

4. Diskussion

4.1 Allgemein

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das einen neuartigen Biochip zu entwerfen. Dieser Chip sollte nach einem vollständig neuen Konzept entwickelt werden. Dieses Konzept sah eine Vielzahl von Einzelreaktion vor. Hierzu war es notwendig, die Einzelschritte zu realisieren und zu optimieren.

Eine Grundvoraussetzung bestand darin, einen Chip zu entwerfen, der in der Lage ist sich durch Kapillarkräfte selbstständig zu befüllen. Die eigenständige Befüllung eines Chips hat einen entscheidenden Vorteil gegenüber konventionellem Tropfverfahren (Spotting) oder der Synthese über fotolithografische Verfahren. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei dem Spotting oder der Fotolithografie ist das Beladen des Chips. Dies wird mit zunehmender Probenzahl immer deutlicher. Darüber hinaus ist zum heutigen Zeitpunkt die Probendichte mit dem erwähnten Spottingverfahren begrenzt. Eine Alternative zu dem Spottingverfahren sind die über Fotolithografische Verfahren hergestellten Chips der Firma Affimetrix. Diese wurden schon in der Einleitung erwähnt. Mit diesem Verfahren können allerdings keine vollständigen Gene an die Oberfläche gebracht werden, sondern nur Oligonukleotide. Die Befüllung über Kapillarkräfte ist wesentlich schneller und mit weniger Kosten verbunden. Es sind keine Roboter nötig, die für das Beladen von konventionellen Chips verwendet werden.

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Verfahren kann eine sehr hohe Probendichte erreicht werden. Die Probendichte ist hierbei abhängig von der Größe der Reaktionsräume. Darüber hinaus hatte der hier verwendete Chip nur eine Fläche, die ein Drittel eines Objektträgers entsprach.

Der Chip, der in dieser Arbeit verwendet wurde, wurde durch eine Ätztechnik hergestellt. Dabei wirkte die verwendete Flusssäure nicht nur von einer Seite, sondern beidseitig. Dies führte dazu, dass keine Kavitäten wie bei Leamon (Leamon *et al.*, 2003) sondern Kapillaren entstanden. Diese Kapillaren ähneln der Form einer Sanduhr und nicht einem idealen Zylinder. Das Aspektverhältnis zwischen Durchmesser und Länge der Kapillare ist hier von entscheidender Bedeutung, wie im Ergebnisteil gezeigt werden konnte. Der Chip der ersten Generation, mit gebohrten Reaktionsräumen, wies ein ungünstiges Verhältnis auf. Aus diesem Grund blieb die eigenständige Befüllung der Kapillaren aus. In diesem Chip lag das Verhältnis Durchmesser zu Länge etwa bei eins zu eins. Durch Verkleinerung des Durchmessers wurde die selbstständige

4. Diskussion

Befüllung der Kapillaren erreicht, welche Grundvoraussetzung für das in dieser Arbeit dargestellte Konzept war. In der momentanen Form weist der Chip ein Aspektverhältnis von eins zu fünf auf und hat einen Kapillardurchmesser von 100 µm. Für zukünftige Formate ist eine weitere Verkleinerung angedacht. Das ausgewählte Herstellungsverfahren bietet auch das Potenzial noch kleinere Kapillardurchmesser zu generieren und dadurch die Probenfläche noch weiter zu erhöhen. Des Weiteren ist die Erhöhung der Probenzahl dadurch zu erreichen, indem man die Größe des Chips an einen Objektträger anpasst und dadurch die dreifache Probenzahl auftragen kann.

4.2 Abdichtung des Chips

Das Konzept des Chips, wie es im Ergebnissteil beschrieben wurde, beinhaltet die Amplifikation von Nukleinsäuren. Bei diesem Schritt wurde die Polymerasekettenreaktion verwendet. Bei der Polymerasekettenreaktion werden Temperaturen von bis zu 95 °C benötigt. Das in dem Chip verwendete kleine Volumen in Verbindung mit diesen hohen Temperaturen führt zu einer sehr schnellen Verdunstung. Die PCR reagiert sehr empfindlich auf die Veränderung der Konzentration der beteiligten Komponenten. Bei einer Verdunstung würde es zum Beispiel zu einer Erhöhung der Magnesiumionenkonzentration kommen, was sich inhibiert auf die PCR auswirken würde. Wahrscheinlicher ist allerdings die vollständige Verdunstung des Wassers, wodurch ebenfalls keine Reaktion mehr stattfinden könnte.

