

3. Ergebnisse

3.1 Neuartiger Biochip

Für die Herstellung von Biochips ist das Aufbringen von Nukleinsäuren oder Proteinen auf die Oberfläche des Chips ein zentraler Punkt. Auch durch moderne Robotertechnik und die Automatisierung solcher Prozesse handelt es sich dabei um einen zeitintensiven Prozess. Die benötigte Zeit für die Herstellung solcher Chips nimmt mit der Anzahl der zu untersuchenden Proben immer weiter zu. Für komplexe Netzwerke, wie sie von Rhodes (Rhodes *et al.*, 2005) beschrieben wurden, sind die heute erhältlichen Chips nicht ausreichend geeignet. Die Herstellung von Chips die alle potenziellen Wechselwirkungen in einem Organismus untersuchen könnten, wäre nur mit einem erheblichen Zeitaufwand möglich.

Ein Chip der eine solch hohe Zahl an Wechselwirkungen untersuchen soll, müsste mit einem neuartigen Verfahren hergestellt werden, welches viel schneller ist, als die heute bekannten. Der optimale Fall sieht einen Chip vor, der günstig in der Herstellung ist und in sehr kurzer Zeit mit möglichst geringem technischen Aufwand produziert werden kann. Unter der Produktion ist in diesem Fall die Beladung des Chips zu sehen und nicht die gesamte Herstellung. Hierbei ist der direkte Vergleich zu dem fotolithografischen Verfahren oder dem Aufbringen von vorher synthetisierter DNA mithilfe von Robotern gemeint.

Das Konzept eines neuartigen Chips, welches in dieser Arbeit untersucht werden soll, stellt genau einen solchen Chip dar. Dieser soll zukünftig in der Lage sein eine hohe Anzahl an Wechselwirkungen zu untersuchen. Bei dem Chip soll es sich um einen Kapillarchip handeln, der einzig durch die Kapillarkräfte befüllt wird. In der folgenden Abbildung (Abbildung 7) soll das Prinzip des Chips erklärt werden. Bei dem Chip soll es sich um eine regelmäßige Anordnung von Kapillaren handeln. Diese sollen aus einem Material bestehen, welches dazu führt, dass sich die Kapillaren innerhalb kürzester Zeit eigenständig mit einer wässrigen Flüssigkeit füllen können. Der Chip soll dabei in eine Lösung getaucht werden, die alle nötigen Bestandteile für eine Polymerasekettenreaktion beinhaltet. Eine wichtige Grundvoraussetzung hierbei ist, dass die Zielmoleküle, welche amplifiziert werden sollen in einer geringen Konzentration vorliegen. Die Konzentration muss so eingestellt werden, dass im statistischen Mittel nur ein Zielmolekül pro Kapillare enthalten ist. Bei den zu amplifizierenden Zielmolekülen soll es sich um verschiedene Nukleinsäuren (eine DNA Bibliothek) handeln, die durch diesen Chip vereinzelt werden können. Durch die Amplifikation in jeder einzelnen Kapillare sollten nach Beendigung der PCR viele

3. Ergebnisse

Kopien einer einzigen Sequenz vorliegen. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einer *in vitro* Klonierung (Lukyanov *et al.*, 1996).

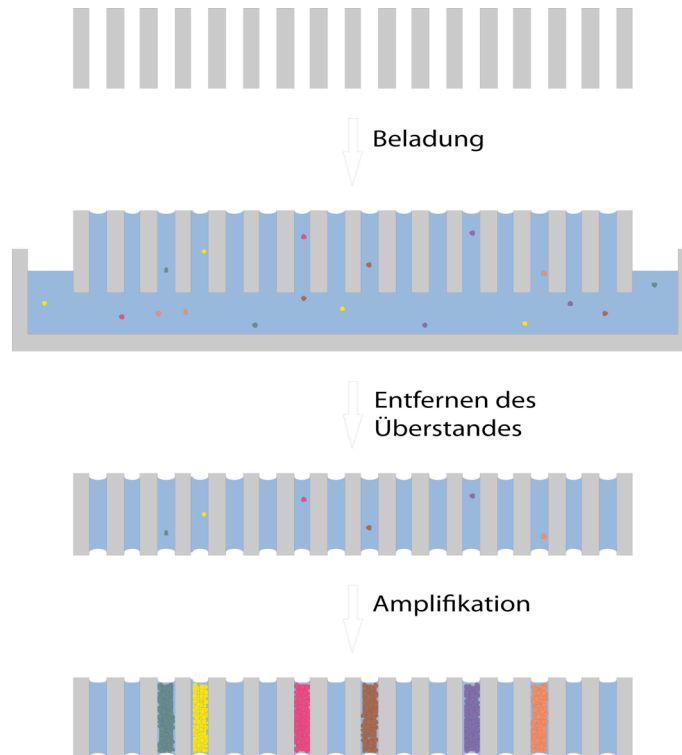


Abbildung 7: schematische Darstellung des zu entwickelnden Kapillarchips. Der Chip wird in eine Lösung getaucht, welche alle notwendigen Bestandteile für die PCR und eine Bibliothek an Zielmolekülen beinhaltet. Nach der eigenständigen Befüllung wird der Chip aus der Lösung genommen, die überschüssige Flüssigkeit entfernt und zur Amplifikation gebracht.

Darüber hinaus ist es wichtig, dass die Zielmoleküle so hergestellt werden, dass alle Moleküle durch die Verwendung eines einzigen Paares von Oligonukleotiden amplifiziert werden können.

In der Abbildung 7 ist auch zu erkennen, dass einige Kapillaren mit einem Molekül belegt wurden, während andere Kapillaren kein Molekül enthalten werden. Durch die hier beschriebene Methode könnte man eine DNA Bibliothek auf, oder besser in einem Chip erschaffen.

Ein weiteres Problem bei der Untersuchung von Wechselwirkungen stellt die bis lang getrennte Betrachtung der genetischen Ebene, in Form der DNA- und der Proteinebene dar. Hierbei wäre eine kombinierte Betrachtung beider Ebenen sehr sinnvoll, um die direkten Einflüsse von

3. Ergebnisse

genetischen Veränderungen beobachten zu können. Um komplexe Netzwerke verstehen zu können, ist eine gemeinsame Betrachtung von Genotyp und Phänotyp unabdingbar. Zum heutigen Zeitpunkt gibt es durchaus schon Versuche den Genotyp mit dem Phänotyp zusammen zu betrachten und so zu neuen Erkenntnissen zu kommen.

Durch eine Kombination von genetischer und Proteinebene ist es heute möglich eine *in vitro* Evolution durchzuführen. Hierbei stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, die an dieser Stelle nur kurz erwähnt werden sollen. Ein Verfahren der *in vitro* Evolution von Nukleinsäuren stellt das SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) Verfahren dar (Tuerk *et al.*, 1992, Beutel und Gold, 1992). Die Produkte des Verfahrens werden als Aptamere bezeichnet. Darunter versteht man hochaffine Nukleinsäuremoleküle, die durch ihre Konformation andere Moleküle erkennen und diese spezifisch binden können.

Bei diesem Verfahren sind die genetische Information und die Funktion des Moleküls in der RNA vereint. In den meisten Fällen stellt nach heutigem Wissensstand die DNA die genetische Information zur Verfügung und die Proteine übernehmen die ausführende Funktion. Dies ist im oben genannten Fall der RNA etwas anders. Hierbei ist die RNA sowohl Information als auch Funktionsträger.

Ein weiteres Beispiel für die Ausnutzung der Genotyp Phänotyp Verknüpfung stellt das Ribosom Display dar. Bei dieser Methode dient das Ribosom als bindendes Glied zwischen den beiden Ebenen. Das Ribosom Display beruht darauf, dass während der Translation für kurze Zeit die genetische Information (in Form der mRNA) und die funktionelle Information (in Form der Polypeptidkette) am Ribosom zusammen vorliegen. Durch einige Manipulationen des Systems der Translation unterbindet man die Termination und somit das Zerfallen des Ribosoms. Allerdings ist hier anzumerken, dass es auch im Falle des Ribosom Displays nur um die Bindung an einen Affinitätsträger geht. Enzymatische Funktionen können zum jetzigen Zeitpunkt mit diesem System noch nicht selektiert werden.

Eine Verbindung zwischen Genotyp und Phänotyp könnte auch in dem oben gezeigten Chip erreicht werden. Dazu müssten die Fragmente, die in dem Chip vereinzelt und amplifiziert wurden regulatorische Sequenzen für die *in vitro*-Proteinsynthese enthalten. Hierdurch könnte im Anschluss an die PCR eine zellfreie Proteinsynthese durchgeführt werden. Dieses ist in der folgenden Abbildung (Abbildung 8) dargestellt.

