

Untersuchungen zur Miniaturisierung der Polymerase Kettenreaktion (PCR) auf der Basis von Mikrochip-Thermocyclern

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

eingereicht am Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Dipl. Ing. (FH) Jana Felbel

geb. am 24. Mai 1977 in Rudolstadt

urn:nbn:de:gbv:3-000011695

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011695>]

überarbeitete Fassung vom 18.04.2007

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Pietzsch
2. Gutachter: Prof. Dr. J. Popp
3. Gutachter: Prof. Dr. R. Rudolph

Datum der Einreichung: 01.09.2006

Datum der Verteidigung: 30.03.2007

*Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems,
das gelöst werden will.*

Galileo Galilei

1	Einleitung	1
1.1	Polymerase Kettenreaktion und Reverse Transkription	3
1.1.1	Das PCR-System p53.....	4
1.1.2	Das PCR-System HPV 16 E6.....	5
1.2	Realtime-Detektion von PCR-Produkten	7
1.3	PCR in Mikrochip-Thermocyclern	9
1.3.1	Prinzip der stationären PCR-Chips	10
1.3.2	Prinzip der Durchfluss-PCR-Chips.....	11
1.4	Zielstellung und Aufgaben der Arbeit.....	12
2	Materialien und Methoden	14
2.1	Geräte	14
2.2	Software	15
2.3	Chemikalien und Biochemikalien.....	16
2.4	Chip-Substrate	17
2.5	Aufbau der verwendeten Mikrochip-Thermocycler	18
2.5.1	Aufbau- und Verbindungstechnik.....	18
2.5.2	Stationäre Oberflächen-Chipthermocycler	19
2.5.3	Glas-Silizium-Durchfluss-Chipthermocycler.....	20
2.5.4	Glas-Glas-Durchfluss-Chipthermocycler.....	21
2.6	Untersuchungen zur PCR-Kompatibilität	22
2.6.1	PCR-Kompatibilität planarer Chipoberflächen	22
2.6.2	PCR-Kompatibilität der Mikrokanäle	22
2.7	Chemische Modifikation der Chipoberflächen.....	23
2.7.1	Oberflächenmodifikation der stationären Chipthermocycler	23
2.7.1.1	Silanisierung	24
2.7.1.2	Polymerbeschichtung	25
2.7.1.3	Oberflächencharakterisierung.....	26
2.7.2	Oberflächenmodifikation der Durchfluss-Chipthermocycler	27
2.8	PCR-Systeme	28
2.9	PCR-Protokolle	29
2.9.1	3-Schritt-Protokolle für die stationäre PCR	29
2.9.2	PCR-Protokoll für die <i>on-Chip</i> -Hybridisierung	30
2.9.3	2-Schritt-Protokoll für die stationäre PCR.....	31

2.9.4	Protokolle für die Durchfluss-PCR im Silizium-Glas-Chipthermocycler.....	31
2.9.5	Protokolle für die Durchfluss-PCR im Glas-Glas-Chipthermocycler.....	32
2.9.6	Protokolle für Reverse Transkription mit PCR (RT-PCR)	33
2.9.6.1	2-Schritt-Protokoll: Kombination RT mit Durchfluss-PCR	33
2.9.6.2	1-Schritt-Protokoll für die Durchfluss-RT-PCR.....	34
2.10	PCR-Produktnachweise	35
2.10.1	Endpunktbestimmungen	35
2.10.1.1	Horizontale Agarosegelelektrophorese.....	35
2.10.1.2	<i>on-Chip</i> -Hybridisierung	36
2.10.2	Realtime-Detektion	38
2.10.2.1	Unspezifische Realtime-Detektion	40
2.10.2.2	Spezifische Realtime-Detektion	40
3	Ergebnisse	42
3.1	Stationäre PCR in Chipthermocyclern.....	42
3.1.1	PCR-Kompatibilitätsuntersuchungen für die Chip-PCR	42
3.1.2	Charakterisierung der modifizierten Chipoberflächen	44
3.1.3	Entwicklung eines stationären PCR-Chipthermocyclers	48
3.1.3.1	Funktionsnachweise der stationären PCR-Chips	49
3.1.3.2	Vergleich der Nachweisgrenzen Tischthermocycler, <i>in-situ</i> -Adapter und PCR-Chip	53
3.1.3.3	Chip-PCR mit unspezifischer Realtime-Detektion der PCR-Produkte	54
3.1.3.4	Chip-PCR mit spezifischer Realtime-Detektion der PCR-Produkte	57
3.1.3.5	Chip-PCR in Kombination mit <i>on-Chip</i> -Hybridisierung	60
3.2	Entwicklung von Chipthermocyclern für die Durchfluss-PCR	61
3.2.1	PCR-Kompatibilitätsuntersuchungen im Mikrokanal	61
3.2.2	Oberflächenmodifikation der Mikrokanäle.....	63
3.2.3	PCR in einem 25-Zyklus-Glas-Silizium-Durchflussschip	64
3.2.3.1	Bestimmung der optimalen Flussraten bei 25 PCR-Zyklen	65
3.2.3.2	Bestimmung der Nachweisgrenzen bei 25 PCR-Zyklen	67
3.2.3.3	Durchfluss-PCR mit vorgeschalteter Reverser Transkription (RT)	69
3.2.4	PCR/RT-PCR in einem 35-Zyklus-Glas-Glas-Durchflussschip.....	70
3.2.4.1	Bestimmung der optimalen Flussraten bei 35 PCR-Zyklen	72
3.2.4.2	Bestimmung der Nachweisgrenzen bei 35 PCR-Zyklen	74
3.2.4.3	RT-PCR im Durchflussscycler	76

4 Diskussion.....	79
4.1 PCR-Kompatibilität und chemische Oberflächenmodifikation	79
4.2 Vergleich der stationären Oberflächen-Chips mit kommerziellen Blockthermocyclern	81
4.2.1 PCR-Effizienz auf stationären Chipthermocyclern	84
4.2.2 Effizienz der Realtime-Detektion auf stationären PCR-Chips	85
4.2.2.1 Gegenüberstellung der Realtime-Detektion mit Sybr Green.....	86
4.2.2.2 Gegenüberstellung der Realtime-Detektion mit TaqMan-Sonden	87
4.2.3 Effizienz der <i>on-Chip</i> -Hybridisierung	89
4.3 PCR in Durchfluss-Chipmodulen	90
4.3.1 PCR-Effizienz im 25-Zyklen-Glas-Silizium-Durchflusschip	91
4.3.2 PCR-Effizienz im 35-Zyklen-Glas-Glas-Durchflusschip	92
4.3.3 RT-PCR-Effizienzen in Durchflusscyclern	94
5 Zusammenfassung.....	96
6 Ausblick.....	98
7 Literatur	99
8 Anhang	105
Abkürzungen.....	115
Danksagung	117

1 Einleitung

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR, engl. polymerase chain reaction) ist eine der am meisten verbreiteten Standard-Methoden in der modernen biomolekularen Analytik. Sie findet in vielen Bereichen, wie beispielsweise der Lebensmittel- und Umweltanalytik, der Forensik oder der medizinischen Diagnostik Anwendung. Im Mittelpunkt steht dabei immer die spezifische Vervielfältigung von DNA-Abschnitten (im Fall der RT-PCR von RNA-Proben).

Seit ihrer „Entdeckung“ im Jahre 1983 durch K.B. Mullis [1] beschäftigt sich eine Vielzahl an Wissenschaftlern weltweit mit der Weiterentwicklung der Methoden, der Erweiterung möglicher Applikationen sowie der effizienteren Nutzung der notwendigen Materialien und Geräte [2]. Ein großer Meilenstein auf diesem Weg war die Verwendung von thermostabilen Polymerasen, deren Aktivität über den gesamten PCR-Prozess stabil bleibt und somit einen kontinuierlichen und leicht automatisierbaren Ablauf zulässt [3]. Die Entwicklung von entsprechenden Biochemikalien zielt im Allgemeinen auf die Verbesserung von Prozessparametern ab, wie kürzere Reaktionszeiten, die Reduzierung von Verbrauchsmaterialien und die Vereinfachung von Arbeitsabläufen (MasterMix-Ansätze).

Ein wichtiger Aspekt der Forschungsarbeiten zur Weiterentwicklung der PCR ist die Geräteentwicklung. Derzeit sind verschiedenste Geräte-Konzepte verfügbar. Am weitesten verbreitet sind dabei die so genannten Blockthermocycler, kommerziell entwickelt und vertrieben von Applied Biosystem, Eppendorf, Corbett Research etc. (Tabelle 1). Daneben gab es erste Umsetzungen von Geräten auf der Basis von Glaskapillaren, welche kleinere Probenvolumen verarbeiten können und schnellere Heizraten erzielen (Light-Cycler, Roche).

Der allgemeine Entwicklungstrend geht derzeit in Richtung schnellerer und kostengünstiger arbeitende Thermocycler mit integrierter Realtime-Detektion. Diese Realtime-Thermocycler ermöglichen eine qualitative und zusätzlich quantitative Aussage über die PCR-Produktbildung während der Amplifikation. Bisher wurde eine qualitative Aussage im Allgemeinen durch eine elektrophoretische Auswertung im Anschluss an die PCR-Reaktion getroffen. Neben der Qualität spielt bei vielen Anwendungen auch die Quantität eine wichtige Rolle. Vor dem Einsatz der Realtime-PCR, war eine annähernde Quantifizierung durch den Vergleich mit Standard-Proben bekannter Konzentrationen möglich. Diese wurden analog zur eigentlichen DNA-Probe mit dem selben Ablauf amplifiziert und anschließend die Produktmengen miteinander vergli-

chen, um auf die unbekannte Ausgangskonzentration der gesuchten DNA-Abschnitte zu schließen. Diese Quantifizierungsmethoden sind allerdings sehr zeitaufwändig.

Tabelle 1 Kurzübersicht der Geräteparameter verschiedener konventioneller Thermocycler für die Polymerase Kettenreaktion

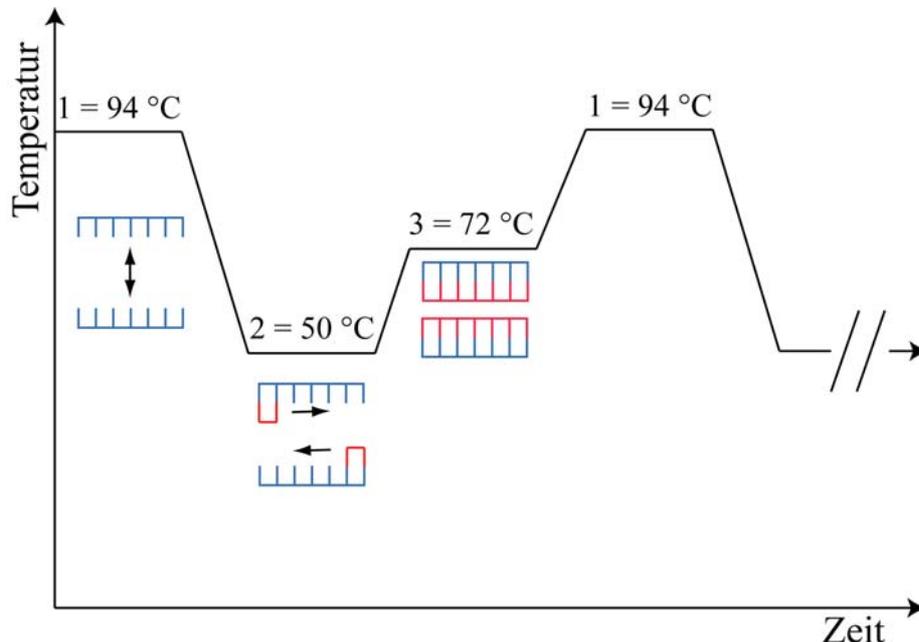
Art	Marke, Typ	Proben- volumen	Heiz- und Kühlraten	Realttime- Detektion
Blockthermocycler mit 200 µl Eppendorf Reaktionsgefäßen	Eppendorf, Mastercycler gradient	10-50 µl	3 K/s und 1 K/s	keine
	Eppendorf, Mastercycler ep realplex4	10-100 µl	6 K/s und 4,5 K/s	4-fach Multiplex
	Applied Biosystems, ABI 7300	20 –100 µl	2,5 K/s	4-fach Multiplex
Rotorthermocycler mit 200 µl Eppendorf Reaktionsgefäßen	Corbett Research, Rotor-Gene 6000	5-100 µl	10 K/s und 5 K/s	5-fach Multiplex
Kapillarthermocycler	Roche, Light Cycler 2.0	20 od. 100 µl	bis zu 20 K/s	6-fach Multiplex

Ein alternativer gerätetechnischer Ansatz ist die Entwicklung von Mikrochip-Thermocyclern, wie er von vielen wissenschaftlichen Arbeitsgruppen weltweit und unter andern auch am Institut für Physikalische Hochtechnologie in Jena verfolgt wird. Bei diesen Entwicklungen steht die Frage der Arbeitsgeschwindigkeit in Kombination mit hoher Mobilität der Geräte für die Vor-Ort-Analytik im Vordergrund. Dabei spielen Parameter wie Heizraten, Leistungsbedarf und Probenvolumen eine entscheidende Rolle. Außerdem besteht eine große Nachfrage nach Geräteentwicklungen für einen hohen Probendurchsatz (High-Throughput-Screening) oder die kontinuierliche Probenanalytik, beispielsweise in der medizinischen Diagnostik oder der Medikamentenherstellung. Im Allgemeinen können die genannten konventionellen Thermocycler derzeit 96 PCR-Proben parallel verarbeiten, in Einzelfällen ist auch eine spezielles Umrüsten zur Verwendung von 384-iger Probenplatten möglich (Speedcycler, Analytik Jena AG). Die kontinuierliche Analyse vor PCR-Proben ist zum jetzigen Stand der Technik mit keinem konventionellen Thermocycler durchführbar.

1.1 Polymerase Kettenreaktion und Reverse Transkription

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist ein enzymatisch katalysierter, Temperaturkontrollierter Prozess und ermöglicht die gezielte Vervielfältigung von Genabschnitten, die in sehr geringen Mengen (eine DNA-Kopie) verfügbar sind [1, 52].

Die PCR verläuft üblicherweise in einem 3-Schritt-Protokoll (Abbildung 1). Dabei erfolgt in einem ersten Schritt die DNA-Denaturierung (Auftrennung des DNA-Doppelstranges in seine beiden Einzelstränge). Daraufhin lagern sich im zweiten Schritt, in der Phase des "Annealings", die Primer an die DNA-Einzelstränge an. Bei den Primern handelt es sich um kurze, zur Zielsequenz komplementäre Einzelstrang-DNA-Moleküle (Oligonukleotide), die den zu amplifizierenden Abschnitt an beiden Seiten flankieren. In einem abschließenden dritten Schritt werden die DNA-Stränge in Gegenwart der DNA-Bausteine (einem Gemisch der Desoxynukleosid-Triphosphate dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und dem Enzym Taq-Polymerase verlängert (Elongation). Durch die zyklische Wiederholung der drei Temperaturschritte erfolgt im idealen Fall (keine Limitierung der einzelnen Reaktionskomponenten) mit jedem PCR-Zyklus eine Verdopplung der vorliegenden DNA-Menge.



- 1 - Denaturierung
- 2 - Annealing
- 3 - Elongation

Abbildung 1 Schematische Darstellung der Funktionsweise der PCR

Aus einer einzelnen DNA-Kopie beim Start der Reaktion, können mit Hilfe der PCR somit nach 25 PCR-Zyklen theoretisch 33 Millionen DNA-Kopien synthetisiert und analysiert werden.

Außer zur Vervielfältigung von DNA kann das PCR-Verfahren grundsätzlich auch zum Nachweis von RNA eingesetzt werden. Hierzu wird dem beschriebenen DNA-Amplifikationsprozess eine Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion vorgeschaltet. Dazu wird aus der RNA mit Hilfe spezifischer Primer und dem Enzym Reverse Transkriptase eine einzelsträngige cDNA hergestellt. Durch den Einsatz von Oligo(dT)-Primern, kann nur mRNA revers transkribiert werden, da diese spezifisch an die polyadenylierten 3'-Enden der mRNA binden.

Für die so genannte Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR) gibt es verschiedene Anwendungsbereiche. Diese Methode lässt sich u.a. zur Genexpressionsanalyse [53], zur mRNA-Quantifizierung, zum diagnostischen Nachweis von Viren [54] oder zur Vervielfältigung spezifischer RNA-Matrizen für die nachfolgende Klonierung [55] einsetzen.

1.1.1 Das PCR-System p53

Als ein PCR-Testsystem für eine mögliche diagnostische Anwendung von Mikrochip-Thermocyclern wurde in der vorliegenden Arbeit der Nachweis eines Genabschnittes (Exon 6) des Protein P53 ausgewählt.

Bei dem Protein P53 handelt es sich um ein Tumorsuppressorprotein, das an definierte Stellen der DNA bindet und im Zellkern vorliegt. Die Entwicklung von unkontrolliert wachsenden, malignen Tumoren stellt einen mehrstufigen Prozess dar, in welchem dem Protein P53 eine entscheidende Rolle zugewiesen wird. Das Gen (Abbildung 2) für das Protein P53 befindet sich auf dem Chromosom 17. Seine Funktion umfasst die Regulation des Zellzyklus im Falle von DNA-Schäden (z.B. durch Bestrahlung, Umwelteinflüsse usw.) in einer betroffenen Zelle [56-59] durch:

- die Arretierung der Zellen in der G1-Zellzyklusphase durch die Verhinderung der DNA-Replikation und Zellteilung
- den Einfluss auf DNA-Synthese und -Reparatur
- die Auslösung des programmierten Zelltods (Apoptose).

Der Wildtyp des P53-Proteins steuert somit nicht nur die Zelldifferenzierung sowie die Zellreifung, sondern verhindert damit auch unkontrolliertes Wachstum mutierter Zellen.

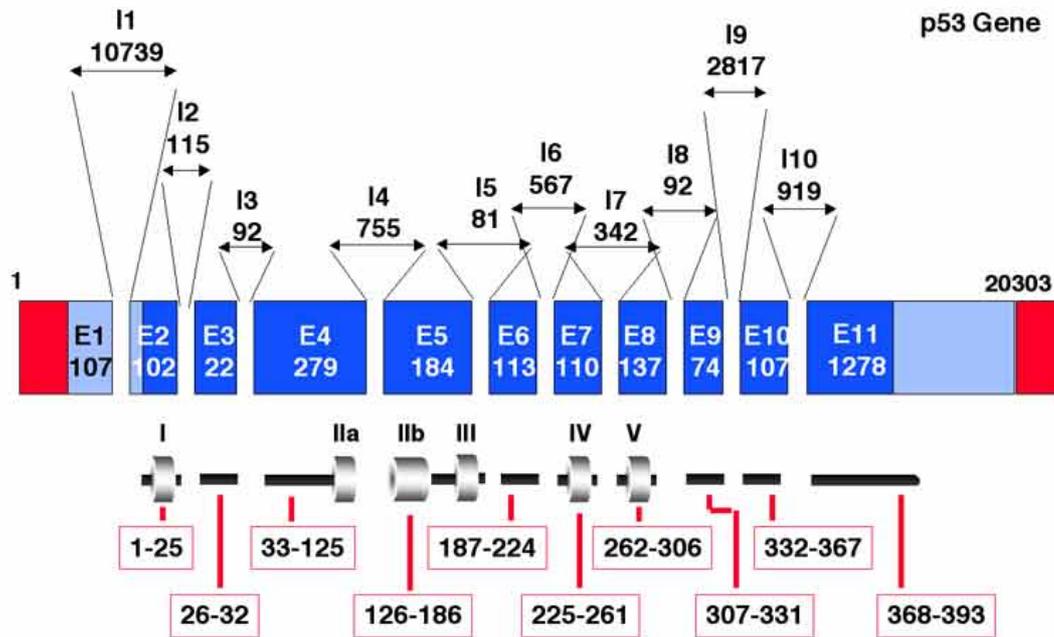


Abbildung 2 Schematische Darstellung des p53 Gens mit der Verteilung und Größenangabe der einzelnen Exons und Introns

Quelle: http://p53.free.fr/p53_Info/gene/p53GENE.html

Mutationen des p53-Gens stellen die häufigste genetische Veränderung bei der Entwicklung und Progression humaner Tumore in verschiedenen Geweben wie Lunge [60], Brust [61], Darm, Leber, Pankreas, Blase, Gehirn, Knochen und hämatopoetischem System dar [62]. Diese Alterationen äußern sich in einer teilweisen oder manchmal vollständigen Eliminierung des p53-Gens, meist jedoch in einer Überexpression des P53-Proteins. Die Überexpression, sowie eine ggf. stark erhöhte Stabilität des mutierten Proteins führen zur massiven Akkumulation der Mutante des P53-Proteins [62, 63]. Neben dem Verlust der wachstumskontrollierenden Eigenschaften des Proteins deuten zahlreiche Forschungsergebnisse auf ein zusätzliches onkogenes Potential einiger P53-Mutanten hin.

Ein wichtiges diagnostisches Mittel ist daher die Suche nach Veränderung im Genom für das Protein P53, um Mutanten zu erkennen und ihre Funktionalität näher zu erforschen. Für diese Forschungsarbeiten ist die PCR bzw. RT-PCR eines der wichtigsten Analyseverfahren.

1.1.2 Das PCR-System HPV 16 E6

Ein weiteres in dieser Arbeit verwendetes PCR-System wurde zum Nachweis eines bestimmten onkogenen Abschnitts (E6) des Genoms vom Typ 16 des Humanen Papillomavirus (HPV) eingesetzt.

Das klinische Erscheinungsbild einer Infektion mit Papillomaviren in Form von gutartigen Tumoren der Haut und der Schleimhaut ist schon seit über 2000 Jahren bekannt. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurden 1950 schließlich Viruspartikel in Hautwarzen und 1968 in Genitalwarzen nachgewiesen. Bei den identifizierenden Partikeln handelte es sich um nicht umhüllte ikosaedrische Viren mit einem Durchmesser von 55 nm, die in ihrem Inneren eine doppelsträngige ringförmig geschlossene DNA mit einer Länge von ca. 8000 Basenpaaren (bp, engl. base pair) enthalten, die mit zellulären Histonen assoziiert ist [64]. Der entscheidende Durchbruch in der Papillomavirusforschung gelang erst mit Hilfe der Molekularbiologie und Gentechnologie. Im Jahr 1980 wurde aus Viruspartikeln Papillomavirus-DNA isoliert und in bakterielle Vektoren kloniert. Diese klonierten viralen Nukleinsäuren konnten als radioaktiv markierte Sonden eingesetzt werden, um eine ganze Reihe maligner Tumoren des Menschen auf die Anwesenheit von Virus-DNA zu untersuchen. Sehr schnell wurde dabei deutlich, dass vor allem Karzinome des Genitalbereiches und Hautkarzinome bei Patienten zu einem hohen Prozentsatz Papillomavirus-DNA enthielten [65].

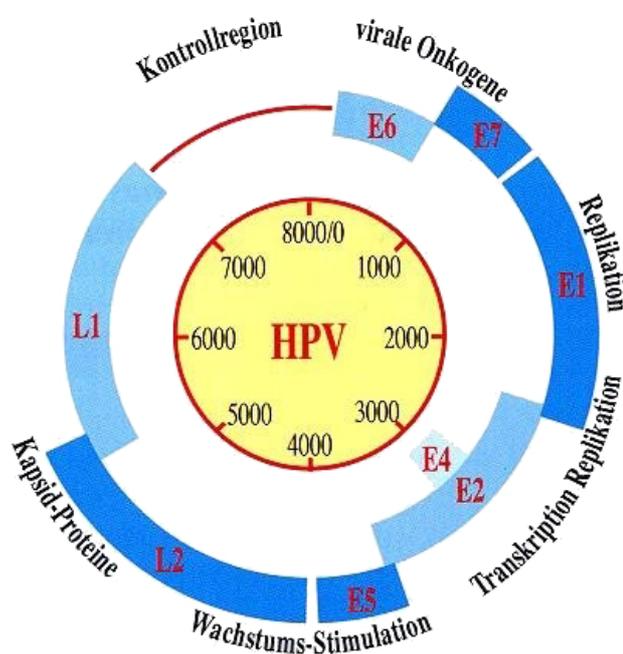


Abbildung 3 Graphische Darstellung der Genomorganisation von humanen Papillomaviren (HPV)

Quelle: <http://www.cervical-cancer.de/hpvariantikel/abb1b.html>

Das virale Genom (Abbildung 3) wird in drei Segmente mit unterschiedlicher Länge und Funktion unterteilt. Der Kontrollbereich (NCR für non coding region) entspricht

etwa 10% der Gesamtgenomgröße und enthält wichtige Steuersequenzen für die koordinierte Genexpression und die Replikation des Virus im differenzierenden Epithel. Die „frühe Region“ enthält vor allem Gene (E1, E2, E5-E7) mit regulatorischen Genprodukten, die bei der Virusvermehrung, aber auch im Prozess der malignen Entartung, eine wichtige Rolle spielen. In der „späten Region“ finden sich die zwei Strukturgene (L1, L2) des Virus, deren Genprodukte das virale Kapsid aufbauen. Die Klassifizierung von mucosal-genitalen HPV erfolgt aufgrund ihres unterschiedlichen onkogenen Potentials in zwei Gruppen: low risk (LR) und high risk (HR) [66]. HPV-HR Typen werden maßgeblich für die Entstehung von Gebärmutterhalskrebs verantwortlich gemacht. Der frühzeitige Nachweis solcher Hochrisiko-HPV-Typen ist daher ein wichtiger Schritt, um eine mögliche Krebserkrankung zu erkennen und entsprechend schnell notwendige therapeutische Schritte einleiten zu können. Neben standardisierten zytologischen Untersuchungen werden zum HPV-Nachweis zusätzlich auch verschiedene PCR-Techniken eingesetzt.

1.2 Realtime-Detektion von PCR-Produkten

Für eine genaue Quantifizierung der PCR-Reaktionen und vor allem für eine Optimierung der Reaktionsbedingungen stellt die Einführung der Realtime-PCR [67] einen besonderen Fortschritt da. Damit ist es möglich, den Amplifikationsprozess in Echtzeit (Realtime) durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen zu beobachten. Prinzipiell gibt es zwei Methoden für die Realtime-Detektion von fluoreszenzmarkierten PCR-Produkten, der Sequenz-unspezifische und der Sequenz-spezifische Nachweis.

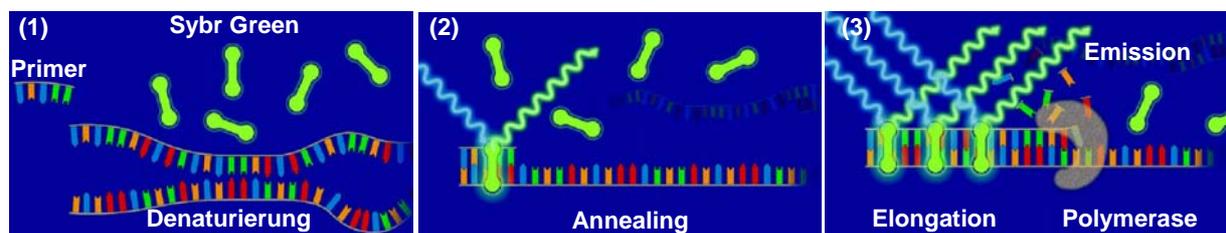


Abbildung 4 (1) Einzelsträngige DNA, Sybr Green liegt nicht gebunden in der Lösung vor \Rightarrow kein Fluoreszenzsignal detektierbar
 (2) Primer binden (Annealing), es entstehen kurze doppelsträngige DNA-Abschnitte, in die sich nur wenig Sybr Green einlagern kann \Rightarrow geringes Fluoreszenzsignal detektierbar
 (3) Strangverlängerung (Elongation), es entstehen pro PCR-Zyklus mehr doppelsträngige PCR-Produkte in die sich Sybr Green einlagern kann \Rightarrow Anstieg des Fluoreszenzsignal detektierbar

Quelle: Hoffmann La Roche

Eine Variante der Realtime-Detektion ist der unspezifische Nachweis von PCR-Produkten unter Verwendung von interkallierenden Fluoreszenzfarbstoffen wie Ethidiumbromid und Sybr Green (Abbildung 4). Ethidiumbromid ist bis heute der am meisten verwendete Farbstoff für den Nachweis von DNA und RNA mittels Gelelektrophorese [68] und wurde erstmals im Jahre 1992 von Higuchi zur Realtime-Detektion von DNA eingesetzt [69, 70]. Da Ethidiumbromid aufgrund seiner mutagenen Wirkung ein sehr hohes Gefährdungspotenzial für Mensch und Umwelt aufweist [71] und darüber hinaus noch unempfindlicher gegenüber Sybr Green ist [72], findet es in der heutigen Realtime-Detektion nur noch selten Anwendung.

Als Alternative zu der unspezifischen Realtime-Detektion mit Sybr Green wurden verschiedene Möglichkeiten der spezifischen Detektion auf der Basis des Fluoreszenz-Resonanz Energie Transfers (FRET) entwickelt [73-75]. Bei FRET handelt es sich um einen physikalischen Prozess bei dem Energie eines angeregten Fluoreszenzfarbstoffs (Donor-Fluorophor) strahlungsfrei auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor-Fluorophor) übertragen werden kann.

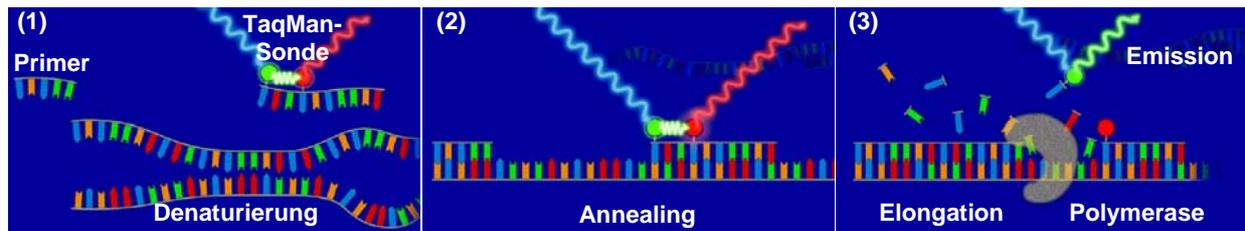


Abbildung 5 (1) Einzelsträngige DNA, TaqMan-Sonde liegt gequenscht vor
 ⇒ keine Fluoreszenzsignal detektierbar
 (2) Primer und TaqMan-Sonde binden an DNA-Einzelstrang (Annealing), TaqMan-Sonde liegt weiter gequenscht vor
 ⇒ keine Fluoreszenzsignal detektierbar
 (3) Strangverlängerung und dabei Abbau der TaqMan-Sonde
 ⇒ Fluoreszenzsignal detektierbar

Quelle: Hoffmann La Roche

Die am meisten verbreitete Methode ist der Einsatz von TaqMan-Sonden (Hydrolyse-Sonden [76]). TaqMan-Sonden sind kurze doppelt markierte, einzelsträngige DNA-Fragmente mit einer Länge von 20-30 Basen, die in einem Abstand von 5-10 Basen zum Primer an die Target-DNA binden (TaqMan-Design [77]). Liegt die Sonde einzeln oder gebunden an den DNA-Strang vor, ist kein Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffs messbar, da dieses von dem benachbarten Farbstoff gequenscht wird. Erst bei der Synthese eines neuen DNA-Doppelstrangs während der PCR-Reaktion, wird die TaqMan-Sonde durch die Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase abge-

trennt, und das Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffes wird messbar (Abbildung 5).

1.3 PCR in Mikrochip-Thermocyclern

Der einfache Mechanismus der PCR-Reaktion machte diesen in dem vergangenen Jahrzehnt zu einem idealen Prozess für die Miniaturisierung. Das Potenzial von miniaturisierten PCR-Chips gegenüber kommerziellen Thermocyclern besteht vor allem in dem geringen Leistungsbedarf, den schnellen Reaktionszeiten und der Reduzierung von Proben- und Reagenzienvolumen (Tabelle 2).

Tabelle 2 Abschätzung wichtiger Geräteparameter von konventionellen Thermocyclern und Mikrochip-Thermocyclern

Art	Leistungsbedarf	Reaktionsvolumen	Heizraten/ Kühlraten
Konventionelle Thermocycler	1000 bis 2000 Watt	10 -100 μ l	3 K/s bis 20 K/s 1 K/s bis 5 K/s
Mikrochip-Thermocycler	1 bis 100 Watt	85 μ l -10 μ l	15 K/s bis 40 K/s 5 K/s bis 15 K/s

Während der Entwicklung von PCR-Mikrochip-Thermocyclern wurden international verschiedene Strategien verfolgt [4]. Von besonderer Bedeutung waren dabei die örtlich stationären und die Durchfluss-PCR-Chipthermocycler. Neben etablierten Materialien für die Mikrosystemtechnik wie Silizium bzw. Glas werden für die Herstellung der Chipsysteme auch Kunststoffe [5-7] und Keramik [8] verwendet. Die PCR-Chips werden über integrierte Widerstandsheizter oder über externe Heizelemente wie Peltierelemente [9] und Induktionsheizter [10] betrieben.

Unabhängig von ihrer Betriebsweise werden die meisten PCR-Mikrochips auf der Basis der Mikrosystemtechnik entwickelt. Diese Technologien werden verwendet, um möglichst kleine Strukturen herzustellen und beispielsweise den Vorteil von Silizium als guten Wärmeleiter zu nutzen. Durch die Anwendung solcher Herstellungstechnologien wird außerdem die notwendige Integration verschiedener Funktionselemente auf einem Chip ermöglicht. Das angestrebte Ziel der Integration aller Prozessschritte auf einem Mikrochip verfolgen die so genannten μ TAS (micro total analysis systems), dessen Konzept Manz et al. erstmals 1990 vorstellte [11-13].

Ein generelles Problem bei der Entwicklung von Mikrochip-Thermocyclern ist die PCR-Kompatibilität der verwendeten Materialien. Durch die zunehmende Miniaturisierung spielt der Einfluss der Oberflächen auf das PCR-Ergebnisse eine bedeutende Rolle, da das Oberflächen-Volumen-Verhältnis bei Chip-basierten Systemen im

Vergleich zu konventionellen Thermocyclern sehr groß ist. Dadurch sind PCR-Reaktionen auf nativen Chipsubstraten wie Glas oder Silizium teilweise vollständig inhibiert. Besonders beeinflusst werden die PCR-Reaktionen durch die Adsorption von Biomolekülen, wie DNA und DNA-Polymerasen, an den Chipoberflächen, welche für die Reaktion damit nur noch eingeschränkt oder gar nicht zur Verfügung stehen [14]. Dieses Problem kann durch die Modifikation der Chipoberflächen (z.B. Silanisierung) und durch Änderung der Reagenzienzusammensetzung (z.B. Zugabe von Additiven wie BSA) gelöst werden [15-18].

1.3.1 Prinzip der stationären PCR-Chips

Eine Entwicklungsstufe der Mikrochip-Thermocycler stellen die stationäre PCR-Chips dar. Diese arbeiten zeitabhängig und basieren somit grundlegend auf dem Funktionsprinzip der konventioneller Blockthermocycler (Abbildung 6). Dabei wird der PCR-Reaktionsmix üblicherweise in eine Kammer gefüllt und mittels entsprechender Heizelemente amplifiziert. Die stationären PCR-Chipthermocycler zeichnen sich dadurch aus, dass sie kleinste Probenvolumina (bis zu 85 μl [19]) in kürzesten Zeiten (8 min für 30 PCR-Zyklen [6]) amplifizieren können.

Die ersten stationären PCR-Chips wurden in den Jahren 1993/94 von den Arbeitsgruppen um Northrup und Wilding präsentiert [9, 20]. Das erste vollständig mobile Analysesystem stellten Northrup et al. [21, 22] 1998 in Form eines miniaturisierten Thermocyclers (MATCI) für die Amplifikation und integrierte Online-Detektion von DNA vor.

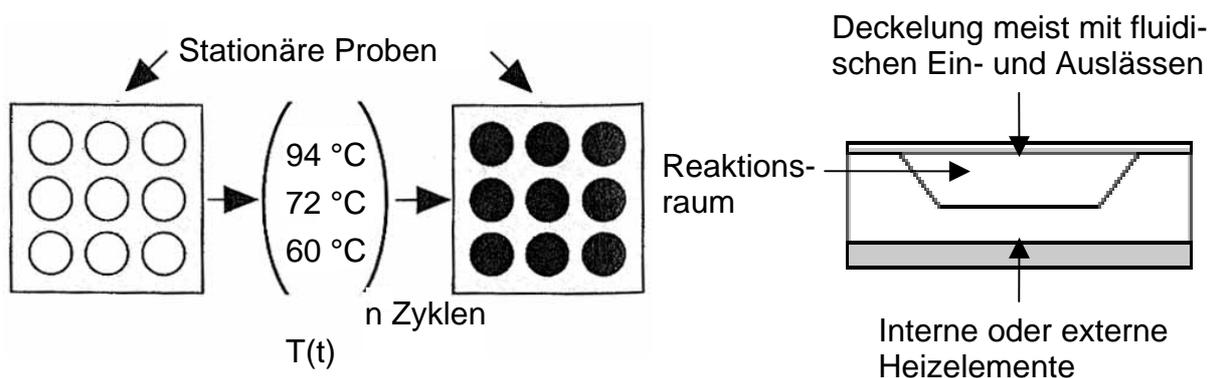


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Stationären PCR-Chips mit der Beschreibung ihrer Funktionsweise (links) und dem typischen Chipaufbau (rechts)

Seit dieser Zeit entwickelten und optimierten eine Vielzahl von Arbeitsgruppen weltweit stationäre PCR-Chips [23-35]. Besondere Ergebnisse bei der Optimierung der

Reaktionsvolumen erzielte dabei eine Forschergruppe aus Japan um Nagai [19], welche im Jahre 2001 erfolgreiche PCR-Reaktionen in einem Picoliter-Array mit einem Fassungsvermögen von je 85 pl demonstrierten. Allerdings besaß dieses Chip-system kein eigenes Temperierungssystem, sondern wurde auf einen kommerziellen Thermocycler aufgelegt und ist somit ein System, das von den Heiz- und Kühlraten der verwendeten konventionellen Thermocycler abhängt. Mit Reaktionsvolumen im Nanoliterbereich (10-50 nl) machte 2004 eine Gruppe aus Norwegen um Gulliksen [36] auf sich aufmerksam, welche die Methode der isothermalen PCR mit Online-Detektion in Chipreaktoren präsentierte.

Ein neuer Ansatz für die PCR mit Mikrochip-Thermocyclern sind die Planaren Oberflächen-Chipthermocycler, welche am IPHT Jena in Zusammenarbeit mit der Advantix AG entwickelt wurden. Die PCR-Reaktion läuft nicht mehr wie bisher in einem geschlossenen Reaktionsraum, sondern direkt auf der planaren Chipoberfläche, gedeckelt von einem Mineralöltropfen als Verdunstungsschutz, ab. Dabei war es möglich, Mikrofluidik mit einem stationär arbeitenden PCR-Chip zu kombinieren [37]. Das Reaktionsmedium wurde in einzelnen Tropfen, mit der Hilfe von akustischen Oberflächenwellen (SAW) auf einem piezoelektrischen Material (Lithiumniobat), an die gewünschte Stelle auf dem Chip transportiert und konnte zusätzlich gezielt dosiert und gemischt werden. Die Mikrofluidiktechnologie wurde von der Firma Advantix AG entwickelt. Die Weiterentwicklung dieser Chipthermocycler und deren Etablierung für die Polymerase Kettenreaktion wird in dieser Arbeit vorgestellt.

1.3.2 Prinzip der Durchfluss-PCR-Chips

Alternativ zu den stationären Chipthermocycler wurden international Mikrochip-Thermocycler für die Durchfluss-PCR entwickelt. Diese arbeiten im Gegensatz zu den stationären und konventionellen Systemen ortsabhängig. Das heißt der Reaktionsansatz wird in Mikrokanälen über die verschiedenen Temperaturzonen geleitet und die Probe dabei amplifiziert. Die Reaktionszeit wird durch die vorliegende Kanalgeometrie und die angelegte Flussrate bestimmt, mit der die Medien im Chip gepumpt werden und nicht wie bei einem stationären System von den Heiz- und Kühlraten. Die Durchfluss-PCR wurde besonders für Hochdurchsatzanwendungen entwickelt, da mit dieser Methode theoretisch eine beliebige Anzahl an Proben kontinuierlich analysiert werden kann. Das am häufigsten verwendete Prinzip ist bis heute die Verwendung von mäandrischen Mikrokanälen, hergestellt aus Glas- oder Kunststoffsubstraten (Abbildung 7, links).

Die ersten Durchfluss-PCR-Chips wurden 1998 parallel von Köhler und Kopp vorgestellt [38, 39]. Diese Chipentwicklungen wurden im Laufe der vergangenen Jahre von verschiedenen Forschungsgruppen weltweit verbessert, angepasst und auf verschiedene Materialien übertragen [8, 40-45]. Außerdem wurden die Chipmodule erweitert, so dass auch komplexe RT-PCR-Reaktion durchgeführt werden konnten, und die Detektion der Produkte online erfolgte [46-48].

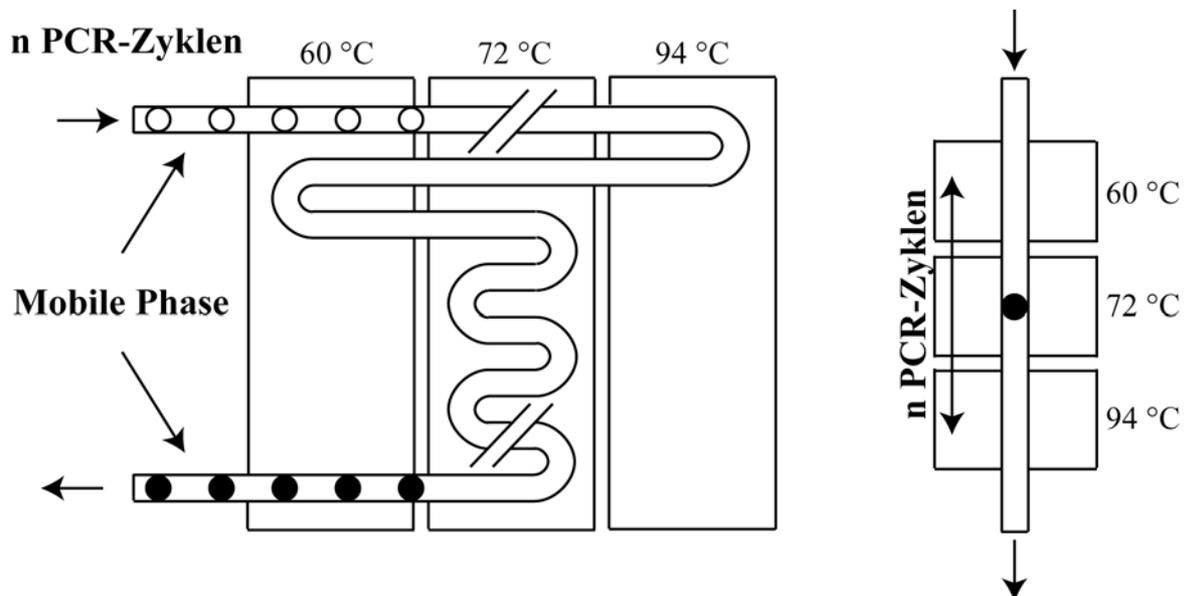


Abbildung 7 Schematische Darstellung zweier Prinzipien für die Durchfluss-PCR: links – mäandrische Mikrokanäle sind über den Temperaturzonen angeordnet, durch welche die Reaktionsansätze gepumpt werden
rechts– das Sample-Shuting-Prinzip, bei dem der Reaktionsansatz zwischen den Temperaturzonen hin und her bewegt wird

Ein weiteres Prinzip (Abbildung 7, rechts) wurde in den letzten Jahren etabliert, bei dem die Probe in schnellen Wechsels zwischen den verschiedenen Temperaturzonen hin und her bewegt wird [49-51]. Diese Methode brachte zwar einen entscheidenden zeitlichen Vorteil, allerdings eignet sie sich nicht als Hochdurchsatzverfahren.

1.4 Zielstellung und Aufgaben der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Entwicklung und Etablierung verschiedener Chip-basierter Technologien für die Polymerase Kettenreaktion mit einer anwendungsorientierten Ausrichtung auf die medizinische Diagnostik. Neben der Realisierung von verschiedenen PCR-Reaktionen mittels am IPHT entwickelter Mikrochip-Thermocyclern standen dabei deren Charakterisierung und der Vergleich zu konventionellen Tischthermocyclern im Mittelpunkt.