Um dies zu vermeiden, wurden verschiedene Möglichkeiten getestet, die im Chip enthaltenen Kapillaren gasdicht zu bekommen. Eine Möglichkeit der Abdichtung bestand in der Verwendung von Klebefolien, die allerdings eine Eigenfluoreszenz aufwiesen. Folien, die für die quantitative PCR eingesetzt werden können, sollten keine Eigenfluoreszenz aufweisen. Das größere Problem bestand in der inhibitorischen Wirkung der verwendeten Folien. Dies lässt sich wahrscheinlich durch den verwendeten Kleber der Folien erklären. Bei einer sachgerechten Verwendung für PCR-Platten kommt es nicht zu einem Kontakt der Flüssigkeit mit der Klebefolie, bei den verwendeten Chips allerdings schon. So könnte der Kleber in die Reaktion gelangen und diese inhibieren. Des Weiteren gestaltete sich das Entfernen der Folie sehr schwierig, was dazu führte, dass einige Chips dabei zerstört wurden. Aufgrund der inhibitorischen Wirkung und der Probleme des Entferns der Folie wurden diese nicht weiter verwendet.

Die Verwendung von Kleberahmen, die normalerweise für die *in situ*-PCR verwendet werden, stellte sich ebenfalls als problematisch heraus. Hierbei zeigte sich, dass durch den verwendeten Rahmen ein Raum ober- und unterhalb des Chips entstand, welcher ein zu großes Volumen aufwies. Durch die hohen Temperaturen über einen längeren Zeitraum war eine vollständige

4. Diskussion

Verdunstung der Proben zu beobachten. Hierdurch konnte auch ein Vermischen der Proben untereinander nicht ausgeschlossen werden, was für die Umsetzung des Konzeptes des Chips entscheidend war. Daher wurde der Ansatz mit den Kleberahmen für die *in situ* PCR nicht weiter verfolgt. Aus diesen Experimenten ging allerdings hervor, dass wahrscheinlich ein geringeres Volumen ober- und unterhalb des Chips zu einer Abdichtung geführt hätte. Es wurde nach ähnlichen Materialien wie diesen Kleberahmen gesucht und einige weitere allerdings ohne Kleber getestet. Hierbei wurde vermutet, dass bei der Verwendung einer silikonisierten Folie, diese eine Art von Dichtung ausbilden könnte. Dies konnte auch nicht bestätigt werden.

Bei der erfolgreichen Abdichtung mit Öl stellte sich zum einen die Frage nach einer geeigneten Reaktionskammer. Die meisten Blöcke, für die *in situ*-PCR haben eine glatte Oberfläche, auf die ein Objektträger aufgelegt wird. Dies in Verbindung mit dem Versuch der Ölabdichtung würde dazu führen, dass das Öl aus dem Block in das Innere der PCR-Maschine gelangen würde, was wahrscheinlich zu einem Defekt der Maschine führen würde. Eine Möglichkeit bestand darin eine Kammer herzustellen, die auf den Block der PCR-Maschine aufgesetzt wird. Dieses würde ein abgeschlossenes System darstellen. Hierfür wurde eine Kammer verwendet, die aus einem Aluminiumblock gefräst wurde. Die Kammer stellte dann zusätzliches Material dar, was erwärmt und gekühlt werden musste, was die Temperaturregulierung der PCR deutlich erschwerte. Nachdem BioRad (Deutschland) einen Aufsatz für einen PCR-Block auf den Markt brachte, schienen diese Probleme gelöst zu sein. Bei diesem Block handelte es sich um einen Aufsatz für die PTC 100 Mj Research der für die Verwendung mit Öl geeignet war.