3. Ergebnisse

Nach der Amplifikation wird der Chip in die zellfreie Proteinsynthese eingesetzt. Die Aufnahme des Mixes für die *in vitro*-Expression geschieht wieder über Kapillarkräfte. Nachdem der Chip

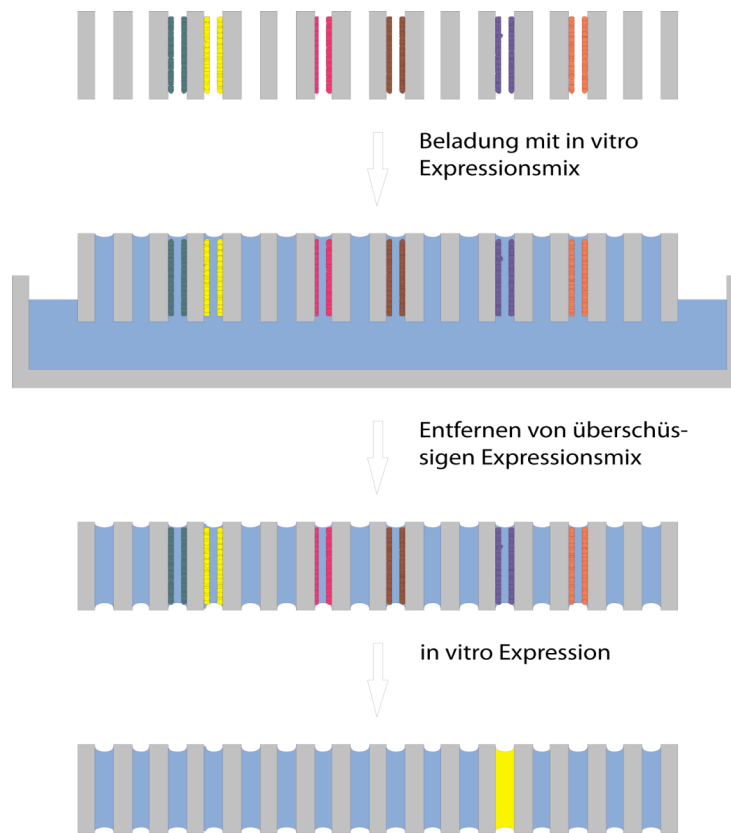


Abbildung 8: schematische Darstellung der *in vitro*-Proteinsynthese im Chip

Der erste Teil der Abbildung zeigt einen Chip, wie er aus der PCR hervorgegangen ist.

Er beinhaltet traslatierbare Amplifikate

Der zweite Teil zeigt die Befüllung mit dem Translationsmix gefolgt von der

Entfernung des überflüssigen Expressionsmix

Die vierte Grafik zeigt die Expression im Chip, bei der eine Kapillare ein Protein mit

den gewünschten Eigenschaften aufweist

vollständig mit dem Mix gefüllt ist, wird er aus der Lösung mit dem Expressionsansatz genommen und der Überstand entfernt. Anschließend muss der Chip abgedichtet werden, um die Reaktion starten zu können. Nach erfolgter Reaktion liegt in jeder Kapillare neben der genetischen Information auch das dazugehörige Protein vor. Hierdurch ist eine Verbindung zwischen der genetischen und der funktionellen Ebene entstanden, die über die Möglichkeiten des Ribosom Displays hinausgeht. In dem hier beschriebenen System wäre es denkbar, neben der Bindung zwischen Protein und Ligand auch enzymatische Umsetzung zu untersuchen.

3. Ergebnisse

Die Grundlage des hier beschriebenen Verfahrens bilden die Arbeiten von Ohuchi (Ohuchi *et al.*, 1998), der eine Methode entwickelt hat, die als SIMPLEX (single molecule amplification and *in vitro* expression) bezeichnet wird. Diese wurde bisher nur in einem größeren Volumen durchgeführt und ist daher noch nicht für den Hochdurchsatzbereich geeignet.

Das in Abbildung 7 und Abbildung 8 beschriebene System würde völlig neue Möglichkeiten in dem Bereich der *in vitro* Evolution darstellen. Nicht nur bei der Suche nach Bindern wie sie bei der SELEX oder dem Ribosom Display beschrieben wurden, sondern auch bei der Suche nach verbesserten Enzymen kann dieses System entscheidende Vorteile bringen. An dieser Stelle sei darauf verwiesen, dass die SIMPLEX-Methode schon für die Suche nach verbesserten Enzymen eingesetzt wurde (Miyazaki-Imamura *et al.*, 2003). Bei der von Miyazaki vorgestellten Arbeit konnte eine Peroxydase mit einer verbesserten Stabilität selektiert werden.

Ein solches System, wie es in Abbildung 7 und Abbildung 8 dargestellt wurde, wäre ein sehr nützliches Instrument bei der Suche nach neuartigen Wirkstoffkandidaten in der Pharmaindustrie. Darüber hinaus würde die Verbindung von Genotyp und Phänotyp zu einem wesentlich besseren Verständnis von Funktionen in verschiedenen Organismen führen.

3.2 Auswahl eines geeigneten Chips

Die Grundlage für das oben dargestellte Verfahren ist, ein Aufsaugen von verschiedenen Lösungen mithilfe von Kapillarkräften. Um dies zu realisieren, stand als Erstes die Auswahl einer geeigneten Geometrie und damit verbunden die Suche nach einem geeigneten Herstellungsverfahren an. Nach eingehender Marktanalyse wurden einige Materialien identifiziert, welche für die Herstellung eines solchen Chips in Frage kamen.

- Glas
- Glaskeramik
- Silizium
- Kunststoffe wie Polycarbonat
- Aluminiumoxid

Die in Frage kommenden Materialien hatten alle Vor- und Nachteile. Glas wird schon seit langer Zeit in der biologischen Forschung verwendet. Es ist in einem eingeschränkten Maß mikrostrukturierbar. Eine thermische Stabilität, die für die PCR benötigt ist, ist gegeben. Die Wärmeleitkapazität ist allerdings recht niedrig, was einen Wärmeübergang erschwert. Die

3. Ergebnisse

Modifizierung der Oberfläche ist durch die Verwendung von verschiedenen Silanen realisierbar. Dadurch ist die Kopplung von Oligonukleotiden möglich. Die gegebene Transparenz erleichtert zum Teil die Mikroskopie. Allerdings ist auch zu erwähnen, dass die Transparenz bei der Fluoreszenzmikroskopie eher hinderlich ist. Es kann zu einem Überstrahlen von einer Kapillare in die andere kommen.

An diesem Punkt hat die Glaskeramik einen entscheidenden Vorteil. Dieses Material ist von den Eigenschaften her dem Glas sehr ähnlich, jedoch ist es nicht transparent. Dies kann in der Fluoreszenzmikroskopie von Vorteil sein. Ein Überstrahlen wird durch die Verwendung dieses Materials erfolgreich verhindert.

Silizium ist hervorragend mikrostrukturierbar. Hier kann auf das Wissen aus der Halbleiterherstellung zurückgegriffen werden. Es ist nicht transparent und würde sich in der Mikroskopie wie eine Glaskeramik verhalten. Auch die thermische Stabilität ist gegeben. Es hat allerdings zwei entscheidende Nachteile. Zum einen wirkt es auf die PCR stark inhibierend (Shoffner *et al.*, 1996) und zum anderen ist die Herstellung solcher Chips mit hohen Kosten verbunden.

Reaktionsgefäße, wie sie täglich im Labor verwendet werden, bestehen aus dünnwandigen Kunststoffen. Die meisten biochemischen Reaktionen sind auf diese optimiert. Die Verwendung eines solchen Materials wäre ideal, wenn es in ausreichendem Maße strukturierbar wäre. Für das Aufsaugen der verschiedenen Flüssigkeiten musste ein günstiges Aspektverhältnis (Höhe zu Durchmesser der Kapillare) erreicht werden. Zum Zeitpunkt der Marktanalyse war dies bei Kunststoffen nicht gegeben. Ein Aspektverhältnis von 1 zu 3 war das Maximale, was zu diesem Zeitpunkt realisierbar war. Hierbei zeigte sich die Firma Bartels Mikrotechnik (Deutschland) als einer der wichtigsten Hersteller von mikrostrukturiertem Kunststoff.

Nach ausgiebigen Recherchen stellte sich Glas als geeignetes Material heraus. Mit der Firma Mikrogas Mainz (Deutschland) wurde ein geeigneter Hersteller gefunden.

Die erste Version des Kapillarchips (Abbildung 9) hatte Bohrungen mit einem Durchmesser von über 1 mm bei einer Dicke des Chips von 1,4 mm. Dieser Chip zeigte sich als ungeeignet für das Aufsaugen nach dem Prinzip, wie es in Abbildung 7 beschrieben wurde. Es wurde untersucht ob der Chip in der Lage ist Flüssigkeit aufzusaugen. Hierzu wurde ein leerer Chip (Abbildung 9) auf einen Objektträger gelegt und auf diesen seitlich eine Lösung aus Bromphenolblau gegeben. Unter dem Mikroskop sah man wie die Lösung des Bromphenolblaus zwischen Objektträger und Chip entlangzog, jedoch wurde sie nicht in die Kapillaren des Chips eingesogen. Man konnte

3. Ergebnisse

keinen Unterschied zwischen den mikroskopischen Aufnahmen vor und nach der Zugabe von Bromphenolblau in den Kapillaren erkennen (Abbildung 9).

