

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abschnitt 1: Einleitung	1
1.1 Sequenzierverfahren	1
1.2 Fluoreszente DNA-Sequenzierung	2
1.3 Beladung von Trenngelen mit DNA	6
1.4 Zielsetzung	7
Abschnitt 2: Grundlagen	8
2.1 Fluoreszenz	8
2.1.1 Absorption	8
2.1.2 Emission	9
2.1.3 Fluoreszente Farbstoffe	11
2.2 Laser als Anregungslichtquelle	14
2.2.1 Grundlagen des Lasers	14
2.2.2 Eigenschaften von Laserstrahlung	17
2.3 Untergrundstrahlung des Messaufbaus	19
2.4 Desoxyribonukleinsäure (DNA)	21
2.4.1 DNA-Sequenzierung	24
2.5 Elektrophorese	26
2.6 Polymermembranen	31
2.7 Chemische Bindungen und Wechselwirkungen	33
2.8 Elektrophoretische Auflösung	36
2.9 Startzonenbetrachtung der Membranbeladung	38
2.10 Simulation des elektrischen Transferfeldes	40
Abschnitt 3: Praktischer Messaufbau	44

Abschnitt 4:	Experimente und Ergebnisse	50
4.1	Pneumatische Methode zum Beladen von Gelen mit DNA	50
4.2	Methode zum Beladen von Photodioden Arrays mit 0,8 mm weiten Bildpunkten, mittels poröser Membranen	52
4.3	Abhängigkeit der elektrophoretischen (vertikalen) Auflösung und des integrierten Fluoreszenzsignals vom Probenvolumen	55
4.3.1	Methode zur Herstellung kleiner Probenvolumina (0,1 µl)	56
4.3.2	Elektrophoretische Auflösung in Abhängigkeit vom Probenvolumen	57
4.3.3	Integriertes Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit vom Probenvolumen	59
4.4	Erweiterte Auswahl geeigneter Membranen	60
4.4.1	Messungen der, durch unterschiedliche Membranen verursachten, Änderung des Untergrundes des Messaufbaus	60
4.4.2	Messungen bei 488nm (Argon-Laser) Anregungswellenlänge	62
4.4.3	Messungen bei 633nm (He/Ne-Laser) Anregungswellenlänge	63
4.4.4	Erweiterte Auswahl geeigneter Membranen durch Messung der elektrophoretischen Auflösung und des integrierten Fluoreszenzsignals	63
4.5	Abhängigkeit des integrierten Fluoreszenzsignals und der elektrophoretischen Auflösung von der Stärke des elektrischen Transferfeldes	66
4.5.1	Integriertes Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von der Stärke des elektrischen Transferfeldes	67
4.5.2	Elektrophoretische Auflösung für unterschiedlich starke elektrische Transferfelder	69
4.6	Simulation des Migrationsweges der DNA aus der Membran in das Gel zur Optimierung der Membrangeometrie für die Membran Polyethersulfon (PES) durch Berechnung der elektrischen Feldlinien	70
4.6.1	Bestimmung der spezifischen Widerstände, der in die Simulation eingehenden Geometrien	71
4.6.2	Simulationen der Standardmethode zur Beladung von Gelen mit DNA	72
4.6.3	Simulation der Seitenansicht eines Geles mit Membrankamm	73
4.6.4	Simulation der elektrischen Feldlinienverteilung der Eintrittsphase der DNA-Moleküle in das Gel für eine Polyethersulfon-Membran mit gefrästen Zähnen	75

4.6.5	Simulation der elektrischen Feldlinienverteilung der Eintrittsphase der DNA-Moleküle in das Gel, für eine Polyethersulfon-Membran ohne gefräste Zähne	77
4.6.6	Messungen der Eintrittsphase der DNA-Moleküle in das Gel	78
4.7	Automatisierung der Aufnahme von kleinen Probenvolumina (0,1 µl) aus Mikrotiterplatten und deren Abgabe auf Membranen	81
4.7.1	Der Probentransfer	81
4.7.2	Das Robotersystem	82
4.8	Sequenzanalyse-Experiment auf dem Arakis-System	85
4.9	Sequenzanalyse-Experiment auf dem ABI PRISM 377-System	86
Abschnitt 5:	Ergebnisse und Ausblick	89
5.1	Ergebnisse der Arbeit	89
5.2	Ausblick auf weitere Einsatzmöglichkeiten von Membranen in der Genom- und Funktionsanalyse	91
5.3	Alternative Sequenzierungstechniken	91
5.4	Abschlussbemerkungen	93
Abschnitt 6:	Materialien und Methoden	94
6.1	Gel- und Elektrophoresebedingungen	94
6.2	Biologische Proben	96
6.3	Auswertungsprogramme	98
6.4	Membranen	99
6.5	Messgeräte	102
Anhang:		
	Abkürzungen	103
	Literaturverzeichnis	105
	Publikationsliste	111
	Präsentationen	115
	Danksagung	117