Die Abdichtung mit Öl hatte noch einen weiteren Vorteil. Nach der Herausnahme des Chips aus dem Ölbad blieb ein Ölfilm auf dem Chip erhalten. Durch diesen Ölfilm wurde eine Verdunstung bei der anschließenden Mikromanipulation während der Herausnahme der Proben aus den einzelnen Kapillaren verhindert.

4.3 Probenrückgewinnung

Die Wiedergewinnung des Probenmaterials aus den Kapillaren war ein wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Dies war notwendig um die Analyse von Kleinstvolumina mithilfe von Standardanalyseverfahren zu realisieren. Die ersten Ansätze, bei denen versucht wurde, die Proben mithilfe von Zentrifugalkraft aus dem Chip zu entfernen lieferten keine positiven Resultate. Hierbei zeigte sich, wie stark das Rückhaltevermögen der Kapillaren war. Dieses würde mit einer weiteren Miniaturisierung der Reaktionsräume noch weiter ansteigen und somit wäre

4. Diskussion

die Zentrifugation perspektivisch keine geeignete Lösung. Es mussten alternative Methoden gefunden werden.

Die zweite Möglichkeit, die in Betracht gezogen wurde, war das Raussaugen der Flüssigkeit aus dem Chip. Es konnte beobachtet werden, dass man den Chip gut mit wässrigen Lösungen spülen konnte. Daraus entwickelte sich der Gedanke, dass man die Nukleinsäuren, welche sich in den Kapillaren befanden, auch durch eine Membran zurückhalten könnte. Die Abtrennung über die Größe konnte dabei nicht realisiert werden, da eine dafür geeignete Membran sehr kleine Poren enthält. Diese kleinen Poren wurden sofort durch das noch vorhandenen Öl verstopft. Die Verwendung von anderen Membranen brachte ebenfalls nicht den erwünschten Erfolg.

Aus den vorangegangenen Experimenten war ersichtlich, dass man die Proben mithilfe von Unterdruck und durch Spülen zurückgewinnen konnte. Diese lagen dann in einem großen Volumen vor. Durch Modifikation der Absaugvorrichtung konnte das Volumen schon reduziert werden. Für eine weitere Reduktion standen Standardmethoden zur Verfügung. Die hier entwickelte Methode wurde ausschließlich für die Optimierung der Reaktionen im Chip benötigt und ist nicht für eine spätere Anwendung gedacht.

Um auch den Inhalt der einzelnen Kapillare untersuchen zu können, wurden Methoden aus der Zellkulturtechnik abgewandelt. Die Modifizierung der kommerziell erhältlichen Kapillaren war dabei ein wichtiger Schritt, um die Bindung der Nukleinsäuren an die Kapillaroberfläche zu verhindern.

4.4 Miniaturisierung

Mit der Verkleinerung der Reaktionsräume kommt es zu einer drastischen Zunahme des Oberflächen- zu Volumenverhältnis. Dies hat zur Folge das Oberflächeneffekte, die sonst zu vernachlässigen sind, eine entscheidende Bedeutung erlangt. Diese Entwicklung ist unabhängig von dem verwendeten Material. Es ist allerdings anzumerken, dass Materialien die eine inhibitorische Wirkung auf biochemische Reaktionen haben ab einem bestimmten Oberfläche- zu Volumenverhältnis wahrscheinlich nicht mehr eingesetzt werden können.

Inhibitorische Effekte von Silizium wurden schon an früherer Stelle in der Literatur beschrieben (Shoffner *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 2006b). In der Arbeit von Shoffer wurde auch gezeigt, dass eine SiO₂-Schicht auf einem Siliziumchip eine wesentlich bessere Amplifikation ermöglichte als ein reiner Siliziumchip. Dies würde dafür sprechen, dass das verwendete Glas keinen negativen Effekt hätte. Die Beobachtungen, die im Verlauf der PCR-Optimierung gesammelt werden konnten, widersprachen dem. Es wurde ein starker negativer Einfluss des Glases festgestellt.

