

Entwicklung eines neuartigen PCR basierten Biochips



Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von

Daniel Lehmann

aus Berlin

Januar 2008

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2003 bis Dezember 2007 am Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin angefertigt. Der Verfasser versichert, die Arbeit eigenständig durchgeführt und alle Hilfsmittel angegeben zu haben.

Gutachter: Professor Dr. Volker A. Erdmann

Gutachter: Professor Dr. Gerhard Multhaup

Disputation am 19.05.2008

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Vorteile der Parallelisierung und Miniaturisierung	3
1.2 Die DNA Chip	5
1.2.1 Fotolithografische Synthese	6
1.2.2 Immobilisierung von vorgefertigten DNA Molekülen auf einem Chip	7
1.3 Proteinchips	8
1.4 Lab on Chip	9
1.5. Aufgabenstellung	12
2. Methoden	13
2.1 Methoden für die Zellanzucht	13
2.1.1 Anzucht von Mikroorganismen in Flüssigkulturen	13
2.1.2 Herstellung von Agarplatten	13
2.1.3 Herstellung von Glycerinkulturen	13
2.1.4 Herstellung von kompetenten Zellen	14
2.2 Klonierung	14
2.2.1 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	14
2.2.2 Dephosphorilierung	15
2.2.3 Phosphorilierung	15
2.2.4 DNA Ligation	16
2.2.5 Transformation	16
2.3 Molekularbiologische Methoden	17
2.3.1 Isolierung von Plasmid DNA	17
2.3.2 Präzipitation von Nukleinsäuren	18
2.3.3 Sequenzierung	18
2.3.4 Gelelektrophorese	19
2.3.4.1 Agarosegelelektrophorese	19
2.3.4.2 Elution aus nativen Agarosegelen	20
2.3.4.3 Polyacrylamidgel Elektrophorese (PAGE)	20
2.3.4.4 SDS Polyacrylamidgel Elektrophorese	21
2.3.4.5 Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen	24
2.3.5 Gelfiltration	24
2.3.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	25
2.3.7 Reale Time PCR	27
2.3.8 Aufreinigung von PCR Produkten	28

2.4 Konzentrationsbestimmung der DNA	29
2.4.1 Fotometrische Methode	29
2.4.2 Bestimmung mittels Agarosegelelektrophorese	30
2.4.3 Bestimmung mit Pico Green	30
2.5 <i>In vitro</i> -Proteinsynthese	31
2.6 Fällung von Proteinen	34
2.6.1 Fällung mit Trichloressigsäure (TCA)	34
2.6.2 Fällung mit Aceton	34
2.7 Detektion von β -Strahlung	35
2.7.1 Szintillationszählung	35
2.7.2 Autoradiografie	35
2.8 Methoden für die Kompatibilitätsuntersuchungen	36
2.9 Methoden für die Silanisierungsreaktionen	37
2.9.1 Reinigung Glasoberflächen und Kapillararrays	37
2.9.2 Bestimmung der Silanisierung	38
2.10 Methoden für die Festphasen-PCR	39
2.10.1 Immobilisierung von DNA an eine Glasoberfläche	39
2.10.2 Ermittlung der spezifischen Bindung	40
3. Ergebnisse	41
3.1 Neuartiger Biochip	41
3.2 Auswahl eines geeigneten Chips	45
3.3 Abdichtung des Chips	49
3.4 Wiedergewinnung der Proben	59
3.5 Wiedergewinnung der Proben durch Mikromanipulation	64
3.6 Kompatibilitätsuntersuchungen	66
3.7 Chip PCR	76
3.8 Einzelmolekül PCR	81
3.8.1 Untersuchung des Homo-Tails	83
3.8.2 Herstellung einer Bibliothek	85
3.9 Immobilisierung der Oligonukleotide	87
3.10 Festphasen-PCR	91
3.11 Herstellung der Fragmente für die <i>in vitro</i> -Expression	93
3.12 Zellfreie Proteinsynthese im Chip	94
4. Diskussion	95
4.1 Allgemein	95
4.2 Abdichtung des Chips	96

5.3 Probenrückgewinnung	97
4.4 Miniaturisierung	98
4.5 Inaktivierung der Oberfläche	99
4.6 Chip-PCR	101
4.7 Herstellung der Fragmente für die PCR	102
4.8 Einzelmolekül-PCR im Chip	102
4.9 Immobilisierung von Oligonukleotiden	103
4.10 Festphasen-PCR	104
4.11 Expression im Chip	104
4.12 Ausblick	105
5. Literaturverzeichnis	106
6. Anhang	