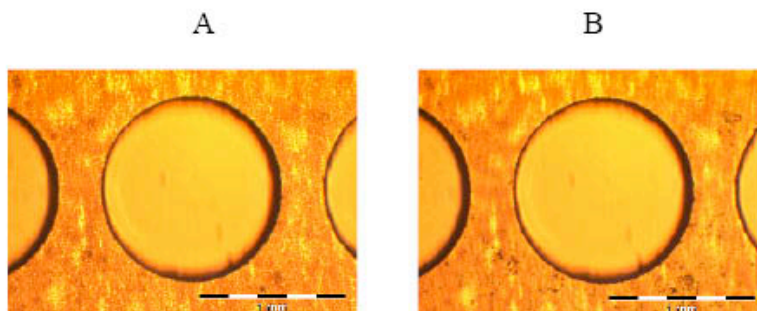


Abbildung 9: mikroskopische Darstellung eines Ausschnitts des Chips mit gebohrten Kapillaren bei dem Versuch der selbstständigen Befüllung

A: Chip vor der Befüllung mit einer Bromphenolblaulösung

B: Chip nach Zugabe von Bromphenolblau

Das Verhältnis von Durchmesser zu Länge der Kapillaren musste vergrößert werden. Unter dieser Vorgabe wurde das Design für einen neuen Chip erstellt. Bei einem kleineren Durchmesser der Kapillaren konnte die Bohrung der Lochplatte aus technischen Gründen nicht mehr verwendet werden. Die oben erwähnte Firma Mikroglas Mainz verfügt über ein Herstellungsverfahren, bei dem fotosensitives Glas eingesetzt wird. Durch hochenergetische UV-Strahlung wird eine Strukturänderung im Glas erreicht. Diese strukturelle Änderung kristallisiert durch die Einwirkung von Hitze aus und kann durch Flusssäure herausgeätzt werden. Mithilfe dieses Verfahrens können kleinere Lochdurchmesser der Kapillaren erreicht werden. Das Design des Chips ist in Abbildung 10 dargestellt.

Die so hergestellten Glasplatten wurden anschließend in 16 einzelne Chips zerschnitten und die Oberfläche poliert. Durch dieses Verfahren konnten Kapillarchips mit 5625 Kapillaren, die einen Durchmesser von $100\ \mu\text{m}$ hatten, hergestellt werden. Das Volumen eines Reaktionsraumes betrug weniger als $3,9\ \text{nL}$. Eine genaue Angabe des Volumens ist aufgrund des Herstellungsverfahrens nicht möglich. Es handelt sich bei den Kapillaren nicht um ideale Zylinder, sondern um zwei Kegelstümpfe, bei denen die Spitzen aufeinander stehen. Dadurch ergibt sich eine Form, die einer Sanduhr ähnelt. Der Hersteller gibt den Winkel der Wandung zwischen 1° und 2° an. Zur Vereinfachung der Berechnung des Volumens wurde ein idealer

3. Ergebnisse

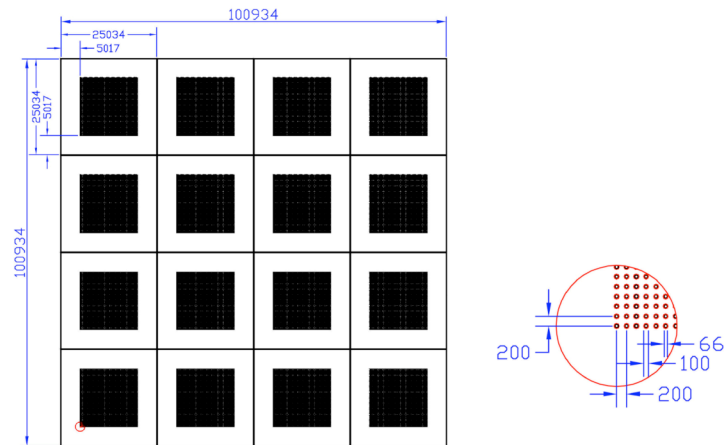


Abbildung 10: Zeichnung der Maske für die Belichtung des fotosensitiven Glases für die Herstellung des Kapillarchips. Der linke Teil der Abbildung zeigt die Maske mit der 16 Chips belichtet werden können, die anschließend geschnitten werden.

Der rechte Teil der Abbildung zeigt einen Ausschnitt dieser Maske, wobei man die Größe und den Abstand der Kapillaren erkennen kann (alle Angaben in μm).

Zylinder vorausgesetzt. Aus diesem Grund ist das genannte Volumen als Näherung zu verstehen und gibt nur die Obergrenze an.

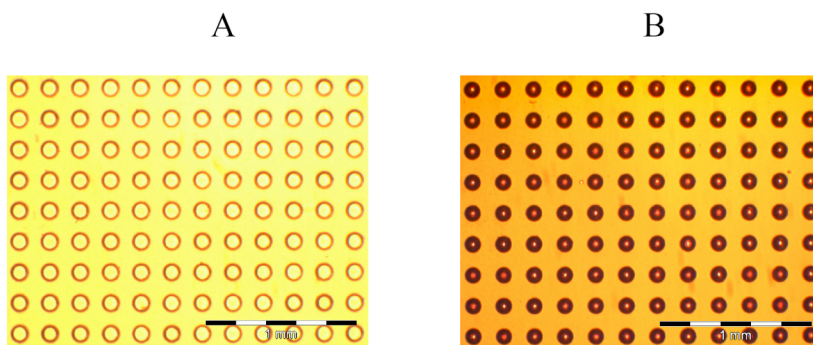


Abbildung 11: mikroskopische Darstellung eines Ausschnitts des Chips mit geätzten Kapillaren bei dem Versuch der selbstständigen Befüllung

A Chip vor der Befüllung mit einer Bromphenolblaulösung

B Chip nach Zugabe von Bromphenolblau

3. Ergebnisse

Auch bei diesem Chip war als Erstes zu klären, ob ein Aufsaugen von Flüssigkeiten durch das Einwirken von Kapillarkräften möglich war. Hierzu wurde ein Chip auf einen Objektträger gelegt und auf diesen anschließend eine Bromphenolblaulösung gegeben. Unter dem Mikroskop konnte man betrachten, dass innerhalb kürzester Zeit die Lösung erst zwischen Objektträger und Chip durchfloss und anschließend von den Kapillaren des Chips aufgesaugt wurde. Dieser Vorgang ist in Abbildung 11 dargestellt. Hier kann man gut erkennen, dass sich die Kapillaren selbstständig befüllen. Der äußere Bereich der Kapillare ist schon deutlich dunkler als der Mittelpunkt. Bei einer Aufnahme einige Sekunden später wäre der gesamte Bereich dunkel und damit der Chip befüllt.

3.3 Abdichtung des Chips

Wie oben beschrieben hatte jede einzelne Kapillare ein Volumen von weniger als 4 nL. Bedingt durch das Konzept, wie in Abbildung 7 dargestellt, musste der Chip über längere Zeit Temperaturen von über 90 °C aushalten. Die hohen Temperaturen führen in kürzester Zeit zu einer Verdunstung der Flüssigkeit innerhalb der Kapillaren. Da es sich bei der Polymerasekettenreaktion und der anschließenden Proteinbiosynthese um Reaktionen handelt, welche sehr empfindlich auf eine Konzentrationsänderung reagieren, musste der Flüssigkeitsverlust möglichst gering gehalten werden. Darüber hinaus sollten die Proben nach beendeter Reaktion noch zugänglich sein. Ein komplettes Verschweißen oder ähnlich geartete Verbindungstechniken konnte daher nicht verwendet werden.

In der Literatur sind verschiedene Ansätze für die Abdichtung von geringen Volumina zu finden. Die Möglichkeit, dass verschiedene Beschichtungen einen positiven Effekt auf die Rückhaltung der Flüssigkeit in den Kavitäten haben würde, konnte schon an früherer Stelle gezeigt werden (Nagai *et al.*, 2001). Die mit dieser Methode erreichte Abdichtung oder besser Rückhaltung der Flüssigkeit war für eine PCR nicht ausreichend.

Des Weiteren wurde eine Kammer in der Literatur beschrieben, die für die Abdichtung der Chips eventuell geeignet schien. Die Verwendung einer solchen PCR-Kammer wie bei Leamon. (Leamon *et al.*, 2003) wurde ebenfalls in Betracht gezogen und sollte im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit verwendeten Kapillarchip getestet werden.