4. Diskussion

Es konnte auf zwei verschiedenen Wegen die Interaktion zwischen Glas und der verwendeten Taq-Polymerase gezeigt werden. Der inhibitorische Effekt ließ sich durch Steigerung der Polymerasekonzentration um den Faktor 50 stark vermindern. Bei dieser Steigerung auf einen Wert von 0,5 U/ μ L konnte nahezu die gleiche DNA-Menge amplifiziert werden, wie bei einer Polymerasekonzentration von 0,01 U/ μ L, ohne dass Glas vorhanden war. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass die Polymerase an die Glasoberfläche bindet und daher nicht mehr für die PCR zur Verfügung stand. Um dies etwas genauer zu untersuchen, wurden weitere Experimente durchgeführt.

Bei dem zweiten Weg zur Klärung der Interaktion des Glases war, dass alle relevanten Substanzen vor der Reaktion mit Glas in Verbindung gebracht und erst danach zur PCR eingesetzt wurden. Auch hier zeigte die Probe, bei der die Polymerase mit Glas inkubiert wurde, eine stark verminderte Amplifikation aufwies. Abschließend blieb noch der Verdacht, dass die negativ geladenen Substanzen in einer PCR erst in Anwesenheit von Magnesiumionen an die durch die Silanolgruppen negativ geladene Glasoberfläche binden würden. Um dies zu klären, wurde ebenfalls mit dem Versuch der Präinkubation der Substanzen und Glas gezeigt, dass auch in der Anwesenheit von Magnesium die Polymerase eine Interaktion mit dem Glas eingeht.

4.5 Inaktivierung der Oberfläche

Es konnte gezeigt werden, dass die Taq-Polymerase eine Interaktion mit dem Glas eingeht und dadurch nicht mehr für die PCR zur Verfügung steht. Durch Erhöhung der Konzentration an Taq-Polymerase kommt es zur Absättigung der Oberfläche des Glases. Bei einer Erhöhung der Konzentration konnte auch in Anwesenheit von Glas eine Amplifikation erreicht werden. Bei höherer Konzentration an Taq-Polymerase kann sich allerdings das in dem Lagerungspuffer enthaltende Glycerin wieder inhibitorisch auf die PCR auswirken. Bei der Taq-Polymerase handelt es sich um die teuerste Komponente eines PCR-Ansatzes. Es sollte also vermieden werden, eine Absättigung mit der Taq-Polymerase durchzuführen.

Eine Alternative für die Absättigung bietet ein preiswertes Protein, das Rinderserum Albumin (BSA). Bei der Absättigung (Passivierung) wird zwischen einer dynamischen und einer statischen Absättigung unterschieden. Bei der statischen Passivierung wird das Glas zuvor mit einer Substanz wie zum Beispiel BSA beschichtet und erst anschließend zur PCR eingesetzt. Darüber hinaus werden zur statischen Passivierung häufig Silane eingesetzt, die kovalente Bindungen mit der Glasoberfläche ausbilden können.

4. Diskussion

Bei der dynamischen Passivierung werden Substanzen wie zum Beispiel BSA als Additiv zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben. Die Konzentration an BSA kann nicht beliebig hoch gewählt werden, da in einer zu hohen Konzentration auch das BSA störend wirkt. Hier besteht die Vermutung, dass das BSA bei höheren Temperaturen denaturiert und sich dann störend auf die Reaktion auswirken würde. Um dies zu vermeiden, könnte man eventuell Proteine aus thermostabilen Bakterien verwenden, die allerdings ähnliche Eigenschaften wie das BSA aufweisen müsste, was die Bindung an die Glasoberfläche und die Interaktion zu anderen Proteinen sowie Nukleinsäuren angeht.

Bei den Versuchen der Inaktivierung mit PVP konnte gezeigt werden, dass dieses gerade in höheren Konzentrationen einen positiven Einfluss auf die PCR in Anwesenheit von Glas aufwies. Auch das PVP darf nicht in einer zu hohen Konzentration eingesetzt werden. Dies zeigte sich an der inhibitorischen Wirkung des PVPs bei einer Konzentration von 5 % ohne die Anwesenheit von Glas. Da die Steigerung von PVP nicht so effektiv war wie die durch BSA sollte das PVP nicht als alleiniges Agens zur Passivierung eingesetzt werden. Um zu untersuchen, ob es synergetische Effekte zwischen PVP und BSA geben könnte, wurden die beiden Substanzen auch zusammen getestet. Diese Versuche zeigten keinen Erfolg sondern bestätigten nur, dass eine höhere Konzentration an PVP inhibitorisch wirkt. Daher wurde für die dynamische Passivierung nur BSA verwendet.