Im Bereich der Mikrochip-Thermocycler sollten die verschiedenen Betriebsarten stationäre PCR und Durchfluss-PCR getestet werden und für die jeweiligen PCR-Systeme die optimalen Reaktionsbedingungen ermittelt werden. Eine Zielstellung war dabei die Erzeugung von mechanisch und chemisch stabilen, PCR-kompatiblen Oberflächen und die Charakterisierung der Oberflächenbeschaffenheit (Schichtdicken, Homogenität, Benetzungsverhalten).

Die Arbeiten sollten die Anpassung und Optimierung vorhandener Chiplayouts, den Aufbau der Chipsysteme, sowie deren Erweiterung für die Möglichkeit einer Realtime-Detektion der PCR-Produkte umfassen.

Neben den technologischen Aufgabengebieten (Chipkonstruktion und -aufbau, Anpassung und Optimierung der Chipumgebung) sollte die Arbeit die allumfassende Adaption von PCR-Protokollen und PCR-Bedingungen, für eine sichere Durchführung von PCR-Reaktionen auf Mikrochips mit niedrigen Reaktionsvolumen enthalten. Die Etablierung von Methoden zur Realtime-Detektion der PCR-Produkte auf dem Chip sollte einen weiteren Schwerpunkt darstellen.

Mit Hilfe der Untersuchungen sollte bewertet werden, ob und unter welchen Bedingung sich die Mikrochip-Thermocyclern für Durchführung der Polymerase Kettenreaktion im Hinblick auf die schnelle medizinische Diagnostik eignen.

2 Materialien und Methoden

In dem folgenden Kapitel werden die verwendeten Methoden beschrieben und die für die Durchführung der Experimente notwendigen Geräte und Materialien genannt, um die im Ergebnisteil dargestellten Resultate nachvollziehen zu können.

2.1 Geräte

Alle für die PCR relevanten Geräte (Tabelle 3), Arbeitsflächen und Reagenzien wurden vor dem Gebrauch autoklaviert oder chemisch desinfiziert. Die verwendeten Pipetten wurden in einem vierteljährlichen Rhythmus autoklaviert und vor jeder Anwendung mit RNase Away dekontaminiert. Außerdem kamen spezielle Filter-Pipettenspitzen (Roth, Karlsruhe) zum Einsatz, die eine Kontamination über Aerosole verhindern. Das Pipettieren der Reaktionsansätze erfolgte ausschließlich unter einer sterilen Werkbank.

Tabelle 3 Geräteauflistung zu den durchgeführten Versuchsteilen

Gerät	Typ	Hersteller
Dampfsterilisator	Varioklav 300 EP	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Elektrophorese	Mupid 2	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln
Filtersätze, optisch	Filter-Set 09 488009-0000	Carl Zeiss AG, Jena
	Anregungsfilter HQ 470/40	AHF Analysentechnik AG, Tübingen
	Sperrfilter HQ 510/20	AHF Analysentechnik AG, Tübingen
Fluoreszenzdetektoren	SensiCam Long Exposure, Cooled Imaging CCD-Kamera	PCO Computer Optics GmbH, Kelheim
	Photomultiplier Mp 962-2	Perkin Elmer Optoelectronics GmbH, Wiesbaden
Fluoreszenzmikroskop	Axiotech 100	Carl Zeiss AG, Jena
Hybridisierungssofen	HB-1000 Hybridizer	UVP Laboratory Products, Cambridge
Kontaktwinkelmessgerät	OCA 20	DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt
Lackschleuder	Delta 10 BM Spinner Module	Süss MicroTec AG, München
Lichtquellen	Quecksilber-Kurzbogenlampe HBO 100 W/2	Carl Zeiss AG, Jena

Lichtquellen	Xenon-Kurzbogenlampe XBO 75 W/2	Carl Zeiss AG, Jena
	Lumatec Superlite SUV-DC-E	Lumatec GmbH, München
Muffelofen	L3-11-S27	Nabertherm GmbH, Lilienthal
PCR-Werkbank	DNA-Workstation I L020-GC	G. Kisker GbR, Steinfurt
Pipetten	Calibra digital 822	Socorex Isba S.A., Ecublens
Rasterkraftmikroskop	Dimension 3100	Digital Instruments/Veeco, Mannheim
Reinstwasseranlage		Millipore GmbH, Schwalbach
Spektrometer	V-530 UV/Vis	Jasco Deutschland, Groß-Umstadt
Spritzenpumpe	CeDoSys SP-4	Cetoni GmbH, Korbußen
Tischhermocycler	Mastercycler Gradient	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
	ABI 7300	Applied Biosystems, Darmstadt
Trockenschränke	T5042	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
	Typ UFE 400	Memmert GmbH + co. KG, Schwabach
UV/VIS-Spektrometer	Nanodrop ND-1000	NanoDrop Technologies, Wilmington
UV-Transluminator	RH-5	Herolab GmbH, Wiesloch
Vortexer	VortexGenie 2	Scientific Industries, Inc., New York
Zentrifuge	MiniSpin	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

2.2 Software

Zur Auswertung aufgenommener Datensätze (Bilder, Kurvenverläufe) stand an den verschiedenen Messplätzen (Elektrophoreseplatz, Fluoreszenzmikroskop, PCR-Arbeitsplatz) entsprechende Rechentechnik mit der notwendigen Anwendersoftware zur Verfügung (Tabelle 4).

Tabelle 4 Software zur Auswertung aufgenommener Datensätzen

Art	Typ	Hersteller
AFM-Analyse	NanoScope Version 3	Digital Instruments/Veeco, Mannheim

Geldokumentation	EasyWin 32	Herolab GmbH, Wiesloch
Grauwertanalyse	Image J	National Institutes of Health, USA
Fluoreszenzanalyse (Mikroskopie)	SensiControl	PCO Computer Optics GmbH, Kelheim
Kontaktwinkel- analyse	SCA 20	DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt
Realtime- Auswertung	7300 System SDS	Applied Biosystems, Darmstadt

2.3 Chemikalien und Biochemikalien

Alle kommerziell verfügbaren Chemikalien und Biochemikalien (Tabelle 5) wurden, falls nicht gesondert aufgeführt, ohne spezielle Vorbehandlung eingesetzt. Das Wasser zum Spülen der Oberflächen wurde über eine Reinstwasseranlage deionisiert, während für die PCR-Ansätze kommerziell erhältliches ultrareines, DNase- und RNase-freies Wasser verwendet wurde.

Tabelle 5 Chemikalien und Biochemikalien

Art	Typ	Hersteller
Agarose	GTQ	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Desinfektionsmittel	Bacillol Plus	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
	RNase Away	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DNA-Marker	ΦX174 RF DNA/Hinc II	Abgene, Hamburg
Farbstoffe	Bromphenolblau	Merck KgaA, Darmstadt
	Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
	Sybr Green I	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lösungsmittel	Aceton	Merck KgaA, Darmstadt
	1-Butanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
	Ethanol	Merck KgaA, Darmstadt
	Perfluoroctan	ABCR GmbH + Co. KG, Karlsruhe
	2-Propanol	Merck KgaA, Darmstadt

Lösungsmittel	Tetradekan	Fluka-Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
	Toluol	Merck KgaA, Darmstadt
	Wasser dest. UltraPure	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Oberflächen-Beschichtung	(3- Glycidoxypropyl)-trimethoxysilane	ABCR GmbH + Co. KG, Karlsruhe
	Perfluorodecyltrichlorosilane	ABCR GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Oberflächen-Beschichtung	Repel Silane ES	Amersham Biosciences, München
	Teflon AF 1600	DuPont Fluoroproducts, Bad Homburg
PCR-Kits	HotStarTaq Polymerase Kit	Qiagen GmbH, Hilden
	HotStarTaq Master Mix Kit	Qiagen GmbH, Hilden
	SuperHot Taq-Polymerase	Genaxxon bioscience GmbH, Biberach
	Taq-DNA-Polymerase S	Genaxxon bioscience GmbH, Biberach
	Taq PCR Core Kit	Qiagen GmbH, Hilden
	Taq PCR Master Mix Kit	Qiagen GmbH, Hilden
PCR-Zusätze	BSA (Rinderserumalbumin)	Fluka-Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
	Tween 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
RT-PCR-Kits	SuperScriptII Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
	SuperScriptIII One-Step RT-PCR System	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
sonstiges	Mineralöl für die Molekularbiologie	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.4 Chip-Substrate

Die Grundlage aller eingesetzten PCR-Chips waren 4- bzw. 5-Zoll Glassubstrate (Schott Jena^{er} Glas GmbH, Jena) mit einer Waferstärke zwischen 0,5 und 1,0 mm. Die PCR-Kompatibilitätsuntersuchungen wurden mit den gleichen Glassubstraten, 4-Zoll Siliziumwafern (Filtronics) und 4-Zoll Lithiumniobatwafern (Advalytix AG) durchgeführt (Tabelle 6). Die Polymerchips (microfluidic ChipShop GmbH, Jena) bestanden aus Polycarbonat (PC) und wurden mit verschiedenen PC-Folien gedeckelt.

Tabelle 6 Substratspezifikationen

	Glas	Silizium	Lithiumniobat
Substratgröße	4“, 5“	4“	4“
Substratstärke	0,5; 0,7; 1,0 mm	0,5 mm	0,5 mm
Substrattyp	Borofloat 33	<100>	<128 ° cut>
Substratbeschaffenheit	einseitig poliert	einseitig poliert	beidseitig poliert

2.5 Aufbau der verwendeten Mikrochip-Thermocycler

Es wurden Mikrochip-Thermocycler getestet, welche am IPHT Jena entwickelt und im Rahmen dieser Arbeit optimiert und weiterentwickelt wurden. Dazu wurden zwei Chipsysteme gegenüber gestellt. Die stationären PCR-Chipthermocycler, bei denen die PCR-Reaktionen auf planaren Chipoberflächen [37] ablaufen und welche eine Weiterentwicklung der ursprünglichen Silizium-Kammer-Chipthermocycler [27] sind. Außerdem wurden verschiedene Entwicklungsstufen der Durchflusschip-Thermocycler [40, 78] verglichen und damit eine PCR-Anwendung für die medizinische Diagnostik etabliert.

2.5.1 Aufbau- und Verbindungstechnik

Vor der Inbetriebnahme der PCR-Chips mussten diese für die elektrische Kontaktierung vorbereitet werden. Dafür wurden für das entsprechende Chiplayout angepasste Platinen hergestellt, auf welche die Kontaktierungspins flach oder im 45° Winkel angelötet wurden. Die anschließende Fixierung der Chips auf den Platinen erfolgte bei den Durchfluss-Chips durch Kleben mit Zwei-Komponenten Epoxydharz Kleber (Uhu) und bei den stationären Chips mit doppelseitigen Klebeband. Die elektrische Kontaktierung zwischen Platine und Chip wurde mittels Aluminium-Drahtbondung realisiert (Abbildung 8).

Die Chips wurden vor der Verwendung kalibriert. Die Kalibrierung erfolgte in einem Wärmeschrank, an dem nacheinander vier Temperaturen (40, 55, 70 und 90 °C) eingestellt wurden. Die entsprechenden gemessenen Widerstände wurden nach einer Äquilibrationszeit von 20 Minuten notiert. Durch die Kalibrierung konnten die Temperatur-Widerstands-Kennlinien der einzelnen Temperatursensoren auf dem Chip bestimmt werden. Da die Kennlinien für die Platinsensoren in diesen Bereichen linear verlaufen, ermöglicht das die Umrechnung der später gemessenen Sensorwiderstände in die für die PCR-Reaktion relevanten Temperaturen. Die Richtigkeit der ge-

messenen Werte wurde durch die Ermittlung der Raumtemperatur mit dem Chip überprüft und mit dem Wert eines Quecksilberthermometers verglichen. Betrug die Abweichung der beiden gemessenen Wert mehr als 0,5 K, wurde der Chip erneut kalibriert oder als defekt aussortiert.

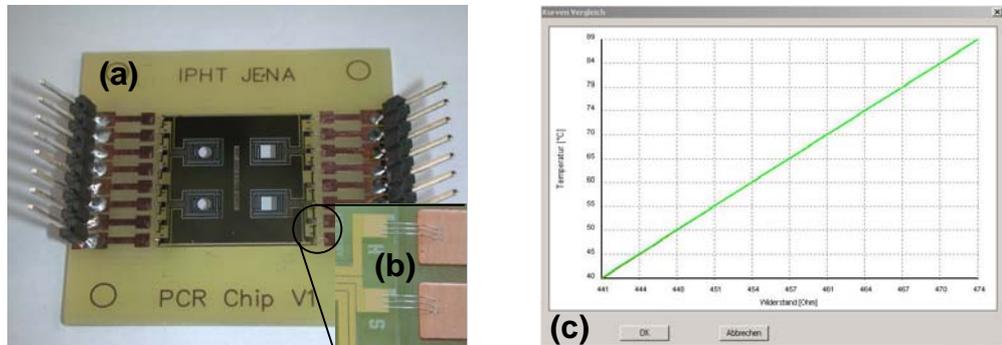


Abbildung 8 (a) Platine mit Pins für die elektrische Kontaktierung zum Regler
 (b) 3x Drahtbondung für die elektrische Kontaktierung zwischen Chip und Platine
 (c) Temperatur-Widerstandskennlinie eines Platinsensors auf dem PCR-Chip

2.5.2 Stationäre Oberflächen-Chipthermocycler

Für die Herstellung der stationären PCR-Chipthermocycler wurden 4“-Glaswafer mit einer Substratstärke von 0,7 mm verwendet. Auf einen Wafer konnten 12 Einzelchips prozessiert werden (Abbildung 9).

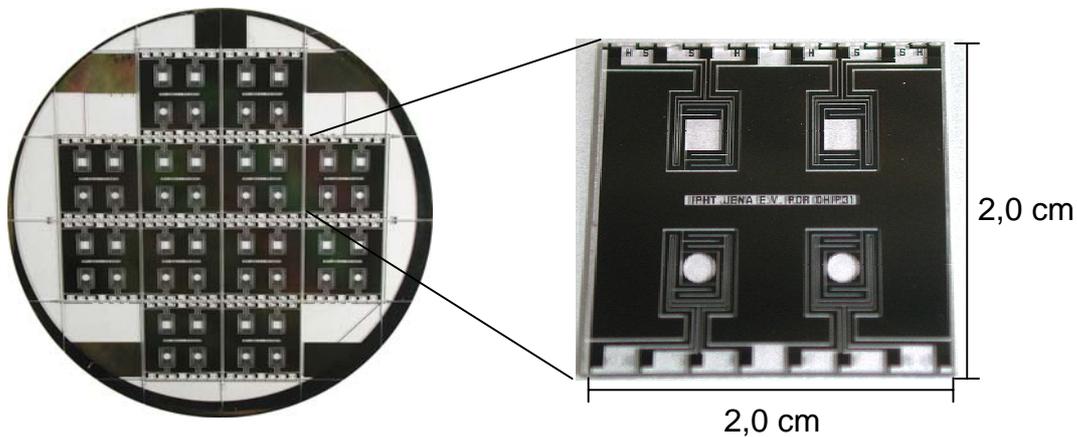


Abbildung 9 links - Aufnahme eines prozessierten 4“-Glaswafers mit 12 PCR-Chips
 rechts - Aufnahme eines PCR-Chips mit den Abmaßen 2 x 2 cm

Nach der Waferprozessierung im Reinraum wurde es notwendig, den gesamten Waferverbund bei 200 °C über 12 Stunden zu tempern, um Veränderungen der Platinstrukturen während des Chipbetriebes zu verhindern und eine genauere Temperatursteuerung zu erreichen. Im Anschluss an diesen Tempersschritt wurden die Wafer

im Reinraum mit einem Schutzlack beschichtet. Dieser Schutzlack wurde eingesetzt, um die Oberflächen bei der Chipvereinzelnung vor mechanischen Beschädigungen zu schützen. Im Anschluss wurden die Wafer bis auf eine Substrathöhe von 150 μm angesägt und zum endgültigen Vereinzeln an einer sauberen Kante gebrochen. Die Abmaße eines Chips betragen immer 2,0 x 2,0 cm.

2.5.3 Glas-Silizium-Durchfluss-Chipthermocycler

Die Glas-Silizium-Durchfluss-Chipthermocycler wurden aus einem Glas- und einem Silizium-4"-Wafern im Reinraum hergestellt. Dabei wurden auf jedem Wafer die Strukturen für 2 Chipmodule aufgebracht. Durch den Prozess des anodischen Bondens wurden die beiden Wafer exakt miteinander verbunden, und anschließend die Chips entlang der aufgetragenen Markierungen gesägt.

Die Temperierung der Heizzonen für die Denaturierung und die Elongation wurde über Platinheizerstrukturen realisiert, welche sich auf der Rückseite des Chips (Siliziumseite) befanden. Die eingestellten Temperaturen wurden über Platintemperatursensoren kontrolliert, welche ebenfalls auf der Chiprückseite über Dünnschichttechnologien aufgebracht wurden (Abbildung 10, a). Die eigentlichen Chipabmaße ohne Platine betragen 2,6 x 5,3 cm und umfassten 25 PCR-Zyklen.

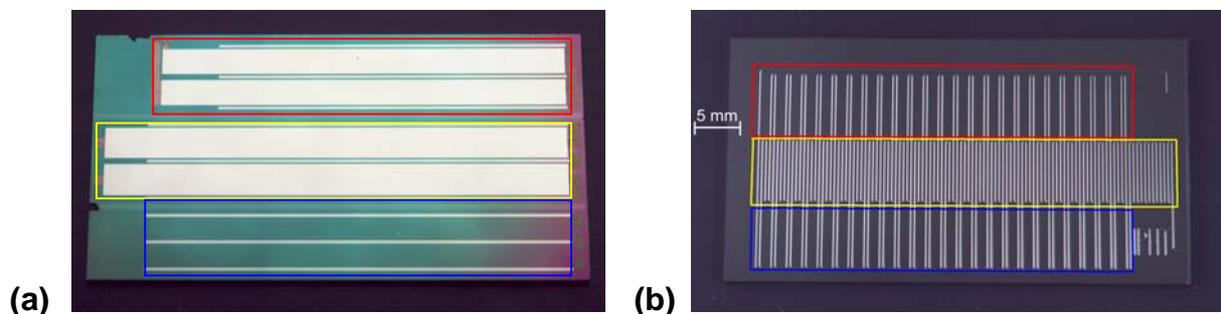


Abbildung 10 (a) Siliziumseite mit Platinheizern (breite Strukturen) und Platintemperatursensoren (schmale Strukturen)
rot - Denaturierung, blau – Annealing, gelb - Elongation
(b) Glasseite mit mäandrischen Mikrokanälen für 25 PCR-Zyklen

Die Platine wurde über einem Kupferblock befestigt und mittels Thermopaste thermisch an die Annealingzone kontaktiert. In einem separaten Wasserbad wurde die benötigte Annealingtemperatur eingestellt und das erwärmte Wasser durch den Kupferblock geleitet, worüber die entsprechende Zone auf dem Chip temperiert wurde. Auf der mit Mikrokanälen strukturierten Glasseite (Abbildung 10, b) wurden über die vorbereiteten Bohrungen standardisierte HPLC-Anschlüsse für den Einlass und Auslass anschraubt, und über diese Teflonkapillaren ($\varnothing_{\text{innen}}=0,5 \text{ mm}$) für die Aufnahme

der notwendigen Medien befestigt. Die Schlauchkapillare des Einlasses führte zur Spritzenpumpe (Cetoni), welche die benötigten Flussraten erzeugte. Die amplifizierte PCR-Lösung wurde am Auslass in einen Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt.

2.5.4 Glas-Glas-Durchfluss-Chipthermocycler

Aufgrund der Erkenntnisse des im Abschnitt 2.5.3 verwendeten Glas-Silizium-Chips wurde ein Chipmodul mit einem veränderten Layout entwickelt.

Im Gegensatz zu dem ursprünglichen Chipmodulansatz wurden die Temperaturen nicht mehr über integrierte Heizerstrukturen erreicht und kontrolliert, sondern über eine separate Heizplatte, auf welche der Fluidik-Glas-Glas-Chip aufgelegt wurde (Abbildung 11).

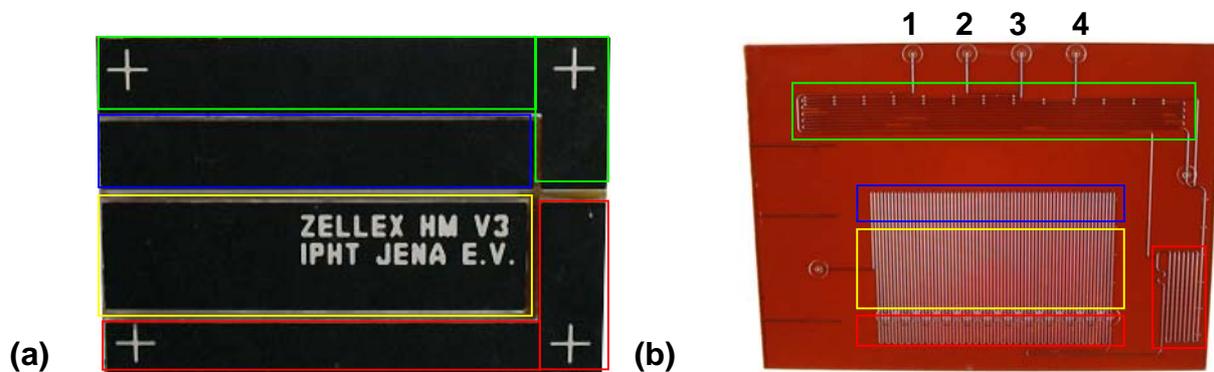


Abbildung 11 (a) Heizplatte des Chipmoduls mit abgedeckten Platinheizer- und sensorstrukturen: grün – Reverse Transkription, rot – Denaturierung/HotStart, blau – Annealing, gelb – Elongation
(b) Fluidikchip mit Mikrokanälen für 35 PCR-Zyklen, Reaktionsbereiche für die Reverse Transkription und HotStart sowie verschiedene fluidische Einlässe: 1- PCR, 2- RT-PCR, 3- Trägermedium, 4- HotStart-PCR

Die Heizplatte erzeugt fünf verschiedenen Temperaturzonen für die Reverse Transkription, die Aktivierung der modifizierten DNA-Taq-Polymerase (HotStart - HS) und die notwendigen drei Temperaturschritte für den eigentlichen PCR-Prozess (Denaturierung, Annealing, Elongation). Sie ist aus drei unterschiedlichen vertikalen Schichten aufgebaut: Auf der Unterseite befinden sich 16 Dünnschicht-Platinheizer und -sensorstrukturen auf einem Glassubstrat, für die Generierung und Kontrolle der notwendigen Temperaturzonen. Die mittlere Schicht besteht aus Kupferstreifen, welche die homogene Temperaturverteilung in den einzelnen Temperaturzonen ermöglichen. Die Oberseite der Heizplatte bildet eine strukturierte Glasabdeckung für eine gleichmäßige thermische Anbindung des Fluidikmoduls. Zwischen den Heizerchips der einzelnen Temperaturzonen wurden thermische Gaps mit einer Breite von 2 mm

eingebraucht, welche die Einhaltung der festgelegten, scharfen Temperaturgradienten sichern.

Für das fluidische Management wurden die Fluidikmodule in Glas konstruiert, da somit die notwendige optische Transparenz für eine stabile Prozesskontrolle gesichert wurde. Mit Flusssäure wurden Halbkanäle in je zwei Glassubstrate geätzt und diese mittels eines anodischen Bondprozesses miteinander verbunden. Auf dem Fluidikchip wurde mittels eines Zweikomponenten Klebers eine Kanüle für den Fluidikauflaß geklebt, während die verschiedenen fluidischen Einlässe über spezielle Fluidikklemmen mittels HPLC-Technologie befestigt wurden. Die Fluidiksteuerung erfolgte über ein 4-Kanalspritzenpumpensystem von Cetoni. Die amplifizierten Proben wurden analog zum Silizium-Glas-Chip über Teflonkapillaren in ein Eppendorfreaktionsgefäß geleitet und dort gesammelt.

2.6 Untersuchungen zur PCR-Kompatibilität

Die Frage der PCR-Kompatibilität von Materialien, welche für die beschriebenen Chipsysteme zum Einsatz kamen, spielte eine besondere Rolle. Daher wurden die Effekte der eingesetzten Chipmaterialien auf die PCR-Effizienz mit verschiedenen Experimenten untersucht.

2.6.1 PCR-Kompatibilität planarer Chipoberflächen

Zur Untersuchung des Einflusses der Chipoberflächen auf die PCR-Reaktionen wurden verschiedene Experimente zur Bestimmung der PCR-Kompatibilität der Chipmaterialien durchgeführt. Dafür wurden Silizium, Glas und Li-Niobat-Stücken eines 4"-Wafers mit einem Mörser zu feinem Pulver gemahlen. Die Materialstücke wurden vorab gereinigt (Tabelle 7, Seite 24). Es wurden je 5, 10, 15 und 20 mg Materialpulver in ein 200 µl Eppendorfreaktionsgefäß abgewogen mit 100 µl PCR-Ansatz überschichtet, gemischt und amplifiziert. Vor der Probenauftragung auf ein Agarosegel wurden die Lösungen erneut gemischt und zentrifugiert. Für die Elektrophorese wurden ausschließlich 1 µl des Lösungsüberstandes aufgetragen. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze erfolgten analog den Protokollen 1 und 2 aus Abschnitt 2.9.1 (Tabelle 13, Seite 30) sowohl ohne als auch mit Additiven.

2.6.2 PCR-Kompatibilität der Mikrokanäle

Die Überprüfung der PCR-Kompatibilität im Mikrokanal erfolgte mit PCR-Ansätzen hergestellt nach den PCR-Protokollen 7 und 8 (Tabelle 18, Seite 32). Es wurden

Chipthermocycler getestet, die aus verschiedenen Materialien aufgebaut waren: Glas-Silizium; Glas-Glas; Polycarbonat-Polycarbonat (Abbildung 12).

Im ersten Versuchsteil wurden diese Chips mit den jeweiligen PCR-Ansätzen vollständig gefüllt, verschlossen und auf dem Tischthermocycler mit dem *in-situ*-Adapter temperiert. Im zweiten Versuchsteil wurden 10 µl PCR-Lösung zwischen Mineralöl aufgenommen, welches später in der Durchfluss-Betriebsweise als Trägermedium dient. Bei diesen Versuchen wurde nur noch das modifizierte PCR-Protokoll 8 verwendet. Die Chips wurden nach dem Befüllen ebenfalls verschlossen und auf dem Tischthermocycler mit dem *in-situ*-Adapter temperiert und dabei die PCR-Proben amplifiziert.

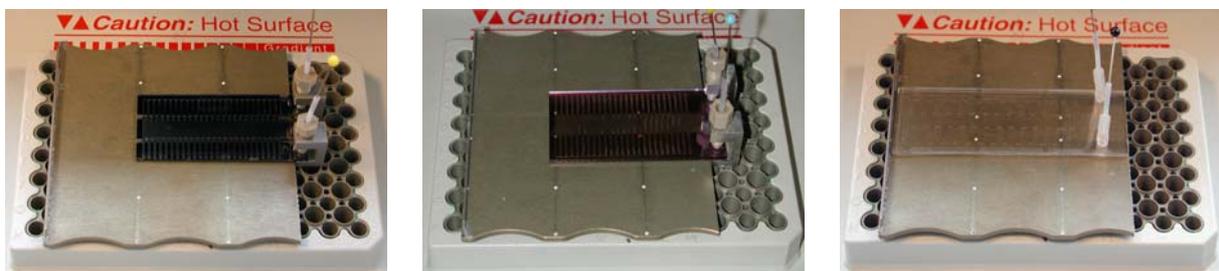


Abbildung 12 Testaufbau für den Nachweis der PCR-Kompatibilität in drei verschiedenen Chipmodulen auf dem *in-situ*-Adapter: links – Glas-Silizium-Chip, mitte – Glas-Glas-Chip, rechts – Polycarbonat-Chip

Die Analyse der amplifizierten PCR-Proben erfolgte durch Gelelektrophorese. Dafür wurden je 1 µl der PCR-Probe auf ein 3%-iges Agarosegel aufgetragen.

2.7 Chemische Modifikation der Chipoberflächen

Für die Entwicklung von PCR-kompatiblen Chipoberflächen wurden Oberflächenmodifikationen notwendig, da aus vorangegangenen Arbeiten (Diplomarbeit, Jana Felbel; [79]) bereits deutlich wurde, dass die eingesetzten Chipsubstrate, wie beispielsweise Silizium oder Glas, die PCR-Reaktionen stark behindern. Die Untersuchungen wurden in Abhängigkeit von den verwendeten Chipthermocyclertypen sowohl für planare Chipoberflächen als auch für Mikrokanäle durchgeführt.

2.7.1 Oberflächenmodifikation der stationären Chipthermocycler

Eine erfolgreiche und stabile Oberflächenmodifikation ist maßgeblich von sauberen Substratoberflächen abhängig. Durch Spülen mit Aceton wurde der Sägeschutzlack von den Chips entfernt. Anschließend wurden die Chips nach dem in Tabelle 7 beschriebenen Protokoll gereinigt.

Tabelle 7 Reinigungsprotokoll

Reinigungsmittel	Reinigungsschritt
Deconex	10 min im Ultraschallbad
Wasser	10 min im Ultraschallbad
Ethanol	10 min im Ultraschallbad
Aceton	10 min im Ultraschallbad

Um eine hohe Beladungsdichte an OH-Gruppen auf der Oberfläche zu erreichen, wurden die Chips nach der Reinigung aktiviert. Die Aktivierung erfolgte bei frisch produzierten Chips im Sauerstoffplasma für 2 min bei 50 W. Nach längerer Lagerung unter Laborbedingungen wurden die Chips in einem Gemisch von Schwefelsäure % : Wasserstoffperoxid 30% (4:1 [v/v]) aktiviert. Nach dem Spülen mit Wasser wurden die Substrate im Stickstoffstrom getrocknet.

Um die Chips mehrmals benutzen zu können, wurden sie nach einmaliger Benutzung aller Strukturen auf einem Chip mittels reaktiven Ionenätzens im Sauerstoffplasma für 10 min bei 70 W regeneriert und anschließend wieder frisch beschichtet.

2.7.1.1 Silanisierung

Um erfolgreich eine PCR auf Chipoberflächen durchführen zu können, war es notwendig, die Oberflächen zu modifizieren. Ein etabliertes Verfahren dafür ist das Aufbringen von Self Assembled Monolayers. Auf der Grundlage voran gegangener Arbeiten (Diplomarbeit, Jana Felbel) wurden für die Silanisierung drei Silane ausgewählt. Für die PCR-Reaktionen kamen neben Dimethyldichlorosilan (Repel-Silan, Pharmacia Biotech) mit Perfluorodecylsilan (SIH5841.0, ABCR) beschichtete Oberflächen zum Einsatz. Beide Beschichtungsreaktionen liefen bei Raumtemperatur ab. Dimethyldichlorosilan (Handelsnahme Repel) wurde als 2%-ige gebrauchsfertige Lösung verwendet, indem die Oberflächen vollständig damit benetzt und nach 10 min mit Isopropanol und Wasser gespült wurden. Die Chips wurden im Stickstoffstrom getrocknet und für 1 Stunde bei ca. 100 °C im Trockenschrank getempert.

Die Silanisierung mit Perfluorodecylsilan (PFS) erfolgte für 30 min in einer 10 mM Lösung in Perfluorooctan als Lösungsmittel unter Argonatmosphäre. Im Anschluss folgten Waschschrte mit je zweimal Perfluorooctan, Ethanol und Wasser für je 10 min. Die Chips wurden im Stickstoffstrom getrocknet.

Für den PCR-Produktnachweis mit *on-Chip*-Hybridisierung wurde an spezifischen Stellen auf dem Chip GOPS (3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan, ABCR) als Oberflä-

chenbeschichtung verwendet. Die Erzeugung dieser Stellen erfolgte im Reinraum mittels Mikrostrukturierung nach dem angegebenen Schema (Abbildung 13). Für die Silanisierung der hydrophilen Pads wurde eine 10 mM GOPS-Lösung mit trockenem Toluol hergestellt. Die Silanisierung erfolgte darin über Nacht (6-8 Stunden) bei 70 °C unter Argonatmosphäre. Im Anschluss wurde je zweimal für 10 min mit Toluol, Ethanol und Wasser gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Bis zur Weiterbehandlung wurden die Substrate in einem Vakuum-Exsikkator gelagert.

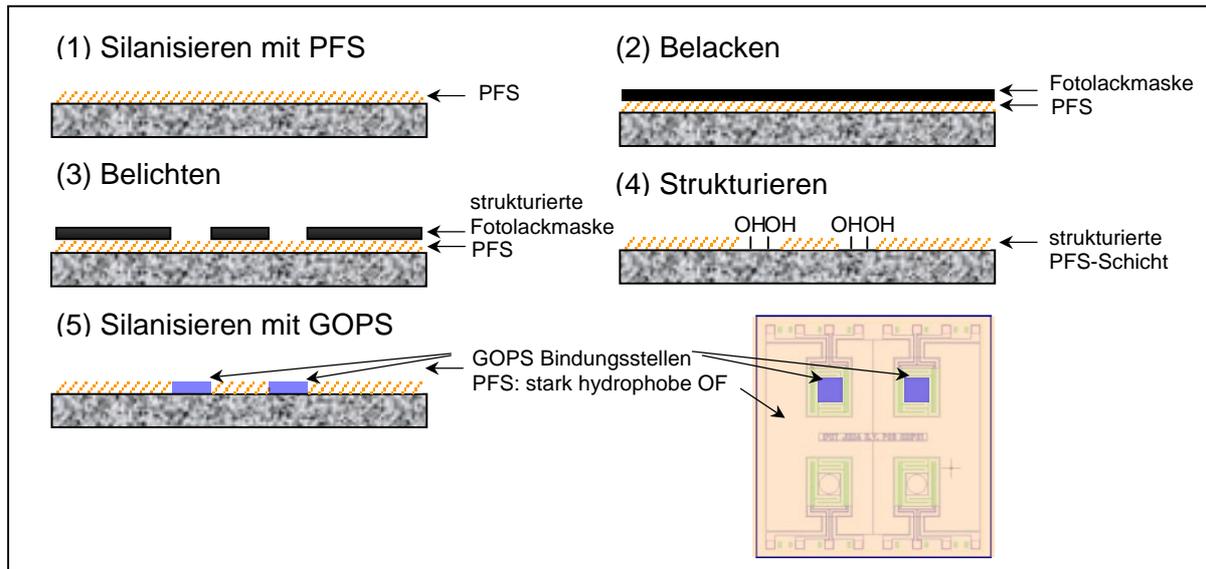


Abbildung 13 Herstellung spezifischer Oberflächenarsenale mittels Mikrostrukturierung und Silanisierung

2.7.1.2 Polymerbeschichtung

Alternativ zu den Silanoberflächen wurden Chips mit einer Teflonbeschichtung verwendet. Die Polymerbeschichtung erfolgte nach einer vorangegangenen Oberflächenmodifizierung mit Dimethyldichlorosilan (Abschnitt 2.7.1.1). Das Polymer Teflon AF (DuPont Fluoroproducts) wurde als 1,0 oder 0,1%-ige Lösung auf die Substrate aufgeschleudert (Tabelle 8). Dieser Schritt wurde für einen geschlossenen Schichtaufbau dreimal wiederholt. Die Chips wurden danach für 1 Stunde bei ca. 160°C getempert.

Tabelle 8 Schleuderprogramm für die Beschichtung mit Teflon AF

Ablauf	Drehzahl [U/min]	Zeit [s]
1. Schritt	500	5
2. Schritt	3000	60

2.7.1.3 Oberflächencharakterisierung

Die Charakterisierung der Oberflächen erfolgte in erster Linie durch die Bestimmung der Kontaktwinkel. Alle Messergebnisse beziehen sich auf den statischen Kontaktwinkel und wurden ausschließlich mit der Methode des liegenden Tropfens (Sessile-Drop-Method) ermittelt (Abbildung 14).

Gleichung 1:
$$\sigma_{sg} = \sigma_{sl} + \sigma_{lg} \cos \alpha$$

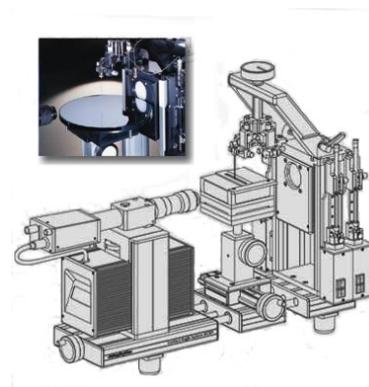
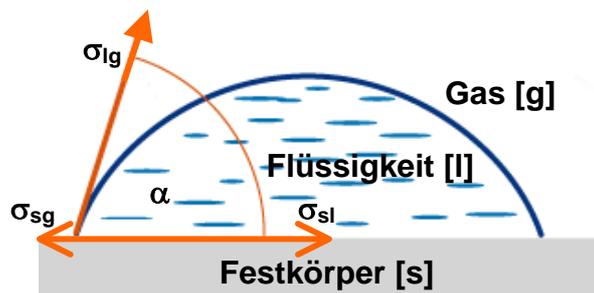


Abbildung 14 links - rechnerische Herleitung der Kontaktwinklebestimmung [80]
rechts - Kontaktwinkel-Messeinheit OCA 20 von Dataphysics

Der Kontaktwinkel ist ein quantitatives Maß für die Benetzbarkeit von Oberflächen. Er ist nach der Young-Gleichung (Gleichung 1) das Ergebnis der Wirkung der drei Vektoren (σ_{sg} , σ_{lg} , σ_{sl}) in Form der spezifischen Ober- und Grenzflächenspannung [81].

In der Regel gibt es drei mögliche Situationen der Benetzbarkeit einer Festkörperoberfläche durch Flüssigkeiten: vollständige Benetzung (Spreitung $\alpha = 0^\circ$), partielle Benetzung ($0 > \alpha > 90^\circ$) und vollständige Unbenetzbarkeit ($\alpha = 180^\circ$). Die Kontaktwinkelmessung wurde in Abhängigkeit von der jeweiligen festen und flüssigen Phase durchgeführt. Als flüssige Phasen wurden die für die PCR relevanten Medien Wasser, PCR-Lösung und Mineralöl ausgewählt. Mineralöl wurde bei einer Chip-PCR als Verdunstungsschutz zum Deckeln der Probe eingesetzt. Als feste Phasen kamen die im Abschnitt 2.7 beschriebenen Beschichtungen Dimethyldichlorosilan, Perfluorodecylsilan und Teflon AF zum Einsatz.

Für die weitere Charakterisierung der Oberflächen wurde zusätzlich die freie Oberflächenenergie aus den Kontaktwinkeln und den bekannten Oberflächenspannungen von Wasser, Diiodmethan, Dimethylsulfoxid (DMSO) und Ethanol bestimmt.

Tabelle 9 Die gesamte Oberflächenspannung (SFT total) mit ihren dispersen (SFT D) und polaren (SFT P) Anteilen der gemessenen Flüssigkeiten für die Bestimmung der freien Oberflächenenergie auf verschiedenen Beschichtungen

Flüssigkeit	SFT (total)	SFT (D)	SFT (P)
Wasser [82]	72,80 mN/m	21,80 mN/m	51,00 mN/m
Diiodmethan [83]	50,80 mN/m	48,50 mN/m	2,30 mN/m
DMSO [84]	43,54 mN/m	34,86 mN/m	8,68 mN/m
Ethanol	22,10 mN/m	17,50 mN/m	4,60 mN/m

Es wurden drei verschiedene Berechnungsmethoden für die Bestimmung der freien Oberflächenenergien herangezogen. Die Berechnungstheorie „Equation of State“ nach Neumann [85] nutzt die Bestimmung der freien Oberflächenenergie nach einer thermodynamischen Ableitung und ist universell einsetzbar. Dagegen betrachtet die Methode nach Fowkes [83] vorrangig die dispersen Anteile der freien Oberflächenenergie und ist speziell für nicht polare Systeme geeignet. Das Modell nach Owens-Wendt-Rabel & Kaelble [86, 87] für die Berechnung der freien Oberflächenenergie lässt Rückschlüsse auf die dispersen und polaren Anteile zu und ist universell einsetzbar (Polymere, Aluminium, Beschichtungen, Lacke).

In Tabelle 9 sind die aus der Literatur bekannten Oberflächenspannungen der verwendeten Flüssigkeiten mit ihren dispersen und polaren Anteilen dargestellt.

Neben den Benetzungseigenschaften wurde außerdem die Qualität der Oberflächenmodifikation, wie Homogenität und die Schichtdicken überprüft. Dafür wurden Aufnahmen mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM) zur genaueren Charakterisierung herangezogen.

Um eine möglichst scharfe Kante für die Schichtdickenbestimmung zu erhalten, wurden je ein Glaschip (2 x 2 cm) mit Repel, Perfluorosilan und Teflon AF beschichtet und im Reinraum strukturiert. Für die Strukturierung wurde 50 % der Oberfläche mit einem Schutzlack bedeckt und auf der freien Chiphälfte wurde im Sauerstoffplasma (5 min, 70 W) die Beschichtung bis auf die Substratoberfläche weggeätzt.

2.7.2 Oberflächenmodifikation der Durchfluss-Chipthermocycler

Die Beschichtung der Mikrokanäle erfolgte bei den verwendeten Glas-Silizium und Glas-Glas-Chipthermocyclern mit den bereits etablierten Silanen (Dimethyldichlorosilan, Perfluorodecylsilan) und Teflon AF.

Die Reinigung und Aktivierung der Mikrokanäle wurde nach dem in der Tabelle 10 dargestellten Protokoll durchgeführt.

Tabelle 10 Reinigungs- und Aktivierungsprotokoll für die Mikrokanäle

Chemikalien	Ablauf
NaOH (20 %)	Befüllen, 6 min bei 100°C
NaOH (1 M)	Spülen
Wasser	Spülen
HCl (2 M)	Spülen
Wasser	mehrfach Spülen
Luft	Trocknen im Trockenschrank , 100°C

Die Beschichtung mit Dimethyldichlorosilan (Repel) erfolgte, indem die gebrauchsfertige Lösung bis zur vollständigen Befüllung in den Mikrokanal gepumpt wurde und dort 5 Minuten verweilte. Anschließend wurden die Kanäle mehrmals mit Isopropanol und Wasser gespült und im Trockenschrank getrocknet.

Für die Beschichtung mit Perfluorodecylsilan wurde eine 10 mM Lösung in Perfluorooctan hergestellt und der Mikrokanal mit dieser gefüllt. Nach 30 min wurden die Mikrokanäle des Chips als erstes mit Perfluorooctan, dann mit Isopropanol und zum Schluss mit Wasser mehrfach gründlich gespült, bevor die Trocknung im Trockenschrank erfolgte.

Bei der Beschichtung mit Teflon AF erfolgte die Vorbehandlung, wie beschrieben, mit Repel. Im Anschluss daran wurde durch die Kanäle eine 0,1 %-ige Teflonlösung (in Perfluorooctan) gepumpt. Es musste darauf geachtet werden, dass der Fluidstrom nie zum Stillstand kam. Das Spülen der Kanäle erfolgte analog zu dem Ablauf bei der Beschichtung mit Perfluorodecylsilan.

Zur Untersuchung der jeweiligen Beschichtungen wurden die Chips mit 10 µl PCR-Lösung, aufgenommen zwischen Mineralöl, befüllt, verschlossen und auf dem Tischthermocycler mit dem *in-situ*-Adapter für 35 PCR-Zyklen amplifiziert.

2.8 PCR-Systeme

Zur Etablierung der PCR auf verschiedenen Mikrochip-Thermocyclern wurden drei PCR-Systeme mit unterschiedlichen Produktlängen eingesetzt. Dabei handelte es sich um Plasmid-DNA eines Abschnitts des Tumorsuppressorgens p53 mit einer Länge von 151 bp, welches zur Etablierung der PCR auf dem stationären PCR-Chip diente. Als Referenzsysteme wurden außerdem ein Standardsystem des GAPDH-Gens mit 379 bp (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) und zwei Fragmente (124, 740 bp) des onkogenen Abschnitt E6 von HPV 16 (Human Papillomavirus) Genoms verwendet. Zur Etablierung der PCR in Durchflusschip-Thermocyclern wurde

ausschließlich das PCR-System zum Nachweis von HPV 16 E6 verwendet. Dieses System wurde durch Prof. Dr. M. Dürst von der Frauenklinik der Friedrich-Schiller-Universität Jena (FSU) zur Verfügung gestellt und wird zum Nachweis von HPV-infizierten Zellen für die Diagnostik von Gebärmutterhalskrebs verwendet. Die eingesetzten Primersequenzen sind in der Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11 Primersequenzen der verwendeten PCR-Systeme

Typ	Primer 1 (forward)	Primer 2 (reverse)
p53 Exon 6 (131 bp)	5'-GCTCTTAGGTCTGGCCCCTC-3'	5'-CAAACCAGACCTCAGGCGGC-3'
HPV 16 E6 (124 bp)	5'-AATGTTTCAGGACCCACAGG-3'	5'-CTCACGTTCGCAGTAACTGTTG-3'
HPV 16 E6 (740 bp)	5'-AATGTTTCAGGACCCACAGG-3'	5'-ATGGTTTCTGAGAACAGATGGGGC-3'
GAPDH (379 bp)	5'-CCCATCACCATCTTCCAGGAGC-3'	5'-CCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3'

2.9 PCR-Protokolle

Alle folgenden Temperatur-Zeit-Protokolle und PCR-Ansätze wurden als Referenzen zu den jeweiligen Chipläufen im kommerziellen Tischthermocycler von Eppendorf mitgeführt und gegenübergestellt. Aufgrund der verschiedenen technologischen Anforderungen zwischen den Stationären- und den Durchfluss-PCR-Chipsystemen wurden auch spezifische Protokolle entwickelt und etabliert.