Feste Verbindungen wie sie zur Herstellung von mikrofluidischen Systemen benutzt wurden (Chen *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 1997, Zhuang *et al.*, 2006, Jiao *et al.*, 1995), hätten sicher eine gasdichte Verbindung ergeben. Diese Methoden konnten nicht benutzt werden, da man nach einmaligem Schließen des Chips nicht mehr an die Proben herangekommen wäre.

3. Ergebnisse

Die Verwendung von Öl zum Abdichten von biochemischen Reaktionen ist eine recht alte Methode und wurden in den Anfängen der PCR verwendet (Saiki et al., 1988). Das Öl keinen störenden Einfluss auf die Reaktion haben würde, war auch dadurch zu erkennen, dass PCR-Reaktionen in eine Emulsion durchgeführt wurden (Williams et al., 2006, Nakano et al., 2003, Diehl et al., 2006).

Nach der eingehenden Untersuchung der Literatur wurden die folgenden Möglichkeiten zur Abdichtung der Reaktionsräume ausgewählt:

- Abdichtung mit Klebefolien
- Abdichtung mit Kleberahmen
- Abdichtung durch Verwendung von hydrophob oder hydrophil beschichteten Objektträgern
- Abdichtung durch Zusatz von Öl

Klebefolien, wie im ersten Punkt erwähnt, stellten einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die Abdichtung dar. Diese Folien werden heute schon für PCR-Platten mit 96 oder 384 Reaktionsräumen eingesetzt. Ein wesentlicher Unterschied zu diesen Platten ist, dass die Probe im Chip einen direkten Kontakt zu der Klebefolie hatte. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass der

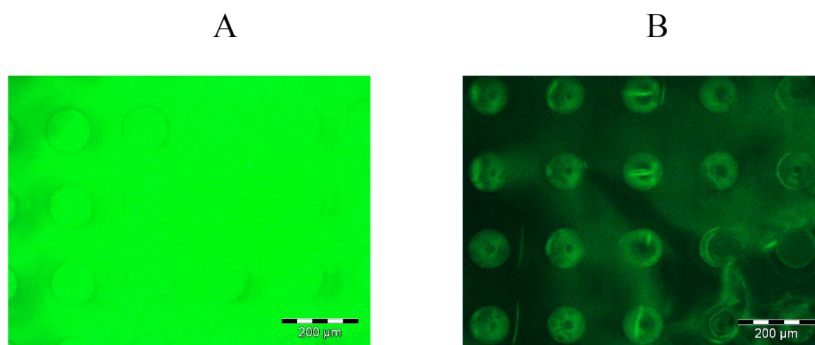


Abbildung 12: fluoreszenzmikroskopische Darstellung eines Ausschnitts des Chips, welcher mit einer PCR-Klebefolie verschlossen wurde Belichtungszeit 5 sek

A: hier wurde der verschlossene Chip unter dem Mikroskop betrachtet.

B: der Chip nach Entfernung der Klebefolie mit flüssigem Stickstoff

Kleber solcher Folien nicht förderlich für biochemische Reaktionen ist. Darüber hinaus musste die Klebefolie nach der Reaktion wieder abgelöst werden, um die Zugänglichkeit der Proben

3. Ergebnisse

gewährleisten zu können. Ein einfaches Abziehen der Folie war nicht möglich, da diese sehr fest an dem Chip klebte. Bei diesen Versuchen zerbrachen mehrere Chips. Des Weiteren blieben die Proben nicht im Chip sondern auch auf der abgezogenen Folie. Um diese Probleme zu lösen, wurde der Chip in flüssigen Stickstoff getaucht. Dabei sank die Klebkraft der Folie deutlich und man konnte sie einfach entfernen. Für die spätere Anwendung des Chips sollten fluoreszente Nachweismethoden eingesetzt werden. Eine Grundvoraussetzung hierfür war, dass der Chip selber und die verwendete Abdichtungsmethode keine Fluoreszenz aussendeten. Die Klebefolien konnten zwar durch die Verwendung von Stickstoff entfernt werden, jedoch verblieben Reste des Klebers an den Oberflächen, welcher selber fluoreszent war. Die starke Eigenfluoreszenz der Folie ist gut im Teil A der Abbildung 12 zu erkennen. Bei einer Belichtungszeit von 5 Sekunden konnte man die Reaktionsräume kaum noch erkennen. Dass Reste des Klebers ebenfalls fluoreszieren, konnte man nach dem Ablösen mit Stickstoff beobachten (Abbildung 12).

Eine weitere Möglichkeit wurde durch die Verwendung von PCR Kleberahmen (Eppendorf) getestet. Diese werden für die *in situ* PCR hergestellt. Die Rahmen, die ein Volumen von 65 μL aufnehmen können, passen genau auf den Chip und wurden auf beide Seiten des Chips geklebt. In diesem Fall wäre eine Eigenfluoreszenz und die inhibitorische Wirkung des Rahmens nicht so entscheidend, da hier kein direkter Kontakt zu den Proben vorhanden war. Der Aufbau der Abdichtung ist in Abbildung 13 schematisch dargestellt. Der Rahmen wurde mit einer flexiblen Kunststofffolie verschlossen und anschließend einer PCR unterzogen.

3. Ergebnisse

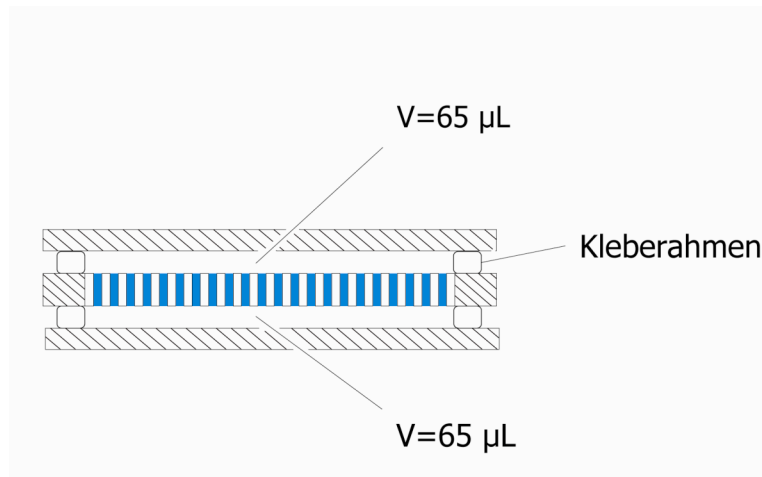


Abbildung 13: schematische Darstellung der Abdichtung des Chips mit PCR Kleberahmen. Die Kleberahmen werden auf den Chip geklebt und auf der anderen Seite von einer Kunststoffolie begrenzt, wodurch ein abgeschlossener Raum ober- und unterhalb des Chips entsteht.

Durch die Verwendung dieser Kleberahmen entstand ober- und unterhalb des Chips ein Totvolumen von jeweils 65 µL. Eine Frage bestand darin, ob mithilfe dieser Kleberahmen eine Verdunstung der Proben verhindert werden kann und ob es zu einem signifikanten Verlust an Flüssigkeit in den Kapillaren kommen würde. Um dies zu klären, wurden mehrere Chips mit einer Bromphenolblaulösung befüllt und nach der Methode, wie in Abbildung 13 dargestellt verschlossen. Anschließend wurden die so verschlossenen Chips einen PCR Temperaturprofil unterzogen. Es folgte die Betrachtung unter dem Mikroskop.

Es ist gut zu erkennen (Abbildung 14), dass nachdem die Chips einen PCR Temperaturprogramm unterzogen wurden, keine Flüssigkeit mehr in den Kapillaren vorhanden war. Es sind Reste der Bromphenolblaulösung an einigen Stellen zu erkennen. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass sich an den Folien ober- und unterhalb des Chips ein Kondensat bildete, was auch zur Veränderung der Farbe im mikroskopischen Bild beitrug.

3. Ergebnisse

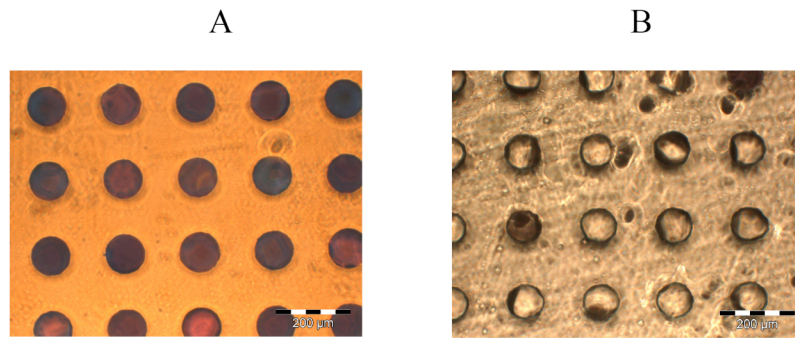


Abbildung 14: mikroskopische Darstellung eines befüllten Chips mit einer Bromphenolblaulösung unter Verwendung eines *in situ* Kleberahmens zur Abdichtung

A: Befüllt vor dem PCR-Lauf.

