

# **Systeme für die Chip-basierte Nukleinsäure-Analytik mit integrierter DNA-Amplifikation und Detektion**

## **Dissertation**

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

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Ingenieurin (FH) **Sandra Julich**  
geboren am 21.11.1983 in Nordhausen

Gutachter:

1. Prof. Jürgen Popp  
(Institut für Physikalische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena)
2. Dr. Wolfgang Fritzsche  
(Institut für Photonische Technologie Jena)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 31.08.2011

*„Denn es ist zuletzt doch nur der Geist, der jede Technik lebendig macht.“*

Johann Wolfgang von Goethe

# Gliederung

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Einführung in die Thematik .....	1
1.2	Ausgewählte diagnostische Fragestellungen .....	2
1.2.1	Protein p53 .....	2
1.2.2	HBME-Zellen .....	3
1.2.3	Phytopathogen <i>Phytophthora</i> .....	5
1.3	<b>Grundlegende Aspekte der Nukleinsäure-basierten Bioanalytik und technischer Stand</b> .....	<b>7</b>
1.3.1	Probenpräparation .....	7
1.3.1.1	Nukleinsäureextraktion und -aufreinigung.....	7
1.3.1.2	Separation einzelner Zellen .....	8
1.3.2	Anreicherung von Nukleinsäuren mittels Polymerase-Kettenreaktion .....	10
1.3.3	Detektion von DNA .....	12
1.3.3.1	Elektrophoretische Detektion von DNA .....	12
1.3.3.2	Real-Time PCR .....	14
1.3.3.2	Hybridisierungsnachweis mit DNA Mikroarrays .....	17
1.4	<b>Motivation und Zielstellung</b> .....	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b> .....	<b>22</b>
2.1	<b>Materialien</b> .....	<b>22</b>
2.1.1	Chemikalien und Biochemikalien .....	22
2.1.2	Biologische Proben .....	23
2.1.2.1	Oligonukleotide .....	23
2.1.2.2	Polynukleotide .....	24
2.1.2.3	Zellen .....	25
2.1.3	Geräte .....	25
2.1.4	Sonstige Materialien .....	26
2.1.5	Software .....	26
2.2	<b>Methoden</b> .....	<b>27</b>
2.2.1	Verwendete Chip-Komponenten .....	27
2.2.1.1	Herstellung von PCR- und Mikroarray-Chips mit metallischen Strukturen	28
a)	Mikrostrukturierte Chips .....	28
b)	Chips mit Siebdruck-Strukturen .....	30

2.2.1.2	Herstellung von Silikonabformungen mit mikrofluidischen Halbkanälen	31
2.2.1.3	Oberflächenmodifikationen .....	31
2.2.1.4	Probenträger für die tropfenbasierte on-Chip PCR.....	33
2.2.1.5	Mikroarray-Präparation .....	33
2.2.2	Probenpräparation.....	35
2.2.2.1	DNA-Extraktion .....	35
2.2.2.2	Herstellung definierter Ausgangskonzentrationen an DNA .....	36
2.2.2.3	Separation von Zellen .....	37
a)	Verwendung verdünnter Zellsuspension .....	37
b)	Verwendung einer Mikromanipulation mittels Glaskapillare .....	37
c)	Separation von Zellen mittels Dielektrophorese .....	38
2.2.3	Amplifikation von Nukleinsäuren .....	38
2.2.3.1	PCR-Ansätze .....	38
2.2.3.2	PCR-Protokolle.....	39
a)	Amplifikation von DNA .....	39
b)	Zell-Lyse und reverse Transkription .....	40
2.2.4	Detektion von PCR-Produkten .....	41
2.2.4.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	41
2.2.4.2	Real-Time PCR .....	41
2.2.4.3	Hybridisierungsnachweis .....	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>On-Chip Real-Time PCR .....</b>	<b>46</b>
3.1.1	Oberflächenmodifikation der Probenträger .....	46
3.1.2	Applikation von DNA bei der PCR .....	47
3.1.2.1	Bestimmung von Nachweisgrenzen und PCR Effizienzen .....	47
a)	Produkt-unspezifische Detektion mit SYBR Green .....	49
b)	Produkt-spezifische Detektion mittels TaqMan-Sonde .....	53
3.1.2.2	Verringerung des Probenvolumens .....	54
3.1.3	Applikation von Zellen bei der PCR .....	56
3.1.3.1	<i>Phytophthora</i> -Zoosporen.....	56
a)	Einsatz von Sporen in verschiedenen Lösungsmitteln .....	56
b)	Direkte Applikation von <i>Phytophthora</i> -Sporen bei der on-Chip PCR .....	58
c)	Verringerung der Sporenanzahl im PCR-Ansatz .....	59
3.1.3.2	HBME-Zellen .....	60
3.1.4	Kopplung von Chip-basierter Dielektrophorese und PCR .....	62
3.1.4.1	Dielektrophoretische Separation von Zellen .....	63

3.1.4.2	DNA-Amplifikation auf Dielektrophorese-Chips .....	64
<b>3.2</b>	<b>Kombination von on-Chip-PCR mit DNA-Mikroarray Technologien zu einem Lab-on-a-Chip System .....</b>	<b>65</b>
3.2.1	Vorversuche zur tropfenbasierten Kombination von DNA-Amplifikation und -Hybridisierung .....	65
3.2.2	Etablierung von Nachweisprotokollen am PCR-Chip Modul .....	68
3.2.2.1	Nukleinsäureamplifikation mit dem PCR-Chip Modul .....	68
3.2.2.2	Ermittlung der Nachweisgrenze für die Amplifikation des <i>Phytophthora</i> -DNA-Abschnittes .....	69
3.2.2.3	Optimierung des Protokolls für die Amplifikation des <i>Phytophthora</i> -DNA-Abschnittes .....	70
3.2.3	Etablierung von Nachweisprotokollen am DNA-Chip-Modul .....	72
3.2.3.1	Stationäre Hybridisierung ohne aktive Bewegung der Reaktionslösung ...	72
a)	Nachweis von Protein p53 .....	73
b)	Nachweis von drei ausgewählten <i>Phytophthora</i> -Arten.....	73
3.2.3.3	Hybridisierung der Reaktionslösung im Durchfluss mit dem DNA-Chip Modul.....	74
3.2.3.3.1	Protokolloptimierung für die Präparation der Mikroarrays .....	75
3.2.3.3.2	Ermittlung der optimalen Hybridisierungstemperatur .....	76
3.2.3.3.3	Unterscheidung verschiedener <i>Phytophthora</i> -Arten .....	78
a)	DNA-Proben aus Reinkultur .....	79
b)	DNA-Proben aus Blattmaterial.....	80
3.2.3.3.4	Optimierung der Protokolldauer für den <i>Phytophthora</i> -Nachweis mit dem DNA-Chip Modul .....	81
3.2.4	Entwicklung des Komplettsystems und Anpassung der Nachweisprotokolle .....	82
3.2.4.1	Aufbau und Konstruktion des Gesamtsystems .....	83
3.2.4.2	Chip-Design .....	84
3.2.4.3	Anpassung der Temperatureinstellungen .....	85
3.2.4.4	Überprüfung der Funktionsfähigkeit .....	86
3.2.4.5	Optimierung der Protokolldauer .....	88
3.2.4.6	Anpassung vom Chip-Layouts.....	89
3.2.4.7	Untersuchungen zu verschiedenen Materialien und Oberflächenmodifikationen .....	91
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>93</b>
<b>4.1</b>	<b>Verwendetes Ausgangsmaterial und Probenpräparation .....</b>	<b>93</b>
<b>4.2</b>	<b>Applikation von Zellen .....</b>	<b>95</b>

4.3	Nachweisgrenzen .....	97
4.4	Temperaturmanagement der Systeme.....	100
4.5	Chip-Materialien und Oberflächenmodifikation .....	104
4.6	Fluidische Umsetzung.....	106
4.7	Optimierung der Protokolldauer .....	108
4.8	Auslesung der Mikroarrays .....	110
4.9	Bedeutung für die Diagnostik.....	112
5	Zusammenfassung.....	114
6	Ausblick .....	117
7	Anhang .....	121
7.1	Literaturverzeichnis .....	121
7.2	Quellenverzeichnis.....	136
7.3	Abkürzungsverzeichnis.....	138
7.4	Danksagung .....	141
7.5	Selbstständigkeitserklärung .....	143
7.6	Wissenschaftliche Beiträge und Publikationen .....	144
7.7	Lebenslauf .....	148

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung in die Thematik

Die Analyse spezifischer Nukleinsäuresequenzen findet in vielen Bereichen der Bioanalytik Anwendung. Dazu gehören die Identifizierung von Organismen [1-3], Infektions- [4, 5] und Erbkrankheiten [6], Krebserkrankungen [7], Verwandtschaftsbeziehungen [8] oder auch gentechnischen Veränderungen [9, 10] anhand spezifischer Gensequenzen. Mit der Entwicklung von Chip-Systemen für die Nukleinsäure-basierte Diagnostik im Bereich der Humanmedizin sowie Phytopathologie beschäftigt sich diese Arbeit. Aus der Übertragung von Laborprozessen in einen miniaturisierten Maßstab ergeben sich verschiedene Vorteile gegenüber den verbreiteten Standard-Systemen (Abb. 1). Dazu gehören ein verringerter Bedarf an Material, Reagenzien, Energie und Platz, sowie das Potential zur Parallelisierbarkeit einer Vielzahl von Analysen.

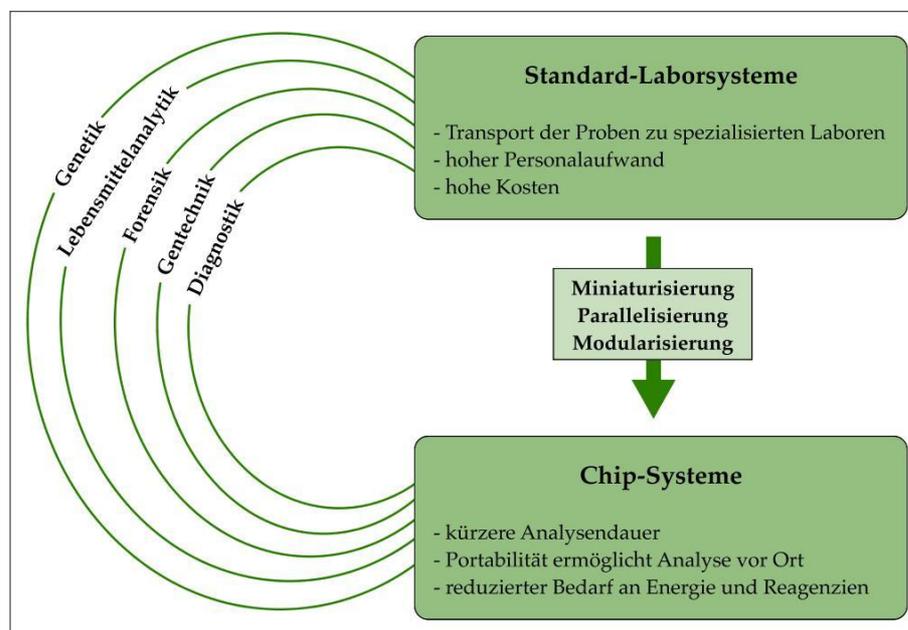


Abb. 1: Anwendungen der Nukleinsäure-basierten Bioanalytik und Vorteile der Miniaturisierung

Die Zielstellung bei der Entwicklung solcher Lab-on-a-Chip Systeme besteht darin, die Analyse vor Ort durchführen zu können. Dadurch können Zeit und Kosten eingespart werden, die bei einem Transport zu spezialisierten Laboren anfallen würden. In diesem Zusammenhang ist der Begriff des  $\mu$ TAS (*Mikro Total Analysis System*) [11] von besonde-

rer Bedeutung. Damit werden Systeme beschrieben, welche die gesamte für eine Analyse notwendige Prozesskette in einem kleinen Format integrieren.

Wesentliche Methoden der Molekularbiologie zur Analyse von Nukleinsäuren sind die Polymerase-Kettenreaktion (kurz: PCR, *Polymerase Chain Reaction*), Hybridisierung und Elektrophorese. Nachdem die Struktur der Deoxyribonukleinsäure (DNA) als Träger des Erbgutes von Watson und Crick aufgeklärt und 1953 veröffentlicht wurde [12], entwickelte man auch Sequenzierungsmethoden zur Aufklärung des genetischen Codes [13, 14]. Dadurch wurde die Identifizierung spezifischer Sequenzen oder Sequenzveränderungen ermöglicht.

## 1.2 Ausgewählte diagnostische Fragestellungen

Mit Hilfe verschiedener, genetischer Targets sollte die Anwendbarkeit und Funktionsfähigkeit der in Rahmen dieser Arbeit entwickelten bzw. weiterentwickelten Chip-Systeme demonstriert werden. Dazu gehörten auch Genabschnitte von dem Tumorsuppressorprotein p53. Die für dieses Protein codierende DNA stammte aus humanen Proben. Bis zu drei verschiedene Genabschnitte aus humanen HBME-Zellen (HBME, *human brain microvascular endothelial cells*) wurden ebenfalls untersucht. Außerdem wurde ein Genabschnitt der ribosomalen DNA des Phytopathogens *Phytophthora* amplifiziert und von fünf verschiedenen Arten spezifisch detektiert.

### 1.2.1 Protein p53

Der genetische Code für das aus 393 Aminosäuren bestehende und im Zellkern vorkommende Protein p53 ist beim Menschen auf dem Chromosom 17 lokalisiert [15]. dieses Protein spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Zellzyklus sowie der Einleitung von Reparaturmechanismen oder dem programmierten Zelltod (Apoptose) nach mutagenen Veränderungen der DNA [16], wie sie z. B. nach UV- oder Röntgenstrahlung sowie der Einwirkung von chemischen Mutagenen auftreten können. In Folge einer solchen, genetischen Veränderung nimmt die Expression von p53 zu und bewirkt ein Anhalten des Zellzyklus in der G1-Phase [17]. Damit wird die Zeitspanne zur Reparatur von DNA-Schäden erhöht. Kann die Schädigung der DNA nicht behoben werden oder wird p53 in sehr großen Mengen exprimiert, führt das zur Einleitung der Apoptose (Abb. 2). Wird allerdings das für p53 codierende Gen durch Mutation geschädigt, kann eine DNA-Reparatur nicht mehr eingeleitet werden. Dadurch kann die

mutagene Veränderung der zellulären DNA an nachfolgende Zellgenerationen weitergegeben werden. In den meisten Fällen einer Schädigung des p53 handelt es sich dabei um eine Punktmutation (Veränderung einer einzelnen Nukleinbase). Dabei ist häufig die DNA-Bindungsdomäne des Proteins betroffen, wodurch die Fähigkeit zur Einleitung der zellulären Reparatur- oder Apoptose-Mechanismen verloren geht.

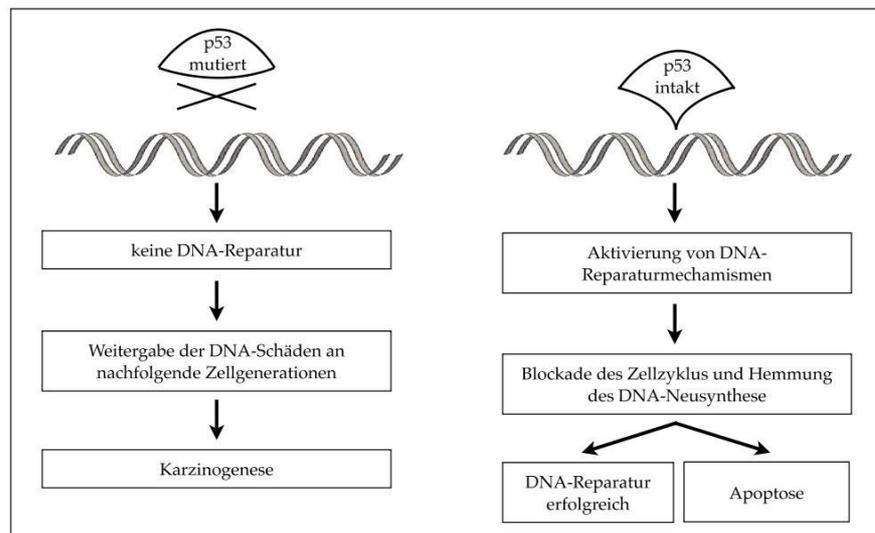


Abb. 2: Wirkungsweise des Tumorsuppressors p53 und Auswirkungen einer Störung

Mutationen des p53 zählen zu den häufigsten, genetischen Veränderungen, die im Zusammenhang mit menschlichen Tumoren identifiziert werden. Keimbahnmutationen des p53 führen zu dem vererbaren Li-Fraumeni-Syndrom [18-20], wobei eine Vielzahl unterschiedlicher Tumore, wie z. B. Sarkome, Karzinome oder Leukämien [21, 22] entstehen können. Als mit dem Li-Fraumeni-Syndrom vergesellschaftete Tumore gelten Weichteilsarkome, Brustkrebs [23], Knochensarkome, Hirntumore [24] und Karzinome der Nebennierenrinde. Bei den Betroffenen ist auch ein erhöhtes Risiko von Lungen- und Eierstockkrebs sowie Tumoren an Magen, Darm und Lymphknoten zu beobachten.

### 1.2.2 HBME-Zellen

Humane, mikrovaskuläre Hirn-Endothelzellen (HBME, *human brain microvascular endothelial cells*) sind die Hauptelemente der Blut-Hirn-Schranke. Sie bilden die physiologische Barriere zwischen dem Blutkreislauf und der Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit (*Liquor cerebrospinalis*) [25] (Abb. 3). Um einen ausreichenden Schutz beispielsweise vor Krankheitserregern oder Toxinen zu gewährleisten, wirken diese Zellen als hochselektive Filter. Zu diesem Zweck befindet sich zwischen den Zellen eine hohe Anzahl sogenannter

nannter *tight junctions*. Dies sind Bänder aus Membranproteinen, die eine enge Verbindung zwischen den HBME-Zellen erzeugen. Durch diese strukturelle Besonderheit unterscheiden sich diese Zellen von anderen Endothelzellen im Organismus. Die durch die *tight junctions* entstehende Diffusionsbarriere schränkt den Stofftransport zwischen den Zellen stark ein. Der hochselektive Nährstofftransport und Abtransport von Stoffwechselprodukten aus der Hirn-Rückenmarks-Flüssigkeit erfolgt in der Regel sehr kontrolliert durch die Membranen der HBME-Zellen. Störungen der Blut-Hirn-Schranke sind Ausgangspunkt für einige, sehr seltene, genetisch bedingte, neurologische Erkrankungen. Bestimmte bakterielle und virale Krankheitserreger können die Barriere der HBME-Zellen überwinden [26-28]. Dazu gehören u. a. HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), *Neisseria meningitidis* oder *Vibrio cholerae*. Einige Tumorarten bilden metastasierende Zellen, welche die Blut-Hirn-Schranke überwinden, sodass Metastasen in das Gehirn gelangen können [29].

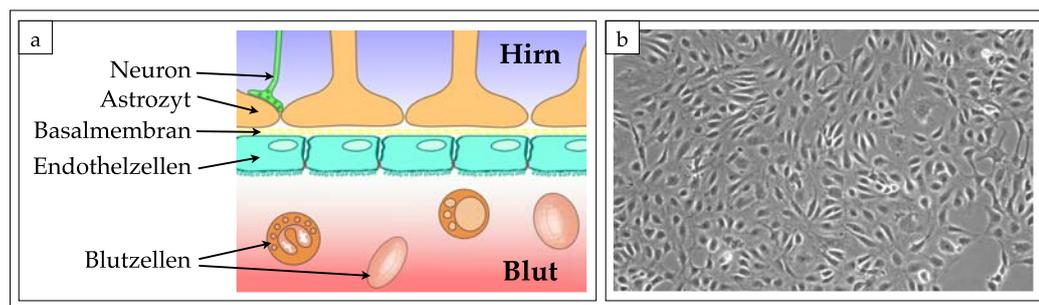


Abb. 3: Schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke [Q1] (a) und mikroskopische Aufnahme von HBME-Zellen [Q2] (b)

Aus dem Erbgut der HBME-Zellen wurden verschiedene Genabschnitte mittels on-Chip PCR untersucht. Dazu gehören codierende Sequenzabschnitte der Proteine L13a, Gremlin und Vimentin. L13a stellt eine Komponente der großen Untereinheit zellulärer Ribosomen dar und liegt im Zytoplasma vor [30, 31]. Das codierende Gen ist auf dem Chromosom 19 lokalisiert. Das Protein Gremlin ist beteiligt an der Differenzierung verschiedener Organsysteme bei der embryonalen Entwicklung [32-34]. Eine Expression dieses auf dem Chromosom 15 codierten Gens konnte bei Tumoren zahlreicher Gewebe festgestellt werden, darunter Lunge, Niere, Brust, Darm und Bauchspeicheldrüse. Aufgrund der Beteiligung dieses Proteins an der Entstehung von Tumoren stellt es ein potentielles, diagnostisches Target bei Krebserkrankungen dar. Vimentin ist ein Strukturprotein des Zytoskeletts [35]. Das entsprechende Gen ist auf dem Chromosom 10 lokalisiert. Es kommt vor in Zellen, die aus embryonalem Bindegewebe hervorgegangen

sind. Dazu gehören neben den Zellen des Bindegewebes auch glatte Muskelzellen und Endothelzellen. Vimentin gilt als Marker für Weichgewebstumore (Sarkome) [36], die als bösartig eingestuft werden und aus diesen Gewebetypen hervorgehen.

### 1.2.3 Phytopathogen *Phytophthora*

Mit der Gattung *Phytophthora* werden Pflanzenpathogene beschrieben, die der Klasse der Eipilze (*Pernospromycetes*) [37] zugeordnet sind. Diese sind deutlich näher mit Gold-, Braun- und Kieselalgen verwandt, als mit echten Pilzen. Die Fähigkeit zur Photosynthese ist im Gegensatz zu anderen Eipilzen in Verlauf der Evolution bei *Phytophthora* verloren gegangen. Diese in Wasser, Boden oder Landpflanzen lebenden Organismen kommen deshalb als Parasiten oder Saprophyten vor, d. h. sie verdauen lebendes oder totes, organisches Pflanzenmaterial durch Enzymabsonderung und nehmen die gelösten Nährstoffe über ihre Zellmembran auf. *Phytophthora* wächst in Form eines Geflechtes von Zellfäden (Myzel) und bildet Sporangien mit begeißelten Schwärmerzellen (Zoosporen) aus (Abb. 4a). Diese Zoosporen verbreiten sich über Wind sowie Regen- und Bodenwasser.

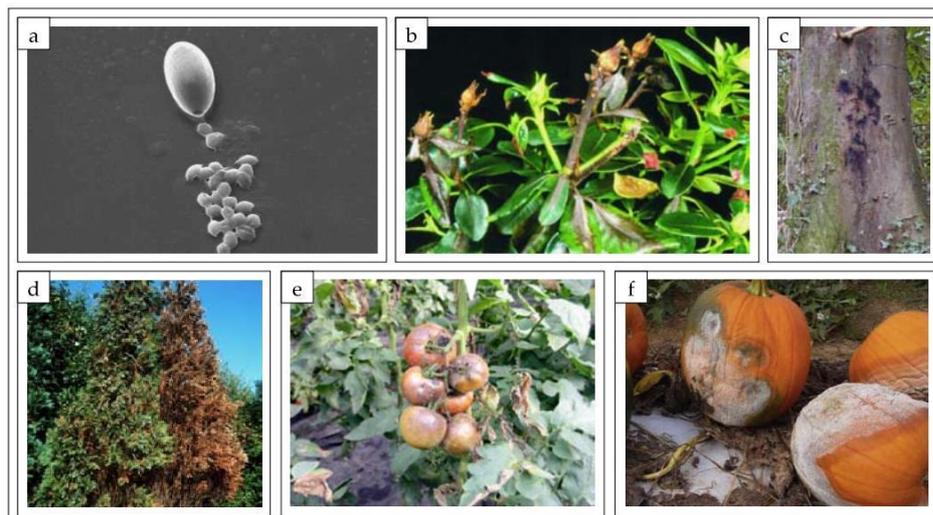


Abb. 4: Mikroskopische Aufnahme eines Sporangiums von *Phytophthora* mit austretenden Zoosporen (a) und verschiedene, infizierte Pflanzen: Rhododendron (b), Rosskastanie (c), Zypresse (d), Tomate (e), Kürbis (f) [Q3-8]

Der Befall einer Pflanze mit *Phytophthora* ist symptomatisch je nach Art an Blattverfärbungen, Verfärbungen der Rinde, Absterben der Triebe, Wurzelfäule oder am Stamm austretenden, dunklen Schleim erkennbar (Abb. 4b bis 4f). Diese typischen Symptome

sind allerdings erst in einem späteren Stadium der Erkrankung sichtbar. Oftmals sind Pflanzen über längere Zeit bereits infiziert ohne äußerlich erkennbare Anzeichen für einen Befall durch *Phytophthora*. Bis heute sind ca. 70 verschiedene *Phytophthora*-Arten bekannt. Einige davon weisen ein sehr breites Spektrum an Wirtspflanzen auf, wie z. B. *P. ramorum* [38-41]. Andere *Phytophthora*-Arten befallen nur ganz bestimmte Pflanzenarten. Für betroffene Pflanzen gibt es keine Behandlungsmöglichkeiten, sodass meist ein früher oder später eintretendes Absterben verursacht durch Fäulnis unvermeidbar ist.

Die Problematik um *Phytophthora* hat umwelt- und ernährungsbezogen sowie wirtschaftlich relevante Bedeutung, da neben zahlreichen Wildpflanzen auch viele Nutzpflanzen betroffen sind. Ein bekanntes, historisches Beispiel ist die 1845 durch *P. infestans* verursachte Hungersnot in Irland. *P. infestans* [42] gilt als Verursacher der Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffeln und Tomaten. Mitte des 19. Jahrhunderts fiel die Kartoffelernte in Irland komplett aus, weshalb große Teile der Bevölkerung verstarben oder auswanderten, da zu dieser Zeit die Kartoffel das Hauptnahrungsmittel der Bewohner darstellte. Einige *Phytophthora*-Arten, wie z. B. *P. lateralis* und *P. fragariae* wurden von der EPPO (*European and Mediterranean Plant Protection Organization*) bereits als Quarantäne-Schadorganismen eingestuft.

Für die Entwicklung eines Chip-basierten Detektionssystems wurden fünf verschiedene *Phytophthora*-Arten mit hoher, phytopathologischer Relevanz ausgewählt (Tab. 1).

<i>Phytophthora</i> -Art	Beispiele für potentielle Wirtspflanzen	Erstbeschreibung
<i>P. ramorum</i>	Rhododendron, Eiche, Buche, Flieder, Eibe, Sojabohne, Azalee	(Werres 2001) [38]
<i>P. lateralis</i>	Scheinzypresse, Eibe	(Tucker 1942) [187]
<i>P. hibernalis</i>	Rose, Rhododendron	(Carne 1925)
<i>P. kernoviae</i>	Rhododendron, Magnolie, Eiche	(Brasier 2005) [190]
<i>P. plurivora</i>	Orange, Buche	(Jung 2009) [188]
<i>P. cinnamomi</i>	Hibiskus, Rhododendron, Pinie	(Rands 1922)
<i>P. alni</i>	Erle	(Brasier 1995) [189]

Tabelle 1: Ausgewählte *Phytophthora*-Arten und Beispiele für entsprechende Wirtspflanzen

Um die verschiedenen *Phytophthora*-Arten zu unterscheiden, wurde eine auf der ribosomalen DNA befindliche ITS-Region (*internal transcribed spacer*) für die Amplifikation ausgewählt. Die ribosomale DNA, die in Form von sich wiederholenden Transkriptionseinheiten in der genomischen DNA vorhanden ist, besitzt codierenden Abschnitte

für ribosomale RNA (Abb. 5). Diese codieren die 18S-, 5,8S- und 28S-rRNA, welche in Verbindung mit verschiedenen Proteinen strukturelle Elemente der Ribosomen darstellt. Da die zur Durchführung der PCR nötigen Primer-Sequenzen auf den codierenden Bereichen der ribosomalen DNA lokalisiert sind, kann ein einziges Primer-Paar zur Amplifikation des ausgewählten ITS-Bereiches bei allen zu untersuchenden *Phytophthora*-Arten verwendet werden. Der Grund dafür besteht darin, dass die für ribosomale RNA codierenden Bereiche bei den verschiedenen Arten gleich sind, während die dazwischen liegenden ITS-Bereiche hoch variabel sind.

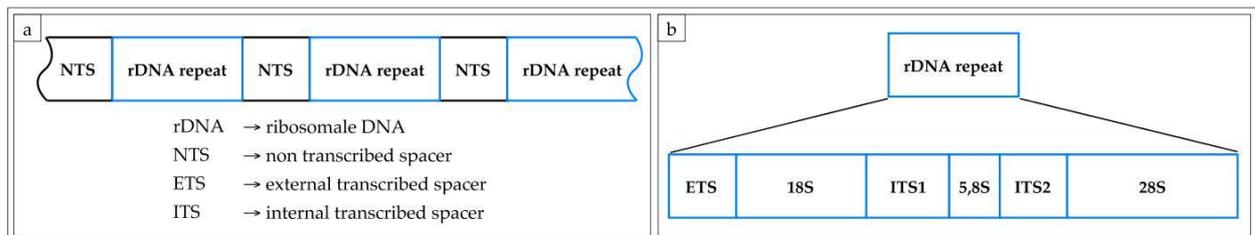


Abb. 5: Struktur der ribosomalen DNA

## 1.3 Grundlegende Aspekte der Nukleinsäure-basierten Bioanalytik und technischer Stand

### 1.3.1 Probenpräparation

Die Analyse von Nukleinsäuren setzt sich im Wesentlichen immer aus der Probenpräparation, der Anreicherung des genetischen Materials und dessen Detektion zusammen. Im folgenden Abschnitt sollen Grundlagen dargestellt und ein Überblick zum technischen Stand der im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Technologien gegeben werden.

#### 1.3.1.1 Nukleinsäureextraktion und -aufreinigung

Um die in Zellen enthaltenen Nukleinsäuren amplifizieren und detektieren zu können, ist ein Zellaufschluss prinzipiell notwendig. Die Extraktion und speziell die Aufreinigung der Zellen ist dabei nicht in jeden Fall erforderlich. Falls sich herausstellt, dass enthaltenen Zellbestandteile die Detektion der Nukleinsäuren behindern, können verschiedene Methoden zur Extraktion angewendet werden. Dabei kann eine Extraktion nach Lösung und Zentrifugation mit Ethanol oder Isopropanol sowie Phenol und Chlo-

roform erfolgen [43]. Ebenso kann die DNA chromatografisch an Silica-Oberflächen über elektrostatische Wechselwirkungen aufgereinigt werden. Diese Methode wurde auch bereits in einen miniaturisierten Maßstab in Form mikrofluidischer Chip-Systeme übertragen [44-46]. Bei der Extraktion von DNA an carboxylierten Magnetpartikeln kann auf die Zentrifugation verzichtet werden, da die Partikel mit Hilfe eines äußeren Magnetfeldes fixiert und somit der Flüssigkeitsüberstand abgenommen werden kann.

### 1.3.1.2 Separation einzelner Zellen

Für den Fall, dass zur Analyse von Nukleinsäuren auf deren zeit- und materialintensive Aufreinigung verzichtet werden kann, wurden verschiedene Methoden zur gezielten Separation von Zellen entwickelt. Die Separation weniger oder einzelner Zellen für eine Analyse z. B. der enthaltenen Nukleinsäuren wird aus verschiedenen Gründen angestrebt. Vor allem beim Einsatz miniaturisierter Chip-Systeme wird im Allgemeinen mit sehr geringen Probenmengen gearbeitet. Beim direkten Einsatz von Zellen zur Amplifikation mittels PCR können sich große Mengen zellulärer Bestandteile, wie z. B. Proteine, hemmend auf die Reaktion auswirken. Als mögliche Methoden zur gezielten Separation einzelner Zellen sind Mikromanipulationstechniken, optische Pinzette oder Dielektrophorese zu nennen. Während bei der mechanischen Mikromanipulation beispielsweise Glaskapillaren eingesetzt werden, können Zellen auch im elektromagnetischen Feld eines Lichtstrahls fokussiert bzw. in Richtung der maximalen Lichtintensität bewegt werden [47-50].

Bei der Dielektrophorese [51], die auch im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurde, kommt es im Unterschied zur Elektrophorese zu einer Bewegung ungeladener Objekte, die durch ein alternierendes, elektrisches Wechselfeld polarisiert werden. Dabei bilden sich auf beiden Seiten des Objektes gleich große, partielle Ladungen aus, wobei die Nettoladung null bleibt.

Einflussfaktoren bei der Dielektrophorese sind die Frequenz des elektrischen Feldes, Größe, Form und elektrische Eigenschaften der Partikel sowie die Beschaffenheit des umgebenden Mediums. Für den Fall, dass das Medium weniger polarisierbar ist, als das Objekt, bewegen sich die polarisierten Objekte in Richtung hoher Feldstärken (Abb. 6). Der Grund für diesen Effekt besteht darin, dass sich der Betrag der angreifenden Kräfte aufgrund von Feldinhomogenitäten ändert. Während man bei dieser Bewegung von Objekten hin zu hohen Feldstärken von positiver Dielektrophorese spricht, bezeichnet man den umgekehrten Fall als negative Dielektrophorese. Dieser Effekt

funktioniert bei Partikeln mit einer Größe zwischen 1 und 1000  $\mu\text{m}$ . Andernfalls wirken vordergründig Kräfte, wie Gravitation bei größeren oder Brownsche Molekularbewegung bei kleineren Partikeln. Mit Hilfe der Dielektrophorese können auch DNA-Moleküle [52, 53] oder Zellen [54, 55] manipuliert werden.

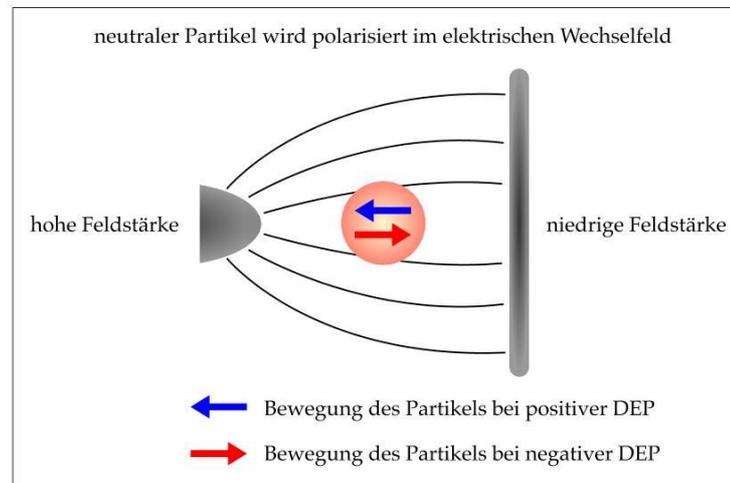


Abb. 6: Schematische Darstellung von Prinzip der Dielektrophorese

Zur Herstellung von Dielektrophorese-Chips werden Strukturen aus elektrisch leitfähigem Material auf Chip-Oberflächen erzeugt. In der Regel wird dazu Gold auf einer Haftschrift aus Titan oder einer Legierung aus Nickel und Chrom mittels fotolithografischer Strukturierungsprozesse auf der Chip-Oberfläche aufgetragen. Als Chip-Substrat ist Glas am besten geeignet, da aufgrund der optischen Transparenz eine visuelle Kontrolle des Separationsvorganges ermöglicht wird. Neben einer dielektrophoretischen Separation von Partikeln innerhalb einer Reaktionskammer mit fluidischen Anschlüssen [56] sind auch komplexere Strukturen zur Umsetzung mehrerer Separationsstufen [54] oder bewegte Felder [52, 57] in der Literatur beschrieben. In der Regel ist eine Verwendung von Lösungen geringer Leitfähigkeit zu empfehlen, da sonst beim Kontakt Ionen-haltiger Flüssigkeiten mit Elektroden unter Spannung elektrolytische Reaktionen beobachtet werden. Allerdings sind auch Systeme beschrieben, bei denen die Elektroden durch spezielle Beschichtungen, wie beispielsweise Agarose, isoliert wurden und somit leitfähige Lösungen eingesetzt werden konnten [58, 59]. Sowohl für die negative [60], als auch für die positive Dielektrophorese [61] wurden bereits Chip-Systeme etabliert. Dabei sind mit verschiedenen Systemen auch Zellen separiert bzw. sortiert wurden [62-64].

### 1.3.2 Anreicherung von Nukleinsäuren mittels Polymerase-Kettenreaktion

In vielen Fällen reicht die in einer Probe enthaltene Menge an DNA oder RNA für einen Nachweis nicht aus. Zur Anreicherung von bis zu mehreren Kilobasen großen DNA-Abschnitten bedient man sich deshalb der PCR [65-67]. Bei dieser enzymatisch katalysierten Reaktion werden in einem dreischrittigen und zyklisch ablaufenden Prozess DNA-Abschnitte vervielfältigt (Abb. 7a). Diese drei Schritte werden als Denaturierung, Annealing und Elongation bezeichnet. Während der Denaturierung wird die DNA-Doppelhelix bei 94 °C entspiralisiert und in Einzelstränge aufgespalten. Im zweiten Schritt wird die Lösung auf eine bestimmte Temperatur zwischen 55 und 65 °C abgekühlt, wobei sich die sogenannten Primer jeweils an die Enden des zu amplifizieren Sequenzabschnittes anlagern. Die Primer sind einzelsträngige Oligonukleotide mit einer Größe von 18 bis 30 Basenpaaren, deren Basensequenz entsprechend dem gewünschten PCR-Produkt ausgewählt wird. Die exakte Annealing-Temperatur ist abhängig von der Länge sowie der Basensequenz der Primer. Bei der sich anschließenden Elongation lagert sich DNA-Polymerase an die 3'-Enden der Primer an und synthetisiert den jeweils komplementären Strang aus den vier verschiedenen Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs). Dadurch entsteht neue, doppelsträngige DNA. Das Temperaturoptimum und damit die Elongationstemperatur der am häufigsten verwendeten und hitzebeständigen *Taq* DNA-Polymerase beträgt 72 °C [68, 69]. Dieser Prozess wird 25 bis 45 mal wiederholt, wobei sich idealerweise innerhalb eines PCR-Zyklus die Menge an DNA-Molekülen verdoppelt.

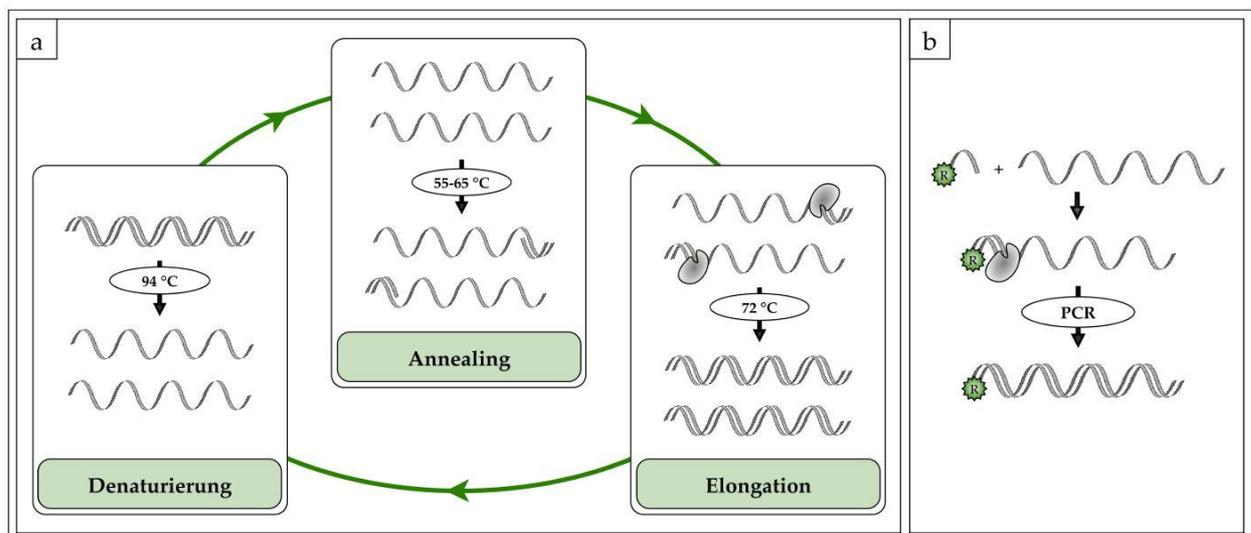


Abb. 7: Schematische Darstellung zur Polymerase-Kettenreaktion (a), mit markiertem Primer (b)

Die Polymerase-Kettenreaktion kann auch angewendet werden, um DNA-Fragmente zu markieren. Dabei werden entsprechend modifizierte Primer (Abb. 7b) oder dNTPs eingesetzt, die z. B. mit radioaktiven Isotopen [70, 71], Fluoreszenzfarbstoffen [72-74] oder Biotin [10, 75-78] verknüpft sind. Diese Markierungen können eine Detektion der amplifizierten DNA im Anschluss an die PCR mittels Hybridisierungsnachweis ermöglichen.

Steht bei der PCR nicht DNA, sondern RNA als Ausgangsmaterial zur Verfügung, wird eine reverse Transkription [79] der Amplifikation vorangestellt. Dabei erfolgt ein Umschreiben der einzelsträngigen RNA mit Hilfe des Enzyms reverser Transkriptase in doppelsträngige DNA, wobei das in der RNA enthaltene Uracil durch Thymin ersetzt wird. Der PCR-Prozess kann auch mit einer Fluoreszenz-basierten Real-Time Detektion gekoppelt werden, sodass bereits im Verlauf der Amplifikation die PCR-Produkte nachgewiesen werden können (siehe Abschnitt 1.3.3.2).

Zur Umsetzung der Polymerase-Kettenreaktion im Chip-Format gib es eine Reihe verschiedener Konstruktionen [80]. Prinzipiell existieren dabei zwei Betriebsweisen. Beim stationären Betrieb wird die Reaktionslösung in eine Kavität gefüllt oder als Tropfen auf der Chip-Oberfläche platziert und an dieser Stelle temperiert. Dabei können Reaktionsvolumina zwischen 50  $\mu\text{l}$  [81] und einigen Pikolitern [82] prozessiert werden. Für den Durchfluss-Betrieb werden Chips mit integrierten Kanalstrukturen eingesetzt. Der PCR-Ansatz wird durch diese Kanäle über verschiedene, fest definierte Temperaturzonen geleitet [83, 84].

Als Materialien zur Fertigung von PCR-Chip sind in der Literatur neben Silizium [85-88] und Glas [89, 90] u. a. Polydimethylsiloxan (PDMS) [91, 92], Polycarbonat (PC) [93, 94], Polymethylmethacrylat (PMMA) [95, 96] oder Polyethylenterephthalat (PET) [97] beschrieben.

Zur Temperierung der Reaktionslösung wurden häufig Dünnschichtheizer aus Platin, Aluminium, Nickel oder verschiedenen Legierungen auf den Chips durch Mikrostrukturierungsprozesse erzeugt. Eine andere Methode besteht in der Positionierung der Chips auf metallischen Heizblöcken, welche meist mit Peltier-Elementen verbunden sind. Als weitere, technische Lösung ist die Verwendung von Heizfolien beschrieben. Um die Chips mit der enthaltenen Reaktionslösung zu temperieren, kann auch mit einem Gebläse gearbeitet werden, das heiße bzw. kühle Luft zuführt. Auch Infrarot-Strahlung wurde zum Beheizen angewendet [98, 99]. Als weitere Heizelemente für den Gebrauch bei der on-Chip PCR sind Halogenlampen [100], Induktionsheizer [101] sowie Magnetrons zur Erzeugung von Mikrowellen [102, 103] genannt.

Als Temperaturreselemente wurden ebenfalls Platin- [91, 104, 105] oder auch Aluminium-Dünnschichtstrukturen [106] eingesetzt. Auch Kupfer-Temperatursensoren [107], Pt100-Thermometer [108, 109], Thermoelemente [110, 111] oder Flüssigkristalle wurden zur Temperaturmessung bei der on-Chip PCR angewendet.

Zur erfolgreichen Umsetzung der Polymerase-Kettenreaktion in oder auf einem Chip ist meist eine chemische Oberflächenmodifikation erforderlich, sodass durch eine Passivierung die erforderliche Biokompatibilität hergestellt wird. Problematisch ist meist die Anlagerung von Polymerase an die Chip-Oberfläche, wodurch deren Aktivität stark herabgesetzt wird [87]. Bei Glas- oder Silizium-Oberflächen wird häufig eine Siliziumoxid-Oberfläche erzeugt [112]. Sehr verbreitet ist die chemische Silanisierung der Chip-Oberflächen, beispielsweise mit Dimethyldichlorosilan [113, 114], Chlorotrimethylsilan, oder Chlorodimethyloctysilan [115]. Auch Dimethylformamid [116], Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid [117, 118] oder Teflon [119] wurden erfolgreich angewendet. Eine andere Möglichkeit der Oberflächenpassivierung besteht durch Agenzien, die dem PCR-Ansatz zugesetzt werden und somit im Verlauf der Reaktion wirken. Dazu gehören von allem Rinderserumalbumin [106, 120-122], Polyethylenglycol [123, 124] oder Tween 20.

### 1.3.3 Detektion von DNA

Zum Zweck der Nukleinsäure-Detektion sind vor allem die Fluoreszenz-basierte Real-Time Detektion im Verlauf der PCR oder ein sich anschließender Hybridisierungsnachweis mittels DNA-Mikroarray sehr verbreitet. Bei den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Chip-Systemen wurden diese Detektionsmethoden etabliert. Daneben können DNA-Abschnitte auch elektrophoretisch detektiert werden.

#### 1.3.3.1 Elektrophoretische Detektion von DNA

Bei der Elektrophorese werden elektrisch geladene Objekte in einem Trägermaterial unter Einwirkung eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Die elektrophoretische Mobilität (Abb. 8) wird beeinflusst durch die Ladung und die Größe der Objekte, die elektrische Feldstärke sowie die Viskosität und die Porenweite des Trägermediums.

Auf dem Gebiet der Molekularbiologie ist die Gelelektrophorese besonders verbreitet. Dabei stellen Gele aus Agarose oder Polyacrylamid, die in eine ionische Pufferlösung getaucht werden, das Trägermedium dar. Polyacrylamidgele werden bevorzugt zur Auf-

trennung von Proteinen eingesetzt, während Agarosegele überwiegend zur Analyse von DNA oder RNA verwendet werden.

$\mu_e = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi r \eta}$	$\mu_e$ - elektrophoretische Mobilität $v$ - Geschwindigkeit des Teilchens $E$ - elektrische Feldstärke $q$ - Ladung des Teilchens $r$ - Radius des Teilchens $\eta$ - Viskosität des Trägermediums
---	--

Abb. 8: Berechnung der elektrophoretischen Mobilität [Q9]

Im Anschluss an die Gelelektrophorese werden durch eine Markierung, die z. B. mit radioaktiven Substanzen oder mit Farbstoffen erfolgt, diskrete Zonen bzw. Banden im Gel sichtbar gemacht. Die einzelnen Banden sind dann jeweils gleich großen Molekülen zuzuordnen. Die Agarose-Gelelektrophorese [125-127] ist für diese Arbeit von besonderem Interesse, weil damit der Erfolg der DNA-Amplifikation bei der PCR überprüft und die entwickelten Chip-Systeme mit konventionellen Technologien verglichen wurden. Bei dieser Form der Gelelektrophorese bewegt sich die stets negativ geladene DNA durch das Gel hin zum positiven Pol (Abb. 9a). Dabei werden die DNA-Fragmente letztlich in Abhängigkeit von ihrer Größe aufgetrennt. Je kürzer die zu analysierenden DNA-Fragmente dabei sind, desto schneller bewegen sie sich durch das Gel.

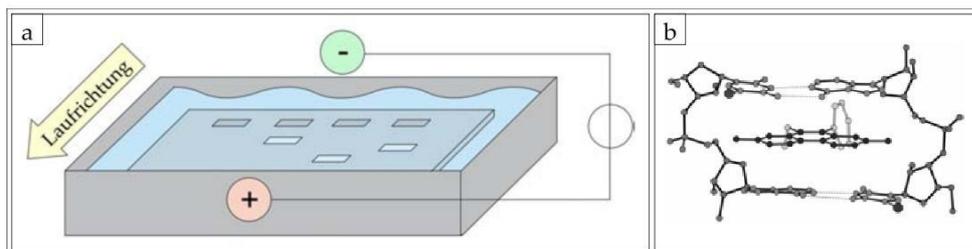


Abb. 9: Schematische Darstellung der Agarose-Gelelektrophorese (a) und Interkalation von Ethidiumbromid in DNA (b) [Q10]

Ein häufig eingesetzter Farbstoff zur Visualisierung der Banden ist Ethidiumbromid, welches in DNA interkaliert (Abb. 9b) und unter ultraviolettem Licht fluoresziert [128-130]. Anhand der Bandenintensitäten kann eine Aussage über den Erfolg der PCR getroffen werden und die zurückgelegte Strecke ermöglicht Rückschlüsse auf die Länge der DNA-Fragmente.

Neben der klassischen Gelelektrophorese kann die Auftrennung auch in feinen Kapillaren mit Probenvolumina bis 10 nl erfolgen. Dazu werden diese mit Elektrolytlösung

oder Gel befüllt. Das Prinzip der Kapillarelektrophorese [131, 132] wurde auch bereits in den miniaturisierten Maßstab übertragen [133, 134]. Um beispielsweise Nukleinsäuren elektrophoretisch aufzutrennen, wurden Chips mit integrierten Mikrokanälen und Injektionsstrukturen hergestellt, wobei der Kanal zur Auftrennung mit Polyacrylamidgel befüllt wurde. Durch Anlegen einer Spannung wird Elektrolytlösung und die in der Regel Fluoreszenz-markierte Probe durch den Kanal bewegt. Neben einkanaligen Chips wurden auch Systeme mit mehreren Kanälen umgesetzt [135, 136], um einen höheren Probendurchsatz zu erzielen.

### 1.3.3.2 Real-Time PCR

Alternativ zur zeitaufwendigen Agarose-Gelelektrophorese ist es möglich, die amplifizierte DNA bereits im Verlauf der PCR zu detektieren. Außerdem sind mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese qualitative und quantitative Aussagen nur mit bedingter Exaktheit möglich. Bei der Fluoreszenz-basierten Real-Time PCR werden verschiedene Detektionsprinzipien angewendet. Dabei ist stets ein Fluoreszenzsignal messbar, dessen Intensität sich proportional zur Menge an synthetisierter DNA verhält. Grundsätzlich können die verschiedenen Real-Time Detektionsmethoden in zwei Gruppen eingeteilt werden. Bei der Sequenz-unspezifischen Detektion werden interkalierende Farbstoffe in die doppelsträngige DNA eingelagert (Abb. 10a), wodurch diese Licht bestimmter Wellenlängen in hoher Intensität emittieren. Beispiele für solche, mit Nukleinsäuren wechselwirkenden Farbstoffe sind SYBR-Green [137], SYTO9 oder EvaGreen.

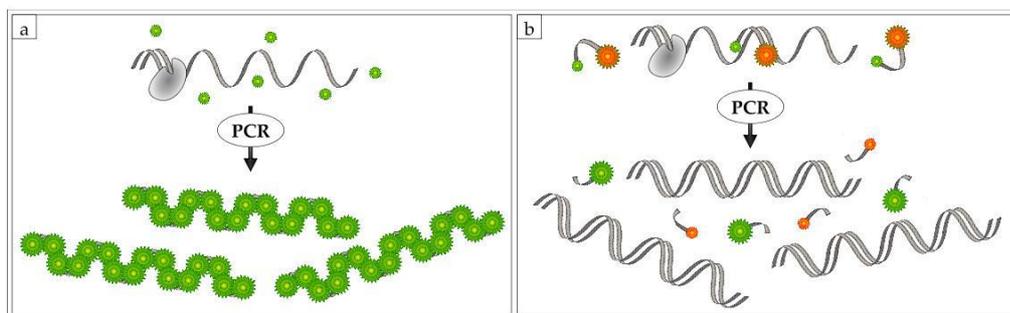


Abb. 10: Prinzip der Real-Time Detektion mit SYBR Green (a) und TaqMan-Sonde (b)

Mit Hilfe von einzelsträngigen Oligonukleotiden, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, kann auch eine Sequenz-spezifische Real-Time Detektion bei der PCR durchgeführt werden (Abb. 10b). Einer der Farbstoffe dient dabei als Reporter, der andere wirkt als Quencher. Zu diesem Zweck werden die Fluoreszenzfarbstoffe

stets so ausgewählt, dass sich das Absorptionsmaximum des Reporters mit dem Emissionsmaximum des Quenchers überschneidet. Damit tritt in einem gewissen Abstand der Fluorophore zueinander ein strahlungsloser Energietransfer zwischen beiden auf, wodurch das Fluoreszenzsignal des Reporters gequencht wird. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von Förster-Resonanzenergietransfer (FRET). Beim FRET handelt es sich um einen strahlungslosen Energieübergang durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen unter Erhaltung des Spin (Singulett-Singulett-Transfer). Zur Bemessung des Abstandes der beiden Fluorophore wird der Förster-Radius [138] berechnet (Abb. 11). Dieser gibt den Abstand zwischen zwei Fluorophoren an, bei dem die Effizienz des strahlungslosen Energieübergangs 50 % beträgt. Neben der Einhaltung des Förster-Radius bestehen weitere Voraussetzungen für FRET in einer Überlappung der Spektren für die Emission des Reporters und die Absorption des Quenchers sowie einer parallelen, elektronischen Schwingungsebene.

$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}$ $R_0 = \sqrt[6]{8,8 \cdot 10^{-28} (\kappa^2 n^{-4} Q_0 J)}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>E - Effizienz</li> <li><math>R_0</math> - Förster-Radius</li> <li><math>\kappa</math> - Dipol-Orientierungsfaktor</li> <li>r - Abstand</li> <li>n - Brechungsindex des Mediums</li> <li>J - Überlappungsintegral</li> <li><math>Q_0</math> - Quantenausbeute des Donors</li> </ul>
---	---

Abb. 11: Berechnung der Effizienz des strahlungslosen Energieüberganges sowie des Förster Radius [Q13]

Es gibt verschiedene Konstruktionen solcher Sonden, wie z. B. Hydrolyse-Sonden (TaqMan-Sonden), Hybridisierungs-Sonden (LightCycler-Sonden), Molekular Beacons oder Scorpion Primer. Für die entsprechenden Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde neben dem interkalierenden SYBR-Green eine TaqMan-Sonden eingesetzt (Abb. 10b). Bei der TaqMan-Sonde handelt es sich um ein einsträngiges Oligonukleotid, das mit zwei entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen an den Enden versehen ist, sodass der Energietransfer ermöglicht wird. Im Gegensatz dazu setzen sich die Light Cycler-Sonden aus zwei kurzen Oligonukleotiden zusammen, von denen jeweils eine mit dem entsprechenden Fluorophor versehen ist. Diese Sonden hybridisieren während der Annealing-Phase der PCR an den einzelsträngigen DNA-Strang. Aufgrund der 5'-3' Exonuklease-Aktivität der *Taq* DNA-Polymerase wird die Sonde während der Elongation abgebaut. Dadurch vergrößert sich der Abstand der beiden Fluorophore zueinander, der Energietransfer zwischen ihnen findet nicht mehr statt und das Fluoreszenzsignal des Reporters kann detektiert werden. Bei den Molecu-

lar Beacons handelt es sich um ein schleifen- oder haarnadelförmige Sonde, deren Funktionsweise prinzipiell der von TaqMan-Sonden entspricht. Scorpion Primer sind komplexere Strukturen, die an den Enden der PCR-Produkte eingebaut werden und an den synthetisierten Strang hybridisieren. Diese Sonden werden im Verlauf der Amplifikation nicht abgebaut.