2.9.1 3-Schritt-Protokolle für die stationäre PCR

Wenn nicht anders angegeben, wurden die in Tabelle 12 aufgeführten PCR-Programme mit 25 Zyklen verwendet. Die einzelnen PCR-Ansätze unterschieden sich in ihrer Zusammensetzung nur in der Art der Zusätze. Es wurden Ansätze (Tabelle 13) ohne Verwendung von Additiven (Protokoll 1) oder Ansätze unter der Zugabe von BSA und Q-Solution (Protokoll 2) eingesetzt. Q-Solution ist ein firmenspezifisches Additiv von Qiagen, dessen Hauptbestandteile Betain und DMSO sind [88]. In der Regel wurde das PCR Core Kit der Firma Qiagen eingesetzt.

Tabelle 12 Temperatur-Zeit-Protokolle der verschiedenen PCR-Systeme

Programmschritt		p53 Exon 6	HPV 16 E6	GAPDH
1 x Denaturierung		94°C → 3 min	94°C → 3 min	94°C → 3 min
n-PCR-Zyklen	Denaturierung	94°C → 20 s	94°C → 20 s	94°C → 20 s
	Annealing	60°C → 20 s	60°C → 20 s	50°C → 20 s
	Elongation	68°C → 40 s	68°C → 40 s	68°C → 40 s

Tabelle 13 Zusammensetzung der PCR-Ansätze unter Verwendung des Qiagen PCR Core Kits, Ansatzvolumen = 50 μ l

Komponenten	Protokoll 1	Protokoll 2
Wasser	37 μ l	22 μ l
PCR-Puffer (10x)	5,0 μ l	5,0 μ l
BSA (10 μ M in Wasser)	/	5,0 μ l
Q-Solution (5x)	/	10 μ l
dNTP (je 10 mM)	1,0 μ l	1,0 μ l
Primer 1 (10 μ M)	2,5 μ l	2,5 μ l
Primer 2 (10 μ M)	2,5 μ l	2,5 μ l
DNA	1,0 μ l	1,0 μ l
Taq-DNA- Polymerase (5U/ μ l)	1,0 μ l	1,0 μ l

Um die Variabilität gegenüber alternativen Kit-Zusammensetzungen zu testen, kamen auch MasterMix-Kits und HotStar-Kits von Qiagen zum Einsatz. Die Zusammensetzung des HotStarTaq-DNA-Polymerase-Kits unterschied sich nicht von dem in Tabelle 13 beschriebenen Protokoll. Die Zusammensetzung der Master-Mix-Ansätze wurde in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14 Zusammensetzung der PCR-Ansätze unter Verwendung der Qiagen MasterMix-Kits mit Taq- oder HotStar-Taq-DNA-Polymerase, Ansatzvolumen = 50 μ l

Komponenten	Protokoll 3	Protokoll 4
Wasser	19,0 μ l	4,0 μ l
BSA (10 μ M)	/	5,0 μ l
Q-Solution (5x)	/	10 μ l
Primer 1 (10 μ M)	2,5 μ l	2,5 μ l
Primer 2 (10 μ M)	2,5 μ l	2,5 μ l
DNA	1,0	1,0
MasterMix	25 μ l	25 μ l

2.9.2 PCR-Protokoll für die *on-Chip*-Hybridisierung

Für den PCR-Produktnachweis des p53 Exon 6 mittels *on-Chip*-Hybridisierung wurde das Protokoll 5 (Tabelle 15) unter Verwendung eines Qiagen Master-Mix-Kits angewendet. Zur Etablierung dieses Nachweisverfahrens wurden 100 μ l des PCR-Ansatzes hergestellt, um entsprechend vergleichbare PCR-Proben vorliegen zu haben. Das Temperatur-Zeit-Protokoll entsprach dem in der Tabelle 12 (Seite 29) beschriebenen 3-Schritt-Protokoll.

Tabelle 15 PCR-Protokoll für die *on-Chip*-Hybridisierung, Ansatzvolumen = 100 μ l

Komponenten	Protokoll 5
MasterMix (Qiagen)	50 μ l
Wasser	32 μ l
DMSO	5,0 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1,0 μ l
Primer 1 (100 μ M)	5,0 μ l
Primer 2 (100 μ M)	5,0 μ l
DNA (10 ⁸ Moleküle/ μ l)	2,0 μ l

2.9.3 2-Schritt-Protokoll für die stationäre PCR

Zur weiteren Optimierung der gesamten Reaktionszeit wurden das PCR-Protokoll auf ein Zwei-Temperaturschritt-Programm (Tabelle 16) umgestellt. Damit liefen die Schritte Annealing und Elongation auf einer Temperaturzone bei 60 °C über 40 Sekunden ab.

Tabelle 16 Temperatur-Zeit-Protokoll der 2-Schritt-PCR mit p53

Programmschritt		Temperatur → Zeit
1x Denaturierung		94°C → 3 min
n-PCR-Zyklen	Denaturierung	94°C → 20 s
	Annealing/Elongation	60°C → 40 s

Gleichzeitig erhöhte sich die PCR-Zyklenzahl von bisher 25 auf 35 bzw. 45 Zyklen. Mit diesen Parametern sollte es möglich sein, die Nachweisgrenze des PCR-Systems p53 auf ein DNA-Molekül als Startkonzentration herabzusetzen.

2.9.4 Protokolle für die Durchfluss-PCR im Silizium-Glas-Chipthermocycler

Die vorhandenen HPV-PCR-Protokolle (Protokoll 6), die im konventionellen Tischthermocycler zum Einsatz kamen, wurden auf die Kits von Qiagen angepasst (Protokolle 7 und 8) und die Temperatur-Zeit-Protokolle entsprechend modifiziert (Tabelle 17 und Tabelle 18).

Die Anzahl der PCR-Zyklen betrug in dem Si-Glas-Chip konstant immer 25. Falls nicht anders angegeben, wurde Plasmid-DNA mit einer Ausgangskonzentration von 1 ng/ μ l verwendet. Die Chips wurden ausschließlich in der kontinuierlichen Betriebsweise mit einem PCR-Reaktionsvolumen von 25 μ l verwendet.

Tabelle 17 Temperatur-Zeit-Protokoll für das HPV-PCR-System

Programmschritt		Standard Temperatur → Zeit	modifiziert Temperatur → Zeit
1x Denaturierung		95°C → 10 min	94°C → 3 min
n-PCR- Zyklen	Denaturierung	95°C → 15 s	94°C → 20 s
	Annealing	60°C → 20 s	60°C → 20 s
	Elongation	72°C → 40 s	70°C → 40 s

Tabelle 18 Zusammensetzung der PCR-Ansätze in der FSU (Kit von Applied Biosystem) und des angepassten sowie modifizierten Protokoll unter Verwendung des Qiagen PCR Core Kits, Ansatzvolumen = 50 µl

Komponenten	Protokoll 6	Protokoll 7	Protokoll 8
Wasser	33,0 µl	37,0 µl	15,3 µl
PCR-Puffer (10x)	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl	-	-
BSA (10 µM)	-	-	5,0 µl
Q-Solution	-	-	10 µl
DMSO	2,5 µl	-	-
Tween 20	-	-	6,7 µl
dNTP (10 mM)	1,5 µl	1,0 µl	1,0 µl
Primer 1 (10 µM)	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Primer 2 (10 µM)	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
DNA (Plasmid HPV 16)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
Taq-Polymerase (5 units/µl)	0,5 µl	1,0 µl	1,0 µl

2.9.5 Protokolle für die Durchfluss-PCR im Glas-Glas-Chipthermocycler

Da der Glas-Glas-Durchflussschip eine Zone für die HotStart-PCR beinhaltete, wurde eine chemisch modifizierte Polymerase der Firma Genaxxon (Protokoll 9, Tabelle 19) verwendet und die Zeit für die erste Denaturierung auf 15 min erhöht. Für alle Versuchsreihen wurde ein Ansatzvolumen von 10 µl verwendet. Wurden die Experimente im segmentierten Probenstrom durchgeführt, kam neben dem Einlass für das Trägermedium Mineralöl, je nach Versuchsanordnung, eine der drei möglichen Injektionsstellen (RT-PCR, HotStart-PCR, Standard-PCR) auf dem Chip zum Einsatz (Abbildung 49, Seite 71). Das Verhältnis der Flussraten von Trägermedium und PCR-Lösung wurde mit 5:1 festgelegt. Wurde für die Experimente ein kontinuierlicher Probenstrom eingestellt, so wurde ein einzelner Fluideinlass verwendet und die Probe in Mineralöl eingebettet (vor der Probe 5 µl, nach der Probe 150 µl).

Tabelle 19 Zusammensetzung der PCR-Ansätze unter Verwendung der Genaxxon SuperHot *Taq*-DNA-Polymerase, Ansatzvolumen = 50 μ l

Komponenten	Protokoll 9
Wasser	22 μ l
Puffer X	5 μ l
BSA (10 μ M)	5 μ l
Q-Solution (Qiagen)	10 μ l
dNTP (je 10 nM)	1 μ l
Primer 1 (10 μ M)	2,5 μ l
Primer 2 (10 μ M)	2,5 μ l
DNA (1ng/ μ l)	1 μ l
SuperHot <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 units/ μ l)	1 μ l

2.9.6 Protokolle für Reverse Transkription mit PCR (RT-PCR)

In Abhängigkeit von den verwendeten Chipmodulen wurden für die RT-PCR-Reaktionen sowohl 2-Schritt (getrennte Ansätze und Abläufe von RT und PCR-Reaktion nacheinander) als auch 1-Schritt-Protokolle (beide Reaktionen laufen in einem Ansatz mit einem Enzym-Mix ab) getestet und im Folgenden beschrieben.

2.9.6.1 2-Schritt-Protokoll: Kombination RT mit Durchfluss-PCR

Für die Etablierung der RT-PCR-Reaktionen in den Durchflusship-Thermocyclern wurde ein 2-Schritt-Protokoll angewendet, bei dem der RT-Schritt im Tischthermocycler und die anschließende PCR im Durchflusship-Thermocycler durchgeführt wurde. Für die RT-Reaktion wurde das Kit SuperScript II von Invitrogen mit dem in Tabelle 20 angegebenen Protokoll 10 verwendet.

Tabelle 20 Protokoll für die Reverse Transkriptase mit dem SuperScript II Kit

Komponenten	Protokoll 10
Oligo(dT)-Primer	1 μ l
total RNA (0,5 μ g)	1 μ l
dNTP (je 10 mM)	1 μ l
Wasser	9 μ l
Mischen \Rightarrow Zentrifugieren \Rightarrow Erhitzen auf 65°C für 5 min \Rightarrow sofort auf Eis Abkühlen	
Puffer (5x)	4 μ l
DTT (0,1 M)	2 μ l
RNaseOUT (40 units/ μ l)	1 μ l
Mischen \Rightarrow Erhitzen auf 42°C für 5 min	
SuperScript II RT (200 units)	1 μ l
Mischen \Rightarrow Erhitzen auf 42°C für 50 min	
Inaktivierung durch Erhitzen auf 70°C für 15 min	

Bei der anschließenden PCR-Reaktion wurden 2 μ l der synthetisierten cDNA als Template auf einen 50 μ l PCR-Ansatz eingesetzt. Die Zusammensetzung der

Reaktionsansätze für die PCR entsprach beim Glas-Si-Chip dem Protokoll 8 und beim Glas-Glas-Chip dem Protokoll 9. Lediglich der reverse PCR-Primer wurde verändert (Tabelle 21), um ausschließlich RNA-spezifische Produkte nachweisen zu können.

Tabelle 21 Spezifische Primersequenzen für die RT-PCR

Typ	Primer 1 (forward)	Primer 2 (reverse)
HPV 16 E6 (143 bp)	5'-AATGTTTCAGGACCCACAGG-3'	5'-CTTTTGACAGTTAATACACCTCACG-3'

2.9.6.2 1-Schritt-Protokoll für die Durchfluss-RT-PCR

Für die Durchführung der Durchfluss-RT-PCR-Reaktionen mit einem Ein-Schritt-Protokoll wurde das kommerzielle One-Step-RT-PCR-Kit der Firma Invitrogen eingesetzt und auf die besonderen Gegebenheiten des Durchflussverfahrens angepasst. Die getesteten Zusammensetzungen der verwendeten Reaktionsmixturen sind in der Tabelle 22 beschrieben.

Tabelle 22 Zusammensetzungen der RT-PCR-Ansätze unter Verwendung des 1-Schritt-RT-PCR-Protokolls

Komponenten	Protokoll 11	Protokoll 12	Protokoll 13	Protokoll 14
Reaktions-Mix	25,0 µl	25,0 µl	25,0 µl	25,0 µl
Wasser	17,0 µl	2,0 µl	1,0 µl	-
Q-Solution (5x)	-	10,0 µl	10,0 µl	10,0 µl
BSA (10 µM)	-	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl
Primer 1 (10 µM)	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Primer 2 (10 µM)	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
total RNA (0,3 µg/µl)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
Enzym-Mix	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl
SuperHot <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 units/µl)	-	-	1,0 µl	2,0 µl

Tabelle 23 Temperatur-Zeit-Protokolle für die 1-Schritt-RT-PCR

Programmschritte		Temperatur → Zeit
Reverse Transkription		60°C → 30 min
Aktivierung der HotStart- <i>Taq</i> -DNA-Polymerase		94°C → 15 min
n-PCR-Zyklus	Denaturierung	94°C → 20 s
	Annealing	60°C → 20 s
	Elongation	72°C → 40 s

Die 1-Schritt-RT-PCR-Reaktionen wurden alle mit dem in Tabelle 23 beschriebenen Temperatur-Zeit-Protokoll durchgeführt.

Zur Absicherung der Ergebnisse wurden bei den RT-PCR-Versuchen verschiedene Negativkontrollen mitgeführt. Zum einen wurden Kontrollen ohne Zusatz von RNA (RNA-Negativkontrolle) durchgeführt, bei denen anstatt des RNA-Templates Wasser zugesetzt wurde. Zum anderen spielte auch die Kontrolle auf mögliche vorhandene DNA in der Probe eine wichtige Rolle (DNA-Negativkontrolle). Dafür wurde der standardmäßig eingesetzte RT-PCR-Enzymmix durch eine HotStart-*Taq*-DNA-Polymerase ersetzt und der Reaktionsansatz nach dem Standard-Protokoll amplifiziert.

2.10 PCR-Produktnachweise

Der Nachweis von PCR-Produkten kann prinzipiell nach zwei verschiedenen Methoden erfolgen. Zu den Standardmethoden gehört der Nachweis mittels Endpunktbestimmung, bei dem der Produktnachweis im Anschluss an die eigentliche PCR-Reaktion erfolgt. Als Alternative dazu wurden in den letzten Jahren vermehrt Realtime-Verfahren entwickelt, welche den qualitativen und quantitativen Produktnachweis bereits während der PCR-Reaktion ermöglichen.

2.10.1 Endpunktbestimmungen

Die Elektrophorese der PCR-Proben mit Agarosegelen ist ein Standardverfahren, um DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe aufzutrennen und so eine qualitative Aussage über das amplifizierte PCR-Produkt zu treffen. Daher wurde diese Methode für alle beschriebenen PCR-Reaktionen in dieser Arbeit verwendet.

Als Alternative zu dem Elektrophorese-Verfahren wurde zusätzlich eine *on-Chip*-Hybridisierung der PCR-Produkte getestet.

2.10.1.1 Horizontale Agarosegelelektrophorese

Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte immer mittels Gelelektrophorese auf 3%igen Agarosegelen (Agarose GTQ). Die elektrophoretische Auftrennung der Produkte fand bei 100 V für ca. 20 min statt. Die Färbung der Produktbanden erfolgte mit Ethidiumbromid, welches sowohl dem Laufpuffer als auch dem Agarosegel zugesetzt wurde. Als DNA-Standard für die spätere Produktgrößenbestimmung wurde der Marker Φ X174 Hinc II aufgetragen. Die notwendigen Rezepturen für die Elektrophorese befinden sich nachfolgend in Tabelle 24-Tabelle 27.

Tabelle 24 Rezeptur für 50x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA)

Bestandteil	Konzentration	Menge pro 1 l
Tris base		242 g
Eisessig		57,1 ml
EDTA	0,5 M	100 ml

Tabelle 25 Rezeptur für Elektrophorese-Laufpuffer

Bestandteil	Konzentration	Menge pro 1 l
TAE-Puffer	50x	20 ml
Ethidiumbromid	10 mg/ml	40 µl

Tabelle 26 Rezeptur für ein 3%iges Agarosegel

Bestandteil	Konzentration	Menge pro 100 ml
Agarose		3 g
TAE-Puffer	50x	2 ml
Ethidiumbromid	10 mg/ml	5 µl

Tabelle 27 Rezeptur für den Probenpuffer

Bestandteil	Konzentration	Menge pro 10 ml
Bromphenolblau		1 mg
TAE-Puffer	1x	7 ml
Glycerol		3 ml

2.10.1.2 *on-Chip*-Hybridisierung

Eine andere Methode zum spezifischen Produktnachweis mittels Endpunktbestimmung stellte die *on-Chip*-Hybridisierung dar. In Anlehnung an das Prinzip von DNA-Mikroarrays wurden auf speziell oberflächenmodifizierten und strukturierten Chipoberflächen (2.7.1.1, Seite 25 - Abbildung 13) Fängermoleküle gebunden, an denen die amplifizierten PCR-Produkte hybridisieren sollten. Als spezifische Fängermoleküle diente die Sequenz einer TaqMan-Sonde, welche über eine Aminomodifizierung am 5'-Ende kovalent an die mit GOPS (3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan) modifizierte und mit KOH aktivierte Chipoberfläche gebunden wurde. Als Kontrollen für die korrekte Anbindung wurde zum einen eine Kaliumhydroxidlösung (KOH, 100 mM) und zum anderen zwei Oligonukleotid-Lösungen mit verschiedenen Sequenzen zur Hybridisierung verwendet, welche am 5'-Ende ebenfalls eine Aminomodifizierung und am 3'-Ende eine Fluoreszenzmarkierung mit Fluorescein (FITC) besaßen. KOH diente dabei zum Nachweis unspezifischer Bindungen an der Chipoberfläche, da an

dieser Stelle keine Hybridisierung stattfindet. Mit den direkt fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden konnte nachgewiesen werden, dass eine kovalente Anbindung über die Aminogruppe sequenzunabhängig stattfand.

Die entsprechenden Sonden (Tabelle 28) wurden für die Anbindung an die Chipoberfläche in 100 mM KOH aufgenommen und auf vergleichbare Konzentrationen (ca. 30 μ M) eingestellt.

Tabelle 28 Sequenzen und Modifizierungen der verwendeten Fängermoleküle, welche auf die Oberfläche gebunden wurden

Name	Sequenzen	Modifikation	
		5'-Ende	3'-Ende
Sonde	5'-TCTTATCCGAGTGGG AAATTTGCGTGTG-3'	NH ₂ -C ₆	-
Kontrolle 1	5'-GAGGGGCCAGACCTAAGAGC-3'	NH ₂ -C ₆	FITC
Kontrolle 2	5'-TTTTTTCAGCATGTGCTCCTTGATTCTATG-3'	NH ₂ -C ₆	FITC

Die hergestellten Lösungen wurden anschließend unter feuchter Atmosphäre (LF = 50 %) in das vorgesehene Detektionsfenster auf den PCR-Chip aufgetragen (Nadelspotter: SpotBot, Telechem International, Inc.). Dabei wurden Spotternadeln des Typs SMP 4 verwendet, welche ein Aufnahmevolumen von 0,25 μ l haben und pro Spott in Abhängigkeit von der Hydrophobizität der Oberfläche ca. 1,1 nl abgeben. Der Chip mit dem aufgetragenen Sondenmuster wurde für ca. 16 Stunden in einer Feuchtkammer im Hybridisierungsofen (HB-1000 Hybridizer, UVP) bei 37°C inkubiert und anschließend nach dem Standardprotokoll (Tabelle 29) gewaschen.

Tabelle 29 Standardprotokoll zum Waschen der Chips nach der Inkubation der Sonden

Waschlösung	Konzentration	Zeit	Wdh.
Triton X-100	0,1 %	5 Minuten	-
Salzsäure (HCl)	37 %	2 Minuten	1x
Kaliumchlorid (KCl)	0,1 M	10 Minuten	-
Wasser		1 Minute	-
Blockungsreagenz: Ethanolamin SDS Tris Wasser	für 100 ml: 0,305 ml (61 g/mol) 1 ml (10 %) 10 ml (1 M, pH 8) 89 ml	15 Minuten	-
Wasser		1 Minute	-

Die Waschlösungen (je 100 ml) wurden entsprechend der benötigten Konzentration hergestellt. Das Waschen erfolgte in Glaspetrischalen auf einem Schütteltisch. Im Anschluss wurden die Chips im Stickstoffstrom getrocknet.

Für den anschließenden Hybridisierungsschritt wurde die PCR mit einem fluoreszenzmarkierten Primer (Primer 2 -Tabelle 30) nach dem Protokoll 5 (Tabelle 15, Seite 31) mit 25 PCR-Zyklen im Tischthermocycler durchgeführt.

Tabelle 30 Primersequenzen für den PCR-Produktnachweis mittels *on-Chip*-Hybridisierung

Typ	Primer 1 (forward)	Primer 2 (reverse)
p53 Exon 6 (131 bp)	5'-GCTCTTAGGTCTGGCCCTC-3'	5'-FIC-CAAACCAGACCTCAGGCGGC-3'

Das PCR-Ergebnis wurde mittels Elektrophorese kontrolliert. Von der amplifizierten PCR-Lösung wurden 60 µl abgenommen, mit 20 µl SSC-Puffer (20x konzentriert) sowie 0,8 µl SDS (10%-ig v/v) gemischt. Von dieser Lösung wurden 2 µl auf das für die Hybridisierung mit angebondenen Fängermolekülen vorbereitete Detektionsfenster des stationären PCR-Chips aufgetragen. Die Lösung wurde zum Verdunstungsschutz mit 10 µl Mineralöl gedeckelt. Anschließend wurde der Chip auf den *in-situ*-Adapter gelegt und das Programm zur Hybridisierung (4 min → 94°C, 60 min → 70°C, 30 min → 60°C, 72 h → 37°C) gestartet. Nach der Hybridisierung wurden die Chips je zweimal für 10 Minuten mit 2 x SSC und anschließend je zweimal für 10 Minuten mit 0,2 x SSC-Puffer gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Auswertung erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie und durch einen Fluoreszenzscanner.

2.10.2 Realtime-Detektion

Der Detektionsaufbau für die Realtime-Detektion der PCR-Produkte auf dem stationären PCR-Chip wurde, wie in Abbildung 15 beschrieben, in einem vollständig abgedunkelten Aufbau realisiert. Die Abdunklung war notwendig, um möglichst gleichbleibende Bedingungen für die Messungen zu schaffen und eine gute Abschirmung gegen das einfallende Tageslicht zu erreichen, welches zur Übersteuerung des Photomultipliers führen würde. Die verwendeten Filtersätze für die Anregung und Detektion der Fluoreszenzsignale wurden anhand der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe (Sybr Green und 6-FAM) ausgewählt. Als Referenz-Thermocycler wurde das kommerzielle Realtime-System ABI 7300 von Applied Biosystems herangezogen. Die Auswertung

der Messdaten mit dem Referenz-Thermocycler erfolgte mit der 7300 System SDS Software.

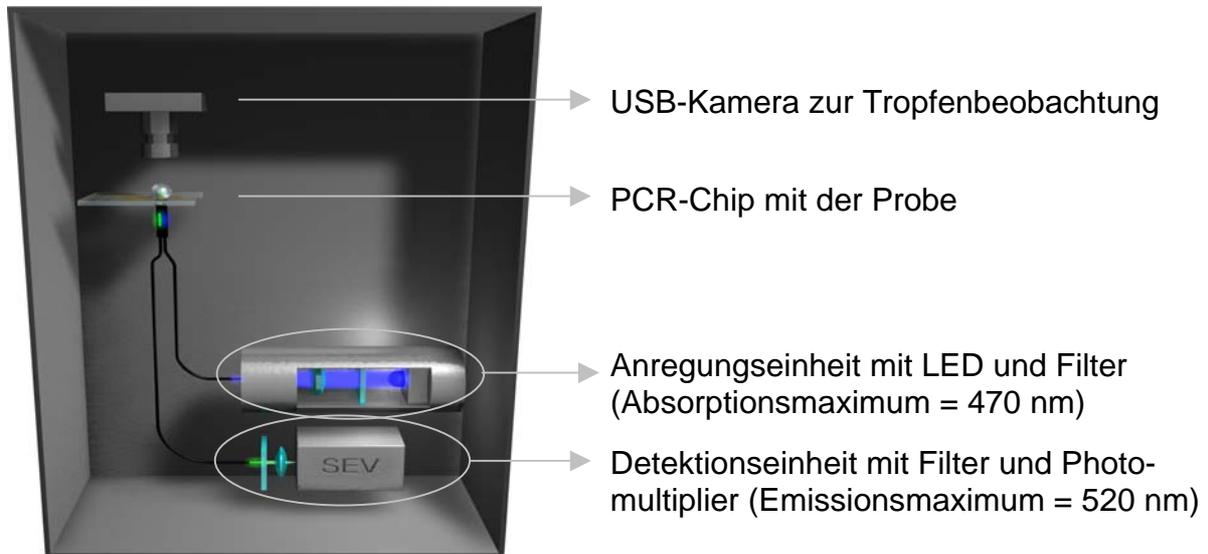


Abbildung 15 Schematischer Chipaufbau mit Realtime-Detektion

Die ermittelten Fluoreszenz-Rohdaten wurden nach folgendem System ausgewertet (Abbildung 16). Im ersten Schritt wurde ein Wert für das Grundrauschen ermittelt. Dafür wurde der Mittelwert der Reportersignale (R_n) während der ersten PCR-Zyklen, vor einem signifikanten Anstieg der Detektionskurve, errechnet. Im zweiten Schritt wurde dieser Mittelwert von allen aufgenommenen Reportersignalen abgezogen und so ΔR_n bestimmt. Dieser Schritt wird durchgeführt, um Schwankungen auszugleichen, die während der PCR auftreten können.

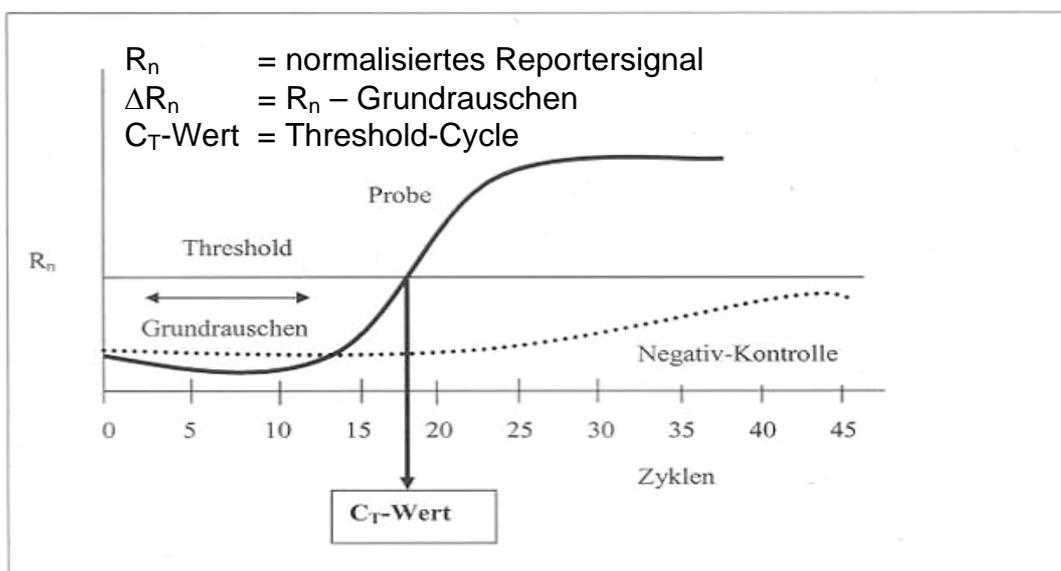


Abbildung 16 Auswertung einer Realtime-Detektionskurve

In einem dritten Arbeitsschritt wurde für jede aufgenommene Detektionskurve der C_T -Wert bestimmt. Der so genannte Threshold-Cycle (C_T -Wert) drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg des Reportersignals über die Grundlinie erfasst wird.

Für eine Quantifizierung wurden die C_T -Werte gegen die logarithmische Verteilung bekannter DNA-Konzentrationen aufgetragen, daraus die Standardkurve der jeweiligen DNA-Verdünnungsreihe ermittelt und über dessen Anstieg auf die PCR-Effizienz (E) rückgeschlossen (Gleichung 2). Eine PCR-Effizienz von 100 % entspricht einer genauen Verdoppelung der Kopienzahl in jedem PCR-Zyklus.

Gleichung 2: $E = (10^{-1/\text{Anstieg}})^{-1} \Rightarrow \text{Anstieg} = -3,3 = E = 100 \%$

2.10.2.1 Unspezifische Realtime-Detektion

Es wurde ausschließlich mit Sybr Green I der Firma Molecular Probes gearbeitet, welches kommerziell 10.000x konzentriert in DMSO (Dimethylsulfoxid) zur Verfügung stand. Von der konzentrierten Lösung wurde eine 20x Verdünnung in DMSO hergestellt, von welcher 0,5 µl pro 50 µl PCR-Ansatz hinzugefügt wurde. Dies entsprach einer 0,2x Endkonzentration von Sybr Green im PCR-Ansatz. Die Bestimmung der Nachweisgrenzen wurde analog zu dem im Abschnitt 2.9.3 (Seite 31) beschrieben Versuchen auf dem PCR-Chip wiederholt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte zum einen über die Analyse der Detektionskurve und zum anderen wurden die PCR-Produkte unter Verwendung von Ethidiumbromid als Fluoreszenzfarbstoff auf ein Agarosegel aufgetragen und nach der Elektrophorese ausgewertet.

2.10.2.2 Spezifische Realtime-Detektion

Für den spezifischen PCR-Produktnachweis mittels Realtime-Detektion wurde eine TaqMan-Sonde verwendet, welche durch die Firma Thermo Electron GmbH synthetisiert und mit den Fluoreszenzfarbstoffen 6-FAM und TAMRA modifiziert wurde. Dafür wurde an das 5'-Ende 6-Fam als Reporterfarbstoff, sowie an das 3'-Ende TAMRA als Quencherfarbstoff angehängen. Die konstruierte Sonde hatte eine Länge von 31 Basen mit folgender Sequenz:

5'-TCTTATCCGAGTGGAAAATTTGCGTGTG-3'.

Es wurde eine 10 µM Lösung der Sonde in Wasser hergestellt, wovon 0,5 µl auf einen 50 µl PCR-Reaktionsansatz verwendet wurden. Die Bestimmung der Nachweis-

grenzen wurde analog zu dem im Abschnitt 2.9.3 (Seite 31) beschriebenen Versuchen auf dem PCR-Chip wiederholt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte über die Analyse der Detektionskurve und zusätzlich wurden die PCR-Produkte unter Verwendung von Ethidiumbromid als Fluoreszenzfarbstoff auf ein Agarosegel aufgetragen und nach der Elektrophorese ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Stationäre PCR in Chipthermocyclern

Die Versuchsreihen zur Durchführung von PCR-Reaktionen in Chipthermocyclern umfassten im ersten Teil die Etablierung von PCR-Protokollen auf den stationären PCR-Chips. In Vorversuchen musste dabei die PCR-Kompatibilität der verwendeten Chipoberflächen geklärt und die Reaktionsansätze entsprechend angepasst werden. Die Oberflächenmodifizierung spielte dabei eine besondere Rolle. Für die folgenden PCR-Versuche wurde das PCR-System p53-Exon 6 verwendet, welches im Abschnitt 1.1.1 (Seite 4) beschrieben wurde.

3.1.1 PCR-Kompatibilitätsuntersuchungen für die Chip-PCR

Um zu untersuchen, ob die Chipoberflächen mit den eingesetzten Enzymen, der DNA und anderen PCR-Reagenzien der Reaktionsansätze kompatibel sind, wurden PCR-Reaktionsansätze mit verschiedenen Mengen an trockenem Chipmaterialpulvern versetzt, nach dem Protokoll 1 (Tabelle 13, Seite 30) im Tischthermocycler amplifiziert und ihr Einfluss auf die PCR untersucht.



Abbildung 17 Inverse gelelektrophoretische Aufnahme, die den Einfluss der Zugabe von verschiedenen Mengen Materialpulver auf eine PCR-Reaktionen im Tischthermocycler (Volumen = 100 μ l) zeigt: links - Zugabe von Glaspulver; mitte - Zugabe von Siliziumpulver; rechts - Zugabe von Li-Niobatpulver

- M Marker
- 1 neg. Kontrolle, ohne DNA
- 2 pos. Kontrolle, ohne Material
- 3 Zugabe von 5 mg Material
- 4 Zugabe von 10 mg Material
- 5 Zugabe von 15 mg Material
- 6 Zugabe von 20 mg Material
- M Marker

Die Auswertung der Gelaufnahmen nach der Elektrophorese (Abbildung 17) zeigten, dass schon bei der Zugabe von 5 mg Materialpulver die PCR-Reaktion vollständig

inhibiert wurde. Dabei wurde der negative Einfluss unabhängig von der Materialart (Glas, Silizium oder Li-Niobat) gleich stark sichtbar.

In einem weiteren Versuchsteil sollte beurteilt werden, ob sich die PCR-Effizienz unter Verwendung von Additiven, wie BSA (Rinderserumalbumin) und Q-Solution maßgeblich verbessern lässt. Dafür wurden die beschriebenen Versuche mit dem Protokoll 2 (Tabelle 13, Seite 30) wiederholt.



Abbildung 18 Inverse gelelektrophoretische Aufnahme, die den Einfluss der Zugabe von verschiedenen Mengen Materialpulver in Kombination mit der Verwendung von BSA und Q-Solution als Additive auf eine PCR-Reaktionen im Tischzycler (Volumen = 100 μ l) zeigt: links - Zugabe von Glaspulver; mitte - Zugabe von Siliziumpulver; rechts - Zugabe von Li-Niobatpulver

- M Marker
- 1 neg. Kontrolle, ohne DNA
- 2 pos. Kontrolle, ohne Material
- 3 Zugabe von 5 mg Material
- 4 Zugabe von 10 mg Material
- 5 Zugabe von 15 mg Material
- 6 Zugabe von 20 mg Material
- M Marker

Die erneute Überprüfung der PCR-Kompatibilität (Abbildung 18) zeigte unter Verwendung entsprechender Additive bei der Zugabe von Glas und Silizium eine deutliche Verbesserung der PCR-Effizienz. Die PCR-Ansätze erreichten bei Silizium dieselbe Produktausbeute wie in der positiven Kontrolle ohne Materialzugabe. Unter der Zugabe von Glas wurde ein leichtes Abschwächen der Produktbande mit steigender Materialmenge erkennbar. Dem gegenüber wurde die PCR bei der Zugabe von mehr als 5 mg Li-Niobat-Pulver vollständig unterdrückt.

Aufgrund dieser Ergebnisse der PCR-Kompatibilitätsuntersuchungen erfolgte eine Modifikation der Chipoberflächen mittels Dimethyldichlorosilan, Perfluorodecylsilan und Teflon AF.

3.1.2 Charakterisierung der modifizierten Chipoberflächen

Aufgrund dieser Ergebnisse der PCR-Kompatibilitätsuntersuchungen wurden die Chipoberflächen mittels Dimethyldichlorosilan, Perfluorodecylsilan und Teflon AF, wie im Abschnitt 2.7 (Seite 23) beschrieben, modifiziert und anschließend charakterisiert. Die Charakterisierung erfolgte zum einen über die Bestimmung der Kontaktwinkel, worüber Aussagen zu den Benetzungseigenschaften abgeleitet wurden, sowie über die Rasterkraft-Mikroskopie, welche Aussagen über die Schichtdicke und Homogenität der Oberflächenmodifikation zulässt.

Die Kontaktwinkelergebnisse zeigen, dass auf sauberen, unbehandelten Silizium- und Glasoberflächen alle getesteten Flüssigkeiten spreiteten und somit die Chipoberflächen vollständig benetzt wurden. Die beschichteten Oberflächen zeigten alle hydrophobes Verhalten und wiesen einen Kontaktwinkel mit Wasser größer als 100° auf. Bei der Kontaktwinkelbestimmung mit PCR-Lösung lagen die Ergebnisse ca. 10° niedriger. Dagegen zeigten die beschichteten Oberflächen bei der Messung mit Mineralöl verschiedene Messergebnisse. Während die Dimethyldichlorosilan-Oberflächen mit Mineralöl noch gute Benetzungseigenschaften aufwiesen, zeigten Teflon AF oder Perfluorosilanoberflächen ein partielles nicht-Benetzungsverhalten. Mit der Kombination Perfluorodecylsilan (PFS) und Mineralöl konnte ein Kontaktwinkel von max. 85° erreicht werden. Die gewonnenen Messdaten sind detailliert in der Tabelle 31 dargestellt.

Tabelle 31 Kontaktwinkel (KW) der verschiedenen Oberflächenbeschichtungen mit Wasser, PCR-Lösung und Mineralöl

Feste Phase	Flüssige Phase		
	Wasser	PCR-Lösung	Mineralöl
Silizium, Glas	KW $< 20^\circ$ 	KW $< 10^\circ$ 	KW $< 10^\circ$ 
Dimethyl-dichlorosilan	KW $100^\circ - 110^\circ$ 	KW $85^\circ - 95^\circ$ 	KW $30^\circ - 50^\circ$ 
Teflon AF	KW $110^\circ - 120^\circ$ 	KW $95^\circ - 105^\circ$ 	KW $65^\circ - 75^\circ$ 
Perfluorodecylsilan	KW $110^\circ - 120^\circ$ 	KW $95^\circ - 105^\circ$ 	KW $75^\circ - 85^\circ$ 

Zur weiteren Charakterisierung wurden zusätzlich die Oberflächenenergie nach drei verschiedenen Methoden (Equation of State, Fowkes und Owens&Kaelble) bestimmt. Aus Tabelle 32 wird ersichtlich, dass die totale freie Oberflächenenergie aller verwendeten Beschichtungen im Vergleich zu den unbehandelten Glasoberflächen gering ist. Betrachtet man die Verteilung zwischen dispersen und polaren Anteilen der Oberflächenenergie genauer, so wird deutlich dass die modifizierten Oberflächen fast ausschließlich durch den dispersen Anteil (>90%) bestimmt sind.

Tabelle 32 Aufstellung freier Oberflächenenergien (SE) unterschiedlicher Beschichtungsarten mit ihren dispersen und polaren Anteile, sowie deren Regressionskoeffizienten (RQ)

Oberfläche	Methode							
	Equation of State		Fowkes		Owens-W.-R. & Kaelble			
	SE (total)	RQ	SE (disp.)	RQ	SE (total)	SE (disp.)	SE (polar)	RQ
Glas	45,93	0,9679	60,48	0,8649	50,27	26,54	23,74	0,9387
Dimethdichl.	21,55	0,9954	24,61	0,9719	19,36	17,51	1,85	0,9973
Teflon AF	15,87	0,9982	16,66	0,9659	13,26	12,11	1,15	0,9974
Perfluorodec.	15,34	0,9984	15,72	0,9484	13,37	12,73	0,63	0,9824

Um einen Eindruck über die Homogenität der Beschichtungen und die Art ihrer Ausbildung, sowie ihrer Schichtdicke zu bekommen, wurden die modifizierten Oberflächen mittel Rasterkraft-Mikroskopie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass mit allen angewandten Beschichtungsprotokollen geschlossene, homogene Oberflächenbeschichtungen erzeugt werden konnten.

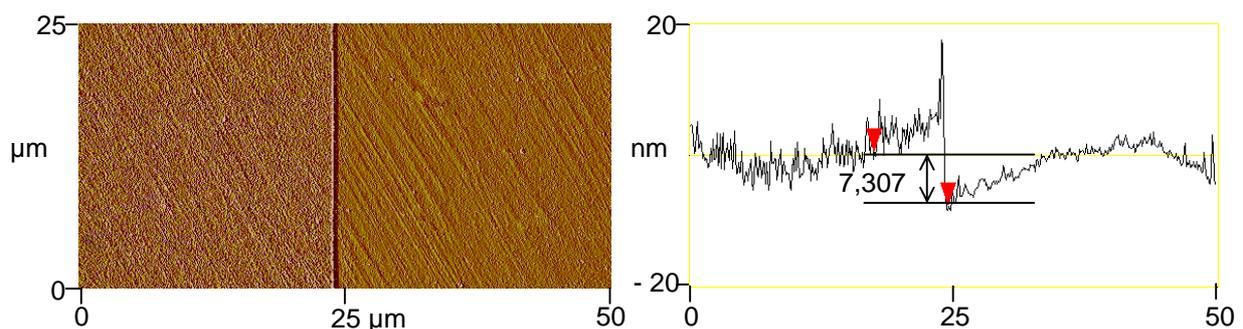


Abbildung 19 links - Ausschnitt einer Rasterkraft-mikroskopischen Aufnahme einer Dimethyldichlorosilan-Beschichtung mit einer Fläche von 25 x 50 µm
rechts - Höhenprofil an der Kante zwischen Dimethyldichlorosilan und der Glasoberfläche

Bei der Beschichtung mit Dimethyldichlorosilan (Abbildung 19) betrug die Schichthöhe durchschnittlich 5 nm (SH im dargestellten Schnitt = 7,307 nm) und bei der

Beschichtung mit Teflon AF (Abbildung 20) wurden ca. 60 nm gemessen (SH im dargestellten Schnitt = 61,714 nm).

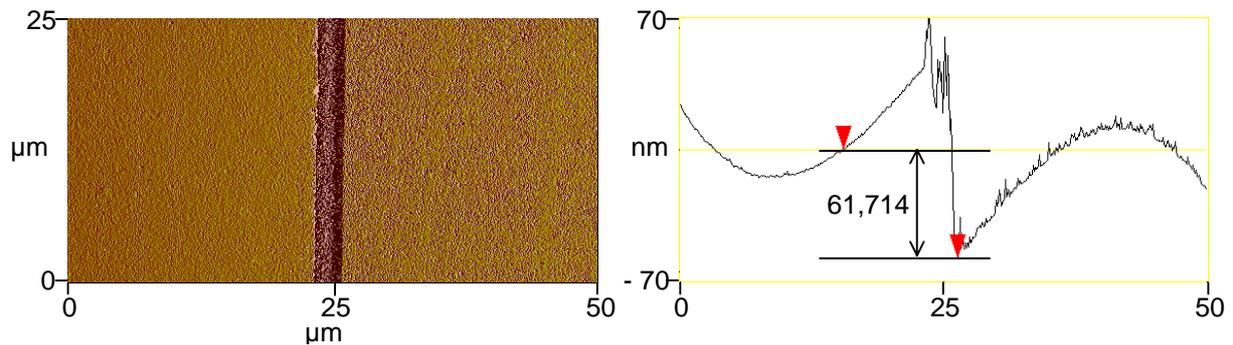


Abbildung 20 links - Ausschnitt einer Rasterkraft-mikroskopischen Aufnahme einer Teflon AF-Beschichtung mit einer Fläche von 25 x 50 µm
rechts - Höhenprofil an der Kante zwischen Teflon AF und der Glasoberfläche

Dabei wies Perfluorodecylsilan (Abbildung 21) eine durchschnittliche Schichthöhe (SH) von 10 nm auf (SH im dargestellten Schnitt = 8,717 nm).