B: Nach Beendigung des PCR Laufs war die Flüssigkeit über weite Bereiche der verwendeten Abdichtungsfolie verteilt, wodurch sich das mikroskopische Bild änderte.

Daraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass das Totvolumen ober- und unterhalb des Chips zu groß war. Um dieses zu verringern, wurde versucht, aus unterschiedlichen Folien Rahmen zu schneiden und diese als Abstandhalter zwischen einer Abdeckung und dem Chip einzusetzen. Bei den verwendeten Folien handelte es sich um silikonisierte und nicht silikonisierte Folien mit Stärken von bis zu 50 µm. Diese Versuche brachten keine positiven Resultate. Die Chips sahen nach einem PCR-Temperaturprogramm ähnlich aus wie die in Abbildung 14 B gezeigten Chip. Es bestand der Verdacht, dass aufgrund des Fehlens des Klebers, keine Dichtung erreicht werden konnte. Dieser Verdacht wurde durch die Beobachtung von Bromphenolblauresten im PCR-Block erhärtet.

Um auch ohne Kleber eine Abdichtung zu erreichen, wurde ein Druck von oben auf die Rahmen ausgeübt. Dies geschah durch die Verwendung von mehreren Objektträgern, die als Abstandhalter zwischen dem Chip und dem Deckel der PCR-Maschine gelegt wurden. Auch hier konnte keine zufriedenstellende Abdichtung erreicht werden.

3. Ergebnisse

Da die kommerziell erhältlichen Kleberahmen mit einem zu großen Totvolumen verbunden waren und die Abdichtung mit verschiedenen Folien auch nicht zum Erfolg führte, musste eine Alternativmethode gefunden werden. Die Überlegungen gingen in die Richtung von unterschiedlichen Beschichtungen von Objektträgern, die dann beidseitig den Chip abdichten sollten.

Ein erhöhtes Rückhaltevermögen mit unterschiedlichen Beschichtungen konnte schon an früherer Stelle gezeigt werden (Nagai *et al.*, 2001). In der Arbeit von Nagai wurde ein Chip unterschiedlich beschichtet. Dabei konnten die Reaktionsräume anders beschichtet werden als die Chipoberfläche, was zu einem verändertem Rückhaltevermögen führte.

Der unbeschichtete Chip hatte eine hydrophile Oberfläche, was man auch gut daran erkennen konnte, dass er sich leicht benetzen ließ. Durch die Verwendung von hydrophob beschichteten

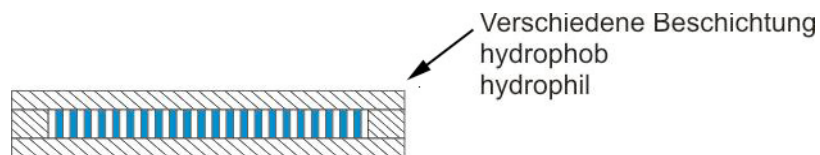


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Abdichtung mit unterschiedlich beschichteten Objektträgern, die den Chip beidseitig begrenzen um so eine Verdunstung aus den Kapillaren zu verhindern

Objektträgern sollte das Austreten der Flüssigkeiten verhindert werden. Auch in diesem Fall wurde der Chip wieder mit Bromphenolblau befüllt und einem PCR-Temperaturprogramm unterzogen. Nach diesem zeigte sich ein ähnliches Bild wie in Abbildung 14. Allerdings war die Oberfläche noch mehr verschmiert, sodass auch diese Methode nicht für die Abdichtung verwendet werden konnte.

Auch der umgekehrte Fall, bei dem ein hydrophiler Objektträger mit einem hydrophoben Chip zusammen gebracht wurde, stellte sich als problematisch dar. Hier stellten sich die Schwierigkeiten schon bei der Befüllung der Chips ein, da das Benetzungsverhalten deutlich schlechter war als mit einem hydrophilen Chip.

Es blieben noch zwei weitere Kombinationsmöglichkeiten übrig, bei dem der Chip genau so beschichtet war, wie der zur Abdichtung verwendete Objektträger. Auch hiermit konnte kein Erfolg erzielt werden.

3. Ergebnisse

Neben einer mikroskopischen Betrachtung wurde auch die Wägung des Chips als Methode zur Bestimmung der Abdichtung verwendet. Hierzu wurde in einem ersten Schritt das Leergewicht des Chips bestimmt, dieser anschließend befüllt und wieder vermessen. Aus den so ermittelten Werten konnte das Volumen innerhalb des Chips berechnet werden. Nachdem der Chip einem PCR-Temperaturprogramm unterzogen wurde, erfolgte wieder eine Messung des Gewichts. Bei einer erfolgreichen Abdichtung sollte sich das Gewicht des Chips nach einem PCR-Temperaturprogramm nicht von dem des befüllten Chips unterscheiden.

In dem gleichen Experiment wurde auch untersucht wie sich die Chips befüllen ließen, da für die Befüllung gleichartig beschichtete Objektträger verwendet wurden.

Wie aus Abbildung 16 zu erkennen ist, zeigten sich alle möglichen Kombinationen der

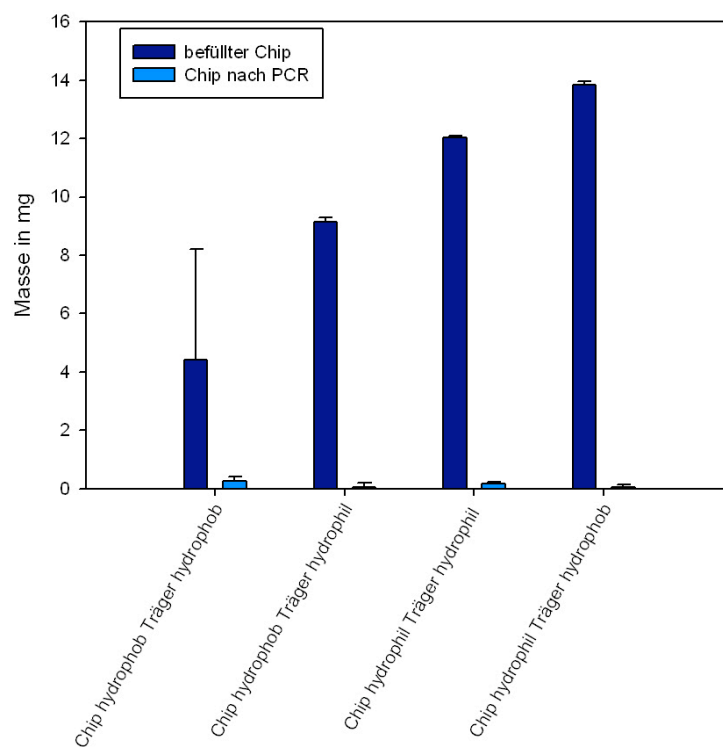


Abbildung 16: grafische Darstellung der Versuche zur Abdichtung mit unterschiedlich beschichteten Objektträgern sowie das unterschiedliche Verhalten bei der Befüllung der Chips mit beschichteten Objektträgern

Die Chips wurden mit einer wässrigen Lösung durch die Ausnutzung von Kapillarkräften befüllt und anschließend gewogen, wobei sich je nach Beschichtung eine unterschiedlich gute Befüllung zeigte. Anschließend wurden die Chips mit beschichteten Objektträgern abgedichtet, einem PCR-Temperaturprogramm unterzogen und gewogen.

3. Ergebnisse

Beschichtung als nicht geeignet für eine Abdichtung. Nach der PCR war in allen Fällen eine deutliche Reduktion des Gewichtes auf nahezu null zu erkennen.

Des Weiteren war ein unterschiedliches Verhalten hinsichtlich der Befüllung der einzelnen Chips zu beobachten. Hierbei kam es gerade bei der Kombination von hydrophoben Chips und hydrophoben Objektträgern zu großen Schwankungen bei den Messungen. Als ideal für die Befüllung zeigte sich die Kombination eines hydrophoben Objektträgers mit einem hydrophilen Chip. Diese Kombination erwies sich auch bei Nagai (Nagai *et al.*, 2001) als vielversprechend.

Eine weitere Möglichkeit der Abdichtung wurde mit der Verwendung einer PCR-Kammer und einem Sealpad untersucht. Bei dem Sealpad handelt es sich um ein elastisches Material aus der Halbleitertechnik mit besonders hoher Wärmeleitfähigkeit. Diese Methode konnte von Leamon (Leamon *et al.*, 2003) erfolgreich bei der Abdichtung einer Pico-Titerplatte verwendet werden. Hierzu musste als Erstes eine entsprechende Kammer hergestellt werden. Die Kammer wurde von Udo Abratis aus einem Aluminiumblock gefräst und ist in Abbildung 17 zu sehen.