Aufgrund der Proportionalität des Fluoreszenzsignals zur Menge an synthetisierter DNA ist ein ansteigender Kurvenverlauf zu beobachten. Insgesamt ergibt das detektierte Signal allerdings einen sigmoidalen Verlauf, der sich aus einer Anlaufphase, einen exponentiellen Anstieg und einer Plateauphase zusammensetzt. Zu Beginn muss ein bestimmter Schwellenwert der Fluoreszenzintensität erreicht werden, damit ein Anstieg registriert werden kann. Dieser Anstieg erfolgt umso später, je geringer die Ausgangskonzentration an DNA im jeweiligen PCR-Ansatz ist (Abb. 12a). Im Verlauf der Reaktion nimmt die Aktivität der *Taq* DNA-Polymerase ab, da die zur DNA-Synthese nötigen Komponenten aus der Lösung, wie z. B. Primer oder Nukleotide aufgebraucht werden. Aus diesem Grund geht der Kurvenverlauf schließlich in eine Sättigung über. Neben den durch Sequenz-spezifische Sonden ermöglichten, qualitativen Analysen, eignen sich Real-Time PCR Methoden hervorragend für quantitative Analysen. Dabei können unter Einsatz verschiedener, definierter DNA-Ausgangskonzentrationen Standardreihen erstellt werden. Über den Anstieg der sich ergebenden Geraden kann eine PCR-Effizienz ermittelt werden (Abb. 12b). Dieser Wert kann zur Bewertung des angewendeten Assays, Protokolls oder der Thermocycler-Technologie herangezogen werden. Außerdem dienen solche Standard-Reihen zur Bestimmung von DNA-Ausgangskonzentrationen in unbekanntem Proben, womit z. B. Rückschlüsse auf den Gehalt bestimmten Mikroorganismen gezogen werden können.

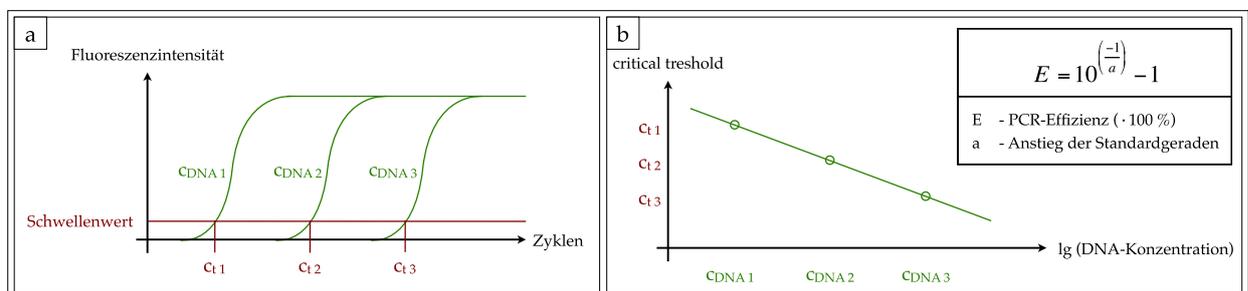


Abb. 12: Typische Detektionskurven bei der Real-Time PCR (a) und Ermittlung der PCR-Effizienz (b)

Beim Einsatz interkalierender Farbstoffe bei der Real-Time PCR wird im Verlauf der Reaktion sämtliche, doppelsträngige DNA detektiert. Mit Hilfe einer Schmelzkurvenana-

lyse wird eine semiqualitative Detektion ermöglicht. Die Schmelzkurve wird im Anschluss an die Amplifikation aufgenommen. Dabei wird die PCR-Lösung unter permanenter Fluoreszenzdetektion gleichmäßig erwärmt. Bei einer spezifischen Schmelztemperatur, die abhängig ist von der Länge sowie dem GC-Gehalt der Produkte, fällt das Signal sprunghaft ab (Abb. 13). Mit Hilfe einer solchen Schmelzkurve können unerwünschte Nebenprodukte von der Ziel-DNA unterschieden werden. Bei diesen Nebenprodukten kann es sich beispielsweise um Primer-Dimere handeln, die sich bei Überschuss bilden und eine vergleichsweise niedrigere Schmelztemperatur aufweisen.

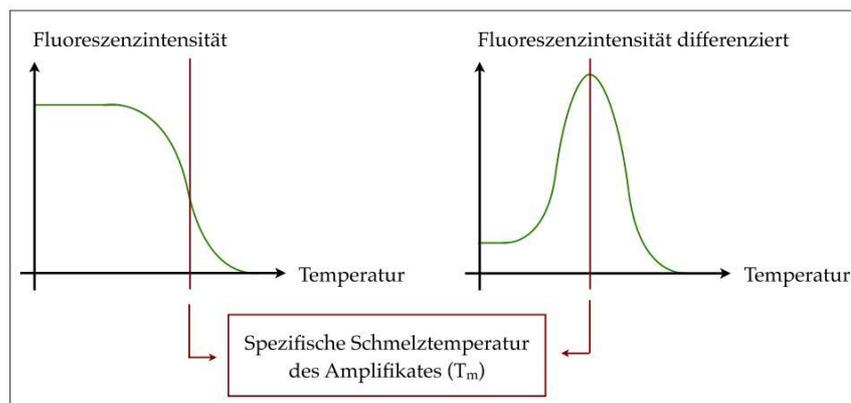


Abb. 13: Schematische Darstellung einer typischen Schmelzkurve

Um bereits im Verlauf der Amplifikation die PCR-Produkte detektieren zu können, wurden neben konventionellen Thermocyclern auch PCR-Chips mit einer Fluoreszenzbasierten Real-Time Detektion verknüpft [139-141]. Zur technischen Realisierung dieser optischen Detektionsmethode wurden Halogen- [142] oder Quecksilberdampf Lampen [143, 144] sowie Leuchtdioden (LED, *light-emitting diode*) [145] oder Laser [96] eingesetzt. Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgte entweder mit Photodioden [145, 146], Photomultipliern [147] oder CCD-Kameras [143]. Neben SYBR-Green [96, 141] und TaqMan-Sonden [139, 144] wurden auch Molecular Beacon Sonden [148] oder Ethidiumbromid [149] zur Detektion in Chip-Systemen eingesetzt.

### 1.3.3.3 Hybridisierungsnachweis mit DNA-Mikroarrays

Bei der Hybridisierung von Nukleinsäure-Einzelstränge verbinden sich diese unter bestimmten Bedingungen sehr spezifisch entsprechend der Watson-Crick-Bindung (Abb. 14a). Dadurch können bestimmte Sequenzabschnitte nachgewiesen werden. Die Bedingungen umfassen bestimmte Salzkonzentrationen in der Hybridisierungslösung

sowie eine spezifisch eingestellte Hybridisierungstemperatur. Diese Temperatur ist abhängig von der Länge des zu hybridisierenden Nukleinsäure-Abschnittes sowie dem Verhältnis der darin enthaltenen Nukleobasen zueinander (Abb. 14b). In diesem Zusammenhang spricht man oft von GC-Gehalt. Da sich zwischen Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, während es bei Adenin und Thymin nur zwei sind, fallen bei GC-reichen Sequenzabschnitten die Hybridisierungstemperaturen verhältnismäßig hoch aus. Hybridisierungsreaktionen von Nukleinsäuren können in Lösung oder auf Oberflächen erfolgen. Für Oberflächen-basierte Hybridisierungsnachweise wird ein Strang als Fänger-Molekül auf dem Substrat immobilisiert. Als sehr verbreitete Technologie sind DNA-Mikroarrays zu nennen, mit denen die orts aufgelöste Analyse einer Vielzahl von Sequenzen auf Oberflächen mit sehr kleinen Abmessungen möglich ist.

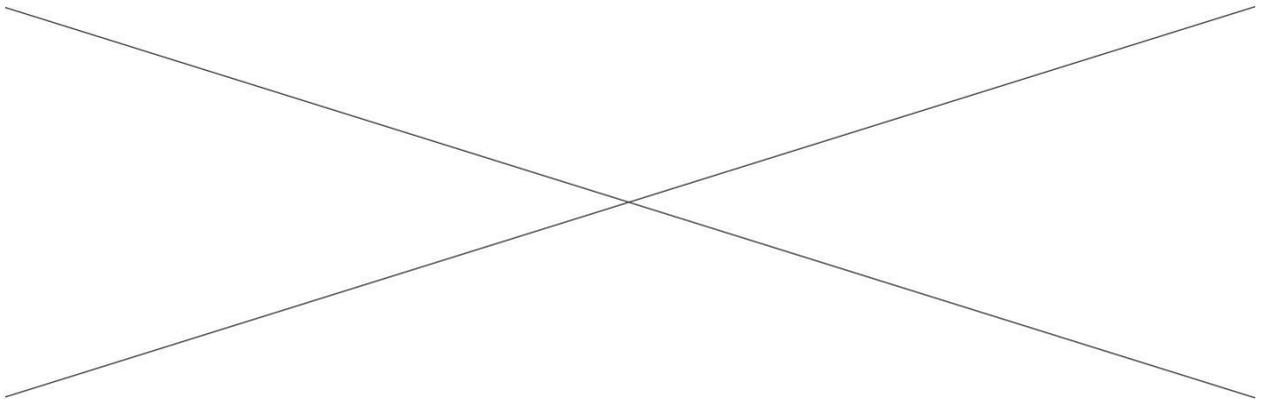


Abb. 14: DNA-Basenpaarung nach Watson und Crick [Q11] (a) und Berechnung der Hybridisierungstemperatur [Q12] [150] (b)

Bei Mikroarrays handelt es sich um eine geordnete Anordnung von spezifischen Proben auf einem planaren Substrat [151, 152]. Diese Proben stellen in der Regel Biomoleküle mit bekannter Struktur dar, die als Fänger-Moleküle agieren. Mikroarrays sind eine Weiterentwicklung der Southern-Blots [153], die auf Nitrozellulose oder Nylon-Membranen durchgeführt werden. Der Nachweis erfolgt über spezifische Bindungs- oder Hybridisierungsereignisse mit Ziel-Molekülen, die auf den Chip gegeben werden. Aufgrund der exakten Positionierung der Fänger-Moleküle auf der Chip-Oberfläche ist ein orts aufgelöster Nachweis der Ziel-Moleküle möglich [154, 155]. Mit Hilfe moderner Präparationstechniken können bis zu mehrere tausend Fänger-Moleküle auf wenigen Quadratcentimetern untergebracht werden. Damit wird die parallele Analyse einer Vielzahl an Proben bei geringem Verbrauch an Reagenzien möglich. Aus diesem Grund

eignen sich Mikroarrays besonders für umfangreiche qualitative Analysen. DNA-Mikroarrays dienen im Speziellen dem Nachweis von Nukleinsäuresequenzen mit Hilfe spezifischer Hybridisierungsreaktionen und sind für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Entwicklungen besonders von Bedeutung. Daneben können auch Proteine [156], Peptide [157] oder ganze Zellen [158] auf diese Weise untersucht werden. Als geeignete Chip-Substrate sind Glas, Kunststoff oder Silizium in der Literatur beschrieben. Um die Fänger-Moleküle auf der Oberfläche zu immobilisieren, sind in der Regel spezielle Oberflächenmodifikationen erforderlich. Zu diesem Zweck werden häufig Organosilane verwendet [159]. Zur Präparation von DNA-Mikroarrays existieren prinzipiell zwei Verfahrensweisen. Die Fänger-DNA, die oftmals durch Oligonukleotide mit einer Anzahl von 5 bis 120 Basen repräsentiert wird, kann entweder direkt auf dem Chip an den entsprechenden Positionen Base für Base synthetisiert (*in situ*) oder fertig hergestellt auf dem Chip immobilisiert werden (*ex situ*). Zur Herstellung der Mikroarrays mittels *in situ* Synthese kommen fotolithographische Verfahren oder das *Mikro Wet Printing* [160] zum Einsatz. Zum gezielten Aufbringen kleinster Flüssigkeitsvolumen mit gelösten Oligonukleotiden werden Spotter verwendet, wobei man zwischen Kontaktverfahren [161] und kontaktfreien Verfahren unterscheidet. Zur Detektion von Hybridisierungsereignissen auf DNA-Mikroarrays existieren verschiedene Markierungsverfahren. Dabei kann die Markierung über eine PCR-Reaktion durch entsprechend modifizierte Primer oder dNTPs in die Ziel-DNA eingebaut werden. Auch zweischrittige Hybridisierungsverfahren sind gebräuchlich. Dabei bleibt die Ziel-DNA unmarkiert und es wird über einen zweiten Hybridisierungsschritt ein markiertes Oligonukleotid an das überlappende, einzelsträngige DNA-Molekül gebunden. Die früher sehr verbreitete Markierung mit radioaktiven Isotopen ist heute weitgehend durch eine Vielzahl anderer Detektionsverfahren abgelöst wurden. Besonders verbreitet ist dabei die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen [1, 162]. Aber auch metallische Nanopartikel oder durch gekoppelte Enzyme katalysierte Produkte [163] werden zur Detektion genutzt. Außerdem kann auch eine markerfreie Detektion von Bindungsereignissen mittels Oberflächenplasmonenresonanz (kurz: SPR, *Surface Plasmon Resonance*) [164, 165] durchgeführt werden. Die Mikroarrays werden damit meistens optisch, sowie teilweise elektrisch [166] oder elektrochemisch [167] ausgelesen.

## 1.4 Motivation und Zielstellung

Die schematische Darstellung in Abb. 15 zeigt einen Überblick zu den technologischen und methodischen Inhalten der vorliegenden Arbeit.

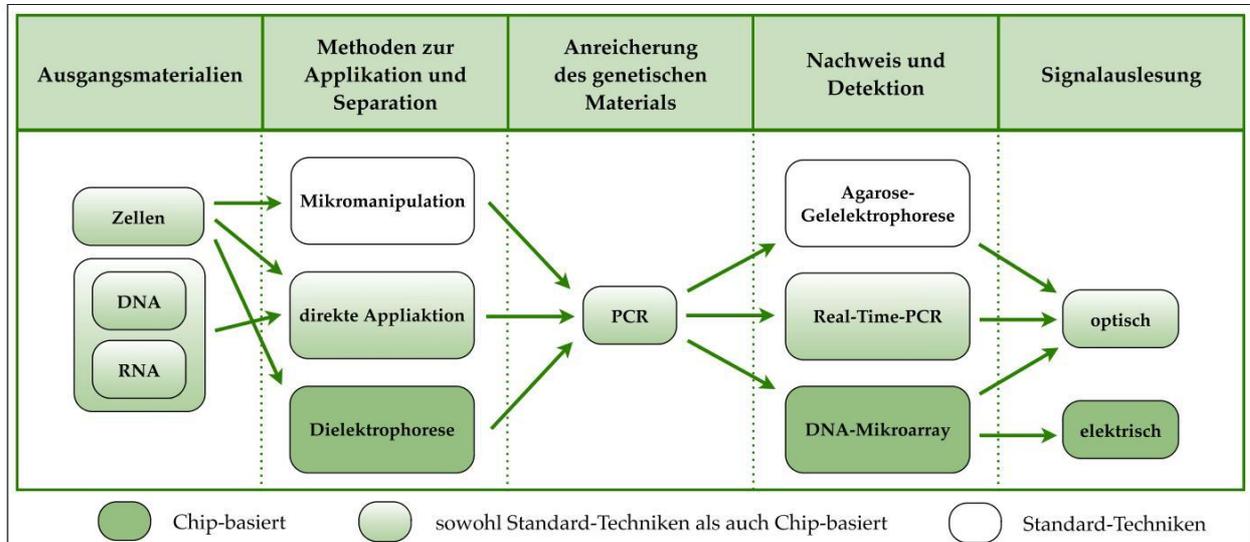


Abb. 15: Überblick zu den Inhalten der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung von Lab-on-a-Chip Systemen für die Nukleinsäure-basierte Bioanalytik. Dabei sollte das Verfahren der on-Chip Real-Time PCR weiter verbessert und die Funktionsfähigkeit anhand verschiedener Anwendung demonstriert werden. Auch die direkte Untersuchung von Zellen ohne vorherige Extraktion der DNA war Gegenstand der Forschung. Zudem wurden auf diesem Chip-System unterschiedliche, genetische Targets unter Anwendung verschiedener Detektionsprinzipien amplifiziert und detektiert, wobei auch die Bestimmung von Nachweisgrenzen, sowie der Reaktionseffizienz eine Rolle spielte.

Desweiteren sollte ein neues Chip-System entwickelt werden, welches die on-Chip PCR zur Anreicherung und Markierung von DNA mit einem elektrisch auslesbaren Mikroarray verknüpft. Die praktische Anwendbarkeit dieses Systems sollte anhand der Identifizierung verschiedener *Phytophthora*-Arten demonstriert werden.

Um das vorgegebene Ziel zu erreichen, wurden Kompatibilitätstests verschiedener, potentieller Chip-Materialien durchgeführt, das System mit dem dazugehörigem thermischen und fluidischen Management konstruiert, sowie Protokolle für die Chip-Präparation und die Nachweisreaktion etabliert. Untersuchungen zur Sensitivität und Spezifität des Systems gehörten ebenfalls zur Aufgabenstellung. Schließlich sollte ein kompaktes

Gesamtsystem für die schnelle und kostengünstige Identifizierung der verschiedenen *Phytophthora*-Arten entstehen.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

Die im Folgenden aufgelisteten Chemikalien, Enzyme und Hersteller-spezifischen Kits wurden bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten verwendet.

Name	Reinheitsgrad	Bezugsquelle
Aceton	≥ 99,8 % zur Analyse	Roth
Agarose	gentechnologische Qualität	Roth
Bromphenolblau	für die Elektrophorese	Roth
BSA	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
CaCl	≥ 94 %	Roth
Repel	2 %	Amersham Biosciences
DMSO	≥ 99,5 % zur Analyse	Roth
EDTA	≥ 99 % zur Analyse	Roth
Ethanol	≥ 99,8 % zur Analyse	Roth
Ethanolamin	≥ 99 % zur Synthese	Merck
Ethidiumbromid (5 mg/ml)	0,50 %	Roth
Glycerin	87 % zur Analyse	Merck
GOPS	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
HCl	37 % zur Analyse	Merck
Isopropanol	≥ 99,8 % zur Analyse	Roth
KCl	≥ 99,5 % zur Analyse	Merck
Mineralöl	für die Molekularbiologie	Sigma
Perfluoroktan	90 %	ABCR
Schwefelsäure	≥ 95 % zur Analyse	Roth
SDS-Puffer	20 %	Roth
Teflon AF	6 %	DuPond Fluoroproducts
Toluol	≥ 99,5 % zur Analyse	Roth
TRIS	≥ 99,8 % zur Analyse	Merck
Triton X-100	für die Molekularbiologie	Sigma-Aldrich
Tween 20	für die Molekularbiologie	Sigma-Aldrich
Wasser	für die Molekularbiologie	Roth
Wasserstoffperoxid	30 %	Roth

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Biochemikalien

Name	Konzentration	Bezugsquelle
Hot Start <i>Taq</i> mit Antikörper	5 Units/ $\mu$ l	Genaxxon
Marker fX174 RF DNA <i>Hinc II</i> (Marker 1)	250 $\mu$ g/ml	Thermo Scientific
Marker pUC19 <i>Msp I</i> (Marker 2)	250 $\mu$ g/ml	Roth
PBS-Puffer	10x	Roth
PCR dNTP-Mix	10 mM jeweils	Genaxxon
PCR Puffer X	10x	Genaxxon
Spotting Solution	4x	ArrayIt
SSC-Puffer	20x	Roth
Streptavidin-Peroxidase Polymer	1 mg/ml	Sigma
SYBR-Green	10000x	Invitrogen
TAE-Puffer	10x	Roth
<i>Taq</i> Polymerase S	5 Units/ $\mu$ l	Genaxxon
TE-Puffer	100x	Roth

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Biochemikalien

Name	Bezugsquelle
Bacillol Plus	Bode
Chemagic DNA Plant Kit	Chemagen
Deconex 50 FF	Bohrer
EnzMet for General Research Application	Nanoprobes
QIAGEN OneStep RT-PCR Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit	Dow Corning

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Biochemikalien

## 2.1.2 Biologische Proben

### 2.1.2.1 Oligonukleotide

Die in Tab. 5 aufgelisteten Oligonukleotide wurden bei der PCR als Primer eingesetzt, um die zu amplifizierenden DNA-Abschnitte zu begrenzen. Für einen anschließenden Nachweis mittels Mikroarray wurden modifizierte Primer verwendet, wodurch auch die entstehenden PCR-Produkte entsprechend markiert wurden. Um die Fänger-Oligonukleotide auf der Chip-Oberfläche zu immobilisieren, wurden diese mit einer Amino-Modifizierung versehen. Außerdem wurde bei einigen Real-Time PCR Experimenten eine mit speziellen Fluorophoren modifizierte TaqMan-Sonde eingesetzt. Diese Sonde sowie sämtliche Oligonukleotide für die Mikroarray-Präparation sind in Tab. 6 dargestellt. Sämtliche Oligonukleotide wurden von MWG Operon Biotech bezogen.

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Nukleotide	Modifikationen
Primer vorwärts <i>Phytophthora</i>	TGAACGCATATTGCACTTCC	20	keine
Primer rückwärts <i>Phytophthora</i>	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20	keine
Primer rückwärts <i>Phytophthora</i> Biotin	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20	5' Biotin
Primer vorwärts p53	GCTCTTAGGTCTGGCCCCTC	20	keine
Primer rückwärts p53	CAAACCAGACCTCAGGCGGC	20	keine
Primer rückwärts p53 FITC	CAAACCAGACCTCAGGCGGC	20	5' FITC
Primer vorwärts RPL13a	AGCTCATGAGGCTACGGAAA	20	keine
Primer rückwärts RPL13a	CTTGCTCCCAGCTTCCTATG	20	keine
Primer vorwärts Vimentin	GGCTCAGATTCAGGAACAGC	20	keine
Primer rückwärts Vimentin	GCTTCAACGGCAAAGTTCTC	20	keine
Primer vorwärts Gremlin	AACTTGGCCTACTGGCAATG	20	keine
Primer rückwärts Gremlin	TCTCGAGTTGCAAGGGTTCT	20	keine

Tabelle 5: Als Primer für die PCR verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Nukleotide	Modifikationen
TaqMan Sonde p53	TCTTATCCGAGTGGAAAGGAAATTTGCGTGTG	31	5' FAM, 3' TAMRA
Positivkontrolle	TTTTTTCAGCATGTGCTCCTTGATTCTATG	30	5' Amino C6, 3' FITC
Positivkontrolle	TTTTTTCAGCATGTGCTCCTTGATTCTATG	30	5' Amino C6, 3' Biotin
Negativkontrolle	TTTTTTCAGCATGTGCTCCTTGATTCTATG	30	5' Amino C6
Fänger p53	TCTTATCCGAGTGGAAAGGAAATTTGCGTGTG	31	5' Amino C6
Fänger <i>P. Gattung</i>	GGACGAAAGTCTCTGCTTTAACTAGATAG	30	5' Amino C6
Fänger <i>P. ramorum</i>	GAAACTTGTGTTGGCGGCTTCGGCTGCTGG	30	5' Amino C6
Fänger <i>P. lateralis</i>	GAAATTTGTGTTGGCAGCTTCGGCTGTTGG	30	5' Amino C6
Fänger <i>P. hibernalis</i>	ATAATGGAATTGGTTGTGGAAGCTTCCCG	29	5' Amino C6
Fänger <i>P. keroviae</i>	CAATTTTTTGTGTGCACGCTTTCGGGCGTT	30	5' Amino C6
Fänger <i>P. plurivora</i>	GGGAAGTTTGTGTGCACCTCGGTGCGCATC	30	5' Amino C6
Fänger <i>P. cinnamomi</i>	CTGTGTCTCTGCGGCGCACTTGTGTGCTTG	30	5' Amino C6
Fänger <i>P. alni</i>	CGCCCTTCGGTGGGCTGCGGGGTGGCATCT	30	5' Amino C6

Tabelle 6: Für den sequenzspezifischen DNA-Nachweis verwendete Oligonukleotide

### 2.1.2.2 Polynukelotide

Für den Nachweis von p53 wurde der dafür codierende Genabschnitt des Exon 6 inklusive flankierender Bereiche der Introns 5 und 6 aus extrahierter, humaner DNA verwendet. Der gesamte Genabschnitt, der bei der PCR eingesetzt wurde, hatte einen Umfang von 150 bp. Für den Nachweis und die Unterscheidung der verschiedenen *Phytophthora*-Arten wurde aufgereinigte, genomische DNA eingesetzt. Diese wurde entweder aus Reinkulturen oder infiziertem Blattmaterial gewonnen. Zur Verfügung gestellt wurden die Proben vom Julius-Kühn-Institut aus Braunschweig. Außerdem wurde am

Forschungszentrum Lobeda in Jena humane, genomische DNA sowie RNA aus HBME-Zellen extrahiert und bei PCR-Experimenten verwendet.

### 2.1.2.3 Zellen

Bei einigen PCR-Experimenten wurden anstelle von aufgereinigter DNA aus lysiertem Zellmaterial auch ganze Zellen als Ausgangsmaterial eingesetzt. Dabei wurden HBME-Zellen verwendet, die vom Forschungszentrum Lobeda zur Verfügung gestellt wurden sowie Zoosporen des Pflanzenpathogens *Phytophthora ramorum* vom Julius-Kühn-Institut.

### 2.1.3 Geräte

In der folgenden Tab. 7 sind alle verwendeten Geräte für die verschiedenen Arbeitsbereiche angegeben.

Verwendung	Gerät	Typ	Bezugsquelle
Chip-Kalibrierung	Thermoschrank	UFE 400	Memmert
	Multimeter	2000	Keithley
	Umschalt- und Steuersystem	7001	Keithley
Chip-Präparation	Flip-Chip-Bonder	HU/HP/PC C97299	Fine Tech electronic
	Piezo-Spotter	Nano Plotter 2.1	GeSiM
	Trockenschrank	T 5042	Heraeus
	Ultraschall-Reinigungsgerät	RK 100 H	Bandelin Sonorex
	UV-Lampe	NU-6 KL	Faust
	Kältethermostat	RE 104	Lauda
	Vakuumregler	CVC 2	Vakuubrand
	Wippschüttler	SSL4	Stuart
Flüssigkeitstransport	Schlauchpumpe	MS/CA_E/DC	Ismatec
Geldokumentation	UV-Lichtquelle	Superlite SUV-DC	Lumatec
	Transilluminator mit Haube	RH-5.1	Herolab
	Mikrowelle	M633	Samsung
	Elektrophoresekammer	Mupid-2	Cosmo Bio Co.
	CCD-Kamera	E.A.S.Y. 440K	Herolab
Oberflächenmodifikation	Schleudieranlage	Delta 10 TT	BLE Laboratory
	Temperaturregler	EKT 3001	Heidolph
Oberflächenmodifikation	Kühlanlage	CB10	Heto Lab Equipment
	Kontaktwinkelmessgerät	OCA 20	Dataphysics
	Muffelofen	S27	Nabertherm
PCR und Real-Time PCR	Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf

Verwendung	Gerät	Typ	Bezugsquelle
PCR und Real-Time PCR	Real-Time Thermocycler	ABI 7300	Applied Biosystems
	Real-Time Thermocycler	Rotor Gene	Corbett Research
Probenaufbewahrung	Gefrierschrank	G32783	Liebherr
Probenpräparation	DNA-Workstation	L020-GC	G. Kisker
	Dampfsterilisator	Varioklav	Thermo Scientific
	Magnetrührer	MR 3002	Heidolph
	Pipetten (0,2 - 1000 $\mu$ l)	Calibra digital	Socorex
	Spektrophotometer	V-670	Jasco
	Schüttelmischer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
	Analysenwaage	BA2105	Sartorius
	Mikrozentrifuge	miniSpin	Eppendorf
	Flockeneisbereiter	GB 902	Brema
	Zählkammer	T729.1	Roth
	Mikropräparationseinheit	aureka	aura optik
Mikroskopie	Homogenisator	Hand Model	Bioreba
	Mikroskop	Axio Imager.A1	Zeiss
	CCD-Kamera	SemsiCam	PCO

Tabelle 7: Verwendete Geräte

#### 2.1.4 Sonstige Materialien

Zum Flüssigkeitstransport durch die fluidischen Chip-Systeme wurden Peristaltikpumpen eingesetzt. An die Pumpen wurden dazu verschiedene Schläuche angeschlossen.

Material	Merkmale	Bezugsquelle
Schlauch Teflon-Kapillare	0,8 mm ( $\varnothing$ innen); 1,6 mm ( $\varnothing$ außen)	Jasco
Schlauch Tygon ST; R-3607	3 Stopper; 1,52 mm ( $\varnothing$ innen); 3,24 mm ( $\varnothing$ außen)	Ismatec
Glaswafer	Borofloat 33 (4"; 500, 700 und 1100 $\mu$ m)	Schott
UV-Küvetten	Mikro, 70-550 $\mu$ l, Y201.1	Roth
Deckel für UV-Küvetten	Y202.1	Roth

Tabelle 8: Verwendete, sonstige Materialien

#### 2.1.5 Software

Die im Folgenden (Tab. 9) aufgelistete Geräte- und Anwendungs-spezifische Software wurde ebenfalls verwendet.

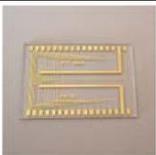
Verwendung	Gerät	Bezugsquelle
Geldokumentation	E.A.S.Y. Win 32	Herolab
PCR	Rotor-Gene Operating Software	Corbett Research
Probenpräparation	Jasco Software	Jasco
Mikroskopie	CamWare	PCO
Bildanalyse	ImageJ	National Institute of Health

Tabelle 9: Angewendete Software

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Verwendete Chip-Komponenten

Die folgende Tabelle (Tab. 10) zeigt eine Übersicht zu allen verwendeten Chip-Komponenten.

Chip-Komponente	Substratmaterial (Dicke)	Herstellung	Oberflächenmodifikation	Anwendung
 1 <i>PCR-Chip</i>	Glas (700 $\mu\text{m}$ )	Mikrostrukturierung	keine	- on-Chip (Real-Time) PCR - PCR-Chip-Modul
 2 <i>Mikroarray-Chip</i>	Glas (500 $\mu\text{m}$ )	Siebdruck	GOPS	- DNA-Chip-Modul
 3 <i>Mikroarray-Chip-Komponente</i>	Glas (1100 $\mu\text{m}$ )	Mikrostrukturierung	verschieden	- Kombiniertes Chip-System
 4 <i>PCR-Probenträger</i>	Glas (500 $\mu\text{m}$ )	Mikrostrukturierung	Repel-Silan Teflon AF	- on-Chip (Real-Time) PCR

Chip-Komponente	Substratmaterial (Dicke)	Herstellung	Oberflächenmodifikation	Anwendung
 <p>5 <i>PCR-Kammer-Chip</i></p>	PDMS (800 $\mu\text{m}$ ) Glas (170 $\mu\text{m}$ )	Silikonabformung + Verkleben	keine	- on-Chip (Real-Time) PCR - PCR-Chip-Modul
 <p>6 <i>Silikonabformung für Mikroarray-Chip</i></p>	PDMS (800 $\mu\text{m}$ )	Silikonabformung	keine	- DNA-Chip-Modul
 <p>7 <i>Mikrofluidik-Chip-Komponente</i></p>	PMDS (750 $\mu\text{m}$ )	Silikonabformung	keine	- Kombiniertes Chip-System
 <p>8 <i>PCR-DEP-Chip</i></p>	Glas (500 $\mu\text{m}$ )	Mikrostrukturierung	Repel-Silan Teflon AF	- Dielektrophorese - on-Chip (Real-Time) PCR

Tabelle 10: Verwendete Chip-Komponente

### 2.2.1.1 Herstellung von PCR- und Mikroarray-Chips mit metallischen Strukturen

Für die durchgeführten Arbeiten im Bereich der Nukleinsäure-basierten Bioanalytik wurden im Wesentlichen zwei Arten von Chips mit metallischen Strukturen erzeugt und verwendet. Zum einen der PCR-Chip, welcher mittels integrierter Strukturen autonom temperiert werden kann. Und zum anderen DNA-Chips mit Elektrodenstrukturen für Mikroarray-Experimente, die eine elektrische Auslesung des Messergebnisses ermöglichen.

#### a) Mikrostrukturierte Chips

Für die Herstellung der PCR-Chips (Abb. 16) wurden 700  $\mu\text{m}$  dicke 4" Glaswafer verwendet. Diese wurden nacheinander mit einer Haftschiicht aus NiCr, einer 120 nm dicken Platinschiicht und einer 400 nm dicken Goldschicht versehen. Über fotolithografi-

sche Techniken sowie nasschemische Ätzprozesse wurde zunächst die Gold- und anschließend die Platinschicht strukturiert. Die erzeugten Platinstrukturen stellen Heizer- und Temperatursensoren dar mit Zuleitungen und Bondpads zur elektronischen Verknüpfung an zwei Außenseiten der Chips. In der Mitte der PCR-Strukturen befinden sich optisch transparente Detektionsfenster. Innerhalb dieser Bereiche wurden die metallischen Strukturen vollständig entfernt. Auf jedem der ca. 19 x 20 mm großen PCR-Chips wurden auf diese Weise vier PCR-Strukturen erzeugt.

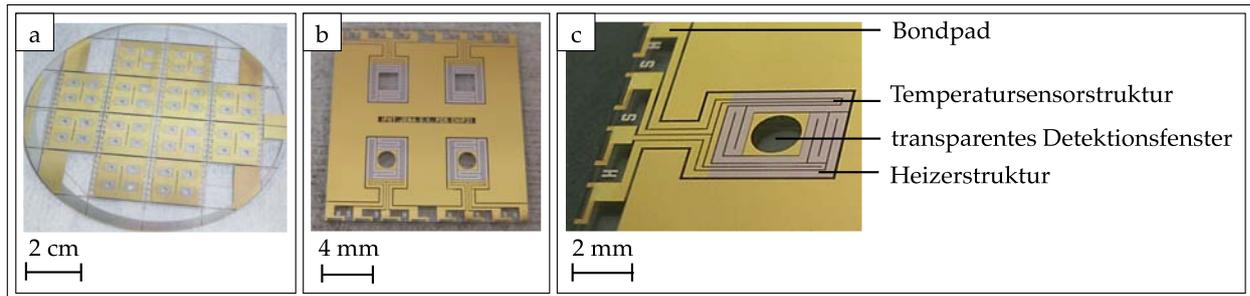


Abb. 16: PCR-Chip mit mikrostrukturierten Heizern und Temperatursensoren  
(a - Wafer, b- Einzelchip, c - vergrößerte Darstellung einer PCR-Struktur)

Auf einem 4" Wafer (10,16 cm Durchmesser) können 10 solcher PCR-Chips hergestellt werden. Im Anschluss an die Strukturierung der Gold- und Platinschichten wurde eine Passivierungsschicht aus 600 nm SiON und 600 nm SiO<sub>2</sub> aufgetragen. Diese sollte die metallischen Strukturen vor dem Kontakt mit Reaktionslösungen und dadurch möglichen Kurzschlüssen bewahren. An den Bondpads wurden die SiON und SiO<sub>2</sub>-Schichten wiederum entfernt, da sonst kein elektrischer Kontakt zu den Heizer- und Temperatursensorstrukturen hergestellt werden konnte.

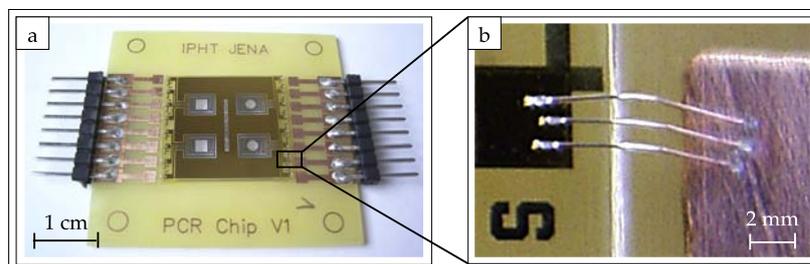


Abb. 17: PCR-Chip auf Platine (a) und vergrößerte Darstellung der Bonddrähte (b)

Im Anschluss an den Strukturierungsprozess wurden die Chips mit einer Wafersäge vereinzelt und schließlich auf Platinen fixiert, die Kupfer-Strukturen und Steckverbindungen zum Anschluss an einen Temperaturregler enthalten (Abb. 17 a). Zwischen dem

Chip und den Kupferbahnen wurde über Bonddrähte, welche mit Hilfe eines Ultraschallbonders fixiert werden, ein elektrischer Kontakt hergestellt (Abb. 17).

Um eine exakte Temperaturregelung zu gewährleisten, war eine Kalibrierung der PCR-Chips erforderlich. Zu diesem Zweck wurden die Chips in einem Ofen auf 40 °C, 55 °C, 70 °C und 90 °C temperiert und jeweils die Widerstandswerte gemessen. Aus dieser Messung ergab sich eine Temperatur-Widerstands-Kennlinie mit entsprechender Geradengleichung, auf deren Basis die Temperaturregelung erfolgte.

Die Mikroarray-Chip-Komponenten (siehe Tab. 10, Nr. 3) wurden ebenfalls mit Mikrostrukturierungsverfahren hergestellt, da das Elektrodenlayout im Verlauf der Arbeit entwickelt und optimiert werden sollte. Aufgrund der vor Ort zur Verfügung stehenden Technologie für die Mikrostrukturierung, konnten Änderungen zeitnah umgesetzt werden. Diese 22 mm x 32 mm großen Chips wurden am IPHT unter Einbeziehung des Reinraums gefertigt. Dabei wurde auf die 1,1 mm dicken 4" Borofloat Glaswafer zunächst eine 5 nm Haftsicht aus Titan und anschließend eine 400 nm Gold-Schicht aufgebracht. Die Elektrodenstrukturen wurden fotolithografisch hergestellt. Dabei werden mit entsprechenden Masken Schutzlacke aufgetragen und mittels nasschemischer Ätzprozesse die gewünschten Elektrodenstrukturen erzeugt. Auf einem Wafer können acht solcher Chips hergestellt werden.

Bei den Chips zur Dielektrophorese sowie PCR (siehe Tab. 10, Nr. 8) wurde eine NiCr-Schicht auf ein 500  $\mu\text{m}$  Glas-Substrat aufgebracht. Die Strukturierung erfolgte ebenfalls fotolithografisch, sowie mittels nasschemischer Ätzprozesse. Aufgrund der geringen Chip-Größe von nur 8 x 9 mm konnten 72 Chips auf einem 4" Wafer hergestellt werden.

#### b) *Chips mit Siebdruck-Strukturen*

Bei der Herstellung einer weiteren Sorte elektrisch auswertbarer DNA-Chips für Mikroarray-Experimente wurden auf der Oberfläche der Chips Goldstrukturen durch Siebdruckverfahren (*Screen Printing*) erzeugt (siehe Tab. 10, Nr. 2). Bei diesem Prozess wird Goldpaste durch eine Maske mit Siebstruktur auf die Glassubstrate gedruckt. Im Anschluss an den Druckprozess werden die Chips temperiert, wodurch die Metallpaste aushärtet und sich mit der Chipoberfläche verbindet. Die auf diese Weise hergestellten Chips mit Abmessungen von 13 mm x 13 mm und einer Höhe von 500  $\mu\text{m}$  besitzen 42 Elektrodenspalte mit einer Spaltgröße von jeweils 50  $\mu\text{m}$ . Es werden jeweils 9 Chips auf einem 5,1 cm x 5,1 cm großem Glas-Substrat hergestellt und schließlich vereinzelt.

### 2.2.1.2 Herstellung von Silikon-Abformungen mit mikrofluidischen Halbkanälen

Zur Herstellung von Silikon-Abformungen mit integrierten Halbkanälen wurde das Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit von Dow Corning verwendet. Dieses Kit enthält zwei separate Komponenten. Die dickflüssige Basislösung besteht im wesentlichen aus Dimethylsiloxan-Monomeren, welche unter Zugabe des ebenfalls flüssigen Vernetzers im Verhältnis 1:10 formfestes, elastisches PDMS (Polydimethylsiloxan) ausbildet. Die Mischung wurde unter Vakuum entgast und in gefräste Formen gegossen. Die Formen repräsentierten jeweils einen Abdruck der herzustellenden Abformungen. Im Anschluss an den Gießprozess wurde erneut entgast und die Form verschlossen. Die Aushärtung erfolgte für ca. 16 h bei Raumtemperatur und anschließend 4 h bei 45 °C. Danach wurden die ausgehärteten Abformungen vorsichtig aus der Gussform gelöst. Um die Polymerisation zu vervollständigen und die Abformungen im Vorfeld der bioanalytischen Nachweisreaktionen zu sterilisieren, wurden diese für 2 h unter UV-Licht bestrahlt und vor Gebrauch für eine Stunde bei 100 °C temperiert. Auf diese Weise wurden verschiedene Silikon-Abformungen mit geöffneten Halbkanälen hergestellt (siehe Tab. 10, Nr. 5, 6 und 7).

### 2.2.1.3 Oberflächenmodifikationen

Für die unterschiedlichen, bioanalytischen Anwendungen wurden prinzipiell zwei verschiedene Oberflächenbeschichtungen angewendet. Bei der Durchführung der PCR im Chip-Format hat sich eine Beschichtung mit Dichlordimethylsilan (Repel-Silan) und Polytetrafluorethylen (Teflon) bewährt (Abb. 18a und 18b). Durch die hohe Hydrophobizität dieser Oberflächen wird eine Anlagerung und damit einhergehende Funktionsbeeinträchtigung von Komponenten aus dem PCR-Ansatz unterbunden.

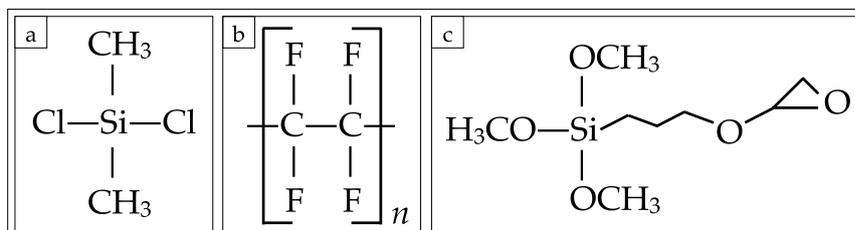


Abb. 18: Strukturformeln von Repel-Silan, Teflon und GOPS

Eine Voraussetzung für erfolgreiche Mikroarray-Experimente besteht in der sorgfältigen Immobilisierung der Fänger-Moleküle auf der Chip-Oberfläche. Um die Amino-modifizierten Oligonukleotide kovalent auf den Chips anbinden zu können, wurden sämtliche Mikroarray-Chips mit 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan (GOPS) beschichtet (Abb. 18c). Im Vorfeld der Beschichtung wurden die Chips für je 5 min im Ultraschallbad mit Aceton, Ethanol und deionisiertem Wasser vorgereinigt und anschließend zunächst unter Stickstoff und dann im Trockenschrank bei 100 °C für 5 min getrocknet. Zur Erzeugung freier Bindungsstellen für die beiden verwendeten Silane wurden die Chips einer Oberflächenaktivierung unterzogen. Dabei wurden zwei verschiedene Methoden angewendet. Glas-Chips ohne metallische Mikrostrukturen wurden für 10 min in einem Gemisch aus 30 %igem Wasserstoffperoxid und 96 %iger Schwefelsäure im Verhältnis 1:4 aktiviert. Diese Lösung wird nach ihrem Erfinder Heinrich Caro auch als Carosche Säure bezeichnet, wobei auch andere Mischungsverhältnisse beschrieben sind [168]. Im Anschluss an die Aktivierung wurden die Chips gründlich mit deionisiertem Wasser gespült sowie im Stickstoffstrom und im Trockenschrank für 5 min bei 100 °C getrocknet. Zur Oberflächenaktivierung von Chips mit metallischen Strukturen wurde eine andere Methode angewendet, da die Säure die Strukturen angreift. In diesem Fall erfolgte die Aktivierung in einem zweistufigen Plasmaätzprozess. Dazu wurde auf die Chips zunächst für 30 s Argonplasma und dann für 5 min Sauerstoffplasma einwirken lassen. Beides jeweils bei 50 W und 5 Pa. Die Plasmabehandlung dient sowohl der Entfernung organischer Verunreinigungen als auch der Oberflächenaktivierung durch Erzeugung von Hydroxylgruppen auf der Chip-Oberfläche. Die Silanisierung sollte unmittelbar im Anschluss an die Aktivierung erfolgen, da die erzeugten Hydroxylgruppen auf der Chipoberfläche nicht über einen längeren Zeitraum stabil bleiben.

Für die Beschichtung mit Repel-Silan wurden die für PCR-Experimente vorgesehenen Chips, Wafer oder Probenträger mit der 2 %igen Repel-Silan-Lösung für 10 min benetzt. Danach erfolgte gründliches Spülen mit Isopropanol und deionisiertem Wasser sowie Trocknen der Chips unter Stickstoff und im Trockenschrank bei 100 °C für 1 h. Für die Beschichtung mit Teflon wurde aus der vorhandenen 6 %igen Lösung mit Perfluoroktan eine 0,1 %ige Lösung hergestellt. Diese wurde dann mit Hilfe einer Lackschleuder in einem dreischrittigen Protokoll auf die bereits mit Repel-Silan beschichteten Chips aufgebracht. Dabei wird zunächst die nötige Menge an Teflon-Lösung auf die Chips bzw. Wafer aufgegeben, sodass diese vollständig benetzt sind und dann für 5 s bei 500 U/min sowie für 60 s bei 3000 U/min geschleudert. Zwischen den Schleuderzyklen wird

die Teflonschicht jeweils für 30 min bei 160 °C ausgehärtet. Im Anschluss an den letzten Beschichtungsschritt erfolgt diese Temperierung für 5 h.

Chips, die für Mikroarray-Experimente vorgesehen sind, wurden im Anschluss an die Aktivierung mit Glycidoxypropoyltrimethoxysilan (GOPS) beschichtet. Dazu wurden die Chips für 5 h in eine 10 mM GOPS-Lösung in getrocknetem Toluol bei 70 °C gegeben. Anschließend verblieben die Chips weitere 16 h in der Silanisierungslösung. Die Silanisierung erfolgt unter wasserfreier Bedingungen, was durch das Anlegen einer Argonatmosphäre als Inertgas zusätzlich unterstützt wurde. Im Anschluss an die Silanisierung wurden die Chips zweimal für 5 min in Toluol gewaschen sowie in einem Exsikkator unter Vakuum getrocknet und darin unter Lichtausschluss gelagert.

#### 2.2.1.4 Probenräger für die tropfenbasierte on-Chip PCR

Für die Herstellung der Probenräger (siehe Tab. 10, Nr. 4) wurden 500  $\mu\text{m}$  dicke 4" Glaswafer verwendet. Diese wurden nach dem beschriebenen Protokoll mit Repel-Silan sowie Teflon beschichtet und strukturiert, wodurch schließlich auf jedem Probenräger vier kreisförmige Strukturen aus hydrophilen und hydrophoben Bereichen erzeugt wurden. Die Strukturierung erfolgt durch Auftragen von Fotolack, Belichtung sowie einem Trockenätzvorgang mit Sauerstoffplasma für 10 min bei 70 W und 5 Pa. Im Anschluss an den Strukturierungsprozess wurden die Chips mit einer Wafer-säge vereinzelt, sodass 16 x 18 mm große Chip entstehen. Aus einem 4" Wafer konnten auf diese Weise 16 Probenräger hergestellt werden. Die kreisförmigen Strukturen ermöglichen zum Einen die optimale Einbettung der PCR-Lösung in den Mineralöltropfen und damit ausreichenden Schutz vor Verdunstung. Zum Anderen wird so der Tropfen auf seiner Position fixiert und kann dadurch im Verlauf der Reaktion nicht verrutschen. Dadurch wird sichergestellt, dass bei jeder Messung die gesamte, von der PCR-Lösung ausgehende Fluoreszenzintensität, erfasst wird.

#### 2.2.1.5 Mikroarray-Präparation

Um PCR-Produkte mit Hilfe von Mikroarrays nachweisen zu können, ist es nötig, spezifische Oligonukleotide als Fänger-Moleküle auf der Chip-Oberfläche zu immobilisieren. Zu diesem Zweck wurden alle verwendeten einzelsträngigen Fänger-Oligonukleotide jeweils am 5'-Ende mit einer Amino-Gruppe modifiziert. Damit kann eine kovalente Bindung mit der GOPS-Oberfläche hergestellt werden (Abb. 19).

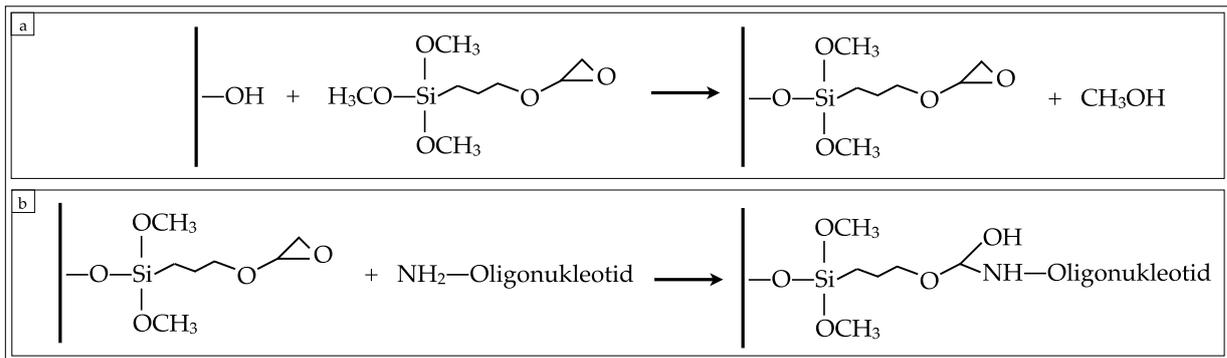


Abb. 19: Darstellung der Anbindung von GOPS an einer Chip-Oberfläche und Kopplung mit Amino-modifiziertem Oligonukleotid

Die Fänger-Oligonukleotide repräsentierten Sequenzabschnitte, die komplementär zu Abschnitten der nachzuweisenden PCR-Produkte sind. Durch die definierte Positionierung der Fänger-Oligonukleotide in Form punktförmiger Spots auf dem Mikroarray können mittels Hybridisierungsreaktion bestimmte Nukleinsäure-Sequenzen ortsauflöst untersucht werden. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde stets auch eine Positivkontrolle sowie Negativkontrollen mitgeführt. Bei der Positivkontrolle handelte es sich um ein nicht-komplementäres Oligonukleotid gleicher Länge, welches direkt mit einem Markermolekül für Auslesung oder Nachweis versehen ist. Als Markermoleküle wurde Fluoreszeinthiocyanat (FITC) oder Biotin verwendet. Bei einer Markierung mit Biotin wird über Streptavidin-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase an den entsprechenden Spots elementares Silber abgeschieden. Damit konnten die Mikroarrays entweder optisch oder elektrisch ausgelesen werden. Als Negativkontrollen wurden ebenfalls eine nicht-komplementäre Sequenz sowie die Pufferlösung eingesetzt. Dadurch kann überprüft werden, ob unspezifische Anlagerung von Silber oder den zu hybridisierenden PCR-Produkte auftreten. Die Anordnung der verschiedenen Oligonukleotide sowie die Anzahl der je Probe erzeugten Spots wurde im Rahmen der unterschiedlichen Versuche und Fragestellungen variiert und angepasst. Die verschiedenen Oligonukleotide wurden in speziellen Puffern gelöst auf die Chips gebracht. Dazu wurden Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  (p53-Nachweis) und 20  $\mu\text{M}$  (*Phytophthora*-Nachweis) eingesetzt. Das Aufbringen der Spots erfolgte mit einem piezoelektrischen, kontaktlosen Spotterverfahren. Dabei wurden je Spot 4,8 nl der Oligonukleotid-Lösungen aufgetragen. Zur Immobilisierung der Oligonukleotide auf den Chip-Oberflächen wurden drei verschiedenen Methoden angewendet. Dabei wurden die Chips entweder für 16 h bei 37 °C in eine feuchten Kammer gelegt oder für 10 min mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm im Abstand von 20 cm belichtet. Am häufigsten wurde die Metho-

de eines alternierenden Wechsels zwischen Eintrocknung der Tropfen für 5 min bei 80 °C und Rehydratisierung in der Feuchtkammer für 10 min bei Raumtemperatur angewendet. Um konstante Bedingungen bei der Benutzung einer feuchten Kammer zu gewährleisten, wurde stets eine Petrischale mit 94 mm Durchmesser mit saugfähigem Zellstoff ausgelegt und 500 µl 0,1 M KCl hineingegeben. Im Anschluss an die Immobilisierung der Oligonukleotide wurden die Chips mit verschiedenen Lösungen gewaschen. Dabei sollten ungebundene Oligonukleotide und Salzreste des Puffers entfernt, sowie die nicht mit Oligonukleotiden besetzten Stellen durch Ethanolamin blockiert werden, um unspezifische Anlagerungen der zu hybridisierenden DNA-Fragmente zu verhindern. Das Waschprotokoll setzte sich folgendermaßen zusammen:

1. 5 min 0,1x Triton X 100
2. 1 min 0,0037 % HCl
3. 1 min 0,0037 % HCl
4. 10 min 0,1 M KCl
5. 1 min deionisiertes Wasser
6. 15 min 50 mM Ethanolamin; 0,1 % SDS; 0,1 M Tris
7. 1 min deionisiertes Wasser

Anschließend wurden die Chips mit Stickstoff getrocknet und für maximal vier Wochen unter Lichtausschluss bis zur Benutzung gelagert.

## 2.2.2 Probenpräparation

### 2.2.2.1 DNA-Extraktion

Die Funktionsfähigkeit des entwickelten Systems sollte auch im Bezug auf pflanzliche Proben nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurde mit verschiedenen *Phytophthora*-Arten infiziertes Blattmaterial von Rhododendron der Sorte „Cunninghams White“ verwendet. Die Blattstücke wurden in spezielle Extraktionstüten gegeben und mit einem Homogenisator bearbeitet. In den Tüten befindet sich ein Vlies, das feste von flüssigen Bestandteilen trennt und somit die Entnahme von Blattsaft ermöglicht. Aus diesem Blattsaft wurde mittels magnetischer Partikel mit spezieller Oberflächenmodifikation die DNA extrahiert. Auf gleiche Weise wurde auch DNA aus *Phytophthora*-Reinkul-

turen extrahiert. Dazu wurde das Probenmaterial zuvor mit einem Mörser und einem Pistill homogenisiert.

### 2.2.2.2 Herstellung definierter Ausgangskonzentrationen an DNA

Um Versuchsreihen mit verschiedenen Ausgangskonzentrationen an DNA durchführen zu können, wurden Stammlösungen mit definierten Konzentrationen erstellt. Die DNA aus diesen Stammlösungen wurde dann den PCR-Ansätzen zugeführt. Mit Hilfe von Konzentrationsreihen aus PCR-Ansätzen mit verschiedenen DNA-Konzentrationen kann man Aussagen über Nachweisgrenzen bzw. die Effizienz eines PCR- oder Thermocycler-Systems gewinnen. Um eine ausreichende Menge hochkonzentrierter DNA-Fragmente zu erhalten wurden diese zunächst mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion angereichert. Dazu wurde für jede DNA-Probe ein PCR-Ansatz von 100  $\mu\text{l}$  hergestellt. Nach der PCR erfolgte die säulenchromatografische Aufreinigung. Um die Konzentration der DNA-Fragmente exakt zu bestimmen, wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie das Absorptionsmaximum im Bereich von 257 bis 260 nm bestimmt. In Abb. 20 ist ein typisches UV/Vis-Spektrum von aufgereinigter DNA-Lösung dargestellt.

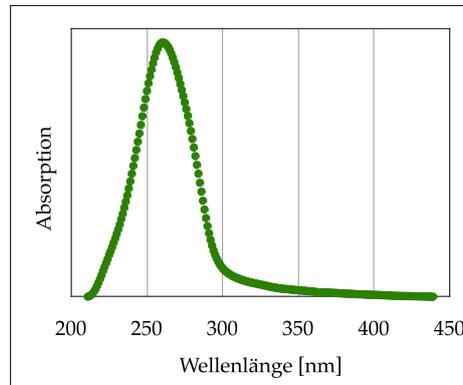


Abb. 20: Typisches UV/Vis-Spektrum DNA

Zur Berechnung der DNA-Konzentrationen wurden die in Abb. 21 dargestellten Formeln benutzt.

