

Bestimmung des Einbaus von Fluoreszenz-Farbstoffen in cDNA mittels der Eppendorf UVette® und des Eppendorf BioPhotometer plus sowie Verwendung der gemessenen Proben für Microarray-Analysen

Ludwig Eichinger¹ und Lorna Moll¹, Martin Armbrrecht²

Zusammenfassung

Mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte cDNA-Proben konnten mit Hilfe des BioPhotometer plus und der Eppendorf UVette problemlos photometrisch gemessen werden. Dabei lagen die gemessenen Absorptionen durch den gewählten Lichtweg von 10 mm deutlich im gut reproduzierbaren Bereich für solche Messungen (> 50 mE). Bei den Experimenten konnte eine gute Korrelation zwischen dem gemessenen FOI und der Signalstärke auf dem Microarray festgestellt werden. Demnach konnte davon ausgegangen werden, dass ein Qualitätsverlust der Probe durch die Messungen selbst oder durch Resorption in der UVette zu vernachlässigen war.

Das System aus BioPhotometer plus und UVette eignet sich somit optimal für die reproduzierbare Qualitätsüberprüfung von mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten cDNA-Sonden.

Einleitung

Die vollständige Entschlüsselung der Genomsequenz eines Organismus ist nur der Anfang der schwierigen Aufgabe, die Funktionen aller Gene eines Organismus zu begreifen. Neue Werkzeuge wie „DNA-Microarrays“ haben die Molekularbiologie revolutioniert, da sie die gesamte zur Verfügung stehende Sequenzinformation für die funktionelle Analyse nutzen können. Mit Hilfe von DNA Microarrays können die komplexen Regulationsnetzwerke eines lebenden Organismus, die z.B. als Antwort auf sich ändernde Umweltbedingungen aktiviert werden, besser verstanden werden [1, 2].

Der Prozess zur Erzeugung eines DNA-Microarrays ist jedoch kosten- und arbeitsintensiv, da für das gesamte Genom eines Organismus die Auswahl und Produktion von tausenden von DNA-Proben durchgeführt werden müssen. Diese werden mittels eines Roboters in hochdichter Anordnung auf Glaträger gedruckt, die dann für die Hybridisierung der markierten cDNA-Proben zur Verfügung stehen. Auch die Gewinnung der RNA, die reverse Transkription in cDNA und die Fluoreszenzmarkierung bis hin zur abschließenden Hybridisierung der cDNA-Proben mit dem Microarray ist zeitintensiv und teuer.

Darüber hinaus muss bedacht werden, dass die so erzeugten Primärdaten nur die Basis für weitergehende Analysen darstellen. Aus diesem Grund ist eine Qualitätskontrolle der verschiedenen Schritte von großer Bedeutung. Um entscheiden zu können, ob eine Fortführung des Experiments sinnvoll ist, haben wir mittels der Eppendorf UVette und des BioPhotometer plus den Einbau von Fluoreszenzfarbstoffen in cDNA quantifiziert und die gemessenen Proben anschließend für Microarray-Analysen verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Einbaurate zuverlässig bestimmt werden kann und die Proben ohne Qualitätsverlust für nachfolgende Hybridisierungen verwendet werden können.

Die Einbaurate „Moleküle Farbstoff pro Anzahl Nukleotide“ wird als FOI (Frequency of Incorporation) bezeichnet und mit der Einheit „Moleküle/kb“ bzw. „pmol/µg“ angegeben. Grundsätzlich sollten nur Sonden für Microarrays verwendet werden, die einen FOI-Wert von mindestens 15 Moleküle/kb aufweisen. Um die FOI-Werte der im Labor generierten cDNA-Proben zu bestimmen, wurde das neue Eppendorf BioPhotometer plus verwendet. Dabei war es uns auch wichtig zu testen, ob die jeweiligen photometrischen Ergebnisse mit den Signalen auf dem Microarray korrelieren.

