

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.

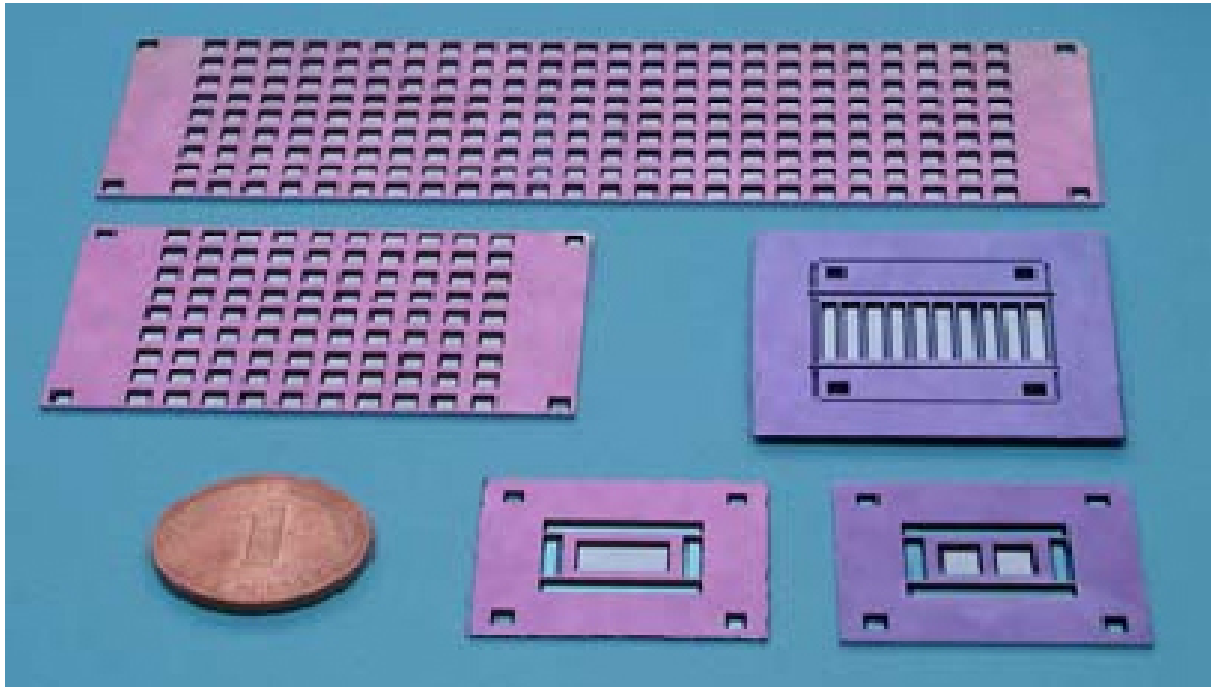


Abbildung 61 Verschiedene Layouts von Silizium-Kammer-Cyclern, welche am IPHT Jena entwickelt wurden

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.