$c_1 = 50 \cdot Abs_{\max}$	$c_2 = \frac{c_1 \cdot 1000}{660 \cdot N}$	$c_3 = \frac{c_2}{6,022 \cdot 10^{11}}$	c - Konzentration Abs <sub>max</sub> - Absorptionsmaximum N - Anzahl der Basenpaare
-----------------------------	--	---	---

Abb. 21: Berechnung der DNA-Konzentration

Im Anschluss an die exakte Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die DNA dekadisch auf definierte Konzentrationen verdünnt. Diese Stammlösungen wurden dann bei der Erstellung von PCR-Ansätzen verwendet.

### 2.2.2.3 Separation von Zellen

Bei einigen PCR-Ansätzen wurden Zellen anstelle von aufgereinigten Nukleinsäuren als Ausgangsmaterial dem PCR-Ansatz zugeführt. Die verschiedenen Methoden, die bei der PCR mit HBME-Zellen oder *Phytophthora*-Sporen angewendet wurden, um Zellen in möglichst definierter Anzahl dem Reaktionsansatz zuzuführen, werden im Folgenden näher beschrieben.

#### a) *Verwendung verdünnter Zellsuspension*

Die Zellen wurden mittels einer Zählkammer gezählt und die Konzentration bezogen auf ein bestimmtes Volumen berechnet. Die Zellsuspension wurde dann entsprechend verdünnt und in den PCR-Ansatz bzw. auf den Probenträger für die Chip-PCR oder in das Reaktionsgefäß gegeben, sodass der PCR-Ansatz die gewünschte Konzentration enthielt.

#### b) *Verwendung einer Mikromanipulationseinheit mit Glaskapillare*

Bei dem angewendeten System („Aureka“) handelt es sich um eine Mikromanipulationseinheit, die an ein Stereomikroskop zur optischen Kontrolle angeschlossen ist (Abb. 22).



Abb. 22: Stereomikroskop mit Mikromanipulationseinheit („Aureka“) [Q14]

Mit Hilfe einer Glaskapillare, die an eine Ölpumpe angeschlossen ist, wurden einzelne Zellen aus der Suspension aufgenommen und ebenfalls unter optischer Kontrolle auf Probenträgern für die on-Chip PCR oder in Reaktionsgefäßen für die konventionelle PCR platziert. Dazu wird an der Zielposition jeweils 1  $\mu\text{l}$  DEPC-behandeltes Wasser aufgetragen. In diesen Tropfen wurde die Kapillare eingetaucht und die Zelle ausgestoßen.

c) *Separation von Zellen mittels Dielektrophorese*

Neben der mechanischen Manipulation von Zellen ist auch eine elektrische Separation möglich. Zu diesem Zweck wurde im Rahmen dieser Arbeit die Methode der Dielektrophorese (siehe 1.3.1.2) angewendet. Nachdem Zellsuspension auf den Chip gegeben wurde, erfolgte die Separation durch Anlegen eines elektrischen Wechselfeldes. Die kontaktierten Elektroden auf dem Chip wurden nach der Größe des entsprechenden Elektrodenspaltes ausgewählt. Im Anschluss an den Separationsvorgang wurden ungebundenen Zellen durch Waschen entfernt.

## 2.2.3 Amplifikation von Nukleinsäuren

### 2.2.3.1 PCR-Ansätze

Prinzipiell wurden zwei verschiedene Arten von Ansätzen erstellt. Die Zusammensetzung war dabei abhängig vom Ausgangsmaterial. Beim Einsatz von RNA beispielsweise wurde dem Ansatz reverse Transkriptase zugeführt. Dieses Enzym transformiert die einzelsträngige, Uracil-haltige RNA in doppelsträngige, Thymin-haltige DNA. Außerdem wurde in diesem Fall RNA-Ribonuklease zugesetzt, um die Lösung vor Verunreinigung mit RNAsen zu schützen. Bei den durchgeführten Experimenten wurden reverse Transkriptase und Polymerase zusammen in einem Ansatz gegeben, sodass beide Reaktionen ohne Unterbrechung direkt hintereinander durchgeführt werden konnten. Die Enzym-Mischung setzt sich zusammen aus zwei verschiedenen Arten von reverser Transkriptase (Omniscrypt und Sensiscrypt) sowie einer Hot Start DNA Polymerase. Bei der Verwendung von DNA wurde ein Standard-Ansatz eingesetzt. Die zugesetzte Q-Solution verstärkt die Effizienz und Spezifität der PCR. BSA wird bei allen Experimenten als Blockierungsreagenz in einer bestimmten Konzentration zugegeben, da es bei der on-Chip-PCR die Inhibierung der *Taq* DNA-Polymerase an den Chip-Oberflä-

chen unterbindet. Zur besseren Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse wurde BSA auch bei der PCR mit dem konventionellen Thermocycler verwendet.

Prinzipiell wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit stets die gleiche Zusammensetzung des PCR-Ansatzes auf dem Chip und bei konventionellen Verfahren verwendet. Die in Tab. 11 angegebene Zusammensetzung bezieht sich jeweils auf ein Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$ .

Ansatz 1 (DNA oder <i>Phytophthora</i> -Sporen als Ausgangsmaterial)	Ansatz 2 (RNA oder HBME-Zellen als Ausgangsmaterial)
23 $\mu\text{l}$ DEPC behandeltes Wasser	6 $\mu\text{l}$ RNase freies Wasser
5 $\mu\text{l}$ 10 $\mu\text{M}$ BSA	10 $\mu\text{l}$ 10x RT-PCR Puffer
5 $\mu\text{l}$ 10x Puffer X	5 $\mu\text{l}$ 10 $\mu\text{M}$ BSA
10 $\mu\text{l}$ 5x Q-Solution	8 $\mu\text{l}$ 5x Q-Solution
1 $\mu\text{l}$ dNTP-Mix (je 10 mM)	2 $\mu\text{l}$ dNTP-Mix (je 10 mM)
2 $\mu\text{l}$ 10 $\mu\text{M}$ Primer vorwärts	2 $\mu\text{l}$ RT-PCR Enzym-Mix
2 $\mu\text{l}$ 10 $\mu\text{M}$ Primer rückwärts	7,5 $\mu\text{l}$ 20 $\mu\text{M}$ Primer vorwärts
1 $\mu\text{l}$ 5 Units/ $\mu\text{l}$ <i>Taq</i> DNA-Polymerase	7,5 $\mu\text{l}$ 20 $\mu\text{M}$ Primer rückwärts
1 $\mu\text{l}$ DNA oder Sporen in Lösung	1 $\mu\text{l}$ RNA Ribonuklease
	1 $\mu\text{l}$ RNA oder Zellen in Lösung

Tab. 11: Prinzipielle Zusammensetzung der angewendeten PCR-Ansätze

### 2.2.3.2 PCR-Protokolle

#### a) *Amplifikation von DNA*

Zur Amplifikation der unterschiedlichen PCR-Produkte wurden verschiedene Temperaturprotokolle verwendet. Diese unterscheiden sich vor allem bei der Annealing-Temperatur, da diese sowohl von der Länge als auch der Sequenz der Primer abhängig ist. Nur bei genauer Abstimmung der Annealing-Temperatur auf die jeweiligen Primer ist deren spezifische Hybridisierung an die Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes möglich. Dadurch wird gewährleistet, dass keine unspezifischen Nebenprodukte synthetisiert werden. Die optimale Elongationstemperatur beträgt 72  $^{\circ}\text{C}$ , kann allerdings ebenfalls variiert werden. Dadurch ist es in einigen Fällen auch möglich, ein PCR-Protokoll anzuwenden, bei dem Annealing und Elongation bei einer gemeinsamen Temperatur stattfinden (z. B. bei der Amplifikation des ausgewählten p53-Genabschnittes). Bei allen angewendeten Protokollen wurden jeweils 45 PCR-Zyklen durchgeführt.

Die erste Denaturierung erfolgte jeweils für 180 s bei 94 °C mit Standard-*Taq*-Polymerase und 10 min 94 °C mit Hot Start-Polymerase. Diese spezielle Polymerase wird mit Hilfe eines konjugierten Antikörpers inaktiviert und ist dadurch bei Raumtemperatur wesentlich stabiler, als die Standard *Taq*-Polymerase. Die deutlich längere Denaturierung zu Beginn der PCR bewirkt eine Zerstörung dieses Antikörpers und aktiviert dadurch das Enzym. In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 12) sind die unterschiedlichen PCR-Protokolle für je einen PCR-Zyklus angegeben, von denen bei den durchgeführten Experimenten ausgegangen wurde.

PCR-Produkt	Standard-Protokoll
ITS 2-Genabschnitt ( <i>Phytophthora</i> )	60 s 94 °C (Denaturierung) 60 s 50 °C (Annealing) 120 s 72 °C (Elongation)
p53-Genabschnitt ( <i>human</i> )	40 s 94 °C (Denaturierung) 40 s 60 °C (Annealing + Elongation)
RPL13A-, Vimentin- und Gremlin-Genabschnitt ( <i>human</i> )	30 s 94 °C (Denaturierung) 60 s 60 °C (Annealing) 60 s 72 °C (Elongation)

Tabelle 12: Ausgangs-PCR-Protokolle

### b) Zell-Lyse und reverse Transkription

Neben der Verwendung von DNA als Ausgangsmaterial bei der PCR ist es auch möglich, RNA oder Zellen direkt in den PCR-Ansatz zu geben. Um ein Gelingen der Amplifikation zu gewährleisten, werden einige Schritte im Vorfeld der PCR nötig, die allerdings direkt mit der Reaktion gekoppelt werden können. Werden beispielsweise Zellen verwendet, so müssen diese zuvor lysiert werden, damit das genetische Material für die Reaktion zugänglich wird.

Zellen wurden mit einem Flüssigkeitsvolumen von 1 µl auf den Probenträger für die Chip-PCR oder in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben. Nachdem die Tropfen eingetrocknet waren, wurden die Chips sowie die Reaktionsgefäße bei -80 °C für mindestens 30 min eingefroren. In diesem Zustand können die separierten Zellen auch einige Tage aufbewahrt werden. Dann wurden die Reaktionsgefäße im konventionellen Thermocycler und die Probenträger auf den PCR-Chips appliziert, wo sie für 5 min bei 75 °C und für 2 min bei 95 °C temperiert wurden. Anschließend wurde in die abgekühlten Reaktionsgefäße und auf die Probenträger der PCR-Ansatz sowie Mineralöl gegeben und

schließlich die Amplifikation gestartet. Die reverse Transkription zur Umwandlung von RNA in DNA erfolgte für 30 min bei 58 °C.

## 2.2.4 Detektion von PCR-Produkten

### 2.2.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Identifizierung und Unterscheidung der PCR-Produkte kann im Anschluss an die Amplifikation eine Gelelektrophorese durchgeführt werden. Bei den durchgeführten Experimente wurden ausschließlich 3 %ige Agarosegele mit 1x TAE Puffer sowie einem Gehalt von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Als Laufpuffer wurde 1x TAE Puffer mit einem Ethidiumbromidgehalt von 0,4 µg/ml angewendet. Für den Nachweis wurde jeweils stets 1 µl PCR-Lösung (Probe) bzw. PCR-Ansatz (Negativkontrolle) zusammen mit 1 µl Probenpuffer in eine der Taschen des Gels gefüllt. Der Probenpuffer enthielt 100 µg/ml Bromphenolblau, 0,1x TAE und 30 % Glycerol. Durch Zugabe eines DNA-Größenmarkers kann die Länge der Fragmente anhand der durch das Ethidiumbromid sichtbaren Banden abgeschätzt werden. Die verwendeten DNA-Größenmarker sind in Abb. 23 dargestellt.

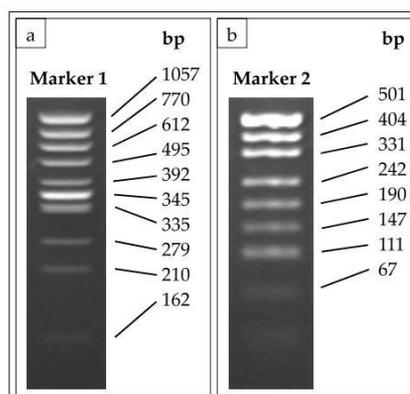


Abb. 23: Verwendete DNA-Größenmarker (a - DNA- Größenmarker 1, b - DNA-Größenmarker 2)

### 2.2.4.2 Real-Time PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion kann mit einer Fluoreszenz-basierten Real-Time Detektion kombiniert werden, die bereits während der Reaktion eine Analyse der PCR-Produkte zulässt. Zu diesem Zweck wurde entweder SYBR Green (Abb. 24) als Interkalator oder eine Sequenz-spezifische TaqMan-Sonde dem PCR-Ansatz zugeführt (siehe Ab-

schnitt 1.3.3.2). Zusätzlich zur unter 2.2.3.1 angegebenen Zusammensetzung wird dabei jeweils entweder 0,5  $\mu\text{l}$  20x SYBR-Green oder 0,5  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  TaqMan-Sonde zu dem 50  $\mu\text{l}$  umfassenden PCR-Ansatz gegeben.

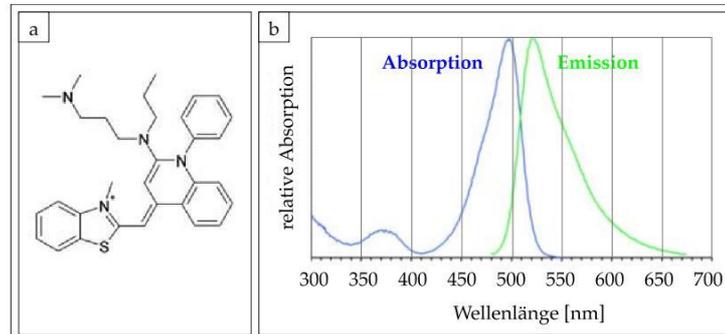


Abb. 24: SYBR-Green [Q15] (a - Strukturformel, b - Absorptions- und Emissionsspektrum)

Bei der verwendeten Sonde handelt es sich um ein einzelsträngiges Oligonukleotid aus 31 Basen, dessen Enden mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen modifiziert sind (siehe Tab. 6). Am 5'-Ende dieser TaqMan-Sonde befindet sich dabei Carboxyfluorescein (FAM) und am 3'-Ende Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA). Die Strukturformeln sowie Anregungs- und Emissionsspektren dieser Fluoreszenzfarbstoffe sind in Abb. 25 dargestellt.

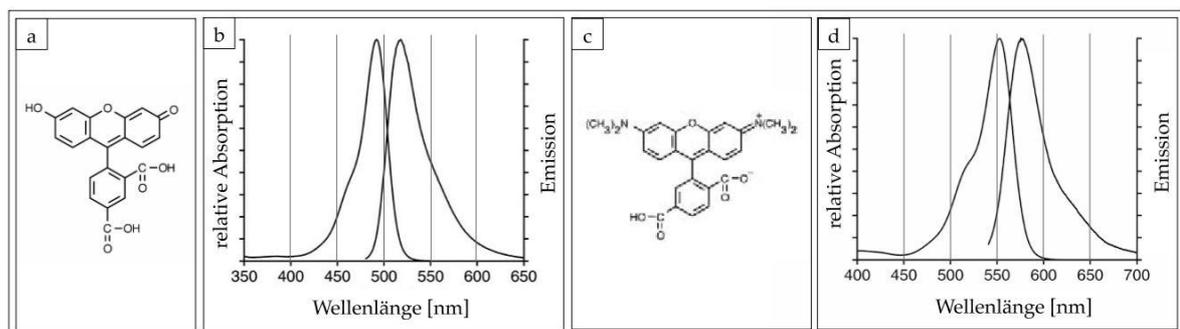


Abb. 25: FAM (a, b) und TAMRA (c, d) [Q16-Q19]

(a und c - Strukturformeln, b und d - Absorptions- und Emissionsspektren)

Der Detektor ist mit entsprechenden Filtern ausgestattet, sodass eine Detektion im Bereich von 500 bis 520 nm erfolgt. Zur Anregung wurde eine blaue LED mit einem Wellenlängenbereich zwischen 450 und 500 nm eingesetzt. Damit können SYBR-Green und FAM mit dem on-Chip Real-Time PCR System detektiert werden. TAMRA wirkt bei der Sonde als Quencher, da sich dessen Absorptionsmaximum mit dem Emissionsmaxi-

zum von FAM überschneidet, wodurch bei räumlicher Nähe der Farbstoffe zueinander ein Energieübertrag stattfindet.

Als Detektor wurde ein Photomultiplier verwendet. Die Übertragung des Anregungs- und Emissionslichtes erfolgte durch optische Fasern, die unterhalb vom transparenten Detektionsfenster des Chips angeordnet wurden (Abb. 26).

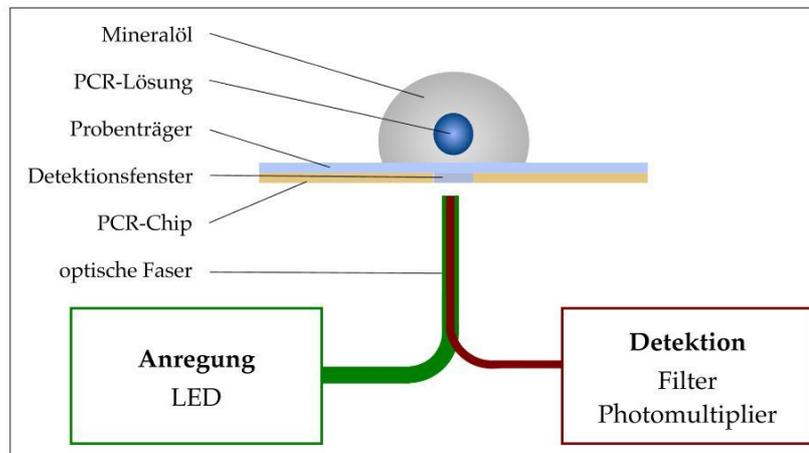


Abb. 26: Schematische Darstellung des Detektionsaufbaus

In Verbindung mit dem angeschlossenen Temperaturregler sowie der Software wird auch die Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse ermöglicht. Für eine derartige Analyse eignet sich SYBR-Green aufgrund des reversiblen Bindemechanismus sehr gut. Die Fluoreszenzintensität wird durch die unterschiedlichen Gerätetechnologien in unterschiedlichen Maßeinheiten wiedergegeben. Beim System für die on-Chip Real-Time PCR erfolgt die Angabe der Anzahl der Photonen, der verwendeten Real-Time-Thermocycler erstellt dagegen eine prozentuale Skala für die Fluoreszenzintensität. Der Verlauf der Kurven ist dabei absolut vergleichbar.

#### 2.2.4.3 Hybridisierungsnachweis

Für den Nachweis von PCR-Produkten mittels Hybridisierung auf Mikroarrays wurden prinzipiell zwei verschiedene Markierungen der Ziel-DNA eingesetzt, entweder fluoreszierendes FITC oder Biotin (Abb. 27). Beide Moleküle können endständig an Oligonukleotide geknüpft werden, welche in dieser Form kommerziell erhältlich sind. Im Fall von FITC konnte der Mikroarray direkt nach der Hybridisierung und dem Waschen optisch mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgelesen werden. An das Biotin dagegen wurde zunächst Streptavidin-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase angebunden, um mit

deren Hilfe elementares Silber an den betreffenden Stellen des Mikroarrays abzuscheiden. In diesem Fall kann der Mikroarray sowohl optisch als auch elektrisch ausgelesen werden.

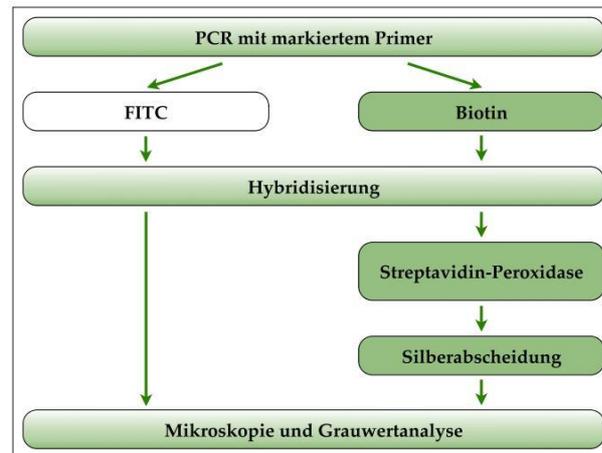


Abb. 27: Angewendete Detektionsmethoden und optische Detektion

Vorraussetzung für die elektrische Detektion ist allerdings, dass die Spots innerhalb von Elektrodenspalten auf entsprechend strukturierten Chips positioniert wurden. Die Vorgehensweise bei beiden Verfahren beinhaltet zunächst die Herstellung der Hybridisierungslösung. Dazu wurde die PCR-Lösung unter Zugabe bestimmter Puffer 1:5 verdünnt, sodass die Hybridisierungslösung letztlich eine Konzentration von 5x SSC und 0,1 % SDS aufweist. Da für die Hybridisierung DNA-Einzelstränge erforderlich sind, um sich mit den ebenfalls einzelsträngigen und auf der Oberfläche der Mikroarrays immobilisierten Oligonukleotiden zu verbinden, wurde die Hybridisierungslösung für 5 min bei 94 °C denaturiert und direkt anschließend für weitere 5 min bei ca. 0 °C gekühlt. Durch diese rapide Abkühlung der denaturierten DNA konnten die Einzelstränge fixiert und an einer Renaturierung gehindert werden. Nach der Überführung der Reaktionslösung auf den bereits auf Hybridisierungstemperatur erwärmten Chip erfolgte dann die spezifische Hybridisierung an die komplementären Fänger-Oligonukleotide. Für diesen Schritt wurden verschiedene Protokollvarianten hinsichtlich Hybridisierungstemperatur und -dauer sowie zusätzlicher Bewegung der Ziel-DNA angewendet (siehe 3.2.3). Im Anschluss an die Hybridisierung wurde ungebundene DNA gewaschen. Für die Enzymbindung wurde eine 2 µg/ml Lösung von Streptavidin-gekoppelter Meerrettich-Peroxidase in 1x PBS und 0,05 % Tween 20 Puffer hergestellt und auf den Mikroarray gegeben. Nach der Anbindung, die ebenfalls unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt wurde, erfolgte wiederum ein Waschschritt mit 1x PBS und

0,05 % Tween 20 Puffer sowie kurz mit deionisiertem Wasser. Das Spülen mit Wasser bewirkt, dass die im Puffer enthaltenen Chlorid-Ionen entfernt werden, da sich sonst Silberchlorid anstelle von elementarem Silber bilden würde. Schließlich wurde die Reaktionslösung zur Silberabscheidung entsprechend der Herstellerangaben präpariert und ebenfalls auf den Chip gegeben. Die Abscheidung wird nach 5 min mit deionisiertem Wasser gestoppt und die Chips optisch und elektrisch vermessen. Für den Fall, dass noch keine elektrischen Signale messbar waren, obwohl an bestimmten Spots Silber abgeschieden wurde, erfolgte eine Nachverstärkung. Dazu wurde erneut Reaktionslösung zur Silberabscheidung hergestellt und jeweils für zwei Minuten auf die Chips gegeben, mit deionisiertem Wasser gespült und gemessen. Dieser Vorgang der Nachverstärkung wurde bis zu 4 mal wiederholt.

Zum Zweck der optischen Auswertung der Ergebnisse wurden mikroskopische Aufnahmen der einzelnen Spots angefertigt und daran eine Grauwertanalyse durchgeführt. Dazu wurde jeweils mit einer exakt definierten Fläche der Grauwert innerhalb eines Spots sowie der Wert für den Hintergrund bestimmt. Die Messwerte wurden schließlich normiert und Mittelwerte aus mehreren Messungen berechnet. Da die Grauwerte nach Korrektur des Hintergrundsignals bei den Silberspots im Vergleich zu den Fluoreszenzspots im negativen Bereich liegen und mit steigender Signalintensität kleiner werden, wurde in diesen Fällen der Betrag gebildet.

Bei der elektrischen Detektion wurde jeweils der Widerstand an den einzelnen Elektrodenspalten gemessen und die Leitfähigkeit nach der in Abb. 28 dargestellten Formel bestimmt.

$G = \frac{1}{R} \quad R = \frac{U}{I}$	G - Leitwert R - Widerstand U - Spannung I - Stromstärke
---	---

Abb. 28: Berechnung des Leitwertes

Ist der Spalt nicht ausreichend durch abgeschiedenes Silber überbrückt, so ist der Widerstand sehr groß und der Stromfluss sehr klein. Bei dem verwendeten Messgerät wurde ein Schwellenwert von  $1 \mu\Omega$  für die Messbarkeit festgelegt. Aus den gemessenen Widerstandswerten wurde die Leitfähigkeit berechnet, ein Mittelwert aus mehreren Messungen bestimmt und im logarithmischen Maßstab dargestellt.

## 3 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel sind alle wesentlichen Ergebnisse dargestellt, die zur Entwicklung bzw. Weiterentwicklung der beiden Lab-on-a-Chip Systeme beigetragen haben sowie deren Funktionsfähigkeit und Anwendbarkeit demonstrieren (Abb. 29). Dabei ist das Kapitel in zwei Hauptabschnitte eingeteilt, worin jeweils die Ergebnisse zur on-Chip Real-Time PCR sowie zur Kombination von on-Chip PCR und DNA-Mikroarray erläutert sind.

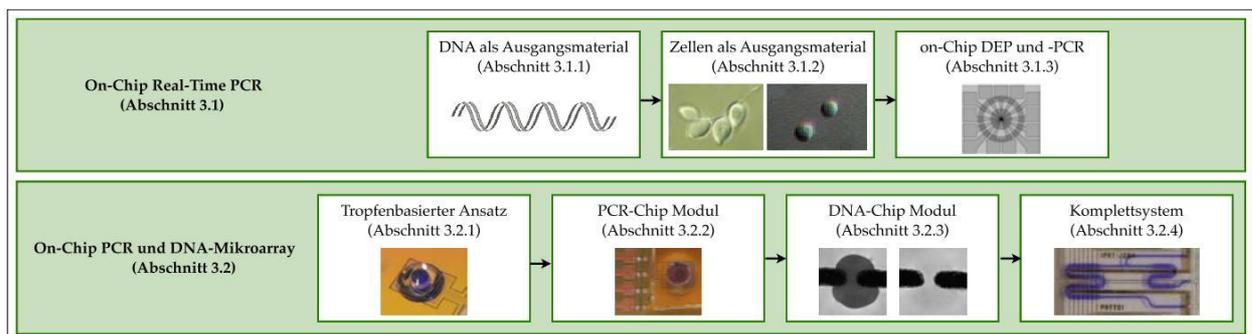


Abb. 29: Übersicht zu den dargestellten Ergebnissen

### 3.1 On-Chip Real-Time-PCR

Bei der tropfenbasierten on-Chip Real-Time PCR wurde sowohl DNA als auch RNA dem PCR-Ansatz zugeführt. Neben aufgereinigten Nukleinsäuren kamen auch Zellen bzw. Sporen bei der PCR zum Einsatz.

#### 3.1.1 Oberflächenmodifikation der Probenträger

Für die Herstellung der Probenträger wurden Glaswafer benutzt und entsprechend der Angaben unter 2.2.1.3 mit Repel-Silan und Teflon beschichtet. Im Anschluss wurde die Beschichtung an punkt- bzw. kreisförmigen Strukturen durch trockenchemische Ätzvorgänge entfernt, sodass Bereiche mit unterschiedlichen Benetzungseigenschaften für Mineralöl und PCR-Lösung entstanden. Eine schematische Darstellung des resultierenden Beschichtungsmusters ist in Abb. 30a sichtbar. Die resultierenden Randwinkel von PCR-Lösung und Mineralöl auf unbeschichtetem Glas sowie der Repel-Silan/Teflon-Oberfläche sind aus Abb. 89 (siehe Seite 92) ersichtlich. Durch die spezielle Oberflächenstruktur ist es möglich, kleine Volumina an wässriger PCR-Lösung in einen Trop-

fen aus Mineralöl einzuschließen (Abb. 30b). Damit ist die PCR-Lösung im Verlauf der Reaktion vor Verdunstung geschützt. Die spezielle, punktförmige Struktur gewährleistet außerdem, dass die Reaktionslösung im Verlauf der PCR in der Mitte des Tropfens verbleibt und damit eine stabile Signalintensität während der Reaktion gewährleistet wird. Um Kontaminationen zu verhindern, wird jede der Strukturen nur einmal benutzt. Der Probenträger, welcher auf den PCR-Chip aufgelegt wird, bietet dabei eine kostengünstige Alternative zur direkten Applikation auf dem mikrostrukturierten PCR-Chip.

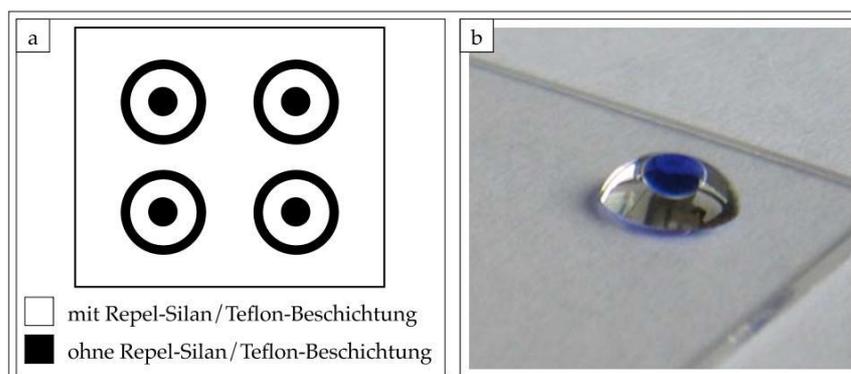


Abb. 30: Schematische Darstellung zur Oberflächenmodifikation des Probenträgers (a) und resultierende Gestalt des applizierten Tropfens (b)

### 3.1.2 Applikation von DNA bei der PCR

#### 3.1.2.1 Bestimmung von Nachweisgrenzen und PCR-Effizienzen

Um die Sensitivität der tropfenbasierten on-Chip PCR zu demonstrieren, wurden PCR-Ansätze mit unterschiedlichen DNA-Ausgangskonzentrationen erstellt und die Amplifikation bei gleichzeitiger Real-Time Detektion durchgeführt. Eine hohe Sensitivität bei der PCR ist oftmals notwendig, da der DNA-Gehalt in realen Proben nur sehr gering ausfällt bzw. nur geringe Mengen an Probenmaterial gewonnen werden können. Um einen Vergleich zu ermöglichen, wurden alle Versuche stets auf dem PCR-Chip und mit dem konventionellen Real-Time-Cycler durchgeführt. Für die Versuche wurden alle Reaktionsparameter inkl. der Zusammensetzung der Lösung, der Protokolldauer und des Probenvolumens identisch angewendet, um eine hohe Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Konzentrationsreihen mit verschiedenen DNA-Mengen im PCR-Ansatz werden nicht nur genutzt, um die Nachweisgrenze der Amplifikation unter den gegebenen Bedingungen zu bestimmen, sondern auch zur Erstellung einer Standardgerade. Diese

kann bei der Ermittlung unbekannter Nukleinsäure-Konzentrationen in einer Probe genutzt oder zur Bestimmung der Reaktionseffizienz angewendet werden.

Für die im folgenden Abschnitt dargestellten Konzentrationsreihen wurden Sequenzbereiche des für p53 codierenden Genabschnittes sowie der ribosomalen DNA von *Phytophthora* eingesetzt. Zum Nachweis des Genabschnittes wurde neben SYBR-Green als interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff außerdem eine Fluoreszenz-markierte TaqMan-Sonde bei der Real-Time PCR eingesetzt.

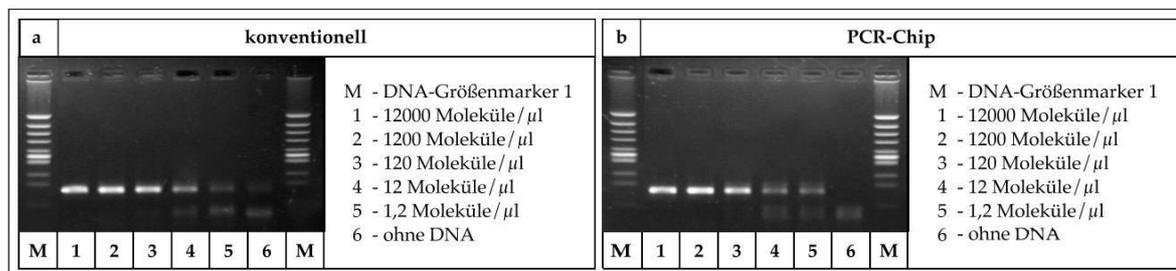


Abb. 31: Agarosegele zur Bestimmung der Nachweisgrenze bei der Amplifikation des ausgewählten p35-Genabschnittes (a - konventionell, b - PCR-Chip)

Die in Abb. 31 dargestellten Agarosegele zeigen die PCR-Produkte des p53-Genabschnittes nach der Amplifikation mit verschiedenen DNA-Ausgangskonzentrationen im Bereich zwischen 12000 und 1,2 Molekülen/μl im konventionellen System (Abb. 31a) sowie auf dem PCR-Chip (Abb. 31b). Es ist deutlich zu erkennen, dass in beiden Fällen auch eine Konzentration von nur 1,2 Molekülen/μl im PCR-Ansatz nachgewiesen werden konnte, wobei die entsprechende Bande beim PCR-Chip intensiver ausfällt. Die Ausgangskonzentration an DNA im PCR-Ansatz liegt damit im Bereich weniger Attogramm/μl. Bei einem eingesetzten Gesamtvolumen von 3 μl an PCR-Lösung konnte damit eine Gesamtzahl von drei bis vier DNA-Molekülen zuverlässig nachgewiesen werden. Damit weist sowohl der PCR-Chip wie auch der konventionelle Thermocycler bei Anwendung des gleichen PCR-Protokolls eine hohe Sensitivität auf.

Mit zunehmender DNA-Ausgangskonzentration steigt auch die Fluoreszenzintensität der entsprechenden Banden im Gel. Bei der Negativkontrolle wurde kein entsprechendes PCR-Produkt amplifiziert. Allerdings ist eine Bande im unteren Gel-Bereich erkennbar, welche auf Nebenprodukte wie Primer-Dimere hindeutet. Diese deutlich kürzeren Fragmente bilden sich aufgrund ihres Überschusses zunehmend bei geringen DNA-Konzentrationen im PCR-Ansatz. Für die Versuche wurde ein zeitlich optimiertes PCR-Protokoll mit 4 s Denaturierung und 15 s gemeinsamer Annealing/Elongationsphase angewendet. Damit konnte letztlich auch demonstriert werden, dass bei zeit-

lich optimierten PCR-Protokollen zum Zweck besonders schneller Analysen die Sensitivität bei der PCR in keiner Weise beeinträchtigt ist.

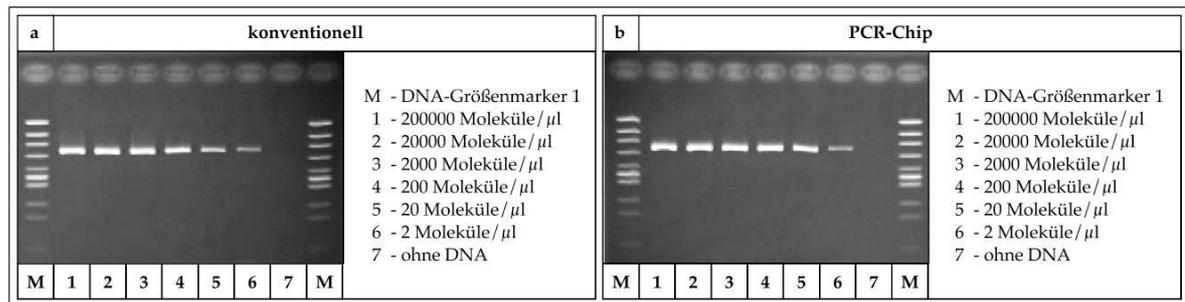


Abb. 32: Agarosegele zur Bestimmung der Nachweisgrenze bei der Amplifikation eines ausgewählten Abschnittes der ribosomalen DNA von *Phytophthora* (a - konventionell, b - PCR-Chip)

Auch bei der Amplifikation vom 550 bp umfassenden Genabschnitt des Phytopathogens *Phytophthora* konnten geringste DNA-Ausgangskonzentrationen von nur 2 Molekülen/ $\mu\text{l}$  im PCR-Ansatz nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser PCR-Konzentrationsreihe sind in den Agarosegelen in Abb. 32 dargestellt. Für diese Versuche wurde ein Standard-Protokoll mit 60 s Denaturierung, 60 s Annealing und 120 s Elongation angewendet. Unspezifische Nebenprodukte werden im Verlauf der Reaktion nicht gebildet. Deshalb sind bei dieser Versuchsreihe nur die Produktbanden im Gel erkennbar. Bei der Negativkontrolle ist entsprechend der Erwartung keine Bande sichtbar. Die Ergebnisse der Chip-PCR sind ebenfalls absolut vergleichbar mit dem konventionellen Thermocycler.

#### a) Produkt-unspezifische Detektion mit SYBR-Green

Die Ergebnisse der Fluoreszenz-basierten Real-Time Detektion bei der Amplifikation des p53-Genabschnittes mit dem PCR-Chip (Abb. 33a) und dem konventionellen Thermocycler (Abb. 34a) zeigen typische, sigmoidale Kurvenverläufe mit einer Anlaufphase und einem exponentiellen Anstieg, der schließlich in einen Sättigungswert übergeht. Dabei kann ein zeitlich versetzter Anstieg mit abnehmender DNA-Konzentration im Verlauf der PCR beobachtet werden. Auch die Sättigungswerte der Fluoreszenzintensität nehmen entsprechend ab. Die Abstände zwischen den Kurven, vor allem im Bereich zwischen 120000 und 12 Moleküle/ $\mu\text{l}$  sind sehr gleichmäßig, was sich durch eine hohe Regression der  $c_t$ -Werte bei der Standardgerade bestätigt. Bei der geringsten DNA-Konzentration wirken sich statistische Schwankungen stärker aus, weshalb der Abstand der entsprechenden Kurve innerhalb der Reihe geringfügig abweichen kann. Da SYBR-

Green lediglich eine sequenz-unspezifische Detektion ermöglicht und damit sämtliche, doppelsträngige DNA inklusive der Primer-Dimere detektiert wird, ist auch im Fall der Negativkontrolle beim angewendeten Protokoll für den Nachweis des p53-Genabschnittes ein Anstieg der Fluoreszenzintensität erkennbar.

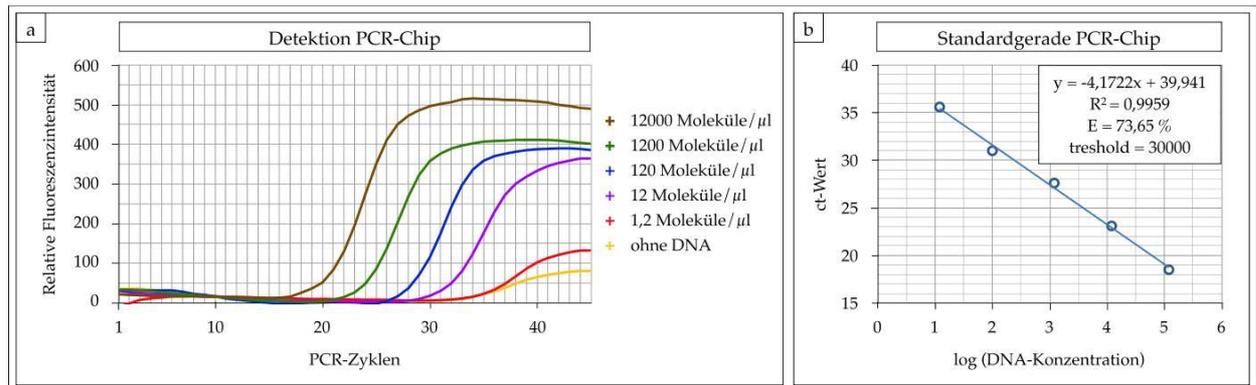


Abb. 33: Ergebnisse der Real-Time PCR mit dem PCR-Chip bei der Amplifikation des p53-Genabschnittes (a - Real-Time Detektion, b - Standardgerade mit Angabe der PCR-Effizienz)

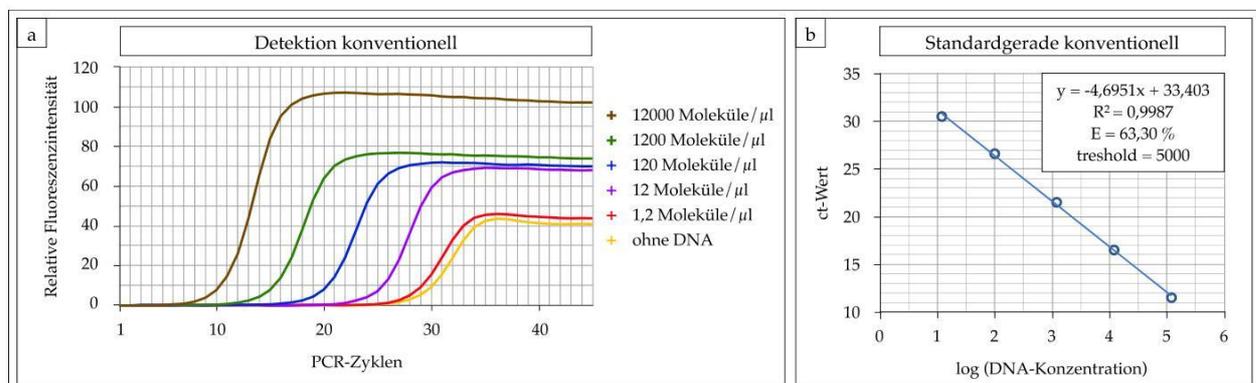


Abb. 34: Ergebnisse der Real-Time PCR mit dem konventionellen Thermocycler bei der Amplifikation des p53-Genabschnittes (a - Real-Time Detektion, b - Standardgerade mit Angabe der PCR-Effizienz)

Beim Vergleich der Kurvenverläufe von Chip-basierter und konventioneller PCR fällt außerdem auf, dass im Fall der konventionellen PCR die Kurven insgesamt um ca. 8 Zyklen früher ansteigen und die Abstände etwas größer sind. Diese größeren Abstände wirken sich direkt auf den Anstieg der ermittelten Standardgerade aus (Abb. 33b und 34b). Dabei ist der Anstieg der Standardgeraden umso größer, je geringer die Abstände der einzelnen Kurven einer Konzentrationsreihe zueinander sind. Damit ergibt sich bei Berechnung der PCR-Effizienz für den PCR-Chip ein Wert von 74 % und für den konventionellen Thermocycler ein Wert von 63 %. Die Schwellenwerte zur Bestimmung der  $c_t$ -Werte wurden mit einer relativen Fluoreszenzintensität von 30000 beim PCR-Chip und 5000 beim konventionellen Thermocycler festgelegt.

Obwohl beim Einsatz von SYBR-Green im Verlauf der Real-Time-Detektion auch unspezifische Nebenprodukte detektiert werden, erlaubt der reversible Bindemechanismus dieser fluoreszierenden Moleküle die Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse. Dabei wird die Reaktionslösung bei kontinuierlicher Messung der Fluoreszenzintensität langsam und gleichmäßig erhitzt. Bei einer bestimmten Temperatur denaturieren die PCR-Produkte, wodurch ein sprunghaftes Absinken der Fluoreszenzintensität messbar wird. Bei Darstellung der ersten Ableitung des Fluoreszenzsignals nach der Temperatur ergibt sich an dieser Stelle ein deutlich erkennbarer Peak. Die Schmelzkurven zur Konzentrationsreihe mit dem p53-Genabschnitt sind in Abb. 35 dargestellt. Im Fall des konventionellen Thermocyclers befindet sich das Peakmaximum bei 81,5 °C, bei der on-Chip PCR sind es rund 80 °C. Diese Differenz ist auf eine unterschiedliche Wärmeübertragung während der Reaktion, resultierend aus der unterschiedlichen Bauweise und Temperaturregelung der Thermocycler-Systeme, zurückzuführen. Die Schmelztemperatur eines DNA-Fragmentes ist abhängig von der Anzahl der Basenpaare sowie dem Gehalt an Guanin und Cytosin. Aufgrund der Sequenz-unspezifischen Detektion mit SYBR-Green ergibt sich auch bei der Negativkontrolle im Fall des p53-Nachweises ein Peak, allerdings bei deutlich niedrigeren Temperaturen von 77,5 °C bzw. 76 °C. Diese niedrigere Schmelztemperatur deutet auf die kurzen Nebenprodukte hin. Eine Schmelzkurvenanalyse ermöglicht damit zusätzlich zur quantitativen Analyse durch die Real-Time PCR auch eine qualitative Analyse der amplifizierten PCR-Produkte.

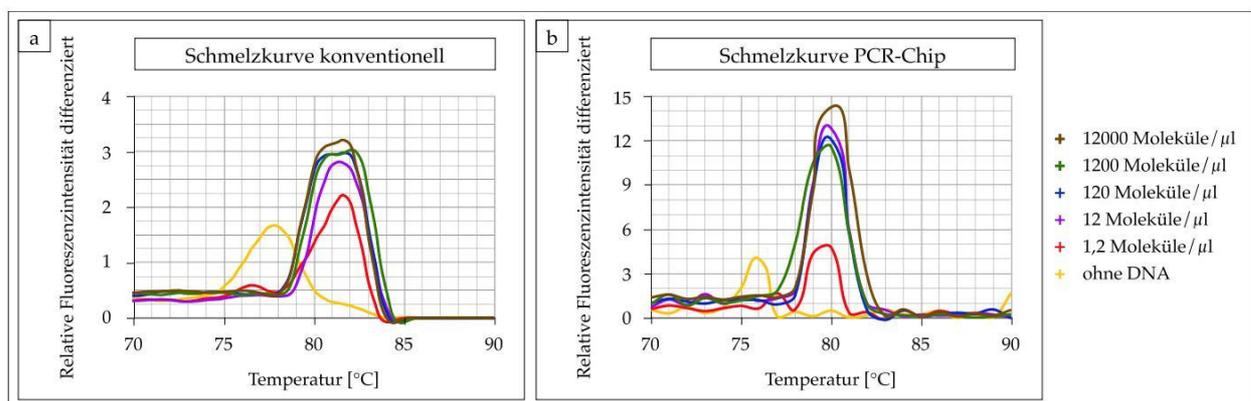


Abb. 35: Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse bei der Amplifikation des p53-Genabschnittes (a - konventioneller Thermocycler, b - PCR-Chip)

Auch die in Abb. 36 und 37 dargestellten Resultate der Real-Time Detektion zur Amplifikation des Genabschnittes der ribosomalen *Phytophthora*-DNA demonstrieren die Funktionalität des Chip-Thermocyclers verglichen mit dem konventionellen System. Die Detektionskurven steigen entsprechend der Erwartungen mit zunehmender DNA-

Ausgangskonzentration zeitversetzt an, wobei hinsichtlich der  $c_t$ -Werte kaum Unterschiede zwischen Chip und konventionellem Thermocycler auffallen. Die sich ergebenden PCR-Effizienzen betragen beim Chip-Thermocycler 99,1 % und beim konventionellen Real-Time-Cycler 77,5 %.

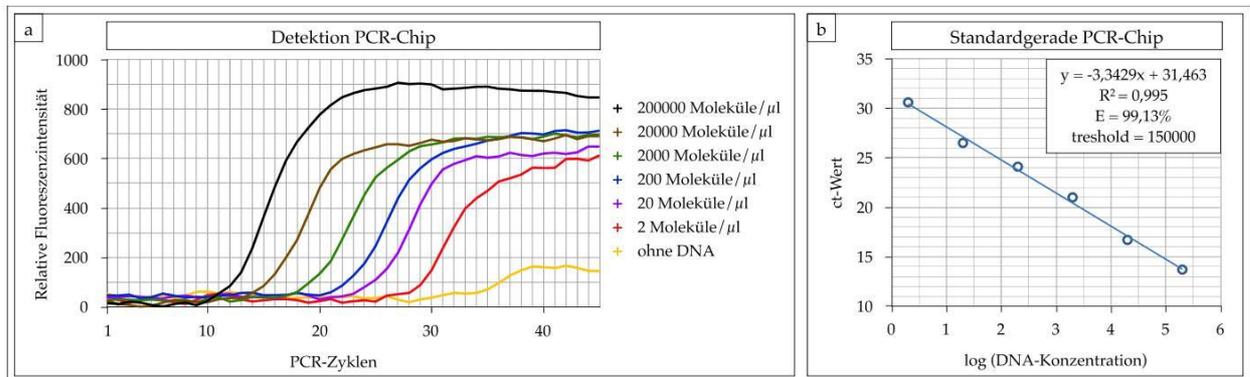


Abb. 36: Ergebnisse der Real-Time PCR mit dem PCR-Chip bei der Amplifikation des Abschnittes der ribosomalen DNA von *Phytophthora* (a - Real-Time Detektion, b - Standardgerade mit Angabe der PCR-Effizienz)

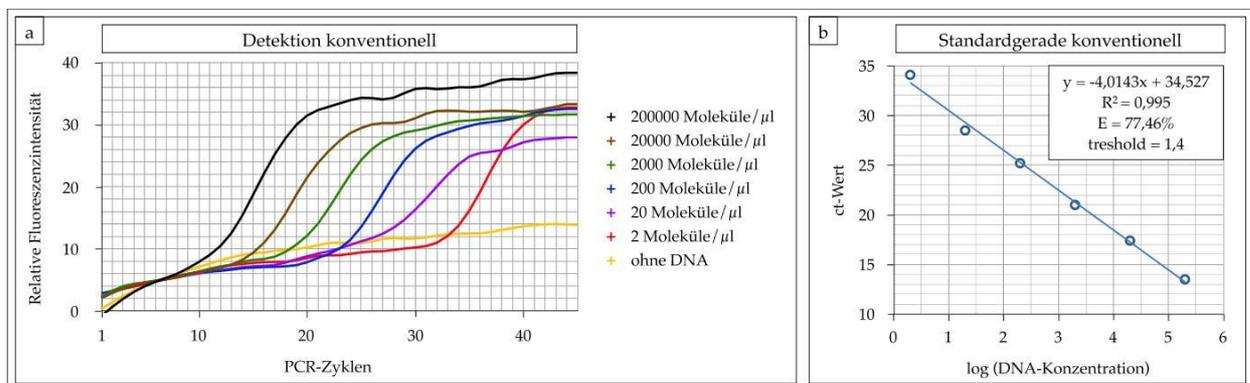


Abb. 37: Ergebnisse der Real-Time PCR mit dem konventionellen Thermocycler bei der Amplifikation des Abschnittes der ribosomalen DNA von *Phytophthora* (a - Real-Time Detektion, b - Standardgerade mit Angabe der PCR-Effizienz)

Da auch bei der Detektion des *Phytophthora*-Genabschnittes SYBR-Green als Detektionsmittel eingesetzt wurde, konnte auch in diesem Fall im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Für dieses 550 bp lange Produkt ergaben sich im Vergleich zum p53-Genabschnitt relativ hohe Werte für die mittlere Schmelztemperatur mit Peakmaxima von 88 °C bzw. 86 °C (Abb. 38). Da bei der Negativkontrolle keine unspezifischen Nebenprodukte gebildet wurden, sind in diesem Fall auch keine Peaks bei niedrigeren Temperaturen erkennbar.

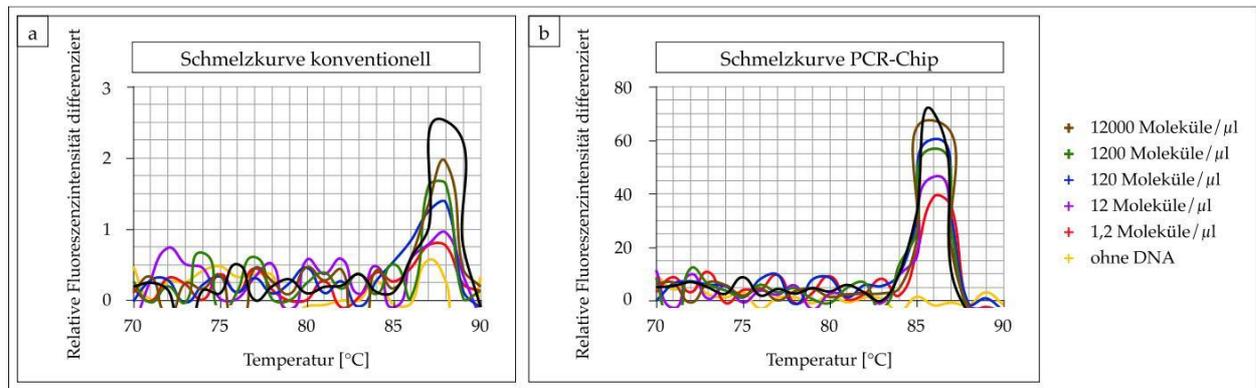


Abb. 38: Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse bei der Amplifikation des Abschnittes der ribosomalen DNA von *Phytophthora* (a - konventioneller Thermocycler, b - PCR-Chip)

### b) Produkt-spezifische Detektion mittels TaqMan-Sonde

Im Gegensatz zur Detektion mit SYBR-Green ermöglicht der Einsatz einer TaqMan-Sonde bereits im Verlauf der PCR neben der quantitativen auch eine qualitative Analyse der Amplifikate. Die Spezifität wird dabei durch Komplementarität der Sonde zum PCR-Produkt erreicht. Bei der Sonde handelt es sich um ein Oligonukleotid, welches mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen verbunden ist, wobei das Fluoreszenzsignal des Reporters in räumlicher Nähe zum Quencher von diesem absorbiert wird. Im Verlauf der Reaktion wird die Sonde aufgrund der Exonuklease-Aktivität der *Taq* DNA-Polymerase abgebaut. Durch die räumlich Trennung der Farbstoffe wird eine steigende Fluoreszenzintensität messbar. Diese Intensität korreliert zur Menge an synthetisiertem PCR-Produkt, sodass sich analog der Detektion mit SYBR-Green sigmoidale Kurvenverläufe ergeben (Abb. 39 und 40). Durch den Sequenz-spezifischen Detektionsmechanismus werden unspezifische Nebenprodukte nicht nachgewiesen. Auffällig sind die deutlich geringeren Signalintensitäten im Vergleich zur Detektion mit SYBR-Green, was auf die geringere Anzahl an fluoreszierenden Molekülen in Verhältnis zur DNA-Menge zurückzuführen ist. Die Sättigungswerte der Fluoreszenzintensität verringern sich stark mit abnehmender DNA-Ausgangskonzentration. Außerdem ist anhand der dargestellten Diagramme erkennbar, dass beim PCR-Chip ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis vorliegt als beim konventionellen Thermocycler. Im Fall der Sonden-basierten Detektion des p53-Genabschnittes wurde für die PCR-Effizienz beim konventionellen Thermocycler ein Wert von 85 % und beim PCR-Chip 66 % ermittelt. Im Fall der konventionellen Umsetzung erwies sich die Auswertung der Kurvenverläufe aufgrund des schlechteren Signal-Rausch-Verhältnisses als schwierig. Letztlich konnte anhand dieser

Versuchsreihe die Funktionsfähigkeit des PCR-Chips für eine Sonden-basierte Detektion des p53-Genabschnittes demonstriert werden.