1) Institut für Biochemie I, Medizinische Fakultät, Universität zu Köln, 50931 Köln

2) Eppendorf AG, 22331 Hamburg

Das BioPhotometer plus ist besonders gut für die Überprüfung von cDNA-Proben geeignet, da nach Messung der Absorption alle wichtigen Qualitätsparameter wie die Farbstoff- und cDNA-Konzentration sowie der daraus resultierende FOI-Wert automatisch berechnet und anschließend übersichtlich in einem Ergebnisdisplay angezeigt werden. Häufig werden fluoreszenz-markierte Biomoleküle in sehr kleinen Volumina und darüber hinaus in geringen Konzentrationen gemessen. Verwendet werden dabei in der Regel Mikroliter-Messzellen oder auch Spektrophotometer wie das ND-1000 von Nanodrop® (ThermoScientific®), die in der Lage sind, direkt Volumina von 1 µl oder weniger zu messen. Bei gering konzentrierten Proben wird dabei unterhalb der Nachweisgrenze des Photometers gemessen. Die Messungen sind daher nicht immer reproduzierbar, und es können dann keine zuverlässigen Aussagen bezüglich der Einbaurate des Farbstoffes getroffen werden, da die für die Messung verwendeten optischen Schichtdicken von 1 mm oder weniger für gering konzentrierte Proben nicht geeignet sind. Wir schlagen hier einen alternativen Weg vor, bei dem die markierten Sonden in einem größeren Messvolumen unter Verwendung einer Küvette mit größerer optischer Schichtdicke (10 mm) überprüft werden, um auch gering konzentrierte Proben mit guter Reproduzierbarkeit messen zu können. Die Verwendung eines 10-fach längeren Messweges ergibt nämlich auch eine 10-fach höhere Extinktion. Aus diesem Grund wurden alle Messungen in der Eppendorf UVette durchgeführt. Die Eppendorf UVette ist eine UV-transparente Mikroküvette, in der Volumina von nur 50 µl mit einer optischen Schichtdicke von 10 mm gemessen werden können. Die Einmalküvetten aus Kunststoff sind einzeln verschweißt und frei von DNasen, RNasen, DNA, RNA und Protein. Die Proben wurden unverdünnt in der UVette gemessen und für die nachfolgenden Microarray-Experimente direkt weiterverwendet. Dabei stellte sich auch die Frage, ob die Messung mit UV-Licht im BioPhotometer plus und/oder eine mögliche Resorption in der UVette einen Qualitätsverlust der Probe zur Folge haben würde.

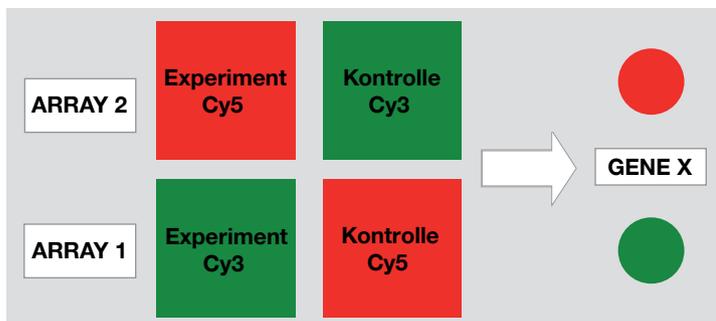


Abbildung 1: Schema des Dye-Swaps. cDNA aus unbehandelten und behandelten Zellen wird jeweils sowohl mit Cy3 als auch Cy5 markiert. In diesem Beispiel erscheinen hochregulierte Gene in der Auswertung bei der einen Kombination rot (Array 1) und bei der anderen grün (Array 2).