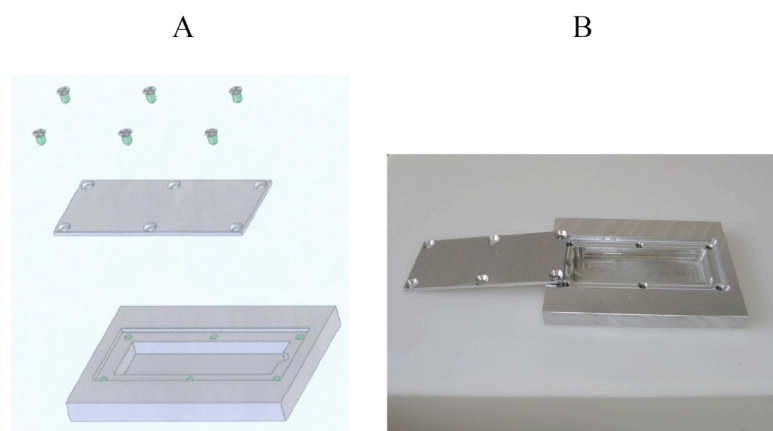


Abbildung 17: Darstellung der PCR-Kammer nach dem Vorbild von (Leamon *et al.*, 2003) für die Abdichtung des Kapillarchips

A: schematische Darstellung für die Konstruktion

B: fotografische Darstellung der fertigen PCR-Kammer

3. Ergebnisse

Die Pico-Titerplatte war allerdings nur an einer Seite geöffnet. Bedingt durch den Aufbau des hier verwendeten Chips musste eine Abdichtung von oben und von unten erfolgen. Das Sealpad musste daher von beiden Seiten angewendet werden. Daraus ergab sich der folgende Aufbau (Abbildung 18) für die Abdichtung in der Chipkammer. Der Chip wurde beidseitig von einem Streifen Sealpad begrenzt. Dies hat neben der hohen Wärmeleitfähigkeit auch hydrophobe Eigenschaften. Aus diesem Grund schien das Sealpad für die Abdichtung gut geeignet zu sein. Das Sealpad wurde von zwei Objektträgern begrenzt, um das Volumen der Chipkammer zu füllen und einen stabilen Aufbau zu gewährleisten. Nach oben begrenzte ein Streifen aus Gummi den Aufbau. Der Gummistreifen sollte ein Brechen des Chips verhindern, während dieser durch Druck von oben abgedichtet wurde. Dieser konnte durch den Deckel, welcher mit 6 Schrauben

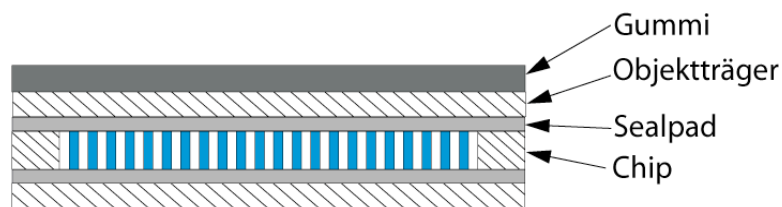


Abbildung 18: schematische Darstellung der Abdichtung in der PCR-Kammer mit dem Sealpad, welches als flexible hydrophobe und gut Wärme leitende Schicht verwendet wurde.

fixiert wurde, aufgebaut werden (Abbildung 17). Dieser Aufbau wurde wie die zuvor Beschriebenen getestet, indem der Chip wieder mit einer farbigen Lösung befüllt wurde und einem PCR-Temperaturprogramm unterzogen wurde. Diese Methode konnte auch kein Erfolg erzielen. Die mikroskopischen Bilder sehen dem von Abbildung 14 sehr ähnlich, jedoch war der Chip wesentlich mehr verschmiert. Durch diese Abbildung konnte man schlussfolgern, dass auch eine Kontamination von einer Kapillare zur anderen nicht auszuschließen war und daher für dieses Projekt nicht geeignet war.

3. Ergebnisse

Reaktionen mit höheren Temperaturen konnten in diesem Chip nur bei einer ausreichenden Abdichtung erfolgen. In den ersten Versuchen zur Polymerasekettenreaktion wurde das Reaktionsgemisch mit Mineralöl überschichtet (Saiki *et al.*, 1988), um eine Verdunstung zu verhindern. Diese Methode der Abdichtung sollte auch für den Chip untersucht werden. Bei den bis zu diesem Zeitpunkt gezeigten Experimenten wurde das Öl oberhalb der Probe verwendet. Da Öl leichter als eine wässrige Lösung ist, funktioniert dieses Prinzip auch sehr zuverlässig. In dem hier vorgestellten Fall sollten die Proben innerhalb des Chips in einem Ölbad, in welchem der Chip vollständig von Öl umgeben ist, zur Amplifikation gebracht werden. Es wurde die Verdunstung unter der Abdichtung von Öl untersucht, in dem ein befüllter Chip in ein Ölbad gelegt wurde und dieses für einen Zeitraum von 20 Minuten auf einer Feinwaage beobachtet wurde. Zum Vergleich wurde auch ein Chip verwendet, welcher nicht abgedichtet wurde. Bei dem nicht abgedichteten Chip ist ein deutlicher Gewichtsverlust festzustellen. Unter diesen Bedingungen dauerte es etwa 15 Minuten, bis die Flüssigkeit im Chip vollständig verdunstet war. Durch die Abdichtung mit Öl konnte über diesen Zeitraum kein Gewichtsverlust verzeichnet werden (Abbildung 19). Als weitere Untersuchung der Abdichtung mit Öl wurde auch dieser

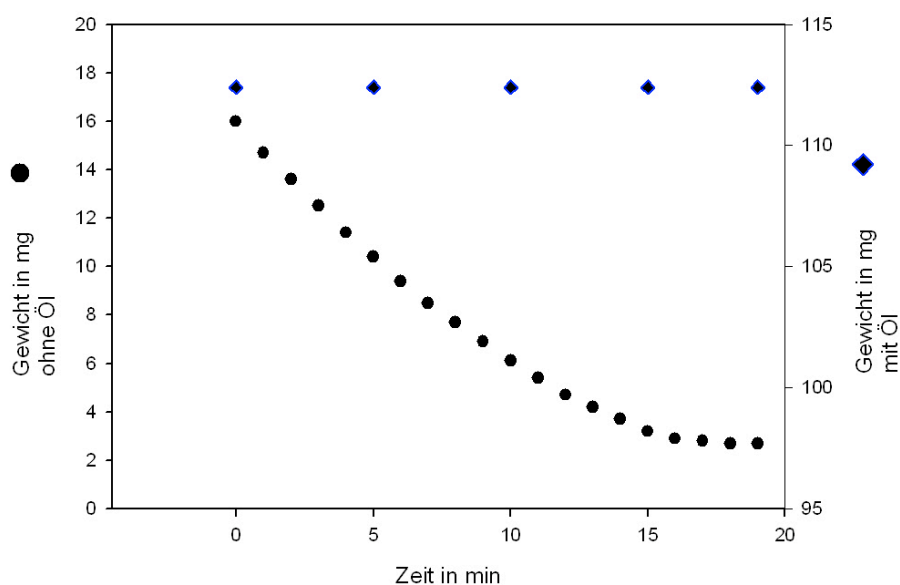


Abbildung 19: grafische Darstellung der Verdunstung im Chip mit und ohne Abdichtung durch die Verwendung eines Ölbades

- Zeigt den Verlauf der Verdunstung ohne die Verwendung des Ölbades bei Raumtemperatur.
- ◆ Zeigt den Verlauf der Verdunstung unter Verwendung des Ölbades als Abdichtung bei Raumtemperatur.

3. Ergebnisse

Chip einem PCR-Temperaturprogramm unterzogen, und anschließend unter dem Mikroskop betrachtet. Dadurch konnten die Ergebnisse der Gewichtsmessung bestätigt werden.

Abschließend lässt sich für diesen Teilabschnitt sagen, dass verschiedene Möglichkeiten der Abdichtung untersucht wurden. Die Versuche der Abdichtung brachten keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Die Abdichtung mit Öl, sowie sie in Standardreaktionsgefäßen verwendet wurde, brachte den benötigten Verdunstungsschutz.

3.4 Wiedergewinnung der Proben

Das Volumen, das für die Einzelreaktion in diesem Chip eingesetzt wurde, war sehr gering und konnte daher nicht einfach aus den einzelnen Kapillaren herauspipettiert werden. Für den Nachweis und die Optimierung der PCR und der *in vitro* Proteinsynthese musste eine geeignete Methode gefunden werden, die Proben aus dem Chip wiederzugewinnen und zu analysieren. Hierbei muss zwischen der Wiedergewinnung einer Einzelprobe aus einem Reaktionsraum und der des gesamten Probenmaterials unterschieden werden.

