

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine neue Methode zur Detektion von SNPs mit Hilfe von Oligonukleotid-Mikroarrays beschrieben. Diese Methode stützt sich auf die Allelspezifische Elongation von immobilisierten Oligonukleotiden, bei der ein Fluoreszenzmarkiertes Nukleotid (Cy3-dUTP) eingebaut und mittels konfokalem Laser Scanner detektiert wird. Um den Ertrag an verlängertem Produkt zu steigern, wurden mehrere Zyklen bestehend aus einem Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsschritt durchgeführt. Humane mitochondriale DNS wurde als Modellsystem verwendet und in der Reaktion verwendete Einzelstrang DNS Sonden wurden auf zwei verschiedenen Wegen hergestellt. Hierbei handelte es sich um asymmetrische PCR Produkte und Exonuklease-behandelte PTO-modifizierte PCR Produkte. Beide Sonden erwiesen sich als brauchbar für den Einsatz im SNP Detektions System. Es wurde gezeigt, dass mit einem asymmetrischen 426 bp PCR Produkt neun SNPs parallel detektiert werden können. Zur Herstellung des asymmetrischen Produktes reichte der Einsatz eines einzigen Oligonukleotides in der PCR Reaktion aus. Als Matrize diente ein 426 bp PCR Produkt. 46 von 48 SNPs konnten durch den Einsatz von 3 asymmetrischen multiplex PCR Produkten nachgewiesen werden. Der Nachteil von asymmetrischen PCR Reaktionen ist die schwierige Beurteilung von multiplex Reaktionen, weil die asymmetrischen PCR Produkte als ein Schmier von Banden im Agarosegel erscheinen. Die Verwendung von Exonuklease-behandelten PTO-modifizierte PCR Produkten als Sonde ist deshalb vorteilhaft. Mit dem Einsatz 5 solcher Produkte einer Länge von 2,5 bis 4,4 kb konnten 44 von 46 zufällig verteilten mitochondrialen SNPs typisiert werden. Diese 5 DNS-Sonden decken zusammen das mitochondriale Genom vollständig ab. Es konnte ermittelt werden, dass Einzelstrang-Sonden dieser Art bis zu einer Größe zwischen 4,4kb und 5,7kb in der Primer-Elongations-Reaktion eingesetzt werden können. Das hier beschriebene Verfahren vereinfacht ausserdem die PCR Amplifikation von SNP Loci, welche einen entscheidenden Engpaß bei Microarray-basierten SNP-Typisierungs Methoden in hohem Durchsatz dargestellt.