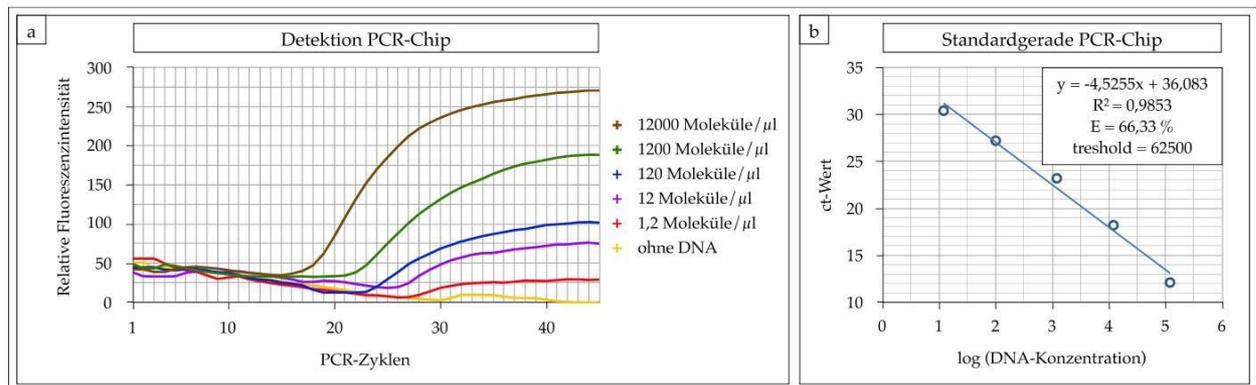


Abb. 39: Ergebnisse der Real-Time PCR mit dem PCR-Chip bei der Amplifikation des p53-Genabschnittes (a - Real-Time Detektion, b - Standardgerade mit Angabe der PCR-Effizienz)

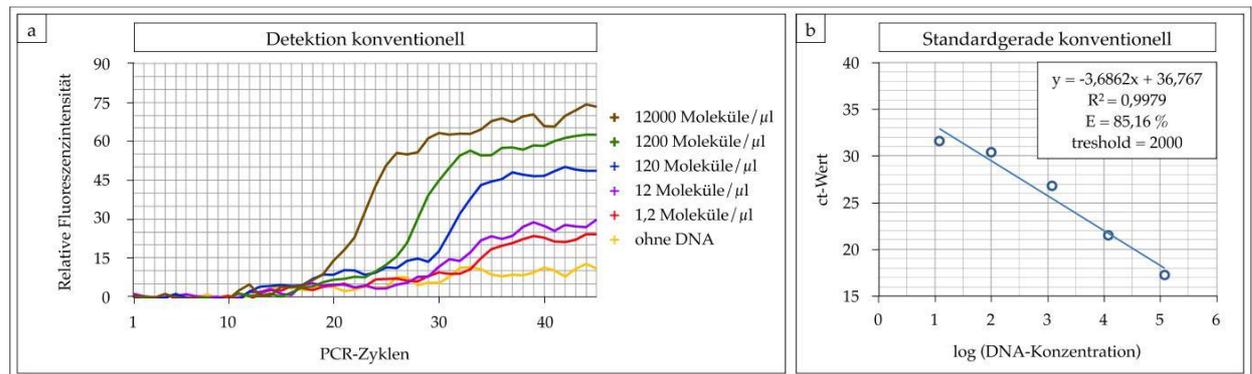


Abb. 40: Ergebnisse der Real-Time PCR mit dem konventionellen Thermocycler bei der Amplifikation des p53-Genabschnittes (a - Real-Time Detektion, b - Standardgerade mit Angabe der PCR-Effizienz)

### 3.1.2.2 Verringerung des Probenvolumens

Eine Reduzierung des Probenvolumens hat neben dem geringeren Verbrauch an Reagenzien auch den Effekt einer besseren und schnelleren Temperierung. Die Applikation des Proben-tropfens, eingebettet in Mineralöl, ermöglicht eine Verringerung des Probenvolumens bei gleichbleibend hoher Ausbeute an PCR-Produkt, wie anhand des in Abb. 41 dargestellten Agarosegels deutlich wird. Bei den Versuchen wurde der p53-Genabschnitt unter Anwendung des zeitlich optimierten PCR-Protokolls amplifiziert. Die Ausgangskonzentration der DNA betrug 120 Moleküle/μl bzw. 15 ag/μl. Bis zu einem Volumen von nur 500 nl wurde auf dem Chip eine hohe Ausbeute an PCR-Produkt erreicht, beim konventionellen Thermocycler wies die entsprechende Bande dagegen eine verringerte Intensität auf.

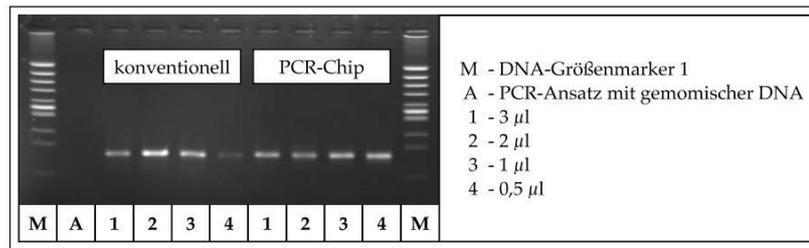


Abb. 41: Agarosegel zur Verringerung des Probenvolumens

Bei der in Abb. 42 dargestellten Real-Time Detektion sowie den Schmelzkurven gemessen mit dem PCR-Chip in einem Volumen zwischen 3 µl und 500 nl fällt der gleichbleibende Kurvenverlauf auf. Die Detektionskurven beginnen in beiden Fällen ca. beim 27. Zyklus anzusteigen. Das Peakmaximum der Schmelzkurven ist jeweils deutlich bei 83 °C zu erkennen. Unterschiede ergeben sich in Hinblick der Fluoreszenzintensität. Der Maximalwert bei der Detektion mit 500 nl erreicht mit einer relativen Fluoreszenzintensität von 1000 im Vergleich zu einem Wert von 650 bei einem Reaktionsvolumen von 3 µl nur etwa ein Siebtel.

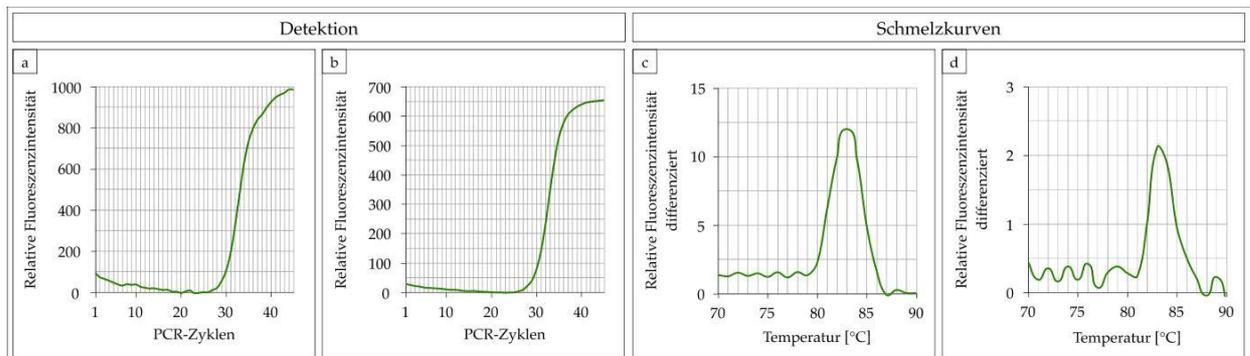


Abb. 42: Ergebnisse der Real-Time PCR und Schmelzkurvenanalyse mit dem PCR-Chip bei der Amplifikation des p35-Genabschnittes mit unterschiedlichen Reaktionsvolumina (a - Real-Time Detektion 3 µl, b - Real-Time Detektion 0,5 µl, c - Schmelzkurve 3 µl, d - Schmelzkurve 0,5 µl)

Bei der Schmelzkurve beträgt der Intensitätsunterschied der Peakmaxima mit Werten von 12 bzw. 2,2 etwa ein Sechstel. Diese Feststellung war aufgrund des verringerten Volumens und damit einer geringeren Menge an detektierbaren Fluoreszenzfarbstoffen zu erwarten. Dennoch bleibt festzuhalten, dass auch mit einem derart geringen Reaktionsvolumen das System und der dazugehörige Detektionsaufbau hinreichend empfindlich sind, um eine aussagefähige Detektion zu ermöglichen.

### 3.1.3 Applikation von Zellen bei der PCR

Eine direkte Verwendung von zellulärem Material bei der PCR bietet den entscheidenden Vorteil, dass eine aufwändige Extraktion der enthaltenen DNA oder RNA im Vorfeld der Amplifikation entfällt. Ist es außerdem möglich, die zugegebenen Zellen ausschließlich durch Temperatureinwirkungen aufzuschließen und damit die Nukleinsäuren zugänglich zu machen. Damit kann auf den Einsatz von Chemikalien verzichtet werden, die eine Inhibierung der PCR verursachen können. Im Gegensatz zur mehrfach in der Literatur beschriebenen Verwendung von Blutzellen [169, 170] ist dies allerdings nicht bei allen zellulären Proben möglich und bedarf deshalb einer experimentellen Untersuchung für den konkreten Anwendungsfall. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Experimente zur PCR mit geringen Zellzahlen an *Phytophthora*-Zoosporen sowie HBME-Zellen durchgeführt. Dabei sollten die Zellen ausschließlich durch Temperatureinwirkungen lysiert werden.

#### 3.1.3.1 *Phytophthora*-Zoosporen

##### a) Einsatz von Sporen in verschiedenen Lösungsmitteln

Für die Experimente zum Nachweis der ribosomalen DNA von *Phytophthora* wurden ausschließlich Zoosporen von *P. ramorum* verwendet. Um eine geeignete Handhabung der Sporen beim direkten Einsatz in der PCR-Lösung bzw. auf der Chip-Oberfläche zu ermöglichen, sollten diese in einem flüssigen Lösungsmittel aufgenommen werden. Im günstigsten Fall können die Sporen mit dem Lösungsmittel abgetötet werden, ohne die enthaltene DNA zu zerstören. Als geeignet erwiesen sich bei phytopathologischen Analysen u. a. verdünnte Ethanol- sowie Essigsäure-Lösung. Es galt, bestimmte Konzentrationen dieser Lösungsmittel in der Reaktionslösung auf ihre PCR-Kompatibilität hin zu untersuchen. Im PCR-Ansatz wurde die Sporenlösung schließlich 1:50 verdünnt und eine Gesamtzahl von rund 85 Sporen in den 3  $\mu$ l Reaktionslösung eingestellt. Diese Versuchsreihe wurde ausschließlich mit dem konventionellen Thermocycler durchgeführt. Wie im dargestellten Agarosegel (Abb. 43) erkennbar ist, erwies sich eine 50 %ige Ethanol-Lösung als geeignet. Bei der 1 %igen Essigsäure war die Ausbeute an PCR-Produkt allerdings stark vermindert, was auf eine Absenkung des pH-Wertes zurückzuführen ist. Der dadurch veränderte pH-Wert befindet sich dann möglicherweise nicht mehr im optimalen Bereich für die *Taq* DNA-Polymerase, wodurch deren Aktivität eingeschränkt

wird. Deshalb wurde die Essigsäure-Konzentration schrittweise herabgesetzt, wobei sich eine 0,05 %ige Lösung als am besten geeignet herausstellte. Dabei ist es prinzipiell bemerkenswert, dass die DNA der Sporen, die häufig sehr widerstandsfähig sind, in ausreichendem Maß für die Amplifikation zugänglich gemacht werden konnte. Die Versuche zeigen, dass eine exakte Einstellung des pH-Wertes bei der PCR von entscheidender Bedeutung ist und Modifikationen an der Zusammensetzung der Reaktionslösung diesen nur geringfügig beeinflussen sollten.

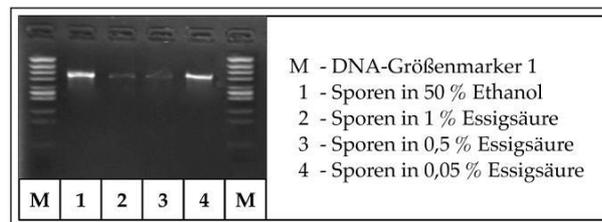


Abb. 43: Agarosegel zur PCR mit *Phytophthora*-Zoosporen in verschiedenen Lösungsmitteln

Bei der im Verlauf der Amplifikation durchgeführten Real-Time Detektion unter Verwendung von SYBR-Green als Detektionsmittel ergaben sich in Korrelation zu den Ergebnissen der Agarose-Gelelektrophorese bei 50 %igem Ethanol sowie 0,05 %iger Essigsäure deutliche Anstiege der Fluoreszenzintensität im Verlauf der PCR-Reaktion (Abb. 44). Auch die Schmelzkurven zeigen in diesen Fällen deutliche Peakmaxima bei 85 °C. Bei der Verwendung von höher konzentrierter Essigsäure ergibt sich dagegen kein signifikanter Signalanstieg.

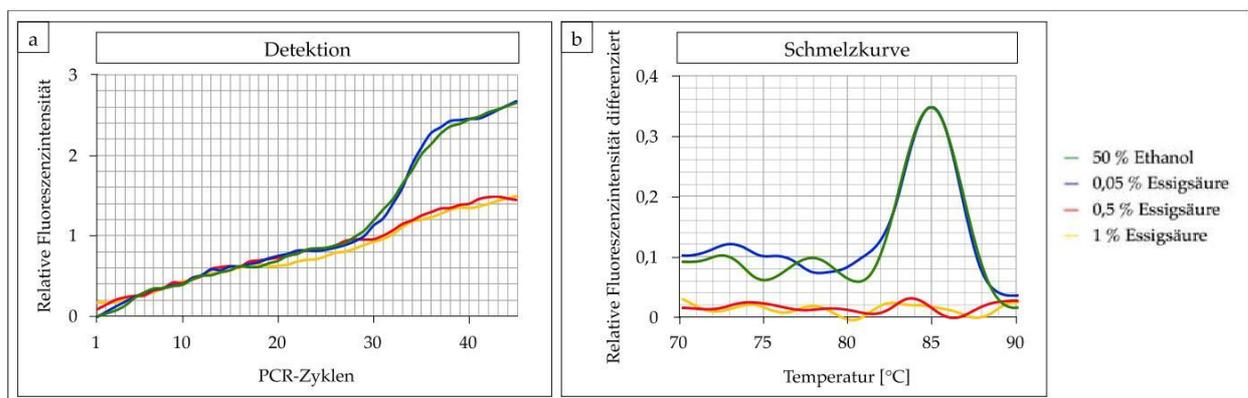


Abb. 44: Ergebnisse der Real-Time PCR mit dem konventionellen Thermocycler bei direktem Einsatz von verschiedenartig gelösten *Phytophthora*-Zoosporen im PCR-Ansatz (a - Real-Time Detektion, b - Schmelzkurve)

b) Direkte Applikation von *Phytophthora*-Sporen bei der on-Chip PCR

Die Übertragung des Protokolls mit in 0,05 %iger Essigsäure gelösten *Phytophthora*-Sporen auf den PCR-Chip ergab vergleichbar zufriedenstellende Ergebnisse, was sowohl durch die deutlich erkennbaren Produktbanden im Agarosegel (Abb. 45) als auch entsprechende Kurvenverläufe bei der Real-Time-Detektion sowie Schmelzkurvenanalyse (Abb. 46 und 47) demonstriert wird.

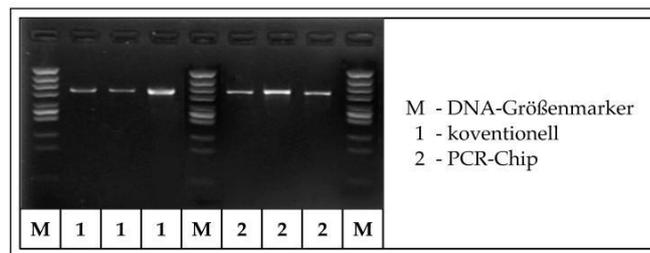


Abb. 45: Agarosegel zur PCR bei direktem Einsatz von Sporen im PCR-Ansatz mit dem konventionellen Thermocycler sowie dem PCR-Chip

Insgesamt sind die Signalintensitäten allerdings geringer als beim Einsatz von DNA im PCR-Ansatz. Die mit dem PCR-Chip detektierten Kurvenverläufe weisen im Vergleich zum konventionellen Thermocycler ein schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis auf.

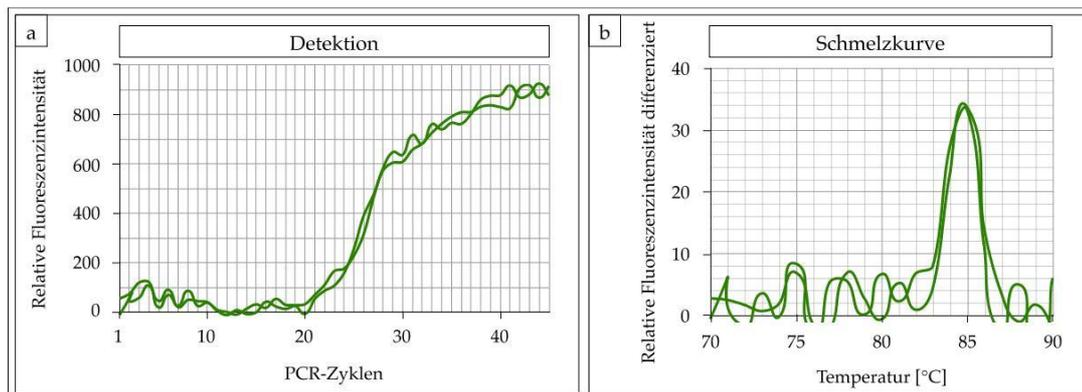


Abb. 46: Ergebnisse der Real-Time PCR und Schmelzkurvenanalyse in Doppelbestimmung mit dem PCR-Chip bei direktem Einsatz von *Phytophthora*-Sporen (gelöst in 0,05 % Essigsäure) im PCR-Ansatz (a - Real-Time Detektion, b - Schmelzkurve)

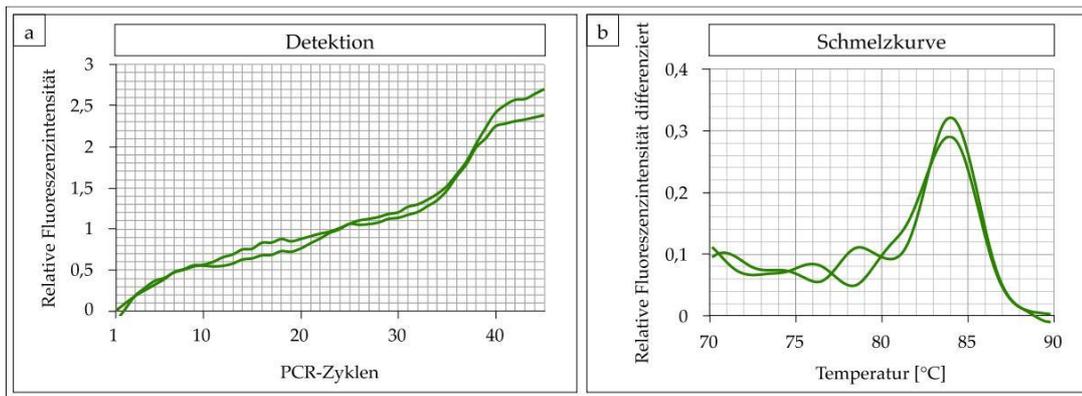


Abb. 47: Ergebnisse der Real-Time PCR und Schmelzkurvenanalyse in Doppelbestimmung mit dem konventionellen Thermocycler bei direktem Einsatz von *Phytophthora*-Sporen (gelöst in 0,05 % Essigsäure) im PCR-Ansatz (a - Real-Time Detektion, b - Schmelzkurve)

c) Verringerung der Sporenanzahl im PCR-Ansatz

Um die Sensitivität der on-Chip PCR beim Nachweis von *Phytophthora*-Zoosporen zu untersuchen, wurde die Ausgangskonzentration an Sporen schrittweise verringert und das Ergebnis der Amplifikation überprüft. Aufgrund der geringen Signalintensitäten, die beim Einsatz von rund 85 Sporen messbar waren, wurde bei den Experimenten zur Reduktion der Sporenanzahl auf die Real-Time Detektion verzichtet und die Ergebnisse ausschließlich elektrophoretisch ausgewertet. Die in Abb. 48 dargestellten Agarosegele demonstrieren, dass auch bei einer Gesamtzahl von nur 5 Sporen im eingesetzten Volumen an PCR-Lösung die gewünschten Produkte amplifiziert wurden. Obwohl die Menge an synthetisiertem PCR-Produkt bereits bei einer reduzierten Anzahl von rund 43 Sporen gering ausgefallen ist und die Banden schwach erscheinen, konnten auch geringste Mengen an Sporen mit dem Chip-System nachgewiesen werden. Dabei sind die Bandenintensitäten bei der Verwendung des konventionellen Thermocyclers mit denen der Chip-PCR vergleichbar.

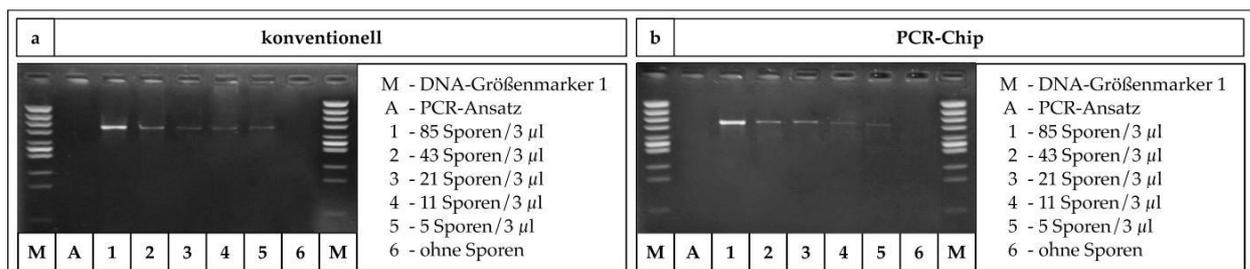


Abb. 48: Agarosegele zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation bei Reduzierung der Sporenanzahl im PCR-Ansatz (a - konventionell, b - PCR-Chip)

## 3.1.3.2 HBME-Zellen

Neben den Zoosporen von *Phytophthora ramorum* sollten auch humane Hirnendothelzellen (HBME-Zellen) direkt bei der PCR eingesetzt werden. Erste Versuche wurden mit extrahierter DNA sowie RNA durchgeführt. Die Protokolle wurden jeweils im konventionellen Thermocycler sowie auf dem PCR-Chip angewendet. Bei der Verwendung von RNA wurde der PCR eine reverse Transkription vorangestellt. Das Agarosegel in Abb. 49a zeigt, dass sowohl die DNA als auch die RNA bei der PCR eingesetzt werden können und die Amplifikation auf dem Chip erfolgreich sowie vergleichbar zum konventionellen Thermocycler verlief.

Damit wurde die Anwendbarkeit des Protokolls zur Temperatur-induzierten Zell-Lyse in Verbindung mit einer reversen Transkription auf dem PCR-Chip demonstriert. Außerdem war es möglich, drei verschiedene PCR-Produkte in einem einzigen PCR-Ansatz auf dem Chip zu amplifizieren (Abb. 49b). Dabei handelte es sich um Genabschnitte der codierenden Bereiche für die Proteine RPL13A, Gremlin und Vimentin. Die eingesetzte Ausgangs-DNA stammte dabei aus HBME-Zellen.

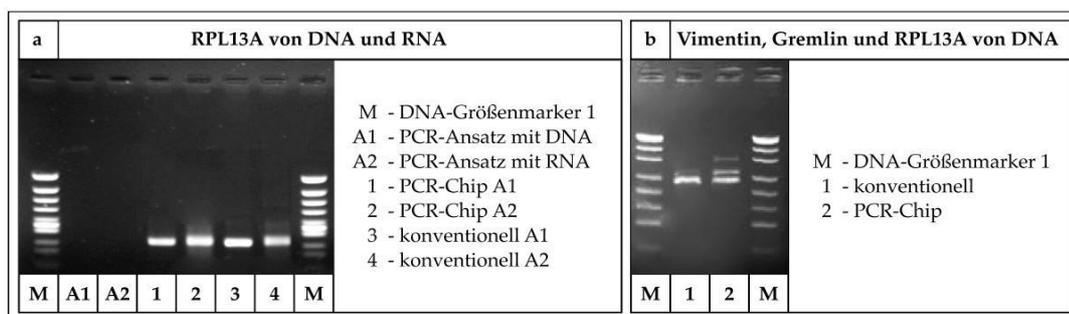


Abb. 49: Agarosegele zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation von Abschnitten der DNA bzw. RNA aus HBME-Zellen (a - Amplifikation codierender Genabschnitte für RPL13A aus DNA und RNA, b - Amplifikation codierender Genabschnitte für Vimentin, Gremlin und RPL13A aus DNA)

Anhand der dargestellten Aufnahmen des Agarosegels fällt auf, dass die Amplifikate vom 327 bp langen Vimentin-Genabschnitt nur mit dem PCR-Chip in nachweisbarer Konzentration synthetisiert werden konnten. Während beim PCR-Chip alle drei Banden erkennbar sind, konnte mit dem konventionellen Thermocycler lediglich der 229 bp umfassende RPL13A-Genabschnitt nachgewiesen werden. Für dieses Protokoll einer Multiplex-PCR ist der PCR-Chip damit besser geeignet.

Zur definierten Separation einzelner HBME-Zellen wurde eine Mikromanipulations-einheit in Verbindung mit einem Stereomikroskop (aura optik GmbH) verwendet. Die

Zellen wurden dabei einzeln in einer Glaskapillare separiert und unter ständiger, optischer Kontrolle auf die Chip-Oberfläche bzw. in Reaktionsgefäße überführt (Abb. 50).

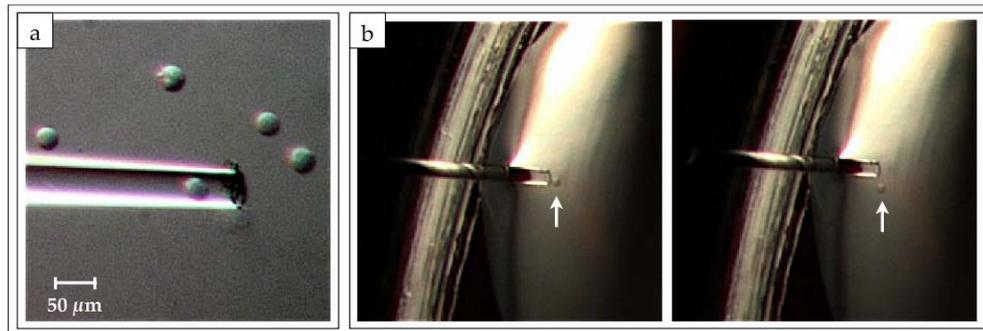


Abb. 50: Separation einzelner HBME-Zellen durch Mikromanipulation mit einer Glaskapillare (a - Aufnahme einer Zelle aus der Suspension, b - Ausstoß der Zelle in einen Wassertropfen, der sich im Reaktionsgefäß oder auf einer Chip-Oberfläche befindet)

Im Anschluss an die Separation der einzelnen HBME-Zellen erfolgte die Zell-Lyse, reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion, um den RPL13A-Genabschnitt zu amplifizieren.

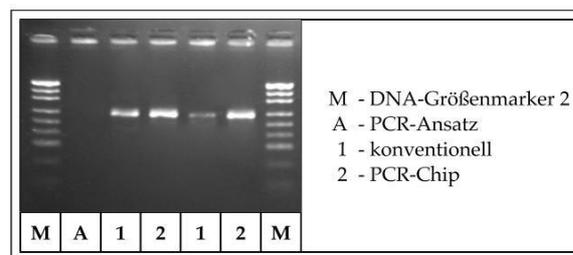


Abb. 51: Agarosegel mit PCR-Produkten des RPL13A-Gens amplifiziert von je einer einzelnen HBME-Zelle

Die Resultate im Agarosegel entsprechend Abb. 51 belegen, dass eine einzelne Zelle für den Nachweis ausreichend ist. Es fällt auf, dass die Ausbeute an PCR-Produkt beim PCR-Chip höher ausfällt als beim konventionellen Thermocycler, was an einer höheren Intensität der dazugehörigen Banden erkennbar ist.

Im Rahmen der Versuche wurde die Amplifikation mit einer Fluoreszenz-basierten Real-Time Detektion gekoppelt sowie eine sich anschließende Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Als Detektionsmittel wurde dabei erneut SYBR-Green verwendet. Dabei wiesen die mit dem PCR-Chip gemessenen Kurven den typischen Verlauf auf (Abb. 52).

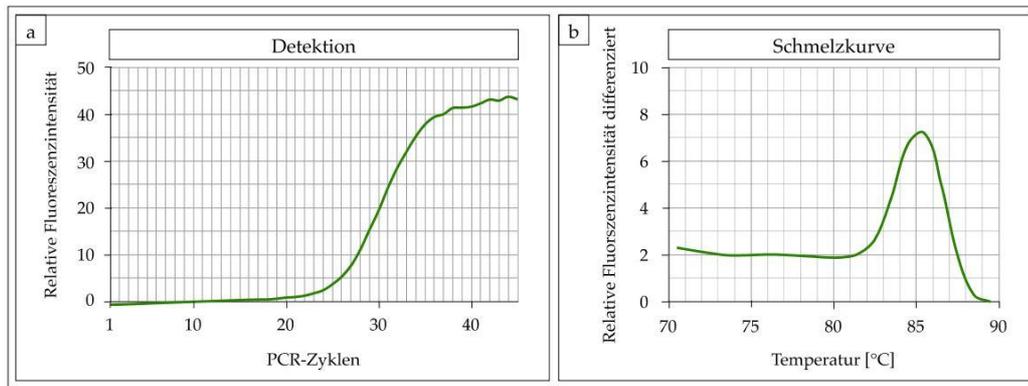


Abb. 52: Ergebnisse der Real-Time PCR (a) und Schmelzkurvenanalyse (b) mit dem PCR-Chip bei direktem Einsatz einer einzelnen HBME-Zelle

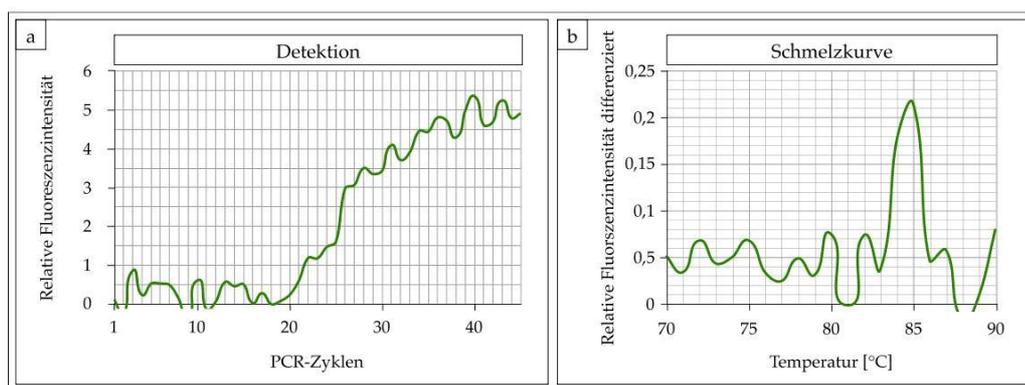


Abb. 53: Ergebnisse der Real-Time PCR (a) und Schmelzkurvenanalyse (b) mit dem konventionellen Thermocycler bei direktem Einsatz einer einzelnen HBME-Zelle

Beim konventionellen Thermocycler ist der Kurvenverlauf prinzipiell ähnlich, die Kurven weisen allerdings ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis auf (Abb. 53). Die Ergebnisse belegen, dass sich der miniaturisierte Chip-Maßstab besonders gut für den Nachweis einer einzelnen HBME-Zelle in einem geringen Reaktionsvolumen von  $3 \mu\text{l}$  eignet.

### 3.1.4 Kopplung von Chip-basierter Dielektrophorese und PCR

Als weitere Methode zur Separation einzelner Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Dielektrophorese angewendet. Damit kann in polarisierbaren Partikeln bzw. Zellen innerhalb eines inhomogenen, elektrischen Feldes ein Dipolmoment induziert werden. Bei der angewendeten, positiven Dielektrophorese wurden dadurch die Zellen oder Partikel in Bereiche höherer Feldstärken bewegt.

Die Anreicherung von DNA [171] oder Hefezellen [172] an Elektroden oder in einem Elektrodenspalt wurde bereits demonstriert. Es wurden Versuche zur Separation ein-

zelner *Phytophthora*-Zoosporen sowie HBME-Zellen durchgeführt. Dadurch konnten die Zellen schließlich für die Chip-basierte PCR zur Verfügung gestellt werden.

### 3.1.4.1 Dielektrophoretische Separation von Zellen

Es wurde ein Chip mit Elektrodenstrukturen konstruiert, in dessen Zentrum sich eine Reihe von Elektrodenspalten unterschiedlicher Größe zwischen  $1\ \mu\text{m}$  und  $25\ \mu\text{m}$  befindet (Abb. 54). Damit konnten je nach Größe der zu separierenden Objekte unterschiedlich große Spalte für die Experimente ausgewählt werden. In Vorversuchen konnten Reaktionsparameter für die dielektrophoretische Separation von HBME-Zellen ermittelt werden. Als geeignet erwiesen sich dabei Frequenzen zwischen 0,5 und 4 MHz sowie Spannungswerte (Spitze-Spitze) zwischen 0,8 V und 10 V. Bei den *Phytophthora*-Sporen ergaben sich Arbeitsbereiche zwischen 1 MHz und 4 MHz sowie 1 V bis 10 V. Durch die unterschiedlichen Spannungswerte kann Einfluss auf die zurückzulegende Entfernung der Zellen im Verlauf der Dielektrophorese genommen werden.

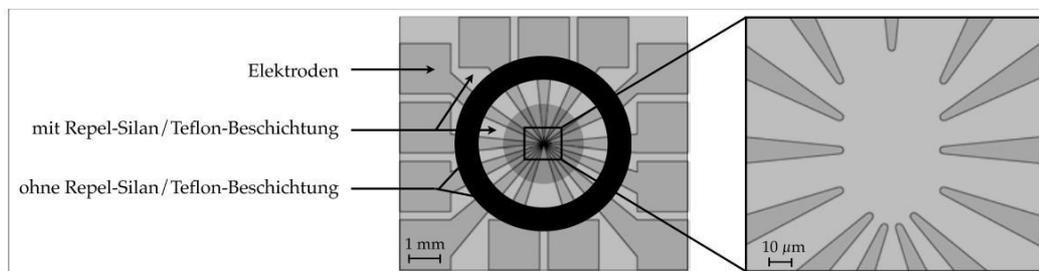


Abb. 54: Schematische Darstellung des DEP-Chips mit vergrößertem Ausschnitt der Elektrodenspalte

Die Abmessung des Dielektrophorese-Chips mit  $9 \times 8\ \text{mm}$  ist so gewählt, dass bis zu vier solcher Chips auf den PCR-Chip aufgelegt werden können. Dabei wird der Bereich der Elektrodenspalte über dem optisch transparenten Detektionsfenster angeordnet. Durch eine strukturierte Beschichtung der Oberfläche der DEP-Chips mit Repel-Silan und Teflon analog der Probenträger für die tropfenbasierte on-Chip PCR können im Anschluss an die Separation der Zellen die enthaltenen Nukleinsäuren amplifiziert und detektiert werden. Abb. 55 zeigt Ergebnisse einer separierten *Phytophthora*-Spore sowie HBME-Zelle. Es fällt auf, dass die Zellen nicht direkt in den Elektrodenspalt, sondern an die spitz zulaufenden Elektroden gezogen werden. Der Bereich der Elektroden, an dem sich die Zellen anlagern befindet sich allerdings deutlich im Bereich über dem optisch transparenten Detektionsfenster vom PCR-Chip.

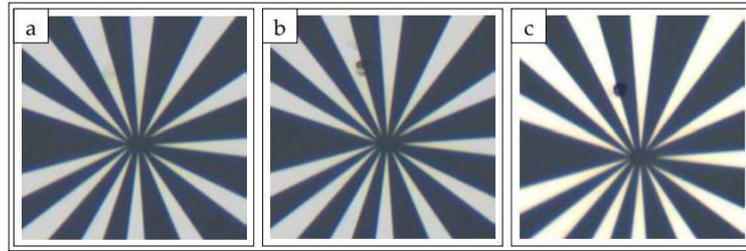


Abb. 55: Experimente zur dielektrophoretischen Separation einzelner Zellen  
(a - vor dem Versuch, b - separierte *Phytophthora*-Spore, c - separierte HBME-Zelle)

### 3.1.4.2 DNA-Amplifikation auf DEP-Chips

Die DEP-Chips wurden mit Teflon beschichtet und ringförmig strukturiert, um die tropfenbasierte on-Chip PCR zu ermöglichen. Um die Eignung der Chips für die PCR zu überprüfen, wurde darauf genomische *Phytophthora*-DNA amplifiziert und die Ergebnisse mit der konventionell durchgeführten PCR sowie den üblicherweise verwendeten Probenträgern verglichen.

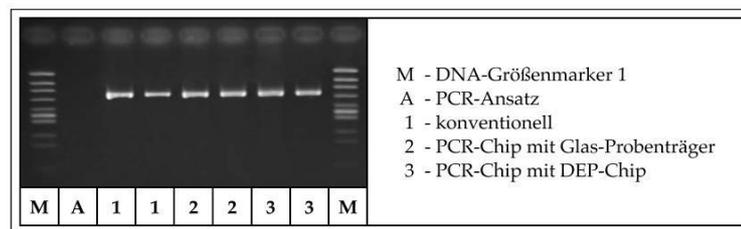


Abb. 56: Agarosegel zum Vergleich der Amplifikation auf dem PCR-Chip mit DEP-Chips sowie den üblicherweise angewendeten Probenträgern

Wie das Agarosegel in Abb. 56 demonstriert, eignet sich der DEP-Chip auch für die on-Chip PCR, da eine hohe und mit den anderen Methoden absolut vergleichbare Ausbeute an PCR-Produkt nachgewiesen werden konnte.

Die bei der Chip-PCR durchgeführte Real-Time Detektion sowie Schmelzkurvenanalyse lieferte ebenfalls positive Resultate. Die Diagramme sind in Abb. 57 dargestellt. Es fällt auf, dass das Detektionssignal beim DEP-Chip mit einem Wert von 150 eine geringere relative Fluoreszenzintensität erreicht verglichen mit den Signalen bei Verwendung der üblichen Probenträger, bei denen das Maximum rund 250 beträgt. Die Ursache liegt in der metallischen und damit nicht transparenten Strukturierung. Da sich einige Elektrodenstrukturen über dem optisch transparenten Detektionsfenster und damit der Faser befinden, wird ein Teil des Tropfens dadurch verdeckt und damit nur ein abgeschwächtes Signal messbar. Der Aspekt der unterschiedlichen Signalintensitäten bestätigt sich

auch bei der Schmelzkurven-Analyse. Während der Peak beim DEP-Chip ein Maximum von ca. 25 erreicht, ist es mit dem unstrukturierten Probenträger ein Wert von ca. 32.

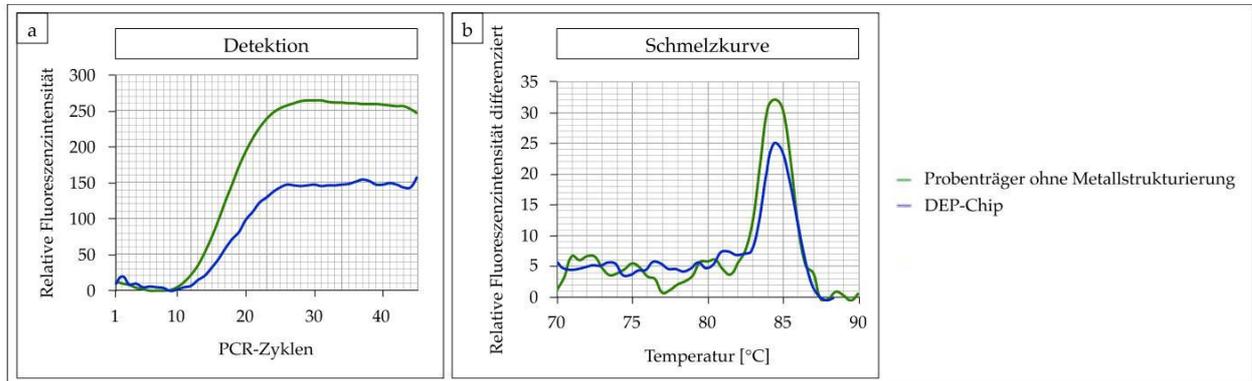


Abb. 57: Ergebnisse der Real-Time PCR (a und b) und Schmelzkurvenanalyse (c und d) auf dem PCR-Chip mit verschiedenen Probenträgern (a und c - Probenträger, b und d - DEP-Chip)

## 3.2 Kombination von on-Chip-PCR mit DNA-Mikroarray Technologie zu einem Lab-on-a-Chip System

Neben der Möglichkeit einer Fluoreszenz-basierten Real-Time-Detektion im Verlauf der PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit ein zweiter, technologischer Ansatz zur Analyse amplifizierter PCR-Produkte angewendet. Dabei bestand das Ziel in der Verknüpfung von DNA-Amplifikation und dem Nachweis der PCR-Produkte mit einem Mikroarray auf einer integrierten Chip-Plattform.

### 3.2.1 Vorversuche zur tropfenbasierten Kombination von DNA-Amplifikation und -Hybridisierung

Am Beispiel der Detektion des p53-Genabschnittes wurden zunächst einige Versuche zur Kombination von PCR und Mikroarray-Detektion durchgeführt. Dabei wurde die Amplifikation und der Hybridisierungsnachweis der PCR-Produkte auf dem PCR-Chip in direkter Aufeinanderfolge realisiert. Der auf diesem Probenträger befindliche Mikroarray enthielt ein zum PCR-Produkt komplementäres Fänger-Oligonukleotid, eine direkt markierten Positivkontrolle sowie eine Negativkontrolle. Um unspezifische Ablagerungen der Nachweisreagenzien ausschließen zu können, wurde außerdem die Pufferlösung zur Verdünnung der Oligonukleotide aufgetragen. Zur Detektion wurde eine

Fluoreszenz-Markierung mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) angewendet, welche über entsprechend modifizierter rückwärts-Primer in die PCR-Produkte eingebaut wurde.

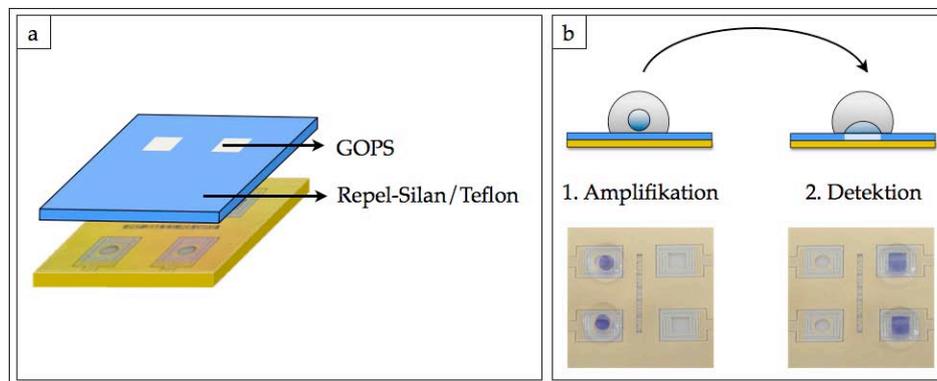


Abb. 58: Tropfenbasierter Ansatz zur Kombination von PCR und Hybridisierungsnachweis (a - PCR-Chip und Probenträger mit spezieller Oberflächenmodifikation, b - Applikation der Probentropfen)

Um die DNA-Amplifikation und den Nachweis der PCR-Produkte in direkter Aufeinanderfolge auf dem PCR-Chip zu kombinieren, wurden die verwendeten Probenträger in einem zweistufigen Protokoll mit einer speziellen Oberflächenmodifikation versehen. Bei den in einem ersten Schritt mit Repel-Silan und Teflon beschichteten Glaschips wurden je zwei Quadrate mit einer Abmessung von  $2 \times 2$  mm photolithografisch freigeätzt und die entsprechende Fläche dabei gleichzeitig aktiviert. Diese Bereiche wurden mit GOPs silanisiert (Abb. 58a), sodass an diesen Stellen die Amino-modifizierten Oligonukleotide immobilisiert werden konnten. Wie in Abb. 58b erkennbar ist, ergab sich dadurch ein unterschiedliches Benetzungsverhalten der PCR- bzw. Hybridisierungslösung (blau dargestellt) zur Oberfläche. Während die PCR-Lösung auf den mit Teflon beschichteten Bereichen nahezu keinen Kontakt zur Chip-Oberfläche herstellt, benetzt die Hybridisierungslösung den Mikroarray-Bereich sehr gut, wodurch ein quadratisch erscheinender Tropfen erkennbar wird.

Bei der PCR wurde eine Ausgangskonzentration von  $400$  DNA-Molekülen/ $\mu\text{l}$  eingesetzt, was  $0,06$  fg/ $\mu\text{l}$  entspricht. Die amplifizierten PCR-Produkte sind auf dem Agarosegel in Abb. 59 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Amplifikation des ausgewählten DNA-Abschnittes erfolgreich und vergleichbar zu der im konventionellen Thermocycler verlief. Auch bei Anwendung eines zeitlich verkürzten PCR-Protokolls auf dem PCR-Chip mit einer Gesamtdauer von  $23$  min konnten entsprechende Produkte hergestellt werden.

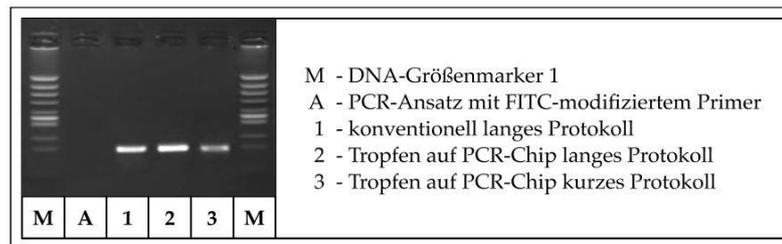


Abb. 59: Amplifizierte PCR-Produkte mit FITC-Markierung

Der Nachweis, einschließlich Amplifikation und Hybridisierungsreaktion, auf dem Mikroarray-Bereich wurde mit zwei verschiedenen Protokollen von unterschiedlicher Dauer durchgeführt. Zunächst lieferte ein 153 min dauerndes Protokoll das gewünschte Resultat. Für das gesamte Nachweisprotokoll inkl. PCR und Hybridisierungsnachweis konnte die Reaktionsdauer auf 98 min optimiert werden. Die Reaktionszeiten sind im Einzelnen in Tab. 14 aufgeschlüsselt.

Reaktionsschritt	Dauer [min] bei langem Protokoll	Dauer [min] bei kurzem Protokoll
1. PCR	48	23
2. Denaturierung	5	5
3. Abkühlen	10	10
4. Hybridisierung	60	30
5. Waschen	30	30
<b>Gesamtdauer [min]</b>	153	98

Tab. 14: Auflistung der Reaktionszeiten zum tropfenbasierten Nachweis des p53-Genabschnittes

In Abb. 60 sind jeweils eine mikroskopische Aufnahme der Arrays sowie die Ergebnisse der Grauwertanalyse dargestellt. Wie zu erwarten war, ergaben sich nur bei der direkt mit FITC markierten Positivkontrolle und bei den komplementären Fänger-Oligonukleotiden deutliche Signale. Bei den hybridisierten Proben fallen die Signale schwächer aus, da in diesem Fall eine Renaturierung der PCR-Produkte als Konkurrenzreaktion zur Hybridisierung stattfindet. Deshalb fällt die Dichte an Fluoreszenzmolekülen bei den entsprechenden Spots geringer aus als im Fall der Positivkontrolle. An den Positionen der nicht komplementären Negativkontrolle sowie der Pufferlösung war keine Fluoreszenzintensität messbar, sodass von einer hinreichenden Spezifität der Nachweisreaktion ausgegangen werden kann.

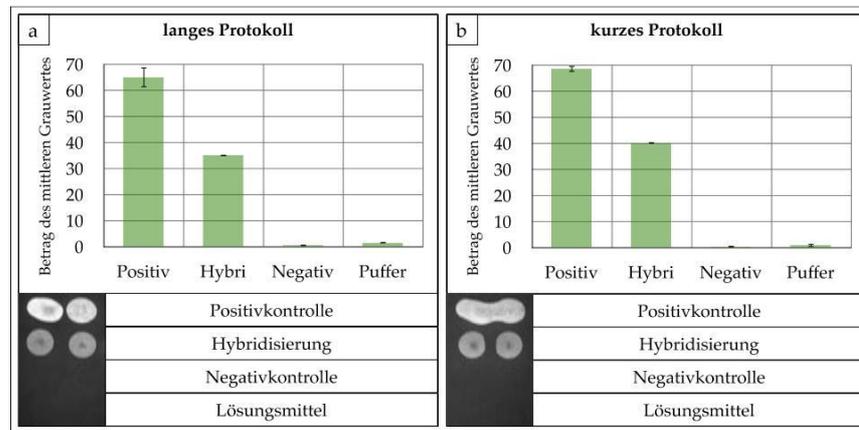


Abb. 60: Tropfenbasierte Detektion der FITC-modifizierten PCR-Produkte mittels Mikroarray (a - ursprüngliches Protokoll, b - zeitlich optimiertes Protokoll)

### 3.2.2 Etablierung von Nachweisprotokollen am PCR-Chip Modul

Im Rahmen der Entwicklung eines neuen Lab-on-a-Chip-Systems für die nukleinsäurebasierte Bioanalytik wurde auf vorhandenen PCR- und DNA-Chip Technologien zurückgegriffen. Für den mikrostrukturierten PCR-Chip wurde ein Probenträger mit integrierten Reaktionskammern konstruiert und gefertigt (PCR-Chip Modul). Zum Nukleinsäure-Nachweis auf DNA-Chips mit Elektrodenstrukturen stand eine Hybridisierungskammer zu Verfügung (DNA-Chip Modul). An beiden Modulen sollten Protokolle für den Nachweis von *Phytophthora* mit den entsprechenden Methoden etabliert werden. Im Verlauf der System- und Protokollentwicklung diente *P. ramorum* als Modellorganismus. Im späteren Entwicklungsverlauf wurden weitere *Phytophthora*-Arten in das Nachweissystem eingebracht.

Zum PCR-Chip Modul gehörte ein 16 x 18 mm großer Probenträger mit integrierten Reaktionskammern, der befüllt und auf den mikrostrukturierten PCR-Chip aufgelegt wurde. Zur Herstellung des Probenträgers wurde eine PDMS-Abformung mit halb-geöffneten Reaktionskammern und ein Deckglas zusammengefügt.

#### 3.2.2.1 Nukleinsäure-Amplifikation mit dem PCR-Chip Modul

Es stellte sich heraus, dass die Reaktionskammern nicht ausschließlich mit der wässrigen PCR-Lösung befüllt werden können, da die Reaktionslösung beim Erhitzen auf 94 °C durch die nach oben gerichteten Öffnungen verdunstet. Bei den PCR-Experimenten wurde die Kammer deshalb zunächst mit Mineralöl und schließlich mit PCR-Lösung befüllt (Abb. 61).

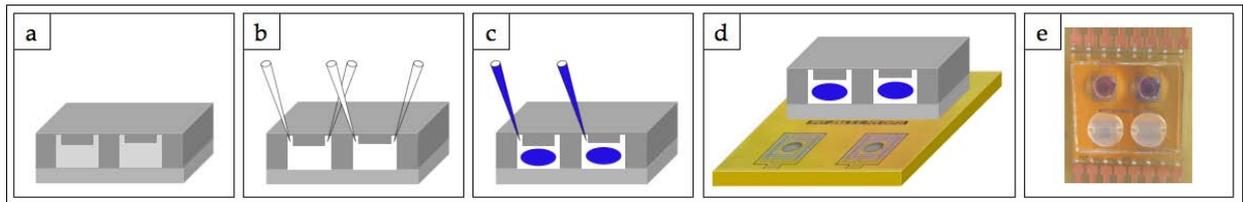


Abb. 61: Befüllung der PCR-Reaktionskammer für die Nukleinsäure-Amplifikation mit dem PCR-Chip Modul (a - unbefüllt, b - Befüllung mit Mineralöl, c - Hinzufügen von PCR-Ansatz, d und e - Applikation der befüllten Kammer auf dem PCR-Chip)

Mit dem PCR-Chip Modul konnten die ausgewählten, codierenden Bereiche sowohl des humanen p53-Genabschnittes als auch der ribosomalen DNA von *Phytophthora* erfolgreich amplifiziert werden. Die in Abb. 62 dargestellten Agarosegele verdeutlichen auch eine gute Vergleichbarkeit der Technologie zur tropfenbasierten on-Chip PCR sowie dem konventionellen Thermocycler. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch DNA verschiedener *Phytophthora*-Arten amplifiziert und gleichzeitig mit einer Biotin-Modifizierung versehen werden kann. Die Ausgangskonzentration an DNA betrug stets 2000 Moleküle/ $\mu\text{l}$  bzw. 1,2 fg/ $\mu\text{l}$ .

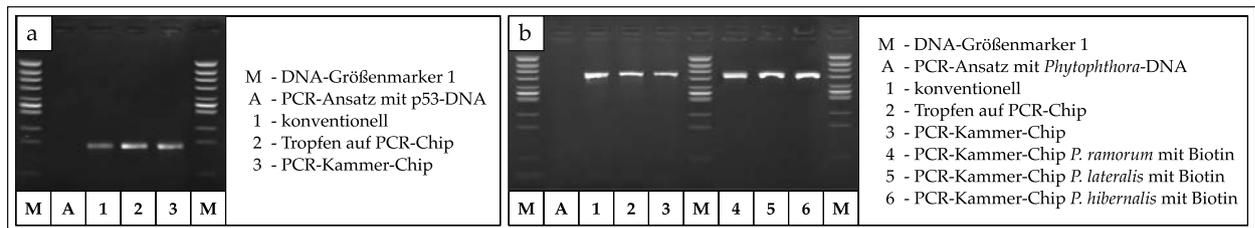


Abb. 62: Funktionsnachweis des PCR-Chip Moduls  
(a - amplifizierter p53-Genabschnitt, b - amplifizierter Genabschnitt von *Phytophthora*)

### 3.2.2.2 Ermittlung der Nachweisgrenze für die Amplifikation des *Phytophthora*-DNA-Abschnittes

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Anreicherung von genetischem Material, welches in realen Proben häufig nur in geringem Maße enthalten ist. Der Grund besteht u. a. darin, dass oft nur geringe Probenmengen entnommen werden, um z. B. die Pflanze in Fall eines negativen Befundes zu erhalten. Deshalb ist die Ermittlung der Nachweisgrenze in Bezug auf die Ausgangs-DNA-Konzentration von Bedeutung. Zu diesem Zweck wurden die 550 bp langen DNA-Abschnitte in definierten Konzentrationen zum PCR-Ansatz gegeben. Das Ergebnis der sich anschließenden Gelelektrophorese ist in Abb. 63 dargestellt und verdeutlicht, dass die Nachweisgrenze 200 Molekülen/ $\mu\text{l}$  bzw.

0,12 fg/ $\mu$ l beträgt. Bei einer Ausgangskonzentration von nur 20 Molekülen/ $\mu$ l sind nahezu keine Produktbanden erkennbar. Die nachgewiesene Sensitivität kann als ausreichend betrachtet werden, da der amplifizierte Abschnitt der ribosomalen DNA in einer Transkriptionseinheit enthalten ist, die sich innerhalb eines Genoms tandemartig mehrere hundert mal wiederholt [173]. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die DNA aus einem einzelnen Zellkern von *Phytophthora* für den Nachweis ausreichend ist.