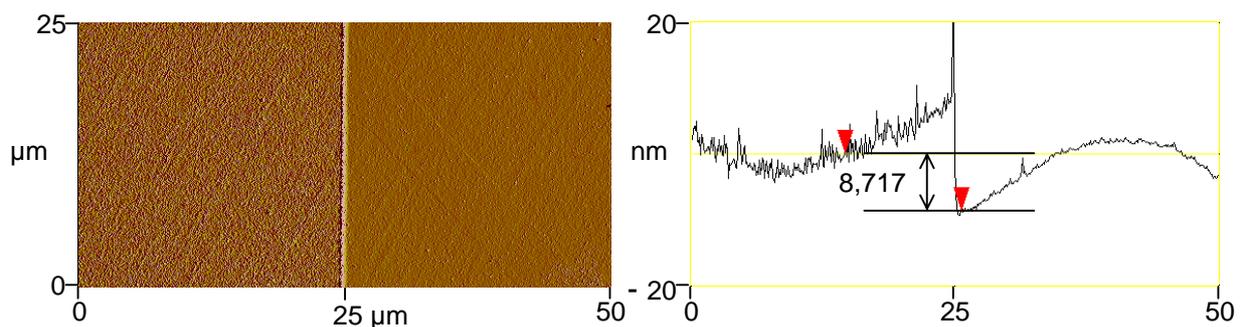


Abbildung 21 links - Ausschnitt einer Rasterkraft-mikroskopischen Aufnahme einer Perfluorodecylsilan-Beschichtung mit einer Fläche von 25 x 50 µm
rechts - Höhenprofil an der Kante zwischen Perfluorodecylsilan und der Glasoberfläche

In einer weiteren Untersuchung sollte die Stabilität der verwendeten Oberflächenmodifikationen unter PCR-Bedingungen überprüft werden. Daher wurden in Vorversuchen unstrukturierte Glaschips mit den drei beschriebenen Beschichtungsarten (Dimethyldichlorosilan, Teflon AF, Perfluorodecylsilan) modifiziert. Die PCR-Versuche wurden auf dem Tischthermocycler unter Verwendung des *in-situ*-Adapter durchgeführt. Dafür wurden je 3 µl PCR-Ansatz unter Verwendung von Mineralöl zur Überschichtung auf einer markierten Stelle der Glaschipoberfläche amplifiziert. Ziel war es, die Kontaktwinkel der Oberflächen über einen Zeitraum von 10 PCR-Läufen (à 25

Zyklen) zu verfolgen. Die Ergebnisse der PCR-Versuche wurden parallel dazu mittels Gelelektrophorese ausgewertet. Die Kontaktwinkelmessungen erfolgten mit Wasser, PCR-Lösung und Mineralöl. Beispielhaft für das Verhalten der Flüssigkeiten über die Anzahl von 10 PCR-Läufen wurde im Diagramm 1 der Kontaktwinkelverlauf von Wasser (PCR-Lösung => Diagramm 11, Mineralöl => Diagramm 12: Anhang, Seite 105) dargestellt.

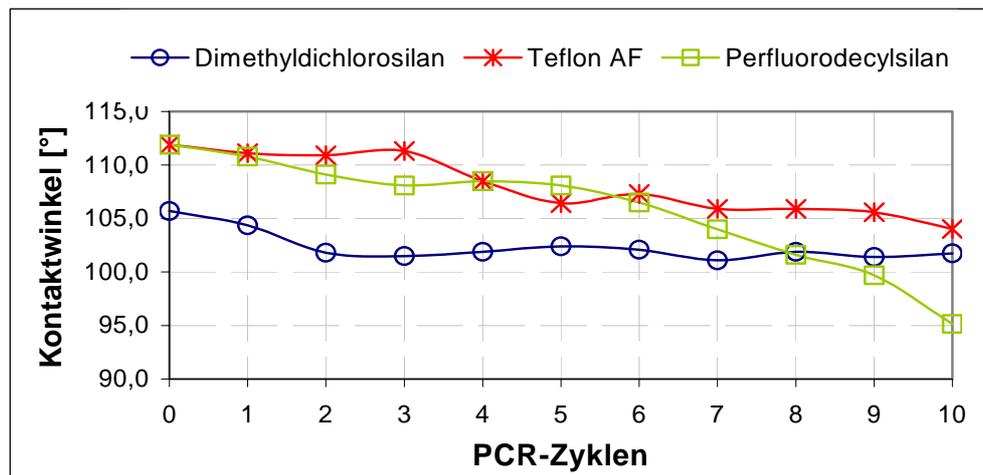


Diagramm 1 Stabilität der Kontaktwinkel von Wasser über 10 PCR-Läufe in Abhängigkeit von der Oberflächenbeschichtung

Nach jedem PCR-Lauf wurde beim Auftragen von Wasser auf die Oberfläche sichtbar, dass sich die Kontaktwinkel nur in einem geringem Bereich zwischen 95 und 112 Grad änderten, dabei zeigten Teflon AF und Perfluorodecylsilan leicht abnehmende Tendenz.

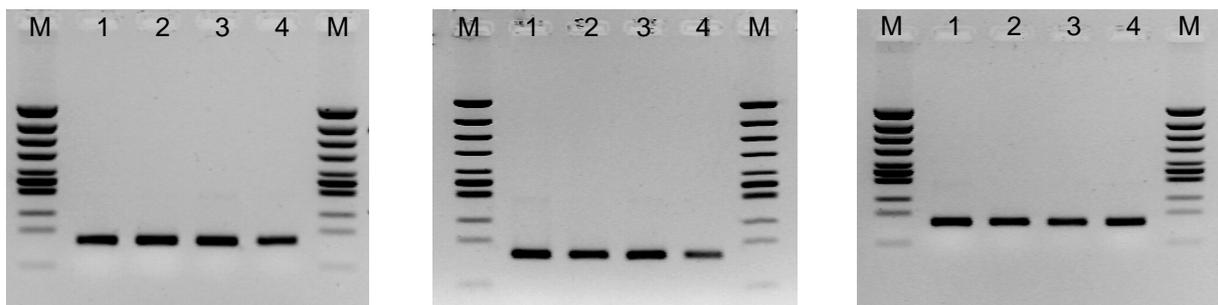


Abbildung 22 Inverse gelelektrophoretische Aufnahmen, die den Einfluss auf die PCR-Effizienzen im Abhängigkeit von der Anzahl der PCR-Läufe auf identischen Reaktionsflächen auf dem Chip zeigen:
links - 1. PCR-Lauf; mitte - 5. PCR-Lauf; rechts - 10. PCR-Lauf

- M Marker
- 1 pos. Kontrolle, TC
- 2 Dimethyldichlorosilan, *in-situ*-Adapter
- 3 Teflon AF, *in-situ*-Adapter
- 4 Perfluorodecylsilan, *in-situ*-Adapter
- M Marker

Betrachtet man die im Abbildung 22 dargestellten Ergebnisse der PCR-Läufe, so war zu erkennen, dass im Bezug auf die Referenzproben aus dem Tischthermocycler sich die Produktbanden in ihrer Intensität nicht merklich in Abhängigkeit von der Anzahl der PCR-Läufe unterschieden.

Als Ergebnis lässt sich festhalten, dass alle getesteten Beschichtungen für die stationären Chipthermocycler ähnlich gut geeignet sind.

3.1.3 Entwicklung eines stationären PCR-Chipthermocyclers

Um zu untersuchen ob sich Mikrochip-Thermocycler für die Durchführung von PCR-Reaktionen mit geringen Probenvolumen ($<10 \mu\text{l}$) eignen, wurde ein spezielles Chip-layout entwickelt (Abbildung 23). Es umfasste 4 Heizer- und Sensorstrukturen, die getrennt ansteuerbar sind. Dabei wurden die Platinheizer- und Temperatursensoren um ein quadratisches Detektionsfenster ($2 \times 2 \text{ mm}$) angeordnet. Außerdem wurde ein kreisförmiger fluidischer Anker, mit einem Durchmesser von $1,7 \text{ mm}$ in zwei Detektionsfenster eingebracht. Der Leistungsbedarf der Heizer betrug $1,5 \text{ W}$. Der Widerstand der Sensoren bei Raumtemperatur lag in Abhängigkeit von der Platinschichtdicke zwischen 400 und 600Ω . Die Temperaturgenauigkeit der Strukturen war bis auf $0,1 \text{ K}$ einstellbar und regelbar.

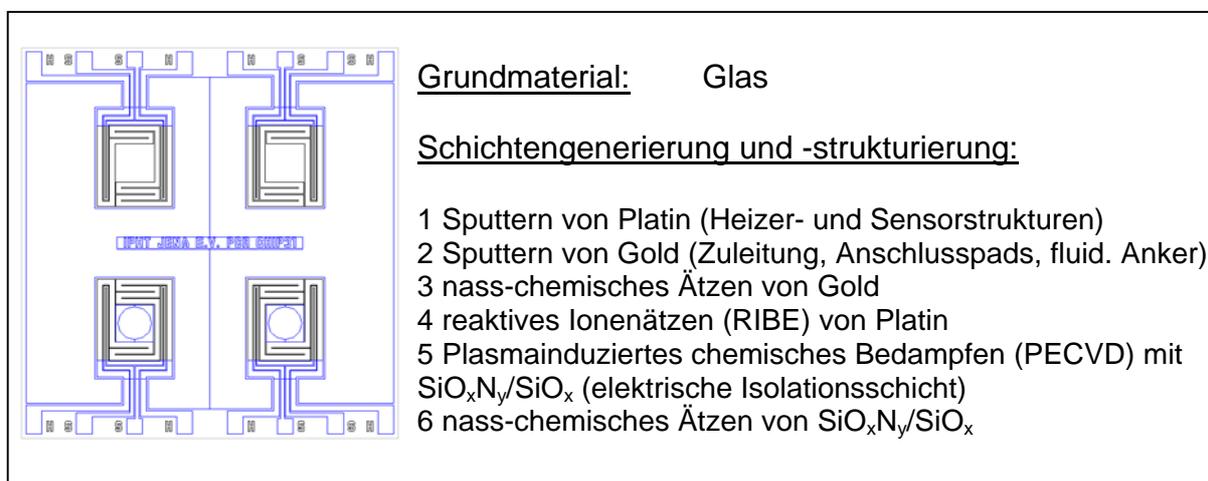


Abbildung 23 Darstellung des verwendeten Chiplayout mit der Beschreibung des Schichtaufbaus

Wenn nicht anders angegeben, wurden mit Teflon AF beschichtete Oberflächen verwendet, wodurch stabile Oberflächenbeschichtungen mit besonderen Benetzungseigenschaften erzielt wurden. Der Vorteil von Teflon AF lag neben seiner einfachen Handhabung, bei der geringen Kontaktfläche des PCR-Tropfens zur Chipoberfläche.

Als Deckelmedium zum Verdunstungsschutz kam Mineralöl, im Allgemeinen mit einem Volumen von 10 – 20 μl , zum Einsatz (Abbildung 24).

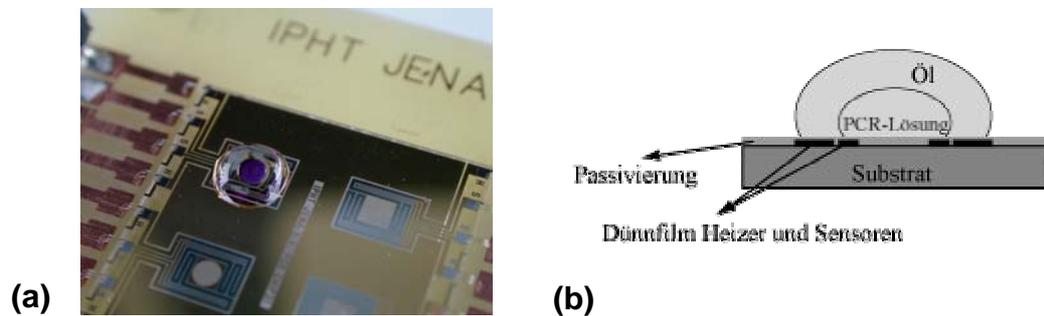


Abbildung 24 (a) Aufnahme eines PCR-Tropfens (blau) der mit Mineralöl gedeckelt wurde.
(b) Funktionsprinzip der PCR auf planaren Chipoberflächen

3.1.3.1 Funktionsnachweise der stationären PCR-Chips

Vergleich Tischthermocycler (TC) – *in-situ*-Adapter – stationärer PCR-Chip

Um die Funktionsweise und Leistungsfähigkeit der stationären Chipthermocycler einzuschätzen wurde Untersuchungen zur Gegenüberstellung mit einem konventionellen Gerätesystem durchgeführt. Dafür wurden die Produktausbeuten der PCR in Eppendorf-Reaktionsgefäßen, auf dem *in-situ*-Adapter und dem stationären PCR-Chip miteinander verglichen (Abbildung 25).

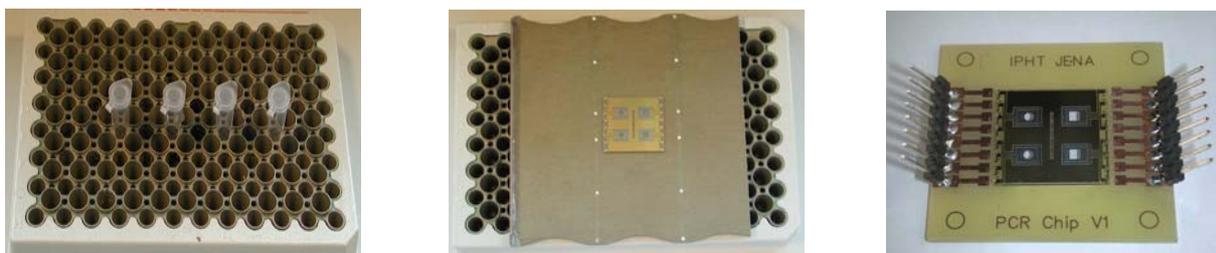


Abbildung 25 links - Tischthermocycler mit Eppendorf-Reaktionsgefäßen
mitte - Tischthermocycler mit *in-situ*-Adapter
rechts - stationärer PCR-Chip

Die Auswertung erfolgte mittels Grauwertanalyse der originalen Abbildungen der Produktbanden im Agarosegel nach der Gelelektrophorese. Dabei wurde für alle Versuche der identische PCR-Ansatz verwendet. Die Experimente in Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden mit einem Standardvolumen von 25 μl , sowie um die Ergebnisse vergleichbar zu machen mit 3 μl PCR-Lösung und 10 μl Mineralöl-Überschichtung durchgeführt. Die stationären Chipthermocycler wurden auf verschiedene Art und Weisen betrieben. Als erstes erfolgte die Temperierung über einen

auf den Tischthermocycler aufgesteckten *in-situ*-Adapter. Für eine bessere Wärmeübertragung wurde auf diesen Thermopaste gleichmäßig verteilt, auf welche danach die Chips platziert wurden. Die zweite Betriebsweise war die Chips über die integrierten Heizerstrukturen zu heizen. Auf dem PCR-Chip wurde eine Heizrate von 4 K/s festgelegt, welche unter Umständen auf 15 K/s hätte erhöht werden können. Die vom Hersteller des Tischthermocyclers angegebenen 3 K/s Heizrate für den Thermoblock wurde nicht erreicht. Bei der Messung mit dem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 1 K/s und mit dem Chip auf dem *in-situ*-Adapter 0,5 K/s ermittelt. Die durchschnittlichen Kühlraten lagen bei dem PCR-Chip bei 3 K/s, bei dem Tischthermocycler unabhängig von der Betriebsweise bei 0,5 K/s. Daraus ergaben sich für die gesamte Reaktionszeit bei einer PCR mit 35 Zyklen geräteabhängig folgende Werte: Tischthermocycler mit Reaktionsgefäß = 1 h : 44 min; Tischthermocycler mit *in-situ*-Adapter = 3 h : 54 min; PCR-Chip = 48 min.

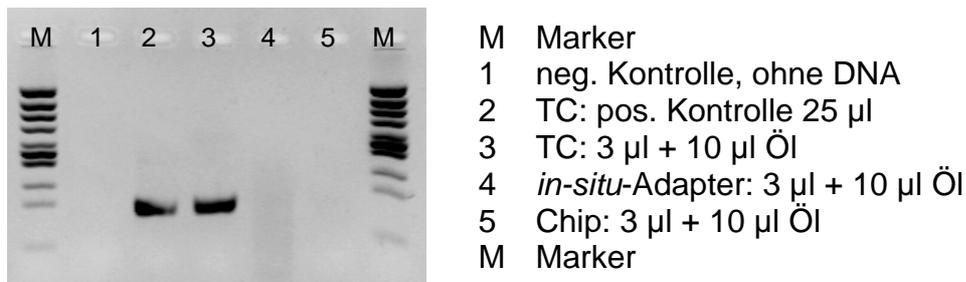


Abbildung 26 Inverse gelelektrophoretische Aufnahme zum Vergleich der PCR-Effizienz von Tischthermocycler (TC), *in-situ*-Adapter und PCR-Chip unter Angabe der Reaktionsvolumina und der quantitativen Auswertung der Produktbanden mittels Grauwertanalyse (Anhang, Seite 105), PCR-Ansatz ohne Zugabe von Additiven

Bei der Durchführung der PCR nach dem Protokoll 1 (Tabelle 13, Seite 30) ohne Zugabe von Additive konnte lediglich beim Tischthermocycler ein Produktnachweis erfolgen (Abbildung 26). Die Stärke der Produktbande war dabei unabhängig vom eingesetzten PCR-Volumen, 25 und 3 µl, gleich groß. Bei den PCR-Läufen auf dem *in-situ*-Adapter und dem PCR-Chip konnte kein PCR-Produkt nachgewiesen werden.

Die Auswertung der PCR-Versuche unter der Verwendung des Protokolls 2 (Tabelle 13, Seite 30) mit Zugabe von Additiven (Abbildung 27) zeigte vergleichbar starke Produktbanden zwischen den getesteten Versuchsanordnungen im Tischthermocycler, dem *in-situ*-Adapter und dem stationären PCR-Chip. Die Grauwertanalyse bestätigte den optischen Eindruck und ergab Bandenintensitäten im Bereich von 6,7 bis 7,8. Die Abweichung vom Mittelwert betrug dabei weniger als 10%.

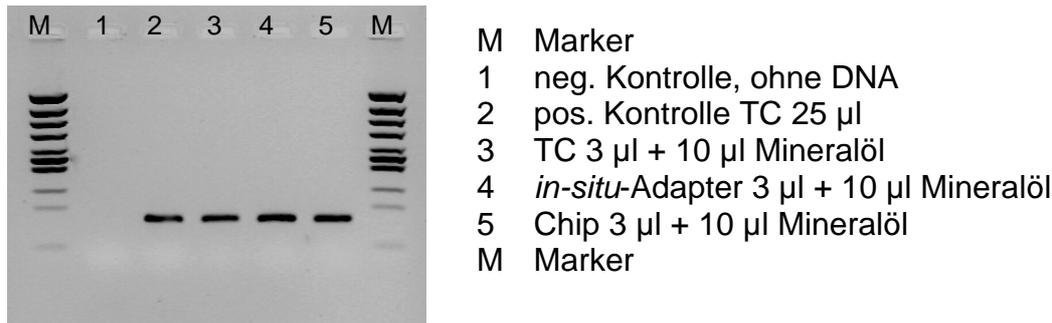


Abbildung 27 Inverse gelelektrophoretische Aufnahme zum Vergleich der PCR-Effizienz von Tischthermocycler (TC), *in-situ*-Adapter und PCR-Chip unter Angabe der Reaktionsvolumina und der quantitativen Auswertung der Produktbanden mittels Grauwertanalyse, PCR-Ansatz mit Zugabe von Additiven (BSA + Q-Solution)

Als Ergebnis wurde damit der Funktionsnachweis der entwickelten stationären Chipthermocycler unter Verwendung von Teflon AF als Oberflächenbeschichtung und einem Reaktionsvolumen von 3 μ l bei einer Reaktionszeit über 25 PCR-Zyklen von 48 Minuten erbracht.

Vergleich verschiedener PCR-Kits im Tischthermocycler und auf dem PCR-Chip

Nach dem prinzipiellen Funktionsnachweis der stationären PCR-Chipthermocycler wurde überprüft, welchen Einfluss die Verwendung unterschiedlicher kommerzieller PCR-Kits auf das PCR-Ergebnis hat. Grundsätzlich können für die PCR-Ansätze verschiedene PCR-Kits verwendet werden. Die Kits unterscheiden sich dabei im Allgemeinen in der Zusammensetzung der Puffer und in der Modifizierung der DNA-Polymerase. Es wurden verschiedene PCR-Kits der Firma Qiagen getestet. Dabei wurden neben Mastermix-Ansätzen vor allem die Eignung von modifizierten Polymerasen, sogenannte HotStart-Polymerasen, überprüft.

Die gezeigten Aufnahmen (Abbildung 28) wiesen deutliche Unterschiede in den Produktausbeuten zwischen den Tischthermocycler-Läufen und dem stationären PCR-Chip auf. Während die verschiedenen PCR-Kits im Tischthermocycler vergleichbare Ergebnisse zeigten (Gel links), verhielten sich die verwendeten Kits auf dem Chipthermocycler (Gel rechts) sehr unterschiedlich. Besonders deutlich wird der Unterschied zwischen den Standard-Ansätzen und den Master-Mix-Ansätzen. Die Produktausbeuten der Standard-Ansätze auf dem stationären PCR-Chip waren in Abhängigkeit von der eingesetzten Polymerase vergleichbar groß. Dagegen waren die Produktausbeuten mit den Master-Mix-Ansätzen sichtbar niedriger und im Fall der HotStart-Polymerase kaum nachweisbar.

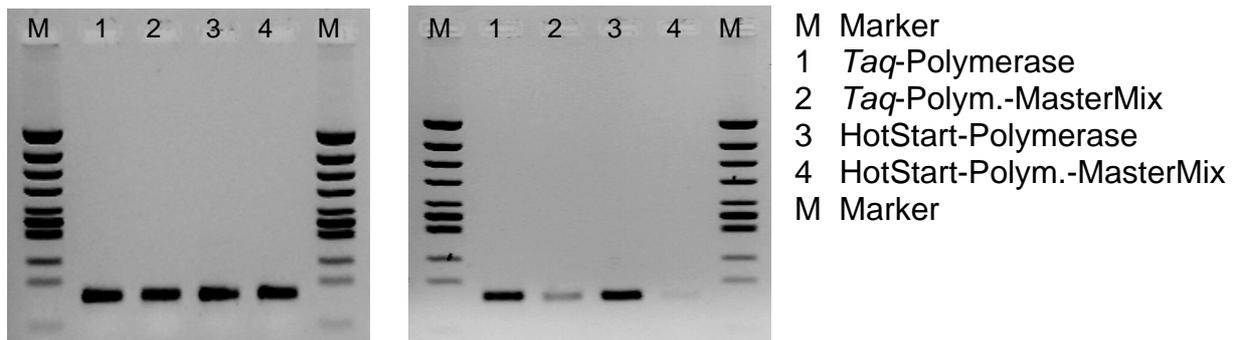


Abbildung 28 Inverse gelelektrophoretische Aufnahmen zum Vergleich der PCR-Effizienz von Tischthermocycler (Gel links) und stationären PCR-Chip (Gel rechts) mit verschiedenen PCR-Kits der Firma Qiagen bei einem Reaktionsvolumen von 3 µl

Die Ergebnisse ließen damit den Schluss zu, dass die MasterMix-Kits der Firma Qiagen sich nicht für PCR-Reaktionen auf den stationären PCR-Chipthermocycler eignen.

Vergleich verschiedener Volumen an PCR-Lösung auf dem stationären PCR-Chip

Ein Vorteil der stationären Chipthermocycler liegt bei der Analyse kleiner Probenvolumina. Daher sollte in den nächsten Untersuchungen geklärt werden, wie weit man das Volumen an PCR-Lösung reduzieren kann, ohne dass die PCR-Reaktion aufgrund von Limitierungen der Reagenzien behindert wird. Das dabei verwendete Volumen an Mineralöl zum Deckeln wurde mit 10 µl konstant gehalten.

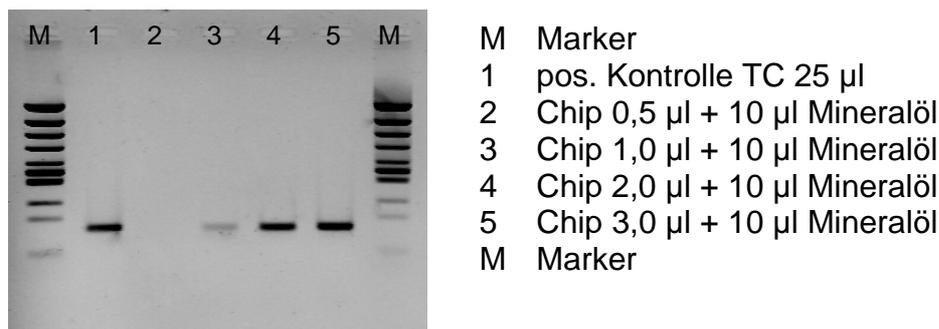


Abbildung 29 Inverse gelelektrophoretische Aufnahme zum Vergleich der PCR-Effizienz auf dem PCR-Chip in Abhängigkeit von dem angegebenen PCR-Volumen

Die Abbildung 29 zeigt, dass das minimal verwendbare Volumen bei 1 µl PCR-Ansatz lag. Mit diesem Volumen konnte allerdings nur eine geringe Produktausbeute erzielt werden. Ab einem Volumen von 2 µl wurde die PCR-Effizienz deutlich erhöht und damit entsprechend gute PCR-Ergebnisse, vergleichbar zu einem 25 µl PCR-Ansatz im Tischthermocycler, erreicht.

Vergleich verschiedener PCR-Systeme im Tischthermocycler und auf dem PCR-Chip

Um die universelle Einsatzfähigkeit des PCR-Chips nachzuweisen, wurden verschiedene PCR-Systeme getestet und mit dem Tischthermocycler verglichen. Bei den verwendeten PCR-Systemen handelte es sich um Genabschnitte der Human-Papillomavirus-DNA (HPV), der Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und des Tumorsuppressorgens p53. Die amplifizierten PCR-Produkte unterschieden sich in ihrer Fragmentlänge von 740, 379 und 131 Basenpaaren (bp). Die eingesetzten Protokolle sind im Abschnitt 2.9.1 (Tabelle 12, Protokoll 2-Tabelle 13, Seite 30) beschrieben.

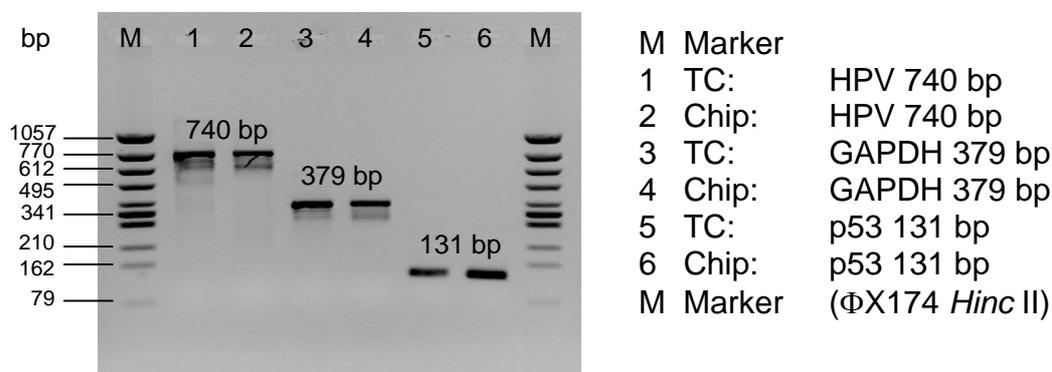


Abbildung 30 Inverse gelelektrophoretische Aufnahme zum Vergleich der PCR-Effizienz von Tischthermocycler und PCR-Chip mit verschiedenen PCR-Systemen (HPV, GAPDH, p53)

Der Abbildung 30 kann entnommen werden, dass die verschiedenen PCR-Systeme auf dem stationären PCR-Chip vergleichbar gute Ergebnisse zum Tischthermocycler aufwiesen. Unabhängig von der Anzahl der Basenpaare konnten alle PCR-Fragmente erfolgreich amplifiziert werden.

3.1.3.2 Vergleich der Nachweisgrenzen Tischthermocycler, *in-situ*-Adapter und PCR-Chip

Nachdem der prinzipielle Funktionsnachweis der PCR-Chips erbracht wurde, war es nötig, die unteren DNA-Nachweisgrenzen zu bestimmen und die PCR-Effizienzen der verschiedenen PCR-Läufe (Tischthermocycler, *in-situ*-Adapter und PCR-Chip) miteinander zu vergleichen. Dafür wurde das bisher verwendete PCR-Protokoll auf ein 2-Temperatur-Schritt-Protokoll (Tabelle 16, Seite 31) modifiziert und auf 35 PCR-Zyklen erhöht.

Für die Nachweisgrenzenbestimmung wurden DNA-Startkonzentrationen von 2000, 200, 20 und 2 Moleküle/ μ l im Reaktionsansatz eingesetzt. Zusätzlich wurde in jedem

Versuchsteil eine Negativkontrolle ohne DNA mitgeführt. Es wurden jeweils 3 μl PCR-Lösung und 10 μl Mineralöl für die Reaktionen verwendet.

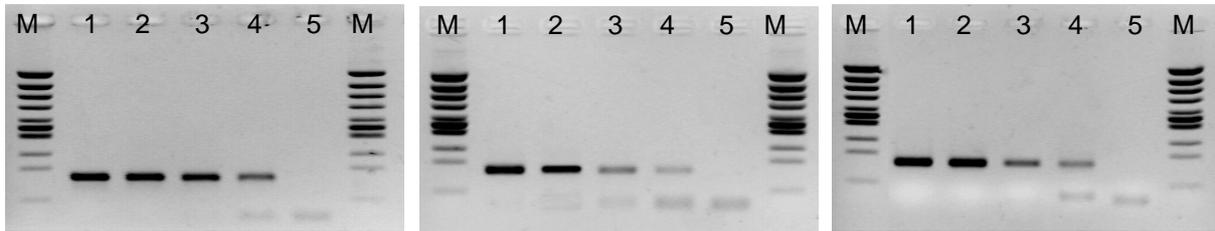


Abbildung 31 Inverse gelelektrophoretische Aufnahmen zum Vergleich der Nachweisgrenzen von Tischthermocycler, *in-situ*-Adapter und PCR-Chip: links - Tischthermocycler; mitte - *in-situ*-Adapter; rechts - PCR-Chip

M	Marker
1	2000 Moleküle/ μl
2	200 Moleküle/ μl
3	20 Moleküle/ μl
4	2 Moleküle/ μl
5	ohne DNA
M	Marker

Das linke Gel der Abbildung 31 zeigt für die PCR im Tischthermocycler bei einer Gesamt-molekülzahl von 6 noch eine deutliche Produktbande. Dagegen ist bei der PCR auf dem *in-situ*-Adapter (mittleres Gel) in diesem Molekülbereich nur noch eine sehr schwache Produktbande erkennbar. Mit der Chip-PCR (rechtes Gel) wurde ein Ergebnis erzielt, welches von der Bandenintensität zwischen dem Tischthermocycler und dem *in-situ*-Adapter einzuordnen ist.

Damit wurde für alle getesteten Geräteansätze unter den beschriebenen Bedingungen eine untere Nachweisgrenze von 2 Molekülen/ μl -Reaktionsansatz erzielt.

3.1.3.3 Chip-PCR mit unspezifischer Realtime-Detektion der PCR-Produkte

Ein Problem der Chip-PCR ist das Handling und die Analyse der kleinen PCR-Volumen. Daher wurde eine Realtime-Detektion zur Analyse der PCR-Produkte angestrebt. Zur unspezifischen Detektion von doppelsträngiger DNA werden interkalierende Farbstoffe wie Ethidiumbromid und Sybr Green eingesetzt. Aus Gründen der Empfindlichkeit solcher Fluoreszenzfarbstoffe wurde sich im Folgenden für Sybr-Green entschieden. Dieser Fluoreszenzfarbstoff behindert allerdings in zu hohen Konzentrationen die PCR-Reaktion, daher musste als erstes untersucht werden, welches die optimale Menge ist, die dem PCR-Ansatz zugesetzt werden kann.

Kommerziell lag die Sybr Green Lösung 10.000x konzentriert vor. Die empfohlene Endkonzentration im PCR-Ansatz sollte ca. 0,25x konzentriert sein. Daher wurden vier Verdünnungsstufen im Bereich von 0,1x bis 0,8x konzentriert getestet. Alle PCR-Produkte wurden unabhängig von der Zugabe von Sybr Green für die Realtime-Detektion während der Elektrophorese im Gel mit Ethidiumbromid nachgefärbt.

In Abbildung 32 kann man erkennen, dass die PCR-Reaktion bei einer 0,8x Konzentration an Sybr Green vollständig unterdrückt wurde. Bei einer 0,4x bis 0,1x Konzentration konnte dagegen ein vergleichbares PCR-Ergebnis erzielt werden wie in einem Ansatz ohne Zugabe von Sybr Green. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im weiteren Verlauf immer mit einer 0,2x Konzentration von gearbeitet.

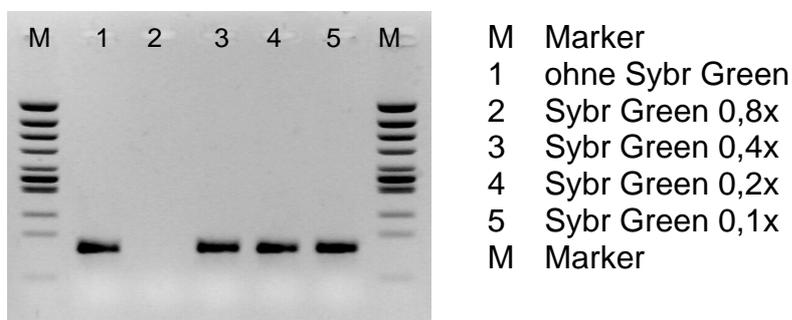


Abbildung 32 Inverse gelelektrophoretische Aufnahme zur Bestimmung der optimalen Sybr Green Konzentration für eine Realtime-Detektion der PCR-Produkte

Für die Vergleichsversuche mit Realtime-Detektion zwischen dem Realtime-Thermocycler ABI 7300 und dem stationären PCR-Chip wurden die identischen PCR-Ansätze verwendet, welche nach dem Protokoll 2 aus Tabelle 13 (Seite 30) hergestellt wurden. Das Reaktionsvolumen entsprach auf dem stationären PCR-Chip 3 μ l und im Realtime-Thermocycler 25 μ l.

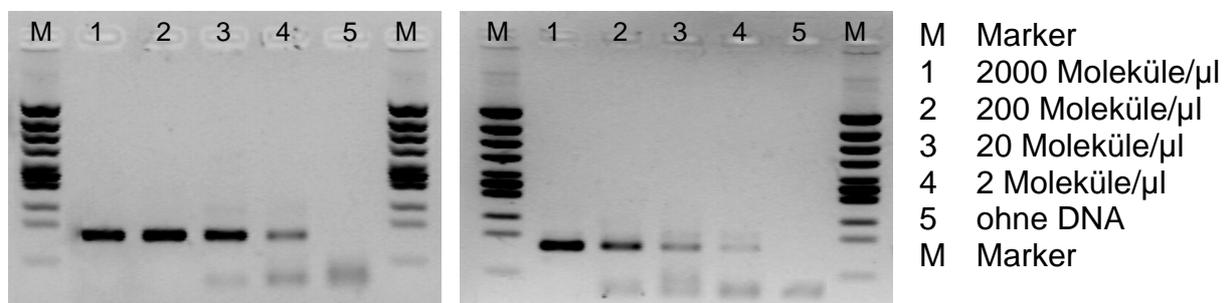


Abbildung 33 Inverse gelelektrophoretische Aufnahmen zum Vergleich der Nachweisgrenzen von Tischthermocycler (links) und PCR-Chip (rechts) unter Einsatz der Realtime-Detektion mit Sybr Green

Die Abbildung 33 zeigt die gelelektrophoretische Auswertung einer Verdünnungsreihe mit einer DNA-Ausgangskonzentration von 2000 Molekülen/ μl in 10-er Potenzschritten fallend bis auf 2 Moleküle/ μl und einer Negativkontrolle ohne DNA im Vergleich zwischen dem kommerziellen Realtime-Thermocycler ABI 7300 (links) und dem stationären PCR-Chip (rechts). Die Elektrophoresegele zeigten bei beiden Versuchen Produktbanden bis zu einer Nachweisgrenze von 2 Molekülen/ μl , womit das Ergebnis der Nachweisgrenzen ohne Realtime-Detektion bestätigt wurde.

Tabelle 33 Festlegung der Auswerteparameter für den kommerziellen Realtime-Cycler (ABI 7300) und den PCR-Chip mit Sybr Green

Auswerteparameter	ABI 7300	PCR-Chip
Baseline	3. bis 10. Zyklus	3. bis 10. Zyklus
Threshold (delta R_n)	5.000	75.000

Die Auswertung der Detektionskurven zu den zuvor gezeigten Elektrophoresegelelen des kommerziellen Realtime-Thermocyclers (Diagramm 2) und des stationären PCR-Chips (Diagramm 3) zeigen prinzipiell ähnliche Kurvenverläufe, wobei die Reporter-signale (delta R_n) bei dem Chipthermocycler deutlich höher lagen.

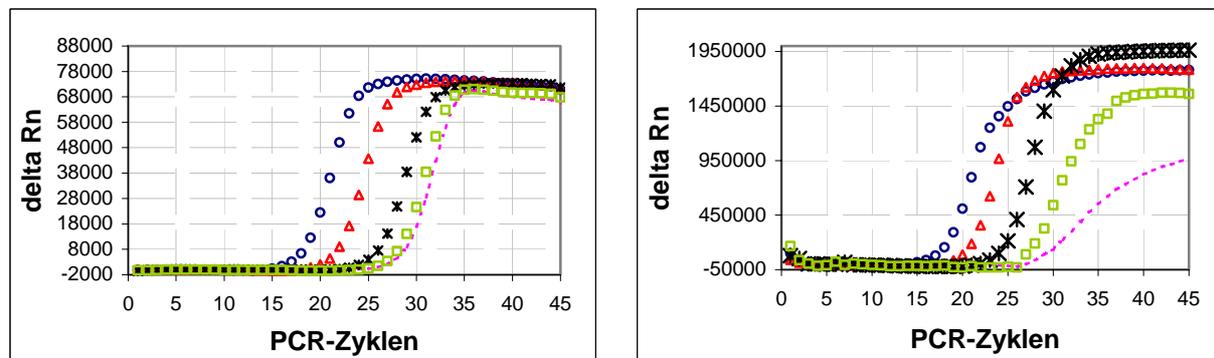


Diagramm 2 links - Detektionskurven des Realtime-Cyclers ABI 7300 mit verschiedenen DNA-Ausgangskonzentration

Diagramm 3 rechts - Detektionskurven des PCR-Chips mit verschiedenen DNA-Ausgangskonzentrationen

- ○ ○ ○ 2000 Moleküle/ μl
- △ △ △ △ 200 Moleküle/ μl
- * * * * 20 Moleküle/ μl
- □ □ □ 2 Moleküle/ μl
- ohne DNA

Die bei dem jeweils festgelegten Threshold (Tabelle 33) ermittelten Ct-Werte, für die einzelnen DNA-Konzentrationen, lagen bei dem ABI 7300 immer leicht über denen des stationären PCR-Chips. Anhand der gezeigten Ct-Werte (Tabelle 34) konnte zu jeder Versuchsreihe eine Standardgerade und deren Anstieg bestimmt werden.

Tabelle 34 Ct-Werte des ABI 7300 und des PCR-Chips in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration

DNA-Konzentration	Ct-Werte	
	ABI 7300	PCR-Chip
2000 Moleküle/ μ l	17,68	16,85
200 Moleküle/ μ l	21,12	19,80
20 Moleküle/ μ l	25,40	23,63
2 Moleküle/ μ l	27,48	26,88

Die Genauigkeit der einzelnen Messwerte zu den dargestellten Standardgeraden (Diagramm 4, Diagramm 5) wird durch das Bestimmtheitsmaß R^2 angegeben, welches bei dem kommerziellen Realtime-Thermocycler mit 98,4 % und beim stationären PCR-Chip mit 99,8% errechnet wurde. Anhand der Steigung der jeweiligen Standardgeraden konnte außerdem auf die PCR-Effizienz (Berechnung 2.10.2, Seite 38) rückgeschlossen werden:

ABI 7300 : Anstieg der Standardgerade = -3,368 \Rightarrow Effizienz = 98%

PCR-Chip: Anstieg der Standardgerade = -3,392 \Rightarrow Effizienz = 97%.

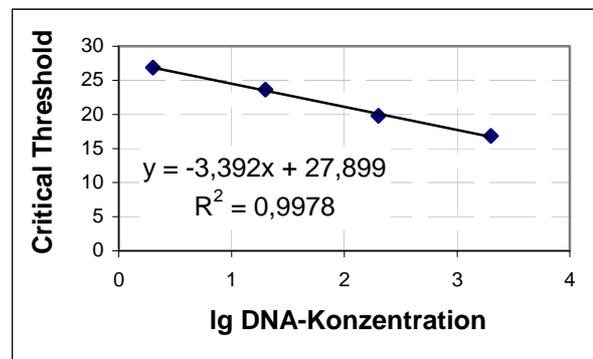
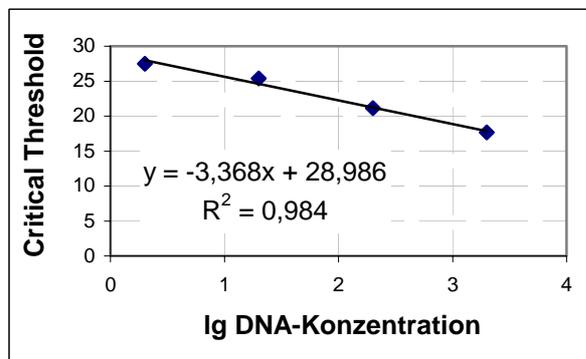


Diagramm 4 links - Standardgerade der Verdünnungsreihe des ABI 7300

Diagramm 5 rechts - Standardgerade der Verdünnungsreihe des PCR-Chips

3.1.3.4 Chip-PCR mit spezifischer Realtime-Detektion der PCR-Produkte

Für einen spezifischen Produktnachweis mittels Realtime-Detektion wurde eine doppelt-fluoreszenzmarkierte TaqMan-Sonde konstruiert, die spezifisch an einem bestimmten DNA-Abschnitt des gesuchten PCR-Produktes bindet (Abschnitt 2.10.2.2, Seite 40). Unter Einsatz dieser Sonde wurden die Versuche zur Bestimmung der Nachweisgrenze, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, wiederholt.

Die ausgewerteten Gelaufnahmen zeigten für die PCR im ABI Realtime-Thermocycler (Abbildung 34-links) und auf dem stationären PCR-Chip (Abbildung 34-rechts) eine Nachweisgrenze bei 2 Molekülen/ μl .

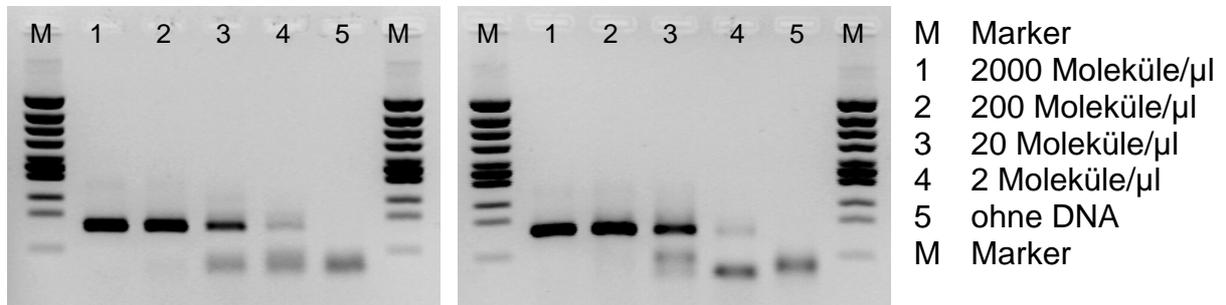


Abbildung 34 Inverse gelelektrophoretische Aufnahmen zum Vergleich der Nachweisgrenzen von Tischthermocycler (links) und PCR-Chip (rechts) unter Einsatz der Realtime-Detektion mit TaqMan-Sonden

Aus der Tabelle 35 sind die Parameter (Baseline, Threshold) zu entnehmen, mit denen die Auswertung der folgenden Detektionskurven erfolgte.