Aus der Literatur waren für den Nachweis von PCR-Reaktionen verschiedene Methoden zu finden. Hier ist als erstes die Methode von Nagai (Nagai *et al.*, 2001) zu nennen. Nagai verwendete eine gasdurchlässige Membran unterhalb des eigentlichen Deckels. Nach der Entfernung des Deckels konnte das Wasser verdunsten und die Membran entfernt werden. Der Nachweis der PCR erfolgte dann durch die Anfärbung der gebildeten DNA mit YOYO II. Diese Möglichkeit wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht, da auch in diesem Fall die



Abbildung 20: fotografische Darstellung der Zentrifugationseinheit zur Wiedergewinnung der Proben aus dem Chip

3. Ergebnisse

Proben nicht für weitere Untersuchungen zur Verfügung standen. Es musste eine Alternative für die Rückgewinnung des Probenmaterials gefunden werden.

Für Standardanalyseverfahren in Form von gelelektrophoretischer Untersuchung sollte möglichst das gesamte Probenmaterial wiedergewonnen werden. Als eine einfache Methode wurde versucht die Flüssigkeit aus dem Chip heraus zu zentrifugieren. Die Zentrifugalkraft sollte die Proben aus dem Chip herausgedrückt und diese in einem Auffangbehälter gesammelt werden. Hierzu wurden Adaptoren aus Teflon gefertigt, welche in handelsübliche Zellkulturplatten passten. Diese sind in Abbildung 20 zu sehen. Die Probe sollte in dem Kegel gesammelt und konzentriert werden. Die Zellkulturplatten wurden mit den Adaptoren und den Chips bei der maximaler Umdrehungszahl (etwa 2500 g) der Labofuge 400 (Heraeus) für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der so behandelte Chip aus dem Adaptor genommen und unter dem Mikroskop betrachtet. Dabei konnte die folgende Abbildung aufgenommen werden (Abbildung 21). In dieser Abbildung ist zu erkennen, dass der größte Teil der Kapillaren noch befüllt war, was man an der dunklen Färbung der Kapillaren erkennen kann. Lediglich die Reaktionsräume die durch einen Pfeil in Abbildung 21 gekennzeichnet sind waren teilweise entleert.

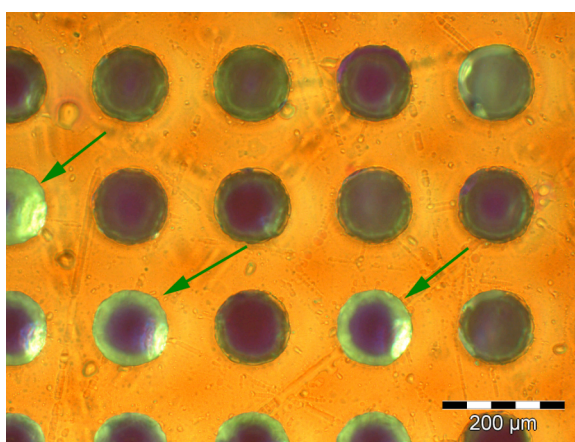


Abbildung 21: mikroskopische Aufnahme des Chips, nachdem dieser 5 Minuten bei maximaler Drehzahl in der Labofuge 400 zentrifugiert wurde. Die Pfeile kennzeichnen Kapillaren, die teilweise entleert wurden. Der größte Teil der Kapillaren konnte auf diese Art nicht entleert werden.

In den durch Pfeilen markierten Kapillaren ist eine deutliche Veränderung der Färbung zu verzeichnen. Um die wirkenden Kräfte zu vergrößern, wurden die Zeit der Zentrifugation verdoppelt. Auch bei der Zentrifugationszeit von 10 Minuten konnten die Ergebnisse der

3. Ergebnisse

Entleerung der Kapillaren nicht nennenswert verbessert werden. Der zweite Parameter, der bei der Zentrifugation geändert werden konnte, war die Drehzahl. Mit steigender Drehzahl nehmen die Kräfte, die auf die Probe wirken deutlich zu. Eine weitere Erhöhung der Beschleunigung war in der Labofuge 400 nicht realisierbar. Um dies zu erreichen, musste ein anderer Rotor verwendet werden. Dies war in der Labofuge 400 nicht möglich, sodass auch eine andere Zentrifuge verwendet werden musste. Für die Erhöhung der Drehzahl wurde auf eine Beckmann Zentrifuge



Abbildung 22: fotografische Abbildung der Zentrifugationseinheit für die JS 13 Rotor.

Der linke Teil der Abbildung zeigt den Zentrifugenbecher des Herstellers und der rechte Teil den aus Teflon gefertigten Adaptor, der im oberen Teil den Chip aufnehmen konnte.

und einen JS 13 Rotor (Beckmann) zurückgegriffen.

Bei diesem Rotor handelte es sich um einen Ausschwingrotor, für welchen wieder andere Adaptoren hergestellt werden mussten (Abbildung 22). Mit diesem Rotor waren Rotationsgeschwindigkeiten bis zu 13000 rpm möglich, was über 26000 x g entspricht. Es wurde versucht die Flüssigkeit mit 10000 x g herauszudrücken und anschließend die Chips unter dem Mikroskop zu betrachten.

Die höheren Kräfte, welche auf den Chip wirkten, hatten zur Folge, dass dieser zerbrach. In den noch vorhandenen Stücken waren noch immer Reste der Flüssigkeit in den Kapillaren. Die Zentrifugation stellte daher keine geeignete Methode zur Wiedergewinnung der Proben dar.

Nachdem der Ansatz der Zentrifugation nicht zu einer ausreichenden Rückgewinnung der Probe geführt hat, wurde versucht, die Flüssigkeit aus dem Chip herauszusaugen. Hierzu wurde eine Filtrationseinheit (Millipore) verwendet, welche an eine Membranpumpe (Vacubrand)

3. Ergebnisse

angeschlossen wurde. Durch die Verwendung einer Omega 3-Membran (Pall) sollten größere DNA-Fragmente zurückgehalten werden, während die dNTPs durch den Filter wandern. Durch ein mehrmaliges Spülen des Chips sollten die Proben aus dem Chip vollständig entfernt werden. Schon die ersten Versuche zeigten, dass dies nicht möglich war. Nachdem der Chip aus einem Ölbad genommen wurde, wurde versucht, die Flüssigkeit aus dem Chip zu saugen. Dies führte dazu, dass ein Teil des restlichen Öls in die Membran gesaugt wurde und diese dadurch vollständig blockiert war. Ein Spülen mit einer wässrigen Lösung war durch das Verstopfen der Membran nicht mehr möglich. Auch das vorherige Entfernen von Teilen des Öls blieb ohne Erfolg und führte ebenfalls zu einem Verstopfen der Membran.

Da das Öl, welches für die Abdichtung benötigt wurde, eine Ultrafiltrationsmembran verstopfte, wurde nach einer Lösung gesucht, den Porendurchmesser zu erhöhen um ein Verstopfen der Membran zu verhindern.

Bei dem Herausaugen sollte die negative Ladung der DNA ausgenutzt werden, um sie an eine positiv geladene Membran zu binden. Bei diesen Versuchen wurde DE 81-Papier (Whatman) verwendet. Der Test sollte sich so gestalten, dass alle Komponenten der PCR durch den Filter gesaugt werden. Dabei werden die negativ geladenen Komponenten wie DNA, dNTPs und Primer an die Membran gebunden. Durch Waschen der Membran mit einem steigendem Salzgradienten sollte es gelingen, dass die dNTPs und die Primer von der Membran eluiert werden. Für einen sensitiven Nachweis wurde radioaktiv markierte DNA verwendet. Die verbleibende DNA kann dann durch die Messung der zurückgehaltenen Radioaktivität bestimmt werden.

Es musste das unterschiedliche Elutionsverhalten mit der verwendeten Filteranlage getestet werden. Hierbei stellte sich heraus, dass es keine signifikanten Unterschiede gab.

Durch die Experimente mit den unterschiedlichen Filtern konnte gezeigt werden, dass es möglich war, die Proben aus dem Chip zu saugen. Dieses Verfahren sollte dann auch für die Wiedergewinnung der Proben verwendet werden. Hierzu wurde die Filteranlage (Abbildung 23) etwas modifiziert um die Proben in der Saugflasche sammeln zu können. Zur Sammlung der Proben wurde ein Szintillationsröhrchen verwendet und dieses mit einem Schlauch mit der Absauganlage verbunden. Durch das Anlegen eines Unterdrucks war es möglich die Proben aus dem Chip zu saugen und den Chip anschließend mit Puffer zu spülen. Durch das Spülen mit einer Pufferlösung handelte es sich um ein recht großes Volumen und somit eine geringe Probenkonzentration. Bei der Wiedergewinnung ging es in erster Linie um die Möglichkeit eine Polymerasekettenreaktion im Chip nachweisen zu können. Bei dieser Reaktion wird DNA

3. Ergebnisse

vervielfältigt, die anschließen durch eine Fällung aufkonzentriert werden konnte. Durch die Durchführung einer Fällung war es darüber hinaus noch möglich das noch vorhandene Öl abzutrennen.