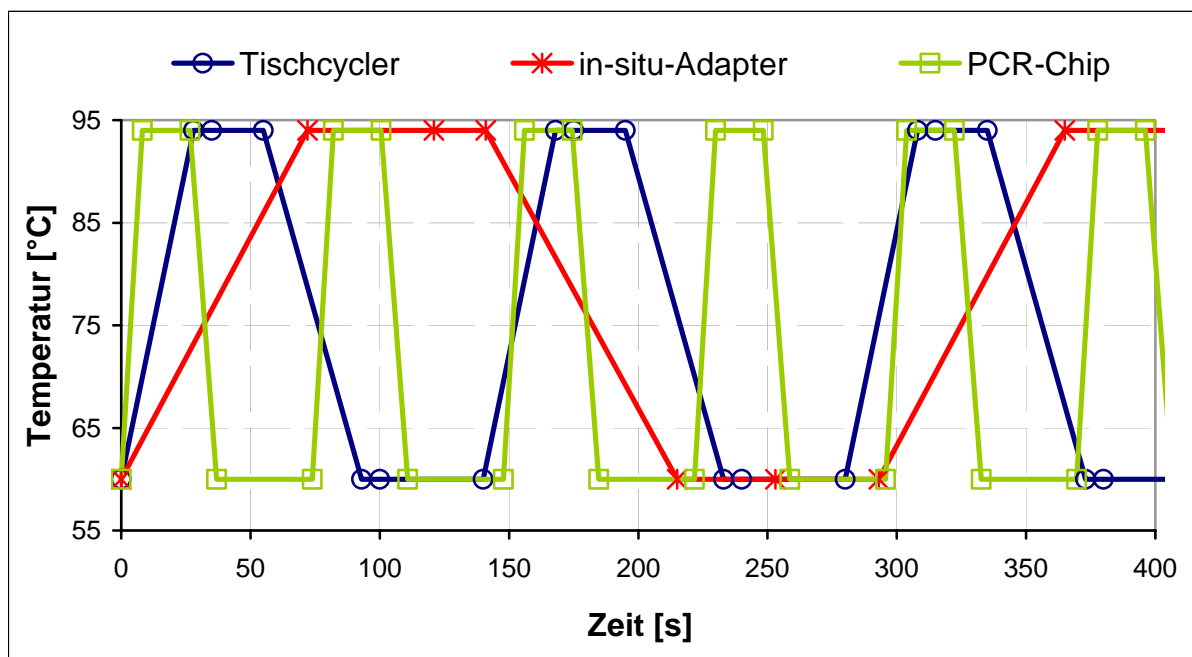


Diagramm 10 Vergleich der tatsächlichen Temperatur-Zeit-Profile von Tischthermocycler, *in-situ*-Adapter und PCR-Chip bei folgendem PCR-Protokoll: Denaturierung: 20 s bei 94°C; Annealing + Elongation: 40 s bei 60 °C

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/ μ l 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 Waschschrinen 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 Siliziumsubstrathälften 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).

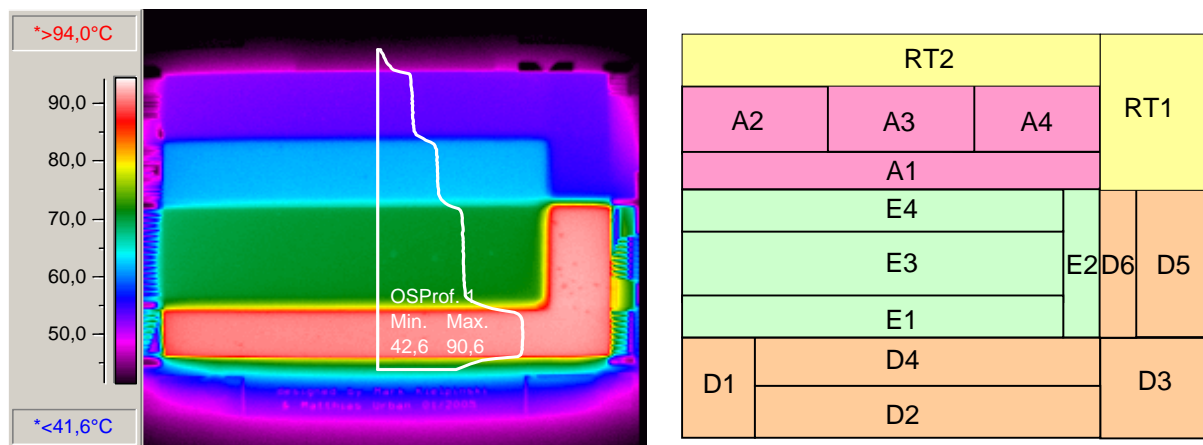


Abbildung 62 links- Thermobild eines temperierten Mikrochip-Thermocyclers für die Durchfluss-PCR mit einer Temperaturstabilität von $\pm 0,1 \text{ K}$
rechts- Verteilung der 16 Heizerstrukturen in den jeweiligen Temperaturzonen: RT = Reverse Transkription, D = Denaturierung, A = Annealing, E = Elongation

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.