Tabelle 35 Festlegung der Auswerteparameter für den kommerziellen Realtime-Thermocycler (ABI 7300) und den Chipthermocycler mit TaqMan-Sonden

Auswerteparameter	ABI 7300	PCR-Chip
Baseline	7. bis 22. Zyklus	3. bis 10. Zyklus
Threshold (ΔR_n)	100	10.000

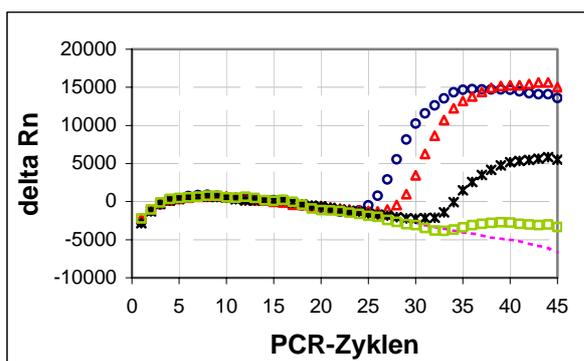


Diagramm 6 links - Detektionskurven des Realtime-Cyclers ABI 7300 mit verschiedenen DNA-Ausgangskonzentration

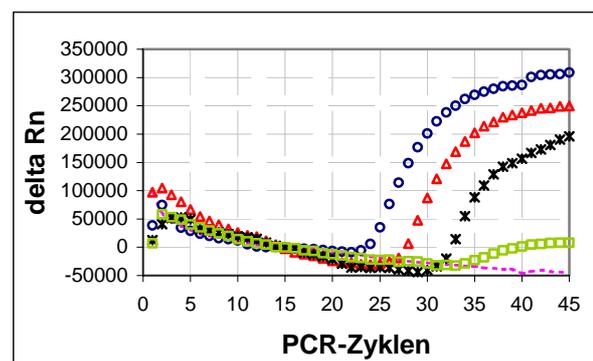


Diagramm 7 rechts - Detektionskurven des PCR-Chips mit verschiedenen DNA-Ausgangskonzentrationen

○○○○○○ 2000 Moleküle/ μl
 ▲▲▲▲▲ 200 Moleküle/ μl
 * * * * * 20 Moleküle/ μl
 □□□□□ 2 Moleküle/ μl
 - - - - - ohne DNA

Bei den Kurvenverläufen der einzelnen DNA-Konzentrationen konnten, außer der Höhe der Reportersignale, keine weiteren Unterschiede zwischen dem ABI-Cycler

(Diagramm 6) und dem PCR-Chip-System (Diagramm 7) festgestellt werden. Die gemessenen Fluoreszenzsignale lagen analog zu den Sybr Green Versuchen auf dem stationären PCR-Chip deutlich (10-fache) höher als die bei den Messungen im ABI-Cycler.

Die Signalhöhen bei der DNA-Konzentration von 2 Molekülen/ μl lagen bei beiden verwendeten Technologie-Plattformen unter den festgelegten Werten für den Threshold und konnten daher nicht mit in die Berechnung der Ct-Werte (Tabelle 36) für die Standardgeraden einfließen.

Tabelle 36 Ct-Werte des ABI 7300 und des PCR Chips in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration

DNA-Konzentration	Ct-Werte	
	ABI 7300	PCR-Chip
2000 Moleküle/ μl	25,52	24,18
200 Moleküle/ μl	28,45	28,08
20 Moleküle/ μl	34,09	32,85
2 Moleküle/ μl	nicht auswertbar	nicht auswertbar

Die Genauigkeiten der Standardgeraden wurden für den ABI-Cycler mit 96,77% und für den PCR-Chip mit 99,67 % berechnet. Anhand der berechneten Steigung der Standardgeraden (Diagramm 8, Diagramm 9) wurden folgende PCR-Effizienzen bestimmt: ABI 7300 : Anstieg der Standardgerade = -4,285 \Rightarrow Effizienz = 71%
PCR-Chip: Anstieg der Standardgerade = -4,335 \Rightarrow Effizienz = 70 %
Somit lag die PCR-Effizienz bei der Verwendung der TaqMan-Sonde für beide Systeme ca. 30 % unter den ermittelten Effizienzwerten bei der Verwendung von Sybr Green als Fluoreszenzfarbstoff.

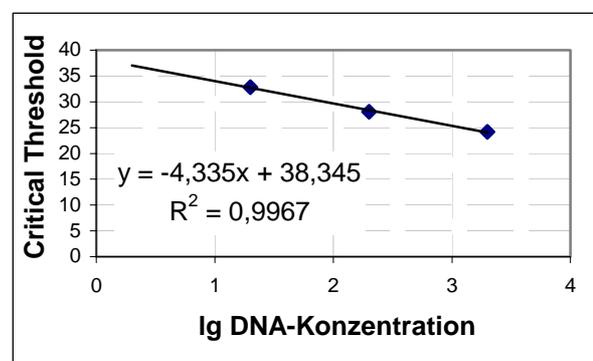
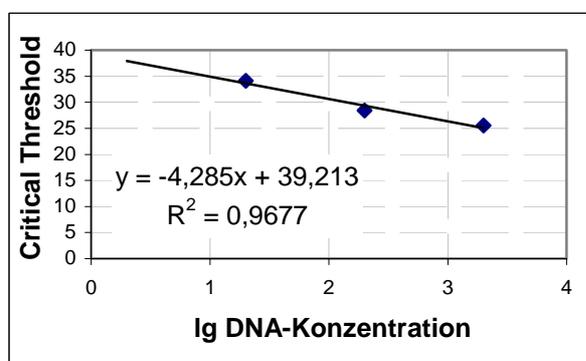


Diagramm 8 links - Standardgerade der Verdünnungsreihe des ABI 7300

Diagramm 9 rechts - Standardgerade der Verdünnungsreihe des PCR-Chips

Die Ergebnisse mit Realtime-Detektion zur Echtzeitüberwachung des Amplifikationsprozesses auf dem stationären PCR-Chip ergaben, dass der entwickelte Detektionsaufbau vergleichbare Nachweisgrenzen zum konventionellen Realtime-Thermocycler erzielt. Dabei wurden für den Nachweis mit Sybr Green 2 Moleküle/µl und mit der spezifischen TaqMan-Sonde 20 Moleküle/µl Reaktionsansatz erfolgreich detektiert.

3.1.3.5 Chip-PCR in Kombination mit *on-Chip*-Hybridisierung

Eine weitere Möglichkeit des spezifischen Produktnachweises ist die Hybridisierung an spezifische Sonden nach der eigentlichen PCR-Reaktion. In diesem Versuchsteil sollte getestet werden, ob eine Hybridisierung auf dem PCR-Chip möglich ist.

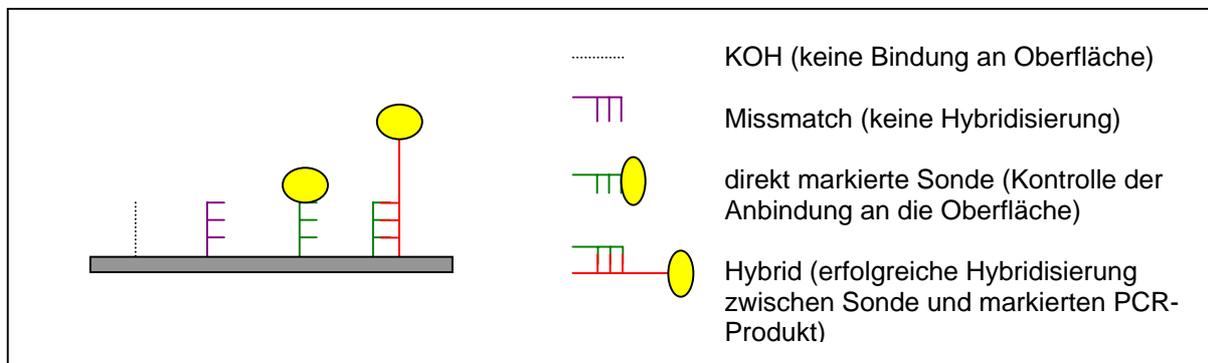
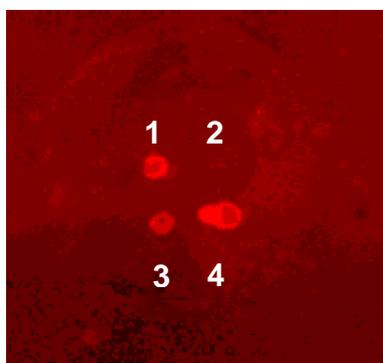


Abbildung 35 Schematische Darstellung der Hybridisierungsproben auf dem PCR-Chip.

Als Hybridisierungssonde wurde dabei dieselbe Sequenzfolge wie bei der TaqMan-Sonde verwendet, nur wurde diese am 5'-Ende mit einer Aminogruppe, für die Anbindung an die Oberfläche, modifiziert. Die Überprüfung der erfolgreichen Hybridisierung erfolgte über den Einbau eines fluoreszenzmarkierten Primers während der PCR (Abbildung 35).



- 1 erfolgreiche Hybridisierung des PCR-Produkts mit der Sonde
- 2 neg. Kontrolle ohne Sonde (Mismatch)
- 3 pos. Kontrolle mit direktmarkierter Sonde, anderer Sequenz
- 4 pos. Kontrolle mit direktmarkierter Sonde, anderer Sequenz

Abbildung 36 Chipaufnahme des Spotmusters nach der Hybridisierung

Nach Optimierung des Hybridisierungsprotokolls und der richtigen Spotplatzierung auf dem Chip war es möglich, einen erfolgreichen PCR-Produktnachweis mittels On-Chip-Hybridisierung durchzuführen.

In der Abbildung 36 ist die erfolgreiche Hybridisierung mit der Sonde (Position 1) sowie die positiven Kontrollen mit den direktmarkierten Sonden zu erkennen (Positionen 3, 4). Auf diese Weise wurde die erfolgreiche Anbindung der Sonden über eine chemische Ringöffnung an den oberflächenmodifizierten Chips nachgewiesen. An Position 2 wurde KOH als negative Kontrolle gespottet. Hier ist, wie zu erwarten, kein Bindeereignis mit dem PCR-Produkt aufgetreten. Damit konnte nachgewiesen werden, dass keine unspezifische Bindungen an der Chipoberfläche auftreten.

3.2 Entwicklung von Chipthermocyclern für die Durchfluss-PCR

Neben den stationären Chipthermocyclern wurde Chipsysteme für die Durchführung von PCR-Reaktionen im Durchfluss entwickelt. Im Folgenden wurden Untersuchungen durchgeführt, welche deren Funktionsweise und Eignung für die Amplifikation eines ausgewählten PCR-/RT-PCR-Systems nachweisen sollen.

Für die Versuchsreihen im Flussbetrieb wurden zwei verschiedene Chipsysteme, der Glas-Silizium-Chipthermocycler und der Glas-Glas-Chipthermocycler, verwendet. Diese unterschieden sich grundsätzlich in ihrem Aufbau und wurden in den Abschnitten 2.5.3 und 2.5.4 dieser Arbeit detailliert vorgestellt. Das Glas-Silizium-Chipsystem lag während der Bearbeitung dieser Dissertation bereits funktionsfähig vor und wurde zur Etablierung des PCR-Systems HPV 16 (Abschnitt 1.1.2, Seite 5) herangezogen. Der Glas-Glas-Chipaufbau wurde auf der Grundlage dieser Ergebnisse neu konstruiert und erweitert.

3.2.1 PCR-Kompatibilitätsuntersuchungen im Mikrokanal

Analog zu den Versuchen auf dem stationären Chipthermocycler mussten auch die PCR-Kompatibilität in Mikrokanälen untersucht werden. Die Oberflächen-Volumen-Verhältnisse in einem Mikrokanal mit kontinuierlichen Probendurchfluss unterscheiden sich zu denen auf planaren Chipoberflächen unterscheiden. Die Kontaktflächen zwischen der Probe und der Chipoberfläche sind in der Durchfluss-Betriebweise wesentlich größer und damit die Möglichkeit der Wechselwirkung mit den PCR-Reagenzien erhöht.

Um den Einfluss der Chipoberflächen der auf die Durchfluss-PCR zu testen, wurden die Chips im ersten Schritt jeweils mit PCR-Lösungen nach dem Protokoll 1 und dem Protokoll 2 (Tabelle 13, Seite 30) mit Additiven gefüllt, verschlossen und auf den *in-situ*-Adapter für 35 PCR-Zyklen gecycelt. Dafür kamen drei verschiedene Materialzusammensetzungen der Chips zum Einsatz. Neben einem Glas-Silizium und einem Glas-Glas-Hybrid wurden Chips aus Polycarbonat getestet.

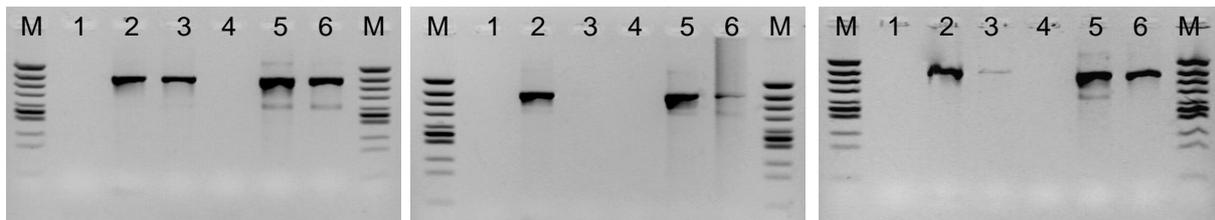


Abbildung 37 Inverse gelelektrophoretische Aufnahmen zum Vergleich der PCR-Effizienzen mit verschiedenen PCR-Protokollen in Durchfluss-Chips (FC) aus folgenden Materialien:

links – Glas-Silizium, mitte – Glas-Glas, rechts – Polycarbonat

M Marker

1 TC: neg. Kontrolle ohne Zusätze

2 TC: pos. Kontrolle ohne Zusätze

3 FC: ohne Zusätze

4 TC: neg. Kontrolle mit Zusätzen

5 TC: pos. Kontrolle mit Zusätzen

6 FC: mit Zusätzen

Prinzipiell konnte festgestellt werden, dass die Verwendung des PCR-Protokolls 2 mit Zusatz von Additiven eine Erhöhung der Produktausbeute schon im konventionellen Tischthermocycler (in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 25 µl) zur Folge hat. Für die PCR in den Glas-Silizium-Chip wurde mit der Zugabe von BSA und Q-Solution (Protokoll 2) eine leichte und für den Polycarbonat-Chip eine deutliche Verbesserung erzielt. Dafür wurden jeweils die Intensitäten der Produktbanden mit und ohne Zusätze miteinander verglichen (Abbildung 37). Als Besonderheit für die Polycarbonat-Chips zeigte sich eine geringfügige Veränderung der Materialbeschaffenheit nach dem Einsatz. So kam es an einigen Stellen zu Blasenbildungen zwischen dem Bulkmaterial (Mikrokanalseite) und der gebondeten Folie, sowie zu leichten Auswölbungen der Folienschicht.

Im Gegensatz zu der eben beschriebenen stationären Betriebsweise spielt der Einfluss des verwendeten Trägermediums in der Durchflussbetriebsweise eine besondere Rolle. Daher war zu prüfen, ob sich die erzielten PCR-Ergebnisse in Kombination mit dem Trägermedium Mineralöl ändern. Die Chips wurden dazu mit einer definierten Menge von 10 µl PCR-Lösung, hergestellt nach beiden Protokollvarianten mit und ohne Additiven (Tabelle 13, Seite 30), gefüllt. Diese 10 µl PCR-Lösung wurden

zwischen Mineralöl aufgenommen, welches den Rest der Mikrokanäle füllte. Auf dem *in-situ*-Adapter wurden die Chips über 35 PCR-Zyklen temperiert.

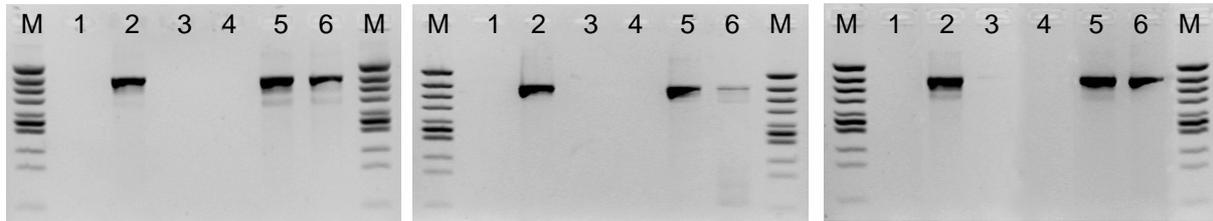


Abbildung 38 Inverse gelelektrophoretische Aufnahmen zum Vergleich der PCR-Effizienzen in Kombination von Mineralöl mit verschiedenen PCR-Protokollen in Durchflussschips (FC) aus folgenden Materialien: links – Glas-Silizium, mitte – Glas-Glas, rechts – Polycarbonat

M Marker

1 TC: neg. Kontrolle ohne Zusätze

2 TC: pos. Kontrolle ohne Zusätze

3 FC: ohne Zusätze

4 TC: neg. Kontrolle mit Zusätzen

5 TC: pos. Kontrolle mit Zusätzen

6 FC: mit Zusätzen

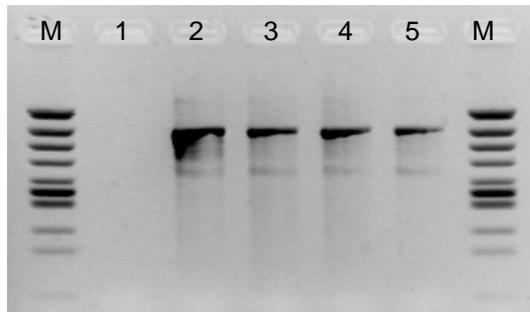
Unabhängig von dem verwendeten Chipmaterial zeigten alle drei getesteten Chipmodule das gleiche Ergebnis bei der PCR in Kombination mit Mineralöl (Abbildung 38). Bei den PCR-Ansätzen ohne Zugabe von Additiven (Protokoll 1) konnte kein PCR-Produkt nachgewiesen werden. Dagegen zeigte der Einsatz des PCR-Protokolls 2 die gewünschte Wirkung und es konnte bei den Glas-Silizium und Polycarbonat-Chipmodulen eine PCR-Produkt-Ausbeute vergleichbar zu der im Tischthermocycler erzielt werden. Bei den Glas-Glas-Chips wurde ein Produktbande geringerer Intensität detektiert.

Da in den folgenden Untersuchungen sowohl die Glas-Silizium als auch die Glas-Glas-Chipmodule zum Einsatz kommen, wurden die Mikrokanäle zur Verbesserung der PCR-Effizienz analog zu den stationären Chipthermocyclern mit verschiedenen Beschichtungen modifiziert.

3.2.2 Oberflächenmodifikation der Mikrokanäle

Zur Bestätigung des Einflusses der Oberflächenmodifikation, welche bereits bei dem stationären PCR-Chip etabliert wurde, erfolgte die Beschichtung der Mikrokanäle eines Glas-Silizium-Chipmoduls nach den Protokollen von Abschnitt 2.7.2 (Seite 27) mit Dimethyldichlorosilan, Perfluorodecylsilan und Teflon AF. Aufbauend auf den Ergebnissen aus den PCR-Kompatibilitätsuntersuchungen wurden die Chips jeweils mit einer definierten Menge von 10 µl PCR-Lösung gefüllt. Die PCR-Ansätze wurden nach dem PCR-Protokoll 2 (Tabelle 13, Seite 30) mit Additiven hergestellt. Diese 10 µl PCR-Lösung wurden wieder zwischen Mineralöl aufgenommen, welches den

Rest der Mikrokanäle füllte. Auf dem *in-situ*-Adapter wurden die Chips über 35 PCR-Zyklen temperiert.



- M Marker
 1 TC: neg. Kontrolle, ohne DNA
 2 TC: pos. Kontrolle
 3 FC: Dimethyldichlorosilan
 4 FC: Perfluorodecylsilan
 5 FC: Teflon AF
 M Marker

Abbildung 39 Inverse gelelektrophoretische Aufnahmen zum Vergleich der PCR-Effizienzen in Durchflussschips (FC) mit verschiedenen Oberflächenmodifikationen

Aus der Abbildung 39 wird deutlich, dass alle getesteten Oberflächenmodifikationen vergleichbar gute PCR-Ausbeuten erreichen konnten und somit für den Einsatz zur Beschichtung von Mikrokanälen für die PCR-Reaktion geeignet sind.

3.2.3 PCR in einem 25-Zyklen-Glas-Silizium-Durchflussschip

Für die Etablierung des HPV 16 PCR-Systems wurde ein 25-Zyklen-Glas-Silizium-Chipthermocycler mit Dimethyldichlorosilan beschichtet und anschließend im kontinuierlichen Fluss betrieben.

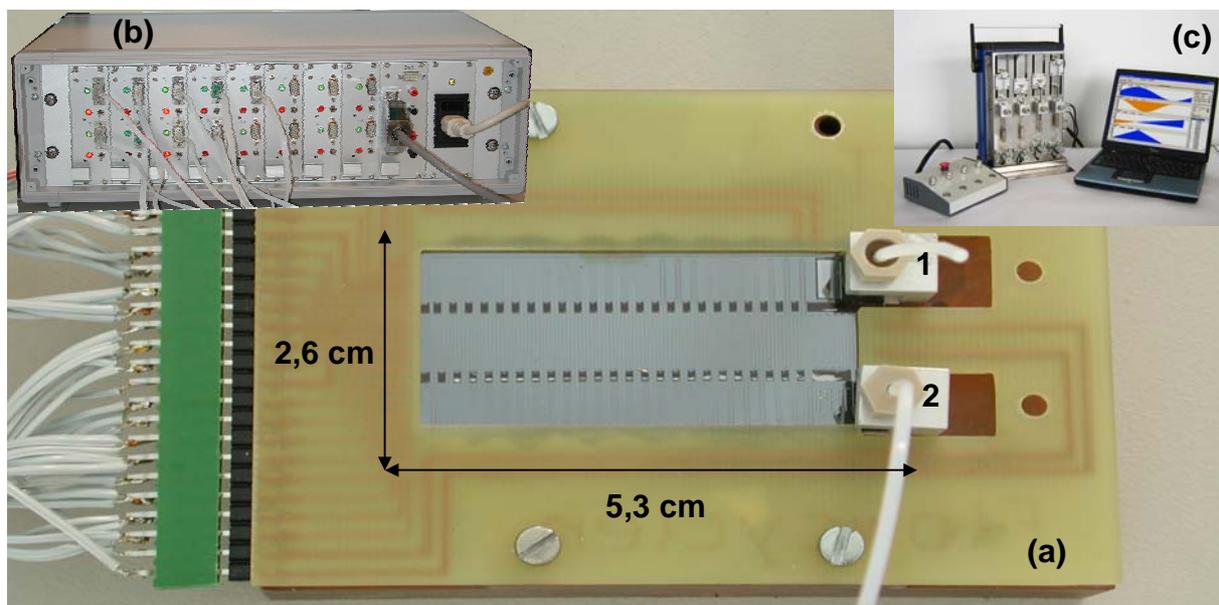


Abbildung 40 (a) Chipaufbau mit fluidischen Anschlüssen: 1 - Einlass, 2 - Auslass
 (b) Regler zum Betrieb der Heizer- und Sensorstrukturen
 (c) Fluidisches Management über 4-Kanal-Spritzenpumpensystem von Cetoni

Der genaue Chipaufbau bestand neben dem Glas-Silizium-Chipmodul mit 25 PCR-Zyklen aus einem Regler zum Betreiben und der Kontrolle der Heizer- und Sensorstrukturen, sowie einem Spritzenpumpensystem zur Steuerung des Fluidikstroms (Abbildung 40).

Als Trägermedium wurde Mineralöl verwendet. Das Volumen an PCR-Ansatz betrug in jedem Versuchsteil 25 μl und der PCR-Ansatz wurde nach dem Protokoll 8 (Tabelle 18, Seite 32) hergestellt. Die PCR-Lösung wurde mit einer Flussrate von 0,25 $\mu\text{l}/\text{min}$ durch den Chip gepumpt. Bei der Aufnahme der Probe war auf eine möglichst luftblasenfreie Befüllung der Spritzen zu achten. Vor der Probe wurden 25 μl und nach der Probe 100 μl Mineralöl aufgenommen, wodurch die Probe beidseitig von Mineralöl flankiert war und so gleichmäßig durch den Chip gepumpt wurde.

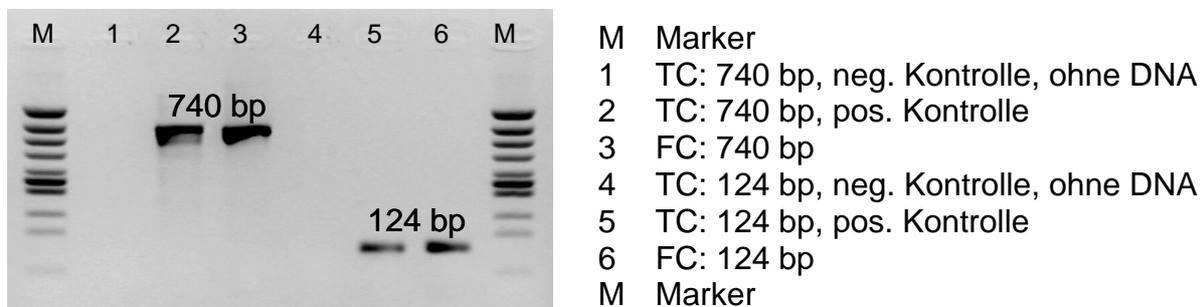


Abbildung 41 Inverse gelelektrophoretische Aufnahmen zum Vergleich von PCR-Läufen im Tischthermocycler (TC) und Flusscycler (FC) mit zwei verschiedenen HPV-Produkten (124 bp, 740 bp)

Unter den beschriebenen Bedingungen war es möglich, mittels Durchfluss-PCR beide HPV-Fragmente erfolgreich und in der PCR-Effizienz vergleichbar zum Tischthermocycler zu amplifizieren (Abbildung 41).

3.2.3.1 Bestimmung der optimalen Flussraten bei 25 PCR-Zyklen

Um die Reaktionsbedingungen der PCR im Durchfluss zu verbessern, war es notwendig das Fluidische Management zu optimieren. Die Einstellung der optimalen Flussrate ist dabei von besonderer Bedeutung, da dies die Verweilzeiten in den einzelnen Temperaturzonen bestimmt.

Die Ermittlung der optimalen Flussbedingungen wurde in Abhängigkeit von der Fragmentlänge des zu amplifizierenden PCR-Produktes durchgeführt. Im folgenden Versuchsteil wurden die Flussraten von 0,25 $\mu\text{l}/\text{min}$ bis 1,75 $\mu\text{l}/\text{min}$ variiert und die Auswirkung auf die Produktausbeute beobachtet. Die Ausgangskonzentration der Plasmid-DNA betrug 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

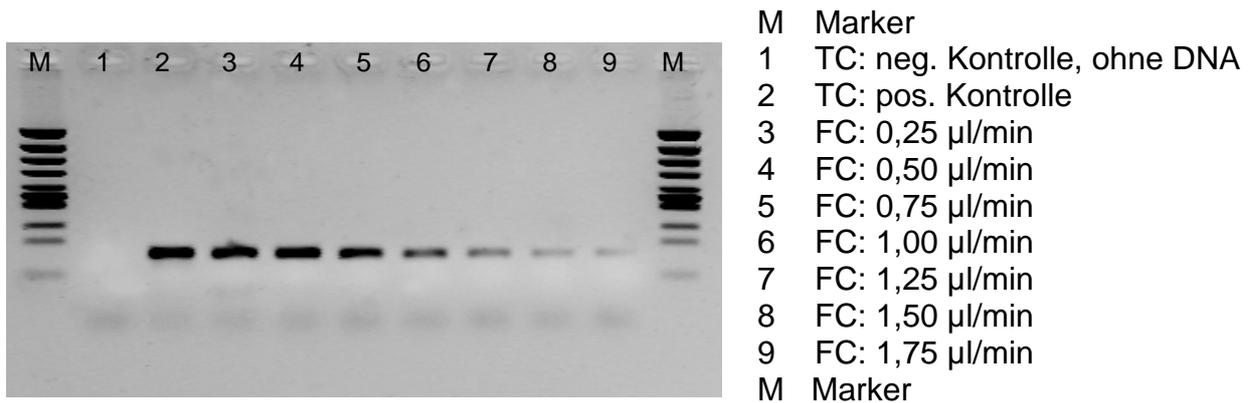


Abbildung 42 Inverse gelelektrophoretische Aufnahmen zum Vergleich der PCR-Effizienzen in Abhängigkeit von der eingestellten Flussrate, Produktgröße = 124 bp

Für das kleine HPV-Fragment (124bp, Abbildung 42) erfolgte ein Produktnachweis bis zu der maximal getesteten Flussrate von 1,75 µl/min. Ab einer Flussrate von 1,00 µl/min lies die Effizienz der PCR allerdings deutlich nach, welches an der Bandenstärke bzw. den ermittelten Intensitäten der Produktbanden zu erkennen war. Wurde bei einer Flussrate von 0,5 µl/min noch eine Intensität von 7,1 festgestellt (vergleichbar zum TC mit $I = 7,8$), betrug diese bei der doppelten Flussrate von 1,0 µl/min nur noch $I = 4,1$ und nimmt bis zu einer Flussrate von 1,75 µl/min auf $I = 0,5$ ab. Errechnet man aus der optimalen Flussrate von 0,75 µl/min die Analysezeit für 25 µl, so benötigte der Flusscyclus ca. 1:15 h, was genau dem Zeitregime im Tischthermocycler entsprach.

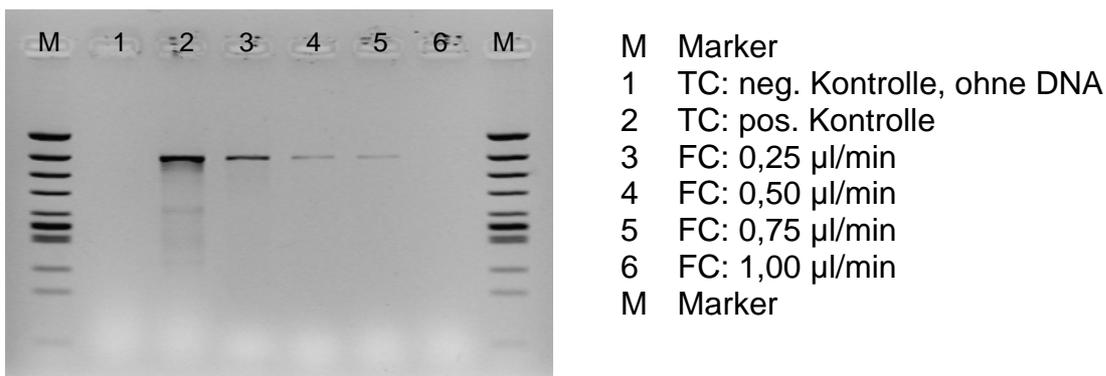


Abbildung 43 Inverse gelelektrophoretische Aufnahme zum Vergleich der PCR-Effizienzen in Abhängigkeit von der eingestellten Flussrate, Produktgröße = 740 bp

Der Flussratenbereich für das große HPV-Fragment war wesentlich schmaler (Abbildung 43). Lediglich bei einer Flussrate von 0,25 µl/min konnte eine vergleichbare PCR-Produktbande zum Tischthermocycler erzielt werden ($I_{TC} : I_{FC} = 4,9 : 3,6$).

Schon bei einer Flussrate von 0,5 µl/min sank die Produktausbeute sichtbar ($I = 1,9$). Bei einer Flussrate von 1,00 µl/min konnte bereits kein PCR-Produkt mehr nachgewiesen werden. Bei der Rückrechnung der optimalen Flussrate von 0,25 µl/min ergab sich damit für die Analyse von 25 µl PCR-Probe eine Gesamtreaktionszeit von 3:48 h.

3.2.3.2 Bestimmung der Nachweisgrenzen bei 25 PCR-Zyklen

Zur weiteren Charakterisierung der Durchfluss-Chipthermocycler wurden im nächsten Versuchsteil die Nachweisgrenzen für beide HPV-Fragmente ermittelt und mit denen des konventionellen Tischthermocyclers verglichen.

Für die Bestimmung der Nachweisgrenzen wurden die Experimente mit beiden HPV-Fragmenten bei 25 PCR-Zyklen zunächst im Tischthermocycler durchgeführt. Die Ausgangskonzentration an Plasmid-DNA wurde dabei beginnend bei 1000 pg/µl in fünf 10er-Potenz-Schritten auf 1 pg/µl reduziert. Die PCR-Ansätze wurden nach dem Protokoll 8 (Tabelle 18, Seite 32) hergestellt. Das PCR-Volumen betrug in allen Versuchsteilen 25 µl (beinhaltet 0,5 µl Plasmid-DNA). Rechnet man aus den vorgegebenen Konzentrationsangaben die Molekülzahl, so wurde in der höchsten Verdünnung 1.700 Moleküle/µl PCR-Ansatz als Startkonzentration eingesetzt.

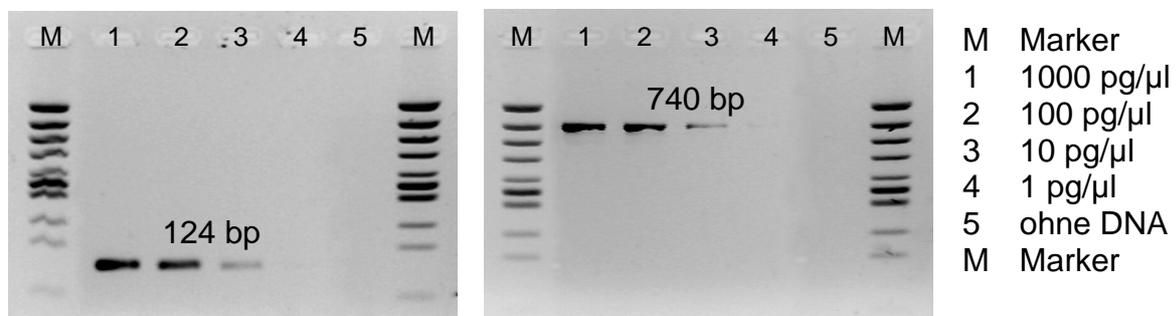


Abbildung 44 Inverse gelelektrophoretische Aufnahmen zum Vergleich der PCR-Effizienzen in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration an Plasmid-DNA bei 25 PCR-Zyklen:
links - kurzes HPV-Fragment = 124 Basenpaare
rechts - langes HPV-Fragment = 740 Basenpaare

Die Auswertung der Elektrophoreseaufnahmen (Abbildung 44) zeigten bei 25 PCR-Zyklen für beide Fragmentlängen eine Nachweisgrenze von 10 pg/µl, dies entsprach 17.000 Molekülen/µl Reaktionsansatz.

Im Anschluss wurden die Versuche in dem Glas-Silizium-Chipmodul wiederholt.

Um die Nachweisgrenzenbestimmung für die beiden Fragmentlängen vergleichbar zu machen, wurden die Experimente mit einer Flussrate von 0,25 µl/min durchgeführt.

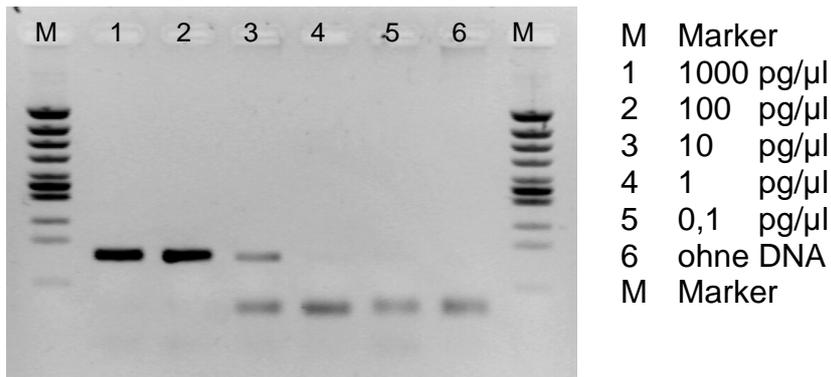


Abbildung 45 Inverse gelelektrophoretische Aufnahmen zur Bestimmung der untersten DNA-Nachweisgrenze, Produktgröße = 124 bp

Für das kleine HPV-Fragment (124 bp, Abbildung 45) wurde eine minimale Produktbande bei einer DNA-Konzentration von 1.700 Molekülen/μl (1 pg/μl) detektiert, wobei ein sicherer Produktnachweis nur bis zu einer Ausgangs-DNA-Menge von 17.000 Molekülen/μl (10 pg/μl) möglich wurde und somit die Ergebnisse aus dem Tischthermocycler bestätigt wurden.

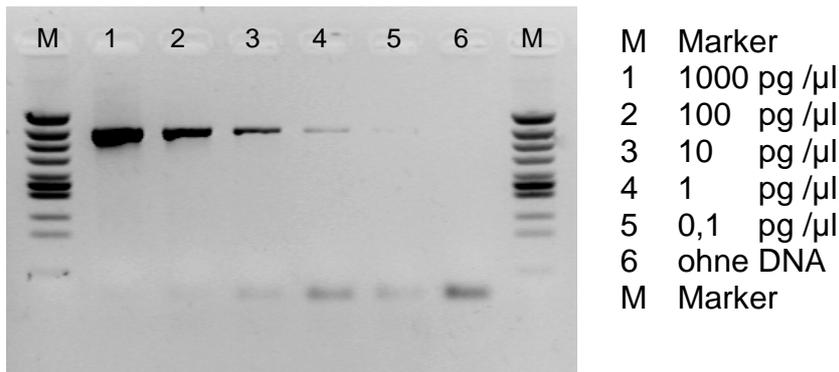


Abbildung 46 Inverse gelelektrophoretische Aufnahmen zur Bestimmung der untersten DNA-Nachweisgrenze, Produktgröße = 740 bp

Für das große HPV-Fragment (740 bp, Abbildung 46) konnte unter den gleichen PCR-Bedingungen eine niedrigere Nachweisgrenze erreicht werden. Sie betrug bei minimaler Produktintensität 170 Moleküle/μl (0,1 pg/μl) und bei der ersten deutlich sichtbaren PCR-Produktbande 1.700 Moleküle/μl (1 pg/μl).

Unabhängig von der eingesetzten Fragmentlänge wurden bei allen Versuchen Negativkontrollen ohne Zusatz von Plasmid-DNA mitgeführt, welche bei den dargestellten Gelaufnahmen (Abbildung 45, Abbildung 46) jeweils in der Bahn 6 zu sehen sind und keine Produktbanden zeigen.

Die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen im Glas-Silizium-Chipthermocycler zeigten, dass die Durchfluss-PCR für die Amplifikation von Abschnitten des HPV 16-

Genoms geeignet ist. Für den Nachweis geringerer Kopienzahlen wird allerdings eine Weiterentwicklung des Chipsystems mit der Erhöhung der PCR-Zyklenzahl notwendig sein.

3.2.3.3 Durchfluss-PCR mit vorgeschalteter Reverser Transkription (RT)

Neben der DNA-Analytik spielt in der Tumordiagnostik die Untersuchung von RNA-Proben für die Genexpressionsanalyse eine große Rolle. Daher wurde versucht, die Durchfluss-PCR mit einem vorgeschalteten Reverse Transkriptase Schritt (RT) zu kombinieren. Es wurde ein 2-Schritt-Protokoll verwendet, bei dem im ersten Schritt die vorliegende RNA in cDNA umgeschrieben wird, welche anschließend mittels der PCR vervielfältigt wird. Die PCR sollte dabei in dem 25 Zyklen Glas-Silizium-Durchflusscycler durchgeführt werden.

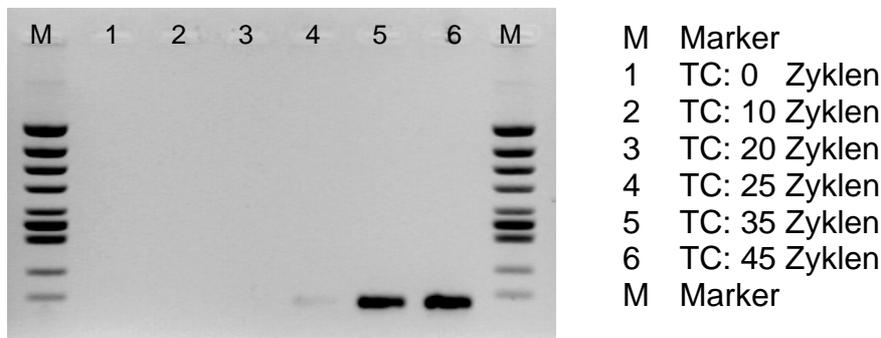


Abbildung 47 Inverse gelelektrophoretische Aufnahme zum Vergleich der RT-PCR-Effizienzen in Abhängigkeit von der PCR-Zyklenzahl

Die eingesetzte Menge an Start-RNA für den RT-Schritt betrug 0,3 µg/µl. Aus diesem Ansatz wurde 1 µl cDNA für 25 µl PCR-Ansatz verwendet. In dem ersten Versuchsteil wurde die RT-PCR im Tischthermocycler durchgeführt, um das Protokoll zu überprüfen und die notwendige Zyklenzahl herauszufinden. Nach 20 PCR-Zyklen war keine und nach 25 PCR-Zyklen wurde im Gel nur eine sehr leichte Produktbande sichtbar (Abbildung 47), weshalb die Zyklenzahl auf 35 und 45 PCR-Zyklen erhöht wurde. Nach diesen 35 und 45 PCR-Zyklen war eine deutliche Produktbande sichtbar, welche auch im Durchflusscycler zu erwarten war.

Da der Durchflusscycler nur über 25 PCR-Zyklen verfügte, wurde es notwendig, für den Nachweis von 35 und 45 PCR-Zyklen die Probe im Tischthermocycler für 10 bzw. 20 Zyklen vor zu amplifizieren. In Abbildung 48 konnte nach 25 Zyklen sowohl im Tischthermocycler als auch im Flusscycler eine sehr schwache Produktbande detektiert werden. Nach 35 und 45 PCR-Zyklen wurden mit beiden Technologie-

Plattformen vergleichbar starke Produktbanden sichtbar, welche auf eine sehr gute PCR-Effizienz schließen ließen.

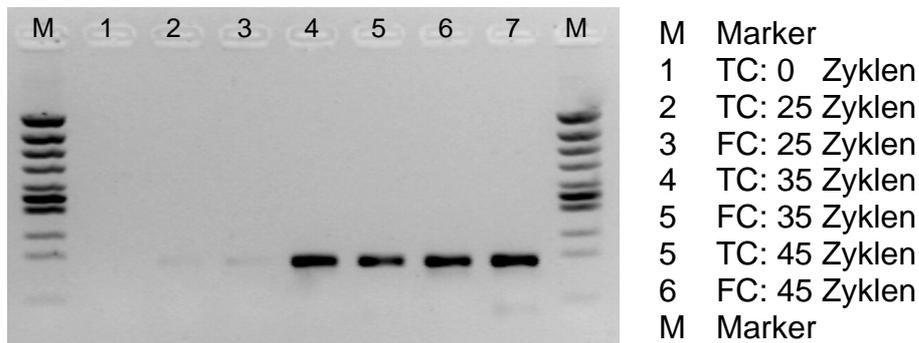


Abbildung 48 Inverse gelelektrophoretische Aufnahmen zum Vergleich der RT-PCR-Effizienzen zwischen Tischthermocycler (TC) und Durchflussscyler (FC)

Durch das voramplifizieren der Proben im Tischthermocyclern konnte eine erfolgreiche Amplifikation im Durchflussscyler mit nur 25 vorhandenen PCR-Zyklen nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde erneut deutlich, dass ein weiterentwickeltes Chipmodul über mindestens 35 PCR-Zyklen verfügen muss.

3.2.4 PCR/RT-PCR in einem 35-Zyklen-Glas-Glas-Durchflusship

Aufgrund der im vorhergehenden Abschnitt gewonnenen Erkenntnisse wurden für die Konstruktion eines neuen Chipaufbaus folgende Parameter festgelegt: 35 PCR-Zyklen, Integration einer Zone für Reverse Transkriptase und Integration einer HotStart (HS)-Zone um das Arbeiten mit 1-Schritt-RT-PCR-Kits zu ermöglichen.

Der Chipaufbau bestand aus einem zweiteiligen Chipmodul (Heizplatte und Fluidikchip), einem Regler zum Betreiben und zur Kontrolle der Heizplatte sowie einem Spritzenpumpensystem zur Steuerung des Fluidikstroms (Abbildung 49). Von dem Spritzenpumpensystem wurde in Abhängigkeit von der Flussart 1 (kontinuierlicher Fluss) oder 2 Kanäle (segmentierter Fluss) verwendet.

Im Unterschied zu dem Glas-Silizium-Chipmodul beinhaltet der entwickelte Fluidikchip Injektionsdüsen zur Erzeugung eines segmentierten Probenstromes (Abbildung 49, d). Alle folgenden Ergebnisse wurden daher auch nicht wie bisher nur im kontinuierlichen Probenstrom, sondern zum Teil auch im segmentierten Probenstrom durchgeführt. Die PCR-Ansätze wurden nach dem Protokoll 9 (Tabelle 19, Seite 33) hergestellt.