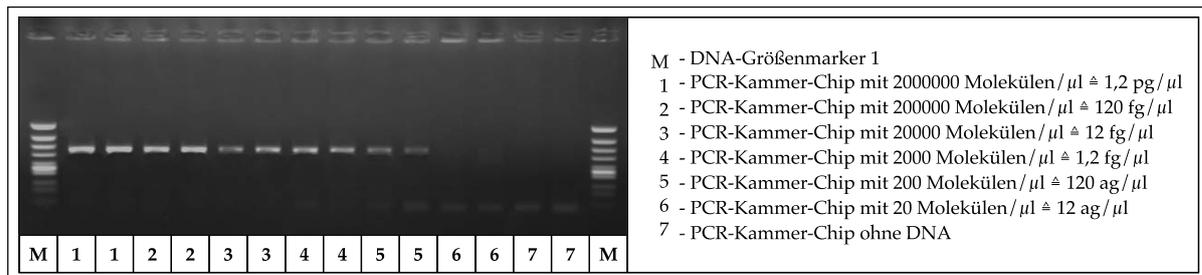


Abb. 63: Bestimmung der Nachweisgrenze an *Phytophthora*-DNA mit dem PCR-Chip Modul

### 3.2.2.3 Optimierung der Protokolldauer für die Amplifikation des *Phytophthora*-DNA-Abschnittes

Um eine zeitliche Verkürzung der Analyse zu erreichen, bietet sich die Umstellung auf eine 2-schrittige Protokolldurchführung an. Dabei werden Annealing und Elongation bei einer gemeinsamen Temperatur durchgeführt, die zunächst für den konkreten Anwendungsfall ermittelt werden muss. Dabei gilt es, eine Temperatur zu finden, bei der sowohl die Primer an die Einzelstränge binden als auch eine ausreichende Aktivität der *Taq* DNA-Polymerase vorhanden bleibt.

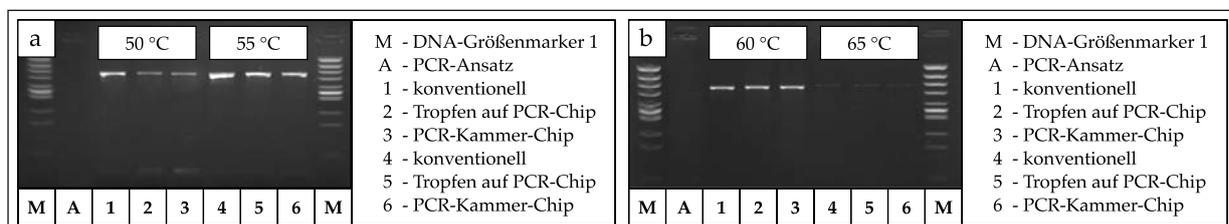


Abb. 64: Anwendung einer gemeinsamen Temperatur für Annealing und Elongation

(a - 50 und 55 °C, b - 60 und 65 °C)

Es wurden verschiedene Temperaturen zwischen 50 °C und 65 °C getestet, wobei sich 55 °C als am besten geeignet erwies, wie aus dem in Abb. 64 dargestellten Agarosegel

hervorgeht. Bei dieser Temperatur war die Ausbeute an PCR-Produkt im Vergleich zu den anderen getesteten Temperaturen am höchsten.

Bezüglich der unterschiedlichen, angewendeten Thermocycler-Technologien waren die Ergebnisse vergleichbar zueinander. Im weiteren Verlauf für die Optimierung des Protokolls bei den unterschiedlichen Thermocycler-Systemen wurde von einem Protokoll mit 60 s 94 °C und 120 s 55 °C ausgegangen.

Für die zeitliche Optimierung des Protokolls zur Amplifikation des ausgewählten Genabschnittes bei *Phytophthora* wurden die Reaktionszeiten für die Denaturierungs- sowie die zusammengeführte Annealing-/Elongationsphase schrittweise verkürzt und die Ergebnisse der PCR erneut mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Abb. 65).

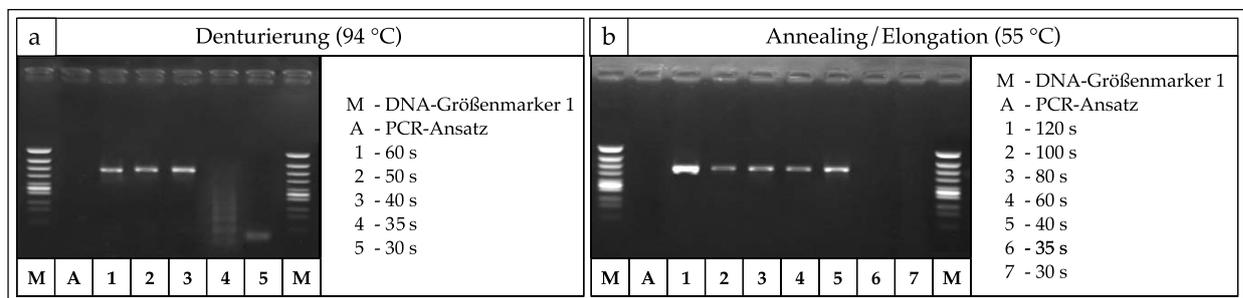


Abb. 65: Optimierung der Reaktionsdauer für die Amplifikation des *Phytophthora*-Genabschnittes mit dem PCR-Chip Modul (a - Denaturierungszeit, b - Annealing-/Elongationszeit)

Es stellte sich heraus, dass die Denaturierungszeit von ursprünglich 60 s auf 40 s verkürzt werden konnte, und für die zuvor 120 s lange Annealing-/Elongationsphase ebenfalls 40 s ausreichend sind. Damit konnte die Gesamtdauer der PCR-Reaktion inklusive der einzelnen Heiz- und Kühlphasen mit dem PCR-Chip Modul von ursprünglich 195 min auf 73 min verkürzt werden.

Für den konventionellen Thermocycler wurde zum Vergleich ebenfalls eine zeitliche Optimierung der Reaktionsdauer durchgeführt. Dabei ergab sich ein deutlich abweichendes Protokoll mit 5 s Denaturierungszeit und 65 s für Annealing und Elongation (Abb. 66). Unter Einbeziehung aller Heiz- und Kühlphasen ergibt sich dabei eine gesamte Reaktionsdauer von 94 min. Die starken Abweichungen bei der zeitlich optimierten Protokollführung zwischen dem PCR-Chip Modul und dem konventionellen Thermocycler sind auf die unterschiedlichen, technologischen Umsetzungen sowie die unterschiedlichen Materialien der mit der Reaktionslösung in Berührung kommenden Bestandteile zurückzuführen.

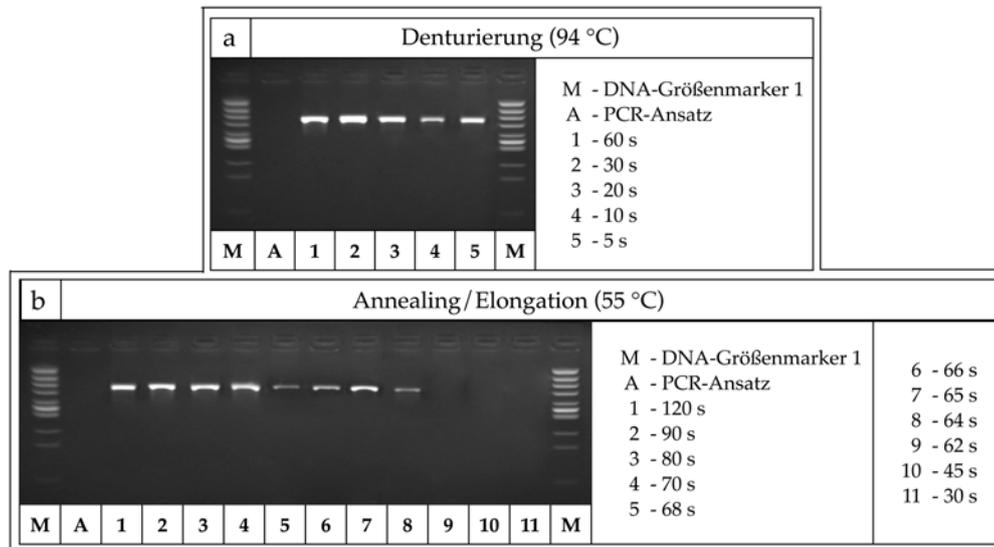


Abb. 66: Optimierung der Reaktionsdauer für die Amplifikation des *Phytophthora*-Genabschnittes im konventionellen Thermocycler (a - Denaturierungszeit, b - Annealing-/Elongationszeit)

### 3.2.3 Etablierung von Nachweisprotokollen am DNA-Chip Modul

Eine der Zielstellungen im Rahmen dieser Arbeit bestand in der Entwicklung eines Lab-on-a-Chip Systems, dass die on-Chip PCR mit einem elektrischen DNA-Chip für den Hybridisierungsnachweis auf einem Mikroarray vereint. Zur Überprüfung der Anwendbarkeit dieser Mikroarray-Technologie für den Nachweis verschiedener *Phytophthora*-Arten sowie Anpassung und Optimierung des Protokolls wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Die Detektion erfolgte dabei stets optisch über einer Grauwertanalyse der entsprechenden Spots sowie teilweise elektrisch durch Ermittlung der Leitwerte an den Elektrodenspalten. Die markierten PCR-Produkte wurden stets konventionell hergestellt, da sie für die nachfolgenden Experimente in größeren Mengen benötigt wurden. Die DNA-Ausgangskonzentration betrug dabei immer 2000 Moleküle/ $\mu\text{l}$  bzw. 1,2 fg/ $\mu\text{l}$ .

#### 3.2.3.1 Stationäre Hybridisierung ohne aktive Bewegung der Reaktionslösung

Erste Versuche zur Etablierung eines Nachweisprotokolls der PCR-Produkte vom p53- und *Phytophthora*-Genabschnitt wurden mittels stationärer Hybridisierung in einem Spalt zwischen dem Mikroarray-Chip und einem Deckglas durchgeführt. Das Waschen der Chips sowie Aufbringen weiterer Reaktionslösungen für den Nachweis erfolgte manuell.

a) *Nachweis von Protein p53*

Für den Nachweis vom PCR-Produkt des p53-Genabschnittes auf den Mikroarray-Chips wurde sowohl eine Fluoreszenz-Markierung als auch enzymatisch abgeschiedenes Silber zur Detektion angewendet. Die Chips wurden im Anschluss an die Analyse mikroskopisch ausgewertet und eine Grauwertanalyse durchgeführt. Die Markierung wurde mittels entsprechend modifizierter Primer im Verlauf einer konventionell durchgeführten PCR in die Amplifikate (Abb. 67) eingebaut.

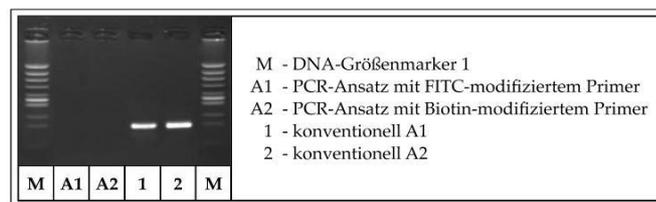


Abb. 67: Mit dem konventionellen Thermocycler amplifiziertes und unterschiedlich modifiziertes PCR-Produkt vom p53-Genabschnitt

Die Ergebnisse der Grauwertanalyse sowie beispielhafte, mikroskopische Aufnahmen der Spots sind in Abb. 68 dargestellt. Korrelierend zu den sichtbaren Spots weisen die ermittelten Grauwerte jeweils nur im Fall der hybridisierten Proben und bei der Positivkontrolle hohe Beträge auf.

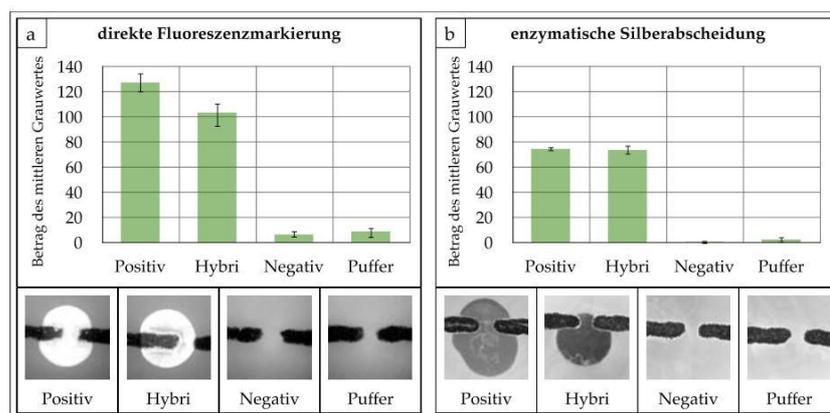


Abb. 68: Hybridisierungsnachweis des amplifizierten p53-Genabschnittes mit dem Mikroarray-Chip (a - direkte Fluoreszenz-Markierung, b - enzymatische Silberabscheidung)

b) *Nachweis von drei ausgewählten Phytophthora-Arten*

Für erste Versuche zur Identifizierung ausgewählter *Phytophthora*-Arten mit dem Mikroarray-Chip wurden die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Protokolle

zur Hybridisierung Biotin-markierter PCR-Produkte und anschließender Silberabscheidung angewendet. Die PCR-Produkte wurden ebenfalls mit dem konventionellen Thermocyclern erzeugt, wobei das entsprechende Protokoll zur Amplifikation des ausgewählten Genabschnittes der *Phytophthora*-DNA angewendet wurde. Auf dem Mikroarray wurden spezifische Fänger-Oligonukleotide für die Gattung sowie die nahe verwandten Arten *P. ramorum*, *P. lateralis* und *P. hibernalis* immobilisiert.

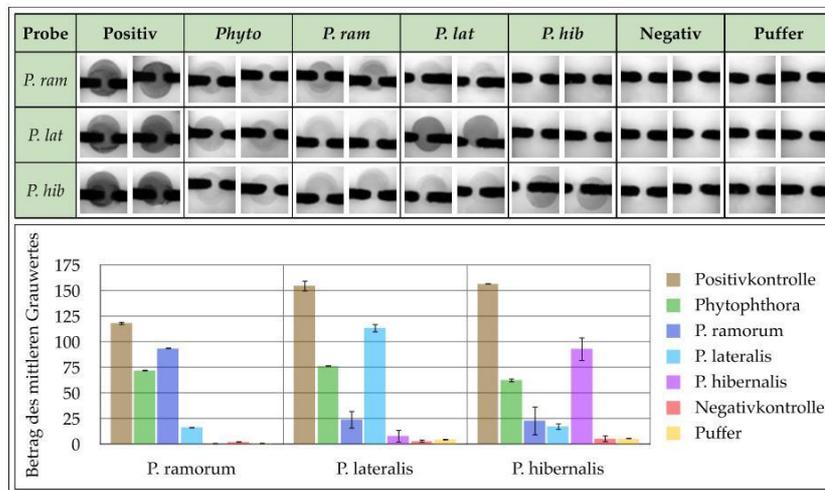


Abb. 69: Nachweis und Unterscheidung von *P. ramorum*, *P. lateralis* und *P. hibernalis* mit dem Mikroarray-Chip nach stationärer Hybridisierung

Die in Abb. 69 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die einzelnen Arten anhand der Signalintensitäten voneinander unterscheidbar sind und die ausgewählten Sequenzen eine ausreichende Spezifität aufweisen. Allerdings sind die Signalintensitäten vor allem im Fall von *P. ramorum* und *P. hibernalis* relativ schwach, weshalb eine Verbesserung der angewendeten Protokolle erforderlich wurde. Die Oligonukleotidsequenz für den Nachweis der Gattung wies keine ausreichende Spezifität auf, was an den verhältnismäßig schwachen Signalen erkennbar ist. Für weitere Versuche wurde deshalb auf den Gattungsnachweis verzichtet.

### 3.2.3.2 Hybridisierung der Reaktionslösung im Durchfluss mit dem DNA-Chip Modul

Die Benutzung des DNA-Chip Moduls mit integrierter Hybridisierungskammer sollte die Effizienz der Nachweisreaktion steigern und die Reaktionsdauer verkürzen, da die Reaktionslösungen mit einer Pumpe über den Chip geleitet und während der Reaktion in Bewegung verbleiben können. Das DNA-Chip Modul besteht aus dem Mikroarray-Chip mit Siebdruck-Elektrodenstrukturen, der zusammen mit einer Silikon-Abformung

in eine beheizbare Hybridisierungskammer eingelegt wird. Diese Kammer verfügt zudem über fluidische Anschlüsse, sodass Reaktionslösungen durch die Kanäle der Silikonabformung über den Chip geleitet werden können. Diese Technologie verspricht eine effiziente Reaktion aufgrund der ständigen Bewegung der Reaktionslösung sowie Einsparungen im Reagenzienverbrauch durch das verringerte Reaktionsvolumen.

### 3.2.3.2.1 Protokolloptimierung für die Präparation der Mikroarrays

Um die Qualität der Mikroarrays für den Nachweis verschiedener *Phytophthora*-Arten zu verbessern und eine reproduzierbar, gleichbleibende Güte zu gewährleisten, wurden verschiedene Verfahren zur Präparation des Mikroarrays getestet. Neben dem bekannten Verfahren zur Immobilisierung Amino-modifizierter Oligonukleotide für mehrere Stunden in einer feuchten Kammer bei 37 °C wurden die Oligonukleotide auch mit UV-Licht immobilisiert [174] sowie ein weiteres Verfahren mit alternierendem Eintrocknen und Anfeuchten der Spots angewendet. Letzteres erwies sich als am besten geeignet, da die Spots der Positivkontrolle und der hybridisierten PCR-Produkte eine hohe Intensität sowie Homogenität aufwiesen (Abb. 70). Inhomogenitäten der Spots z. B. durch unzureichende Silberabscheidung in der Spotmitte können eine elektrische Detektion erschweren oder unmöglich machen. Zur Präparation sämtlicher, weiterer Mikroarrays wurde ausschließlich das alternierende Protokoll angewendet.

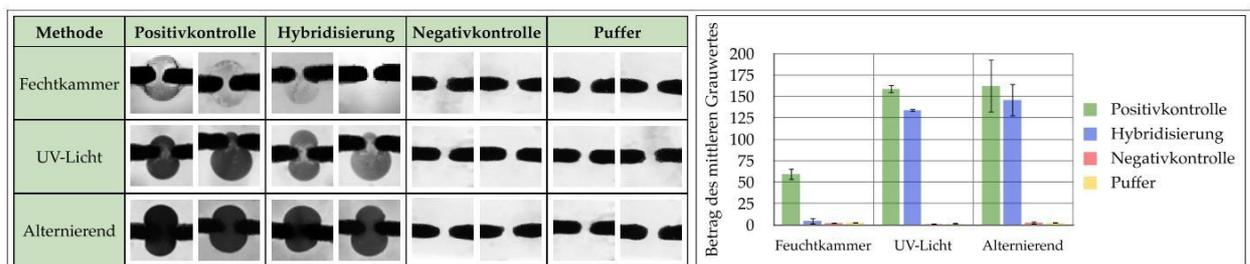


Abb. 70: Vergleich verschiedener Methoden zur Mikroarray-Präparation

Weiterhin wurden neben der verwendeten 3x SSC-Lösung andere Puffer bei der Immobilisierung der Oligonukleotide auf der Mikroarray-Oberfläche angewendet. Zu den Pufferlösungen gehörte eine herstellereigene Spotting Solution in einfacher Konzentration (1x SS), 3x SSC- und 5x PBS-Puffer. Die verschiedenen Oligonukleotide wurden jeweils darin gelöst und das alternierende Protokoll zur Immobilisierung angewendet. Bei den Versuchen erwies sich 3x SSC-Lösung als am besten geeignet, da in diesem Fall nicht nur bei der Positivkontrolle, sondern auch bei den hybridisierten

Amplifikaten deutlich erkennbare und homogene Spots mit hoher Intensität detektiert werden konnten (Abb. 71).

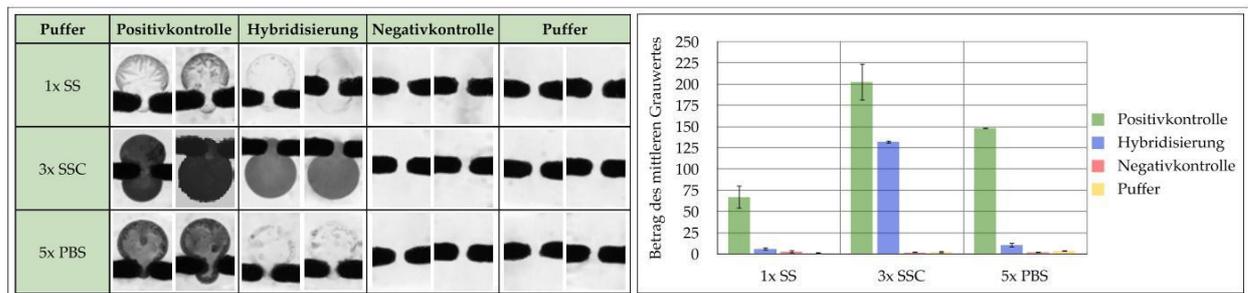


Abb. 71: Untersuchung verschiedener Pufferlösungen zur Immobilisierung der Oligonukleotide auf dem Mikroarray

Eine Variation der SSC-Konzentration brachte keine Veränderung. Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurden Konzentrationen zwischen 3x und 15x SSC als Puffer zur Verdünnung der Oligonukleotide eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 72 dargestellt und zeigen keine signifikante Veränderung bezüglich Intensität oder Homogenität der resultierenden Spots.

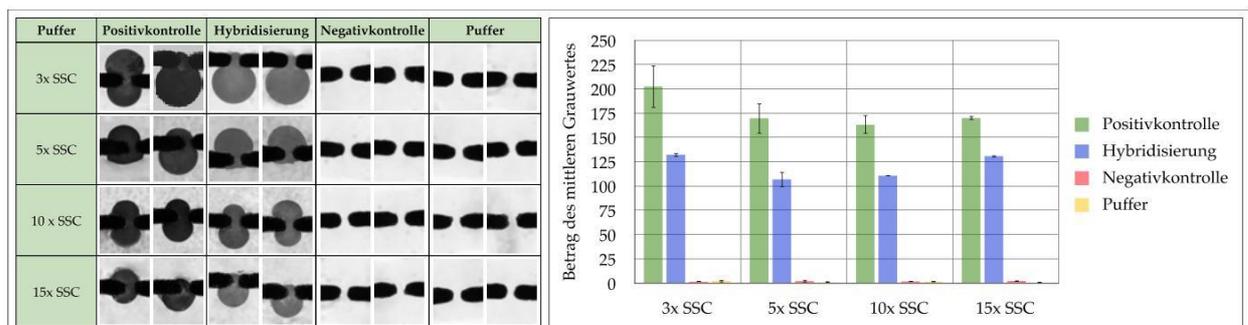


Abb. 72: Variation der SSC-Konzentration zur Immobilisierung der Oligonukleotide

### 3.2.3.2.2 Ermittlung der optimalen Hybridisierungstemperatur

Die bei der Hybridisierung von DNA-Einzelsträngen einzustellende Temperatur kann theoretisch berechnet werden. Dabei spielt vor allem die Länge des zu hybridisierenden Sequenzabschnittes sowie die Basenfolge bzw. der Gehalt an Guanin und Cytosin eine entscheidende Rolle. Aber auch andere Parameter, wie z. B. der Salzgehalt der Hybridisierungslösung oder die methodische Umsetzung (in Lösung oder oberflächenbasiert) können einen Einfluss auf die optimale Hybridisierungstemperatur haben. Aufgrund dieser Erkenntnisse existieren verschiedene Formeln zur Berechnung dieser Tempera-

tur. Außerdem ist es oft unerlässlich, die theoretisch ermittelten Werte in einem praktischen Test zu überprüfen und ggf. anzupassen. Für fünf verschiedene *Phytophthora*-Arten mit hoher, phytopathologischer Relevanz wurden die in Tab. 15 dargestellten Hybridisierungstemperaturen nach Fotin [150] berechnet. Die auf dieser Berechnungsgrundlage ermittelten Temperaturen erwiesen sich bereits beim Hybridisierungsnachweis des p53-Genabschnittes als geeignet. Für die oberflächenbasierte Hybridisierung ergab sich dabei ein Durchschnittswert von rund 57,01 °C.

Oligonukleotid	Anzahl Guanin und Cytosin	T <sub>m</sub> [°C]	T <sub>m</sub> Chip [°C]
<i>P. ramorum</i>	18	72,23	58,88
<i>P. lateralis</i>	15	68,13	53,96
<i>P. hibernalis</i>	13	65,40	50,68
<i>P. kernoviae</i>	14	66,77	52,32
<i>P. plurivora</i>	18	72,23	58,88
<i>P. cinnamomi</i>	18	72,23	58,88
<i>P. alni</i>	22	77,70	65,44

Tab. 15: Berechnete Hybridisierungstemperaturen

Zur praktischen Überprüfung wurden außerdem Temperaturen von 30 °C, 45 °C und 60 °C angewendet. Die in Abb. 73 dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass der Hybridisierungsnachweis der PCR-Produkte sowohl bei 45 °C als auch bei 55 °C und 60 °C erfolgreich verläuft. Dagegen ist eine Temperatur von 30 °C für eine erfolgreiche Hybridisierung offensichtlich nicht ausreichend. Bei sämtlichen weiteren Experimenten wurde eine Temperatur von 55 °C angewendet, welche dem theoretisch ermittelten Wert am nächsten ist und sich bei den praktischen Versuchen aufgrund der höchsten Signalintensität als geeignet herausstellte.

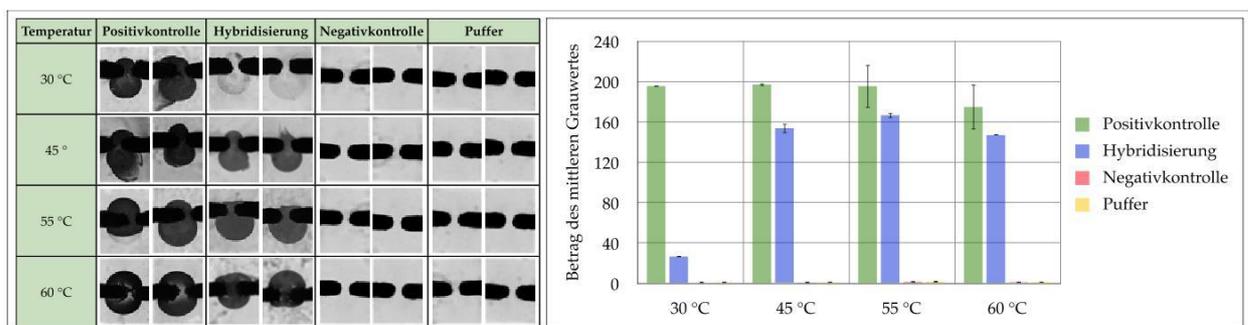


Abb. 73: Variation der Hybridisierungstemperatur

3.2.3.2.3 Unterscheidung verschiedener *Phytophthora*-Arten

Das am Beispiel von *P. ramorum* etablierte Nachweisprotokoll wurde nun zur Detektion weiterer *Phytophthora*-Arten angewendet. Dabei wurde die Unterscheidbarkeit der einzelnen Arten mit dem Nachweissystem untersucht.

## a) DNA-Proben aus Reinkultur

Bei Versuchen mit DNA-Mikroarrays zum Nachweis von *Phytophthora*-DNA fünf verschiedener Arten aus Reinkulturen konnte nun demonstriert werden, dass diese eindeutig voneinander unterschieden werden können. Die ausgewählten Arten umfassen sehr eng verwandte Spezies, wie *P. ramorum* und *P. lateralis*. Außerdem wurden für den Mikroarray-Nachweis besonders relevante *Phytophthora*-Arten ausgewählt, die ein hohes Schadenpotential aufweisen und z. T. als meldepflichtig gelten.

Probe	Positivkontrolle	<i>P. ramorum</i>	<i>P. lateralis</i>	<i>P. kernoviae</i>	<i>P. plurivora</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>Py. oligandrum</i>	<i>Py. ultimum</i>	Negativkontrolle	Puffer
<i>P. ramorum</i>										
<i>P. lateralis</i>										
<i>P. kernoviae</i>										
<i>P. plurivora</i>										
<i>P. cinnamomi</i>										

Tab. 16: Unterscheidung verschiedener *Phytophthora*-Arten aus Reinkulturen

Die in den Tab. 16 und Abb. 74a dargestellten Ergebnisse zur optischen Auslesung demonstrieren, dass sich das Verfahren sehr gut für diese Anwendung eignet. Bei jeder der fünf Arten ergaben sich im Fall kompletter Übereinstimmung der Hybridisierungssequenz sowie bei der Positivkontrolle deutlich erkennbar Spots mit entsprechende hohen Grauwerten. Es ist ebenfalls zu erkennen, dass sich bei der optischen Detektion auch schwache Signale durch Kreuzreaktionen mit anderen Arten ergeben. Dies ist vor allem bei *P. ramorum* und *P. lateralis* ersichtlich. Die Intensitäten dieser Spots sind allerdings wesentlich geringer im Vergleich zu den jeweils komplementären Proben.

Der Grauwert betrug bei der Positivkontrolle rund 220 und bei den hybridisierten PCR-Produkten zwischen 140 und 180. An den Positionen der jeweils nicht komplementären Proben sowie in Fall der Negativkontrolle ergaben sich nur geringe Hintergrundwerte unter 50 bzw. in den meisten Fällen unter 25.

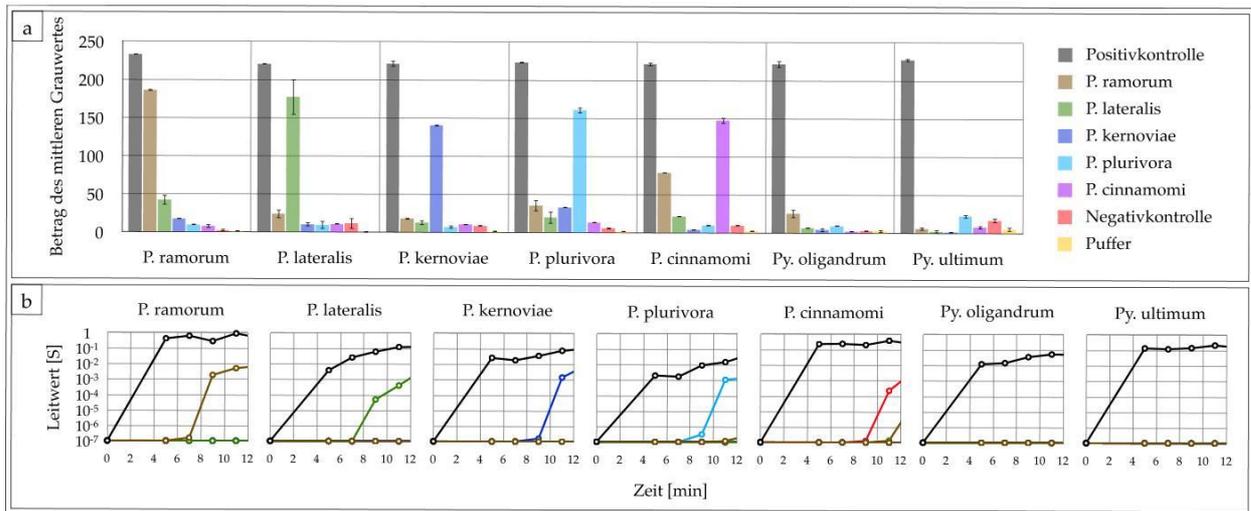


Abb. 74: Unterscheidung verschiedener *Phytophthora*-Arten aus Reinkulturen  
(a - optische Detektion, b - elektrische Detektion)

Neben der DNA aus Proben der verschiedenen *Phytophthora*-Arten wurden auch PCR-Produkte der nahe verwandten Gattung *Pythium* auf den Array gegeben. Sowohl bei *Py. oligandrum* als auch bei *Py. ultimum* ergaben sich bei keinem der Art-spezifischen Fänger-Oligonukleotide signifikante Intensitäten. Eine Nachverstärkung der Silberspots war notwendig, um aus den enzymatisch katalysierten Silber-Partikeln eine durchgängig, leitfähige Überbrückung der Elektrodenspalte zu erzeugen. Nach 5 min enzymatischer Silberabscheidung wurde insgesamt 8 min nachverstärkt. Im Verlauf der Silberabscheidung wurden die Leitwerte dann zu fünf verschiedenen Zeiten detektiert (Abb. 74b). Bei der Positivkontrolle konnten bereits nach 5 min Leitwerte zwischen 10<sup>-3</sup> S und 1 S erreicht werden. An den Positionen der hybridisierten PCR-Produkte konnten jeweils nach einer Zeit von 9 min bis 11 min Leitwerte zwischen 10<sup>-4</sup> S und 10<sup>-2</sup> S gemessen werden. Für alle anderen Messpunkte konnte kein Anstieg der Leitwerte detektiert werden. Einzig im Fall von *P. cinnamomi* konnte nach 12 min bei dem für *P. ramorum* spezifischen Fänger-Molekül ein geringfügiger Anstieg auf 10<sup>-6</sup> S gemessen werden. Prinzipiell konnten alle ausgewählten Arten eindeutig bestimmt werden, da sowohl die Grauwerte als auch die elektrischen Leitwerte der hybridisierten PCR-Produkte neben der Positivkontrolle jeweils die höchste Signalintensität aufweisen. Durch die Festlegung von Schwellenwerten für diese diagnostische Anwendung bei beiden Messmethoden könnte eine automatisierte und eindeutige Identifizierung der in der Probe enthaltenen *Phytophthora*-Arten ermöglicht werden. Im Fall der optischen Auslesung würde dieser Schwellenwert bei einem Grauwert von 100 liegen und im Fall der elektrischen Auslesung bei einem Leitwert von 10<sup>-6</sup> S.

b) DNA-Proben aus Blattmaterial

Auch bei der Anwendung von infiziertem Pflanzenmaterial konnte der Nachweis mit dem angewendeten Protokoll erfolgreich durchgeführt werden. Bei diesen Versuchen wurde zunächst sämtliche DNA aus *Rhododendron*-Blätter extrahiert und diese dem PCR-Ansatz zugeführt. Dabei wurden sowohl Blätter mit Infektionen verschiedener *Phytophthora*-Arten als auch Blattmaterial ohne Infektion (Negativkontrolle) verwendet.

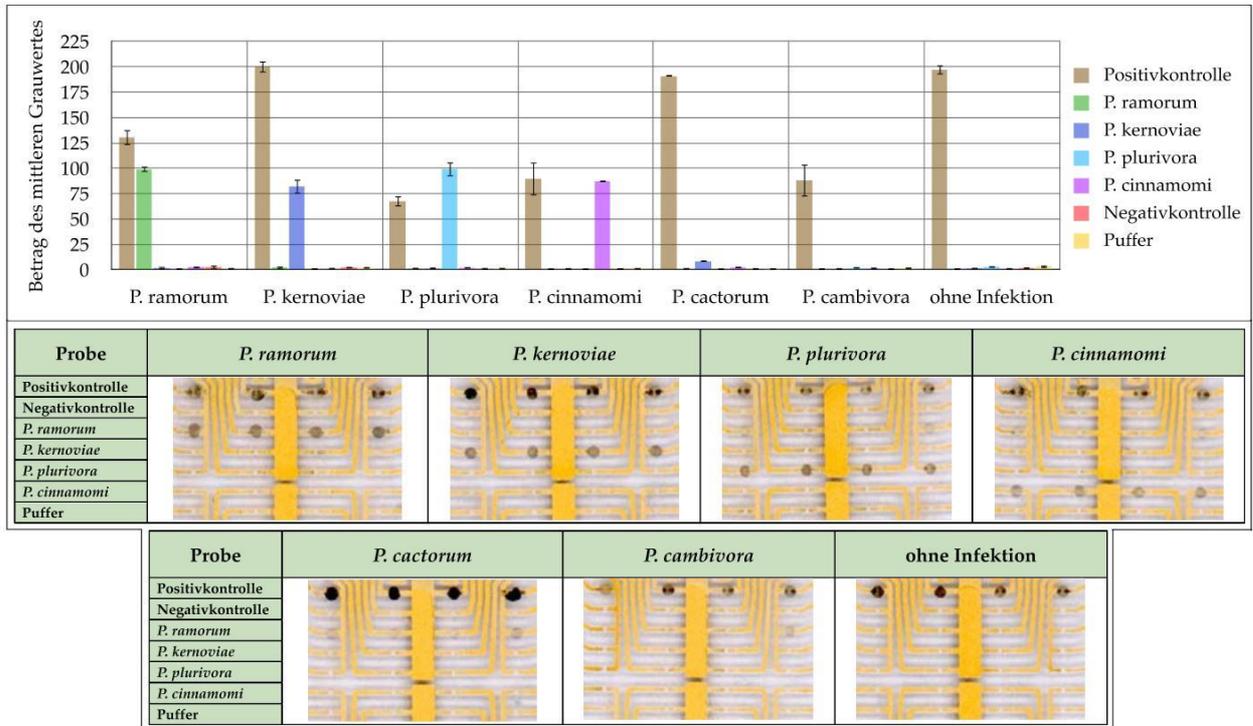


Abb. 75: Unterscheidung verschiedener *Phytophthora*-Arten aus Blattproben

Obwohl die Signale der Positivkontrolle hohe Intensitätsschwankungen aufweisen und die Grauwertbeträge insgesamt niedriger ausfallen, als bei den Experimenten mit Material aus Reinkulturen, ist auch bei dieser Versuchsreihe die Identifizierung der einzelnen *Phytophthora*-Arten gelungen. Die Grauwertbeträge reichen bei der Positivkontrolle von 70 bis 200 und bei den hybridisierten Proben von 75 bis 100 (Abb. 75).

Stimmen Fänger- und Ziel-Sequenz nicht überein, bleiben die Grauwerte unter einem Wert von 10. Es wurden die vier *Phytophthora*-Arten *P. ramorum*, *P. kernoviae*, *P. plurivora* und *P. cinnamomi* mit Hilfe entsprechender Fänger-Oligonukleotide auf dem Mikroarray eindeutig identifiziert und voneinander unterschieden. Zusätzlich wurden verschiedene Kontrollen eingesetzt, darunter andere *Phytophthora*-Arten, wie *P. cactorum* oder *P. cambivora* sowie *Rhododendron* ohne Infektion. Bei all diesen Kontrollen ergaben sich

keinerlei signifikante Intensitäten an den Positionen der artspezifischen Fänger-Moleküle auf dem Mikroarray. Damit konnte gezeigt werden, dass eine Infektion eindeutig nachgewiesen werden kann und damit die pflanzliche DNA keine Kreuzreaktionen mit den verwendeten Proben hervorruft. Außerdem wurde erneut demonstriert, dass die verwendeten Sequenzen eine hohe Artspezifität aufweisen.

### 3.2.3.2.1.5 Optimierung der Protokolldauer für den *Phytophthora*-Nachweis mit dem DNA-Chip Modul

Miniaturisierte Chip-Systeme für die Bioanalytik weisen großes Potential für hohe Reaktionsgeschwindigkeiten auf. Dies ist auf die geringe Größe und damit reduzierte, thermische Masse zurückzuführen. Das verwendete DNA-Chip Modul bietet zusätzlich den Vorteil einer effizienteren Umsetzung des Nachweises durch die Bewegung der Lösungen während der Reaktion. Im Ergebnis der Entwicklung sollte die Nachweisreaktion mit dem neuen Lab-on-a-Chip System deshalb nicht wesentlich mehr Zeit in Anspruch nehmen, als es mit den derzeit gängigen Verfahren der Fall ist. Dazu gehört beispielsweise der *Phytophthora*-Nachweis mittels konventioneller Real-Time PCR, der innerhalb von zwei Stunden durchführbar ist [175]. Deshalb bestand eine Zielstellung darin, die gesamte Analysendauer möglichst gering zu halten. Aus diesem Grund wurde neben der Dauer für die Amplifikation der PCR-Produkte auch die Dauer für den Hybridisierungsnachweis mittels Mikroarray reduziert. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Hybridisierungszeit schrittweise verkürzt und die Ergebnisse auf eine gleichbleibende Signalqualität hin überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass auch bei einer Hybridisierungszeit von nur 5 min hohe Signalintensitäten mit Grauwertbeträgen von 150 für die Positivkontrolle und 115 für die hybridisierten PCR-Produkte erzielt werden können (Abb. 76).

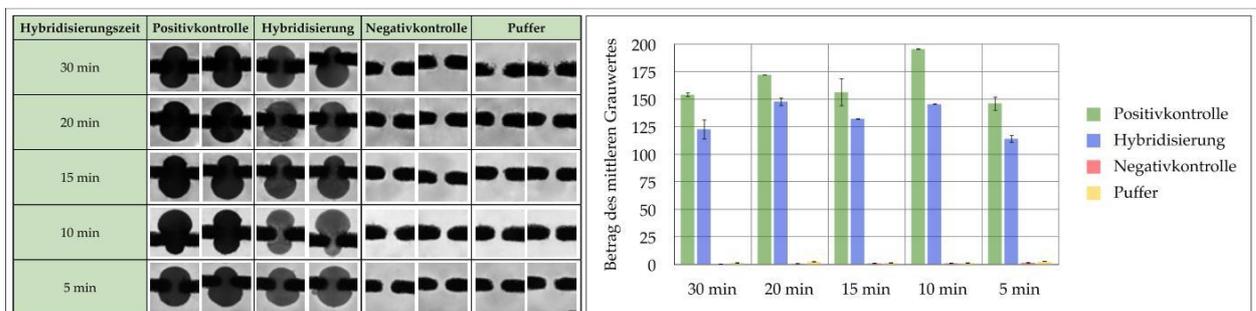


Abb. 76: Verringerung der Hybridisierungszeit

Bei längeren Hybridisierungszeiten von bis zu 30 min waren die geringfügig schwankenden Signale nur leicht erhöht. Somit ist davon auszugehen, dass der größte Teil der Fänger-Oligonukleotide bereits in den ersten Minuten der Hybridisierungsphase mit den PCR-Produkten hybridisiert.

Im weiteren Verlauf wurde eine ähnliche Zeitoptimierung für die Enzymanbindung durchgeführt. Die in Abb. 77 dargestellten Ergebnisse demonstrieren, dass bei einer Reduzierung der Enzymanbindungszeit von 15 auf 10 oder 7 min die Signalintensitäten nur sehr geringfügig abnehmen. Bei einer Enzymanbindungszeit von nur 7 min konnten Grauwertbeträge von 190 bei der Positivkontrolle und 130 bei den hybridisierten PCR-Produkten gemessen werden.

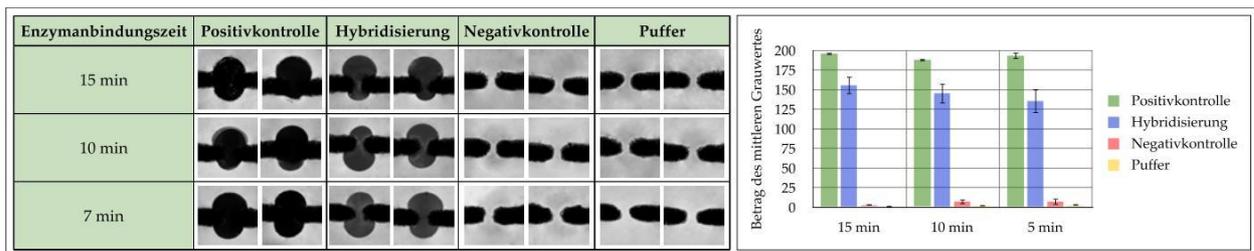


Abb. 77: Verringerung der Enzymanbindungszeit

Damit konnten für den *Phytophthora*-Nachweis mittels elektrisch auslesbaren DNA-Chips insgesamt 33 min eingespart werden. Zusammen mit den kurzen Waschschrritten und der enzymatischen Silberabscheidung ergibt sich von ursprünglich insgesamt 66 min für die Nachweisreaktion mit dem DNA-Chip Modul nun eine Dauer von 33 min. Im Vergleich dazu wurden für die Nachweisreaktion bei stationärer Hybridisierung insgesamt mehrere Stunden benötigt.

### 3.2.4 Entwicklung des Komplettsystems und Anpassung der Nachweisprotokolle

Anhand der gewonnenen Erkenntnisse aus der Entwicklung von PCR- und DNA-Chip Modul wurde ein neues Lab-on-a-Chip System entwickelt, das die Amplifikation von Nukleinsäuren mit einem Mikroarray-Nachweis in direkter Aufeinanderfolge kombiniert. An dieses neue System wurden dabei bestimmte Ansprüche hinsichtlich dem applizierbaren Reaktionsvolumen sowie der zu realisierenden Temperaturen gestellt, die bei den Entwicklungen berücksichtigt werden mussten.

### 3.2.4.1 Aufbau und Konstruktion des Gesamtsystems

Das Kernstück des neuen Lab-on-a-Chip-Systems ist eine Baugruppe mit jeweils zwei integrierten Peltier-Heizelementen und Temperatursensoren (Abb. 78a). Die beiden Temperierungszonen sind durch einen Luftspalt voneinander getrennt und können unabhängig voneinander betrieben werden. Eine der Zonen ist für das thermische Management bei der PCR, die andere bei der Hybridisierung vorgesehen. Die verwendeten Peltier-Elemente weisen insgesamt einen Temperaturbereich von rund  $-10$  bis  $120$  °C auf. Bei der PCR müssen während der Denaturierungsphase Temperaturen um  $94$  °C erreicht werden. Das erforderliche Temperaturminimum liegt bei rund  $0$  °C, da durch zügiges Abkühlen die Einzelstränge der amplifizierten und denaturierten PCR-Produkte fixiert und damit für den anschließenden Hybridisierungsnachweis zugänglich gemacht werden. Zur Kontrolle der Temperatur ist jeweils ein Pt1000-Messelement eingebaut und an den Temperaturregler angeschlossen. Die Baugruppe verfügt zudem über einen Kühlkörper zur Wärmeabfuhr sowie eine Vorrichtung zum Verschließen der Reaktionskammer.

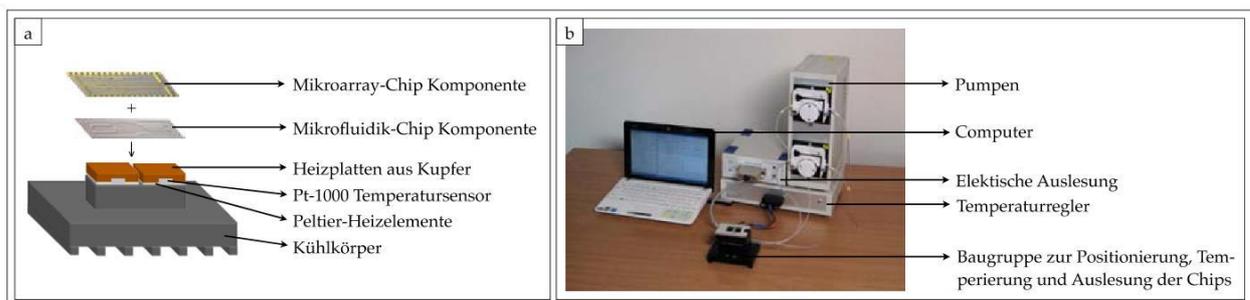


Abb. 78: Darstellung des neuen Lab-on-a-Chip Systems  
(a - Komponenten des Gesamtsystems, b - Detailansicht der Baugruppe)

Zur Peripherie des Systems gehört außerdem ein elektrisches Auslesegerät sowie kompakte Einbau-Peristaltikpumpen zur Bewegung der Reaktionslösung durch die Kanäle des Chips (Abb. 78b). Zusammen mit einem Laptop oder auch PDA und verfügbarer Steuerungs- und Auswertesoftware (Abb. 79) ist ein System entstanden, welches sich durch ein relativ kompaktes Format und geringes Gewicht auszeichnet. Neben dem eigentlichen Chip, auf dem die molekularbiologischen Reaktionen stattfinden, sind damit im Gesamtsystem alle technisch notwendigen Komponenten für den Reaktionsablauf enthalten.

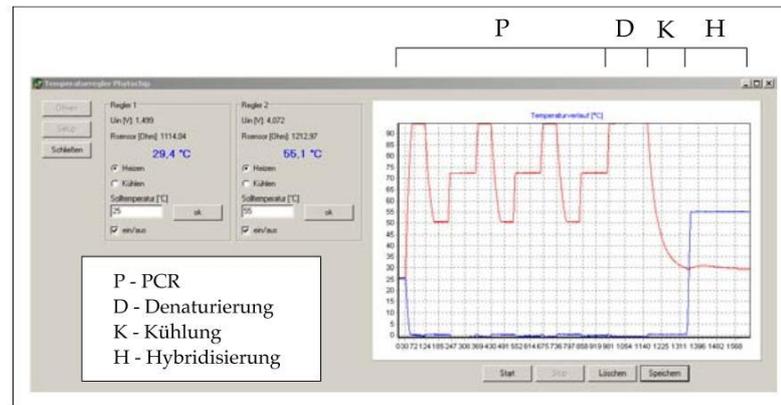


Abb. 79: Grafische Benutzeroberfläche mit thermischen Profil einer Nachweisreaktion

### 3.2.4.2 Chip-Design

Die Chips bestanden ihrerseits aus zwei Komponenten. Ein Glas-Chip mit Elektrodenstrukturen repräsentiert die Mikroarray-Komponente (Abb. 80b).

Die verschiedenen Fänger-Oligonukleotide werden an den Positionen der 32 Elektrodenspalte immobilisiert. Um Flüssigkeiten über den Chip leiten zu können, wird eine flexible Mikrofluidik-Komponente (Abb. 80a) mit integrierten, halbgeöffneten Kanalstrukturen mit der Mikroarray-Komponente zusammengeführt.

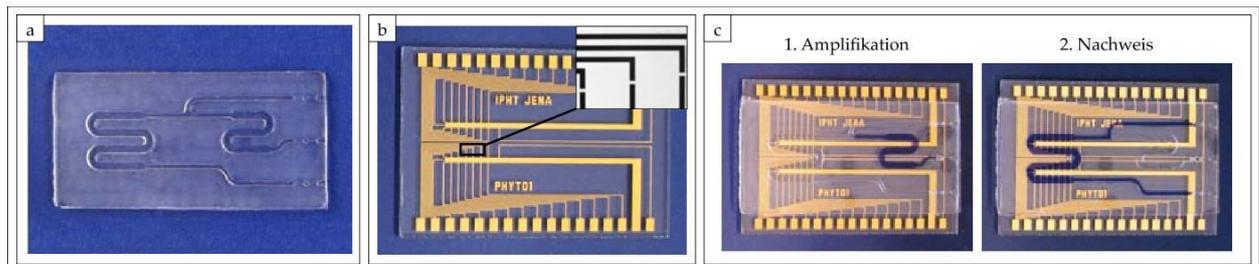


Abb. 80: Darstellung der entwickelten Chip-Komponenten (a - Mikrofluidik-Komponente, b - Mikroarray-Komponente mit vergrößerter Darstellung von Elektrodenspalten sowie des Chips nach Befüllung zur Umsetzung der beiden Reaktionsschritte (c))

Durch angemessenen Druck beim Zusammenführen der Chips werden die Kanäle abgedichtet. Im Verlauf der Reaktion erfolgt zunächst die Amplifikation der PCR-Produkte innerhalb einer S-förmigen Reaktionskammer. Der Hybridisierungsnachweis erfolgt innerhalb einer zweiten, M-förmigen Kammer, die ebenfalls im Chip integriert ist (Abb. 80c). Die Mikrofluidik-Komponente besitzt zudem Führungsstrukturen für die anzuschließenden Kanülen sowie Septen an den Aus- bzw. Einlässen.

### 3.2.4.3 Anpassung der Temperatureinstellungen

Aufgrund der Dicke der Chip-Komponenten sowie der Anordnung der Temperatursensoren unterhalb der Heizplatten aus Kupfer war davon auszugehen, dass die Temperaturen im Inneren der Reaktionskammern von den gemessenen Werten abweichen. Bei ersten Versuchen zur Amplifikation der *Phytophthora*-DNA in dem neuen Lab-on-a-Chip System konnten bei Anwendung des im PCR-Chip Modul optimierten Protokolls aus diesem Grund keine PCR-Produkte nachgewiesen werden. Eine Wärmebildaufnahme von der Oberfläche eines auf die Baugruppe aufgelegten Chips ist in Abb. 81a dargestellt und verdeutlicht diesen Aspekt sehr anschaulich. Anstatt der in diesem Fall mit dem Temperatursensor gemessenen Temperatur von 90 °C im Bereich der links dargestellten PCR-Zone liegt die erreichte Temperatur für diesen Bereich nur bei 74 bis 80 °C.

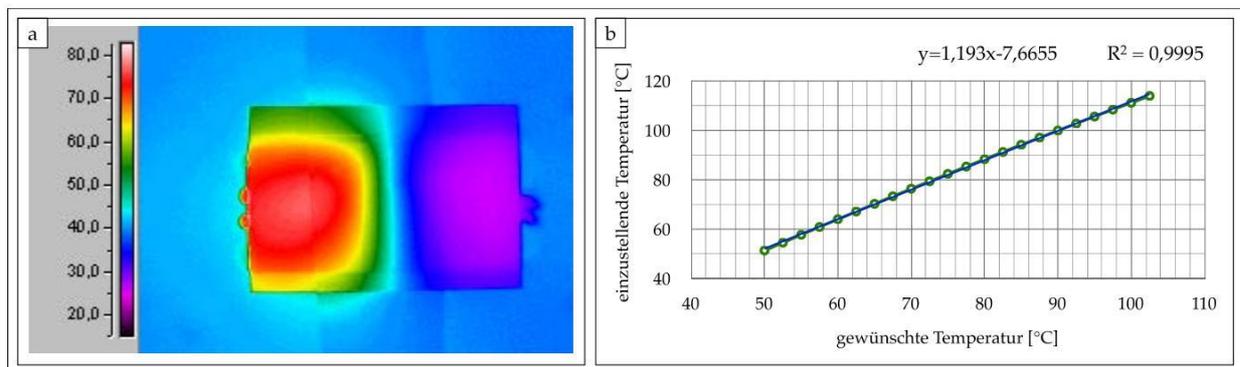


Abb. 81: Temperaturmessungen am Chip-System (a - Wärmebildaufnahme, b - Messung der Temperatur im Kanal in Abhängigkeit von der Temperatur am Heizelement)

Da mit einem Wärmebild lediglich die Temperaturen der Oberfläche von Objekten bestimmt werden können, wurde schließlich ein zweites Pt1000-Element zur Temperaturmessung im Inneren der Reaktionskammer verwendet. Die Ergebnisse der Vergleichsmessung sind im Diagramm von Abb. 81b dargestellt. Innerhalb des für die PCR-Reaktion relevanten Temperaturbereiches zwischen 50 °C und 100 °C ergab sich ein nahezu linearer Zusammenhang. Dabei steigt mit zunehmender Zieltemperatur die Temperaturdifferenz zwischen Heizelement und Kanal.

Bei praktischen Tests wurden dann die Zieltemperaturen der Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsphase nacheinander in einem Bereich um die zu erwartende, korrigierte Temperatur variiert und anschließend der Erfolg der Amplifikation elektrophoretisch überprüft. Dabei ist anhand der in Abb. 82 dargestellten Agarosegele erkennbar, dass sowohl die Denaturierungs- als auch die Elongationstemperatur ein breites Opti-

zum aufweisen. Für die Annealingtemperatur ergab sich ein relativ konkreter Wert von 50 °C. Bei der Denaturierung sollte am Heizer eine Temperatur zwischen 100 °C und 106 °C eingestellt werden. Bei einer Variation der Elongationstemperatur in einem Bereich zwischen 76 und 84 °C zeigten sich gleichbleibend gute Resultate bei den PCR-Produkten. Für weitere Experimente wurden aufgrund der praktisch ermittelten Temperaturabweichungen Werte von 104 °C, 50 °C und 80 °C angewendet. Die berechneten Werte betragen 104°C , 52 und 78 °C. Trotz der geringen Differenz kann vor allen für die Annealingtemperatur festgestellt werden, dass bei dem neu entwickelten Lab-on-a-Chip System eine praktische Überprüfung und Anpassung der Temperaturoptima unerlässlich ist.

