

Zusammenfassung

Nach Beendigung der Sequenzierung des humanen Genoms wird sich die Genomforschung auf die Untersuchung von Variationen im humanen Genom konzentrieren. Deshalb sind effiziente Hoch-Durchsatz Genotypisierungstechnologien zur Analyse von DNA-Markern, insbesondere für "single nucleotide polymorphisms" (SNPs) besonders gefragt. Viele Methoden wie DNA-Chips, gel-basierende Verfahren und Prozeduren, die auf Mikrotiterplatten ausgeführt werden, wurden für die SNP-Analyse entwickelt. Keine dieser Methoden kann jedoch mit der schnellen und hochaufgelösten Detektion von Massenspektrometern konkurrieren. Besonders die Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI-MS) hat die Analyse von Proteinen und DNA revolutioniert. Nichtsdestotrotz wurde bald klar, dass eines der prinzipiellen Probleme der DNA-Analyse mittels MALDI-MS darin besteht, eine genügend reine Probe zu gewährleisten. Dies limitiert signifikant den Hoch-Durchsatz, da die Automation mit derzeitigen Aufreinigungsmethoden umständlich und kostspielig ist. Der entscheidende Vorteil der neuen Methoden, die in dieser Arbeit gezeigt werden, besteht in der Verwendung empfindlichkeits-steigernder DNA-Chemie, deren Anwendung als "charge-tagging" bezeichnet wird. Diese DNA-Modifikationschemie wurde in mehrere verschiedene molekularbiologische Verfahren zur Generierung allel-spezifischer DNA-Produkte von SNPs implementiert. Deshalb werden Aufreinigungen und Aufkonzentrationen wie sie jede andere Technologie, die MALDI-MS verwendet, nicht benötigt. Jede der gezeigten Prozeduren beginnt mit einer PCR. Die "GOOD assays" und der vereinfachte "GOOD assay" benötigen eine Primer-Extension für die Generierung allel-spezifischer und ladungs-konditionierter DNA. Zusätzlich sind Prozeduren, die Ligasen oder "Flap"-Endonukleasen für die Generierung solcher Produkte benutzen, gezeigt. Unter allen diesen Methoden ist der vereinfachte "GOOD assay" potentiell der Beste, da dieser mit der kürzesten Reaktionssequenz und völlig ohne Chemie auskommt. Der vereinfachte "GOOD assay" ist eine aufreinigungs-freie, Ein-Topf- und 3-Schritt-Prozedur bestehend aus PCR, Primer Extension und Phosphodiesterase II-Verdau gefolgt von massenspektrometrischer Analyse, während für die "GOOD assays" in einem zusätzlichen Schritt noch eine Alkylierungsreaktion nach dem Phosphodiesterase-

Verdau hinzukommt. Die “GOOD assays” und der vereinfachte “GOOD assay” wurden mit einfachen Pipettierschritten bei kleinst-machbaren Volumina, Inkubationen und thermozyklischen Schritten durchgeführt, und sie wurden erfolgreich in einen automatisierten Prozess für die Hoch-Durchsatz-Genotypisierung von SNPs implementiert.