

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 Proteinallergie: 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-Amplifikation	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	Hochdurchsatz-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
8	Zukunftsaussichten	185
8.1	Technische Entwicklungen	185
8.2	Anforderungsprofile	187
8.3	Der Schluss vom Schluss	189
9	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
	Firmenverzeichnis	197
	WEB-Links	201
	Sachverzeichnis	203