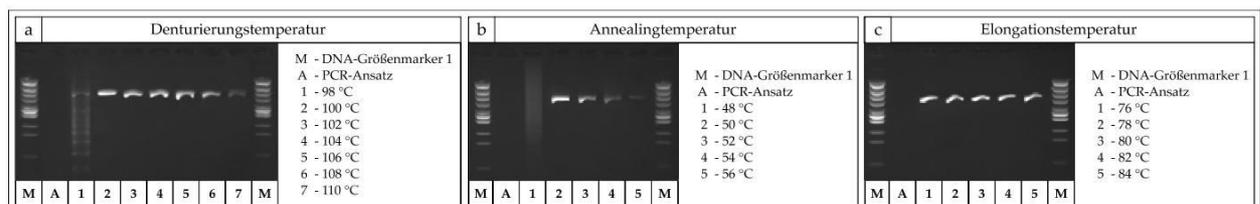


Abb. 82: Denaturierungs- (a), Annealing- (b) und Elongationstemperatur (c)

Neben einer Korrektur der Temperaturen bei Verwendung des neuen Lab-on-a-Chip Systems wurde außerdem die Zeitdauer für die einzelnen Phasen erhöht. Der Grund ist ein verzögertes Erreichen der Zieltemperatur in der Reaktionskammer im Vergleich zum Heizelement. Diese Zeitdifferenz wurde ermittelt unter Anwendung derselben Versuchsanordnung, die auch zur Ermittlung der Temperaturdifferenz eingesetzt wurde. Für die einzelnen Reaktionsschritte bei der PCR ergeben sich dabei zeitliche Verzögerungen von 24 s für die Denaturierung, 16 s für Annealing und 27 s für die Elongation. Diese Differenzwerte wurden dann zu den ursprünglichen Reaktionszeiten hinzugefügt, wodurch ein reproduzierbar funktionierendes PCR-Protokoll für die Amplifikation des ausgewählten Genabschnittes der *Phytophthora*-DNA erstellt werden konnte.

#### 3.2.4.4 Überprüfung der Funktionsfähigkeit

Das Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese in Abb. 83a zeigt, dass die PCR mit dem korrigierten Temperatur- und Zeitprotokoll im neuen Lab-on-a-Chip-System erfolgreich verläuft. Es konnten hohe Ausbeuten der Amplifikate erreicht, sowie die Vergleichbarkeit zum konventionellen Thermocycler und der tropfenbasierter on-Chip-PCR demonstriert werden. Als Ausgangsmaterial wurde bei diesen Versuchen aufgereinigte,

genomische DNA von *P. ramorum* eingesetzt. Neben dem PCR-Ansatz mit der üblichen Zusammensetzung wurde auch eine Hot-Start-Polymerase und entsprechender Puffer verwendet, was ebenfalls zu positiven Resultaten führte (Abb. 83b).

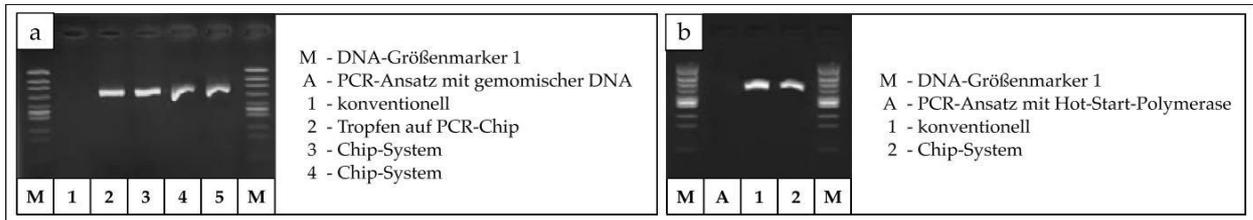


Abb. 83: Ergebnisse der Polymerase-Kettenreaktion im neuen Lab-on-a-Chip Systems mit genomischer DNA (a) sowie Hot-Start-Polymerase (b)

Bei einem mobilen Einsatz des Systems muss eine temperaturstabile Polymerase eingesetzt werden, welche bei Temperaturen über  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt wird. Hot-Start-Polymerase kann mehrere Monate bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und auch einige Stunden bei Raumtemperatur gelagert werden.

Das in Abb. 84 dargestellte Agarosegel demonstriert, dass auch die DNA anderer *Phytophthora*-Arten erfolgreich in dem Lab-on-a-Chip System amplifiziert werden kann. Dabei wurde eine DNA-Ausgangskonzentration von  $1,2\text{ fg}/\mu\text{l}$  angewendet. Neben den Proben aus *Phytophthora* wurde auch DNA anderer, nahe verwandter phytopathologischer Spezies, wie *Py. oligandrum* und *Py. ultimum* eingesetzt. In diesen Fällen wurde allerdings keinerlei PCR-Produkt amplifiziert, sodass von einer hohen Primer-Spezifität ausgegangen werden kann.

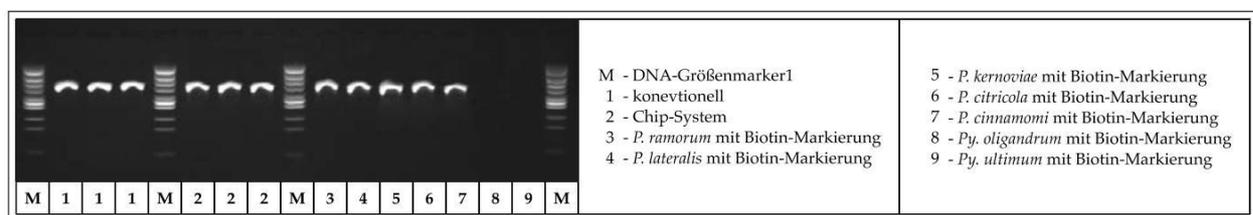


Abb. 84: Amplifikation des ausgewählten DNA-Abschnittes von verschiedenen *Phytophthora*-Arten

Die amplifizierte DNA der verschiedenen *Phytophthora*-Arten sollte auch über Sequenzspezifische Hybridisierung auf dem DNA-Mikroarray des neuen Lab-on-a-Chip Systems nachgewiesen werden. Zur Überprüfung der Anwendbarkeit des Nachweisprotokolls wurden zunächst Glas-Chips ohne Elektrodenstrukturen verwendet, weshalb die Ergebnisse ausschließlich optisch ausgewertet werden konnten. Abb. 85 verdeutlicht,

dass auch mit dem neuen Chip-System verschiedene *Phytophthora*-Arten eindeutig voneinander unterschieden werden können. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen deutlich erkennbare Spots aus abgedichtetem Silber jeweils bei Positivkontrolle und übereinstimmender Sequenz bzw. *Phytophthora*-Art. Die Resultate der Grauwert-Analyse korrelieren entsprechend.

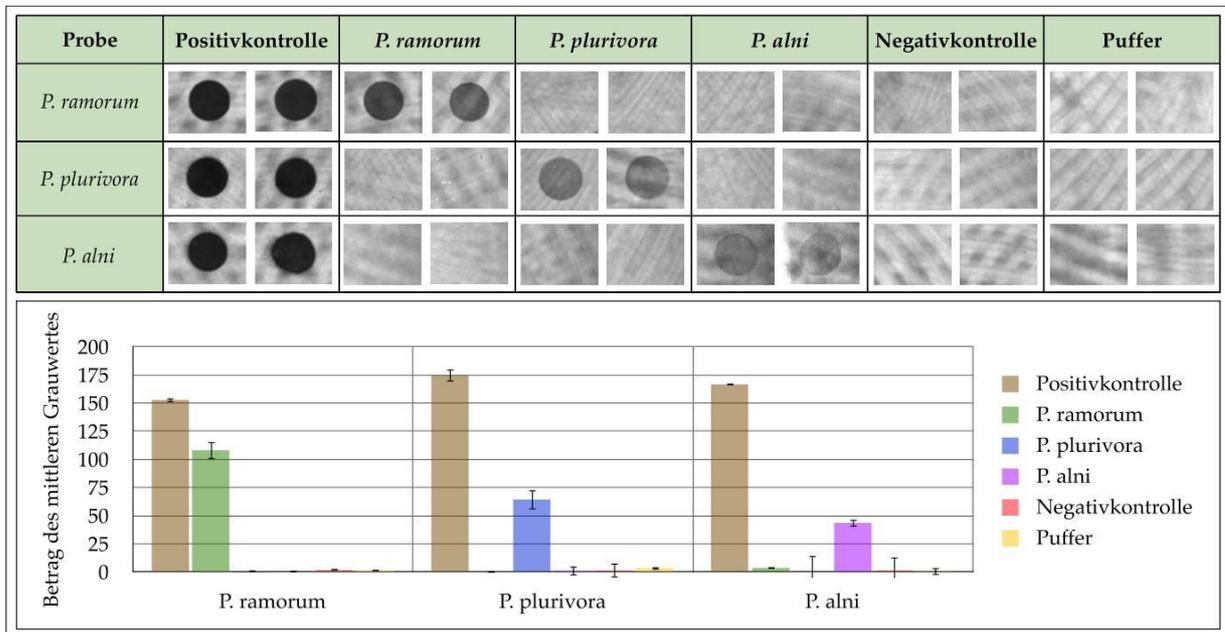


Abb. 85: Hybridisierungsnachweis von *P. ramorum*, *P. plurivora* und *P. alni* mit dem neuen Lab-on-a-Chip System

Das mit dem DNA-Chip Modul etablierte Protokoll für den Hybridisierungsnachweis konnte auf das neue Chip-System übertragen werden. Die im PDMS abgeformten Strukturen, welche technisch durch den Fräsvorgang der Gussform bedingt sind, werden im Bildhintergrund erkennbar. Die technische Realisierung beim Transfer der gekühlten Lösung auf den Mikroarray-Bereich sollte noch verbessert werden. Vor allem im Fall von *P. alni* verlief dieser Prozessschritt nicht mit ausreichender Geschwindigkeit, sodass sich die Reaktionslösung vor Erreichen der Fänger-Moleküle bereits erwärmte. Dadurch kommt es zur verstärkten Renaturierung der DNA-Stränge, sodass diese nur noch in verringerter Anzahl zur Hybridisierung auf dem Array verfügbar sind.

#### 3.2.4.5 Optimierung der Protokolldauer

Das im Bezug auf Temperaturen und Reaktionszeiten korrigierte PCR-Protokoll mit dem neuen Lab-on-a-Chip System beansprucht eine Gesamtdauer von 4 h 33 min. All-

erdings ist hinsichtlich des aktuellen Entwicklungsstandes bei der PCR-basierten Analytik sowie aus Zeit- und Kostengründen eine wesentlich geringere Reaktionsdauer wünschenswert. Da das bereits mit dem PCR-Chip Modul optimierte Protokoll zur DNA-Amplifikation aufgrund unterschiedlicher, thermischer Eigenschaften nicht direkt auf das neue Chip-System übertragen werden konnte, musste das angepasste Protokoll erneut zeitlich optimiert werden. Die Resultate dieser Optimierungsversuche sind in Abb. 86 dargestellt. Die Denaturierungsdauer konnte auf 44 s, die Annealingdauer auf 26 s und die Dauer für die Elongation auf 87 s reduziert werden. Damit ergab sich insgesamt eine Zeitersparnis von 1 h 49 min.

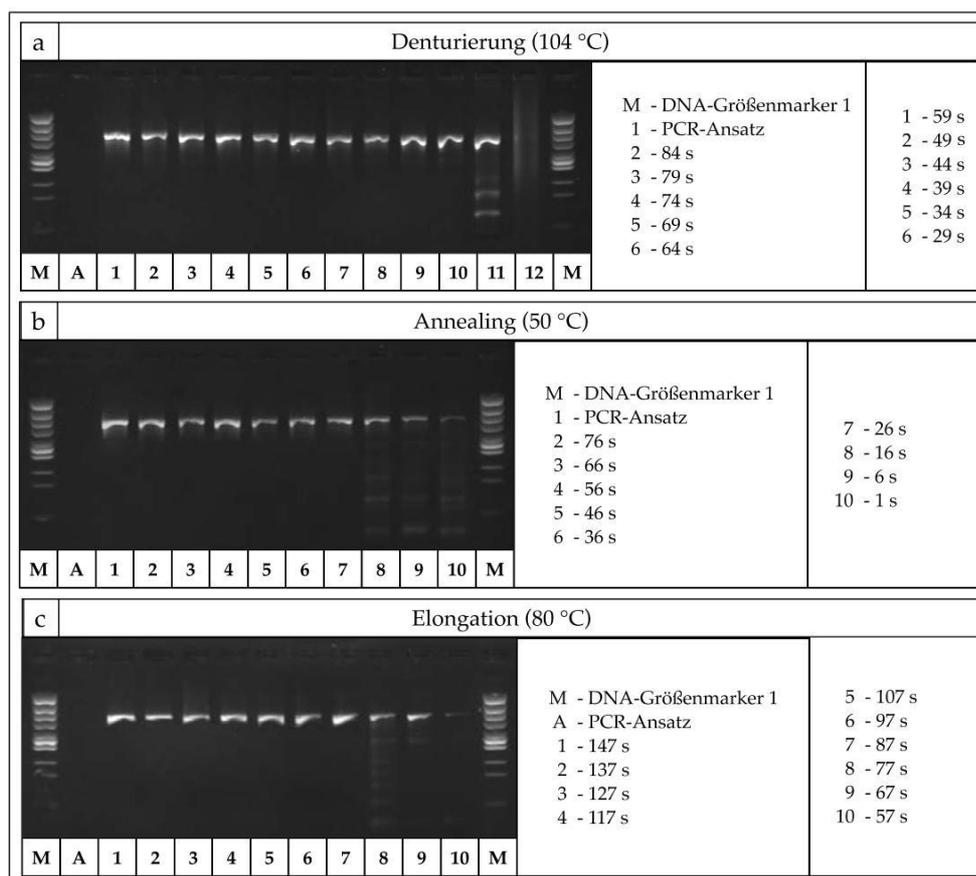


Abb. 86: Zeitliche Protokolloptimierung für die PCR im neuen Lab-on-a-Chip System (a - Denaturierung, b - Annealing, c - Elongation)

### 3.2.4.6 Anpassung des Chip-Layouts

Im Verlauf der Entwicklung der Chip-Komponenten erwies sich eine Anpassung des Layouts sowohl bei der mikrofluidischen Chip-Komponente als auch beim Mikroarray-Chip als notwendig. Die Anordnung der Elektrodenspalte im Bezug zum Fluidkanal

wurde geändert. Die Elektrodenspalte sind nun nicht mehr versetzt, sondern mittig über den Kanalbereich verteilt. Dadurch ist gewährleistet, dass auch bei gewissen Abweichungen der Positionierung des Kanals (Abb. 87a) die Spots noch vollständig mit Reaktionslösung überströmt werden. Andernfalls ist eine vollständige Überbrückung des betreffenden Elektrodenspaltes nicht gewährleistet, was die elektrische Detektion in diesem Fall unmöglich macht. Die Anzahl der 32 Elektrodenspalte wurde nicht verändert. Die Anordnung der Elektroden wurde angepasst, da sonst beim Einführen der Kanüle im Kanal befindliche Elektrodenbahnen beschädigt und zerstört werden. Besonders zwei Elektroden, die im ursprünglichen Layout quer über den Kanal verliefen, waren davon betroffen. Dadurch konnten einige Messpunkte nicht mehr elektrisch ausgelesen werden. Diese Elektrodenbahnen wurden nun längs dem Kanal angeordnet, was ein derartiges Durchtrennen verhindert.

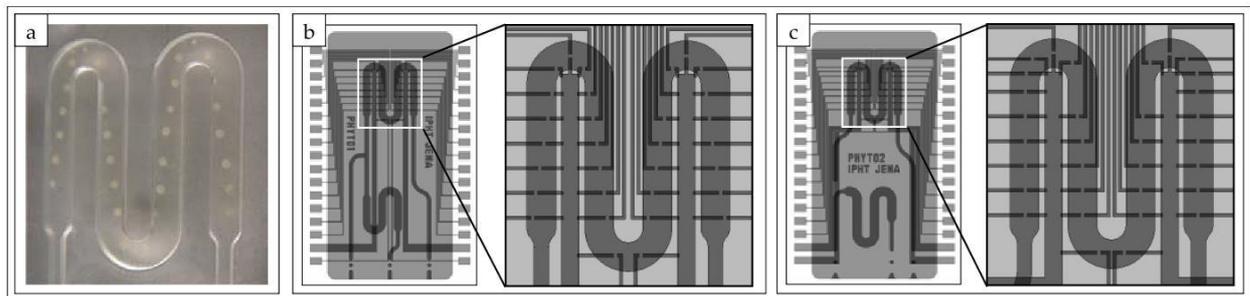


Abb. 87: Anpassung des Chip-Layouts bei den Chip-Komponenten (a - Resultat bei ungenauer Positionierung, b - ursprüngliches Chip-Layout, c - angepasstes Layout)

Bei der mikrofluidischen Komponente wurden ebenfalls Änderungen vorgenommen. Dabei wurde der Kanal zwischen den Reaktionskammern unterbrochen. Nur so konnte gewährleistet werden, dass die PCR-Lösung während der gesamten Amplifikation in der betreffenden Kammer verbleibt. Durch die starke und wiederkehrende Temperaturerhöhung steigt der Druck im Inneren der Kammer und die Lösung wird herausgedrückt. Mit Hilfe einer Unterbrechung der Kanalstruktur konnte dieses Problem beseitigt werden. Allerdings wird dadurch ein Aufstechen der Kanalzuführung im Anschluss an die PCR erforderlich, da nur dann die für den Nachweis nötigen Reagenzien dem Mikroarray-Bereich zugeführt werden können. Außerdem wurde die Spritzenanodelführung an der Eintrittsstelle erweitert und die Septen vergrößert, was die Handhabung bei der Versuchsvorbereitung sowie die Gewährleistung der Sterilität verbessert. Das ursprüngliche Chip-Layout ist in Abb. 87b dargestellt, die angepasste Variante in Abb. 87c.

### 3.2.4.7 Untersuchungen zu verschiedenen Materialien und Oberflächenmodifikationen

Für den Mikroarray-Chip wurden verschiedene Materialien- und Oberflächenmodifikationen getestet. Diese Untersuchungen erwiesen sich als notwendig, da die Chip-Oberfläche sowohl mit der PCR-Lösung in Kontakt kommt, als auch zur Erstellung des Mikroarrays genutzt wird. Allerdings erfordern beide Prozesse spezielle, unterschiedliche Oberflächeneigenschaften. Zur erfolgreichen Umsetzung einer on-Chip-PCR wird eine Oberfläche benötigt, bei der die Anlagerung von Komponenten aus dem PCR-Ansatz, wie z. B. Polymerase, weitgehend unterbunden wird. Oberflächen aus Teflon-beschichtetem Glas erwiesen sich bereits für die tropfenbasierte on-Chip PCR sowie reines Glas in Kombination mit PDMS für die on-Chip PCR mit einem miniaturisierten Kammer-system als geeignet. Diese Erkenntnisse konnten mit dem kombinierten Chip-System bestätigt werden (Abb. 88). Bei Mikroarrays ist eine Immobilisierung der Fänger-Moleküle auf der Chip-Oberfläche erforderlich, damit z. B. die DNA-Hybridisierung orts-aufgelöst detektiert werden kann. Im Fall von DNA-Mikroarrays verwendet man dabei häufig eine kovalente Bindung z. B. über Amino-modifizierte Oligonukleotide. Zur Präparation der Mikroarrays für die beschriebenen Experimente wurden deren Oberflächen stets mit GOPS beschichtet, um schließlich Amino-modifizierte Oligonukleotide kovalent darauf zu immobilisieren. Es stellte sich allerdings heraus, dass GOPS-beschichtetes Glas nicht PCR-kompatibel ist, d. h. in diesem Fall konnten keine PCR-Produkte amplifiziert werden, was vermutlich auf die Inhibierung der Polymerase an die reaktiven Epoxy-Gruppen dieses Silans zurückzuführen ist. Durch eine Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm ist es allerdings möglich, diese reaktiven Gruppen zu inaktivieren. In diesem Fall war die Amplifikation erfolgreich und die Ausbeute an PCR-Produkten vergleichbar zum konventionellen Verfahren.

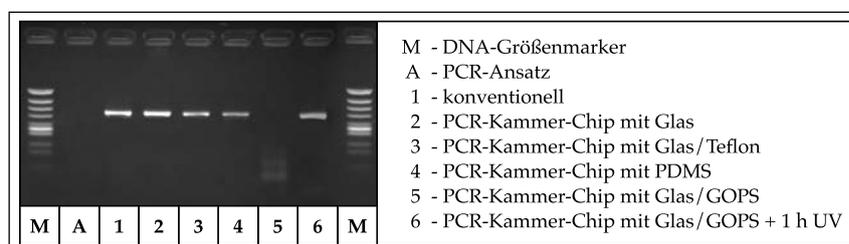


Abb. 88: Überprüfung der PCR-Kompatibilität

Neben der Überprüfung einer erfolgreichen Amplifikation wurden auch Kontaktwinkel zu den einzelnen Materialien und Oberflächen ermittelt (Abb. 89). Hohe Randwinkel

bedeuten eine geringe Benetzung der Oberfläche durch die entsprechende Lösung und damit geringe Wechselwirkung zwischen Reagenzien und Oberfläche.

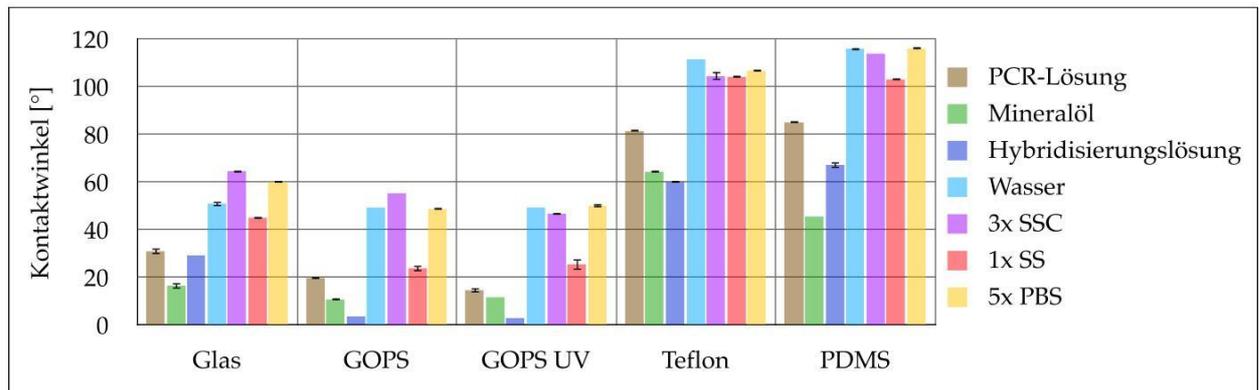


Abb. 89: Optimierung der Annealing- und Elongationstemperatur

Im Fall von Teflon und PDMS sind die Randwinkel jeweils am höchsten. Besonders für wässrige Lösungen mit niedrigem Salzgehalt ergeben sich hier Randwinkel von 100 ° und mehr. Die Randwinkel bei der salzhaltigen PCR- und Hybridisierungslösung erreichen auf Teflon- und PDMS-Oberflächen Werte zwischen 60 und 85 °. Teflon wurde wegen des erhöhten, technischen Aufwandes allerdings nicht zur Beschichtung der Mikroarray-Chip-Komponenten eingesetzt. Bei einer Verwendung der Chips für PCR und Mikroarray müsste in diesem Fall der Chip zunächst mit Teflon beschichtet und dann zur Hälfte durch Ätzung wieder davon befreit werden, um diesen Bereich mit GOPS zu beschichten. Eine komplette Beschichtung mit GOPS und anschließende Bestrahlung bei UV-undurchlässiger Abdeckung des Mikroarray-Bereiches ist mit einem deutlich geringeren, technischen Aufwand verbunden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Verwendetes Ausgangsmaterial und Probenpräparation

Bei den durchgeführten Applikationsversuchen mit den entwickelten Chip-Systemen wurden neben DNA oder RNA auch Zellen direkt dem PCR-Ansatz zugeführt. Je nach Ausgangsmaterial waren dabei verschiedene Schritte zur Probenpräparation im Vorfeld der PCR nötig. Beim Nachweis von RNA erfolgte zunächst die reverse Transkription. Der in diesem Fall eingesetzte PCR-Ansatz enthielt alle nötigen Komponenten sowohl für die reverse Transkription als auch für die Amplifikation. Damit konnten beide Teilreaktionen in direkter Aufeinanderfolge durchgeführt werden, sodass eine Überführung der transkribierten DNA in einen neuen Ansatz und damit ein erhöhtes Risiko für Kontaminationen der Reaktionslösung vermieden wird. Gebrauchsfertige PCR-Kits für diese Anwendung sind kommerziell erhältlich, jedoch muss deren Funktionsfähigkeit am konkreten Anwendungsfall stets überprüft werden. Das erforderliche Temperaturprotokoll für die reverse Transkription ließ sich ebenfalls mit dem entwickelten PCR-Chip und der dazugehörigen Temperaturregeleinheit realisieren. Der direkte Einsatz von Zellen bei der PCR erfordert einen zusätzlichen Lysierungsschritt, um die Nukleinsäuren im Inneren der Zelle für die Reaktion zugänglich zu machen. Grundsätzlich gibt es dafür verschiedene Methoden, wobei vor allem mechanische, chemische oder thermische Verfahren angewendet werden. Die Anwendung mechanischer Methoden erfordert eine entsprechende Gerätetechnik. Beim Einsatz von Chemikalien wird eine zusätzliche Aufreinigung notwendig, weil diese den PCR-Prozess inhibieren können. Eine Lysierung der Zellen ausschließlich durch Hitzeeinwirkung ist mit dem verwendeten PCR-Chip ohne zusätzlichen, technischen Aufwand realisierbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand von Anwendungsversuchen sowohl mit HBME-Zellen als auch mit *Phytophthora*-Sporen demonstriert, dass eine thermische Behandlung der Zellen ausreichend ist, um bei der sich direkt anschließenden PCR erfolgreich die ausgewählten DNA-Fragmente zu amplifizieren. Dabei wurden die Probenträger mit den immobilisierten Zellen zunächst bei -80 °C eingefroren. Zur Durchführung des PCR-Prozesses werden die Probenträger dann auf die mikrostrukturierten PCR-Chips mit den integrierten Heizer- und Temperatursensorstrukturen aufgelegt. Bevor die Reaktionslösung und das Mineralöl aufgetragen und die Amplifikation gestartet wird, werden die immobilisierten Zellen auf 75 °C und dann auf 95 °C erhitzt. Letztlich konnte das DNA-

Fragment vom codierenden Gen für RPL13A an einzelnen HBME-Zellen mit Hilfe der Real-Time PCR nachgewiesen werden. Im Fall der Sporen, die aus Reinkulturen von *Phytophthora ramorum* entnommen wurden, war der Nachweis des ausgewählten Genabschnittes der ribosomalen DNA ebenfalls erfolgreich. Sporen, die von verschiedenen Organismen zum Zweck der Vermehrung gebildet werden, sind häufig mit einer sehr widerstandsfähigen Zellwand ausgestattet. So bestehen die Zellwände von Eipilzen, denen auch die Gattung *Phytophthora* zuzuordnen ist, u. a. aus Glukanen, Hydroxyprolin und Zellulose. Speziell die Zellbegrenzung der Zoosporen, welche bei den durchgeführten Experimenten ausschließlich verwendet und erfolgreich durch Temperatureinwirkung lysiert wurden, besteht ausschließlich aus Glukan. Aufgrund der relativ geringen Bandenintensitäten bei den resultierenden Agarosegelen zur PCR mit Sporen als Ausgangsmaterial verglichen mit Ergebnissen beim Einsatz von aufgereinigter DNA, kann davon ausgegangen werden, dass nicht jede Spore ausreichend lysiert wurde. Dennoch ist auch bei einer Gesamtzahl von nur fünf Sporen, die auf der entsprechenden Chip-Struktur aufgebracht oder im Reaktionsgefäß appliziert wurden, eine Bande erkennbar. Obwohl die beschriebenen Versuche mit RNA oder Zellen ausschließlich mittels tropfenbasierter on-Chip Real-Time PCR durchgeführt wurden, ist davon auszugehen, dass diese PCR-Protokolle auch auf das kombinierte Lab-on-a-Chip-System mit integrierter PCR und DNA-Mikroarray übertragbar sind. Auch Versuche, bei denen Sporen direkt dem PCR-Ansatz zugeführt wurden, verliefen erfolgreich. Bei der Anwendung dieses PCR-Protokolls sollte allerdings die eingesetzte Konzentration an Sporen nicht weniger als 85 Stück je Mikroliter betragen. Die thermische Lysierung von auf der Oberfläche applizierten und eingetrockneten Sporen führt deshalb zu einer gesteigerten Reaktionseffizienz durch die deutlich geringere Nachweisgrenze.

Letztlich konnte demonstriert werden, dass bei der Anwendung von HBME-Zellen oder *Phytophthora*-Sporen zur Nukleinsäure-basierten Diagnostik mittels Lab-on-a-Chip Systemen auf eine aufwändige Probenpräparation verzichtet werden kann. Neben der Gewinnung des Zellmaterials aus Reinkulturen könnten die Sporen beispielsweise auch direkt vom Blattmaterial gewonnen werden. Damit wäre die gesamte Analyse auf dem Chip-System und damit ein  $\mu$ TAS realisiert, sodass eine Möglichkeit zur Vor-Ort-Analyse gegeben ist. Dennoch bleibt zu bemerken, dass die betreffende Pflanze bereits einen hohen Infektionsgrad aufweist, wenn Sporen an den Blättern austreten. Für eine Früherkennung oder Untersuchung von Pflanzen vor deren Verkauf oder Export müssen andere Methoden zur Probennahme angewendet werden. Denkbar wäre beispielsweise die Untersuchung einzelner Wurzelspitzen, da die Sporen bei einer Verbreitung über

das Bodenwasser dort anbinden. Prinzipiell müssen die Methoden der Probennahme allerdings noch weiter untersucht und eventuell notwendige Schritte zur Probenpräparation in den Reaktionsablauf integriert werden.

Zur Untersuchung von Blattmaterial, wie z. B. bei den ebenfalls angewendeten *Rhododendron*-Blätter, wurde die enthaltenen DNA aufgereinigt. Die angewendete Methode, bei der Blattsaft mit Hilfe eines Homogenisators und spezieller Extraktionstüten gewonnen und schließlich die DNA mit Hilfe spezieller Magnetpartikel aufgereinigt wird, erfordert einen relativ geringen, technischen Aufwand (z. B. keine Zentrifuge nötig) und könnte auch außerhalb eines spezialisierten Labors durchgeführt werden. Die Aufreinigung der DNA ist in diesem Fall empfehlenswert, da der Blattsaft u. a. Phenole enthält, welche die PCR inhibieren können. Bei der DNA-Extraktion aus Blattmaterial wird neben der in Fall einer Infektion enthaltenen *Phytophthora*-DNA auch die pflanzliche DNA gewonnen. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die angewendeten Primer eine ausreichende Spezifität aufweisen und damit keinerlei pflanzliche DNA amplifiziert wird. Zur Überprüfung dieser Spezifität wurden als Negativkontrollen auch *Rhododendron*-Blätter ohne Infektion eingesetzt.

Hinsichtlich des eingesetzten Ausgangsmaterials erwiesen sich die bei der Chip-PCR angewendeten Protokolle als geeignet. Damit konnte die vielseitige Einsetzbarkeit des Chips für den Nachweis von aufgereinigten Nukleinsäuren sowie bei der direkten Applikation von Zellen demonstriert werden.

## 4.2 Applikation von Zellen

Es wurden verschiedene Methoden angewendet, um Zellen auf Chip-Oberflächen oder in Reaktionsgefäße zu übertragen, sodass diese als Ausgangsmaterial für die Polymerase-Kettenreaktion zur Verfügung gestellt werden konnten. Eine Möglichkeit bestand dabei in der direkten Applikation verdünnter Zellsuspension durch Pipettieren. Diese Methode eignet sich für Prinzipstudien zur Etablierung funktionsfähiger Protokolle. Allerdings können damit nur ungenau sehr geringe Zellzahlen appliziert werden, da bei der Entnahme bestimmter Volumina an verdünnter Zellsuspension die tatsächlich enthaltene Zellzahl statistischen Schwankungen unterliegt. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde stets ein Mikroliter Zellsuspension appliziert. Bei sehr niedrigen Verdünnungsstufen wirken sich Schwankungen bezüglich der Anzahl der enthaltenen Zellen stärker aus. So bestand bei der Verwendung einer entsprechend niedrigen Verdünnung zur Applikation einer einzelnen Zelle eine relativ hohe

Wahrscheinlichkeit, dass zwei oder keine Zelle in dem überführten Volumen der Zellsuspension enthalten waren.

Zur gezielten Applikation einer geringen Anzahl von Zellen bzw. einer einzigen Zelle haben sich andere Methoden als geeigneter erwiesen, bei denen parallel zum Transfer die optische Kontrolle des Separationsvorganges ermöglicht wird. Um einzelne Zellen zu manipulieren, wurde die Methode der on-Chip Dielektrophorese oder eine präzise zu steuernden Glaskapillare angewendet. In beiden Fällen erfolgte eine visuelle Kontrolle des Separationsvorganges mittels Mikroskop. Mit diesen Methoden war es möglich, Einzelzellen gezielt auf die Chip-Oberfläche zu übertragen. Im Anschluss an die Separation erfolgte der thermisch induzierte Zellaufschluss und schließlich, nach Zugabe von PCR-Ansatz und Mineralöl, der Nachweis bestimmter DNA-Abschnitte. Durch den erhöhten, technischen Aufwand ist das System zur Analyse vor Ort allerdings weniger geeignet. Zudem können diese Separationsvorgänge nur von geschultem Fachpersonal durchgeführt werden.

Bei der Mikromanipulation mittels Glaskapillare konnten einzelne HBME-Zellen auf den optisch transparenten Probenträger überführt und anschließend eine Real-Time PCR durchgeführt werden (siehe Abb. 49 bis 52 im Abschnitt 3.1.3). Diese Methode erwies sich als sehr geeignet für Real-Time PCR Versuche an einzelnen Zellen. Allerdings ist die Separation einer Vielzahl einzelner Zellen auch durch die fehlende Möglichkeit zur Automatisierung sehr aufwändig.

Die Einzelzellseparation mittels Dielektrophorese erfolgte durch Auftragen der Zellsuspension in einem geeigneten Konzentrationsbereich, Anlagerung einzelner Zellen an den kontaktierten Elektroden im elektrischen Wechselfeld und anschließendem Waschen zum Entfernen ungebundener Bestandteile. Mit Hilfe dieser Methode konnten sowohl einzelne HBME-Zellen als auch *Phytophthora*-Sporen an den Elektroden im Zentrum dieser Chips separiert werden. Die Oberfläche der strukturierten Chips wurde analog der Probenträger für die tropfenbasierte on-Chip PCR mit Repel-Silan und Teflon beschichtet sowie mit kreisförmigen, hydrophilen Strukturen versehen. Dadurch konnte auch auf diesen Chips im Anschluss an die Separation und Lyse der einzelnen Zellen eine PCR im Tropfenformat durchgeführt werden. Es stellte sich allerdings heraus, dass durch die Anordnung der Elektrodenstrukturen ein Teil des Fluoreszenzsignals bei der Real-Time Detektion verloren geht, weil die Elektroden den Lichtdurchtritt zur unterhalb des Chips befindlichen, optischen Faser teilweise verdecken. Dieses Problem könnte durch eine Anpassung des optischen Detektionsaufbaus gelöst werden, indem die Faser oberhalb des Tropfens angeordnet wird.

Prinzipiell war bei der Durchführung der PCR mit zuvor auf der Chip-Oberfläche immobilisierten und lysierten Zellen darauf zu achten, dass die PCR-Lösung in der Mitte der kreisförmigen Struktur aus Repel-Silan und Teflon appliziert werden muss, bevor das Mineralöl aufgetragen wird. Nur dadurch kann ein Kontakt von Reaktionslösung und Zelle gewährleistet werden. Diese Durchführung steht im Gegensatz zur Anwendung von PCR-Lösung mit enthaltener Ausgangs-DNA oder -RNA, weil in diesen Fällen stets zunächst das Mineralöl aufgetragen und die PCR-Lösung schließlich darin eingebettet wird. Dadurch soll die Kontaktfläche zwischen PCR-Lösung und Chip-Oberfläche und somit die Inhibierung der *Taq* DNA-Polymerase minimiert werden. Allerdings trägt das im Ansatz enthaltene BSA dazu bei, die Chip-Oberfläche abzusättigen, was die Anbindung der Polymerase ebenfalls verhindert und damit die Analyse von Zellen ermöglicht, die auf dem Chip immobilisiert sind.

### 4.3 Nachweisgrenzen

Um die Sensitivität der Chip-basierten PCR genauer zu untersuchen und den Vergleich zur konventionellen Technologie zu ermöglichen, wurden Nachweisgrenzen in Bezug auf die Menge an eingesetztem Ausgangsmaterial ermittelt. Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, konnte eine Gesamtzahl von nur fünf *Phytophthora*-Sporen sowie eine einzelne HBME-Zelle mit Hilfe der tropfenbasierten on-Chip PCR nachgewiesen werden. Beim Einsatz einer einzelnen HBME-Zelle ergab sich bei Verwendung des Chip-Systems eine hohe Ausbeute an PCR-Produkt, was an der entsprechend hohen Intensität der Gelbanden erkennbar ist (siehe Abb. 50).

Der Verlauf der Fluoreszenzintensität bei der Chip-basierten Real-Time-Detektion sowie die detektierten Schmelzkurven weisen beim Einsatz eines geringen Reaktionsvolumens von nur drei Mikrolitern im Vergleich zu den mit dem konventionellen Thermocycler gemessenen Intensitätsverläufen ein deutlich geringeres Signal-Rausch-Verhältnis auf.

Bei der Verwendung einer geringen Anzahl von *Phytophthora*-Sporen konnten aufgrund der deutlich geringeren Ausbeute an PCR-Produkt sowohl mit dem PCR-Chip als auch dem konventionellen Thermocycler keine ansteigenden Fluoreszenzintensitäten gemessen werden. Mögliche Ursachen dafür könnten die sehr geringe Ausbeute an PCR-Produkt oder eine unspezifische Anlagerung der SYBR-Green Moleküle an Bestandteilen der Zelle sein. Für diesen Fall könnte eine Optimierung des Protokolls hinsichtlich der Zusammensetzung des PCR-Ansatzes zu einem verbesserten Ergebnis führen.

Die Bestimmung der Nachweisgrenze beim Einsatz von aufgereinigter DNA wurde sowohl mit dem Genabschnitt vom Exon 6 des codierenden Bereiches für das Protein p53 durchgeführt als auch mit dem ausgewählten ITS-Genabschnitt bei *Phytophthora*. Mittels UV/Vis-Spektroskopie kann die DNA-Konzentration gemessen und die Anzahl der enthaltenen DNA-Moleküle berechnet werden. Dadurch konnten definierte DNA-Konzentrationen bei den PCR-Ansätzen eingestellt werden. Bei beiden DNA-Abschnitten ergab sich eine Nachweisgrenze von 1 bis 2 Molekülen/ $\mu\text{l}$  bei einem Gesamtvolumen an Reaktionslösung von nur drei Mikrolitern.

Nach Anpassung der Temperatureinstellungen beim Lab-on-a-Chip System mit integrierter PCR und DNA-Mikroarray ist es schließlich gelungen, ein funktionsfähiges Protokoll zur Amplifikation des ITS-Genabschnittes verschiedener *Phytophthora*-Arten zu etablieren. Dabei konnte eine Nachweisgrenze von 200 Molekülen/ $\mu\text{l}$  erreicht werden. Obwohl in diesem Fall (verglichen zur tropfenbasierten on-Chip Real-Time PCR) die Sensitivität geringer ist, reicht diese Nachweisgrenze für die praktische Anwendung aus. Da sich der ausgewählte Genabschnitt innerhalb eines repeat-Clusters der ribosomalen DNA befindet, welches nach Judelson [173] mit einer bis ca. 400-fachen Wiederholung im Genom vorliegt, sollte das Genom einer einzelnen Zelle für den Nachweis ausreichend sein. Zwar beziehen sich die Untersuchungen von Judelson auf die Arten *P. mirabilis* und *P. infestans*, es ist aber davon auszugehen, dass bei anderen *Phytophthora*-Arten Wiederholungen diese Clusters in ähnlicher Anzahl vorhanden sind.

Die amplifizierten PCR-Produkte konnten sowohl mit Hilfe einer sich anschließenden Agarosegelelektrophorese, als auch durch Messung der Fluoreszenzintensität im Verlauf der Amplifikation nachgewiesen werden. Die Zweckmäßigkeit der angewendeten Protokolle insbesondere bei der on-Chip PCR ist damit ebenfalls bewiesen, da geringste Mengen der in einer Probe enthaltenen Nukleinsäuren auf diese Weise nachgewiesen werden konnten. Die Detektion geringer Nukleinsäurekonzentrationen bzw. einzelner DNA-Moleküle und eine damit verbundene, hohe Empfindlichkeit der verwendeten Thermocycler-Technologie ist in vielen Anwendungsfällen sogar notwendig, da oft nur geringe Probenmengen gewonnen werden können (z. B. bei einer Biopsie) oder die Menge an enthaltenen Nukleinsäuren gering ist (z. B. bei fossilen Funden).

Bei der tropfenbasierten on-Chip Real-Time PCR wurden verschiedene Detektionsverfahren angewendet. Sowohl beim Einsatz des interkalierenden SYBR-Green, als auch mit der für das Protein p53 spezifischen TaqMan-Sonde verlief die Detektion erfolgreich und Nachweisgrenzen von 1 bis 2 Molekülen/ $\mu\text{l}$  wurden erreicht. Der gelungene Nachweis geringster DNA-Ausgangskonzentration mit einer Fluoreszenz-markierten

Sonde ist ebenfalls als sehr positiv zu bewerten, da die Zahl an fluoreszierenden Molekülen und damit die maximal erreichbaren Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zur Anwendung von SYBR-Green wesentlich geringer ausfällt. Die Auswahl des Detektionsmittels und damit auch Detektionsverfahrens ist abhängig davon, auf welche Fragestellung hin die PCR-Produkte untersucht werden sollen. Prinzipiell eignet sich die Fluoreszenz-basierte Real-Time Detektion besonders für quantitative Analysen von Nukleinsäuren. Dazu ist jeweils die Erstellung einer Standardgeraden mit Hilfe verschiedener, definierter DNA-Ausgangskonzentrationen nötig. Damit können Rückschlüsse auf den Gehalt bestimmter Mikroorganismen innerhalb einer Probe gezogen werden und somit z. B. mikrobiologische Kontaminationen in Lebensmitteln quantifiziert werden. Für eine zusätzliche, qualitative Aussage empfiehlt sich der Einsatz einer Sequenz-spezifischen Sonde. Sind die Sondensequenz sowie die Annealingtemperatur bei der PCR günstig ausgewählt, wird nur bei Komplementarität der Sonde zur Ziel-DNA eine ansteigende Fluoreszenzintensität im Verlauf der Reaktion messbar. Dagegen wird beim Einsatz von SYBR-Green prinzipiell sämtliche, doppelsträngige DNA detektiert, was bei der Entstehung von unspezifischen Nebenprodukten zu falsch-positiven Ergebnissen bei der Real-Time Detektion führen kann. Eine Überprüfung der amplifizierten PCR-Produkte ist deshalb besonders bei der Anwendung von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen zu empfehlen. Zu diesem Zweck kann entweder eine elektrophoretische Analyse oder eine Schmelzkurvenanalyse im Anschluss an die PCR durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde im Anschluss an sämtliche PCR-Experimente stets eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, welche ca. 30 bis 45 min in Anspruch nahm. Eine Schmelzkurvenanalyse, die nur ca. 5 bis 10 min dauert, konnte direkt im Anschluss an die PCR mit dem Chip sowie der dazugehörigen Peripherie durchgeführt werden. Dadurch war es nicht nötig, die Reaktionslösung vom Chip zu entnehmen, wodurch die Gefahr von Kontaminationen oder Verlusten ausgeschlossen wurde. Die Schmelzkurvenanalyse ermöglicht aufgrund der reversiblen Interkalation der SYBR-Green Moleküle in doppelsträngige DNA eine qualitative Analyse der PCR-Produkte. Dabei wird die PCR-Lösung erhitzt und eine Verringerung der Fluoreszenzintensität bei der Denaturierung der PCR-Produkte messbar. Die auf diese Weise ermittelte Schmelztemperatur der einzelnen PCR-Produkte ist dabei abhängig von deren Länge sowie dem Gehalt an Cytosin und Guanin. Hinsichtlich qualitativer Untersuchungen erlaubt der Einsatz einer Fluoreszenz-markierten Oligonukleotidsonde allerdings eine wesentlich höhere Spezifität.

Bei der Betrachtung der erzielten Ergebnisse zur Real-Time PCR mit verschiedenen Konzentrationen an Ausgangsmaterial kann letztlich festgestellt werden, dass sich bei PCR-Chip und konventionellem Thermocycler jeweils die gleichen Nachweisgrenzen ergeben, sowohl bei den Versuchen mit Zellen oder Sporen als auch beim Einsatz von aufgereinigter DNA. Wie auch bei den anderen PCR-Experimenten wurden dabei stets alle Parameter gleichermaßen gewählt und eingestellt. Somit konnte eine hohe Vergleichbarkeit des Chip-Systems mit dem verwendeten, konventionellen Thermocycler demonstriert werden. Damit ist die Funktionalität und praxisnahe Anwendbarkeit des Lab-on-a-Chip Systems zur Real-Time PCR für diese Anwendungsfälle erwiesen. Die Funktionsfähigkeit dieses Chip-Systems konnte neben den im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Assays auch bereits an anderen Anwendungen mit Produktlängen zwischen 100 bp und 1000 bp demonstriert werden (u. a. spezifische Gene für Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) sowie vom Humanen Papiloma Virus).

#### 4.4 Temperaturmanagement der Systeme

Im Entwicklungsverlauf der Chip-Systeme sowie bei den durchgeführten Applikationsversuchen stellten sich zunehmend Unterschiede im Temperaturmanagement der einzelnen Thermocycler-Technologien heraus, welche letztlich auf deren unterschiedliche Konstruktion und Bauweise zurückzuführen sind. Dies sollte bei einem Vergleich der Systeme unbedingt beachtet werden. Aufgrund der thermischen Unterschiede ist eine direkte Übertragung etablierter Protokolle zwischen den Systemen oft unmöglich. Stattdessen sind Anpassungen hinsichtlich Temperatureinstellungen sowie Reaktionszeiten nötig.

Ein Vergleich der Peakmaxima aus den Diagrammen der im Anschluss an die PCR durchgeführten Schmelzkurvenanalyse (siehe Abb. 35 und 38) ergibt einen Unterschied von ca. 1,5 °C, sowohl bei der Analyse des p53- als auch des *Phytophthora*-Genabschnittes. Dabei ist dieser Wert stets im Fall des konventionellen Thermocyclers erhöht. Da die mittlere Schmelztemperatur für einen bestimmten DNA-Abschnitt immer gleich ist, deutet dieser Effekt auf Unterschiede bei der Wärmeübertragung vom Heizelement zur Reaktionslösung. Da das Peakmaximum in Fall des PCR-Chips stets einen niedrigeren Wert aufweist, kann davon ausgegangen werden, dass die Wärmeankopplung zwischen der mikrostrukturierten Dünnschicht-Heizerstruktur des Chips und der tropfenförmig aufgetragenen PCR-Lösung besser ist, als von der erwärmten Luftkammer durch das Reaktionsgefäß aus Polycarbonat. Ein weiterer, möglicher Grund für diesen

Unterschied ist auch die Positionierung der Temperatursensoren (Abb. 89), die jeweils mit einem Regelement verbunden sind. Diese können nicht direkt in der Reaktionslösung platziert werden, weil dadurch z. B. der technische Aufwand sowie das Risiko von Kreuzkontaminationen deutlich erhöht wäre. Im Fall des PCR-Chips kann davon ausgegangen werden, dass die ebenfalls auf der Chip-Oberfläche angeordneten Sensoren sich näher an der PCR-Lösung befinden, als beim konventionellen Thermocycler, wo sie im Bereich der zu temperierenden Kammer angeordnet sind. Letztlich kommt dadurch die mit dem Peakmaximum der Schmelzkurvenanalyse angegebene Temperatur beim PCR-Chip der tatsächlichen Schmelztemperatur des jeweiligen DNA-Abschnittes deutlich näher. Vergleiche von Schmelzkurven-Daten sind in jeden Fall nur mit dem gleichen Thermocycler-System möglich und zulässig. Anhand der Temperaturdifferenzen können zwar Korrekturfaktoren für die einzustellenden Temperaturen berechnet werden, allerdings weisen die unterschiedlichen Systeme auch Differenzen bei den Heiz- und Kühlgeschwindigkeiten auf. Deshalb ist insbesondere bei umfangreichen Anwendungsversuchen die ausschließliche Verwendung eines einzigen Real-Time PCR Systems zu empfehlen.

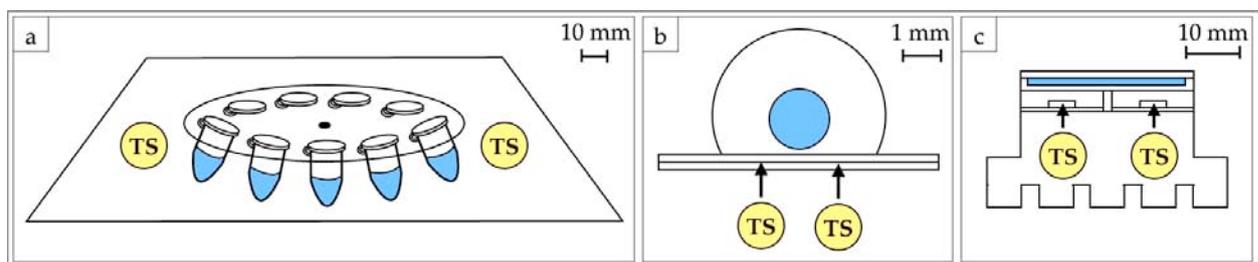


Abb. 89: Positionierung der Temperatursensoren (TS, gelb) relativ zur Reaktionslösung (blau) beim konventionellen Thermocycler (a), der tropfenbasierten on-Chip PCR (b) und dem Lab-on-a-Chip System mit integrierter PCR und DNA-Mikroarray (c)

In das Lab-on-a-Chip System mit integrierter PCR und DNA-Mikroarray wurden Peltier-Elemente integriert, da zur Stabilisierung der DNA-Einzelstränge eine aktive Kühlung auf Temperaturen deutlich unter Raumtemperatur notwendig wurde. Diese Heizelemente sind ebenfalls für die Temperierung bei der Polymerase-Kettenreaktion im Chip-Format geeignet [111, 176, 177]. Zwischen dem Temperatursensor, der unterhalb einer Kupfer-Platte zusammen mit dem Peltier-Element untergebracht ist, und der Reaktionslösung besteht ein Temperaturunterschied (Abb. 89c). Diese Differenz, welche schließlich als Korrekturfaktor zur eingestellten Temperatur addiert wurde, konnte messtechnisch erfasst werden, indem ein Pt1000-Element in die Reaktionskammer ein-

gebracht wurde. In einem Temperaturbereich zwischen 50 °C und 100 °C ergab sich dabei ein linearer Zusammenhang, wobei mit steigendem Temperatur-Sollwert auch der Korrekturfaktor zunimmt (siehe Abb. 81b). Mit Hilfe der dazugehörigen Geradengleichung können die einzustellenden Temperaturwerte bei der Anwendung neuer PCR-Protokolle kalkuliert werden. Eine praktische Überprüfung der optimalen Temperaturwerte für die einzelnen Phasen des PCR-Prozesses zur Amplifikation des *Phytophthora*-Genabschnittes ergab eine gute Korrelation zu den kalkulierten Werten. Es hat sich aber gezeigt, dass die Temperaturoptima für Denaturierung, Annealing und Elongation unterschiedlich breit ausfallen können. So kann z. B. die Elongation ohne signifikante Verluste bei der Ausbeute an PCR-Produkt in einem Temperaturbereich zwischen 76 °C und 84 °C erfolgen. Außerdem ergab sich ein Arbeitsbereich von 100 °C bis 106 °C für die Denaturierung. Einzig die Annealingtemperatur weist mit 50 °C ein sehr enges Optimum auf und liegt damit etwas unter dem kalkulierten Wert von 52 °C (siehe Abb. 82).

Die zweite Temperierungszone dieses Lab-on-a-Chip Systems ist zum Kühlen der Reaktionslösung vorgesehen, um die DNA-Einzelstränge zu stabilisieren, sowie zum Einstellen der Hybridisierungstemperatur für den Nachweis der PCR-Produkte mittels DNA-Mikroarray. Die beiden Temperierungszonen für PCR und Hybridisierungsnachweis sind durch einen Spalt thermisch voneinander entkoppelt. Mit Hilfe von Wärmebildaufnahmen konnte gezeigt werden, dass sich die Zonen nicht gegenseitig beeinflussen (siehe Abb. 81a). Hinsichtlich der erreichten Heiz- und Kühlraten sind ebenfalls Unterschiede beim Vergleich der angewendeten Thermocycler Systeme festzustellen, wobei der PCR-Chip für die tropfenbasierte DNA-Amplifikation besonders hohe Raten aufweist (Abb. 90).

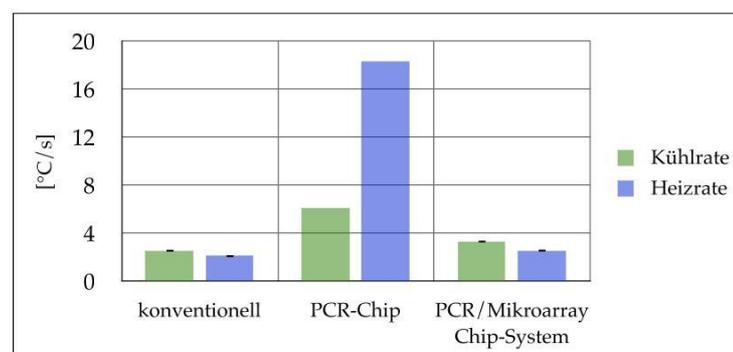


Abb. 90: Vergleich der Heiz- und Kühlraten von konventionellem Thermocycler und den entwickelten Chip-Systemen

Beim Vergleich der Real-Time Detektionskurven von PCR-Chip und konventionellem Thermocycler fallen weitere, temperaturbedingte Unterschiede auf. Die im Verlauf der Amplifikation auftretenden Unterschiede hinsichtlich der Temperaturregelung werden durch eine Verschiebung der Detektionskurven deutlich. Bei der Amplifikation zur Bestimmung der Nachweisgrenze vom p53-Genabschnitt wurde ein zeitlich optimiertes PCR-Protokoll mit stark verkürzten Reaktionszeiten angewendet. Es fällt auf, dass die einzelnen Detektionskurven zur gemessenen Fluoreszenzintensität beim PCR-Chip mit einer Verzögerung der Zyklenanzahl ansteigen. Dies erscheint zunächst als Widerspruch zur Feststellung einer besseren, thermischen Ankopplung, welche anhand der gemessenen Schmelzkurven gemacht wurde. Die Ursache dafür, dass die Real-Time Detektionskurven im Fall des konventionellen Thermocyclers im Verlauf der PCR eher ansteigen, besteht allerdings in einer Verlängerung der einzelnen Reaktionsphasen. Da bei diesem Gerät die Temperaturübertragung weniger effizient ist, als beispielsweise bei dem vorgestellten PCR-Chip, errechnet das Gerät zur Reaktionszeit der einzelnen Schritte des PCR-Zyklus eine zusätzliche Zeitdauer, die zur gewünschten Reaktionszeit addiert wird. Somit beträgt die Denaturierungsphase bei diesem PCR-Protokoll mit dem konventionellen Thermocycler nicht 5 s, sondern 13 s und die Dauer der Annealing-/Elongationsphase ist nicht 15 s, sondern 17 s. Dadurch soll die vollständige Temperierung des Reaktionsgefäßes mit der darin enthaltenen Reaktionslösung gewährleistet werden. Da beim PCR-Chip die Zeitdauer der einzelnen Phasen nicht zusätzlich erhöht wird, steigen die Kurven verzögert an. Auf die Ausbeute an PCR-Produkten hat dieser Effekt bei einer Gesamtzahl von 45 PCR-Zyklen allerdings keinen Einfluss, da stets die Sättigung (Plateauphase) erreicht wird.

