

## 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/ $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  und senkten die damit verbundenen Kosten für einen PCR-Ansatz um ca. ein zehntel, wenn man von minimalen Probenvolumen der konventionellen Geräte von 10  $\mu\text{l}$  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/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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.