In der vorliegenden Anwendung ist ein cDNA Microarray des Organismus *Dictyostelium discoideum* verwendet worden. Es handelt sich hierbei um eine im Waldboden lebende Amöbe, die viele zu Säugerzellen ähnliche biologische Prozesse aufweist. *D. discoideum* erlaubt die Untersuchung zentraler biologischer Fragen mit Hilfe molekularbiologischer, zellbiologischer, biophysikalischer und biochemischer Methoden. Neben Untersuchungen von Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen wird *D. discoideum* besonders bei der Analyse der amöboiden Zellbewegung und der Zytoskelettorganisation eingesetzt [3]. Das 34 Mb große Genom dieses Organismus ist auf sechs Chromosomen verteilt und kodiert für etwa 12.000 Gene [4].

Material und Methoden

RNA aus *D. discoideum* wurde mit dem Qiagen RNeasy® Mini kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) unter Verwendung des Protokolls für zytoplasmatische RNA-Isolierung isoliert. Für die Generierung der Zielproben wurde der FairPlay™ Microarray Labeling Kit (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet. Es wurden 20 µg Gesamt-RNA in Anwesenheit von aminoallyl-dUTP in cDNA umgeschrieben. Diese wurde anschließend mit aktiviertem CyTM3 und CyTM5 (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) markiert [5]. Die photometrische Bestimmung des FOI wurde mit dem neuen Eppendorf BioPhotometer plus unter Verwendung der Methoden Dye550-ssDNA (Cy3) bzw. Dye650-ssDNA (Cy5) durchgeführt. Dabei wurden die Absorptionen der Fluoreszenz-Farbstoffe Cy3 und Cy5 bei 550 nm bzw. 650 nm und die der cDNA bei 260 nm gemessen. Der FOI-Wert wurde über vorprogrammierte Methoden berechnet, wobei gleichzeitig die Menge an cDNA und Fluoreszenz-Farbstoff bestimmt wurde. Für die Berechnung des FOI-Wertes des Farbstoffes im BioPhotometer plus wurden die in Tabelle 1 gezeigten Berechnungsfaktoren verwendet. Alle Messungen erfolgten in der Eppendorf UVette. Bei den Hybridisierungen wurden so genannte „DyeSwaps“ durchgeführt, um Farbstoffartefakte auszuschließen. RNA wurde aus behandelten und unbehandelten Zellen isoliert und jeweils sowohl mit Cy3 als auch mit Cy5 markiert. Die zugehörigen Cy3- und Cy5-markierten Sonden wurden anschließend gemischt und mit zwei Microarrays hybridisiert. Im Microarray-Experiment überwiegt dann bei einem hochregulierten Gen bei der einen Kombination die Cy3- und bei der anderen die Cy5-Fluoreszenz-Markierung (siehe Schema in Abbildung 1).

Tabelle 1: Berechnungsfaktoren für die Konzentration von ssDNA, Cy3 und Cy5.

Extinktion	ssDNA	Cy3	Cy5
1	40 ng/µl	6.7 pmol/µl	4 pmol/µl

Microarrays wurden mit einem ScanArray®4000XL ausgelesen und mit ScanArray® Express v3.0 ausgewertet (PerkinElmer Life Sciences, Wesley, USA). Der hier verwendete *D. discoideum* Microarray enthält partielle Sequenzen von 450 charakterisierten Genen und ca. 5.400 nicht redundanten ESTs (Expressed Sequence Tags) aus dem *Dictyostelium* cDNA Projekt [6]. Eine komplette Beschreibung des Microarrays ist auf der Webseite von GEO (Gene Expression Omnibus; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>; accession number GPL1972) accession number GPL1972) verfügbar.