Aufgrund der guten Wärmeanpassung an den mikrostrukturierten Heizern auf der Oberfläche des PCR-Chips eignet sich dieser auch für die Durchführung von Hybridisierungsexperimenten, wobei die Fläche des applizierten Mikroarrays nur einige Quadratmillimeter betragen kann, damit dieser über der Heizerstruktur platziert und die Hybridisierungslösung zum Schutz vor Verdunstung mit Mineralöl bedeckt werden kann. Die für einen spezifischen Hybridisierungsnachweis nötigen Temperaturen können am Chip mit einer hohen Genauigkeit eingestellt werden.

Ein Grund für die Umsetzbarkeit besonders kurzer Reaktionszeiten mit dem PCR-Chip besteht in der geringen, thermischen Masse, die erhitzt und gekühlt werden muss und sich nur aus dem 700  $\mu\text{m}$  dicken Chip mit einem ebenfalls 700  $\mu\text{m}$  dicken Probenträger sowie dem Tropfen mit einem Gesamtvolumen von 13  $\mu\text{l}$  zusammensetzt. Beim entwickelten PCR-Chip Modul, welches als Vorläufer für das neue Lab-on-a-Chip System mit

integrierten Reaktionskammern für Amplifikation und Hybridisierungsnachweis dienen sollte, wurde eine deutlich größere thermische Masse auf dem PCR-Chip appliziert. Um die Amplifikation innerhalb einer Reaktionskammer durchführen zu können, wurden Chips aus 170  $\mu\text{m}$  dicken Deckgläsern und ca. 1 mm dicken Abformungen aus PDMS gefertigt. In die Silikonabformungen waren kreisförmige Reaktionskammern eingebracht, die nach Zusammenfügen mit dem Deckglas mit ca. 12  $\mu\text{l}$  Reaktionslösung befüllt wurden. Bei der Übertragung eines zuvor für die tropfenbasierte on-Chip-PCR zeitlich optimierten Protokolls auf diese Technologie konnten keine PCR-Produkte amplifiziert werden. Offenbar bewirkt die zusätzliche, thermische Masse aus PDMS eine verzögerte Wärmeübertragung. Eine Verlängerung der Reaktionszeiten konnte diesem Effekt entgegenwirken.

Bezüglich des Temperaturmanagements bei Thermocyclersystemen bleibt festzuhalten, dass sich Zeit- und Temperaturparameter meist nicht ohne weiteres von einem System auf ein anderes übertragen lassen. Dies gilt insbesondere bei zeitlich stark verkürzten Protokollen. Vielmehr ist häufig eine Anpassung bzw. erneute Optimierung des jeweiligen Protokolls nötig. Für anwendungsrelevante Versuchsreihen sollte deshalb auch stets nur ein bestimmtes System verwendet werden. Gründe für die schlechte Übertragbarkeit und damit auch mangelnde Vergleichbarkeit der erzielten Resultate liegen in unterschiedlichen Heiz- und Kühlraten, variabel verlängerten Reaktionszeiten, unterschiedlichen Heiz- und Kühlmechanismen bzw. Bauweisen der Systeme sowie einer z. T. stark abweichenden thermischen Masse.

#### 4.5 Chip-Materialien und Oberflächenmodifikation

An das Material, welches bei der Produktion von Chips für die Nukleinsäure-basierte Bioanalytik Anwendung findet, werden verschiedene Anforderungen gestellt, damit die Biokompatibilität sowie eine wirtschaftliche Herstellung der Chips gewährleistet sind.

Als Materialien zur Chip-Herstellung erwiesen sich Glas und PDMS grundsätzlich als geeignet. Während PDMS sich stets als PCR-kompatibel erwies, kann unbehandeltes Glas nur bedingt bei der Chip-basierten PCR eingesetzt werden, da sich Komponenten des PCR-Ansatzes, wie z. B. die *Taq* DNA-Polymerase, an diese Oberfläche anlagern können und dadurch in ihrer Beweglichkeit sowie Funktionalität stark eingeschränkt werden. Durch die Zugabe von BSA zum PCR-Ansatz kann dieser Effekt weitgehend unterbunden werden. Die Oberflächencharakterisierung mittels Kontaktwinkelmessung bestätigt diese Erkenntnisse (siehe Abb. 88). Prinzipiell deutet ein hoher Rand-

winkel auf eine geringe Benetzung der jeweiligen Lösung mit der untersuchten Oberfläche hin. Für den Fall einer Chip-PCR ist es von Vorteil, wenn die PCR-Lösung die Chip-Oberfläche wenig benetzt und damit kaum Inhibierung auftritt. Um günstigere Eigenschaften für diese Anwendung zu erzielen, kann die Glas-Oberfläche beschichtet werden. Neben der Benetzung spielen aber auch andere Faktoren, wie beispielsweise das Oberflächen-Volumen-Verhältnis oder Zusätze von Blockierungsreagenzien, eine Rolle bei der Auswahl der Chip-Materialien oder Oberflächenmodifikationen. Aufgrund des relativ großen Reaktionsvolumens von 12  $\mu\text{l}$  sowie des im Ansatz enthaltenen BSA konnte, auch bei Verwendung eines unbehandelten Glas-Chips in der entsprechenden Reaktionskammer des Lab-on-a-Chip Systems, erfolgreich DNA amplifiziert werden. Da auf der einen Hälfte dieses Glas-Chips ein DNA-Mikroarray appliziert werden sollte, wurden Versuche zur PCR-Kompatibilität der GOPS-Oberfläche durchgeführt. Eine mit GOPS beschichtete Oberfläche ermöglicht die kovalente Anbindung von Amino-modifizierten Oligonukleotiden und ist damit sehr geeignet für die Präparation von DNA-Mikroarrays. Es stellte sich allerdings heraus, dass diese Oberfläche nicht PCR-kompatibel ist, was vermutlich auf eine Inhibierung durch die reaktiven Epoxy-Gruppen des Silans zurückzuführen ist. Mit Hilfe von UV-Licht können diese Gruppen inaktiviert werden, sodass die erfolgreiche Durchführung einer PCR möglich wird. Damit konnte ein Protokoll zur Herstellung der Mikroarray-Chip-Komponente etabliert werden, dass ohne zusätzliche Mikrostrukturierung der Oberfläche auskommt. Es genügt, die Seite des Chips, welche mit der PCR-Lösung in Berührung kommt, im Anschluss an die Mikroarray-Präparation mit UV-Licht zu bestrahlen. Damit war der Chip letztlich kompatibel für beide Teilreaktionen.

Die Durchführung der tropfenbasierten on-Chip PCR erfordert einen hohen Randwinkel zwischen PCR-Lösung und Mineralöl zur Chip-Oberfläche. Ein Erfolg der Reaktion ist nur dann gewährleistet, wenn die PCR-Lösung vollständig mit Mineralöl umschlossen ist und dabei kaum Kontakt zur Chip-Oberfläche besteht. Das Mineralöl verhindert ein Verdunsten der wässrigen PCR-Lösung beim Erhitzen. Der Kontakt zur Chip-Oberfläche sollte nicht nur wegen Immobilisierungseffekten hinsichtlich der Polymerase verhindert werden, sondern auch, um die Entstehung von Luftblasen beim Erhitzen der Reaktionslösung zu vermeiden. Um die halbkugel- bzw. kugelförmige Struktur des Tropfens zu erzeugen, hat sich eine kombinierte Beschichtung mit Repel-Silan und Teflon als geeignet erwiesen. Bei einer homogenen Beschichtung mit diesen Reagenzien auf der gesamten Chip-Oberfläche wurden allerdings unerwünschte Effekte hinsichtlich der Stabilität der Tropfenposition beobachtet. Beispielsweise kam es zu einer Bewegung

des Tropfens aus PCR-Lösung an den Rand des Öltropfens, sodass der Verdunstungsschutz nicht mehr gewährleistet und der Tropfen nicht mehr vollständig über dem Detektionsfenster und damit der optischen Faser angeordnet war, was zu Verlusten bezüglich der Signalintensität geführt hat. Dadurch war auch die Vergleichbarkeit verschiedener Messungen nicht mehr gewährleistet. Zur Lösung dieses Problems wurde die Repel-Silan-/Teflon-Oberfläche mit einer kreisförmigen Struktur versehen, wobei stellenweise die Beschichtung entfernt wurde. Dadurch konnten hydrophile Bereiche innerhalb der hydrophoben Struktur erzeugt werden. Diese Oberflächenstruktur ermöglichte eine exakte Ausrichtung des Tropfens über dem mikrostrukturierten Heizer inkl. dem optisch transparenten Detektionsfenster mit mittlerer Position der PCR-Lösung. Außerdem war dadurch eine stabile Lage des Tropfens im gesamten Reaktionsverlauf gewährleistet.

Mit einer Beschichtung aus Repel-Silan und Teflon wurde auch bei der Durchführung der Kammer-PCR experimentiert. Allerdings erwies sich eine stark hydrophobe Oberfläche bei der Herstellung der Kammer-PCR-Chips als ungeeignet, da aufgrund der ungenügenden Haftung keine dichten Kammern durch Verkleben erzeugt werden konnten.

Beim kombinierten Chip-System werden beide Chip-Komponenten in eine Baugruppe eingelegt, die mechanisch verschlossen wird. Durch den aufgebrachten Druck kann auch bei Verwendung eines Chips mit hydrophober Oberfläche eine dichte Reaktionskammer erzeugt werden. Allerdings ist in diesem Fall eine Beschichtung mit Repel-Silan und Teflon nicht erforderlich, da aufgrund des relativ günstigen Oberfläche/Volumen-Verhältnisses eine ausreichende Absättigung mit BSA erfolgt und damit die Inhibierung der *Taq*-Polymerase weitgehend verhindert wird. Aus diesem Grund kann sowohl unbehandeltes Glas, als auch eine mit UV-Licht behandelte GOPS-Oberfläche für die PCR mit dem kombinierten Lab-on-a-Chip-System verwendet werden.

#### 4.6 Fluidische Umsetzung

In Rahmen der Entwicklung der vorgestellten Lab-on-a-Chip-Systeme wurden verschiedene, fluidische Ansätze verfolgt. Der tropfenbasierte Ansatz ermöglicht eine besonders sparsame und schnelle Analyse, da mit sehr kleinen Volumina an PCR-Lösung im Bereich von 3 bis 0,5  $\mu\text{l}$  gearbeitet wird. Die wässrige PCR-Lösung wird dabei von einem Tropfen aus Mineralöl umschlossen und dadurch vor Verdunstung geschützt. Mit einer speziellen Kombination der Oberflächenbeschichtung war es auch möglich,

einen Hybridisierungsnachweis direkt an die Amplifikation anzuschließen (siehe Abb. 58a). Dabei konnte eine gute Benetzung der Hybridisierungslösung mit der Chip-Oberfläche realisiert werden. Für die tropfenbasierte Hybridisierung wurde der PCR-Lösung ein geringes Volumen an Hybridisierungspuffer zugesetzt. Dennoch erlaubt dieser technologische Ansatz für einen Mikroarray-Nachweis ebenfalls einen sehr sparsamen Reagenzienverbrauch. Der angewendete Mikroarray umfasste insgesamt acht Spots. Moderne Präparationstechniken würden auf der gleichen Fläche auch die Unterbringung einer weitaus höheren Anzahl von Proben erlauben. Neben der relativ aufwändigen Oberflächenmodifikation bestand ein Nachteil bei Anwendung dieser Technologie in der manuellen Übertragung der Lösung mit einer Pipette. Eine automatisierte Tropfenbewegung wäre zur Realisierung eines Point-Of-Care Systems allerdings unerlässlich. Ein möglicher Ansatz zur Lösung könnte in der Anwendung der Surface-Acoustic-Wave Technologie (SAW) bestehen. Die Bewegung von auf Chip-Substraten befindlichen Probentropfen mittels akustischer Oberflächenwellen wurde bereits beschrieben [178]. Die Herstellung der dafür verwendeten Chips aus Lithiumniobat ist allerdings sehr aufwändig und teuer.

Hinsichtlich des PCR-Chip Moduls stellte sich die fluidische Umsetzung als ungünstig heraus. Problematisch war die Anordnung der Öffnungen zum Befüllen des Kammer-Chips. Diese waren direkt mit den Reaktionskammern verbunden und nach oben gerichtet (Abb. 61), sodass bei Erwärmung und damit einhergehender Ausdehnung der Flüssigkeit diese aus der Reaktionskammer gedrückt wurde. Da bei ausschließlicher Befüllung der Reaktionskammern mit PCR-Ansatz die wässrige Lösung komplett verdunstet, wurde die Kammer zunächst mit Mineralöl befüllt und der PCR-Ansatz anschließend hineingegeben. Damit konnte die Amplifikation erfolgreich realisiert werden. Allerdings ist der Einsatz von Mineralöl in einem Chip-System mit mikrofluidischen Kanalstrukturen dann ungünstig, wenn im Anschluss an die Amplifikation ein Hybridisierungsnachweis erfolgen soll. Das verwendete Mineralöl kann die Mikroarray-Oberfläche benetzen und damit eine Hybridisierung der Ziel-DNA an den Fänger-Sequenzen unmöglich machen. Zudem ist die Befüllung des Kammer-Chips nicht automatisiert und erfordert praktisches Geschick. Aus diesem Grund ist der Chip nicht für Routine-Abläufe geeignet.

Beim DNA-Chip Modul ist die fluidische Umsetzung weitgehend automatisiert. Der Chip wird in eine Hybridisierungskammer eingelegt, die über Schläuche mit einer Peristaltikpumpe verbunden ist. Dadurch ist es möglich, die verschiedenen Reaktionslösungen durch einen fluidischen Kanal über die auf dem Chip angeordneten Messpunk-

te zu leiten. Durch die fortwährende Bewegung der Lösung wird die Effizienz der Nachweisreaktion erhöht. Das verwendete Reaktionsvolumen an Hybridisierungslösung beträgt 90  $\mu\text{l}$ . Alle Komponenten, die mit den Reagenzien in Kontakt kommen, sind preiswert herzustellen, leicht austauschbar und damit für den Einmalgebrauch geeignet. Dazu gehören die DNA-Chips mit Siebdruck-Strukturen, Abformungen aus PDMS sowie die zum Flüssigkeitstransport verwendeten Schläuche.

Auch beim neu entwickelten Lab-on-a-Chip System, welches neben dem Nachweis mittels Mikroarray auch die Amplifikation der DNA integriert, wurden Kanalstrukturen in einer Abformung aus PDMS realisiert und der Chip über Schläuche an Peristaltikpumpen angeschlossen. Um im Anschluss an die PCR unter Zudosierung des Hybridisierungspuffers die Reaktionslösung auf den Mikroarray-Bereich zu übertragen, werden zwei Pumpen sowie zwei Einlässe für Reaktionslösungen im Chip benötigt. Zu diesem Zweck wurden kompakte Einbaupumpen verwendet, wodurch der Platzbedarf für das Komplettsystem gering bleibt. Da zur Durchführung der PCR innerhalb einer Reaktionskammer diese im Verlauf des Prozesses absolut dicht sein muss, wurde der Verbindungskanal unterbrochen und im Anschluss an die PCR mit einer Kanüle geöffnet. Dieser Überführungsschritt ist technisch noch nicht völlig ausgereift oder reproduzierbar. Für die Entwicklung von Point-of-Care Systemen wäre auch eine Ventilsteuerung unerlässlich, sodass der Zugriff auf die verschiedenen Flüssigkeitsreservoirs automatisch erfolgt.

#### 4.7 Optimierung der Protokolldauer

Durch eine Reduzierung der Protokolldauer können Einsparungen von Zeit und Kosten erzielt werden. Bei bestimmten Anwendungen, wie z. B. in der Sepsis-Diagnostik, sind kurze Reaktionszeiten besonders wichtig, da der Krankheitsverlauf schnell fortschreitet und eine gezielte Behandlung möglichst rasch erfolgen muss. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene PCR-Protokolle zeitlich optimiert. Für die tropfenbasierte Amplifikation des 131 bp umfassenden p53-Genabschnittes konnte ein besonders kurzes PCR-Protokoll realisiert werden, mit dem die Amplifikation innerhalb von 24 min durchführbar ist. Dieses Protokoll war auch auf den konventionellen Thermocycler übertragbar, wobei sich die Reaktionsdauer aufgrund der erhöhten, thermischen Masse verlängerte, da geräteintern die Dauer der einzelnen Phasen des PCR-Zyklus erhöht wird, um die vollständige Temperierung des Heizblockes mit den darin befindlichen Reaktionsgefäßen zu gewährleisten (siehe Abschnitt 4.4). Die Optimierbarkeit der Reaktionsdauer

bei der PCR ist abhängig von der vorhandenen, thermischen Masse sowie der Länge der zu amplifizierenden PCR-Produkte. Deshalb konnte das PCR-Protokoll zur Amplifikation des 550 bp umfassenden *Phytophthora*-Genabschnittes nicht auf eine Gesamtdauer von weniger als 1 h verkürzt werden.

Für beide Assays konnte die Anwendung eines zweiseitigen PCR-Protokolls demonstriert werden, wobei Annealing und Elongation bei einer gemeinsamen Temperatur durchgeführt wurden. Dadurch entfällt je ein Heiz- bzw. Kühlschritt, was ebenfalls zu einer zeitlichen Verkürzung der Gesamtdauer beiträgt. Die Möglichkeit, die Elongation bei einer Temperatur deutlich unter 72 °C durchzuführen, bestätigte sich durch die Ergebnisse der PCR mit variablen Elongationstemperaturen (siehe Abb. 82c). Dabei hat sich gezeigt, dass das entsprechende Temperaturoptimum offenbar einen breiten Bereich umfasst. Bei der Protokolloptimierung zur Amplifikation des ausgewählten Genabschnittes der *Phytophthora*-DNA mit dem kombinierten Lab-on-a-Chip System wurde das dreischrittige Protokoll beibehalten, da zunächst eine aufwändige Temperaturanpassung nötig war, um eine reproduzierbar hohe Ausbeute an PCR-Produkt bei der Amplifikation zu erhalten.

Das verwendete Protokoll zum Nachweis verschiedener Genabschnitte aus HBME-Zellen wurde ebenfalls nicht verkürzt, da zunächst der Nachweis der Funktionsfähigkeit bei dieser Anwendung im Vordergrund stand. Zur Amplifikation des ausgewählten Genabschnittes von *Phytophthora* wurde eine Reihe unterschiedlicher Protokolle angewendet. Eine Übersicht zu den verwendeten und etablierten PCR-Protokollen bezüglich der verschiedenen Thermocycler-Systeme ist in Tab. 17 dargestellt.

Das Protokoll für den Hybridisierungsnachweis mit einer Hybridisierungszeit von 30 min und einer Enzymanbindungszeit von 15 min ist bereits verhältnismäßig kurz. Im Vergleich zur stationären Hybridisierung wird durch die fortwährende Bewegung der Reaktionslösung eine hohe Anbindungseffizienz erzielt. Dennoch konnte ein Erfolg der Reaktion auch bei einer Dauer von nur 5 min Hybridisierungszeit und 7 min Enzymanbindungszeit nachgewiesen werden. Für den Hybridisierungsnachweis des p53-Genabschnittes, der im Tropfenformat auf dem PCR-Chip durchgeführt wurde, betrug die minimale Hybridisierungsdauer 30 min.

Prinzipiell besteht meist ein hohes Potential, die notwendige Reaktionsdauer zu verkürzen. Allerdings sind solche Optimierungsversuche sehr aufwändig, sodass zunächst die Notwendigkeit der Protokolloptimierung genau abgewogen werden sollten.

PCR-Produkt	PCR-Protokoll	konventioneller Thermocycler	PCR-Chip	PCR/Mikroarray Chip-System
p53 Genabschnitt aus humaner DNA	20 s 94 °C 40 s 60 °C	✓ 82 min	✓ 55 min	-
	4 s 94 °C 15 s 60 °C	✓ 52 min	✓ 24 min	-
Genabschnitte von RPL13A, Gremlin und Vimentin aus HBME-Zellen	30 s 94 °C 60 s 60 °C 60 s 72 °C	✓ 150 min	✓ 140 min	-
ITS-Genabschnitt aus <i>Phytophthora</i>	60 s 94 °C 60 s 50 °C 120 s 72 °C	✓ 226 min	✓ 192 min	✗
	60 s 94 °C 120 s 55 °C	✓ 177 min	✓ 146 min	✗
	40 s 94 °C 40 s 55 °C	✗	✓ 71 min	✗
	5 s 94 °C 65 s 55 °C	✓ 94 min	✗	✗
	84 s 104 °C 76 s 50 °C 147 s 80 °C	✗	✗	✓ 273 min
	44 s 104 °C 26 s 50 °C 87 s 80 °C	✗	✗	✓ 164 min

Tab. 17: Vergleich der PCR-Protokolle, die zur Amplifikation der verschiedenen Genabschnitte entwickelt wurden (inkl. Angaben zur jeweiligen Gesamtdauer)

#### 4.8 Auslesung der Mikroarrays

Bei der Auslesung der Messergebnisse von den Hybridisierungsexperimenten wurde neben einer optischen auch eine elektrische Detektion angewendet. Bei erfolgreicher Silberabscheidung verfärbten sich die entsprechenden Spots grau bis schwarz. Die optische Analyse erfolgt über eine Grauwert-Messung. Dazu wurde an mikroskopischen Aufnahmen der Spots innerhalb einer definierten Fläche jeweils der Grauwert unter Abzug des Hintergrundsignals ermittelt. Eine elektrische Auslesung wird möglich, wenn durch das abgeschiedene Silber der Elektrodenspalt leitfähig überbrückt wird. Da nach einer Silberabscheidungszeit von 5 Minuten oft noch keine ausreichende Menge an Silber auf den Spots vorhanden ist, kann eine Nachverstärkung durchgeführt werden. Die Leitfähigkeit insbesondere der Spots, an denen die PCR-Produkte hybridisieren, wird erst nach einigen Minuten Nachverstärkung messbar. Bei der Nachverstärkung werden bereits vorhandene Silberpartikel vergrößert und verbinden sich dadurch zu einer durchgängig, leitfähigen Struktur. Deshalb werden die Messungen stets in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die Grauwert-Analyse wurde nach 5 min enzymatischer Silberabscheidung durchgeführt.

Prinzipiell korrelieren die Daten der optischen und elektrischen Auslesung. Bei einem hohen Grauwert-Betrag von mehr als 100, wie er nur bei der Positivkontrolle und in Fall einer erfolgreicher Hybridisierung erreicht wird, ergab sich in der Regel eine messbare Leitfähigkeit nach einer Abscheidungszeit von max. 11 min. Während zur elektrischen Detektion von Mikroarrays Chips mit Elektrodenstrukturen benötigt werden, kann bei ausschließlicher, optischer Detektion unstrukturiertes Glas als Substrat verwendet werden. Die optische Auslesung von Mikroarrays ist sehr verbreitet, vor allem bei der Anwendung von Fluoreszenz-markierter DNA. Dabei können auch verschiedene Farbstoffe eingesetzt und mit Hilfe entsprechender Computerprogramme deren Anteile bei den Spots ermittelt werden. Bei Fluoreszenz-markierten Proben ist allerdings die Langzeitstabilität der Signale aufgrund von Ausbleicheffekten beeinträchtigt. Außerdem sind optische Geräte mit hoher Empfindlichkeit zum Auslesen der Mikroarrays mit Fluoreszenz-Markierungen nötig. Zur optischen Detektion von Mikroarrays, bei denen die Hybridisierungsereignisse über eine Silberabscheidung nachgewiesen werden, genügt eine Durchlicht-Aufnahme mit ausreichender Auflösung, um die mikroskopisch kleinen Spots aufzunehmen. Für die elektrische Detektion wird eine technisch wenig aufwändige Widerstandsmessung durchgeführt, die innerhalb weniger Sekunden das Ergebnis liefert. Im Rahmen der durchgeführten Versuche zur Identifizierung und Unterscheidung verschiedener *Phytophthora*-Arten mit Hilfe des elektrischen DNA-Chips hat sich gezeigt, dass die elektrische Detektion sensitiver und spezifischer ist, als die optische Auslesung. Der Grund dafür ist, dass nahezu keine Hintergrundsignale bei der Widerstandsmessung auftreten, denn der messbare Schwellenwert des Gerätes wird nur im Fall einer leitfähigen Überbrückung des Elektrodenspaltens durch ausreichend abgeschiedenes Silber überschritten. Die entsprechenden Spots weisen eine dunkelgraue bis schwarze Färbung auf, was nur bei der Positivkontrolle und einer erfolgreichen Hybridisierung zutrifft. Bei der Grauwertanalyse dagegen ergeben sich oft schwache Signale an den Positionen der nicht komplementären Proben. Insgesamt ist die elektrische Auslesung ein sehr nützliches Werkzeug, dass sich aufgrund des damit verbundenen, geringen technischen Aufwandes gut in ein kompaktes Diagnosesystem zur Point-of-Care Analytik integrieren lässt. Die Verwendung von Chips mit Siebdruck-Strukturen ermöglicht zudem eine preiswerte Umsetzung dieser Technologie.

#### 4.9 Bedeutung für die Diagnostik

Das Tumorsuppressorprotein p53 ist eines der am meisten untersuchten Faktoren bei der Entstehung von Tumoren. Eine Analyse möglicher Mutationen bestimmter, für dieses Protein codierender, Gensequenzen sowie von deren Expression kann hilfreich bei der Ursachenforschung einer Krebserkrankung sein.

Die molekularbiologische Untersuchung einzelner Zellen ist vor allem dann interessant, wenn nur geringe Mengen an biologischem Material bei der Probennahme gewonnen werden können. Bei HBME-Zellen handelt es sich um Zellen der Blut-Hirn-Schranke. Bei diesen Zellen kann eine Analyse bestimmter Strukturbestandteile interessant sein, welche für die Barrierefunktion bzw. Durchlässigkeit verantwortlich sind. Idealerweise gelangen Nährstoffe aus dem Blut zum Gehirn und Stoffwechselabbauprodukte heraus. Fehlkonstruktionen der Membranen der HBME-Zellen sowie der Zellzwischenräume können eine Störung des Stofftransportes verursachen. Auch in der Krebsforschung sind diese Zellen interessant im Hinblick auf die Durchlässigkeit von Metastasen und damit verbundene Entstehung von Hirntumoren.

Zur Identifizierung und Unterscheidung verschiedener *Phytophthora*-Arten ist eine molekularbiologische Analyse nahezu unerlässlich, da sich die einzelnen Arten morphologisch kaum unterscheiden. Nur Spezialisten mit jahrelanger Erfahrung sind in der Lage, anhand gestaltspezifischer Merkmale mit geringsten Variationen, z. B. bei der Form von Sporen und Hyphen, die einzelnen *Phytophthora*-Arten zu identifizieren. Mit Hilfe eines kompakten, automatisierten und einfach bedienbaren Diagnosesystems, wie es Ziel der Entwicklung war, könnte eine Analyse außerhalb von spezialisierten Laboren durchgeführt werden. Der Einsatz der Mikroarray-Technologie ermöglicht die Untersuchung einer einzelnen Probe auf eine Vielzahl von genetischen Variationen hin. Im Gegensatz dazu ist aktuell nur für wenige Arten ein Protokoll zur Real-Time PCR mit dazugehörigen, artspezifischen Fluoreszenzsonden vorhanden [179]. Außerdem nimmt die Anzahl relevanter Schadorganismen der Gattung *Phytophthora* weiter zu. Eingesetzt werden könnte ein Lab-on-a-Chip System mit integrierter PCR und DNA-Mikroarray beispielsweise in Baumschulen und Gartenbaubetrieben zur Untersuchung potentieller Wirtspflanzen im Vorfeld von Verkauf oder Export. Bei Betrieben, die mit Pflanzen oder Pflanzenprodukten handeln, besteht großes Interesse an einem schnellen, sicheren und preiswerten Testsystem nicht zuletzt auch deshalb, weil der Verkauf von befallenem Material den wirtschaftlichen Ruin bedeuten könnte. Auch von behördlicher Seite im Rahmen von Grenzkontrollen, insbesondere bei der Einfuhr potentieller Wirtspflanzen

der Quaratäne-pflichtigen *Phytophthora*-Arten, wäre ein Einsatz denkbar und in Anbetracht der zunehmenden, länderübergreifenden Verbreitung auch wünschenswert. Um eine Früherkennung zu ermöglichen, wäre eine Untersuchung empfehlenswert. Die Probennahme sollte dabei an potentiellen Infektionsstellen (z. B. Wurzelspitzen) vorgenommen werden. Bei bereits deutlich erkennbarer Schädigung sollte die Probennahme in Nähe der Schadstelle erfolgen. Nach der Infektion setzt Hyphenwachstum ausgehend von den auf das Pflanzenmaterial getroffenen Sporen ein. Die Hyphenzellen sind polynuklid, sodass bereits bei einer geringen Menge an pflanzlicher Probe mit enthaltenen Hyphen genetisches Material des Pflanzenschädling enthalten sein sollte. Der Nachweis von Zoosporen könnte insbesondere bei der Kontrolle von Bewässerungsanlagen sinnvoll sein sowie bei der Untersuchung von Wasserproben aus der Umwelt. Zur Untersuchung von HBME-Zellen sowie des Tumorsuppressors p53 auf der Basis einer nukleinsäurebasierten Analytik bietet sich die Anwendung der tropfenbasierten Real-Time PCR an. Mit dieser Technologie können sehr geringe Probenmengen schnell und mit gleichzeitiger, quantitativer oder in begrenztem Umfang qualitativer Analyse untersucht werden. Steht jedoch eine umfangreiche, qualitative Analyse im Vordergrund der Untersuchungen, dann bietet sich die Verwendung eines Mikroarrays an.

## 5 Zusammenfassung

Lab-on-a-Chip Systeme zur Umsetzung analytischer und diagnostischer Prozesse in einen miniaturisierten Maßstab sollen die Untersuchung von Proben vor Ort ermöglichen. Mit der Entwicklung solcher Systeme für die nukleinsäurebasierte Bioanalytik beschäftigt sich diese Arbeit.

Eine Zielstellung bestand dabei in der Weiterentwicklung der tropfenbasierten on-Chip Real-Time PCR zur Verbesserung der Funktionsfähigkeit. Dabei stand auch die Demonstration der Funktionsfähigkeit anhand verschiedener Beispiele im Vordergrund. Die Entwicklung eines neuen Chip-Systems, welches die Amplifikation von Nukleinsäuren sowie deren Hybridisierungsnachweis mittels DNA-Mikroarray verbindet, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

Die Anwendbarkeit dieses Systems wurde am Beispiel der Diagnose verschiedener Arten des Pflanzenpathogens *Phytophthora* demonstriert. Neben der Etablierung funktionsfähiger Nachweisprotokolle bestand ein weiterer Schwerpunkt in Untersuchungen zur Spezifität und Sensitivität der Systeme sowie dem Vergleich mit einem konventionellem System, insbesondere von Ergebnissen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Die im Rahmen dieser Arbeit angestrebten Ziele wurden erreicht. Es konnten zwei Lab-on-a-Chip Systeme entwickelt bzw. weiterentwickelt (Abb. 91) sowie deren Funktionsfähigkeit anhand verschiedener Anwendungsbeispiele demonstriert werden.

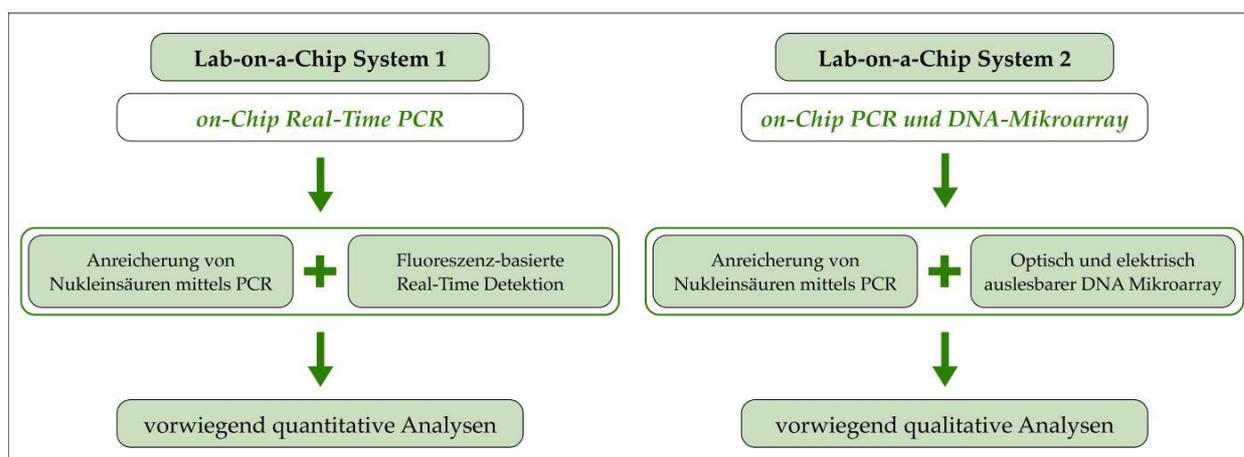


Abb. 91: Entwickelte Chip Systeme und bevorzugte Einsatzbereiche

Durch eine spezielle Oberflächenmodifikation der Probenträger für die tropfenbasierte on-Chip PCR konnte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse entscheidend verbessert werden. Die Anwendbarkeit dieses Chip-Systems wurde an verschiedenen Beispielen

demonstriert. Für den Nachweis spezifischer Genabschnitte, die den Tumorsupressor p53 codieren oder zur Identifizierung des Pflanzenpathogens *Phytophthora* dienen, konnten beim Einsatz von DNA im PCR-Ansatz Nachweisgrenzen von 1 bis 2 Molekülen/ $\mu\text{l}$  erreicht werden. Für den Nachweis des p53-Genabschnittes wurde neben einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff auch eine Fluoreszenz-markierte Hybridisierungs-sonde erfolgreich bei der Detektion eingesetzt.

Der Nachweis bestimmter Genabschnitte bei direkter Applikation von einzelnen, humanen Hirn-Endothelzellen (HBME-Zellen) sowie *Phytophthora*-Zoosporen konnte ebenfalls erfolgreich demonstriert werden. Die Zellen wurden dabei ausschließlich durch Temperatureinwirkungen auf dem Chip lysiert. Um einzelne Zellen gezielt auf den entsprechenden Positionen der Probenträger für die Chip-PCR zu positionieren, wurde auf eine Mikromanipulationstechnik mittels Glas-Kapillare sowie eine Methode zur Chip-basierten Dielektrophorese zurückgegriffen.

Ein funktionsfähiges Labormuster des Lab-on-a-Chip Systems zur Kombination von PCR und DNA-Mikroarray wurde entwickelt. Für dieses System wurden Nachweisprotokolle zur Identifizierung verschiedener, nah verwandter *Phytophthora*-Arten etabliert. Dazu waren genaue Untersuchungen bezüglich des Temperaturmanagements nötig. Zudem wurde das Protokoll zur Präparation der Mikroarrays angepasst, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Mit diesem Lab-on-a-Chip System ist es schließlich gelungen, fünf verschiedene *Phytophthora*-Arten eindeutig voneinander zu unterscheiden. Neben den verwendeten Proben aus Reinkulturen dieser Pflanzenpathogene wurde auch infiziertes Blattmaterial verwendet. Die hohe Spezifität des Systems konnte nachgewiesen werden, da keine Kreuzreaktionen beim Einsatz von pflanzlicher DNA sowie DNA der nah verwandten Gattung *Pythium* auftraten. Die Verwendung von Mikroarray-Chips mit Elektrodenstrukturen ermöglichte nach enzymatischer Silberabscheidung an den entsprechenden Messpunkten neben der optischen Detektion auch ein elektrisches Auslesen der Ergebnisse. Der entwickelte Chip besteht aus zwei Komponenten, darunter eine flexible Silikon-Abformung mit integrierten Mikrokanälen und Reaktionskammern. Die Reaktionslösungen werden über angeschlossene Pumpentechnik auf den Chip gebracht und können auch während der Reaktion bewegt werden, wodurch die Reaktionseffizienz erhöht wird. Ein Protokoll zu Oberflächenmodifikation der zweiten Chip-Komponente (Mikroarray-Chip) konnte etabliert werden, sodass dieser Chip eine ausreichende Kompatibilität sowohl für die PCR als auch zur Immobilisierung der Fänger- Oligonukleotide des Mikroarrays aufweist.

Letztlich wurden anhand der in dieser Arbeit vorgestellten Chip-Systemen zwei Technologien mit großen Potential für eine Vielzahl von Anwendungen präsentiert. Der Einsatz des jeweiligen Systems hängt von der analytischen Fragestellung ab. Während sich die Real-Time PCR besonders bei quantitativen Analysen eignet, ist der Einsatz eines DNA-Mikroarrays sehr nützlich, um eine umfassende, qualitative Untersuchung durchzuführen. Die Entwicklung der Systeme ist allerdings noch nicht vollständig abgeschlossen. Die existierenden Labormuster demonstrieren die Umsetzbarkeit analytischer Methoden wie PCR und DNA-Hybridisierung im Chip-Format. Für einen praktischen Einsatz bedarf es aber einer technischen Weiterentwicklung.

Die Detektion spezifischer Genabschnitte spielt nicht nur in der medizinischen Diagnostik oder der Phytopathologie eine wichtige Rolle, sondern auch bei der Ermittlung von Verwandtschaftsbeziehungen (z. B. Vaterschaftstests) oder der Lebensmittelkontrolle (z. B. Detektion mikrobiologischer Kontaminationen oder des Gehaltes an gentechnisch veränderten Bestandteilen). Damit ergeben sich vielfältige Anwendungsmöglichkeiten für solche Lab-on-a-Chip Systeme, die eine schnelle Untersuchung des Probenmaterials vor Ort ermöglichen können.

## 6 Ausblick

Hinsichtlich der technischen Umsetzung der beschriebenen Lab-on-a-Chip Systeme besteht ein Bedarf an Weiterentwicklung, vor allem im Bereich Automatisierung, um die Handhabung möglichst einfach sowie den Aufwand zur Auswertung der Ergebnisse für potentielle Anwender möglichst gering zu halten. Im Fall des Lab-on-a-Chip Systems mit integrierten Mikrokanälen und Reaktionskammern könnten Ventile zur automatisierten Zudosierung der verschiedenen Reaktionslösungen angekoppelt werden. Für die tropfenbasierte Analytik existieren ebenfalls Ansätze für eine automatisierte Bewegung von Reaktionslösungen. Mit Hilfe akustischer Oberflächenwellen (SAW-Technologie, engl. *surface acoustic wave*) können auf entsprechend strukturierten Chip-Oberflächen Flüssigkeitstropfen gezielt bewegt werden [180, 181]. Damit ist beispielsweise auch die Zudosierung von Reagenzien möglich (Abb. 92).

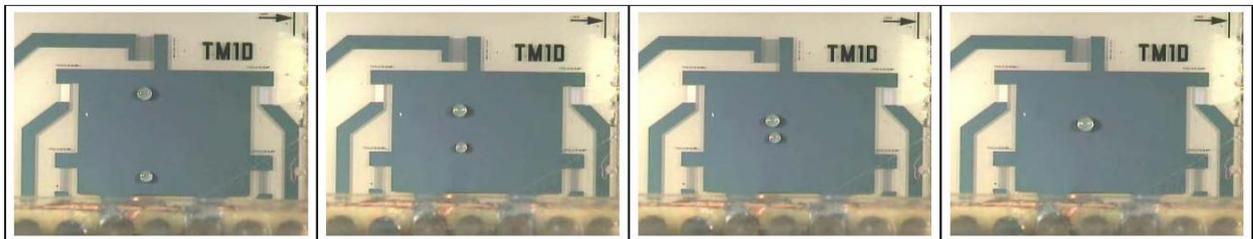


Abb. 92: Vereinigung von zwei Flüssigkeitstropfen mit Hilfe der SAW-Technologie [Q26]

Um die komplette Prozesskette einer Analyse im Chip-Maßstab zu realisieren, kann es erforderlich sein, Methoden zur Vorbereitung des Probenmaterials in das System zu integrieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich HBME-Zellen und *Phytophthora*-Zoosporen thermisch lysieren lassen. Da Standard *Taq* DNA-Polymerase empfindlich gegenüber Phenolen ist, wie sie z. B. in Blattmaterial vorkommen, wurde die DNA aus *Rhododendron*-Blättern zunächst extrahiert und aufgereinigt, bevor sie dem PCR-Ansatz zugeführt wurde. Dazu wurden magnetische Partikel verwendet, die DNA binden und eine Aufreinigung ohne Zentrifugation ermöglichen. Mittlerweile sind spezielle Polymerasen sowie dazugehörige PCR-Kits kommerziell erhältlich, die eine direkte Verwendung von pflanzlichem oder sogar tierischem Gewebe im PCR-Ansatz zulassen [Q27]. Erste Versuche wurden mit Blattsaft aus infiziertem und nicht infiziertem *Rhododendron* durchgeführt. Dabei wurde eine Variante des Protokolls angewendet, die einen zusätzlichen Lösungs- und Zentrifugationsschritt vorsieht. Bei Anwendung der *Phytophthora*-spezifischen Primer wurde nur im Fall einer Infektion

das entsprechende PCR-Produkt synthetisiert (Abb. 93a). Möglicherweise kann das Protokoll optimiert und Blattsaft direkt dem PCR-Ansatz zugeführt werden.

Zur Chip-basierten Extraktion von Nukleinsäuren aus biologischen Proben existieren verschiedene Methoden. Mit Hilfe von Kunststoff-basierten Systemen im Compact Disk-Format mit integrierten, mikrofluidischen Strukturen konnten Zentrifugationsprozesse realisiert werden (Abb. 93b) [182, 183].

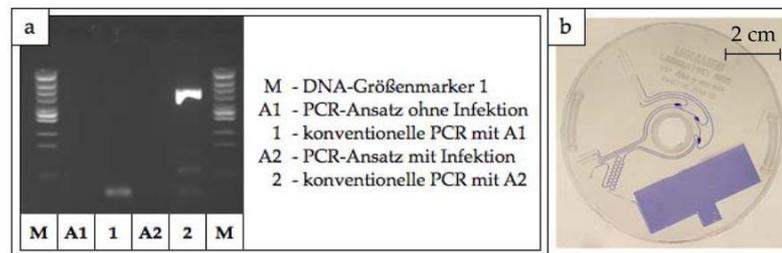


Abb. 93: Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis von *Phytophthora* in Blattsaft, der dem PCR-Ansatz direkt zugeführt wurde (a) und Kunststoff-Pressling mit integrierten mikrofluidischen Strukturen im Compact-Disk-Format (b)

Ein weiterer, mikrofluidischer Ansatz zur Separation von DNA oder auch Zellen, die an Magnetpartikel gebunden werden können, ist in Abb. 94 dargestellt. Auf einem speziellen Chip mit Mikrostrukturen aus Permalloy können die Partikel in einem magnetischen Streufeld eingefangen und transportiert werden. Der Transport kann dabei in einer anderen Richtung erfolgen, als die fluidische Strömung. Dadurch sind beispielsweise Waschprozesse möglich, um saubere Fraktionen zu erhalten. Befinden sich auf der Oberfläche der Magnetpartikel Antikörper, so können Zellen sehr spezifisch sortiert und für weitere Analysen bereitgestellt werden.

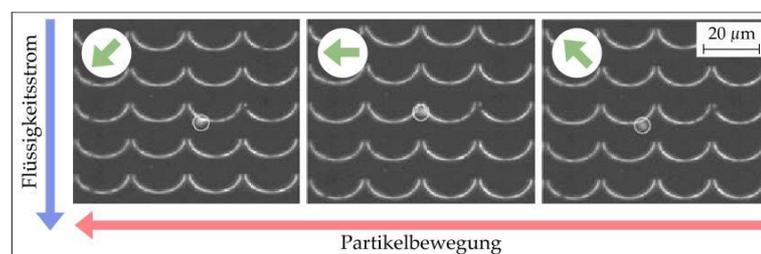


Abb. 94: Bewegung eines Magnetpartikels entlang von Permalloy-Strukturen. Durch ein gedrehtes Magnetfeld (grüner Pfeil) werden Streufelder erzeugt.

Die Identifizierung genetischer Unterschiede mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse, die im Anschluss an die PCR durchgeführt wird, gewinnt zunehmend an Bedeutung im Bereich der Bioanalytik. Mit dieser Methode können bei optimaler Einstellung der Heizra-

te sowie geeigneter Zusammensetzung der Reaktionslösung (verwendeter Farbstoff, Pufferkonzentration) Einzelbasenunterschiede detektiert werden (HRM, engl. *high resolution melt*) [184-186]. Ein Experiment mit den PCR-Produkten der ribosomalen DNA von drei verschiedenen *Phytophthora*-Arten, welches mit dem konventionellen Real-Time Thermocycler durchgeführt wurde, demonstriert deren Unterscheidbarkeit mit dieser Methode (Abb. 95). Die Differenzen der mittleren Schmelztemperatur sind auf einzelne Basenunterschiede sowie Insertionen und Deletionen in amplifizierten Bereich der ribosomalen DNA zurückzuführen. Beispielsweise bestehen im betreffenden Sequenzabschnitt zwischen *P. ramorum* und *P. lateralis* exakt drei einzelne Basenunterschiede. Dabei sind die Basen so ausgetauscht, dass anstelle einer dreifachen Wasserstoffbrückenbindung bei *P. ramorum* eine Doppelbindung bei *P. lateralis* vorliegt. Dies bedingt die niedrigere Schmelztemperatur bei *P. lateralis*. Eine Transformation des angewendeten Protokolls auf den PCR-Chip könnte die Identifizierung verschiedener *Phytophthora*-Arten auch über eine Schmelzkurven-Analyse im Tropfenformat ermöglichen.

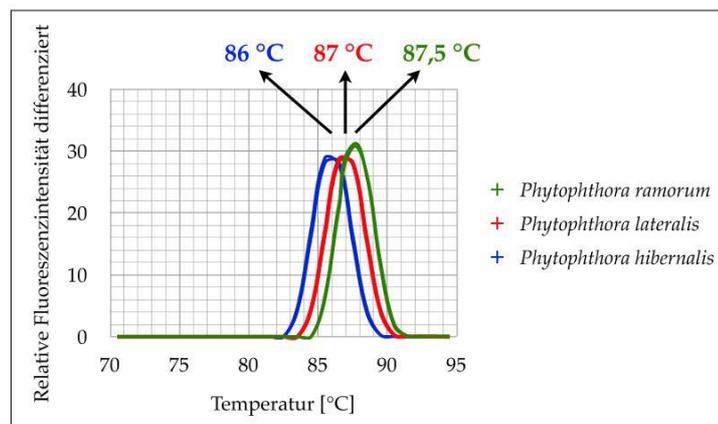


Abb. 95: Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte von drei verschiedenen *Phytophthora*-Arten

Letztlich gibt es zahlreiche Möglichkeiten, die Anwendbarkeit der existierenden Systeme an weiteren Beispielen zu demonstrieren. Neben den im Rahmen dieser Arbeit veranschaulichten Anwendungen in Medizin und Phytopathologie könnten die beiden, entwickelten Chip-Systeme bei einer Vielzahl weiterer, diagnostischer und analytischer Fragestellungen zum Einsatz kommen. Systeme zur Nukleinsäureanalytik mit integrierter PCR oder DNA-Mikroarrays könnten ebenso im Bereich Umweltanalytik, Lebensmittelkontrolle oder Forensik eingesetzt werden. Dadurch ergeben sich neue Möglichkeiten für weitere Forschungsvorhaben.

Zur Umsetzung der kompletten Prozesskette für die Nukleinsäureanalytik in einen miniaturisierten Maßstab wird weitere Entwicklungsarbeit nötig sein. Kommerziell erhält-

liche Systeme bearbeiten meist Teilschritte der gesamten Analyse, sodass in der Regel ein entsprechend ausgestattetes Labor benötigt wird. Anhand vorhandener, wissenschaftlichen Veröffentlichungen können dagegen zunehmend Ansätze für Komplettlösungen beobachtet werden. Ein Problem besteht oft in der kostengünstigen Umsetzung, vor allen im Hinblick auf Einmalgebrauchsartikel, wie sie z. B. in der medizinischen Diagnostik unerlässlich sind. Ein einziges Universalsystem wird kaum umsetzbar sein, wenn es darum geht, kompakte und damit portable Systemlösungen zu entwickeln. Vielmehr sollten Systemlösungen für breite Gruppen an analytischen Fragestellungen realisiert werden.

## 7 Anhang

### 7.1 Literaturverzeichnis

1. Bodrossy, L., Sessitsch, A., *Oligonucleotide microarrays in microbial diagnostics*. Current Opinion in Microbiology, 2004. **7**(3): p. 245-254.
2. Drancourt, M., Bollet, C., Carlouz, A., Martelin, R., Gayral, J.P., Raoult, D., *16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates*. Journal of Clinical Microbiology, 2000. **38**(10): p. 3623-3630.
3. Lee, I.M., Hammond, R.W., Davis, R.E., Gundersen, D.E., *Universal Amplification and Analysis of Pathogen 16s rDNA for Classification and Identification of Mycoplasma-like Organisms*. Phytopathology, 1993. **83**(8): p. 834-842.
4. Ivnitski, D., O'Neil, D.J., Gattuso, A., Schlicht, R., Calidonna, M., Fisher, R., *Nucleic acid approaches for detection and identification of biological warfare and infectious disease agents*. Biotechniques, 2003. **35**(4): p. 862-869.
5. Yang, S., Rothman, R.E., *PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings*. Lancet Infectious Diseases, 2004. **4**(6): p. 337-348.
6. López-Bigas, N., Ouzounis, C.A., *Genome-wide identification of genes likely to be involved in human genetic disease*. Nucleic Acids Research, 2004. **32**(10): p. 3108-3114.
7. Sidransky, D., *Nucleic acid-based methods for the detection of cancer*. Science, 1997. **278**(5340): p. 1054-1058.
8. Hawass, Z., Gad, Y.Z., Ismail, S., Khairat, R., Fathalla, D., Hasan, N., Ahmed, A., Elleithy, H., Ball, M., Gaballah, F., Wasef, S., Fateen, M., Amer, H., Gostner, P., Selim, A., Zink, A., Pusch, C.M., *Ancestry and Pathology in King Tutankhamun's Family*. Journal of the American Medical Association, 2010. **303**(7): p. 638-647.
9. Goetz, F., Rosauer, D., Sitar, S., Goetz, G., Simchick, C., Roberts, S., Johnson, R., Murphy, C., Bronte, C.R., MacKenzie, S., *A genetic basis for the phenotypic differentiation between siscowet and lean lake trout (Salvelinus namaycush)*. Molecular Ecology, 2010. **19**: p. 176-196.
10. Leimanis, S., Hernandez, M., Fernandez, S., Boyer, F., Burns, M., Bruderer, S., Glouden, T., Harris, N., Kaeppli, O., Philipp, P., Pla, M., Puigdomenech, P., Vaitilingom, M., Bertheau, Y., Remacle, J., *A microarray-based detection system for genetically modified (GM) food ingredients*. Plant Molecular Biology, 2006. **61**(1-2): p. 123-139.

11. Manz, A., Graber, N., 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. Watson, J.D., Crick, F.H.C., *Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid*. Nature, 1953. **171**(4361): p. 964-967.
13. Sanger, F., Coulson, A.R., *Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA-Polymerase*. Journal of Molecular Biology, 1975. **94**(3): p. 441-448.
14. Maxam, A.M., Gilbert, W., *New Method for Sequencing DNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977. **74**(2): p. 560-564.
15. Isobe, M., Emanuel, B.S., Givol, D., Oren, M., Croce, C.M., *Localization of Gene for Human p53 Tumor-Antigen to Band 17p13*. Nature, 1986. **320**(6057): p. 84-85.
16. Levine, A.J., Momand, J., Finlay, C.A., *The p53 Tumor Suppressor Gene*. Nature, 1991. **351**(6326): p. 453-456.
17. Baker, S.J., Markowitz, S., Fearon, E.R., Willson, J.K.V., Vogelstein, B., *Suppression of Human Colorectal-Carcinoma Cell-Growth by Wild-Type-p53*. Science, 1990. **249**(4971): p. 912-915.
18. Santibáñez-Koref, M.F., Birch, J.M., Hartley, A.L., Jones, P.H.M., Craft, A.W., Eden, T., Crowther, D., Kelsey, A.M., Harris, M., *p53 Germline Mutations in Li-Fraumeni Syndrome*. Lancet, 1991. **338**(8781): p. 1490-1491.
19. Malkin, D., *p53 and the Li-Fraumeni Syndrome*. Cancer Genetics and Cytogenetics, 1993. **66**(2): p. 83-92.
20. Li, F.P., Fraumeni, J.F., *Soft-Tissue Sarcomas, Breast Cancer, and Other Neoplasms - a Familial Syndrome*. Annals of Internal Medicine, 1969. **71**(4): p. 747-&.
21. Slingerland, J.M., Benchimol, S., *Transforming Activity of Mutant Human p53 Alleles*. Journal of Cellular Physiology, 1991. **148**(3): p. 391-395.
22. Sugimoto, K., Toyoshima, H., Sakai, R., Miyagawa, K., Hagiwara, K., Hirai, H., Ishikawa, F., Takaku, F., *Mutations of the p53 Gene in Lymphoid Leukemia*. Blood, 1991. **77**(6): p. 1153-1156.
23. Osborne, R.J., Merlo, G.R., Mitsudomi, T., Venesio, T., Liscia, D.S., Cappa, A.P.M., Chiba, I., Takahashi, T., Nau, M.M., Callahan, R., Minna, J.D., *Mutations in the p53 Gene in Primary Human Breast Cancers*. Cancer Research, 1991. **51**(22): p. 6194-6198.
24. Mashiyama, S., Murakami, Y., Yoshimoto, T., Sekiya, T., Hayashi, K., *Detection of p53 Gene-Mutations in Human Brain-Tumors by Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of Polymerase Chain-Reaction Products*. Oncogene, 1991. **6**(8): p. 1313-1318.

