

Hans-Joachim Müller, Thomas Röder

Experimentator: Microarrays

ilMSsM&s

11



ELSEVIER
SPEKTRUM
AKADEMISCHER
VERLAG

Spektrum
AKADEMISCHER 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 Energiereiches 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	Höhdurchsatz-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
Zukunftsaussichten		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
Finnenverzeichnis		197
WEB-Links		201
Sachverzeichnis		203