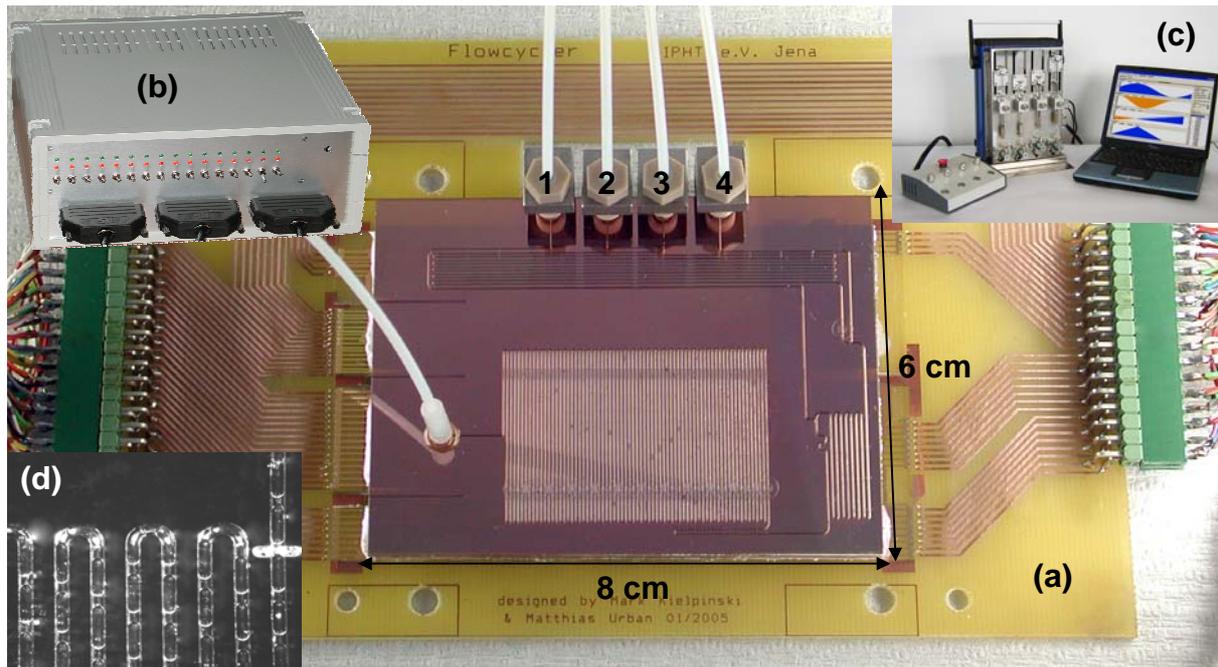
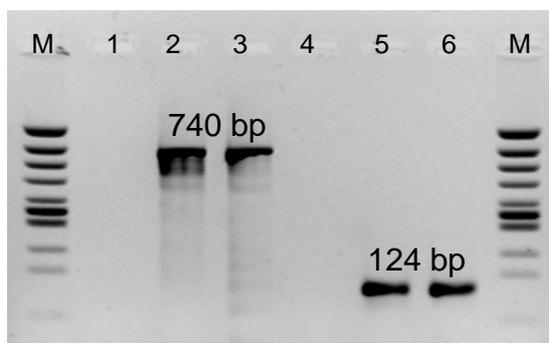


Abbildung 49 (a) Chipaufbau mit fluidischen Anschlüssen und Injektionsstellen für: 1- PCR, 2- RT-PCR, 3- Trägermedium, 4- HS-PCR
 (b) Mikrocontroller gesteuerter Regler zum Betrieb der Heizplatte
 (c) 4-Kanal-Spritzenpumpensystem von Cetoni
 (d) segmentierter Probenstrom in einem Ausschnitt der HotStart-Zone des Fluidikmoduls

Bei der Etablierung des neuen Fluidikmoduls wurde als erstes die PCR-Effizienz im Vergleich zum Tischthermocycler getestet. Dazu wurden PCR-Versuche mit beiden HPV- Fragmentlängen bei einer konstanten Flussrate von 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchgeführt und mit dem PCR-Lauf im Tischthermocycler verglichen.



M Marker
 1 TC: 740 bp, neg. Kontrolle
 2 TC: 740 bp, pos. Kontrolle
 3 FC: 740 bp, 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$
 4 TC: 124 bp, neg. Kontrolle
 5 TC: 124 bp, pos. Kontrolle
 6 FC: 124 bp, 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$
 M Marker

Abbildung 50 Inverse gelelektrophoretische Aufnahme zum Vergleich der PCR-Effizienz von Tischthermocycler und Durchfluss-Chip mit verschiedenen HPV-Fragmentlängen (124 bp, 740 bp)

Die Auswertung dieses Versuches (Abbildung 50) ergab für die kontinuierliche Durchfluss-PCR mit 10 μl PCR-Volumen vergleichbar gute Produktbanden zur PCR im Tischthermocycler mit demselben Probenvolumen unabhängig von der PCR-

Produktgröße. Der Nachweis der Funktionsfähigkeit des entwickelten Chipmoduls war somit erbracht.

3.2.4.1 Bestimmung der optimalen Flussraten bei 35 PCR-Zyklen

Die Ermittlung der optimalen Flussbedingungen für das Glas-Glas-Chipmodul mit 35 PCR-Zyklen erfolgte analog zu den Versuchen mit dem 25-Zyklen-Chip (3.2.3.1, Seite 65) und wurde in Abhängigkeit von der Fragmentlänge des zu amplifizierenden PCR-Produktes im kontinuierlichen Fluss durchgeführt.

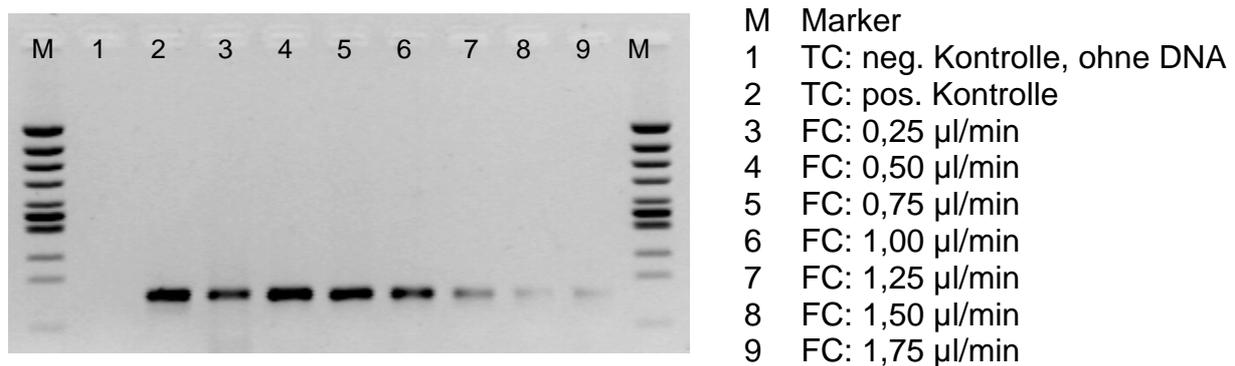


Abbildung 51 Inverse gelelektrophoretische Aufnahmen zum Vergleich der PCR-Effizienzen in Abhängigkeit von der eingestellten Flussrate: Produktlänge = 124 bp

Für das kleine HPV-Fragment (124bp, Abbildung 51) erfolgte wie bei 25 PCR-Zyklen ein Produktnachweis bis zu der maximal getesteten Flussrate von 1,75 µl/min. Allerdings wurde bei dieser Flussrate nur noch ein sehr schwaches PCR-Produkt nachgewiesen ($I = 0,5$). Sehr gute PCR-Ergebnisse wurden mit Flussraten von 0,5 und 1,0 µl/min erzielt. In diesem Bereich waren die Bandenintensitäten vergleichbar stark zum Tischthermocycler ($I_{TC}=7,2$; $I_{FC} = 7,5 - 5,6$). Wurde die Flussrate zu niedrig eingestellt, wie bei 0,25 µl/min nahm die PCR-Effizienz bereits wieder leicht ab. Bezogen auf die zeitliche Effizienz der Gesamtreaktion mit einem Probenvolumen von 10 µl betrug die Amplifikationszeit im Tischthermocycler ca. 2 h, während diese im Flusscycler bei guter Produktausbeute in Abhängigkeit von der Flussrate zwischen 10 h (0,25 µl/min) und 2:30 h (1,0 µl/min) lag.

Für das große HPV-Fragment konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden (Abbildung 52). Im Unterschied zu dem kurzen PCR-Produkt konnte nur bei einer Flussrate von 0,5 und 0,75 µl/min eine deutliche Produktausbeute ($I_{TC}=10,7$; $I_{FC} = 8,8$ und 8,5) erzielt werden. Wurden Flussraten unter- und oberhalb dieser Werte eingestellt, war kein bzw. nur ein sehr schwaches PCR-Signal (0,25 µl/min, $I = 1,0$) im Gel

zu detektieren. Damit ergab sich im Flusscyclus eine Amplifikationsdauer von 5 h (0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$) bzw. 3:20 h (0,75 $\mu\text{l}/\text{min}$).

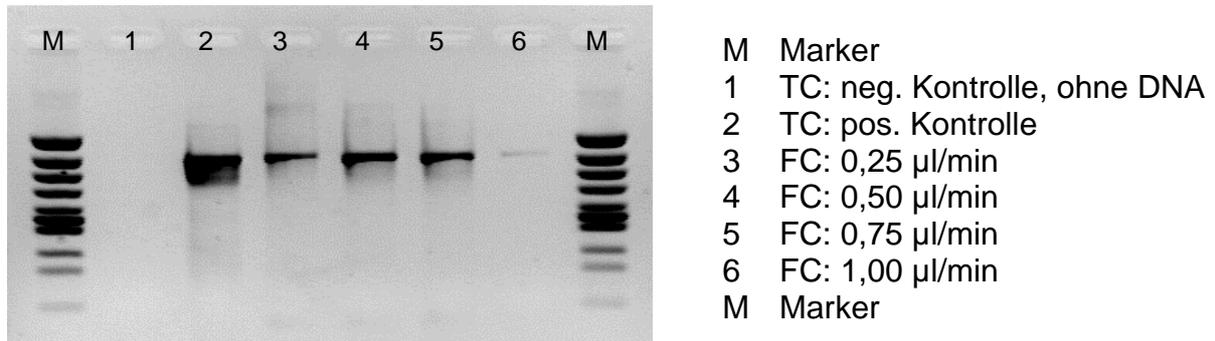


Abbildung 52 Inverse gelelektrophoretische Aufnahmen zum Vergleich der PCR-Effizienzen in Abhängigkeit von der eingestellten Flussrate: Produktlänge = 740 bp

Um nachzuweisen, dass die Ergebnisse auf die Betriebsart im segmentierten Fluss übertragbar sind, wurden die Versuche bei den jeweils optimalen Flussraten in Abhängigkeit von der Produktlänge mit dem gleichen Gesamtvolumen von 10 μl wiederholt. Die Größe der erzeugten Segmente betrug dabei ca. 100 nl und das Verhältnis des Probenstroms zum Fluidikstrom des Trägermediums (Mineralöl) wurde mit 1:5 eingestellt.

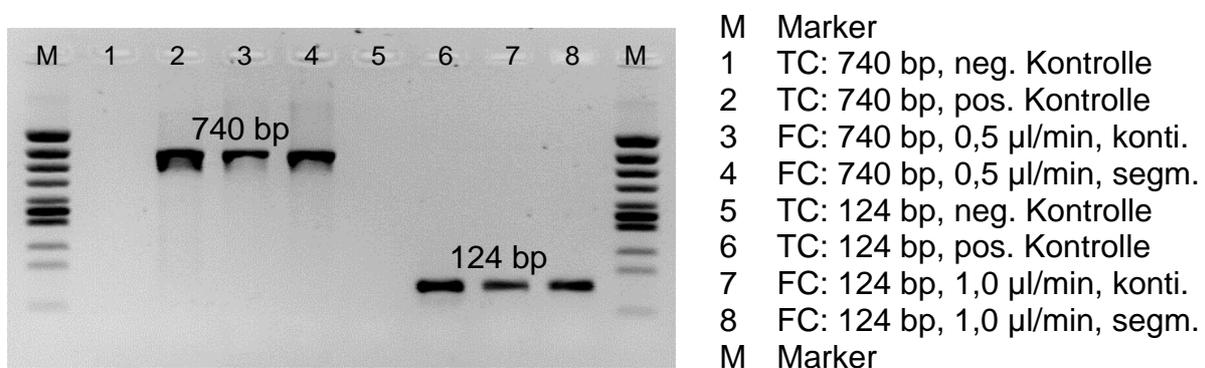


Abbildung 53 Inverse gelelektrophoretische Aufnahme zum Vergleich der PCR-Effizienz von Tischthermocycler und Durchfluss-Chip mit verschiedenen HPV-Fragmentlängen und verschiedenen Flussarten

In Abbildung 53 wird deutlich, dass für beide HPV-Fragmentlängen die Produktausbeuten zwischen der PCR im Tischthermocycler und im Flusscyclus bei segmentiertem Probenstrom vergleichbar gut waren. Dagegen ergab die PCR im kontinuierlichen Probenstrom leicht schwächere Produktbanden, bei gleichen Analysebedingungen (740 bp: $I_{\text{seg}}=3,4 : I_{\text{kon}}=2,6$; 124 bp: $I_{\text{seg}}=1,9 : I_{\text{kon}}=1,5$). Unabhängig vom Flussregime wurde die Auswahl der optimalen Flussraten bestätigt, da bei allen durchgeführten Versuchen die gewünschten spezifischen PCR-Produkte amplifiziert wurden.

3.2.4.2 Bestimmung der Nachweisgrenzen bei 35 PCR-Zyklen

Durch die Erhöhung der Amplifikationsdauer auf 35 Zyklen, wurde eine erneute Ermittlung der untersten Nachweisgrenze notwendig.

Die Ausgangskonzentration an Plasmid-DNA wurde dabei beginnend bei 100 pg/μl in vier 10er-Potenz-Schritten auf 0,01 pg/μl reduziert. Die PCR-Ansätze wurden nach dem Protokoll 9 (Tabelle 19, Seite 33) hergestellt. Das PCR-Volumen betrug in allen Versuchsteilen 10 μl (beinhaltet 0,2 μl Plasmid-DNA). Rechnet man aus den vorgegebenen Konzentrationsangaben die Molekülzahl, so wurde in der höchsten Verdünnung 17 Moleküle/μl PCR-Ansatz als Startkonzentration eingesetzt. Diese Versuche wurden sowohl im Tischthermocycler als auch im Glas-Glas-Chipthermocycler durchgeführt.

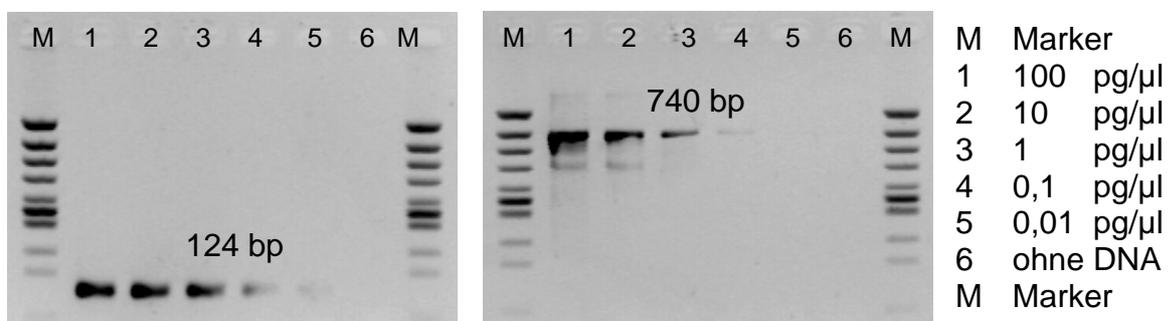


Abbildung 54 Inverse gelelektrophoretische Aufnahmen zum Vergleich der PCR-Effizienzen in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration an Plasmid-DNA bei 35 PCR-Zyklen:

links - kurzes HPV-Fragment = 124 Basenpaare

rechts - langes HPV-Fragment = 740 Basenpaare

Die Ergebnisse im Tischthermocycler mit 35 PCR-Zyklen zeigten, dass der Nachweis von 0,1 pg/μl Plasmid-DNA (170 Moleküle/μl PCR-Ansatz) für beide Fragmentlängen möglich war (Abbildung 54).

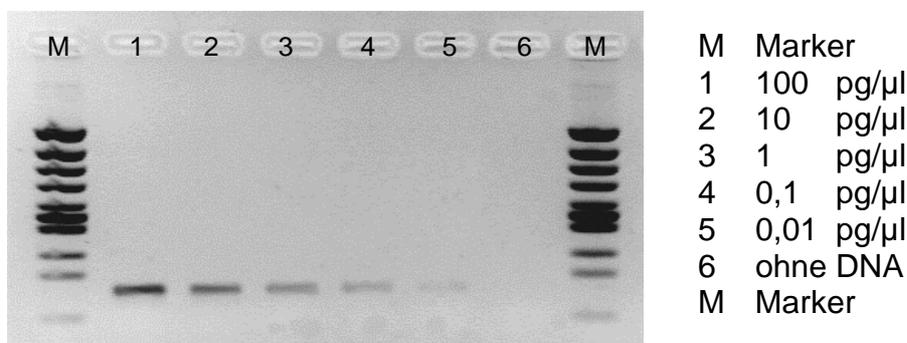


Abbildung 55 Inverse gelelektrophoretische Aufnahme zur Bestimmung der untersten DNA-Nachweisgrenze, Produktgröße = 124 bp

Für den Glas-Glas-Chipaufbau erfolgte die Bestimmung der untersten Nachweisgrenze in Abhängigkeit von Produktgröße bei der jeweiligen im vorherigen Abschnitt (3.2.4.1, Seite 72) ermittelten optimalen Flussrate im kontinuierlichen Fluss. Diese wurde für das kurze HPV-Fragment (124 bp) bei 1,0 $\mu\text{l}/\text{min}$ und für das lange HPV-Fragment (740 bp) bei 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ festgelegt.

Die Abbildung 55 zeigt für die kleine Fragmentlänge einen minimalen Produktnachweis bis zu einer Konzentration von 17 Molekülen/ μl (0,01 $\text{pg}/\mu\text{l}$), wobei ein sicherer Produktnachweis lediglich bis zu einer Ausgangs-DNA-Konzentration von 170 Molekülen/ μl (0,1 $\text{pg}/\mu\text{l}$) gewährleistet werden konnte.

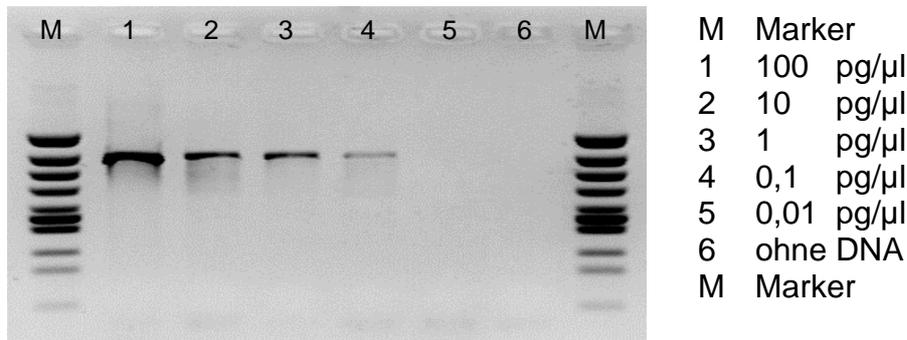


Abbildung 56 Inverse gelelektrophoretische Aufnahme zur Bestimmung der untersten DNA-Nachweisgrenze, Produktgröße = 740 bp

Für das längere HPV-Fragment erfolgte ein sicherer Produktnachweis (Abbildung 56) ebenfalls bis zu einer unteren Nachweisgrenze von 170 Molekülen/ μl (0,1 $\text{pg}/\mu\text{l}$), darunter konnte kein PCR-Produkt mehr nachgewiesen werden. Die ermittelten Nachweisgrenzen entsprachen für beide Fragmentlängen den Werten, welche anhand der Vorversuche im Tischthermocycler zu erwarten waren.

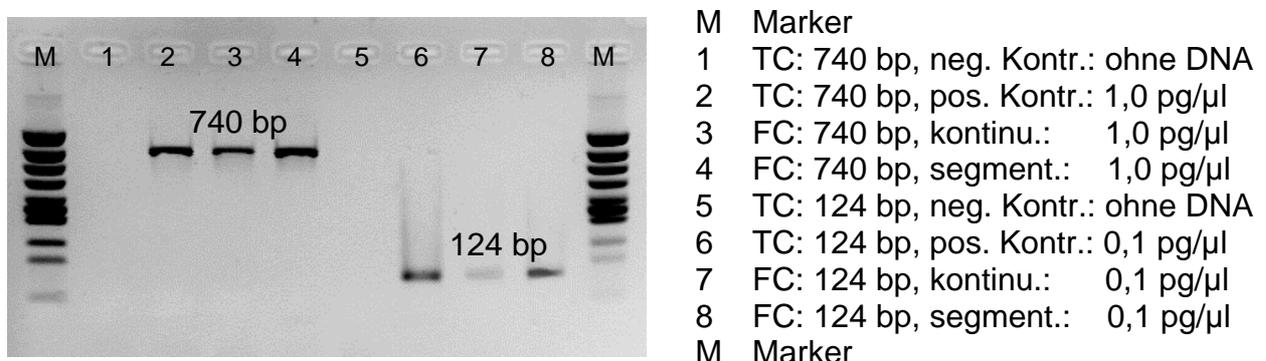


Abbildung 57 Inverse gelelektrophoretische Aufnahme zur Bestimmung der PCR-Effizienz bei der optimalen DNA-Konzentration in Abhängigkeit von der Produktgröße und des Fluss-Regimes

Um sicherzustellen, dass die Ergebnisse im Durchflusship auch im segmentierten Fluss erzielt werden können, wurden die Versuche bei festgelegten Ausgangs-DNA-Konzentrationen mit beiden Fluss-Regimen wiederholt und für beide Fragmentlängen gegenübergestellt. Die DNA-Konzentration betrug dabei für das lange Fragment 1700 Moleküle/ μl und für das kurze Fragment 170 Moleküle/ μl .

In Abbildung 57 wird deutlich, dass für die Produktausbeuten bei der jeweils unteren Nachweisgrenze beider Fragmentlängen im Glas-Glas-Durchflusship mit segmentierten Flussregime vergleichbare Ergebnisse zum Tischthermocycler erzielt wurden. Dagegen waren die Intensitäten im kontinuierlichen Fluss deutlich geringer (740 bp: $I_{\text{seg}}=1,6 : I_{\text{kon}}=1,1$; 124 bp: $I_{\text{seg}}=0,7 : I_{\text{kon}}=0,2$).

3.2.4.3 RT-PCR im Durchflusscycler

Das Glas-Glas-Chipmodul wurde unter anderem für die Durchführung von RT-PCR-Reaktionen entwickelt und musste daher auf diese Eignung untersucht werden. Für die Übertragung von RT-PCR-Protokollen zum Nachweis von RNA mittels Durchfluss-PCR wurden sowohl Experimente im 2-Schritt als auch im 1-Schritt-Protokoll durchgeführt. Die Ergebnisse werden im Folgenden beschrieben.

2-Schritt-RT-PCR

Vergleichbar zu den Versuchen im 25-Zyklen-Glas-Silizium-Cycler (Abschnitt 3.2.3.3, Seite 69) wurde bei dem verwendeten 2-Schritt-RT-PCR-Protokoll der Schritt der Reversen Transkription im Tischthermocycler durchgeführt und die gewonnene cDNA für die anschließende PCR-Reaktion im Durchflusscycler eingesetzt. Für die PCR wurde das Protokoll 9 (Tabelle 19, Seite 33) verwendet. Die Versuche wurden sowohl im kontinuierlichen als auch im segmentierten Probenstrom mit einem Probenvolumen von 10 μl und einer Flussrate von 0,75 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchgeführt.

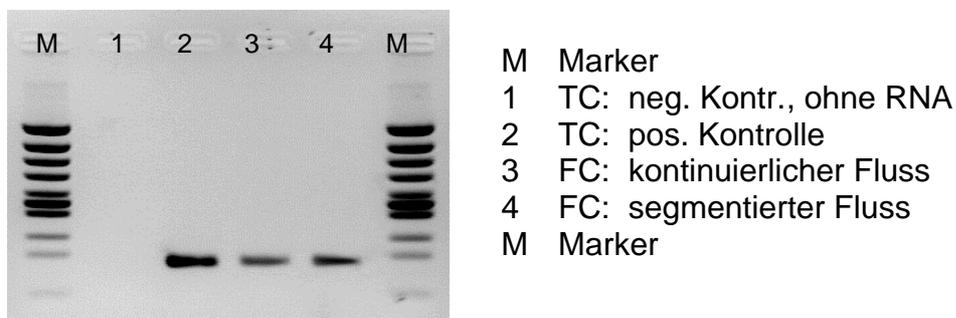


Abbildung 58 Inverse gelelektrophoretische Aufnahme zum Vergleich der RT-PCR-Effizienzen von Tischthermocycler und Durchfluss-Chip bei unterschiedlichen Flussregimen

Es konnte mit beiden Flussregimen das spezifische PCR-Produkt amplifiziert werden (Abbildung 58). Die ermittelten Intensitäten der Produktbanden der Durchflussversuche lagen dabei unter denen des Tischthermocyclers, wobei im kontinuierlichen Probenstrom die geringste PCR-Produktausbeute erzielt wurde.

1-Schritt-RT-PCR

Die 1-Schritt-RT-PCR wurde zunächst im kontinuierlichen Probenstrom durchgeführt, um die optimalen Reaktionsbedingungen zu finden. Es wurden verschiedenen Zusammensetzungen der Reaktionsansätze getestet (Tabelle 22, Seite 34).

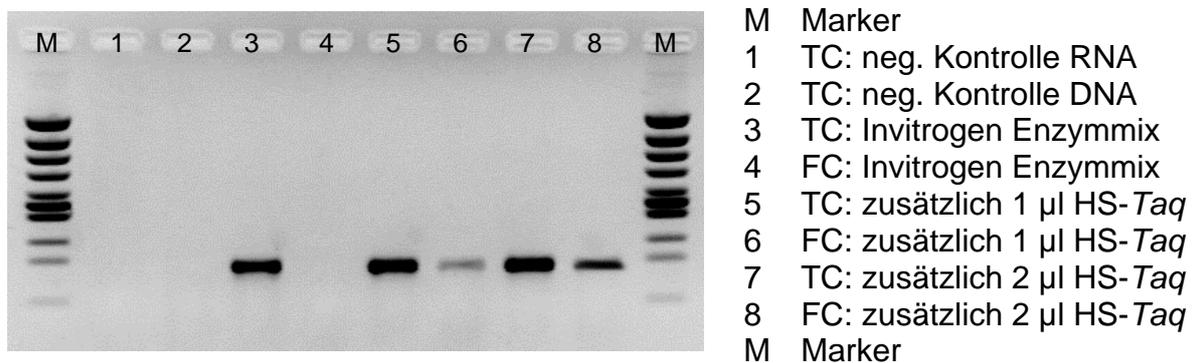


Abbildung 59 Inverse gelelektrophoretische Aufnahme zum Vergleich der RT-PCR-Effizienzen von Tischthermocycler und Durchfluss-Chip mit verschiedenen Enzymzusätzen

Aus Abbildung 59 wurde deutlich, dass mit der 1-Schritt-RT-PCR unter standardisierten Reaktionsbedingungen (Protokoll 12, Tabelle 19, Seite 33) im Durchflusscyler kein PCR-Produkt nachgewiesen werden konnte. Unter zusätzliche Zugabe von HotStart-DNA-Polymerase gelang die spezifische Amplifikation des gewünschten RNA-Abschnittes sowohl im Tischthermocycler als auch im Flusscyler. Die Intensität der Produktbanden nahm im Vergleich zur Standardzusammensetzung der Reaktionsansätze auch im Tischthermocycler zu. Allerdings wurden keine Unterschiede zwischen der Zugabe von 1 und 2 μ l HotStart-DNA-Polymerase festgestellt. Die Auswertung der RT-PCR-Ergebnisse im Durchflussbetrieb ergab die besten Produktausbeuten bei der Zugabe von 2 μ l HotStart-DNA-Polymerase (Protokoll 14, Tabelle 19, Seite 33). Im Unterschied zum Standardprotokoll konnte bei der Zugabe von 1 μ l HotStart-DNA-Polymerase (Protokoll 13, Tabelle 19, Seite 33) auch ein RT-PCR-Produkt nachgewiesen werden. Die Intensität der Produktbande war hierbei deutlich geringer, als bei der Zugabe von 2 μ l.

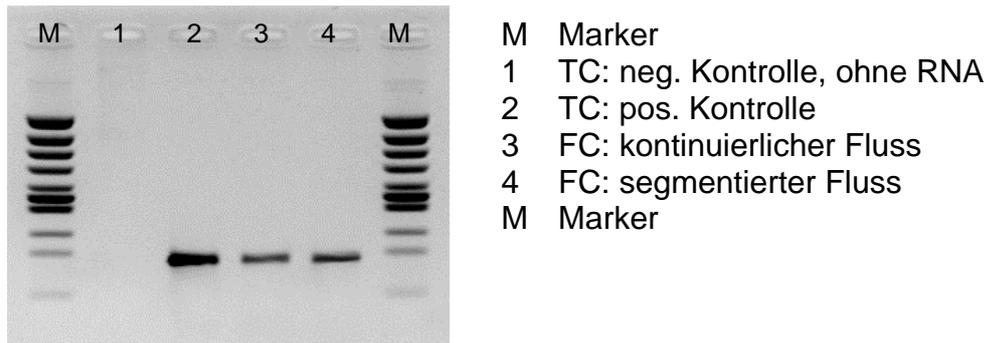


Abbildung 60 Inverse gelelektrophoretische Aufnahme zum Vergleich der RT-PCR-Effizienzen von Tischthermocycler und Durchfluss-Chip bei unterschiedlichen Flussregimen

Aufgrund der gezeigten Ergebnisse wurde für die RT-PCR im 1-Schritt-Verfahren das Protokoll 14 (Zugabe von 2 μ l HotStart-DNA-Polymerase) für die Durchführung der weiteren Versuche festgelegt. Die Wiederholung der RT-PCR erfolgte anschließend sowohl im kontinuierlichen als auch im segmentierten Probenstrom.

Die RT-PCR Versuche mit segmentierten und kontinuierlichen Probenströmen bestätigten die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente, da auch diesmal eine verbesserte Produktausbeute im Durchflusscycler mit segmentierten Fluss erzielt wurde. Abbildung 60 zeigt, dass im Vergleich zum Tischthermocycler mit der Durchfluss-RT-PCR nur geringere Intensitäten der Produktbanden ermittelt werden konnten ($I_{TC} = 2,6$; $I_{FC, seg} = 1,3$; $I_{FC, seg} = 1,1$).

4 Diskussion

4.1 PCR-Kompatibilität und chemische Oberflächenmodifikation

Im Hinblick auf die Verwendung von mikrosystemtechnischen Materialien für die Herstellung von PCR-Chipbauelementen, wie beispielsweise Silizium, Glas oder Lithiumniobat-Oberflächen, wurde deren aus der Literatur bekannte [15, 79, 89] inhibierende Wirkung auf die PCR-Produktausbeute bestätigt. In den durchgeführten Versuchen konnte dieser Effekt zum Teil durch die Zugabe entsprechender Additive wie BSA und Q-Solution vermindert, meist aber nicht vollständig unterdrückt werden. Diese wurde durch eine leichte Verbesserung der Produktausbeuten sichtbar. BSA wird in der PCR zur Oberflächenpassivierung [28] eingesetzt, um die Effektivität der Amplifikation zu erhöhen und um als Blocker unspezifische Bindungen der *Taq*-Polymerase mit der Oberfläche zu vermeiden. Die Effizienz von BSA ist dabei höher als die anderer Zuschlagstoffe, wie beispielsweise DMSO oder Glycerol [90]. Bei dem, von dem Anbieter Qiagen, verwendeten PCR-Kit ist Q-Solution ein spezifischer Zuschlagstoff. Q-Solution verändert das Schmelzverhalten der DNA und wird zur Optimierung von PCR-Systemen eingesetzt [91].

Neben den in dieser Arbeit verwendeten Additiven sind aus der Literatur weitere Möglichkeiten für eine dynamische Oberflächenmodifikation bekannt. Unter anderen wurden Polymere wie PVP, PEG oder Detergenzien wie Tween 20 den PCR-Ansätzen zugesetzt [18, 40, 92, 93].

In eigenen Versuchen brachte der Einsatz von Tween 20 im kontinuierlichen Durchflussbetrieb des 25-Zyklen Glas-Silizium-Chipthermocyclers den gewünschten positiven Effekt auf die PCR-Produktbildung (Abschnitt 3.2.3), dagegen wirkte es sich negativ auf die Segmentbildung in den 35-Zyklen Glas-Glas-Chipthermocycler aus. Tween 20 ist ein Detergenz, welches die Grenzflächenenergien zwischen der Probe und der Mikrokanaloberfläche herabsetzt, wodurch der kontrollierte Tropfenabriss an den Injektionsdüsen, der für eine stabile Segmentbildung wichtig ist, verhindert wurde.

Um direkte Wechselwirkungen mit den nativen Chipoberflächen zu vermeiden, wurden verschiedene statische Oberflächenmodifikationen mit Dimethyldichlorosilan, Teflon AF und Perfluorodecylsilan getestet. Aufgrund der hohen

Kontaktwinkelausbildung mit Wasser und den homogen ausgebildeten Oberflächenschichten, schienen alle getesteten Modifikationen geeignet zu sein.

Betrachtet man die Auswirkungen der Oberflächenmodifikation auf die stationäre Chip-PCR, so zeigte sich, dass die Stabilität der modifizierten Oberflächen aufgrund der günstigen Oberflächen-Volumen-Verhältnisse keinen Effekt auf die PCR-Produkt-Ausbeute hatte. Vielmehr ist ein limitierender Parameter eine unzureichende Kontaktwinkelausbildung mit Mineralöl als Verdunstungsschutz. Dadurch wurde Dimethyldichlorosilan für die stationäre PCR nicht weiter verwendet und für weitergehende Untersuchungen, auch wegen der einfachen Handhabung Teflon AF als Oberflächenmodifikation gewählt. Neben den getesteten und bewerteten Modifikationsvarianten gibt es eine Reihe weiterer Silane die prinzipiell für den Einsatz in der PCR-Chiptechnologie in Frage kommen und bei verschiedenen aus der Literatur bekannten Chipaufbauten verwendet wurden [15, 16, 24-26, 30, 35, 37, 79, 92, 94-98].

Bei der Durchfluss-PCR lagen die Problemstellungen anders. Die Verdunstung der Probe spielte hierbei keine Rolle, da es sich um abgeschlossene Chipsysteme handelte, in denen Mineralöl als Transportmedium verwendet wurde, um den Prozess möglichst pulsationsarm zu führen. Um die guten Stabilitätsbedingungen zu nutzen wurden die 25-Zyklen-Glas-Silizium-Chipthermocycler in der kontinuierlichen Betriebsweise mit Repel beschichtet. Die Beschichtung mit Teflon AF gestaltete sich deutlich schwieriger, da ein Aufreißen der Schichten an den Ein- und Ausläsen nicht unterbunden werden konnte und somit die Mikrokanäle zeitweise durch abgerissene Beschichtungspartikeln verstopften. Bei dem Wechsel auf das 35-Zyklen-Glas-Glas-Chipmodul und der damit verbundenen Betriebsweise des segmentierten Flusses wurde ein weiterer Wechsel der Oberflächenmodifizierung notwendig. Unter den gegebenen PCR-Bedingungen war ein stabiles Segmentierungsverhalten nur bei Perfluorodecylsilan zu beobachten, wofür die notwendigen Grenzflächenspannungen zwischen der PCR-Lösung, dem Trägermedium und der Mikrokanaloberfläche erfüllt wurden. Für die Durchfluss-Chipthermocycler wurden in den bekannten Publikationen, neben dem hier beschriebenen Dimethyldichlorosilan (Repel, [38, 47, 99]), lediglich Hexamethyldisilazan (HMDS, [40]) verwendet, welches wegen seiner niedrigen Kontaktwinkelausbildung und der mangelnden Stabilität [79] nicht zum Einsatz kam.

Die Übersicht in der Tabelle 37 spiegelt die bekannten statischen und dynamischen Beschichtungsmethoden mit dem Verweis auf die entsprechenden Literaturstellen wider.

Tabelle 37 Übersicht der verschiedenen publizierten Beschichtungsmethoden für PCR-Chipmodule

Methoden	Chemikalien / Mengen	Referenzen
statische Beschichtungen:		
Silanisierung	Hexamethyldisilazan (HMDS)	[40, 79]
	Trimethylchlorosilan (TMCS)	[79]
	Dimethyldichlorosilan (DMDCS, Repel)	[38, 47, 79, 99]
	Propyltrichlorosilan (PTCS)	[79]
	Perfluorosilan (PFS)	[37]
	Chlorodimethyloctylsilan (CDMOS)	[92]
	Epoxy(poly)dimethylacrylamid (EPDMA)	[92]
Aminopropoyltriethoxysilan (APTES)	[92]	
SiO ₂	500 Å	[16], [35]
	1000 Å	[15]
	2000 Å	[24, 26, 94, 95]
	3000 Å	[30]
	4000 Å	[25]
Si ₃ N ₄	keine Angabe der Schichthöhe	[15]
BSA	1,0 mg/ml	[97]
	2,5 mg/ml	[96]
	keine Mengenangabe	[98]
dynamische Beschichtungen:		
BSA	0,25 mg/ml	[93, 100]
	2,5 mg/ml	[16]
	5,0 mg/ml	[40]
	keine Mengenangabe	[21]
PEG	8000 = 8,5 % [w/v]	[92]
	8000 = 0,75 % [w/v]	[18, 93]
PVP	keine Mengenangabe	[92]
Tween 20	5 % [v/v]	[40]

4.2 Vergleich der stationären Oberflächen-Chips mit kommerziellen Blockthermocyclern

Basierend auf einem am IPHT entwickelten und bereits publizierten Chip-Design [37], wurde ein Layout entworfen, welches die Platzverhältnisse auf dem Chip optimal ausnutzte und im Gegensatz zu den vorherigen Layouts vier statt zwei PCR-

Strukturen auf einem Chip vereint, welche parallel genutzt werden können. Zusätzlich wurden fluidische Anker in Form eines Goldrings integriert, welche aufgrund ihrer geometrischen Form eine bessere PCR-Tropfenplatzierung während des PCR-Prozesses ermöglichten. Eine Besonderheit gegenüber bisherigen PCR-Chipmodulen stellte die angewendete 2D-PCR auf planaren Chipoberflächen dar.

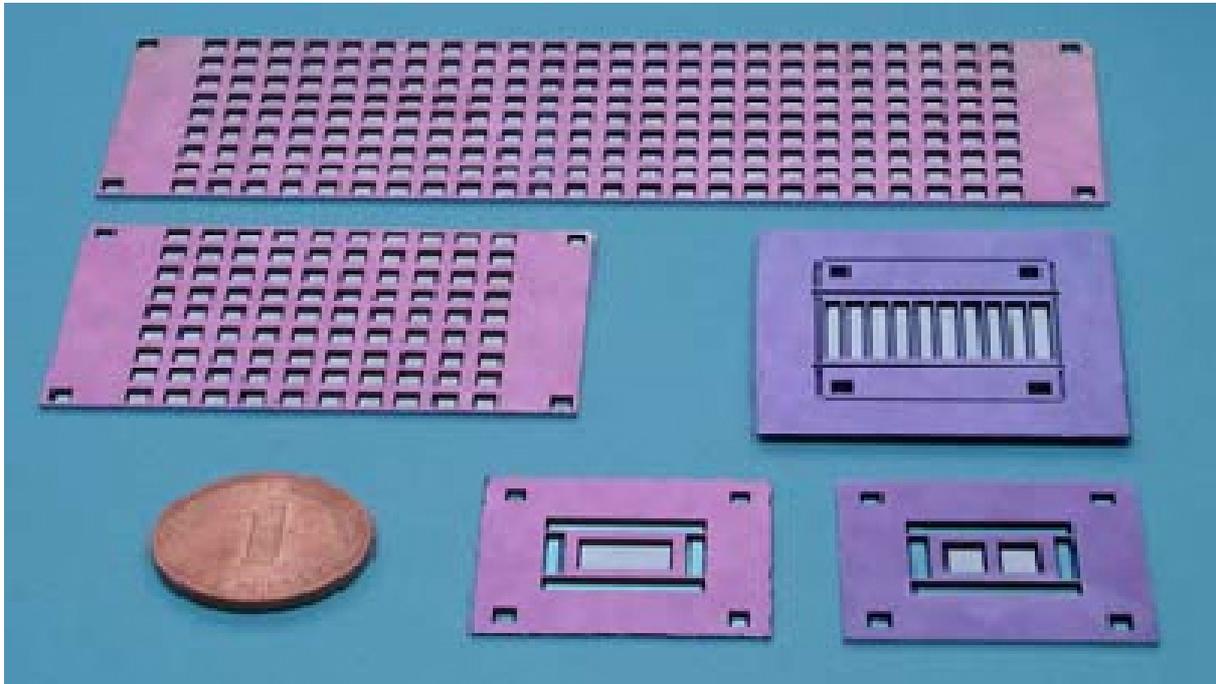


Abbildung 61 Verschiedene Layouts von Silizium-Kammer-Cyclern, welche am IPHT Jena entwickelt wurden

Standardmäßig wurden für die stationäre Chip-PCR am IPHT so genannte 3D-Chipmodule verwendet, welche eine oder mehrere Kammern bzw. einen Mikrokanalabschnitt als Reaktionsraum nutzten (Abbildung 61, [4, 101]). Der Vorteil der Kammer-Chipthermocycler lag in der Verwendung von Silizium als Chipsubstrat. Die gute Wärmeleitfähigkeit dieses Materials ermöglichte Heizraten von mehr als 40 K/s und Kühlraten von 10 K/s, welche mit den entwickelten Oberflächenchips aus Glassubstraten nicht erreicht werden können. Allerdings sind die Herstellungskosten der Kammer-Chipthermocycler aufgrund des aufwendigen Herstellungsprozesses und der Materialkosten sehr hoch. Bei der Herstellung der stationären Oberflächenchips waren keine Tiefenätzprozesse zur Erzeugung der Reaktionskammer notwendig und es mussten keine zusätzlichen, kostenintensiven Prozessschritte zum Deckeln der Chips durchgeführt werden. Durch die Anordnung der Heizer- und Sensorstrukturen auf der Chipoberfläche konnten bei dem 2D-PCR-Chip Heizraten von 15 K/s und

Kühlraten von 5 K/s erreicht werden, welche deutlich über denen konventioneller Blockthermocycler (Heizen: 3 K/s, Kühlen: 1 K/s) lagen.

Ein weiterer Vorteil der Oberflächenchips gegenüber den Kammerchips war das fluiddische Handling. Das Aufbringen und Entnehmen der Proben erfolgte über einfache Pipetierschritte. Die Kammer-Chipthermocycler dagegen waren im Allgemeinen mit Glas gedeckelt und mit fluidischen Anschlüssen versehen, über welche die luftblasenfreie Befüllung und Entleerung der Chips meist nicht vollständig realisiert werden konnte.