Neben der Verwendung von Substanzen, die die Oberfläche des Glases passivieren, wurden auch verschiedene PCR-Verstärker untersucht. Diese sollen sich gerade bei höherem GC-Gehalt der zu amplifizierenden DNA positiv auswirken. Die Verstärker der Firmen Qiagen und Invitrogen wurden untersucht. Daneben wurde noch ein Verstärker verwendet, dessen Hauptbestandteile Betaine, DMSO und DTT sind. Es konnte gezeigt werden, dass diese Verstärker einen positiven Einfluss auf die Amplifikation haben. Dies gilt sowohl für Reaktionen mit Glas als auch für solche, bei denen kein Glas vorhanden war. Es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass die Verwendung von BSA zu einer effizienteren Steigerung der Amplifikation führte.

Es wurden neben den hier beschriebenen dynamischen Methoden der Absättigung auch statische Methoden untersucht. Hierzu wurden die Chips mit verschiedenen Silanen behandelt. Es wurde sowohl ein hydrophobes (Dichlordimethylsilan), als auch ein hydrophiles Silan (3-Aminopropyltriethoxysilan) getestet. Das Dichlordimethylsilan wirkt stark hydrophob, was sich auch auf die Kapillarkräfte auswirkt. Chips, die mit diesem Silan behandelt wurden, ließen sich deutlich schwerer befüllen, was ebenfalls gezeigt werden konnte. Die Verwendung des Aminopropyltriethoxysilans führte zu einer hydrophilen Oberfläche, was die Befüllung eines solch Chips vereinfachte. Auf der anderen Seite können die durch das Silan angebrachten

Ladungen die DNA aus der Lösung entfernen. Dies könnte auch der Grund für die geringere Amplifikation im Vergleich zu dem mit Dichlordimethylsilan beschichtetem Glas sein. Zusätzlich zu den Beschichtungen wurden die beiden oben erwähnten Aditive im Zusammenhang mit den Beschichtungen getestet. Hierbei konnte die positive Wirkung des BSA bestätigt werden. Durch die Kombination einer dynamischen Passivierung mit BSA und statischen Passivierungen mit Dichlordimethylsilan konnten in Anwesenheit von Glas eine Amplifikation erreicht werden, die mit der Amplifikation ohne Glas vergleichbar war.

4.6 Chip-PCR

Mithilfe der Erkenntnisse aus der Optimierung der PCR mit Glas wurde die PCR im Chip durchgeführt. Diese Optimierung in Anwesenheit von Glas war wichtig, da mit steigendem Grad der Miniaturisierung die Oberfläche einen immer größer werdenden Einfluss bekommt.

In den ersten Versuchen erfolgte der Nachweis der Amplifikation über den Einbau von radioaktiv markiertem dCTP. Nachdem die Reaktion erfolgte, konnte der Inhalt des Chips zurückgewonnen werden und über eine Gelelektrophorese mit anschließender Autoradiografie die Spezifität der Amplifikation gezeigt werden. Dieser Nachweis wurde so bis lang noch nicht in der Literatur beschrieben. Es konnten durch diese Methode eindeutige Banden auf dem Agarosegel erzielt werden, wodurch gezeigt werden konnte, dass es sich bei den Amplifikaten um spezifische Produkte handelte.

Der Nachweis der PCR in einer einzelnen Kapillare konnte durch den Vergleich der Konzentrationen vor und nach einer Amplifikation im Chip erbracht werden. Hierbei wurde die quantitative PCR verwendet und eine deutliche Verschiebung der Ct-Werte beobachtet. Durch diese Versuche wurde ebenfalls die Möglichkeit einer zweiten Amplifikation nach einer PCR im Chip bewiesen. Die Verwendung von unterschiedlichen Verdünnungen der eingesetzten PCR zeigte eine Verschiebung von Ct-Werten, wie man sie aus der PCR in Standardreaktionsgefäßen kennt.