Ergebnisse und Diskussion

Die Prozessierung der cDNA-Proben für die Microarray-Experimente ist zeitaufwändig und die Herstellung von Microarrays kostenintensiv. Um zu vermeiden, dass wertvolle Arrays nach der Hybridisierung auf Grund eines zu geringen FOI-Wertes und damit einer unzureichenden Markierungsdichte nicht ausgewertet werden können, empfiehlt es sich, die Proben vor der Weiterverarbeitung diesbezüglich photometrisch zu untersuchen. Die markierten Sonden liegen meist in geringen Mengen vor, so dass wenig Probenmaterial für diese Messungen abgezweigt und anschließend verworfen werden kann. In der Regel sind es nicht mehr als 3 µl Probenvolumen, mit denen eine Qualitätskontrolle der Sonden durchgeführt werden kann. Mittlerweile gibt es einige Spektrophotometer auf dem Markt (ND-1000, Nanophotometer in Kombination mit einer Mikrolitermesszelle), bei denen geringe Mengen an Flüssigkeit für die Messung ausreichend sind. Problematisch ist jedoch, dass in diesen Geräten mit optischen Schichtdicken von 0,2 mm bzw. 1 mm gemessen wird, da in der Regel die cDNA-Proben nach Markierung mit Fluoreszenz-Farbstoff in sehr niedrigen Konzentrationen

von wenigen ng pro µl vorliegen. Wenn solche Proben mit einer Schichtdicke von 10 mm gemessen würden, läge der Messbereich bei 50 bis 200 mE. Das entspricht bei den handelsüblichen Spektrophotometern dem unteren Bereich, in dem Messungen mit guter Reproduzierbarkeit gerade noch möglich sind. Bei Schichtdicken von 0,2 mm bzw. 1 mm würden bei Messungen von mit Fluoreszenz-Farbstoff markierten Sonden rechnerisch Absorptionswerte von 1 bis 4 mE bzw. 5 bis 20 mE resultieren. Dies ist für eine reproduzierbare Bestimmung der Einbauraten definitiv zu wenig. Um in einen photometrisch sinnvollen Messbereich zu gelangen, wurde in unserem Experiment der gesamte Ansatz mit der markierten cDNA in der Eppendorf UVette gemessen und die Proben anschließend direkt für die Microarray-Hybridisierung verwendet. Der Vorteil dieses Vorgehens liegt darin, dass die Absorptionen mit einer optischen Schichtdicke von 10 mm bestimmt werden und damit die Einbauraten des Fluoreszenz-Farbstoffs auch bei gering konzentrierter cDNA reproduzierbar gemessen werden können.

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der photometrischen Auswertung der markierten cDNA aus unbehandelten (Kontrolle) und behandelten (Experiment) Zellen. Bestimmt wurden die Konzentrationen von Cy3, Cy5 und cDNA aus den jeweils ermittelten Extinktionen bei 550, 650 und 260 nm. Eine zusätzliche Messung bei 280 nm ermöglichte die Bestimmung des Reinheitsquotienten A260/280 der Proben-DNA. Darüber hinaus sind in Tabelle 2 die theoretisch zu erwartenden Absorptionsmessungen bei 0,2 mm bzw. 1 mm Lichtweg aufgezeigt. Dabei zeigt sich, dass sämtliche hier gemessenen Proben bei 0,2 mm oder 1 mm Lichtweg Absorptionswerte unterhalb von 50 mE aufweisen würden. Die Messungen in der UVette (10 mm Lichtweg) liegen hingegen alle über diesem Wert.

Table 2: Photometrische Bestimmung der Absorption von Cy3- und Cy5-markierter cDNA

a) Ergebnisse aus Messung mit 10 mm Lichtweg (reale Messungen im Eppendorf BioPhotometer plus und der UVette)								
cDNA probe	Extinktion 260 nm mE	Extinktion 280 nm mE	Quotient A260/280	Extinktion 550 nm mE	Extinktion 650 nm mE	Konzentration cDNA [ng/µl]	Konzentration Dye [pmol/µl]	FOI [Dye/kb]
Experiment Cy3	125	66	1.88	92	-	4.6	0.616	43
Kontrolle Cy3	121	62	1.96	84	-	4.5	0.562	41
Experiment Cy5	138	71	1.95	-	56	5.1	0.548	35
Kontrolle Cy5	112	56	2.00	-	71	4.2	0.408	32
b) Errechnete Extinktionen bei 1 mm Lichtweg (theoretisch)								
Experiment Cy3	12.5	6.6		9.2	-			
Kontrolle Cy3	12.1	6.2		8.4	-			
Experiment Cy5	13.8	7.1		-	5.6			
Kontrolle Cy5	11.2	5.6		-	7.1			
c) Errechnete Extinktionen bei 0,2 mm Lichtweg (theoretisch)								
Experiment Cy3	2.5	1.32		1.84	-			
Kontrolle Cy3	2.42	1.24		1.68	-			
Experiment Cy5	2.76	1.42		-	1.12			
Kontrolle Cy5	2.24	1.12		-	1.42			