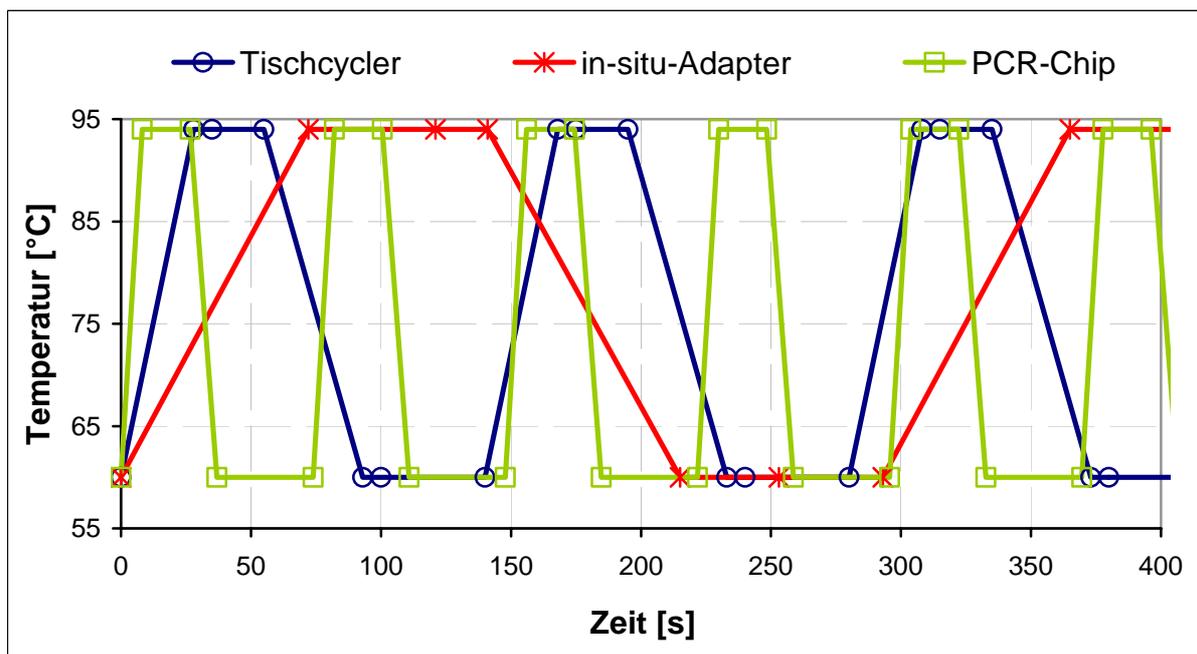


Diagramm 10 Vergleich der tatsächlichen Temperatur-Zeit-Profile von Tischthermocycler, *in-situ*-Adapter und PCR-Chip bei folgendem PCR-Protokoll: Denaturierung: 20 s bei 94°C; Annealing + Elongation: 40 s bei 60 °C

Vergleicht man die Oberflächenchips mit kommerziellen Blockthermocyclern, so erreichten sie vergleichbare Ergebnisse in der Produktausbeute und den Nachweisgrenzen, bei deutlich kürzeren Reaktionszeiten und niedrigeren Probenvolumen von 1,0 - 3,0 µl gegenüber gebräuchlichen Volumen von 10 - 100 µl in Eppendorfreaktionsgefäßen oder 5 - 25 µl in Glaskapillaren. Beim Vergleich der durchschnittlichen Heiz- und Kühlraten der verwendeten Aufbauten (Tischthermocycler mit Eppendorfreaktionsgefäßen und *in-situ*-Adapter, PCR-Chip) wurden deutliche Unterschiede festgestellt (Diagramm 10), was sich auf die gesamte Reaktionszeit auswirkte. Bei den durchgeführten Versuchen betrug die Reaktionszeit der Chip-PCR ca. die Hälfte des Tischthermocyclers im Betrieb mit Eppendorfreaktionsgefäßen und nur ein Drit-

tel beim Betrieb mit dem *in-situ*-Adapter. Dabei ergab sich ein Leistungsbedarf der Chipthermocycler von ca. 1,5 W, was ca. einem Tausendstel von dem konventioneller Geräte entspricht. Die Anforderungen an Chipthermocycler mit hohen Arbeitsschwindigkeiten, niedrigen Probenbedarf und hoher Mobilität bei niedrigen Leistungsbedarf sowie kleinen Geräteabmaßen wurden bei den verwendeten Oberflächenchips somit alle erfüllt.

4.2.1 PCR-Effizienz auf stationären Chipthermocyclern

Im Hinblick auf die variablen Einsatzmöglichkeiten der stationären PCR-Chipthermocycler ist es gelungen, verschiedene PCR-Systeme in einem Produktlängenbereich von 100 bis 1000 Basenpaaren erfolgreich zu amplifizieren, was darauf schließen lässt, dass es keine Einschränkung in der Verwendung der Chips im Hinblick auf die Anzahl der Basenpaare gibt. Allerdings wurde deutlich, dass eine Modifikation der PCR-Protokolle durch die Zugabe von Additiven (BSA, Q-Solution) in jedem Fall notwendig wird, um vergleichbar gute PCR-Effizienzen zum Tischthermocycler zu erreichen. Die Hauptursache für die eingeschränkte Produktbildung während der PCR mit Standardprotokollen liegt in der Wechselwirkung der verwendeten DNA-Polymerasen mit dem hydrophoben Chipoberflächen und die dadurch eingeschränkte Aktivität dieser. Eine Modifikation der nativen Chipoberflächen ist wie in 4.1 beschrieben zusätzlich notwendig, um die PCR auf stationären Chipsystemen überhaupt zu ermöglichen. Durch die Zugabe von Additiven, wie BSA sollen die kleinen Kontaktflächen der PCR-Lösung mit der Oberfläche abgesättigt werden, so dass die DNA-Polymerasen ohne Einschränkung der Aktivität in der Lösung zur Verfügung stehen. Diesen Effekt kann man auch durch die zusätzliche Erhöhung der zugesetzten Menge an DNA-Polymerase erreichen, allerdings steht bei einer Chip-basierten Lösung auch immer die Frage der Kostensenkung im Vordergrund, was diesem Ansatz widersprechen würde. Die Zugabe von Q-Solution als Additiv sorgte bereits bei den Versuchen im Tischthermocycler für verbesserte PCR-Ergebnisse und zeigte diese auch in Kombination mit BSA auf den PCR-Chips, da sie eine stabilisierende Wirkung auf die PCR-Ansätze hat [88].

Die Versuche unter Verwendung verschiedener PCR-Kits zeigten, dass der Einsatz von so genannten Master-Mix-Ansätzen auf dem PCR-Chip nur mit einer deutlich verringerten PCR-Effizienz möglich war. Die Gründe dafür liegen bei der veränderten Konzentration an Polymerase in den PCR-Ansätzen. Während bei den Master-Mix-

Ansätzen 2,5 Units/50 μ l eingesetzt wurden, betrug die Konzentration bei den anderen Ansätzen 5 Units/50 μ l.

4.2.2 Effizienz der Realtime-Detektion auf stationären PCR-Chips

Die Erweiterung des PCR-Chipaufbaus mit der Möglichkeit einer Realtime-Detektion der PCR-Produktbildung war von besonderer Bedeutung. Zum einen wurde die gesamte Analysezeit um ca. 45 Minuten verkürzt, da der nachträgliche Produktnachweis mittels Agarosegelelektrophorese entfiel. Zum anderen wurde damit die Gelegenheit der schnellen und spezifischen Quantifizierung der PCR-Produkte auf dem Chip geschaffen.

Ein Problem der Realtime-PCR in konventionellen Blockthermocyclern ist das Mindestprobenvolumen, welches für die sichere Analyse mit diesen Geräten benötigt wird. Standardmäßig werden mit der Realtime-PCR-Methode Probenvolumen zwischen 10 und 100 μ l untersucht. Einen alternativen Ansatz zu den Blockthermocyclern stellt der so genannte Light Cycler von Roche dar. In speziellen Glaskapillaren wurden mit diesem Gerät Realtime-PCR-Reaktionen mit 5 μ l Probenvolumen erfolgreich durchgeführt [102], wobei Reaktionszeiten von weniger als 15 Minuten für 30 PCR-Zyklen erreicht wurden. Ein Nachteil dieser Geräte-Plattform ist allerdings der risikoreiche Umgang mit den dünnwandigen Glaskapillaren, welche im Allgemeinen nur in Routinelaboratorien mit speziell geschultem Fachpersonal eingesetzt werden. Erste Veröffentlichungen zum Chip-basierten Nachweis der PCR-Produkte stammen aus den Jahren 1997/98 [21, 22, 25, 103]. Taylor et. al [25] beschreibt beispielsweise einen Detektionsaufbau für den Nachweis von PCR-Produkten in Silizium-Kammer-Chipthermocyclern mit einem Fassungsvermögen von 5 μ l unter der Verwendung von TaqMan-Sonden. Mit diesem Aufbau wurde eine Detektionsgrenze von 1,2 Kopien, bei einer PCR-Effizienz von 91% erreicht. Allerdings beruhte das Konzept nicht auf einen miniaturisierten Gesamtaufbau. Alle anderen genannten Forschergruppen verwirklichte einen möglichst mobilen und kleinen Geräteaufbau in Laptop-Größe, arbeiten aber mit einem Probenvolumen zwischen 25 und 50 μ l.

Mit entwickelten Chip-basierten Detektionsaufbau, der in dieser Arbeit verwendet wurde, konnten dagegen Probenvolumen von bis zu 1,0 μ l sowohl mit unspezifischen als auch mit spezifischen Nachweismethoden im Echtzeitverfahren analysiert werden. Der gewählte faseroptische Aufbau mit speziell auf die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe abgestimmten Filtersätzen für die Anregung und Detektion, dem Photomultiplier als Detektor sowie dem verwendeten Chipdesign wurden so kombi-

niert und optimiert, dass auch geringe Fluoreszenzsignalausbeuten mit einem möglichst guten Signal-Rausch-Verhältnis aufgenommen werden konnten.

4.2.2.1 Gegenüberstellung der Realtime-Detektion mit Sybr Green

Der Nachweis der PCR-Produkte mit Fluoreszenzfarbstoffen wie Sybr Green ist kostengünstig und sehr empfindlich, hat aber den Nachteil, dass alle doppelsträngig vorliegende DNA nachgewiesen wird, unabhängig von der Sequenz des zu amplifizierenden PCR-Produktes. Von Vorteil sind dagegen die hohen Fluoreszenzsignale die beim Einbau der Sybr Green Moleküle in die doppelsträngige DNA erreicht werden und somit eine sichere Auswertung der Detektionskurven gewährleisten. Die Überprüfung der PCR-Produkte auf ihre Spezifität kann zusätzlich durch eine so genannte Schmelzkurvenanalyse erfolgen, womit die Qualität der erzeugten PCR-Produkte nachgewiesen wird.

Vergleicht man die aufgenommenen Detektionskurven des Realtime-Thermocyclers von Applied Biosystems (ABI 7300) mit denen des PCR-Chipsystems, so wurden prinzipiell ähnliche Ergebnisse erzielt. Die PCR-Effizienzen der detektierten Verdünnungsreihen lagen bei beiden Systemen bei annähernd 100 %, was einer optimalen Produktverdoppelung in dem linearen Bereich der Detektionskurve entspricht. Die höheren Signalintensitäten bei dem Chipsystem waren auf die verwendeten optischen Komponenten und den Gesamtaufbau zurückzuführen. Während bei dem kommerziellen Realtime-Thermocycler eine gekühlte CCD-Kamera zum Einsatz kam, wurde bei dem Chip-basierten Aufbau ein Photomultiplier verwendet, welcher sich durch eine höhere Empfindlichkeit auszeichnet. Außerdem erfolgte die Anregung und Detektion mittels eines Lichtfaserbündels, welches direkt an der Unterseite der PCR-Chips platziert wurde und somit die ideal Ausleuchtung des gesamten PCR-Tropfens ermöglichte.

Die Empfindlichkeit beider Technologieansätze (Realtime-Thermocycler und stationärer PCR-Chip) ermöglichte den sicheren Nachweis von nur 2 Moleküle/ μl als Konzentration der Ausgangsprobe, was auf das eingesetzte PCR-Volumen bezogen 6 DNA-Kopien entsprach. Damit wurden die ursprünglich ohne Realtime-Detektion ermittelten Nachweisgrenzen bestätigt. Die Ergebnisse der Realtime-Detektion zeigten allerdings ebenfalls eine Detektionskurve bei den getesteten Negativkontrollen ohne Zusatz von DNA. Dabei handelte es sich um kleine unspezifische PCR-Produkte im Bereich von 40-60 Basenpaaren, welche besonders bei niedrigen DNA-

Konzentrationen in den ausgewerteten Agarosegelen sichtbar wurden und auf die Bildung von Primerdimeren zurückgeführt wurde. Die aufgenommenen Schmelzkurven mit dem ABI 7300 zeigten deutlich, dass es sich dabei nicht um das spezifische PCR-Fragment handelte. Eine solche Schmelzkurvenanalyse ist technologisch auch bei dem Chipsystem möglich, zum jetzigen Zeitpunkt aber noch nicht realisiert. Eine entsprechende Weiterentwicklung der Anwendersoftware wurde daher empfohlen und wird zur Zeit etabliert.

Durch den Einsatz der Realtime-Detektion mit Sybr Green wurde die Analysezeit um ca. 45 Minuten verkürzt, da ein nachgeschalteter Nachweis der PCR-Produkte mittels Elektrophoresetechniken entfällt. Zusätzlich bietet diese Nachweismethode auch eine gute Möglichkeit, um quantitative Aussagen zu treffen und über die ermittelte Standardgerade auf die DNA-Ausgangskonzentration einer unbekannt Probe schließen zu können. Die dargestellten Ergebnisse wiesen eine sehr hohe Genauigkeit (>95%) der berechneten Ct-Werte zu der entsprechenden Standardgerade auf, welches eine Grundvoraussetzung für eine sichere Quantifizierung ist. Im Gegensatz zu dem konventionellen Realtime-Thermocycler konnten die Detektionskurven einer DNA-Verdünnungsreihe nicht parallel aufgenommen werden, da das optische Detektionssystem nur für eine PCR-Struktur auf dem Chip ausgelegt war. Das sowohl eine hohe PCR-Effizienz von 97 % als auch ein Bestimmtheitsmaß von 99,8 % der Standardgeraden auf dem PCR-Chip erzielt wurden, zeigte, dass die nacheinander abgelaufenen Experimente, auch mit verschiedenen Chipstrukturen, eine hohe Reproduzierbarkeit aufwiesen. Die Möglichkeit einer parallelen Auslesung von 3 verschiedenen, bekannten Konzentrationen einer DNA-Verdünnungsreihe und die Analyse einer PCR-Probe unbekannter Konzentration ist aufgrund des gewählten Chiplayouts prinzipiell möglich.

4.2.2.2 Gegenüberstellung der Realtime-Detektion mit TaqMan-Sonden

Eine zuverlässige Methode der spezifischen Realtime-Detektion von PCR-Produkten ist der Einsatz von so genannten TaqMan-Sonden, da diese sequenzspezifisch an das gesuchte PCR-Produkt hybridisieren.

Die in dem Abschnitt 3.1.3.4 (Seite 57) verwendete TaqMan-Sonde wurde für die spezifische Detektion des Exon 6-Abschnittes im p53-Genom konstruiert. TaqMan-Sonden zeichnen sich im Allgemeinen durch eine hohe Selektivität aus, sind aber im Vergleich zu Sybr Green weniger sensitiv. Die durchgeführten Experimente bestätig-

ten diese Aussage. Im Gegensatz zu der im vorigen Abschnitt diskutierten Detektion mit Sybr Green wurden mit der TaqMan-Sonde deutlich niedrigere Signalintensitäten, sowohl im Realtime-Thermocycler als auch mit dem PCR-Chip-System aufgenommen.

Im direkten Vergleich der beiden Geräte-Technologien wurde bei dem Realtime-Thermocycler erneut eine deutlich niedrigere Fluoreszenzsignalthöhe zum Chip-system registriert. Dieser Signalunterschied entsprach im Verhältnis dem der Messungen mit Sybr Green und wurde daher auf dieselben gerätetechnischen Gründe im Detektionsaufbau zurückgeführt. Die andiskutierte niedrigere Sensitivität der TaqMan-Sonde spiegelte sich außerdem in den ermittelten Ct-Werten der DNA-Verdünnungsreihen wider. Diese waren im Vergleich zu den Ct-Werten bei der Detektion mit Sybr Green zu deutlich höheren Werten verschoben. Außerdem konnten für die geringste DNA-Konzentration keine Ct-Werte ermittelt werden, da diese Detektionskurven unterhalb der festgelegten Threshold-Grenze (Schwellenwert-Grenze) verliefen.

Ein weiterer Unterschied konnte bei den ermittelten PCR-Effizienzen festgestellt werden. Diese waren bei beiden Gerätetechnologien im Vergleich zu den Sybr Green Messungen um mehr als 30 % vermindert. Der Grund für diese deutliche Effizienz-minderung wurde in einem unzureichenden Bindeverhalten der Sonde vermutet. Zum einen bestand die Möglichkeit, dass die Sonde nicht wie vorgesehen an jedem zur Verfügung stehenden spezifischen DNA-Strang gebunden hatte und zum anderen konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sie nicht wie vorgesehen vollständig durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase hydrolisiert wurde, sondern teilweise selbständig vom Strang abdissoziierte. Dies hätte zur Folge, dass zwischen dem Reporterfarbstoff und dem Quenscher keine räumliche Trennung vorgelegen hätte, da die Sonde noch intakt war. Damit konnte auch kein Anstieg des Reportersignals erfolgen. Aufgrund der Verkürzung der Reaktionszeit in der Elongation von standardmäßig 60 s auf 40 s wäre es auch denkbar, dass bei niedrigen Konzentrationen die Hybridisierungszeit der Sonde an das DNA-Template nicht ausreichte.

Die ausgewerteten Elektrophoresegele zeigten in allen Banden vergleichbare Produktintensitäten. Das bedeutete, dass die tatsächliche PCR-Effizienz vergleichbar zu denen mit Sybr Green sein müssten. Um eine Verbesserung der PCR-Effizienz bei der Realtime-Detektion mit TaqMan-Sonden zu erreichen und die Vorteile dieser Methode besser zu nutzen, sollten daher zukünftig an der Optimierung der PCR-

Ablaufprotokolle gearbeitet werden, bei denen sowohl die Reaktionszeiten als auch die Reaktionstemperaturen variiert werden.

Im Vergleich zu den Sybr Green Messungen konnte eine deutliche höhere Spezifität der TaqMan-Sonde festgestellt werden. Die Negativkontrollen zeigten sowohl mit dem Realtime-Thermocycler von ABI, als auch auf dem PCR-Chip keine Erhöhung des Fluoreszenzsignals. Auf den ausgewerteten Agarosegelen nach der Elektrophorese wurden lediglich deutliche Primerdimer-Banden nachgewiesen, aber kein spezifisches PCR-Produkt, was die Richtigkeit der dargestellten Kurven bestätigte.

4.2.3 Effizienz der *on-Chip*-Hybridisierung

Um eine weitere Chip-basierte Analysemethode der PCR-Produkte zu erarbeiten, wurden Hybridisierungsversuche auf dem PCR-Chip durchgeführt. Im Vergleich zu den Realtime-Detektionsmethoden erfolgte im Anschluss an die PCR-Reaktion der Produktnachweis mit einer Endpunktbestimmung, vergleichbar zu den Gelelektrophorese-Verfahren.

Die durchgeführten Experimente dienten als Voruntersuchungen, um abzuschätzen, ob eine solche Methode zum Produktnachweis auf dem Chip geeignet wäre. Prinzipiell konnte nachgewiesen werden, dass ein solcher Ansatz auch mit geringen Analyse-Volumen von 1 µl spezifisch *on-Chip* möglich war.

Allerdings war der Zeit- und Materialaufwand für diese Hybridisierungsmethode verglichen mit den konventionellen Nachweisverfahren sehr hoch. Im Vergleich zu den standardmäßig eingesetzten PCR-Chips wurden zusätzliche Strukturierungs- und Modifikationsschritte auf der Oberflächenbeschichtung notwendig, welche nicht nur einen höheren Arbeitsbedarf sondern auch höhere Kosten verursachten. Der Zeitaufwand von der Immobilisierung der eingesetzten Sonden, über die Hybridisierung der PCR-Produkte mit allen Waschschritten bis zur endgültigen Auswertung betrug 2-3 Tage. Obwohl weitere Optimierungen bei den verwendeten Protokollen und Abläufen eine erhebliche Verkürzung der Reaktionszeit versprechen, ist nicht davon auszugehen, dass Analysezeiten von 45 min wie bei den Elektrophorese-Verfahren zu erreichen sind.

Die *on-Chip*-Hybridisierungstechniken eignen sich besonders bei Anwendungen, in denen große Probemengen auf vielseitige Fragestellungen hin untersucht werden sollen und werden mittels der DNA-Microarraytechnologie erfolgreich realisiert. Dabei wird allerdings eine große Anzahl an Sonden in dichtesten Anordnungen auf Chip- oder Objektträgeroberflächen immobilisiert. Die Verfahren laufen hoch automatisiert

und in hohen Durchsätzen ab, so dass der Kosten- und Zeitaufwand umgerechnet auf die Ergebnismenge niedrig ist. Dieser Effekt konnte mit dem realisierten Ansatz auf dem PCR-Chip nicht erreicht werden. Denkbar wäre eine solche Auswertemethode für PCR-Chips, die über eine große Anzahl an Strukturen verfügen. Dabei ist eine vollständige Automatisierung der Abläufe denkbar. Zum derzeitigen Stand der PCR-Chiptechnologie ist allerdings ein Realtime-PCR-Verfahren wesentlich zeit- und kosteneffizienter und daher der *on-Chip*-Hybridisierung vorzuziehen.

4.3 PCR in Durchfluss-Chipmodulen

Das Verfahren der Durchfluss-PCR ist auf eine Patentanmeldung aus dem Jahr 1990 (DE 40 24 714 C2) zurückzuführen, welches eine Vorrichtung zum wiederholten, automatischen Ausführen eines Wärmebehandlungszyklus für die Behandlung einer Probe im Durchfluss beschreibt. Die ersten aus der Literatur [104] bekannten Umsetzungen dieses Prinzips erfolgten in Teflonkapillaren, durch welche die PCR-Proben mittels Spritzen-Pumpen bewegt wurden und die Proben so durch entsprechend temperierte Bäder gepumpt wurden. Das Probenvolumen betrug ca. 50 µl. Einzelne Proben wurden durch Luftpolster voneinander getrennt. Allerdings ist die Temperaturstabilität derartig aufgebauter Kapillarsysteme sehr begrenzt und die Wärmeübertragung relativ langsam.

Erste Arbeiten zur Übertragung des Durchfluss-PCR-Prinzips auf der Basis von Mikrochip-Thermocyclern wurden erstmals im Jahr 1998 patentiert (WO 99/41015) und veröffentlicht [38] mit dem Ziel, eine hohe Anzahl an Proben in kleinen Volumen und kürzeren Reaktionszeiten zu analysieren.

Der in dieser Arbeit verwendete Ansatz der Durchfluss-PCR beruht auf Mikrochip-Thermocyclern, welche sich zum einen durch eine schnelle Wärmeübertragung auszeichnen und zum anderen die Einhaltung extremer Temperaturgradienten mit einer hohen Temperaturstabilität garantieren. Durch den modularen Aufbau des Glas-Glas-Chipmoduls und der damit verbundenen Trennung des thermischen und fluidischen Managements ist das Chipsystem für verschiedene Anwendungsbereiche der PCR-Technologie einsetzbar. Parallel zu den ursprünglichen Chip-basierten Durchfluss-PCR-Verfahren in dem Glas-Silizium-Chipthermocycler wurde der Glas-Glas-Chipaufbau entwickelt und etabliert, der zusätzlich den integrierten Schritt der Reversen Transkription und somit auch die Vervielfältigung von RNA ermöglichte. Für den Einsatz in der medizinischen Diagnostik ist dieses Verfahren für die Durchführung von Genexpressionsanalysen von besonderer Bedeutung.

4.3.1 PCR-Effizienz im 25-Zyklen-Glas-Silizium-Durchflusschip

Die Ergebnisse der konventionellen Durchfluss-PCR in Glas-Silizium-Chipthermocyclern (3.2.3) ergaben wichtige Erkenntnisse für eine optimale Weiterentwicklung der Durchfluss-Chiptechnologie und deren Erweiterung in der Art der Anwendung. So wurden die Rahmenbedingungen, wie beispielsweise die notwendige Zyklenzahl, die Flussraten und die Nachweisgrenzen, für die Etablierung des HPV-PCR-Systems im Durchfluss-Verfahren abgeleitet. Der Vorteil der Glas-Silizium-Chipthermocycler lag im guten Wärmetransfer der Heizerstrukturen zum fluidischen Probenstrom. Dies gelang durch die Verwendung von Silizium als Substrat für die aufgetragenen Platin-Heizerstrukturen und der direkten Verbindung dieser Silizium-substrathälften mit den Mikrokanälen auf den Glassubstrathälften. Allerdings war das gesamte Chipdesign auf die Realisierung ausgewählter PCR-Protokolle ausgelegt und musste für die Etablierung neuer PCR-Systeme meist modifiziert und neu hergestellt werden.

Ein kritischer Faktor bei der Durchführung von PCR-Reaktionen im Durchfluss-Verfahren ist das fluidische Management. Der Glas-Silizium-Chipthermocycler wurde im kontinuierlichen Fluss mit einem Reaktionsvolumen von 25 µl betrieben. Bei den verwendeten Flussraten und Probenvolumen konnte von einem laminaren Fluidikstrom ausgegangen werden, welcher dazu führen konnte, dass die Probe in Abhängigkeit von der Entfernung zur Kanalwand unterschiedlich schnell bewegt wurde und somit einen negativen Einfluss auf das PCR-Ergebnis hatte. Dieser theoretische Aspekt konnte allerdings in den Versuchsreihen nicht beobachtet werden. Weiterhin bringt die Verwendung derartiger Probenvolumen ein Kontaminationsrisiko durch dynamische Ablagerungen einzelner Reaktionskomponenten (BSA und Taq-Polymerase) an den Mikrokanalwänden mit sich. Dem wurde durch entsprechende Modifikation der Mikrokanäle (Oberflächenbeschichtung) und notwendigen Spülschritten zwischen den einzelnen PCR-Versuchen entgegengewirkt.

Stellt man die ermittelten Kenngrößen (Verweilzeiten = Flussrate; Nachweisgrenzen) des HPV-Systems im Durchflusscycler mit 25 PCR-Zyklen denen des Tischthermocyclers gegenüber, so wurden vergleichbare PCR-Produktausbeuten erzielt. Die Bestimmungen der untersten Nachweisgrenze von 1700 Moleküle/µl zeigten ebenfalls, dass die beiden Technologiesysteme denselben Amplifikationsbereich aufwiesen, wenn gleich die Durchfluss-PCR bei dem großen HPV-Fragment (740 bp) minimal bessere Ergebnisse erzielte. Dies war allerdings auf die relativ langsamen Flussraten

und die damit verbundene Erhöhung der Verweilzeiten in den entsprechenden Temperaturzonen zurückzuführen. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass die Arbeitsgeschwindigkeit der Durchfluss-PCR bei der langsamsten Flussrate (0,25 $\mu\text{l}/\text{min}$) das 3-fache des Tischthermocyclers ausmachte. Bei einer Flussrate von 0,75 $\mu\text{l}/\text{min}$ konnten die gleichen Prozesszeiten von 1:15 h erreicht werden. Das Ziel der Durchfluss-PCR liegt in der Hauptsache nicht bei der Durchführung von sogenannten Fast-PCR-Protokollen, wie es auf den stationären PCR-Chips realisierbar ist, sondern bei der Möglichkeit von Hochdurchsatzanwendungen durch kontinuierliche Probenverarbeitung.

4.3.2 PCR-Effizienz im 35-Zyklen-Glas-Glas-Durchflussschip

Um eine erweiterte Einsatzmöglichkeit der Mikrochip-Thermocycler zu gewährleisten, wurde ein modulares Chipsystem aufgebaut und in dieser Arbeit auf seine Funktionalität getestet. Die Herstellung der Heizplatte erfolgte analog zu den bisher verwendeten Durchfluss-Chips auf der Basis von Dünnschichttechnologie. Für die Integration zusätzlicher Temperaturzonen (Reverse Transkription und HotStart) und ein besseres thermisches Management wurde die Anzahl der Heizerstrukturen von bisher drei auf 16 erhöht (Abbildung 62).

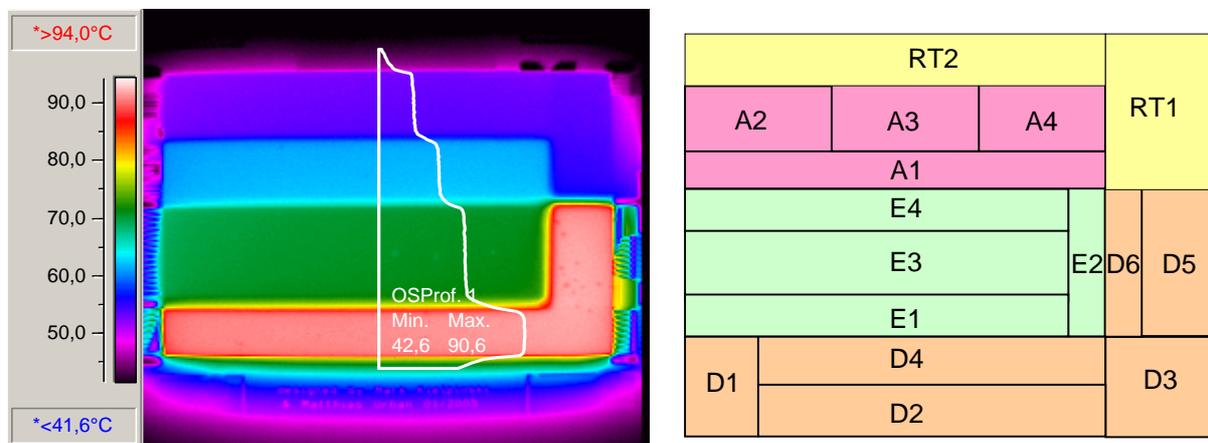


Abbildung 62 links- Thermobild eines temperierten Mikrochip-Thermocyclers für die Durchfluss-PCR mit einer Temperaturstabilität von $\pm 0,1\text{ K}$
rechts- Verteilung der 16 Heizerstrukturen in den jeweiligen Temperaturzonen: RT = Reverse Transkription, D = Denaturierung, A = Annealing, E = Elongation

Aus Kostengründen wurden für die Herstellung ausschließlich Glassubstrate verwendet. Diese besitzen eine geringere Wärmeleitfähigkeit als Silizium. Da die Tempera-

turzonen bei dem Durchfluss-Verfahren konstant gehalten werden, hatte diese Veränderung jedoch keinen negativen Einfluss auf die Reaktionsergebnisse. Um die möglichen negativen Einflüsse aufgrund des zu großen Probenvolumen zu reduzieren, wurden in dem weiterentwickelten Chipmodul Injektionsstellen integriert, welche den zugeführten Probenstrom in Segmente von ca. 100 nl Größe aufteilen. Bei idealen Oberflächeneigenschaften wurden somit die kleinen Probentropfen in ein Trägermedium eingeschlossen und passierten den Mikrokanal ohne direkten Wandkontakt. Zusätzlich wurde durch diese kleinsten Probemengen eine schnelle und gleichmäßige Temperaturverteilung erreicht. Eine mögliche Anwendung für ein solches Durchfluss-Konzept ist die Übertragung von *in-situ*-RT-PCR-Protokollen zur Zellbasierten Genexpressionsanalyse. Eine Grundvoraussetzung dafür war die Entwicklung und der Funktionstest eines mikrosystemtechnischen Chipmoduls, welches für die Anwendungen geeignet sein wird.

Der erste Schritt bestand in der Etablierung von HotStart-PCR-Protokollen, da diese modifizierte Polymerasen enthalten, wie sie bei allen kommerziellen RT-PCR-Kits Verwendung finden. Dafür wurden vergleichbar zu den Versuchsreihen in den Glas-Silizium-Chipthermocyclern die optimalen Flussraten und die entsprechenden untersten Nachweisgrenzen anhand des HPV-PCR-Systems ermittelt. Wie zu erwarten, waren die Flussratenabhängigen PCR-Ergebnisse vergleichbar. Da die Verhältnisse der Mikrokanallängen über den jeweiligen Temperaturzonen konstant gehalten wurden, entsprachen damit auch die Verweilzeiten (Denaturierung:Annealing:Elongation = 1:1:2) in Abhängigkeit von der Flussrate dem ursprünglichen Layout. Die untersten Nachweisgrenzen konnten für beide HPV-Fragmente deutlich gesenkt werden (von 17.000 auf 170 Moleküle/ μ l PCR-Ansatz), da das erweiterte Chiplayout über 35 PCR-Zyklen verfügte. Für eine mögliche *in-situ*-Analyse auf Einzel-Zell-(bzw. Einzel-Kopie)-Niveau für das vorliegende PCR-System sollte die Zyklenzahl zukünftig allerdings auf 40 bis 45 erhöht werden, da dies mit den 35-PCR-Zyklen noch nicht erzielt werden konnte.

Ein großer Vorteil des 35-Zyklen-Cyclers lag in der integrierten Erzeugung eines segmentierten Probenstroms. Im Vergleich zu der kontinuierlichen Betriebsweise konnten die PCR und RT-PCR-Ergebnisse im segmentierten Fluss deutlich verbessert werden. Die Förderung der Proben in einem flüssig/flüssig Zweiphasensystem (PCR-Lösung/Mineralöl) führt dabei zur Vermeidung von fluidischer Dispersion und

ermöglicht damit einen homogenen Fluidiktransport durch die einzelnen Temperaturzonen.

4.3.3 RT-PCR-Effizienzen in Durchflusssystemen

Für die Etablierung von RT-PCR-Protokollen wurden zwei verschiedene Strategien angewendet, welche beide auch in molekularbiologischen Routinelabors eingesetzt werden. Dabei handelte es sich um die 2-Schritt und 1-Schritt-RT-PCR. Das Silizium-Glas-Chipsystem wurde hauptsächlich für erste Vorversuche, in Kombination mit dem Tischthermocycler für den Schritt der Reversen Transkription, mit dem so genannten 2-Schritt-Protokoll verwendet. Die beiden Methoden der Reversen Transkription und der PCR laufen dabei mit den jeweiligen Enzymen in getrennten Reaktionsansätzen ab.

Es zeigte sich, dass für die eingesetzte Konzentration an Ausgangs-RNA (0,5 µg) mit dem 25-PCR-Zyklen-Chip keine erfolgreiche Amplifikation nachgewiesen wurde, dass aber bei voramplifizierten Proben positive Ergebnisse erzielt werden konnten. Daraus wurde ersichtlich, dass die Erhöhung der PCR-Zykluszahl nicht nur für das Erreichen besserer Nachweisgrenzen, sondern besonders für die erfolgreiche Durchführung von RT-PCR-Protokollen notwendig wurde.

Die durchgeführten 2-Schritt-Versuche mit getrennten RT- und PCR-Abläufen zeigten die erwarteten positiven Ergebnisse. Für einen schnellen und sicheren Ablauf von *in-situ*-RT-PCR-Protokollen, welche ein zukünftiges Anwendungsgebiet dieser Durchflusssysteme darstellen, war es allerdings notwendig, den stabilen Ablauf von 1-Schritt-Protokollen zu gewährleisten.

Bei der 1-Schritt-RT-PCR werden die jeweiligen Enzyme in einem Ansatz gemischt zugegeben und die einzelnen Reaktionsschritte laufen in direkter Folge ohne zusätzlichen Handlungsbedarf in einem System ab. Es konnten RNA-Proben mit 1-Schritt-RT-PCR-Protokollen sowohl im kontinuierlichen als auch im segmentierten Probenfluss erfolgreich amplifiziert werden. Im Gegensatz zu den Standard-PCR-Reaktionen werden dabei noch Entwicklungs- und Optimierungsarbeiten notwendig, um Produktausbeuten vergleichbar zum Tischthermocycler zu erreichen. Dabei müssen durch die Variation der Flussraten die Temperatur-Zeit-Protokolle angepasst werden. Außerdem kann die weitere Modifikation der Reaktionszusammensetzung hilfreich sein. Die zukünftige Ermittlung der unteren Nachweisgrenzen für die notwendige Menge an Ausgangs-RNA spielt eine besondere Rolle bei der möglichen Analyse von Proben auf Einzelzell-Niveau, da eine solche Technologie zum heutigen

Stand der PCR-Technik noch nicht verfügbar ist. Zusätzlich ist auch für alle Durchfluss-Verfahren die Integration einer Realtime-Detektion notwendig, um die Analysezeit zu verkürzen und quantitative Aussagen zu ermöglichen.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Entwicklung und Etablierung von Mikrochip-Thermocyclern für die Miniaturisierung der Polymerase Kettenreaktion. Zielsetzung war es dabei, zwei verschiedene Strategien, die stationäre Chip-PCR und die Durchfluss-PCR, auf ihre Funktionalität hin zu testen, ihren Einsatzbereich zu ermitteln sowie Schlussfolgerungen für mögliche Weiterentwicklungen zu ziehen und die Ergebnisse den konventionellen Tischthermocycler-Systemen gegenüberzustellen.

Die Schwerpunkte lagen neben der Entwicklung der Chipthermocycler auf der Realisierung PCR-kompatibler Oberflächenbeschichtungen und deren Charakterisierung, der Anpassung und Umsetzung von PCR-Systemen aus der medizinischen Diagnostik, sowie die Anpassung und Optimierung der Protokolle für die einzelnen Chipsysteme.

Die Ergebnisse der stationären PCR-Chips zeigten, dass die Technologie für einen Produktlängenbereich von ca. 100 bis 1000 Basenpaaren geeignet ist und damit vergleichbare PCR-Effizienzen zu konventionellen Tischthermocyclern erzielt werden können. Für eine schnelle und einfache Quantifizierung wurde ein Chip-basiertes Realtime-Detektionssystem entwickelt und erfolgreich getestet. Damit wurden Nachweisgrenzen von bis zu 2 Molekülen/ μl PCR-Ansatz erreicht. So steht nun ein Chip-system zur Verfügung, welches vollständig dem technischen Stand derzeitiger Realtime-Thermocycler entspricht und wesentliche Vorteile mit sich bringt. Dazu gehört vor allem eine dreifach höhere Arbeitsgeschwindigkeit bei einem tausendstel des notwendigen Leistungsbedarf eines konventionellen Tischthermocyclers. Die eingesetzten Probenvolumen lagen bei 1 bis 3 μl und senkten die damit verbundenen Kosten für einen PCR-Ansatz um ca. ein zehntel, wenn man von minimalen Probenvolumen der konventionellen Geräte von 10 μl ausgeht. Der entwickelte stationäre Chipthermocycler ist vor allem für die Analyse geringer Probendurchsätze von maximal 4 parallel analysierbaren Proben ausgelegt. Die durchgeführten Untersuchungen mit dem stationäre Chipsystemen zeigten, dass diese für die Durchführung der Polymerasen Kettenreaktion im Hinblick auf die schnelle medizinische Diagnostik geeignet sind.

Die Grundlage für die Realisierung von PCR-Reaktionen mit einem hohen Probendurchsatz, bilden die entwickelten Durchfluss-PCR-Module, mit denen theoretisch eine unbegrenzte Menge an Proben kontinuierlich analysiert werden kann. Es wur-

den zwei Durchfluss-Chipsysteme entwickelt, der Glas-Silizium-Chipthermocycler mit 25 PCR-Zyklen und der Glas-Glas-Chipthermocycler mit 35 PCR-Zyklen. Für die Etablierung von PCR-Protokollen zum Nachweis von Humaner Papillomavirus-DNA wurde der Glas-Silizium-Chipthermocycler herangezogen. Diese Experimente schafften die Grundlagen für eine zielgerichtete, anwendungsspezifische Weiterentwicklung der Durchfluss-Chipthermocycler. Mit diesem System wurden in Abhängigkeit von der vorliegenden Größe des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts lediglich Nachweisgrenzen im Bereich von 1.700 bis 17.000 Molekülen/ μ l Reaktionsansatz erreicht. Daher wurde der Glas-Glas-Durchflusship entwickelt, welcher neben der Erhöhung der PCR-Zyklenzahl, auch die Durchführung von komplexen RT-PCR-Reaktionen ermöglichte. Mit dieser neue Entwicklungsstufe der Durchfluss-Chipthermocycler wurde die Nachweisgrenze auf 170 Moleküle/ μ l reduziert. Damit wurde unter den verwendeten PCR-Bedingungen ein vergleichbares Niveau zum Tischthermocycler erreicht. Zusätzlich konnte durch die Erzeugung eines segmentierten Probenflusses auf dem Chip ein gekapseltes Probenvolumen von 100 nl, eingebettet in Mineralöl als Trägermedium, erzielt werden. In diesem Flussregime konnten sowohl PCR als auch RT-PCR-Reaktionen durchgeführt werden, was zu einer Verbesserung der PCR-Ergebnisse im Vergleich zum kontinuierlichen Flussbetrieb führte.

Die Kombination von RT-PCR und segmentiertem Probenfluss in Mikrochip-Thermocyclern bildet die Grundlage für zukünftigen Arbeiten auf dem Gebiet der Zellbasierten *in-situ*-RT-PCR.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse stellen eine Grundlage dafür, dass die erfolgreiche Entwicklung von Mikrochip-Thermocyclern am IPHT Jena weiter voranschreiten wird und auch spezielle Anwendungsbereiche, wie beispielsweise die medizinische Diagnostik bearbeitet werden können.

6 Ausblick

Die auf dem Bereich der stationären PCR-Chiptechnologie vorgestellten Ergebnisse und verwendeten Chipsysteme haben bereits einen Entwicklungsstand erreicht, der eine zeitnahe Umsetzung der Erkenntnisse in ein marktfähiges Gerätekonzept möglich macht. Während der Erstellung dieser Arbeit wurde bereits ein Industrieunterstütztes Forschungsprojekt bearbeitet und erfolgreich beendet. Derzeit werden bereits in Absprache mit einem weiteren Industriepartner Konzepte erstellt, wie eine Geräterealisierung für die schnelle Vor-Ort-Analytik vorstellbar ist. Neben der technologischen Umsetzung steht dabei auch die Entwicklung von biochemischen Kit-Systemen im Vordergrund, die an die speziellen Anforderungen der Chiptechnologie angepasst werden und damit die Arbeitsabläufe stark vereinfachen.

Die Entwicklung von Durchfluss-PCR-Systemen wird zukünftig in den Bereich der medizinischen Diagnostik in Hinblick auf die *in-situ*-RT-PCR weitergeführt werden. Eine große Herausforderung stellt die Überführung der Protokolle auf Zell-basierte Proben dar. Die Möglichkeit einer Analytik auf Einzel-Zell-Niveau mit einer sicheren und zeitnahen Aussage über das PCR-Ergebnis bietet ein weites Anwendungsfeld dieser Methode insbesondere für die Krebsdiagnostik. Durch die integrierten Funktionselemente zur Erzeugung segmentierter Probenströme, wie sie in dem vorgestellten Glas-Glas-Chipsystem verwirklicht wurden, ist es möglich, Zellen in einzelne Kompartimente zu transferieren und nacheinander zu analysieren. Derzeitig sind keine Geräte verfügbar, welche eine große Anzahl an Zellen (10^4 bis 10^6) mit Hilfe der PCR-Technik auf Einzel-Zell-Niveau analysieren können.

7 Literatur

- [1] Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N., *Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sick cell anemia*. *Science*, **1985**. 230: p. 1350-1354.
- [2] Müller, H.-J., *Polymerase Kettenreaktion (PCR)* **2001**: Spektrum Akademischer Verlag. 134.
- [3] Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science*, **1988**. 239(4839): p. 487-491.
- [4] Kricka, L.J. and Wilding, P., *Microchip PCR*. *Anal Bioanal Chem*, **2003**. 377(5): p. 820-825.
- [5] Lee, D.S., Park, S.H., Yang, H., Chung, K.H., Yoon, T.H., Kim, S.J., Kim, K., and Kim, Y.T., *Bulk-micromachined submicroliter-volume PCR chip with very rapid thermal response and low power consumption*. *Lab Chip*, **2004**. 4(4): p. 401-407.
- [6] Giordano, B.C., Ferrance, J., Swedberg, S., Huhmer, A.F.R., and Landers, J.P., *Polymerase Chain Reaction in Polymeric Microchips: DNA Amplification in Less Than 240 Seconds*. *Analytical Biochemistry*, **2001**. 291(1): p. 124-132.
- [7] Yu, X., Zhang, D., Li, T., Hao, L., and Li, X., *3-D microarrays biochip for DNA amplification in polydimethylsiloxane (PDMS) elastomer*. *Sensors and Actuators A: Physical*, **2003**. 108(1-3): p. 103-107.
- [8] Chou, C.F., Changrani, R., Roberts, P., Sadler, D., Burdon, J., Zenhausern, F., Lin, S., Mulholland, A., Swami, N., and Terbrueggen, R., *A miniaturized cyclic PCR device - modeling and experiments*. *Microelectronic Engineering*, **2002**. 61-62: p. 921-925.
- [9] Wilding, P., Shoffner, M., and Kricka, L., *PCR in a silicon microstructure*. *Clin Chem*, **1994**. 40(9): p. 1815-1818.
- [10] Pal, D. and Venkataraman, V., *A portable battery-operated chip thermocycler based on induction heating*. *Sensors and Actuators A: Physical*, **2002**. 102(1-2): p. 151-156.
- [11] Manz, A., Graber, N., and Widmer, H.M., *Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **1990**. 1(1-6): p. 244-248.
- [12] Lee, S.J. and Lee, S.Y., *Micro total analysis system (micro-TAS) in biotechnology*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2004**. 64(3): p. 289-299.
- [13] Vilckner, T., Janasek, D., and Manz, A., *Micro total analysis systems. Recent developments*. *Anal Chem*, **2004**. 76(12): p. 3373-3385.
- [14] Kang, S.H., Shortreed, M.R., and Yeung, E.S., *Real-time dynamics of single-DNA molecules undergoing adsorption and desorption at liquid-solid interfaces*. *Anal Chem*, **2001**. 73(6): p. 1091-1099.
- [15] Shoffner, M., Cheng, J., Hvichia, G., Kricka, L., and Wilding, P., *Chip PCR. I. Surface passivation of microfabricated silicon-glass chips for PCR*. *Nucl. Acids Res.*, **1996**. 24(2): p. 375-379.
- [16] Erill, I., Campoy, S., Erill, N., Barbe, J., and Aguilo, J., *Biochemical analysis and optimization of inhibition and adsorption phenomena in glass-silicon PCR-chips*. *Sensors and Actuators B*, **2003**. 96: p. 685-692.
- [17] Munro, N.J., Huhmer, A.F., and Landers, J.P., *Robust polymeric microchannel coatings for microchip-based analysis of neat PCR products*. *Anal Chem*, **2001**. 73(8): p. 1784-1794.
- [18] Panaro, N.J., Lou, X.J., Fortina, P., Kricka, L.J., and Wilding, P., *Surface Effects on PCR Reactions in Multichip Microfluidic Platforms*. *Biomedical Microdevices*, **2004**. 6(1): p. 75-80.
- [19] Nagai, H., Murakami, Y., Morita, Y., Yokoyama, K., and Tamiya, E., *Development of a microchamber array for picoliter PCR*. *Anal Chem*, **2001**. 73(5): p. 1043-1047.
- [20] Northrup, M.A., Ching, M.T., White, R.M., and Watson, R.T. *DNA amplification with a microfabricated reaction chamber*. in *Transducer '93 -The 7th International Conference on Solid-State Sensors and Actuators*. **1993**. Yokohama, Japan.