Die Verwendung der Phusion-Polymerase, die sich in anderen Reaktionen als sehr positiv erwiesen hatte, zeigt hier keine Verbesserung der Amplifikation. Bei der Phusion-Polymerase handelt es sich um eine Kombination von Polymerase und einem weiteren DNA-bindenden-Proteinen. Es scheint allerdings so, dass eventuell die zusätzlich vorhandene DNA bindende Domäne auch besser an das Glas gebunden hat, als dies bei der Taq-Polymerase der Fall war. Es konnte gezeigt werden, dass die sonst meist besser funktionierende Phusion-Polymerase eine geringere Amplifikation erzielte.

4.7 Herstellung der Fragmente für die PCR

Nachdem die Amplifikation im Chip gezeigt wurde, musste nach eine Strategie gesucht werden, um die Einzelmolekül-PCR nachzuweisen. Um die Amplifikation von Einzelmolekülen zu zeigen, sollten Fragmente mit unterschiedlicher Größe mit einem Primerpaar amplifiziert werden. Ein Gemisch aus Fragmenten unterschiedlicher Größe sollte dann in einer entsprechend hohen Verdünnung auf den Chip gegeben und vermehrt werden. Der Nachweis würde nach der Entnahme und einem weiteren Amplifikationsschritt über die Gelelektrophorese erfolgen. Wenn die Konzentration richtig eingestellt wurde, sollten Spuren ohne Amplifikaten und solche mit Amplifikaten unterschiedlicher Größe vorhanden sein. Doch schon bei der Herstellung der Fragmente für die Amplifikation im Chip zeigten sich Probleme. Es sollte durch die Ligation von Linkern amplifizierbare Fragmente entstehen. Hierbei wurde berücksichtigt, dass durch die Verwendung von gleichen Sequenzen auf beiden Seiten der Fragmente die Entstehung von Primer-Dimere verhindert werden kann (Brownie *et al.*, 1997). Durch diese Methode konnte keine zufriedenstellende Ausbeute der PCR-Produkte erreicht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von gleichen Sequenzen am 5'-und am 3'-Ende der zu amplifizierenden DNA einen negativen Einfluss auf die Amplifikation hat. Dieses Verhalten ist abhängig von der Konzentration der verwendeten Primer und der Länge der zwischen den Primern liegenden DNA. Da für den Beweis der Einzelmolekül-PCR kleine Fragmente verwendet werden sollten, wurde der Ansatz der Adaptor-PCR fallen gelassen.

Für die Herstellung von Fragmenten unterschiedlicher Größe wurde ein Ansatz gewählt, bei dem über Polymerasekettenreaktionen verschieden große Fragmente des YFP-Gens erzeugt wurden. Durch die angehängten Sequenzen konnten diese mit nur einem Primerpaar amplifiziert werden. Im Gegensatz zur Verwendung von nur einem Primer brachte diese Strategie eine hohe Konzentration von Amplifikaten hervor.

4.8 Einzelmolekül-PCR im Chip

Durch das von Mullis (Saiki *et al.*, 1985) entwickelte Verfahren sollte es möglich sein, aus einem einzigen DNA-Molekül eine Vielzahl des gleichen Moleküls herzustellen. Das kleine Volumen des Chips ist für die Amplifikation von Einzelmolekülen besser geeignet. Die Konzentration der DNA ist im Vergleich zu der in einem Standardreaktionsgefäß bei gleicher Molekülzahl wesentlich höher. Dass geringste Konzentrationen in einem mikrofluidischen System amplifizierbar sind wurde in der Literatur gezeigt (Liu *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wird von einer

4. Diskussion

Konzentration von 43 aM gesprochen. Eine solche Konzentration in einem Volumen von 4 nL, wie es in dem in dieser Arbeit verwendeten Chip vorzufinden ist, entspricht weit weniger als einem Molekül. Die Amplifikation von geringen DNA-Mengen konnte auch durch Dahl (Dahl *et al.*, 2007) gezeigt werden. Als geringste Menge an DNA wurden 20 Moleküle in einem Volumen von 200 nL verwendet. Würde man die gleiche Konzentration in den hier verwendeten Kapillarchip verwenden, wären es rechnerisch 0,4 Moleküle in einem Reaktionsraum. Aus diesen Arbeiten konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Amplifikation von Einzelmolekülen möglich sein sollte.