Alle Messungen in Tabelle 2a) wurden mit dem Eppendorf BioPhotometer plus durchgeführt. Die Absorptionswerte des Fluoreszenz-Farbstoffes und der cDNA können hier parallel in einer Messung bestimmt werden. Wie in Abbildung 2 als Beispiel gezeigt, werden über vorprogrammierte Parameter (siehe Tabelle 1) die Konzentrationen beider Komponenten und daraus resultierend der FOI bestimmt und übersichtlich in einem Ergebnisdisplay angezeigt.

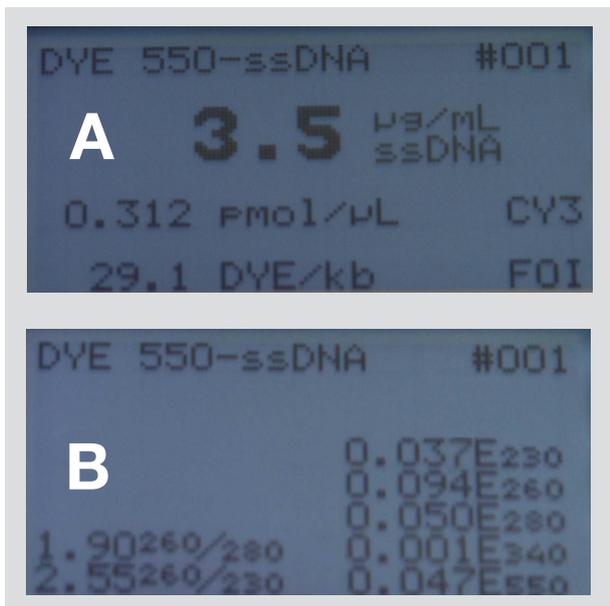


Abbildung 2: Exemplarische Darstellung der Ergebnisse aus den Messungen einer markierten cDNA-Sonde.
 A) Aus den gemessenen Werten werden die Konzentrationen der cDNA, des Farbstoffes und der FOI berechnet und im Ergebnisdisplay angezeigt.
 B) Im Folgedisplay werden zusätzlich die Extinktionsergebnisse bei 230, 260, 280, 340 und 550 bzw. 650 nm angezeigt. Zusätzlich werden die Reinheitsquotienten 260/230 und 260/280 dargestellt, die wichtig für die Beurteilung der Probenqualität vor der Weiterverarbeitung sind.

Nachdem die Einbauraten photometrisch bestimmt worden waren, wurden die Sonden für die Microarray-Hybridisierung eingesetzt. Entscheidend war für uns die Frage, ob die markierten Sonden auch nach den Messungen für die folgenden Microarray-Analysen geeignet sein würden und die Auswertung der Microarrays die erwarteten Signal-Rausch-Verhältnisse ergeben würde. Die Signale der Fluoreszenz-Farbstoffe wurden wie in „Material und Methoden“ erläutert ausgewertet. Dabei wurden jeweils Bilder für Cy3 bzw. Cy5 gewonnen. In Abbildung 3 sind die sich entsprechenden Ausschnitte von zwei verschiedenen „Slides“ zu sehen.

Gezeigt ist jeweils das Cy3- und das Cy5-Signal sowie die Überlagerung der beiden Signale. Desweiteren zeigt Abbildung 3 die Überkreuzmarkierung (dye swap) der jeweiligen Proben: cDNA aus unbehandelten Zellen (Kontrolle) ist sowohl mit Cy5 (obere Reihe) als auch mit Cy3 (untere Reihe) markiert worden.

