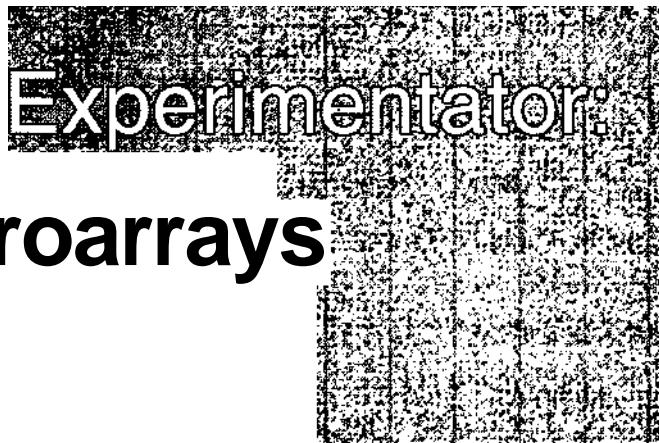


Hans-Joachim Müller, Thomas Röder

Microarrays



11

iMSSM&s



Spektrum
KJCAKADEMISCHER VERLAG

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	V
Vorwort	VII
Abkürzungen	IX
1 Einleitung	1
1.1 Terminologie	2
1.2 Entwicklung der Microarrays	3
2 Anwendungen	7
2.1 Wissenschaftliche Fragestellung	7
2.2 Das pharmazeutische Ziel	10
2.3 Die Anforderungen der biotechnologischen Firmen	12
3 Technologie	15
3.1 Protein-Microarrays	15
3.1.1 Gen- und Proteinexpression	15
3.1.2 Proteinallerlei: vom Molekül zum Biochip	24
3.1.3 Proteinchips	40
3.2 Nucleinsäure-Microarrays	54
3.2.1 Hybridisierungssonden	55
3.2.2 Geringe RNA-Mengen, was nun?	62
3.2.3 Herstellung von DNA-Microarrays	70
3.3 Microarray-Detektion	75
3.3.1 Licht und Strahlung	76
3.3.2 Leuchtende Fluorophore	78
3.3.3 Energieresches Laserlicht	83
3.3.4 Funktionsweise der Microarray-Scanner	86
3.3.5 Funktionsweise der Microarray-Imager	90
3.3.6 Dynamic Range	91
3.3.7 Pixel und Spots	92
3.4 Microarray-Markierungssysteme	94
3.4.1 Tyramide-Signal-Amplification	94
3.4.2 Dendrimere	95
3.4.3 Quantum-Dots	96
3.4.4 Chemilumineszenz	98
3.4.5 Radioaktivität	99
3.4.6 Time-Resolve-Fluorescence	99
4 Instrumentation und Software	105
4.1 Microarray-Spotter	106
4.1.1 Mechanisches Contact-Spotting	109

4.1.2	Piezo-Dispenser-Technologie	112
4.1.3	Grids und Spots	115
4.2	Digitalisierung - Die Microarray-Scanner	116
4.2.1	Der Microarray-Imager	117
4.2.2	Der Microarray-Scanner	117
4.3	Microarray-Software und Dokumentation	117
4.3.1	Dokumentation der Microarray-Experimente	118
4.3.2	Design des Experiments	120
4.3.3	Absicherung der Ergebnisse	121
4.3.4	Microarray-Software	123
4.3.5	Vergleich von Expressionsdaten	129
4.3.6	Weitergehende Analyse	130
4.4	Zusätzliches Labor-Equipment und Laboranforderungen für die Microarray-Applikation	136
4.4.1	Verbrauchsmaterial	136
4.4.2	Weitere hilfreiche Laborgeräte	137
4.5	Reinraum-Technologie	137
4.5.1	Reinheitsklassen	138
4.5.2	Reinraum-Systeme	139
5	Die Microarray-Versuchsdurchführung	143
5.1	Isolierung und Vorbereitung der Nucleinsäuren	143
5.1.1	Isolierung von RNA	143
5.1.2	mRNA-Isolierung aus Eukaryoten	144
5.1.3	mRNA-Isolierung aus Bakterien	144
5.1.4	Sondenherstellung mithilfe der cDNA-Synthese	145
5.1.5	Hybridisierung auf dem DNA-Biochip	146
5.1.6	Prä-Amplifizierung mithilfe der T7-RNA-Polymerase	146
5.1.7	Konstruktion der Microarray-Proben	148
5.1.8	Quantifizierungen - Überprüfungen - Sicherheiten	149
5.1.9	Hybridisieren der Proben	149
5.1.10	Poly-L-Lysin-Beschichtung	151
5.2	Proteinarray-Protokolle	151
5.2.1	Proteinarray-Puffer	152
5.2.2	Nachweis mit Antikörpern	154
5.2.3	Proteinkinase-Array: Nachweis mit ^{33}P	155
6	Höchtdurchsatz-Screening	157
6.1	Laborautomation	158
6.1.1	Laborautomationssoftware	160
6.1.2	Probenaufbereitung	161
6.1.3	Analyse und Auswertung	163
6.2	Drug-Target-Screening	164
6.3	Klinische Chemie und Genetic-Screening	165
7	Datenbank-Recherche und Patente	169
7.1	Datenbank-Recherche	169

7.2	Patente	170
7.2.1	Patent-Recherche	172
7.2.2	Patentrechtlich geschützte Technologien	179
7.3	Marken und Warenzeichen	182
 Zukunftsansichten		185
8.1	Technische Entwicklungen	185
8.2	Anforderungsprofile	187
8.3	Der Schluss vom Schluss	189
 Appendix		191
9.1	Allgemeine Puffer	191
9.1.1	Spotting-und Waschpuffer	191
9.1.2	Blocklösungen	191
9.1.3	Hybridisierungslösungen	192
9.2	Formeln zur Berechnung der Annealing-Temperatur von Oligonucleotiden	192
9.2.1	Formel für Oligonucleotide bis 15 Basen	192
9.2.2	Formel für Oligonucleotide von 20 bis 70 Basen	192
9.3	Mol-Angaben und Berechnungen	192
9.3.1	Definition des Mols	192
9.3.2	Definition der molaren Masse und Molarität	192
9.3.3	pmol-Mengenangaben für Nucleinsäuren	193
9.3.4	Definition der Einheit ‚Dalton‘	194
9.3.5	pmol-Mengenangaben für Proteine und Peptide	194
9.4	Kalkulation der Microarray-Spot-Fläche	195
9.5	Kalkulation der Microarray-Spot-Dichte	195
9.5.1	Spot-Dichte bezogen auf Center-To-Center-Distanz	195
9.5.2	Spot-Dichte bezogen auf Anzahl der absoluten Spots pro cm ²	195
9.6	Kalkulation der Fluorophore- oder Target-Dichte	196
 Finnensverzeichnis		197
 WEB-Links		201
 Sachverzeichnis		203