Für den Nachweis der Einzelmolekül-PCR wurden die Fragmente unterschiedlicher Größe in einem stöchiometrischen Verhältnis gemischt und anschließend im Chip amplifiziert. Es konnte ein Gelbild aufgenommen werden, welche Fragmente unterschiedlicher Größe zeigten. Es war auch zu erkennen, dass in einigen Fällen keine Amplifikation stattgefunden hat. Hier zeigte sich, dass bei einer statistischen Verteilung der Moleküle in dem Chip nicht jede Kapillare mit einem Molekül befüllt war. Bei einer optimalen Verteilung würde man erwarten, dass 33,3 % der Kapillaren mit weniger als einem Molekül, 33 % mit einem und weitere 33 % mit mehr als einem Molekül befüllt sind befüllt sind. In dem hier gezeigten Fall scheint die Verdünnung etwas zu groß gewählt zu sein, da die Anzahl der Spuren mit keiner Amplifikation mehr als 33 % ausmachen. Darüber hinaus sind weniger Spuren mit zwei unterschiedlichen Molekülen vorhanden. Die unterschiedlichen Intensitäten sind durch die Probenahme für die zweite PCR zu erklären. Es konnte nicht gewährleistet werden, dass immer das gleiche Volumen aus einem Reaktionsraum mit dem Mikromanipulator entnommen wurde.

4.9 Immobilisierung von Oligonukleotiden

Für die Realisierung der SIMPEX-Methode im Hochdurchsatzverfahren, wäre es sinnvoll, wenn die PCR-Produkte gereinigt werden könnten. Dafür ist die Kopplung der DNA-Fragmente an die Oberfläche für zukünftige Anwendung eine Voraussetzung. Hierdurch wäre es möglich, alle störenden Substanzen ohne den Verlust von Probenmaterial zu entfernen. Die Immobilisierung wäre möglich, wenn einer der benötigten Primer für die PCR an die Wand des Chips gekoppelt wäre und der andere sich in Lösung befände. Durch die PCR sollte dann das gebildete Produkt an der Wand immobilisiert sein. Der erste Schritt zu Immobilisierung war die Schaffung einer aktiven Glasoberfläche. Hierbei wurde eine geeignete Konzentration des ATS ermittelt.

Hierzu wurde die an die Glasoberfläche gebrachte Aminogruppe ausgenutzt und diese mit einem fluoreszenten Farbstoff umgesetzt. An den Nachweis der Silanisierung schloss sich die

4. Diskussion

Etablierung der Anbindung von Oligonukleotiden an. Nach einigen Vorversuchen zeigt sich, dass SIAB als geeigneter Quervernetzer. Dass eine Bindung von Oligonukleotiden an die Oberfläche realisiert werden konnte, wurde auf zwei verschiedene Wege gezeigt. Es konnte sowohl der radioaktive Nachweis auf einer Glasoberfläche als auch der Nachweis durch Immobilisierung von fluoreszenten Nukleinsäuren an den Chip gezeigt werden.

4.10 Festphasen PCR

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Immobilisierung an die Glasoberfläche möglich war, sollte untersucht werden, ob eine PCR mit diesen gebundenen Primern realisiert werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Amplifikation an der Wand einer Glasmikrokapillare gezeigt werden. Der Nachweis über die Amplifikation erfolgte über den Einbau von fluoreszenten Nukleotiden. Sterische Hinderungen, wie sie von Mercier (Mercier und Slater, 2005) vorhergesagt wurden, wurden nicht untersucht. Die in der Arbeit gezeigten Ergebnisse zeigen die Möglichkeit der Festphasen PCR an einer Glaswand.

4.11 Expression im Chip

Als letzter Teil dieser Arbeit wurde die Möglichkeit der *in vitro*-Proteinsynthese im Chip untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein auf *E.coli* basierendes System verwendet. Es handelte sich dabei um eine gekoppelte Transkription und Translation wie sie erstmal von Lederman (Lederman und Zubay, 1967) beschrieben wurde.