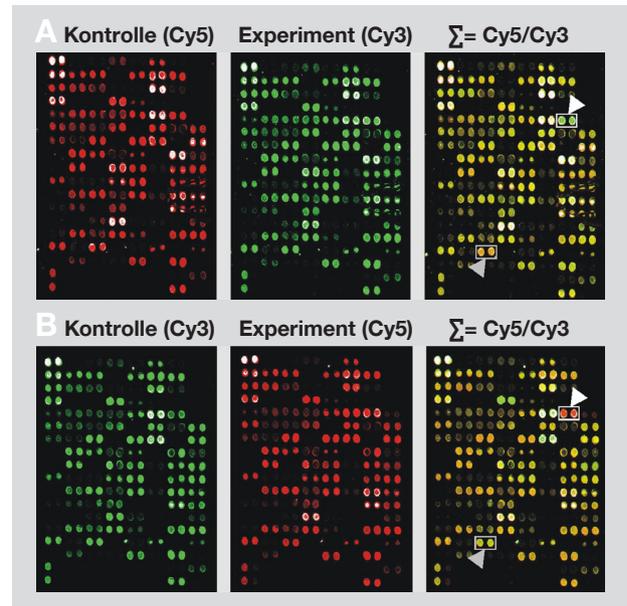


Abbildung 3: Ergebnis der Hybridisierung des *D. discoideum* Microarrays mit markierten Sonden nach Messung der cDNA- und Farbstoffkonzentration mit dem BioPhotometer plus. Entsprechende Bereiche von zwei Microarrays aus zwei unabhängigen Hybridisierungen (dye swap) sind gezeigt.
 A) Markierung der Kontroll-cDNA mit Cy5 und der Experiment-cDNA mit Cy3. Die weiße und graue Pfeilspitze weisen auf ein hoch- (grün) bzw. abreguliertes (rot) Gen hin.
 B) Markierung der Kontroll-cDNA mit Cy3 und der Experiment-cDNA mit Cy5. Die weiße und graue Pfeilspitze weisen auf dieselben Gene wie in A hin, die auch hier hoch- (rot) bzw. abreguliert (grün) sind.

Der „dye swap“ zeigt, dass die differentiell regulierten Gene im übereinandergelagerten Bild in A bzw. B (weiße und graue Pfeilspitze) kein Farbstoffartefakt sind: Somit erscheinen hochregulierte Gene in A grün und in B rot (weißer Pfeil) und herunterregulierte Gene in A rot und in B grün (grauer Pfeil). Unsere Ergebnisse zeigten auch, dass für ein und dasselbe „slide“ die Signalstärken der Farbstoffe gut mit ihren gemessenen Einbauraten korrelierten (Daten nicht gezeigt).

Fazit

Die hier dargestellten Experimente zeigen, dass die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten cDNA-Proben mit dem BioPhotometer plus im 10 mm Lichtweg der Eppendorf UVette gemessen werden können. Dabei liegen die gemessenen Absorptionen deutlich im Extinktionsbereich für gut reproduzierbare Messungen (> 50 mE). Würden dieselben Proben photometrisch mit 1 bzw 0,2 mm Lichtweg gemessen werden, würden die Extinktionswerte im Bereich weniger mE liegen und damit mit nur geringer Reproduzierbarkeit gemessen werden können.

Um genügend Probe für die Messung im 10 mm Lichtweg einsetzen zu können, wurde der gesamte Ansatz (50 μ l) mit der markierten cDNA gemessen.

Durch das hervorragende Signal-Rausch-Verhältnis in den anschließenden Microarray-Experimenten zeigte sich, dass die Probe offensichtlich durch die Messung keinen Schaden nahm und eine eventuelle Resorption durch das Plastikmaterial der UVette offensichtlich nicht stattfand oder zu vernachlässigen war.

