

Zusammenfassung

Entwicklung eines neuartigen PCR basierten Biochips

Die Fertigstellung des humanen Genomprojekts hat gezeigt, dass die Wissenschaft zum heutigen Zeitpunkt noch weit von einem umfassenden Verständnis der Vorgänge im menschlichen Körper auf molekularer Ebene entfernt ist. Folgeprojekte des humanen Genomprojekts zielen vor allem auf die Identifizierung von Genprodukten sowie der Regulation der verschiedenen Gene. Für die Aufgaben der funktionellen Genomanalyse werden verschiedene Hochdurchsatzverfahren, wie zum Beispiel Biochips eingesetzt. Die bislang auf dem Markt erhältlichen Biochips sind für die bevorstehenden Aufgaben nicht umfassend geeignet, so dass an dieser Stelle Entwicklungsbedarf besteht.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuartiger Chip entworfen, der es ohne die Verwendung von Pipettierrobotern ermöglicht, zu einer Genbibliothek zu gelangen. Dieser Chip besteht aus einer regelmäßigen Kapillaranordnung. In diesen Kapillaren wurde eine PCR durchgeführt und anschließend die in den Kapillaren enthaltenen Proben analysiert. Um dies zu erreichen wurden Methoden entwickelt, die es möglich machten Proben aus dem Chip zurückzugewinnen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass durch das große Oberflächen zu Volumenverhältnis das Material des Chips (Glas) einen negativen Einfluss auf die PCR hat. Hierbei zeigte sich, dass die Polymerase in Verbindung mit Glas eine stark verringerte Aktivität aufweist. Die verringerte Aktivität der Polymerase konnte durch geeignete Modifikationen der Reaktion reduziert und zum größten Teil aufgehoben werden. Durch diese Modifikation war es möglich eine spezifische PCR in einem Volumen von weniger als 4 nL durchzuführen. Die Grundlage für die *in vitro* Klonierung war die Etablierung der Einzelmolekül-PCR. Diese Reaktion konnte in dem hier verwendeten Chip nachgewiesen werden.

Für die weitere Verwendung des Chips wurde eine Immobilisierung von Oligonukleotiden an der Wandung der Kapillaren etabliert. Mithilfe dieser Oligonukleotide konnte eine Festphasen-PCR realisiert werden, so dass die PCR Produkte an der Wand des Chips kovalent gebunden wurden.

Neben der PCR, der Immobilisierung von Oligonukleotiden und der Festphasen-PCR konnte auch eine zellfreie Proteinsynthese in einem Volumen von weniger als 4 nL durchgeführt werden. Der Nachweis erfolgte über die Fluoreszenz des gebildeten Proteins.

Diese Arbeit schafft eine Grundlage für einen neuartigen Biochip, der zukünftig für die funktionelle Genomanalyse eingesetzt werden kann.

Summery

Development of a novel PCR based biochip

The completion of the human genome project has shown that we are far away from the understanding of the human body on molecular level. The projects for the next decade are the functional genomics projects. In these projects the scholarship looks for the interaction and regulation of all gene products. For the challenges in the post genomic era we need new tools for high throughput analysis of gene products. At the moment we can choose micro titer plates or micro arrays for such tasks. But all of the commercial available systems are not sufficient appropriate for the investigation of complex regulatory networks.

The intent of this work was the design of a novel micro array. With this micro array it should be possible to create a genomic library without the use of pipettes robots. The chip consists of a regular array of micro capillaries. A polymerase chain reaction was performed in these capillaries. Thereafter the samples were investigated in more detail. For this part of work it was necessary to establish a recovery method for the samples. Furthermore it was shown that the high surface to volume ration in a glass array has a negative influence to the performance of the PCR. It was shown that the polymerase has a significant lower activity with glass in comparison without glass. By the use of additives and other modifications in the PCR system it was possible to reduce and partially to overcome the inactivation problems. A polymerase chain reaction in a volume less the 4 nL has been carried out. The single molecule amplification as a base for the *in vitro* cloning was established.

For future development an immobilization of oligonucleotids at the wall of the capillary was established. By means of this covalent, immobilized oligonucleotides a solid phase PCR was performed.

Not only the creation of DNA but also the creation of proteins was investigated. For the protein synthesis in a small volume of 4 nL an in vitro expression in this chip was developed. The monitoring of proteins was able by the fluorescent protein.

This work creates a base for a novel micro array which can be used for the challenge in the post genomic era.