In der vorliegenden Arbeit ging es darum, die zellfreie Proteinsynthese in einem sehr kleinen Volumen zu zeigen. Dass eine Expression in einem Volumen von unter 1 μL möglich ist, wurde durch Angenendt (Angenendt *et al.*, 2004) gezeigt. Angenendt konnte auf einem Nanowell Chip eine Expression mit einem Volumen von 100 nL zeigen.

In dieser Arbeit konnte die Expression eines fluoreszenten Proteins (YFP) in einem Volumen von weniger als 4 nL gezeigt werden. Dies stellte allerdings nicht das kleinstmögliche Volumen dar, was bislang mithilfe der *in vitro* Expression gezeigt werden konnte.

Kinpara (Kinpara *et al.*, 2004) gelang es eine Expression in einem Volumen von 1 pL zu zeigen. Auch in dieser Arbeit wurde ein fluoreszentes Protein verwendet, was die Sensibilität des Nachweises zeigt.

4.12 Ausblick

Das in dieser Arbeit erarbeitete Verfahren schafft die Grundlage für einen völlig neuartigen Biochip. Der hier gezeigte Chip weist 5625 Reaktionskammern auf. Ein Bakterium hat einen Durchmesser von 1 μm . Wenn es möglich wäre, Kapillaren mit diesem Durchmesser zu generieren und diese in einer ähnlichen Form einzusetzen, wie es hier gezeigt wurde, so würde man auf einer Fläche von 4 cm^2 1 Million Reaktionsräume erhalten. Ein solcher Chip wäre für die Untersuchung von molekularen Wechselwirkungen ein erstrebenswertes Werkzeug.

Von einem solchen Chip ist man zum heutigen Zeitpunkt jedoch noch weit entfernt. Mit der vorliegenden Arbeit wurde die Grundlage dafür geschaffen. Nun sind weitere Schritte der Miniaturisierung notwendig um einen solchen Chip generieren zu können. Das Spektrum der Aufgaben dabei ist sehr vielseitig. Es umfasst nicht nur biochemische, sondern vor allem auch technische Themen. So ist es notwendig neue Herstellungsverfahren für Chips zu erarbeiten. Hierbei kann man sich das Wissen aus der Halbleiterindustrie zu Nutzen machen, in der schon heute Strukturen im Nanometerbereich gefertigt werden können. Darüber hinaus müsste das Verfahren zur Wiedergewinnung der einzelnen Proben automatisiert werden. Für solche Aufgaben könnte man Mikroskope mit motorisierten Tischen verwenden. Mit solchen Mikroskopen, in Verbindung mit automatisierten Mikromanipulatoren, müsste eine integrierte Lösung geschaffen werden, um mit einer derart hohen Probenzahl umgehen zu können.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein vergrößertes Oberflächen zu Volumenverhältnis einen negativen Einfluss auf die PCR hat. Es ist damit zu rechnen, dass bei einer weiteren Verkleinerung der Reaktionsräume diese Probleme verstärkt auftreten. Aus diesem Grund müssten neuartige Inaktivierungsmethoden gefunden werden. Hierbei könnte auf die Methoden der Mikrooberflächenveränderung (*micro surface engineering*) zur Lösung der anstehenden Probleme beitragen. Die Wirkung der Mikrooberflächenveränderung wurde schon in einer früheren Arbeit gezeigt (Siegers et al., 2004). Darüber hinaus gibt es heute schon, im Gegensatz zum Beginn der vorliegenden Arbeit, Möglichkeiten zur Herstellung von Kunststoffkapillaren. Die Kombination aus von Kunststoffmaterialien und den Möglichkeiten der Mikrooberflächenveränderung könnte wesentlich zur Verbesserung der Kompatibilität mit biochemischen Reaktionen beitragen. Dadurch könnte es möglich werden, dass auch ganze Gene oder Genbibliotheken in einem solchen Chip amplifiziert werden können.

Nach der Realisierung der Einzelmolekül-PCR in einem solchen Chip, stünde die Umsetzung der SIMPLEX-Methode in diesem Chip an. Darüber hinaus müssten Detektionsverfahren für die Analyse von Protein Proteininteraktionen an das System angepasst werden.