25. Vorbrodt, A.W., *Ultrastructural Cyto-Chemistry of Blood-Brain-Barrier Endothelia*. Progress in Histochemistry and Cytochemistry, 1988. **18**(3): p. 1-99.
26. Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., Couraud, P.O., *Biology of the blood-brain barrier: Part I*. Revue Neurologique (Paris), 2009. **165**(11): p. 863-874
27. Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., Couraud, P.O., *Implication of the blood-brain barrier in neurological diseases: Part II*. Revue Neurologique, 2009. **165**(12): p. 1010-1022.
28. Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., Couraud, P.O., *The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2009. **1788**(4): p. 842-857.
29. Lehr, J.E., Pienta, K.J., *Preferential adhesion of prostate cancer cells to a human bone marrow endothelial cell line*. Journal of the National Cancer Institute, 1998. **90**(2): p. 118-123.
30. Higa, S., Yoshihama, M., Tanaka, T., Kenmochi, N., *Gene organization and sequence of the region containing the ribosomal protein genes RPL13A and RPS11 in the human genome and conserved features in the mouse genome*. Gene, 1999. **240**(2): p. 371-377.
31. Mazumder, B., Sampath, P., Seshadri, V., Maitra, R.K., DiCorleto, P.E., Fox, P.L., *Regulated release of L13a from the 60S ribosomal subunit as a mechanism of transcript-specific translational control*. Cell, 2003. **115**(2): p. 187-198.
32. Kane, R., Stevenson, L., Godson, C., Stitt, A.W., O'Brien, C., *Gremlin gene expression in bovine retinal pericytes exposed to elevated glucose*. British Journal of Ophthalmology, 2005. **89**(12): p. 1638-1642.
33. Namkoong, H., Shin, S.M., Kim, H.K., Ha, S.A., Cho, G.W., Hur, S.Y., Kim, T.E., Kim, J.W., *The bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is overexpressed in human cancers and interacts with YWHAH protein*. BioMed Central Cancer, 2006. **6**: p. 74
34. Sneddon, J.B., Zhen, H.H., Montgomery, K., van de Rijn, M.V., Tward, A.D., West, R., Gladstone, H., Chang, H.Y., Morganroth, G.S., Oro, A.E., Brown, P.O., *Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(40): p. 14842-14847.
35. Fuchs, E., Weber, K., *Intermediate Filaments - Structure, Dynamics, Function, and Disease*. Annual Review of Biochemistry, 1994. **63**: p. 345-382.
36. Leader, M., Collins, M., Patel, J., Henry, K., *Vimentin - an Evaluation of Its Role as a Tumor-Marker*. Histopathology, 1987. **11**(1): p. 63-72.
37. Dick, M.W., *Straminipilous Fungi: Systematics of the Peronosporomycetes Including Accounts of the Marine Straminipilous Protists, the Plasmodiophorids and Similar Organisms* 2001: Springer Netherland

38. Werres, S., Marwitz, R., Veld, W., De Cock, A., Bonants, P.J.M., De Weerd, M., Themann, K., Ilieva, E., Baayen, R.P., *Phytophthora ramorum* sp nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*. *Mycological Research*, 2001. **105**: p. 1155-1165.
39. Rizzo, D.M., Garbelotto, M., Davidson, J.M., Slaughter, G.W., Koike, S.T., *Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality of *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California. *Plant Disease*, 2002. **86**(3): p. 205-214.
40. Lane, C.R., Beales, P.A., Hughes, K.J.D., Griffin, R.L., Munro, D., Brasier, C.M., Webber, J.F., *First outbreak of Phytophthora ramorum in England, on Viburnum tinus*. *Plant Pathology*, 2003. **52**(3): p. 414-414.
41. Henricot, B., Waghorn, I., Denton, G., Perez Sierra, A.M., *First report of fruit rot caused by Phytophthora syringae on Pyracantha in the UK*. *Plant Pathology*, 2004. **53**(6): p. 805-805.
42. Haas, B.J., Kamoun, S., Zody, M.C., Jiang, R.H.Y., Handsaker, R.E., Cano, L.M., Grabherr, M., Kodira, C.D., Raffaele, S., Torto-Alalibo, T., Bozkurt, T.O., Ah-Fong, A.M.V., Alvarado, L., Anderson, V.L., Armstrong, M.R., Avrova, A., Baxter, L., Beynon, J., Boevink, P.C., Bollmann, S.R., Bos, J.I.B., Bulone, V., Cai, G.H., Cakir, C., Carrington, J.C., Chawner, M., Conti, L., Costanzo, S., Ewan, R., Fahlgren, N., Fischbach, M.A., Fugelstad, J., Gilroy, E.M., Gnerre, S., Green, P.J., Grenville-Briggs, L.J., Griffith, J., Grunwald, N.J., Horn, K., Horner, N.R., Hu, C.H., Huitema, E., Jeong, D.H., Jones, A.M.E., Jones, J.D.G., Jones, R.W., Karlsson, E.K., Kung'u, S.G., Lamour, K., Liu, Z.Y., Ma, L.J., MacLean, D., Chibucos, M.C., McDonald, H., McWalters, J., Meijer, H.J.G., Morgan, W., Morris, P.F., Munro, C.A., O'Neill, K., Ospina-Giraldo, M., Pinzon, A., Pritchard, L., Ramsahoye, B., Ren, Q.H., Restrepo, S., Roy, S., Sadanandom, A., Savidor, A., Schornack, S., Schwartz, D.C., Schumann, U.D., Schwessinger, B., Seyer, L., Sharpe, T., Silvar, C., Song, J., Studholme, D.J., Sykes, S., Thines, M., van de Vondervoort, P.J.I., Phuntumart, V., Wawra, S., Weide, R., Win, J., Young, C., Zhou, S.G., Fry, W., Meyers, B.C., van West, P., Ristaino, J., Govers, F., Birch, P.R.J., Whisson, S.C., Judelson, H.S., Nussbaum, C., *Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen Phytophthora infestans*. *Nature*, 2009. **461**(7262): p. 393-398.
43. Chomczynski, P., Sacchi, N., *Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform Extraction*. *Analytical Biochemistry*, 1987. **162**(1): p. 156-159.
44. Tian, H., Huhmer, A.F., Landers, J.P., *Evaluation of silica resins for direct and efficient extraction of DNA from complex biological matrices in a miniaturized format*. *Anal Biochem*, 2000. **283**(2): p. 175-91.
45. Wolfe, K.A., Breadmore, M.C., Ferrance, J.P., Power, M.E., Conroy, J.F., Norris, P.M., Landers, J.P., *Toward a microchip-based solid-phase extraction method for isolation of nucleic acids*. *Electrophoresis*, 2002. **23**(5): p. 727-733.
46. Cady, N.C., Stelick, S., Batt, C.A., *Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2003. **19**(1): p. 59-66.

47. Enger, J., Goksor, M., Ramser, K., Hagberg, P., Hanstorp, D., *Optical tweezers applied to a microfluidic system*. *Lab on a Chip*, 2004. **4**(3): p. 196-200.
48. Arai, F., Ng, C., Maruyama, H., Ichikawa, A., El-Shimy, H., Fukuda, T., *On chip single-cell separation and immobilization using optical tweezers and thermosensitive hydrogel*. *Lab on a Chip*, 2005. **5**(12): p. 1399-1403.
49. Wakamoto, Y., Inoue, I., Moriguchi, H., Yasuda, K., *Analysis of single-cell differences by use of an on-chip microculture system and optical trapping*. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 2001. **371**(2): p. 276-281.
50. Wakamoto, Y., Umehara, S., Matsumura, K., Inoue, I., Yasuda, K., *Development of non-destructive, non-contact single-cell based differential cell assay using on-chip microcultivation and optical tweezers*. *Sensors and Actuators B*, 2003. **96**(3): p. 693-700.
51. Pohl, H.A., Crane, J.S., *Dielectrophoresis of cells*. *Biophysical Journal*, 1971. **11**(9): p. 711-27.
52. Washizu, M., Nanba, T., Masuda, S., *Handling Biological Cells Using a Fluid Integrated-Circuit*. *IEEE Transactions on Industry Applications*, 1990. **26**(2): p. 352-358.
53. Asbury, C.L., van den Engh, G., *Trapping of DNA in nonuniform oscillating electric fields*. *Biophysical Journal*, 1998. **74**(2): p. 1024-1030.
54. Markx, G.H., Pethig, R., *Dielectrophoretic Separation of Cells - Continuous Separation*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995. **45**(4): p. 337-343.
55. Docoslis, A., Kalogerakis, N., Behie, L.A., *Dielectrophoretic forces can be safely used to retain viable cells in perfusion cultures of animal cells*. *Cytotechnology*, 1999. **30**(1-3): p. 133-142.
56. Pethig, R., *Dielectrophoresis: Using inhomogeneous AC electrical fields to separate and manipulate cells*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1996. **16**(4): p. 331-348.
57. Fuhr, G., Reichle, C., Muller, T., Kahlke, K., Schutze, K., Stuke, M., *Processing of micro-particles by UV laser irradiation in a field cage*. *Applied Physics A*, 1999. **69**(6): p. 611-616.
58. Huang, Y., Ewalt, K.L., Tirado, M., Haigis, T.R., Forster, A., Ackley, D., Heller, M.J., O'Connell, J.P., Krihak, M., *Electric manipulation of bioparticles and macromolecules on microfabricated electrodes*. *Analytical Chemistry*, 2001. **73**(7): p. 1549-1559.
59. Doh, I., Cho, Y.H., *A continuous cell separation chip using hydrodynamic dielectrophoresis (DEP) process*. *Sensors and Actuators A*, 2005. **121**(1): p. 59-65.
60. Frenea, M., Faure, S.P., Le Pioufle, B., Coquet, P., Fujita, H., *Positioning living cells on a high-density electrode array by negative dielectrophoresis*. *Materials Science & Engineering C*, 2003. **23**(5): p. 597-603.
61. Taff, B.M., Voldman, J., *A scalable addressable positive-dielectrophoretic cell-sorting array*. *Analytical Chemistry*, 2005. **77**(24): p. 7976-7983.

62. Cheng, I.F., Chang, H.C., Hou, D., Chang, H.C., *An integrated dielectrophoretic chip for continuous bioparticle filtering, focusing, sorting, trapping, and detecting*. *Biomicrofluidics*, 2007. **1**(2).
63. Fiedler, S., Shirley, S.G., Schnelle, T., Fuhr, G., *Dielectrophoretic sorting of particles and cells in a microsystem*. *Analytical Chemistry*, 1998. **70**(9): p. 1909-1915.
64. Li, Y.L., Dalton, C., Crabtree, H.J., Nilsson, G., Kaler, K., *Continuous dielectrophoretic cell separation microfluidic device*. *Lab on a Chip*, 2007. **7**(2): p. 239-248.
65. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., *Enzymatic Amplification of  $\beta$ -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle-Cell Anemia*. *Science*, 1985. **230**(4732): p. 1350-1354.
66. Saiki, R.K., Bugawan, T.L., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., *Analysis of Enzymatically Amplified  $\beta$ -Globin and HLA-DQ $\alpha$ -DNA with Allele-Specific Oligonucleotide Probes*. *Nature*, 1986. **324**(6093): p. 163-166.
67. Mullis, K.B., Faloona, F.A., *Specific Synthesis of DNA In Vitro Via a Polymerase-Catalyzed Chain-Reaction*. *Methods in Enzymology*, 1987. **155**: p. 335-350.
68. Chien, A., Edgar, D.B., Trela, J.M., *Deoxyribonucleic-Acid Polymerase from Extreme Thermophile Thermus-Aquaticus*. *Journal of Bacteriology*, 1976. **127**(3): p. 1550-1557.
69. Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R.K., Myambo, K., Drummond, R., Gelfand, D.H., *Isolation, Characterization, and Expression in Escherichia-Coli of the DNA-Polymerase Gene from Thermus-Aquaticus*. *Journal of Biological Chemistry*, 1989. **264**(11): p. 6427-6437.
70. Joos, B., Kuster, H., Cone, R., *Covalent attachment of hybridizable oligonucleotides to glass supports*. *Analytical Biochemistry*, 1997. **247**(1): p. 96-101.
71. Wu, F., Lendvai, G., Yngve, U., Eriksson, B., Langstrom, B., Bergstrom, M., *Hybridisation of  $^{76}\text{Br}$ -labelled antisense oligonucleotides to Chromogranin A mRNA verified by RT-PCR*. *Nuclear Medicine and Biology*, 2004. **31**(8): p. 1073-1078.
72. Schubert, F., Cech, D., Reinhardt, R., Wiesner, P., *Fluorescent labelling of sequencing primers for automated oligonucleotide synthesis*. *DNA Sequence*, 1992. **2**(5).
73. Schubert, F., Ahlert, K., Cech, D., Rosenthal, A., *One-Step Labeling of Oligonucleotides with Fluorescein During Automated Synthesis*. *Nucleic Acids Research*, 1990. **18**(11): p. 3427-3427.
74. Diwan, N., Cregan, P.B., *Automated sizing of fluorescent-labeled Simple Sequence Repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean*. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997. **95**(5-6): p. 723-733.
75. Forghani, B., Hurst, J.W., Shell, G.R., *Detection of the Human-Immunodeficiency-Virus Genome with a Biotinylated DNA Probe Generated by Polymerase Chain-Reaction*. *Molecular and Cellular Probes*, 1991. **5**(3): p. 221-228.
76. Murasugi, A., Wallace, R.B., *Biotin-Labeled Oligonucleotides - Enzymatic-Synthesis and Use as Hybridization Probes*. *DNA A*, 1984. **3**(3): p. 269-277.

77. Landgraf, A., Reckmann, B., Pingoud, A., *Quantitative-Analysis of Polymerase Chain-Reaction (Pcr) Products Using Primers Labeled with Biotin and a Fluorescent Dye*. Analytical Biochemistry, 1991. **193**(2): p. 231-235.
78. Holmstrom, K., Rasmussen, O.F., *An Easy Method to Check the Efficiency of Biotin End-Labeling of DNA-Fragments*. Nucleic Acids Research, 1990. **18**(15): p. 4632-4632.
79. Gilboa, E., Mitra, S.W., Goff, S., Baltimore, D., *Detailed Model of Reverse Transcription and Tests of Crucial Aspects*. Cell, 1979. **18**(1): p. 93-100.
80. Zhang, C.S., Xu, J.L., Ma, W.L., Zheng, W.L., *PCR microfluidic devices for DNA amplification*. Biotechnology Advances, 2006. **24**(3): p. 243-284.
81. Hong, J.W., Fujii, T., Seki, M., Yamamoto, T., Endo, I., *Integration of gene amplification and capillary gel electrophoresis on a polydimethylsiloxane-glass hybrid microchip*. Electrophoresis, 2001. **22**(2): p. 328-333.
82. Nagai, H., Murakami, Y., Morita, Y., Yokoyama, K., Tamiya, E., *Development of a microchamber array for picoliter PCR*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(5): p. 1043-1047.
83. Felbel, J., Reichert, A., Kielpinski, M., Urban, M., Hafner, N., Durst, M., Kohler, J.M., Weber, J., Henkel, T., *Technical concept of a flow-through microreactor for in-situ RT-PCR*. Engineering in Life Sciences, 2008. **8**(1): p. 68-72.
84. Reichert, A., Felbel, J., Kielpinski, M., Urban, M., Steinbrecht, B., Henkel, T., *Micro Flow-Through Thermocycler with Simple Meandering Channel with Symmetric Temperature Zones for Disposable PCR-Devices in Microscope Slide Format*. Journal of Biomic Engineering, 2008. **5**(4): p. 291-298.
85. Felbel, J., Bieber, I., Pipper, J., Kohler, J.M., *Investigations on the compatibility of chemically oxidized silicon (SiOx)-surfaces for applications towards chip-based polymerase chain reaction*. Chemical Engineering Journal, 2004. **101**(1-3): p. 333-338.
86. Poser, S., Schulz, T., Dillner, U., Baier, V., Kohler, J.M., Schimkat, D., Mayer, G., Siebert, A., *Chip elements for fast thermocycling*. Sensors and Actuators A, 1997. **62**(1-3): p. 672-675.
87. Erill, I., Campoy, S., Erill, N., Barbe, J., Aguilo, J., *Biochemical analysis and optimization of inhibition and adsorption phenomena in glass-silicon PCR-chips*. Sensors and Actuators B, 2003. **96**(3): p. 685-692.
88. Chaudhari, A.M., Woudenberg, T.M., Albin, M., Goodson, K.E., *Transient liquid crystal thermometry of microfabricated PCR vessel arrays*. Journal of Microelectromechanical Systems, 1998. **7**(4): p. 345-355.
89. Schneegaß, I., Bräutigam, R., Köhler, J.M., *Miniaturized flow-through PCR with different template types in a silicon chip thermocycler*. Lab on a Chip, 2001. **1**(1): p. 42-49.

90. Lagally, E.T., Simpson, P.C., Mathies, R.A., *Monolithic integrated microfluidic DNA amplification and capillary electrophoresis analysis system*. Sensors and Actuators B, 2000. **63**(3): p. 138-146.
91. Fukuba, T., Yamamoto, T., Naganuma, T., Fujii, T., *Microfabricated flow-through device for DNA amplification - towards in situ gene analysis*. Chemical Engineering Journal, 2004. **101**(1-3): p. 151-156.
92. Shin, Y.S., Cho, K., Lim, S.H., Chung, S., Park, S.J., Chung, C., Han, D.C., Chang, J.K., *PDMS-based micro PCR chip with parylene coating*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2003. **13**(5): p. 768-774.
93. Anderson, R.C., Su, X., Bogdan, G.J., Fenton, J., *A miniature integrated device for automated multistep genetic assays*. Nucleic Acids Research, 2000. **28**(12).
94. Hupert, N., Bearman, G.M.L., Mushlin, A.I., Callahan, M.A., *Accuracy of screening for inhalational anthrax after a bioterrorist attack*. Annals of Internal Medicine, 2003. **139**(5): p. 337-345.
95. Ueda, M., Nakanishi, H., Tabata, O., Baba, Y., *Imaging of a band for DNA fragment migrating in microchannel on integrated microchip*. Materials Science & Engineering C, 2000. **12**(1-2): p. 33-36.
96. Lee, D.S., Park, S.H., Yang, H.S., Chung, K.H., Yoon, T.H., Kim, S.J., Kim, K., Kim, Y.T., *Bulk-micromachined submicroliter-volume PCR chip with very rapid thermal response and low power consumption*. Lab on a Chip, 2004. **4**(4): p. 401-407.
97. Zou, Q.B., Miao, Y.B., Chen, Y., Sridhar, U., Chong, C.S., Chai, T.C., Tie, Y., Teh, C.H.L., Lim, T.M., Heng, C., *Micro-assembled multi-chamber thermal cyclers for low-cost reaction chip thermal multiplexing*. Sensors and Actuators A, 2002. **102**(1-2): p. 114-121.
98. Giordano, B.C., Ferrance, J., Swedberg, S., Huhmer, A.F.R., Landers, J.P., *Polymerase chain reaction in polymeric microchips: DNA amplification in less than 240 seconds*. Analytical Biochemistry, 2001. **291**(1): p. 124-132.
99. Slyadnev, M.N., Tanaka, Y., Tokeshi, M., Kitamori, T., *Photothermal temperature control of a chemical reaction on a microchip using an infrared diode laser*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(16): p. 4037-4044.
100. Ke, G.M., Cheng, H.L., Ke, L.Y., Ji, W.T., Chulu, J.L.C., Liao, M.H., Chang, T.J., Liu, H.J., *Development of a quantitative Light Cycler real-time RT-PCR for detection of avian reovirus*. Journal of Virological Methods, 2006. **133**(1): p. 6-13.
101. Pal, D., Venkataraman, V., *A portable battery-operated chip thermocycler based on induction heating*. Sensors and Actuators A, 2002. **102**(1-2): p. 151-156.
102. Fermér, C., Nilsson, P., Larhed, M., *Microwave-assisted high-speed PCR*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2003. **18**(2): p. 129-132.

103. Orrling, K., Nilsson, P., Gullbergh, M., Larhed, M., *An efficient method to perform milliliter-scale PCR utilizing highly controlled microwave thermocycling*. Chemical Communications, 2004(7): p. 790-791.
104. Bu, M.Q., Melvin, T., Ensell, G., Wilkinson, J.S., Evans, A.G.R., *Design and theoretical evaluation of a novel microfluidic device to be used for PCR*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2003. **13**(4): p. 125-130.
105. Lagally, E.T., Medintz, I., Mathies, R.A., *Single-molecule DNA amplification and analysis in an integrated microfluidic device*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(3): p. 565-570.
106. Rodriguez, I., Lesaichere, M., Tie, Y., Zou, Q.B., Yu, C., Singh, J., Meng, L.T., Uppili, S., Li, S.F.Y., Gopalakrishnakone, P., Selvanayagam, Z.E., *Practical integration of polymerase chain reaction amplification and electrophoretic analysis in microfluidic devices for genetic analysis*. Electrophoresis, 2003. **24**(1-2): p. 172-178.
107. Shen, K.Y., Chen, X.F., Guo, M., Cheng, J., *A microchip-based PCR device using flexible printed circuit technology*. Sensors and Actuators B, 2005. **105**(2): p. 251-258.
108. Curcio, M., Roeraade, J., *Continuous segmented-flow polymerase chain reaction for high-throughput miniaturized DNA amplification*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(1): p. 1-7.
109. Kopp, M.U., de Mello, A.J., Manz, A., *Chemical amplification: Continuous-flow PCR on a chip*. Science, 1998. **280**(5366): p. 1046-1048.
110. Belgrader, P., Elkin, C.J., Brown, S.B., Nasarabadi, S.N., Langlois, R.G., Milanovich, F.P., Colston, B.W., Marshall, G.D., *A reusable flow-through polymerase chain reaction instrument for the continuous monitoring of infectious biological agents*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(14): p. 3446-3450.
111. Khandurina, J., McKnight, T.E., Jacobson, S.C., Waters, L.C., Foote, R.S., Ramsey, J.M., *Integrated system for rapid PCR-based DNA analysis in microfluidic devices*. Analytical Chemistry, 2000. **72**(13): p. 2995-3000.
112. Shoffner, M.A., Cheng, J., Hvichia, G.E., Kricka, L.J., Wilding, P., *Chip PCR .1. Surface passivation of microfabricated silicon-glass chips for PCR*. Nucleic Acids Research, 1996. **24**(2): p. 375-379.
113. El-Ali, J., Perch-Nielsen, I.R., Poulsen, C.R., Bang, D.D., Telleman, P., Wolff, A., *Simulation and experimental validation of a SU-8 based PCR thermocycler chip with integrated heaters and temperature sensor*. Sensors and Actuators A, 2004. **110**(1-3): p. 3-10.
114. Sun, K., Yamaguchi, A., Ishida, Y., Matsuo, S., Misawa, H., *A heater-integrated transparent microchannel chip for continuous-flow PCR*. Sensors and Actuators B, 2002. **84**(2-3): p. 283-289.
115. Giordano, B.C., Copeland, E.R., 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.

116. Park, S.R., Swerdlow, H., *Concentration of DNA in a flowing stream for high-sensitivity capillary electrophoresis*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(17): p. 4467-4474.
117. Hühmer, A.F.R., Landers, J.P., *Noncontact infrared-mediated thermocycling for effective polymerase chain reaction amplification of DNA in nanoliter volumes*. Analytical Chemistry, 2000. **72**(21): p. 5507-5512.
118. Oda, R.P., Strausbauch, M.A., Huhmer, A.F.R., Borson, N., Jurens, S.R., Craighead, J., Wettstein, P.J., Eckloff, B., Kline, B., Landers, J.P., *Infrared-mediated thermocycling for ultrafast polymerase chain reaction amplification of DNA*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(20): p. 4361-4368.
119. Sasaki, N., Izawa, M., Shimojo, M., Shibata, K., Akiyama, J., Itoh, M., Nagaoka, S., Carninci, P., Okazaki, Y., Moriuchi, T., Muramatsu, M., Watanabe, S., Hayashizaki, Y., *A novel control system for polymerase chain reaction using a RIKEN GS384 thermalcycler*. DNA Research, 1997. **4**(6): p. 387-391
120. Dunn, W.C., Jacobson, S.C., Waters, L.C., Kroutchinina, N., Khandurina, J., Foote, R.S., Justice, M.J., Stubbs, L.J., Ramsey, J.M., *PCR amplification and analysis of simple sequence length polymorphisms in mouse DNA using a single microchip device*. Analytical Biochemistry, 2000. **277**(1): p. 157-160.
121. Waters, L.C., Jacobson, S.C., Kroutchinina, N., Khandurina, J., Foote, R.S., Ramsey, J.M., *Multiple sample PCR amplification and electrophoretic analysis on a microchip*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(24): p. 5172-5176.
122. Burns, M.A., Mastrangelo, C.H., Sammarco, T.S., Man, F.P., Webster, J.R., Johnson, B.N., Foerster, B., Jones, D., Fields, Y., Kaiser, A.R., Burke, D.T., *Microfabricated structures for integrated DNA analysis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(11): p. 5556-5561.
123. Panaro, N.J., Lou, X.J., Fortina, P., Kricka, L.J., Wilding, P., *Surface effects on PCR reactions in multichip microfluidic platforms*. Biomedical Microdevices, 2004. **6**(1): p. 75-80.
124. Yang, J.M., Bell, J., Huang, Y., Tirado, M., Thomas, D., Forster, A.H., Haigis, R.W., Swanson, P.D., Wallace, R.B., Martinsons, B., Krihak, M., *An integrated, stacked microlaboratory for biological agent detection with DNA and immunoassays*. Biosensors & Bioelectronics, 2002. **17**(6-7): p. 605-618.
125. Johansson, B.G., *Agarose gel electrophoresis*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1972. **124**.
126. Meyers, J.A., Sanchez, D., Elwell, L.P., Falkow, S., *Simple Agarose-Gel Electrophoretic Method for Identification and Characterization of Plasmid Deoxyribonucleic-Acid*. Journal of Bacteriology, 1976. **127**(3): p. 1529-1537.
127. Adkins, S., Burmeister, M., *Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: Applications for preparative gels and educational demonstrations*. Analytical Biochemistry, 1996. **240**(1): p. 17-23.

128. Waring, M.J., *Complex Formation between Ethidium Bromide and Nucleic Acids*. Journal of Molecular Biology, 1965. **13**(1): p. 269-282.
129. Waring, M.J., *Structural Requirements for Binding of Ethidium to Nucleic Acids*. Biochimica Et Biophysica Acta, 1966. **114**(2): p. 234-244.
130. LePecq, J.B., Paoletti, C., *A Fluorescent Complex between Ethidium Bromide and Nucleic Acids - Physical-Chemical Characterization*. Journal of Molecular Biology, 1967. **27**(1): p. 87-106.
131. Verheggen, T., Mikkers, F.E.P., Everaerts, F.M., *Isotachophoresis in Narrow-Bore Tubes Influence of Diameter of Separation Compartment*. Journal of Chromatography, 1977. **132**(2): p. 205-215.
132. Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D., *Free-Zone Electrophoresis in Glass-Capillaries*. Clinical Chemistry, 1981. **27**(9): p. 1551-1553.
133. Harrison, D.J., Manz, A., Fan, Z.H., Ludi, H., Widmer, H.M., *Capillary Electrophoresis and Sample Injection Systems Integrated on a Planar Glass Chip*. Analytical Chemistry, 1992. **64**(17): p. 1926-1932.
134. Harrison, D.J., Fluri, K., Seiler, K., Fan, Z.H., Effenhauser, C.S., Manz, A., *Micro-machining a Miniaturized Capillary Electrophoresis-Based Chemical-Analysis System on a Chip*. Science, 1993. **261**(5123): p. 895-897.
135. Shi, Y.N., Simpson, P.C., Scherer, J.R., Wexler, D., Skibola, C., Smith, M.T., Mathies, R.A., *Radial capillary array electrophoresis microplate and scanner for high-performance nucleic acid analysis*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(23): p. 5354-5361.
136. Woolley, A.T., Sensabaugh, G.F., Mathies, R.A., *High-speed DNA genotyping using microfabricated capillary array electrophoresis chips*. Analytical Chemistry, 1997. **69**(11): p. 2181-2186.
137. Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F., Zeillinger, R., *Quantitative Detection of Reverse Transcriptase-PCR Products by Means of a Novel and Sensitive DNA Stain*. PCR-Methods and Applications, 1995. **4**(4): p. 234-238.
138. Förster, T., *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Annalen der Physik, 1948. **437**(1-2): p. 55-75.
139. Higgins, J.A., Nasarabadi, S., Karns, J.S., Shelton, D.R., Cooper, M., Gbakima, A., Koopman, R.P., *A handheld real time thermal cycler for bacterial pathogen detection*. Biosensors & Bioelectronics, 2003. **18**(9): p. 1115-1123.
140. Belgrader, P., Young, S., Yuan, B., Primeau, M., Christel, L.A., Pourahmadi, F., Northrup, M.A., *A battery-powered notebook thermal cycler for rapid multiplex real time PCR analysis*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(2): p. 286-289.
141. Namasivayam, V., Lin, R.S., Johnson, B., Brahmasandra, S., Razzacki, Z., Burke, D.T., Burns, M.A., *Advances in on-chip photodetection for applications in miniaturized genetic analysis systems*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2004. **14**(1): p. 81-90.

142. Taylor, T.B., WinnDeen, E.S., Picozza, E., Woudenberg, T.M., Albin, M., *Optimization of the performance of the polymerase chain reaction in silicon-based microstructures*. Nucleic Acids Research, 1997. **25**(15): p. 3164-3168.
143. Krishnan, M., Burke, D.T., Burns, M.A., *Polymerase chain reaction in high surface-to-volume ratio SiO<sub>2</sub> microstructures*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(22): p. 6588-6593.
144. Matsubara, Y., Kerman, K., Kobayashi, M., Yamamura, S., Morita, Y., Tamiya, E., *Microchamber array based DNA quantification and specific sequence detection from a single copy via PCR in nanoliter volumes*. Biosensors & Bioelectronics, 2005. **20**(8): p. 1482-1490.
145. Ibrahim, M.S., Lofts, R.S., Jahrling, P.B., Henchal, E.A., Weedn, V.W., Northrup, M.A., Belgrader, P., *Real-time microchip PCR for detecting single-base differences in viral and human DNA*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(9): p. 2013-2017.
146. Belgrader, P., Smith, J.K., Weedn, V.W., Northrup, M.A., *Rapid PCR for identity testing using a battery-powered miniature thermal cycler*. Journal of Forensic Sciences, 1998. **43**(2): p. 315-319.
147. Lin, Y.C., Li, M., Chung, M.T., Wu, C.Y., Young, K.C., *Real-time microchip polymerase-chain-reaction system*. Sensors and Materials, 2002. **14**(4): p. 199-208.
148. Gulliksen, A., Solli, L., Karlsen, F., Rogne, H., Hovig, E., Nordstrom, T., Sirevag, R., *Real-time nucleic acid sequence-based amplification in nanoliter volumes*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(1): p. 9-14.
149. Northrup, M.A., Bennett, B., Hadley, D., Landre, P., Lehew, S., Richards, J., Stratton, P., *A miniature analytical instrument for nucleic acids based on micromachined silicon reaction chambers*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(5): p. 918-922.
150. Fotin, A.V., Drobyshev, A.L., Proudnikov, D.Y., Perov, A.N., Mirzabekov, A.D., *Parallel thermodynamic analysis of duplexes on oligodeoxyribonucleotide microchips*. Nucleic Acids Research, 1998. **26**(6): p. 1515-1521.
151. Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O., *Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary-DNA Microarray*. Science, 1995. **270**(5235): p. 467-470.
152. Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P.O., Davis, R.W., *Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(20): p. 10614-10619.
153. Southern, E.M., *Detection of Specific Sequences among DNA Fragments Separated by Gel-Electrophoresis*. Journal of Molecular Biology, 1975. **98**(3): p. 503-517.
154. Wang, J., *From DNA biosensors to gene chips*. Nucleic Acids Research, 2000. **28**(16): p. 3011-3016.
155. Bier, F.F., Kleinjung, F., *Feature-size limitations of microarray technology - a critical review*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 2001. **371**(2): p. 151-156.

156. MacBeath, G., *Proteomics comes to the surface - Microarrays of purified proteins, representing most of the yeast genome, prove useful for studying protein function on a genome-wide scale*. *Nature Biotechnology*, 2001. **19**(9): p. 828-829.
157. Fodor, S.P.A., *DNA sequencing - Massively parallel genomics*. *Science*, 1997. **277**(5324): p. 393-395.
158. Ziauddin, J., Sabatini, D.M., *Microarrays of cells expressing defined cDNAs*. *Nature*, 2001. **411**(6833): p. 107-110.
159. Pirrung, M.C., *How to make a DNA chip*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2002. **41**(8): p. 1277-1289.
160. Ermantraut, E., Wohlfart, K., Tichelaar, W., *Perforated support foils with pre-defined hole size, shape and arrangement*. *Ultramicroscopy*, 1998. **74**(1-2): p. 75-81.
161. Lorkowski, S., Lorkowski, G., Cullen, P., *Biochips - Das Labor in der Streichholzschachtel*. *Chemie in Unserer Zeit*, 2000. **34**(6): p. 356-372.
162. Bae, J.W., Rhee, S.K., Park, J.R., Chung, W.H., Nam, Y.D., Lee, I., Kim, H., Park, Y.H., *Development and evaluation of genome-probing microarrays for monitoring lactic acid bacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005. **71**(12): p. 8825-8835.
163. Perreten, V., Vorlet-Fawer, L., Slickers, P., Ehricht, R., Kuhnert, P., Frey, J., *Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005. **43**(5): p. 2291-2302.
164. Peterlinz, K.A., Georgiadis, R.M., Herne, T.M., Tarlov, M.J., *Observation of hybridization and dehybridization of thiol-tethered DNA using two-color surface plasmon resonance spectroscopy*. *Journal of the American Chemical Society*, 1997. **119**(14): p. 3401-3402.
165. Thiel, A.J., Frutos, A.G., Jordan, C.E., Corn, R.M., Smith, L.M., *In situ surface plasmon resonance imaging detection of DNA hybridization to oligonucleotide arrays on gold surfaces*. *Analytical Chemistry*, 1997. **69**(24): p. 4948-4956.
166. Möller, R., Schüler, T., Gunther, S., Carlsohn, M.R., Munder, T., Fritzsche, W., *Electrical DNA-chip-based identification of different species of the genus *Kitasatospora**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008. **77**(5): p. 1181-1188.
167. Drummond, T.G., Hill, M.G., Barton, J.K., *Electrochemical DNA sensors*. *Nature Biotechnology*, 2003. **21**(10): p. 1192-1199.
168. Caro, H., *Zur Kenntnis der Oxidation aromatischer Amine*. *Angewandte Chemie*, 1898. **11**(36): p. 845-846.
169. Cho, Y.K., Lee, J.G., Park, J.M., Lee, B.S., Lee, Y., Ko, C., *One-step pathogen specific DNA extraction from whole blood on a centrifugal microfluidic device*. *Lab on a Chip*, 2007. **7**(5): p. 565-573.
170. Hatakeyama, K., Tanaka, T., Sawaguchi, M., Iwadate, A., Mizutani, Y., Sasaki, K., Tateishi, N., Matsunaga, T., *Microfluidic device using chemiluminescence and a DNA-*

- arrayed thin film transistor photosensor for single nucleotide polymorphism genotyping of PCR amplicons from whole blood.* Lab on a Chip, 2009. **9**(8): p. 1052-1058.
171. Wolff, A., Leiterer, C., Csaki, A., Fritzsche, W., *Dielectrophoretic manipulation of DNA in microelectrode gaps for single-molecule constructs.* Frontiers in Bioscience, 2008. **13**: p. 6834-6840.
172. Valero, A., Braschler, T., Demierre, N., Renaud, P., *A miniaturized continuous dielectrophoretic cell sorter and its applications.* Biomicrofluidics, 2010. **4**(2).
173. Judelson, H.S., Randall, T.A., *Families of repeated DNA in the oomycete Phytophthora infestans and their distribution within the genus.* Genome, 1998. **41**(4): p. 605-615.
174. Schüler, T., Nykytenko, A., Csaki, A., Möller, R., Fritzsche, W., Popp, J., *UV cross-linking of unmodified DNA on glass surfaces.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. **395**(4): p. 1097-1105.
175. Bilodeau, G.J., Levesque, C.A., de Cock, A., Duchaine, C., Briere, S., Uribe, P., Martin, F.N., Hamelin, R.C., *Molecular detection of Phytophthora ramorum by real-time polymerase chain reaction using TaqMan, SYBR Green, and molecular beacons.* Phytopathology, 2007. **97**(5): p. 632-642.
176. Wilding, P., Shoffner, M.A., Kricka, L.J., *PCR in a Silicon Microstructure.* Clinical Chemistry, 1994. **40**(9): p. 1815-1818.
177. Lund-Olesen, T., Dufva, M., Dahl, J.A., Collas, P., Hansen, M.F., *Sensitive on-chip quantitative real-time PCR performed on an adaptable and robust platform.* Biomedical Microdevices, 2008. **10**(6): p. 769-776.
178. Guttenberg, Z., Müller, H., Habermüller, H., Geisbauer, A., Pipper, J., Felbel, J., Kielpinski, M., Scriba, J., Wixforth, A., *Planar chip device for PCR and hybridization with surface acoustic wave pump.* Lab on a Chip, 2005. **5**(3): p. 308-317.
179. Schena, L., Hughes, K.J.D., Cooke, D.E.L., *Detection and quantification of Phytophthora ramorum, P. kernoviae, P. citricola and P. quercina in symptomatic leaves by multiplex real-time PCR.* Molecular Plant Pathology, 2006. **7**(5): p. 365-379.
180. Wixforth, A., Strobl, C., Gauer, C., Toegl, A., Scriba, J., von Guttenberg, Z., *Acoustic manipulation of small droplets.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004. **379**(7-8): p. 982-991.
181. Renaudin, A., Sozanski, J.P., Verbeke, B., Zhang, V., Tabourier, P., Druon, C., *Monitoring SAW-actuated microdroplets in view of biological applications.* Sensors and Actuators B-Chemical, 2009. **138**(1): p. 374-382.
182. Focke, M., Stumpf, F., Roth, G., Zengerle, R., von Stetten, F., *Centrifugal microfluidic system for primary amplification and secondary real-time PCR.* Lab on a Chip, 2010. **10**(23): p. 3210-3212.
183. Gorkin, R., Park, J., Siegrist, J., Amasia, M., Lee, B.S., Park, J.-M., Kim, J., Kim, H., Madou, M., Cho, Y.-K., *Centrifugal microfluidics for biomedical applications.* Lab Chip, 2010. **10**(14): p. 1758-1773

184. Wittwer, C.T., Reed, G.H., Gundry, C.N., Vandersteen, J.G., Pryor, R.J., *High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen*. *Clinical Chemistry*, 2003. **49**(6): p. 853-860.
185. Liew, M., Pryor, R., Palais, R., Meadows, C., Erali, M., Lyon, E., Wittwer, C., *Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons*. *Clinical Chemistry*, 2004. **50**(7): p. 1156-1164.
186. Reed, G.H., Kent, J.O., Wittwer, C.T., *High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics*. *Pharmacogenomics*, 2007. **8**(6): p. 597-608.
187. Tucker, C.M., Milbrath, J.A., *Root rot of Chamaecyparis caused by a species of Phytophthora*. *Mycologia*, 1942. **34**(1): p. 94-103.
188. Jung, T., Burgess, T.I., *Re-evaluation of Phytophthora citricola isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, Phytophthora plurivora sp nov.* *Persoonia*, 2009. **22**: p. 95-110.
189. Brasier, C.M., Rose, J., Gibbs, J.N., *An unusual phytophthora associated with widespread alder mortality in Britain*. *Plant Pathology*, 1995. **44**(6): p. 999-1007.
190. Brasier, C.M., Beales, P.A., Kirk, S.A., Denman, S., Rose, J., *Phytophthora kernoviae sp nov., an invasive pathogen causing bleeding stem lesions on forest trees and foliar necrosis of ornamentals in the UK*. *Mycological Research*, 2005. **109**: p. 853-859.

## 7.2 Quellenverzeichnis

Alle angegebenen Quellen wurden am 28.03.2011 auf ihre Aktualität überprüft.

- Q 1 [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d8/Blood-brain\\_barrier\\_02.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d8/Blood-brain_barrier_02.png)
- Q 2 <http://www.sciencellonline.com/site/products/1000.php>
- Q 3 <http://legacy.lclark.edu/faculty/florance>
- Q 4 <http://apps.rhs.org.uk/advice/search/profile.aspx?pid=244>
- Q 5 <http://visualsunlimited.photoshelter.com/image/I000OSHqA8gz0rNw>
- Q 6 [http://www.derkleingarten.de/800\\_lexikon/822\\_gehoelze\\_straecher/rhododendron-krankheiten-pilzbefall-htm](http://www.derkleingarten.de/800_lexikon/822_gehoelze_straecher/rhododendron-krankheiten-pilzbefall-htm)
- Q 7 <https://thescientistgardener.blogspot.com/2009/07/outbreak-of-potatoe-famine-pathogen.html>
- Q 8 <http://genome.jgi-psf.org/PhycalF7.home.html>
- Q 9 <http://www.kapillarelektrophorese.de/Capillary%20Electrophoresis.htm>
- Q 10 <http://www1.tu-darmstadt.de/fb/ch/Fachgebiete/BC/AKDencher/praktikum/ligandenbindung.pdf>
- Q 11 <http://www.rzuser.uni-heidelberg.de/~ltemgoua/chemie/Desoxyribonukleinsaeure.html>
- Q 12 [http://biophp.org/minitools/melting\\_temperature/demo.php?formula=basic](http://biophp.org/minitools/melting_temperature/demo.php?formula=basic)
- Q 13 <http://de.wikipedia.org/wiki/F%C3%B6rster-Radius>
- Q 14 <http://www.tciamerica.com/catalog/D0358.html>
- Q 15 [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/17/Teflon\\_structure.PNG](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/17/Teflon_structure.PNG)
- Q 16 <http://www.asiasilicones.com/silanes/G11%20%5B2530-83-8%5D.html>
- Q 17 <http://www.aura-optik.de/aureka-R.66.0.html>
- Q 18 [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c9/SYBR\\_Green\\_I.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c9/SYBR_Green_I.png)
- Q 19 [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/28/SYBR\\_Green\\_I\\_spectra.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/28/SYBR_Green_I_spectra.png)
- Q 20 <http://probes.invitrogen.com/media/structure/965.jpg>
- Q 21 <http://probes.invitrogen.com/media/spectra/1359ph9.jpg>
- Q 22 <http://probes.invitrogen.com/media/structure/2022.jpg>
- Q 23 <http://probes.invitrogen.com/media/spectra/6121ph7.jpg>
- Q 24 <http://www.elektronik-kompendium.de/sites/grd/0201115.htm>
- Q 25 <http://www.elektronik-kompendium.de/sites/grd/0201112.htm>

Q 26 [http://www.advalytix.com/advalytix/microfluidic\\_transport\\_345.htm](http://www.advalytix.com/advalytix/microfluidic_transport_345.htm)

Q 27 <http://www.finnzymes.com/directpcr/>

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
BSA	Rinderserumalbumin oder fetales Kälberserum (engl. <i>bovine serum albumine</i> )
bp	Basenpaar (engl. <i>base pair</i> )
C	Cytosin
CaCl	Calciumchlorid
CCD	ladungsgekoppeltes Bauteil (engl. <i>charged-coupled device</i> )
cm	Zentimeter
c <sub>t</sub>	Schwellenwert, bei Real-Time PCR im Übergangsbereich der Kurve in die exponentielle Phase (engl. <i>critical threshold</i> )
DEP	Dielektrophorese
DEPC	Diethylpyrokcarbonat
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> )
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
engl.	englisch
EPPO	Pflanzenschutzorganisation für Europa und den Mittelmeerraum (engl. <i>European and Mediterranean Plant Protection Organization</i> )
et al.	und andere (lat. <i>et alii, et aliae</i> )
ETS	Abschnitt einer Transkriptionseinheit der ribosomalen DNA (engl. <i>external transcribed spacer</i> )
FAM	Carboxyfluoreszein
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
GOPS	Glycidoxytrimethoxypropylsilan
HBME	Humane Hirn-Endothelzellen (engl. <i>human brain microvascular endothelial cells</i> )
HCl	Salzsäure
ITS	Abschnitt einer Transkriptionseinheit der ribosomalen DNA (engl. <i>internal transcribed spacer</i> )
KCl	Kaliumchlorid

---

lat.	lateinisch
LED	Leuchtdiode (engl. <i>light-emitting diode</i> )
mm	Millimeter
nm	Nanometer
NTS	Abschnitt einer Transkriptionseinheit der ribosomalen DNA (engl. <i>non-transcribed spacer</i> )
P.	<i>Phytophthora</i>
p53	Protein 53
Pa	Pascal
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PDMS	Polydimethylsiloxan
Pt	Platin
PTFE	Polytetrafluorethylen
Py.	<i>Pythium</i>
R	Widerstand
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
rDNA	ribosomale DNA
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
RPL13A	Ribosomales Protein L13A
s	Sekunde
S	Siemens
SAW	Akustische Oberflächenwelle (engl. <i>surface acoustic wave</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SiON	Siliziumoxynitrid (Mischung aus Siliziumoxid und Siliziumnitrid)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i> )
SSC	Natriumchlorid-haltiges Natriumcitrat (engl. <i>saline-sodium citrate</i> )
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamin
TE	Tris-Hypochlorid-EDTA
T <sub>m</sub>	mittlere Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute

---

UV	Ultraviolettstrahlung
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
°C	Grad Celsius
Θ	Kontaktwinkel
μTAS	(engl. <i>mikro total analysis system</i> )

## 7.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei PD Dr. Wolfgang Fritzsche und Prof. Jürgen Popp für die Betreuung bedanken. Bei Prof. Popp bedanke ich mich auch für die entgegengebrachte Unterstützung, um an der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der Friedrich-Schiller Universität Jena promovieren zu können. Weiterhin bedanke ich mich für die Betreuung und das Korrekturlesen durch Dr. Ivonne Bieber, Dr. Thomas Henkel sowie Dr. Robert Möller.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Jana Felbel für ihren Einsatz, mich als Doktorandin am IPHT zu beschäftigen und mir dadurch die Promotion überhaupt zu ermöglichen.

Für technische Zuarbeiten im Bereich Chip-Design, Fluidik, Elektronik, Regelungstechnik und Software möchte ich mich bei Mark Kielpinski, Robert Kretschmer und Matthias Urban bedanken. Margitta Sossna, Andreas Ihring, Horst Prowol, Denise Horn und Katrin Kandra danke ich für die geleisteten Zuarbeiten bei der Herstellung und Oberflächenaktivierung mikrostrukturierter Chips im Reinraum. Außerdem möchte ich mich bei Jens Albert für das Vereinzeln der Chips sowie bei Anja Schumann für die Applikation der Bonddrähte bedanken. Für die Einführung in den Silanisierungsprozess sowie die Beantwortung zahlreicher Fragen im Bereich der Mikroarray-Technologie möchte ich mich bei Dr. Thomas Schüler bedanken.

Mein Dank gilt ebenfalls Dr. Stefan Wagner, Dr. Sabine Werres und Anne Haverlah vom Julius-Kühn-Institut in Braunschweig sowie Dr. Marko Riedel für die Bereitstellung der *Phytophthora*-Proben, Ermittlung der Sequenzabschnitte für den Nachweis der verschiedenen *Phytophthora*-Arten, Beantwortung meiner Fragen auf dem interessanten Gebiet der Phytopathologie sowie die Unterstützung beim Projektmanagement.

Dr. Joachim Clement vom Forschungszentrum Lobeda sowie Susanne Grimm und Franziska Bähring danke ich für die Kooperation bei der Untersuchung der HBME-Zellen. Für die Möglichkeit zur Durchführung der Einzelzell-Manipulation möchte ich mich bei Dr. Ute Müller und Dr. Roland Kilper von der Firma aura optik bedanken.

Cornelia Arnold danke ich für die Unterstützung bei den Versuchen zur Dielektrophorese. Bei Matthias Thiele möchte ich mich für den Zusammenbau der Baugruppe des neuen Lab-on-a-Chip System sowie die Assitenz bei Untersuchungen zum thermischen Managamet und Hybridisierungsexperimenten mit diesem System bedanken. Andreas Kopski danke für die Unterstützung bei einigen Versuchen zur zeitlichen Protokoll-

optimierung sowie zur Untersuchung verschiedener Präparationstechniken für die Mikroarrays.

Für die Beschaffung einiger, wissenschaftlicher Artikel möchte ich mich bei Benita Göbel bedanken.

Bei allen Mitgliedern des Büros möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Anett Reichert danke ich außerdem für die Unterstützung im Labor bei einigen Versuchen und der Betreuung studentischer Praktika sowie für die zahlreichen, angenehmen, aufbauenden und klärenden Gespräche.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Nanobiophotonik und Mikrofluidik sowie der Jenaer Biochip Initiative danke ich für das gute Arbeitsklima.

Bei meinem Freund Dr. Andreas Wolff möchte ich mich für das Korrekturlesen sowie ganz besonders die moralische Unterstützung während dieser nicht immer leichten Zeit bedanken.

Auch bei meinen Eltern möchte ich mich für die ebenfalls moralische sowie finanzielle Unterstützung im gesamten Verlauf meiner akademischen Ausbildung bedanken.

## 7.5 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Jena, 05.09.2011

Ort, Datum

Sandra Julich

Unterschrift der Verfasserin

## 7.6 Wissenschaftliche Beiträge und Publikationen

### Artikel:

S. Julich, M. Riedel, M. Kielpinski, M. Urban, R. Kretschmer, S. Wagner, W. Fritzsche, T. Henkel, R. Möller, S. Werres, *DNA amplification and microarray analysis for diagnosis of plant pathogens using an integrated lab-on-a-chip device*. Biosensors and Bioelectronics, in press

### Buchkapitel:

S. Julich, M. Kielpinski, M. Urban, T. Henkel, M. Riedel, S. Werres, S. Wagner, R. Möller, W. Fritzsche, *Chip systems for analysis of nucleic acids with integrated amplification and detection*, Optical Nano- and Microsystems for Bioanalytics, Herausgeber: Wolfgang Fritzsche und Jürgen Popp, Springer Verlag Berlin Heidelberg, akzeptiert

### Vorträge:

S. Julich, M. Riedel, *Nanobiotechnologische Detektion von Phytophthora-Arten mittels elektrisch auslesbarer DNA-Biochips*, Innovationstage 2010 der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, 06.10.-07.10.2010, Berlin

S. Julich, M. Urban, M. Kielpinski, R. Kretschmer, M. Riedel, S. Wagner, R. Möller, S. Werres, W. Fritzsche, T. Henkel, *Lab-on-a-Chip System zur elektrischen Phytophthora-Detektion mit integrierter PCR-Mikrokammer und DNA-Mikroarray*, 15. Heiligenstädter Kolloquium - Technische Systeme für die Lebenswissenschaften, 27.09.-29.09.2010, Heilbad Heiligenstadt

S. Julich, A. Kopielski, M. Urban, M. Kielpinski, R. Kretschmer, M. Riedel, S. Wagner, R. Möller, S. Werres, W. Fritzsche, T. Henkel, *Lab-on-a-chip-system for electrical Phytophthora detection with integrated PCR microchamber and microarray*, 12th Status Seminar Chip Technologies - Sequencing and Functional Genomics, 04.02.-05.02.2010, Frankfurt am Main

S. Julich, M. Kielpinski, M. Urban, R. Möller, W. Fritzsche, T. Henkel, *Stationary PCR-chip technology and combination with DNA-microarray for electrical readout*, Workshop Droplet-based microfluidics for high-throughput applications in life science, 13.11.-14.11.2008, Jena

S. Julich, A. Reichert, M. Kielpinski, M. Urban, R. Möller, J. Weber, J. Felbel, T. Henkel, *Integration von on-Chip-PCR und DNA-Mikroarray-Technologie für die schnelle DNA-Analytik*, 14. Heiligenstädter Kolloquium - Technische Systeme für die Lebenswissenschaften, 22.09.-24.09.2008, Heilbad Heiligenstadt

S. Julich, A. Reichert, M. Kielpinski, M. Urban, R. Möller, J. Weber, J. Felbel, T. Henkel, *On-Chip PCR: Technology and Prospects*, 4. Workshop Chemische und biologische Mikrolabortechnik, 26.02.-28.02.2008, Ilmenau Elgersburg

C. Arnold, C. Leiterer, M. Urban, S. Julich, S. Stanca, J. Wirth, F. Garwe, A. Csáki, W. Fritzsche, *Dielectrophoresis and plasmonic nanoparticles for single cell characterization and manipulation*, 7th Münster Conference on Single Cell and Molecule Analysis, 03.11.-04.11.2010, Münster

M. Riedel, S. Julich, R. Möller, J. Felbel, S. Wagner, A. Breitenstein, S. Werres, *Nanobiotechnology for Phytophthora Diagnosis*, 9th International Congress of Plant Pathology, 24.08.-29.08.2008, Turin

M. Riedel, S. Julich, S. Wagner, R. Möller, W. Fritzsche, S. Werres, T. Henkel, A. Breitenstein, *Nanobiotechnologische Detektion von Phytophthora-Arten mittels elektrisch auslesbaren DNA-Chips*, Innovationstage 2008 der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, 15.04.-16.04.2008, Bonn

### **Posterpräsentationen:**

S. Julich, A. Kopylski, M. Urban, M. Kielpinski, R. Kretschmer, M. Riedel, S. Wagner, R. Möller, S. Werres, W. Fritzsche, T. Henkel, *Lab-on-a-chip-system for electrical Phytophthora detection with integrated PCR microchamber and DNA microarray*, International Symposium DNA-Based MikroNano Integration, 27.05.-29.05.2010, Jena

S. Julich, M. Kielpinski, M. Urban, M. Riedel, S. Werres, W. Fritzsche, R. Möller, T. Henkel, *PCR and microarray chip technologies for Phytophthora diagnosis*, qPCR 2009, 09.03.-13.03.2009, Freising-Weihenstephan

S. Julich, M. Urban, M. Kielpinski, S. Werres, R. Möller, W. Fritzsche, T. Henkel, *On-chip-PCR and integration with DNA-microarray technology for fast DNA-analysis*, 11th Status Seminar Chip-Technologies, 05.03.-06.03.2009, Frankfurt am Main

S. Julich, M. Kielpinski, M. Urban, R. Möller, W. Fritzsche, T. Henkel, *Stationary PCR-chip technology and possibilities for chip-based detection of amplified nucleic acids*, Workshop Droplet-based microfluidics for high-throughput applications in life science, 13.11.-14.11.2008, Jena

S. Julich, J. Felbel, R. Möller, T. Henkel, W. Fritzsche, *Integration of on-Chip PCR with Array Technology*, 4. Workshop Chemische und biologische Mikrolabortechnik, 26.02.-28.02.2008, Ilmenau Elgersburg

S. Glathe, J. Beinersdorf, R. Müller, S. Julich, T. Henkel, U. Hübner, R. Mattheis, *Real time observation of magnetic nanobead transportation using domain walls in ferromagnetic nanostripes*, DPG-Frühjahrstagung 2011, 13.03-18.03.2011, Dresden

E. Heinrich, S. Julich, F. Bähring, M. Kielpinski, M. Urban, T. Henkel, *On-Chip-PCR – Technologien und Anwendungen*, Mikrosystemtechnik-Kongress 2009, 12.10.-14.10.2009, Berlin

M. Riedel, S. Julich, M. Kielpinski, R. Möller, W. Fritzsche, S. Wagner, T. Henkel, A. Breitenstein, S. Werres, *Chip-Based On-Site Diagnosis of Phytophthora ramorum*, Sudden Oak Death Fourth Science Symposium, 15.06.-18.06.2009, Santa Cruz

M. Riedel, S. Julich, R. Möller, J. Felbel, S. Wagner, S. Werres, *Entwicklung einer Chip-basierenden Technologie zur Identifizierung von Phytophthora-Arten*, 56. Deutsche Pflanzenschutztagung, 22.09.-25.09.2008, Kiel

A. Brinker, B. Seise, T. Schüler, S. Julich, R. Möller, *Chipbasiertes Detektionssystem für den Nachweis von Tierseuchen*, Workshop Forschung für die zivile Sicherheit - Detektionssysteme für CBRNE Gefahrstoffe, 09.09.2008, Karlsruhe

M. Riedel, S. Julich, R. Möller, J. Felbel, S. Wagner, A. Breitenstein, S. Werres, *Can nanobiotechnology help in routine diagnosis to determine *Phytophthora* species?*, 9th International Congress of Plant Pathology, 24.08.-29.08.2008, Turin

J. Felbel, S. Julich, M. Urban, M. Kielpinski, S. Werres, R. Möller, W. Fritzsche, T. Henkel, *Biochip systems for plant pathogen diagnostic*, 10th Status Seminar Chip Technologies, 04.02.-05.02.2008, Frankfurt am Main

J. Felbel, S. Julich, A. Reichert, M. Kielpinski, M. Urban, T. Henkel, *Real-Time PCR auf stationären Chipthermocyclern*, Mikrosystemtechnik-Kongress 2007, 15.10.-17.10.2007, Dresden

## 7.7 Lebenslauf

### Persönliche Angaben:

Name: Julich  
Vorname: Sandra  
Geburtsdatum: 21.11.1983  
Geburtsort: Nordhausen  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schule:

08/1990-07/1994 Grundschule am Marienwäldchen  
08/1994-06/2002 Otto-Schott-Gymnasium Jena, Abschluss: Abitur

### Praktika:

07/2001-07/2001 Praktikum am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
04/2002-05/2002 Praktikum bei der medtrans GmbH Jena  
06/2002-08/2002 Praktikum bei der biomedical Apherese Systeme GmbH Jena  
06/2005-12/2005 Praktikum am Institut für Photonische Technologien Jena, Arbeitsgruppe Mikrofluidik

### Studium:

10/2002-06/2007 Studium der Pharma-Biotechnologie an der Fachhochschule Jena, Abschluss: Diplom-Ingenieurin (FH)  
12/2005-06/2007 Diplomarbeit angefertigt am Institut für Photonische Technologien Jena, Arbeitsgruppe Mikrofluidik

### Auslandsaufenthalt:

04/2010 Forschungsaufenthalt an der University of California, San Diego, Arbeitsgruppe Nanotechnology

### Berufliche Erfahrung:

07/2007-04/2011 Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Doktorandin am Institut für Photonische Technologien Jena, Arbeitsgruppe Nanobiophotonik

*Sandra Julich*