Die Evaluation der markierten cDNA-Proben erwies sich im BioPhotometer plus als besonders bedienerfreundlich, da hier nicht nur die Konzentration der cDNA und des Farbstoffes gleichzeitig berechnet wird, sondern darüber hinaus auch gleich die Einbaurrate bestimmt wird. Alle Ergebnisse werden in einem übersichtlichen Display angezeigt. Das System aus BioPhotometer plus und UVette eignet sich somit optimal für die reproduzierbare Qualitätsüberprüfung von Fluoreszenz-Farbstoff markierten cDNA-Sonden.

Referenzen

- [1] Farbrother P., Wagner, C., Na, J., Tunggal, B., Morio, T., Urushihara, H., Tanaka, Y., Schleicher, M., Steinert, M and Eichinger, L. (2006) *Dictyostelium* transcriptional host cell response upon infection with *Legionella*. *Cellular Microbiology* 8: 438-456.
- [2] Na, J., Tunggal, B. and Eichinger, L. (2007) STATc is a major regulator of the transcriptional response to hyperosmotic shock. *BMC Genomics*, 8: 123.
- [3] Eichinger, L. (2003) Revamp a model – status and prospects of the *Dictyostelium* genome project. *Curr. Gen.*, 44: 59-72.
- [4] Eichinger, L., Pachebat, J.A., Glöckner, G., Rajandream, M-A., Sucgang R. et al., (2005) The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 435: 43-57.
- [5] Kaul M. and Eichinger, L. (2006) Analysis of gene expression using cDNA microarrays. *Methods Mol. Biol.*, 346: 75-93.
- [6] Urushihara, H., Morio, T., Saito, T., Kohara, Y., Koriki, E., Ochiai, H., et al (2004) Analyses of cDNAs from growth and slug stages of *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res.* 32: 1647-1653. Print 2004.

Bestellinformationen

Product	Description	Order no. international
BioPhotometer plus	230 V / 50-60 Hz Netzstecker Europa, weitere Netzanschlussvarianten erhältlich	6132 000.008
Thermodrucker DPU 414	Inkl. Netzteil und Druckerkabel 230 V	6131 011.006
Thermopapier	5 Rollen	0013 021.566
UVette®	Original Eppendorf Kunststoffküvette, einzeln verpackt, direkt im BioPhotometer verwendbar, zertifiziert RNase-, DNA and proteinfrei, 80 Stück	0030 106.300
UVette® routine pack	Eppendorf Quality Reinheitsgrad, wiederverschließbare Box 200 Stück	0030 106.318
Kuvettenständer	Für 16 Küvetten	4308 078.006

Eppendorf® und UVette® ist eine eingetragene Marke der Eppendorf AG
 Cy™3 and Cy™5 ist eine geschützte Marke von GE Healthcare.
 Implen® ist eine eingetragene Marke der Implen GmbH.
 Nanodrop® ist eine eingetragene Marke von Nanodrop Technologies
 ThermoScientific® ist eine eingetragene Marke von Thermo Scientific.
 ScanArray® ist eine eingetragene Marke von PerkinElmer, Inc.
 RNeasy® ist eine eingetragene Marke der Qiagen GmbH
 FairPlay™ ist eine geschützte Marke der Stratagene Europe.

eppendorf
In touch with life

Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH · Peter-Henlein Str. 2 / 50389 Wesseling-Berzdorf · Deutschland

Tel: +49 2232 418-0 · Fax: +49 2232 418-155 · E-mail: vertrieb@eppendorf.de · www.eppendorf.de

Eppendorf Austria · Brünner Straße 73 · 1210 Wien · Österreich

Tel: +43 1 29017560 · Fax: +43 1 290175620 · E-mail: office@eppendorf.at · www.eppendorf.at

Vaudaux-Eppendorf AG · Im Kirschgarten 30 · 4124 Schönenbuch · Schweiz

Tel: +41 61 482 1414 · Fax: +41 61 482 1419 · E-mail: vaudaux@vaudaux.ch · www.eppendorf.ch

Application Support Tel: +49 1803 666 789 · E-mail: support@eppendorf.com