- [21] Northrup, M.A., Benett, B., Hadley, D., Landre, P., Lehew, S., Richards, J., and Stratton, P., *A miniature analytical instrument for nucleic acids based on micromachined silicon reaction chambers*. *Anal Chem*, **1998**. 70(5): p. 918-922.
- [22] Ibrahim, M.S., Lofts, R.S., Jahrling, P.B., Henchal, E.A., Weedn, V.W., Northrup, M.A., and Belgrader, P., *Real-time microchip PCR for detecting single-base differences in viral and human DNA*. *Anal Chem*, **1998**. 70(9): p. 2013-2017.
- [23] Poser, S., Schulz, T., Dillner, U., Baier, V., and Köhler, J.M. *Chip elements for fast thermocycling*. in *Eurosensors X - The 10th European Conference on Solid-State Transducers*. **1996**. Leuven, Belgium.
- [24] Cheng, J., Shoffner, M., Hvichia, G., Kricka, L., and Wilding, P., *Chip PCR. II. Investigation of different PCR amplification systems in microfabricated silicon-glass chips*. *Nucl. Acids Res.*, **1996**. 24(2): p. 380-385.
- [25] Taylor, T., Winn-Deen, E., Picozza, E., Woudenberg, T., and Albin, M., *Optimization of the performance of the polymerase chain reaction in silicon-based microstructures*. *Nucl. Acids Res.*, **1997**. 25(15): p. 3164-3168.
- [26] Daniel, J.H., Iqbal, S., Millington, R.B., Moore, D.F., Lowe, C.R., Leslie, D.L., Lee, M.A., and Pearce, M.J., *Silicon microchambers for DNA amplification*. *Sensors and Actuators A: Physical*, **1998**. 71(1-2): p. 81-88.
- [27] Poser, S., Schulz, T., Dillner, U., Baier, V., Köhler, J.M., Schimkat, D., Mayer, G., and Siebert, A., *Chip elements for fast thermocycling*. *Sensors and Actuators A*, **1997**. 62(1-3): p. 672-675.
- [28] Lao, A.I.K., Lee, T.M.H., Carles, M.C., and Hsing, I.-M. *Thermal management and surface passivation of a miniaturized PCR device for traditional chinese medicine*. in *Micro Total Analysis Systems 2000*. **2000**. Enschede, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher.
- [29] Lin, Y.-C., Yang, C.-C., and Huang, M.-Y., *Simulation and experimental validation of micro polymerase chain reaction chips*. *Sensors and Actuators B*, **2000**. 71(1-2): p. 127-133.
- [30] Lin, Y.-C., Huang, M.-Y., Young, K.-C., Chang, T.-T., and Wu, C.-Y., *A rapid micro-polymerase chain reaction system for hepatitis C virus amplification*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2000**. 71(1-2): p. 2-8.
- [31] Yoon, D.S., Lee, Y.-S., Lee, Y., Cho, H.J., Sung, S.W., Oh, K.W., Cha, J., and Lim, G., *Precise temperature control and rapid thermal cycling in a micromachined DNA polymerase chain reaction chip*. *J. Micromech. Microeng.*, **2002**. 12(6): p. 813-823.
- [32] Sung, S.W., Yoon, D.S., Lee, Y., and Lim, G., *Modeling and Control of a Microthermal Cycler for DNA Polymerase Chain Reaction*. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2003**. 42(24): p. 6104-6111.
- [33] Zhao, Z., Cui, Z., Cui, D., and Xia, S., *Monolithically integrated PCR biochip for DNA amplification*. *Sensors and Actuators A: Physical*, **2003**. 108(1-3): p. 162-167.
- [34] Erill, I., Villa, R., Goudignon, P., Fonseca, L., and Plaza, J.A., *Silicon microsystem passivation for high-voltage applications in DNA chips*. *Microelectronics Reliability*, **2000**. 40(3-4): p. 787-789.
- [35] Erill, I., Campoy, S., Rus, J., Fonseca, L., Ivorra, A., Navarro, Z., Plaza, J.A., Aguilo, J., and Barbe, J., *Development of a CMOS-compatible PCR chip: comparison of design and system strategies*. *J. Micromech. Microeng.*, **2004**. 14(11): p. 1558-1568.
- [36] Gulliksen, A., Solli, L., Karlsen, F., Rogne, H., Hovig, E., Nordstrøm, T., and Sirevåg, R., *Real-Time Nucleic Acid Sequence-Based Amplification in Nanoliter Volumes*. *Analytical Chemistry*, **2004**. 76(1): p. 9-14.
- [37] Guttenberg, Z., Muller, H., Habermuller, H., Geisbauer, A., Pipper, J., Felbel, J., Kielpinski, M., Scriba, J., and Wixforth, A., *Planar chip device for PCR and hybridization with surface acoustic wave pump*. *Lab Chip*, **2005**. 5(3): p. 308-317.
- [38] Kopp, M.U., DeMello, A.J., and Manz, A., *Chemical amplification: Continuous-flow PCR on a chip*. *Science*, **1998**. 280(5366): p. 1046-1048.
- [39] Köhler, J.M., Dillner, U., Mokansky, A., Poser, S., and Schulz, T. *Micro channel reactors for fast thermocycling*. in *2nd International Conference on Microreaction Technology*. **1998**. New Orleans, LA, USA: Springer.

- [40] Schneegaß, I., Bräutigam, R., and Köhler, M., *Miniaturized flow-through PCR with different template types in a silicon chip thermocycler*. Lab on a Chip, **2001**. 1(1): p. 42-49.
- [41] Schneegaß, I. and Köhler, J.M., *Flow-through PCR in chip thermocyclers*. Reviews in Molecular Biotechnology, **2001**. 82(2): p. 101-121.
- [42] Kricka, L.J., Fortina, P., Panaro, N.J., Wilding, P., Alonso-Amigo, G., and Becker, H., *Fabrication of plastic microchips by hot embossing*. Lab on a Chip, **2002**. 2(1): p. 1-4.
- [43] Belgrader, P., Elkin, C.J., Brown, S.B., Nasarabadi, S.N., Langlois, R.G., Milanovich, F.P., Colston, B.W., Jr., and Marshall, G.D., *A reusable flow-through polymerase chain reaction instrument for the continuous monitoring of infectious biological agents*. Anal Chem, **2003**. 75(14): p. 3446-3450.
- [44] Curcio, M. and Roeraade, J., *Continuous segmented-flow polymerase chain reaction for high-throughput miniaturized DNA amplification*. Anal Chem, **2003**. 75(1): p. 1-7.
- [45] Shih, C.-Y., Chen, Y., and Tai, Y.-C., *Parylene-strengthened thermal isolation technology for microfluidic system-on-chip applications*. Sensors and Actuators A: Physical, **2006**. 126(1): p. 270-276.
- [46] Obeid, P.J. and Christopoulos, T.K., *Continuous-flow DNA and RNA amplification chip combined with laser-induced fluorescence detection*. Analytica Chimica Acta, **2003**. 494(1-2): p. 1-9.
- [47] Obeid, P.J., Christopoulos, T.K., Crabtree, H.J., and Backhouse, C.J., *Microfabricated device for DNA and RNA amplification by continuous-flow polymerase chain reaction and reverse transcription-polymerase chain reaction with cycle number selection*. Anal Chem, **2003**. 75(2): p. 288-295.
- [48] Felbel, J., Sondermann, A., Kielpinski, M., Urban, M., Henkel, T., Häfner, N., Dürst, M., Weber, J., and Fritzsche, W. *Single-cell-diagnostics with in-situ RT-PCR in flow-through micro reactors: thermal and fluidic concepts*. in *BioPerspectives 2005*. **2005**. Wiesbaden, Germany.
- [49] Auroux, P.-A., Day, P.J.R., Niggli, F., and Manz, A. *PCR microvolume device for detection of nucleic acids*. in *The nanotechnology conference and trade show*. **2003**. San Francisco.
- [50] Bu, M., Melvin, T., Ensell, G., Wilkinson, J.S., and Evans, A.G.R., *Design and theoretical evaluation of a novel microfluidic device to be used for PCR*. J. Micromech. Microeng., **2003**. 13(4): p. 125-130.
- [51] Munchow, G., Dadic, D., Doffing, F., Hardt, S., and Drese, K.-S., *Automated chip-based device for simple and fast nucleic acid amplification*. Expert Review of Molecular Diagnostics, **2005**. 5(4): p. 613-620.
- [52] Mullis, K.B., Ferre, F., and Gibbs, R.A., *The polymerase chain reaction*. **1994**, Boston: Birkhäuser.
- [53] Rappolee, D.A., Mark, D., Banda, M.J., and Werb, Z., *Wound macrophages express TGF- α and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping*. Science, **1988**. 241(4866): p. 708-712.
- [54] Byrne, B.C., Li, J.J., Sninsky, J., and Poiesz, B.J., *Detection of HIV-1 RNA sequences by in vitro DNA amplification*. Nucleic Acids Res, **1988**. 16(9): p. 4165.
- [55] Todd, J.A., Bell, J.I., and McDevitt, H.O., *HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus*. Nature, **1987**. 329(6140): p. 599-604.
- [56] Finlay, C.A., Hinds, P.W., and Levine, A.J., *The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation*. Cell, **1989**. 57(7): p. 1083-1093.
- [57] Ullrich, S.J., Anderson, C.W., Mercer, W.E., and Appella, E., *The p53 tumor suppressor protein, a modulator of cell proliferation*. J Biol Chem, **1992**. 267(22): p. 15259-15262.
- [58] Shay, J.W., Werbin, H., Funk, W.D., and Wright, W.E., *Cellular and molecular advances in elucidating p53 function*. Mutat Res, **1992**. 277(2): p. 163-171.
- [59] Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, **1992**. 358(6381): p. 15-16.

- [60] Fontanini, G., Bigini, D., Vignati, S., Macchiarini, P., Pepe, S., Angeletti, C.A., Pingitore, R., and Squartini, F., *p53 expression in non small cell lung cancer: clinical and biological correlations*. *Anticancer Res*, **1993**. 13(3): p. 737-742.
- [61] Mazars, R., Spinardi, L., BenCheikh, M., Simony-Lafontaine, J., Jeanteur, P., and Theillet, C., *p53 mutations occur in aggressive breast cancer*. *Cancer Res*, **1992**. 52(14): p. 3918-3923.
- [62] Gannon, J.V., Greaves, R., Iggo, R., and Lane, D.P., *Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form*. *Embo J*, **1990**. 9(5): p. 1595-1602.
- [63] Lane, D.P. and Benchimol, S., *p53: oncogene or anti-oncogene?* *Genes Dev*, **1990**. 4(1): p. 1-8.
- [64] Favre, M., Orth, G., Croissant, O., and Yaniv, M., *Human papillomavirus DNA: physical map*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1975**. 72(12): p. 4810-4814.
- [65] zur Hausen, H., *Papillomavirus infections--a major cause of human cancers*. *Biochim Biophys Acta*, **1996**. 1288(2): p. F55-78.
- [66] Jacobs, M.V., Husman, A.M.d.R., Brule, A.J.C.v.d., Snijders, P.J.F., Meijer, C.J.L.M., and Walboomers, J.M.M., *Group-Specific Differentiation between High- and Low-Risk Human Papillomavirus Genotypes by General Primer-Mediated PCR and Two Cocktails of Oligonucleotide Probes*. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, **1995**. 33(4): p. 901-905.
- [67] Wilhelm, J. and Pingoud, A., *Real-Time Polymerase Chain Reaction*. *ChemBioChem*, **2003**. 4: p. 1120-1128.
- [68] Le Pecq, J.-B. and Paoletti, C., *A new fluorometric method for RNA and DNA determination*. *Analytical Biochemistry*, **1966**. 17(1): p. 100-107.
- [69] Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R., *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences*. *Biotechnology (N Y)*, **1992**. 10(4): p. 413-417.
- [70] Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R., *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. *Biotechnology (N Y)*, **1993**. 11(9): p. 1026-1030.
- [71] Singer, V.L., Lawlor, T.E., and Yue, S., *Comparison of SYBR(R) Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test)*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **1999**. 439(1): p. 37-47.
- [72] Haugland, R.P., *Nucleic Acid Detection and Quantitation in Electrophoretic Gels and Capillaries*, in *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, J. Gregory, Editor. **2002**, Molecular Probes. p. 1-965.
- [73] Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., and Deetz, K., *Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization*. *PCR Methods Appl*, **1995**. 4(6): p. 357-362.
- [74] Tyagi, S. and Kramer, F.R., *Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization*. *Nat Biotechnol*, **1996**. 14(3): p. 303-308.
- [75] Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S.P., Brown, T., and Little, S., *Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence*. *Nat Biotechnol*, **1999**. 17(8): p. 804-807.
- [76] Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., and Gelfand, D.H., *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1991**. 88(16): p. 7276-7280.
- [77] Lunge, V.R., Miller, B.J., Livak, K.J., and Batt, C.A., *Factors affecting the performance of 5' nuclease PCR assays for *Listeria monocytogenes* detection*. *J Microbiol Methods*, **2002**. 51(3): p. 361-368.
- [78] Felbel, J., Reichert, A., Kielpinski, M., Urban, M., Henkel, T., Häfner, N., Dürst, M., and Weber, J. *In-situ-RT-PCR in micro flow-through chip systems for medical diagnostics*. in *Statusseminar Chiptechnologie*. **2006**. Frankfurt a.M., Germany.

- [79] Felbel, J., Bieber, I., Pipper, J., and Köhler, J.M., *Investigations on the compatibility of chemically oxidized silicon (SiO_x)-surfaces for applications towards chip-based polymerase chain reaction*. Chemical Engineering Journal, **2004**. 101(1-3): p. 333-338.
- [80] Huang, S.-C.P., Caldwell, K.D., Lin, J.-N., Wang, H.-K., and Herron, J.N., *Site-specific immobilization of monoclonal antibodies using spacer-mediated antibody attachment*. Langmuir, **1996**. 12: p. 4292-4298.
- [81] Dörfler, H.-D., *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*. **2002**: Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- [82] Strom, G., Fredriksson, M., and Stenius, P., *Contact angles, work of adhesion, and interfacial tensions at a dissolving Hydrocarbon surface*. Journal of Colloid and Interface Science, **1987**. 119(2): p. 352-361.
- [83] Fowkes, F.M., *Attractive Forces at Interfaces*. Industrial & Engineering Chemistry Industrial & Engineering Chemistry, **1964**. 56(12): p. 40-52.
- [84] Fowkes, F.M. and Maruchi, S., *Coatings and Plastics*, **1977**. 37: p. 605.
- [85] Neumann, A.W., Good, R.J., Hope, C.J., and Sejpal, M., *An equation-of-state approach to determine surface tensions of low-energy solids from contact angles*. Journal of Colloid and Interface Science, **1974**. 49(2): p. 291-304.
- [86] Owens, D.K. and Wendt, R.C., *Estimation of the surface free energy of polymers*. Journal of Applied Polymer Science, **1969**. 13(8): p. 1741-1747.
- [87] Kaelble, D.H. and Cirlin, E.H., *Dispersion and polar contributions to surface tension of poly(methylene oxide) and Na-treated polytetrafluoroethylene*. Journal of Polymer Science Part A-2: Polymer Physics, **1971**. 9(2): p. 363-368.
- [88] Frackman, S., Kobs, G., Simpson, D., and Storts, D., *Betaine and DMSO: Enhancing Agents for PCR*. Promega Notes, **1998**. 65: p. 27.
- [89] Felbel, J., Bieber, I., and Köhler, J.M. *Chemical surface management for micro PCR in silicon chip thermocyclers*. in *SPIE*. **2002**.
- [90] <http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/p16.html>, **2006**.
- [91] http://www.qiagen.com/literatur/handbook/pcr/taqpcr/taq1199_p2de.pdf, **2006**.
- [92] Giordano, B.C., Copeland, E.R., and Landers, J.P., *Towards dynamic coating of glass microchip chambers for amplifying DNA via the polymerase chain reaction*. Electrophoresis, **2001**. 22(2): p. 334-340.
- [93] Yang, J., Liu, Y., Rauch, C.B., Stevens, R.L., Liu, R.H., Lenigk, R., and Grodzinski, P., *High sensitivity PCR assay in plastic micro reactors*. Lab on a Chip, **2002**. 2(4): p. 179-187.
- [94] Wilding, P., Kricka, L.J., Cheng, J., Hvichia, G., Shoffner, M.A., and Fortina, P., *Integrated cell isolation and polymerase chain reaction analysis using silicon microfilter chambers*. Anal Biochem, **1998**. 257(2): p. 95-100.
- [95] Cheng, J., Waters, L.C., Fortina, P., Hvichia, G., Jacobson, S.C., Ramsey, J.M., Kricka, L.J., and Wilding, P., *Degenerate oligonucleotide primed-polymerase chain reaction and capillary electrophoretic analysis of human DNA on microchip-based devices*. Anal Biochem, **1998**. 257(2): p. 101-106.
- [96] Khandurina, J., McKnight, T.E., Jacobson, S.C., Waters, L.C., Foote, R.S., and Ramsey, J.M., *Integrated system for rapid PCR-based DNA analysis in microfluidic devices*. Anal Chem, **2000**. 72(13): p. 2995-3000.
- [97] Hong, J.W., Fujii, T., Seki, M., Yamamoto, T., and Endo, I., *Integration of gene amplification and capillary gel electrophoresis on a polydimethylsiloxane-glass hybrid microchip*. Electrophoresis, **2001**. 22(2): p. 328-333.
- [98] Burns, M.A., Johnson, B.N., Brahmasandra, S.N., Handique, K., Webster, J.R., Krishnan, M., Sammarco, T.S., Man, P.M., Jones, D., Heldsinger, D., Mastrangelo, C.H., and Burke, D.T., *An integrated nanoliter DNA analysis device*. Science, **1998**. 282(5388): p. 484-487.
- [99] Sun, K., Yamaguchi, A., Ishida, Y., Matsuo, S., and Misawa, H., *A heater-integrated transparent microchannel chip for continuous-flow PCR*. Sensors and Actuators B: Chemical, **2002**. 84(2-3): p. 283-289.

-
- [100] Waters, L.C., Jacobson, S.C., Kroutchinina, N., Khandurina, J., Foote, R.S., and Ramsey, J.M., *Microchip Device for Cell Lysis, Multiplex PCR Amplification, and Electrophoretic Sizing*. *Anal. Chem.*, **1998**. 70(1): p. 158-162.
- [101] Köhler, J.M., Eickhoff, H., Rohlf, E., Ivanov, I., Poser, S., and Schultz, T., *PCR-Miniaturisierung - Chipthermocycler*. *transkript Laborwelt*, **2000**. 2: p. 5-10.
- [102] Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., and Rasmussen, R.P., *Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification*. *BioTechniques*, **1997**. 22(1): p. 130-131, 134-138.
- [103] Belgrader, P., Bennett, W., Hadley, D., Long, G., Mariella, R., Jr., Milanovich, F., Nasarabadi, S., Nelson, W., Richards, J., and Stratton, P., *Rapid pathogen detection using a microchip PCR array instrument*. *Clin Chem*, **1998**. 44(10): p. 2191-2194.
- [104] Nakano, H., Matsuda, K., Yohda, M., Nagamune, T., Endo, I., and Yamane, T., *High speed polymerase chain reaction in constant flow*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **1994**. 58(2): p. 349-352.

8 Anhang

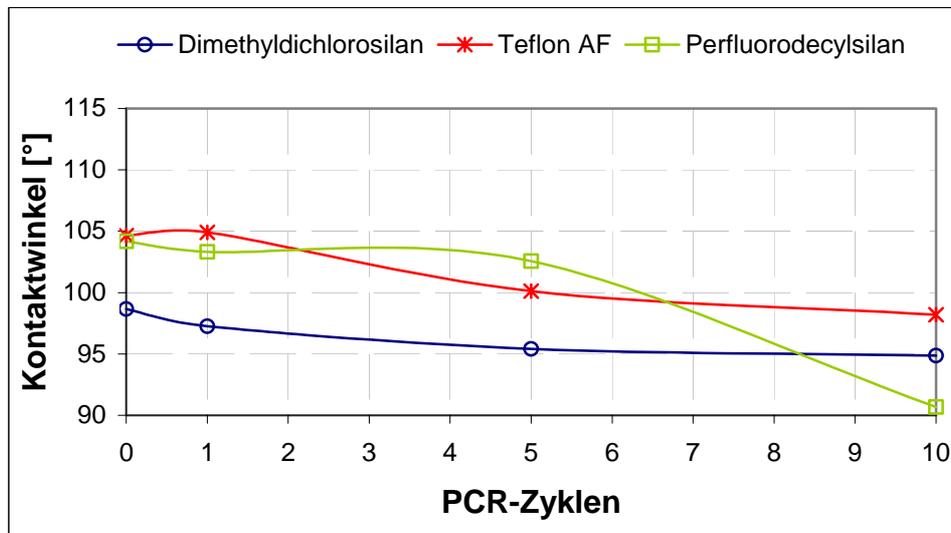


Diagramm 11 Stabilität der Kontaktwinkel mit PCR-Lösung über 10 PCR-Läufe in Abhängigkeit von der Oberflächenbeschichtung

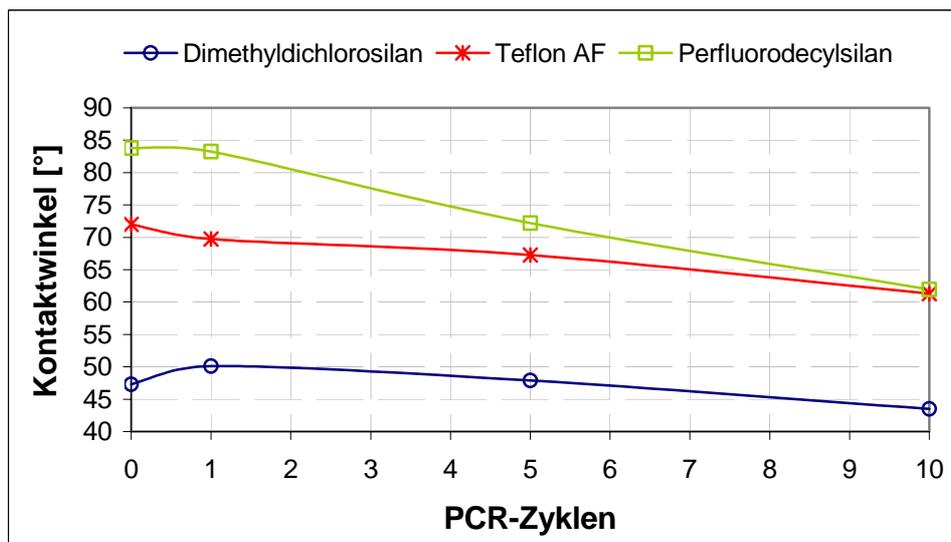


Diagramm 12 Stabilität der Kontaktwinkel mit Mineralöl über 10 PCR-Läufe in Abhängigkeit von der Oberflächenbeschichtung

Datensammlung der Grauwertanalyse:

Für alle aufgenommenen Elektrophoresegele wurde mittels der Software Image J eine Auswertung der Bandenintensität durch eine Grauwertanalyse durchgeführt. Für die korrigierten Intensitäten wurde der Wert für den Hintergrund des jeweiligen Gels von den Intensitäten der Produktbanden abgezogen. Der Hintergrund entspricht bei Gelen mit einer Negativkontrolle, dieser Gelbahn. Bei Gelen ohne entsprechende Kontrolle, einem Bereich in der Nähe der Produktbanden mit gleicher Fläche. Die entsprechen numerischen Daten sind in den folgenden Tabellen aufgeführt:

Tabelle 38 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 22.

linkes Gel - 1. PCR-Lauf

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
Hintergrund	0,077	42	62	4,0	0,0
1	0,077	64	255	14,5	10,4
2	0,077	68	255	15,4	11,3
3	0,077	68	255	15,3	11,3
4	0,077	62	255	13,2	9,2

mittleres Gel - 5. PCR-Lauf

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
Hintergrund	0,096	54	72	6,1	0,0
1	0,096	70	255	17,5	11,4
2	0,096	74	255	16,4	10,3
3	0,096	74	255	17,1	11,0
4	0,096	66	255	14,9	8,9

rechtes Gel - 10. PCR-Lauf

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
Hintergrund	0,082	36	48	3,5	0,0
1	0,082	46	255	14,3	10,8
2	0,082	50	255	12,8	9,4
3	0,082	36	255	12,7	9,2
4	0,082	46	255	12,2	8,8

Tabelle 39 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 26.

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,123	76	94	10,2	0,0
2	0,123	90	255	21,8	11,6
3	0,123	94	255	22,1	11,9
4	0,123	88	114	11,6	1,3
5	0,123	78	96	10,6	0,4

Tabelle 40 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 27.

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,06	66	80	4,3	0,0
2	0,06	76	255	11,4	7,1
3	0,06	72	255	11,0	6,7
4	0,06	72	255	12,1	7,8
5	0,06	66	255	11,6	7,3

Tabelle 41 Berechnete Intensitäten der Produktbäden zu Abbildung 28.

linkes Gel = Tischthermocycler

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
Hintergrund	0,084	58	70	5,5	0,0
1	0,084	64	255	14,6	9,1
2	0,084	64	255	12,3	6,8
3	0,084	66	255	14,7	9,3
4	0,084	62	255	13,5	8,0

rechtes Gel = PCR-Chip

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
Hintergrund	0,091	84	132	9,6	0,0
1	0,091	124	255	21,2	11,5
2	0,091	116	255	18,1	8,4
3	0,091	124	255	21,3	11,7
4	0,091	108	164	12,9	3,2

Tabelle 42 Berechnete Intensitäten der Produktbänden zu Abbildung 30.

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
Hintergrund	0,065	38	50	2,8	0,0
1	0,065	34	255	11,6	8,9
2	0,065	32	255	9,9	7,1
3	0,065	36	255	12,1	9,4
4	0,065	34	255	10,2	7,4
5	0,065	36	255	9,1	6,3
6	0,065	38	255	12,1	9,3

Tabelle 43 Berechnete Intensitäten der Produktbänden zu Abbildung 29.

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,058	82	255	11,3	7,0
2	0,058	72	82	4,4	0,0
3	0,058	74	140	6,3	1,9
4	0,058	92	255	11,6	7,2
5	0,058	86	255	12,3	8,0

Tabelle 44 Berechnete Intensitäten der Produktbänden zu Abbildung 31.

linkes Gel - Tischthermocycler

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,093	66	255	16,8	11,5
2	0,093	74	255	16,5	11,2
3	0,093	70	255	15,1	9,8
4	0,093	64	188	10,8	5,5
5	0,093	50	68	5,3	0,0

mittleres Gel - in-situ-Adapter

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,089	78	255	17,1	10,4
2	0,089	76	255	15,5	8,9
3	0,089	76	196	10,9	4,3
4	0,089	72	132	8,7	2,0
5	0,089	70	84	6,7	0,0

rechtes Gel - PCR-Chip

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,112	100	255	22,6	11,9
2	0,112	108	255	22,7	12,0
3	0,112	104	255	17,8	7,1
4	0,112	96	202	15,7	5,0
5	0,112	88	102	10,7	0,0

Tabelle 45 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 32.

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,084	188	255	19,7	3,7
2	0,084	174	202	15,6	0,0
3	0,084	180	202	16,0	0,0
4	0,084	194	255	20,2	4,3
5	0,084	190	255	20,1	4,1

Tabelle 46 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 33.

linkes Gel = Realtime-Thermocycler

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,013	86	255	2,3	1,3
2	0,013	84	255	2,4	1,4
3	0,013	78	255	2,2	1,2
4	0,013	74	212	1,6	0,6
5	0,013	72	84	1,0	0,0

Rechtes Gel = PCR-Chip

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,014	38	255	2,3	1,9
2	0,014	32	255	1,7	1,3
3	0,014	26	154	1,0	0,6
4	0,014	26	92	0,6	0,2
5	0,014	22	40	0,4	0,0

Tabelle 47 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 34.

linkes Gel = Realtime-Thermocycler

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,017	84	255	3,7	2,5
2	0,017	84	255	3,6	2,4
3	0,017	72	255	3,0	1,8
4	0,017	66	128	1,7	0,5
5	0,017	62	74	1,2	0,0

Rechtes Gel = PCR-Chip

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,018	82	255	3,8	2,6
2	0,018	88	255	3,9	2,7
3	0,018	72	255	3,3	2,1
4	0,018	66	108	1,5	0,3
5	0,018	60	86	1,2	0,0

Tabelle 48 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 37.

Linkes Gel = Glas-Silizium

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,086	40	52	3,9	0,0
2	0,086	54	255	15,1	11,2
3	0,086	46	255	13,2	9,3
4	0,086	40	54	3,9	0,0
5	0,086	60	255	18,8	14,9
6	0,086	56	255	15,1	11,1

Mittleres Gel = Glas-Glas

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,129	62	80	9,0	0,0
2	0,129	70	255	24,2	14,4
3	0,129	72	86	10,1	0,3
4	0,129	72	94	10,4	0,6
5	0,129	88	255	26,6	16,8
6	0,129	72	255	15,8	6,0

Rechtes Gel = Polycarbonat-Polycarbonat

1	0,101	52	72	5,7	0,0
2	0,101	62	255	15,5	9,8
3	0,101	56	106	6,8	1,1
4	0,101	56	72	6,3	0,0
5	0,101	72	255	19,1	12,8
6	0,101	64	255	14,9	8,6

Tabelle 49 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 38.

Linkes Gel = Glas-Silizium

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,086	40	52	3,9	0,0
2	0,086	54	255	15,1	11,2
3	0,086	46	255	13,2	9,3
4	0,086	40	54	3,9	0,0
5	0,086	60	255	18,8	14,9
6	0,086	56	255	15,1	11,1

Mittleres Gel = Glas-Glas

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,154	64	80	11,1	0,0
2	0,154	72	255	28,2	16,6
3	0,154	70	84	11,8	0,2
4	0,154	70	104	12,1	0,5
5	0,154	76	255	27,2	15,6
6	0,154	66	164	14,2	2,6

Rechtes Gel = Polycarbonat-Polycarbonat

1	0,135	92	104	13,2	0,0
2	0,135	88	255	27,5	14,3
3	0,135	80	106	13,1	-0,1
4	0,135	88	108	13,1	-0,1
5	0,135	102	255	27,6	14,4
6	0,135	96	255	23,5	10,3

Tabelle 50 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 39.

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,084	100	122	9,1	0,0
2	0,084	114	255	18,5	9,4
3	0,084	110	255	15,8	6,7
4	0,084	106	255	15,8	6,7
5	0,084	96	255	13,3	4,2

Tabelle 51 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 41.

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,143	52	70	8,4	0,0
2	0,143	70	255	26,3	17,9
3	0,143	68	255	25,9	17,5
4	0,143	60	255	16,6	8,2
5	0,143	58	255	18,1	9,6

Tabelle 52 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 42.

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,071	82	96	6,3	0,0
2	0,071	92	255	14,1	7,8
3	0,071	86	255	13,9	7,6
4	0,071	80	255	13,5	7,1
5	0,071	78	255	12,4	6,1
6	0,071	72	255	10,7	4,3
7	0,071	68	254	8,5	2,2
8	0,071	64	170	6,9	0,6
9	0,071	60	170	6,8	0,5

Tabelle 53 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 43.

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,068	156	176	11,4	0,0
2	0,068	184	255	16,3	4,9
3	0,068	180	255	15,0	3,6
4	0,068	176	255	13,4	1,9
5	0,068	170	242	12,7	1,3
6	0,068	154	180	11,3	-0,12

Tabelle 54 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 44.

linkes Gel = kurzes Fragment 25 Zyklen

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,1	82	255	17,5	10,3
2	0,1	78	255	14,9	7,7
3	0,1	70	136	9,2	2,0
4	0,1	72	84	7,8	0,7
5	0,1	62	80	7,1	0,0

rechtes Gel = langes Fragment 25 Zyklen

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,082	92	255	15,1	8,9
2	0,082	80	255	13,7	7,5
3	0,082	74	255	8,3	2,1
4	0,082	80	90	7,0	0,8
5	0,082	70	88	6,2	0,0

Tabelle 55 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 45.

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,021	94	255	4,4	3,0
2	0,021	74	255	3,3	1,9
3	0,021	72	255	2,4	1,0
4	0,021	66	140	1,6	0,2
5	0,021	64	88	1,4	0,0
6	0,021	60	72	1,4	0,0

Tabelle 56 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 46.

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,017	98	255	3,1	1,7
2	0,017	100	255	3,2	1,8
3	0,017	94	206	2,1	0,7
4	0,017	88	106	1,6	0,2
5	0,017	84	122	1,6	0,2
6	0,017	76	94	1,4	0,0

Tabelle 57 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 47.

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,014	26	40	0,4	0,0
2	0,014	26	40	0,5	0,0
3	0,014	28	48	0,5	0,1
4	0,014	34	70	0,6	0,2
5	0,014	48	255	2,4	2,0
6	0,014	38	255	2,6	2,2

Tabelle 58 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 48.

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,014	46	62	0,8	0,0
2	0,014	48	72	0,8	0,0
3	0,014	48	76	0,8	0,0
4	0,014	60	255	2,5	1,7
5	0,014	56	255	2,2	1,4
6	0,014	56	255	2,4	1,6
7	0,014	48	255	2,6	1,8

Tabelle 59 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 50.

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,096	68	86	7,2	0,0
2	0,096	90	255	21,7	14,5
3	0,096	84	255	18,8	11,6
4	0,096	70	84	7,4	0,2
5	0,096	82	255	19,0	11,8
6	0,096	66	255	17,9	10,7

Tabelle 60 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 51.

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,06	52	62	3,4	0,0
2	0,06	68	255	10,6	7,2
3	0,06	68	255	9,0	5,6
4	0,06	70	255	10,9	7,5
5	0,06	66	255	10,1	6,7
6	0,06	62	255	9,0	5,6
7	0,06	54	196	5,7	2,3
8	0,06	52	100	4,0	0,6
9	0,06	48	100	3,9	0,5

Tabelle 61 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 52.

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,075	68	80	5,5	0,0
2	0,075	78	255	16,2	10,7
3	0,075	74	106	6,5	1,0
4	0,075	68	255	14,3	8,8
5	0,075	66	255	14,0	8,5
6	0,075	60	74	5,1	-0,4

Tabelle 62 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 53.

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,027	20	40	0,8	0,0
2	0,027	30	255	4,5	3,7
3	0,027	40	255	3,4	2,6
4	0,027	50	255	4,2	3,4
5	0,027	28	46	1,0	0,0
6	0,027	42	255	3,6	2,6
7	0,027	40	255	2,5	1,5
8	0,027	38	255	2,9	1,9

Tabelle 63 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 54.

linkes Gel = kurzes Fragment 35 Zyklen

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,066	70	255	10,7	6,6
2	0,066	72	255	10,3	6,2
3	0,066	62	255	9,2	5,1
4	0,066	58	190	5,6	1,5
5	0,066	56	90	4,5	0,4
6	0,066	56	68	4,1	0,0

rechtes Gel = langes Fragment 35 Zyklen

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,047	66	255	9,6	7,1
2	0,047	56	255	7,7	5,2
3	0,047	52	255	4,9	2,4
4	0,047	50	90	2,7	0,2
5	0,047	48	62	2,5	0,0
6	0,047	46	58	2,5	0,0

Tabelle 64 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 55.

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,016	40	255	1,7	0,8
2	0,016	46	192	1,5	0,6
3	0,016	54	142	1,4	0,5
4	0,016	52	156	1,2	0,3
5	0,016	52	84	1,0	0,1
6	0,016	46	68	0,9	0,0

Tabelle 65 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 56.

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,023	32	255	3,6	2,7
2	0,023	30	255	2,4	1,5
3	0,023	28	255	2,0	1,1
4	0,023	28	156	1,2	0,3
5	0,023	26	44	0,9	0,0
6	0,023	30	48	0,9	0,0

Tabelle 66 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 57.

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,013	40	58	0,6	0,0
2	0,013	42	255	2,0	1,4
3	0,013	40	255	1,7	1,1
4	0,013	34	255	2,2	1,6
5	0,013	20	34	0,3	0,0
6	0,013	22	255	1,5	1,2
7	0,013	8	58	0,5	0,2
8	0,013	8	198	1,0	0,7

Tabelle 67 Berechnete Intensitäten der Produktbanden zu Abbildung 58.

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,02	4	22	0,3	0,0
2	0,02	28	255	3,3	3,0
3	0,02	20	244	1,9	1,6
4	0,02	24	255	2,0	1,7

Tabelle 68 Berechnete Intensitäten der Produktbänder zu Abbildung 59.

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,022	16	36	0,6	0,0
2	0,022	16	38	0,6	0,0
3	0,022	28	255	3,4	2,8
4	0,022	28	48	0,8	0,2
5	0,022	36	255	3,6	3,0
6	0,022	30	190	1,6	1,0
7	0,022	28	255	3,6	3,0
8	0,022	16	255	1,7	1,1

Tabelle 69 Berechnete Intensitäten der Produktbänder zu Abbildung 60.

Gelbahn	Fläche	min. GW	max. GW	Intensität	Intensität korr
1	0,02	10	26	0,4	0,0
2	0,02	24	255	3,0	2,6
3	0,02	20	250	1,5	1,1
4	0,02	22	255	1,7	1,3

Abkürzungen

ABI	Applied Biosystems
AFM	Rasterkraftmikroskopie (engl. <i>atomic force microscopy</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
bp	Basenpaar (engl. <i>base pair</i>)
Ct	engl. <i>cycle threshold</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
dTTP	Desoxythymintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E	Effizienz
engl.	Englisch
FC	Flusscycler
FITC	Fluorescein
FSU	Friedrich Schiller Universität Jena
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GOPS	3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan
GW	Grauwert
HCl	Salzsäure
HPLC	engl. <i>high pressure liquid chromatography</i>
HPV	Humane Papillomaviren
HPV-LR	Humane Papillomaviren- niedriger Risikotyp (engl. <i>low risk</i>)
HPV-HR	Humane Papillomaviren- hoher Risikotyp (engl. <i>high risk</i>)
HS	HotStart
I	Intensität
IPHT	Institut für Physikalische Hochtechnologie
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
KW	Kontaktwinkel
LF	Luftfeuchtigkeit
Li	Lithium
MATCI	engl. <i>miniature analytical thermal cycling instrument</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mM	Millimolar
μM	Mikromolar
μTAS	engl. <i>micro total analysis systems</i>
NaOH	Natriumhydroxid
neg.	negativ
NH ₂	Aminogruppe
NCR	engl. <i>non coding region</i>
PC	Polycarbonat
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PFS	Perfluorosilan (=> Perfluorodecylsilan)

pos.	positiv
R ²	Bestimmtheitsmaß
R _n	Reportersignal normiert
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SAW	akustische Oberflächenwellen (engl. <i>surface acoustic waves</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SE	Oberflächenenergie (engl. <i>surface energy</i>)
SFT	Oberflächenspannung (engl. <i>surface tension</i>)
SH	Schichthöhe
Si	Silizium
SSC	Salzhaltiges Natriumcitrat (engl. <i>saline sodium citrate</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TC	Tischthermocycler
TE	Tris-Hydrochlorid-EDTA

Danksagung

Für die interessante Themenstellung, das große Interesse am Fortgang dieser Arbeit, sowie die intensive Unterstützung und Zusammenarbeit danke ich vor allem meinen Betreuern Herrn Prof. Dr. Pietzsch und Frau Dr. Bieber.

Mein besonderer Dank geht an dieser Stelle an Ivonne Bieber und Anett Reichert die mich nicht nur fleißig im Labor unterstützt haben, sondern durch die zahlreichen Diskussionen, nützlichen Ratschläge und vielen Anregungen, zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben - ohne eure Unterstützung hätte ich mein Ziel bestimmt noch nicht erreicht!

Für die gute Zusammenarbeit und die vielen fachlichen Ratschläge möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Abteilungen Mikrosystemtechnologien und Photonische Chipsysteme bedanken. Insbesondere danke ich Matthias Urban und Mark Kiepinski dafür, dass sie alle noch so verrückten Entwicklungsvorschläge versucht haben mit mir gemeinsam in die Tat umzusetzen und dabei nie die Geduld verloren haben. Mein Dank gilt außerdem Dr. Thomas Henkel für die vielen anregenden Diskussionen, bei denen so einige Probleme geklärt wurden.

Für die notwendigen Arbeiten im Reinraum bei der Herstellung meiner PCR-Chips möchte ich Margitta Sossna, Denise Horn, Katrin Kandra, Horst Porwol und Andreas Ihring danken. Jens Albert gilt mein Dank für das Vereinzeln der Chips, womit ich es meist besonders eilig hatte, sowie Ralf Stöpel der mir alle Sonderwünsche in der Werkstatt erfüllt hat. Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Andrea Csaki für die Unterstützung bei den AFM-Aufnahmen und bei Franka Jahn für die mühselige Anfertigung der REM-Aufnahmen.

Jörg Weber danke ich, dass er mir jederzeit bei Problemen mit dem Detektionsaufbau ausgeholfen hat, auch wenn es selten was mit unserer gemeinsamen Projektarbeit zu tun hatte, solche Projektpartner wünscht man sich. Danke an Norman Häfner, durch dich versteh ich jetzt mehr vom HPV-Nachweis.

Ein großes Danke an alle die mir während der Erstellung und der Korrektur meiner Arbeit behilflich waren.

Die für mich wichtigste und fortwährende Unterstützung erhielt und erhalte ich von meinen Eltern, denen ich unendlich dankbar bin.

Nicht zuletzt danke ich vor allem Mario – ohne dich wäre ich das Abenteuer Promotion nie eingegangen, danke dass du an mich glaubst!

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Jana Felbel, dass ich diese Arbeit mit Ausnahme der aufgeführten Personen, Unterlagen bzw. Literaturstellen selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe.

Außerdem erkläre ich, mich mit der Arbeit zum ersten mal für die Erlangung eines Doktorgrades beworben zu haben und die Arbeit ausschließlich an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Fachbereich Biochemie/Biotechnologie einzureichen.

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Name: Felbel, geb. Bodinus

Vorname: Jana

Geburtsdatum: 24. Mai 1977

Geburtsort: Rudolstadt

Familienstand: verheiratet

1983 – 1991 POS Franz-Mehring, Rudolstadt

1991 – 1995 Staatl. Gymnasium Rudolstadt

1995 – 1996 Freiwilliges Ökologisches Jahr

1996 – 1998 Berufsausbildung zur Milchwirtschaftlichen Laborantin

1998 – 2002 Medizintechnik-Studium mit der Fachrichtung Biotechnologie,
Fachhochschule Jena,

Abschluss als Diplomingenieurin (FH)

seit 2003 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Physikalische
Hochtechnologie e.V. Jena,
Abt. Biotechnische Mikrosysteme

2004 - 2006 Doktorarbeit am Institut für Physikalische Hochtechnologie unter
Betreuung von Prof. Pietzsch (Arbeitsgruppe Aufarbeitung bio-
technischer Produkte, Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg)

seit 2006 Projektleiter am Institut für Physikalische Hochtechnologie - IPHT
(am 01.03.2007 erfolgte die Umbenennung des IPHT in Institut
für Photonische Technologien)

Datum

Unterschrift