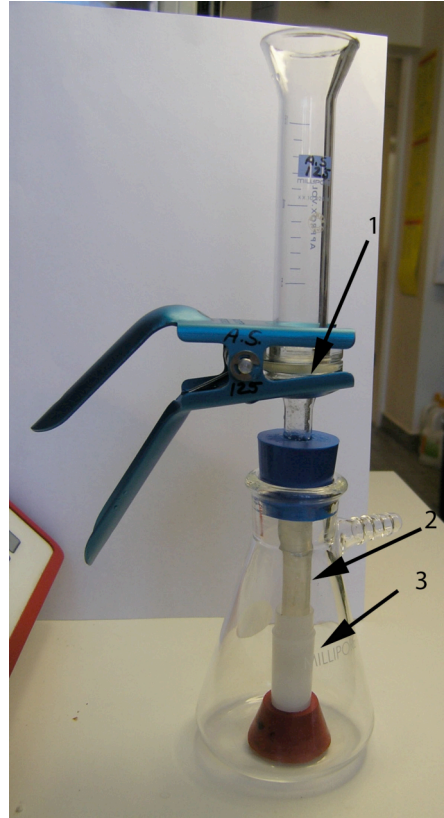


Abbildung 23: Absauganlage zur Wiedergewinnung der Proben aus dem Chip

- 1 Auflagefläche für den Chip auf der Fritte**
- 2 Verbindungsschlauch zur Ableitung der Probe in ein Probengefäß**
- 3 Szintillationsröhrchen als Sammelgefäß für die herausgesaugte Probe**

Um die Wiedergewinnung aus dem Chip unter realen Bedingungen zu untersuchen, wurde eine Standard-PCR angesetzt und in dieser 5 μCi radioaktiv markierte α ^{32}P dCTP eingesetzt. Nach erfolgter PCR wurden je 15 μL auf vier Chips gegeben und diese anschließend abgesaugt. Zum Vergleich wurden aus vier mal 15 μL der PCR direkt die Radioaktivität bestimmt. Hierdurch konnte bestimmt werden, wie viel Prozent von dem ursprünglich eingesetzten Material wieder gewonnen werden konnte. Wie in Abbildung 24 zu sehen, konnte nicht die gesamte Probe wieder gewonnen werden. Die Standardabweichung bei der Wiedergewinnung aus dem Chip ist mit der Abweichung des Reaktionsgefäßes (Tube) vergleichbar. Bei dem hier dargestellten Versuch konnten 78 % aus dem Chip wieder gewonnen werden.

3. Ergebnisse

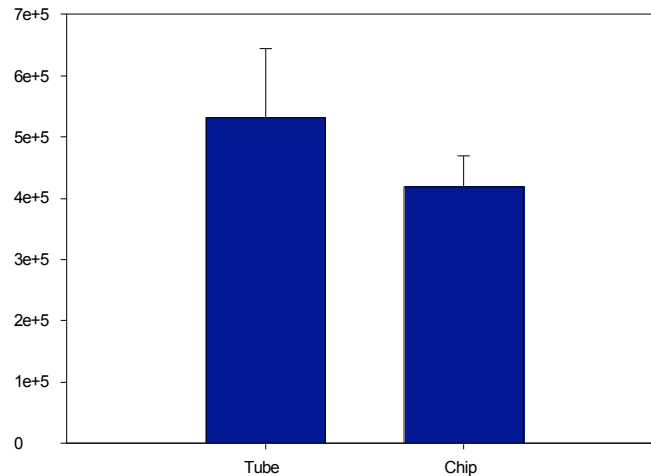


Abbildung 24: grafische Darstellung der Wiedergewinnung aus dem Chip

Hierzu wurden jeweils 15 μL eines PCR Ansatzes mit radioaktivem ^{32}P -dATP direkt in ein Reaktionsgefäß gegeben und zum Vergleich die gleiche Menge auf einen Chip gegeben und anschließend wieder herausgesaugt.

Mithilfe dieser Methode war es möglich, das zurückgewonnene Probenmaterial über unterschiedliche Gelelektrophoresen zu untersuchen.

In diesem Kapitel ging es um die Wiedergewinnung des gesamten Probenmaterials. In dem folgenden soll gezeigt werden, dass auch Proben aus einzelnen Kapillaren einzeln analysiert werden konnten.

3.5 Wiedergewinnung der Proben durch Mikromanipulation

Das Prinzip dieses neuartigen Chips beruht auf der Amplifikation von einzelnen Nukleinsäuren in den Kapillaren des Chips. Für einen Nachweis dieser Einzelmolekülamplifikation muss der Inhalt aus einer einzelnen Kapillaren für weitere Untersuchungen zugänglich gemacht werden.

Für diese Arbeiten konnte schon auf verschiedene Ansätze aus der Zellkulturtechnik zurückgegriffen werden. Durch die Verwendung von Mikromanipulatoren konnten einzelne Zellen aus einem Zellverband heraus isoliert werden und mit diesen Zellen eine PCR durchgeführt werden (Roth *et al.*, 1994, Roehrl *et al.*, 1998). Von Fröhlich (Frohlich und König, 1999) wurde eine Methode für das Überführen von Zellen beschrieben, die auch für diese Arbeit vielversprechend war. Das Promenmaterial wurde von Fröhlich auf einen anderen Objektträger abgelegt und von diesem mit einer Pipette aufgenommen.

3. Ergebnisse

Für die Versuche in der vorliegenden Arbeit wurde der MK2 Mikromanipulator (Eppendorf) verwendet. Es galt eine geeignete Konstruktion an Kapillaren bezüglich des Winkels und des Durchmessers zu finden. Mithilfe des Mikromanipulators und dem Cell Tram Vario (Eppendorf), einer kleinen Unterdruckeinheit, konnte die Flüssigkeit aus einzelnen Kapillaren entnommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt werden.

Im Folgendem wurde untersucht, die herausgesaugten Proben mithilfe einer PCR zu amplifizieren. Hierzu wurde eine Plasmidlösung auf den Chip gegeben, der dann mit Öl überschichtet wurde. Für die Überführung der Proben kam die von Fröhlich entwickelte Methode

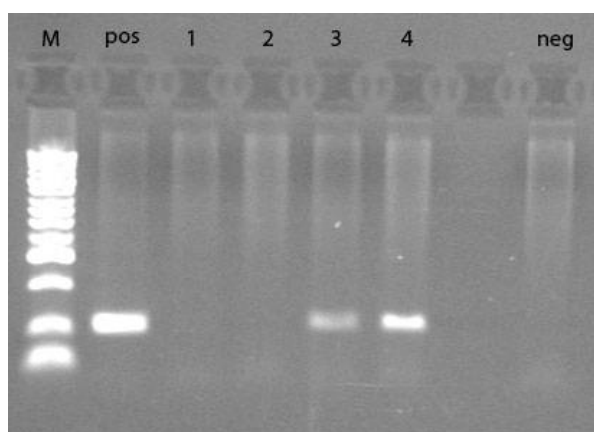


Abbildung 25: Darstellung der Agarosegelelektrophorese (2 % Agarose) der PCR nach erfolgter Mikromanipulation des Ausgangsplasmides

M: Marker Hyper Ladder II

Pos: Kontrolle bei der das Plasmid direkt in die PCR eingesetzt wurde

1-4: vier Proben, welche aus dem Chip mithilfe des Mikromanipulators überführt wurden.

Neg: Negativkontrolle ohne DNA

zum Einsatz. Hierzu wurde ein Objektträger und die verwendete Kapillare des Mikromanipulators mit Dichlordimethylsilan beschichtet. Dies führte zu einer stark hydrophoben Oberfläche und sollte die unspezifische Bindung von DNA verhindern. Nachdem mithilfe des Mikromanipulators eine Probe aus einer einzelnen Kapillare entnommen wurde, wurde diese zusammen mit einem Teil Öl aus dem Cell Tram Vario (Eppendorf) auf den vorbereiteten Objektträger abgesetzt. Anschließend wurde die Probe auf dem Objektträger in 1 μ L TE-Puffer aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Bei dieser Prozedur konnte nicht immer sichergestellt werden, dass die Probe aus der Kapillare auch tatsächlich in das Reaktionsgefäß überführt wurde. Um dies zu überprüfen, wurde anschließend eine PCR mit den entnommenen

3. Ergebnisse

Proben durchgeführt und mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. In Abbildung 25 ist deutlich zu erkennen, dass es möglich war, Proben, welche aus den einzelnen Kapillaren herausgesaugt wurden, zu amplifizieren. Außerdem war zu beobachten, dass die Übertragung der DNA nur zu 50 % gelungen war.

Aus diesem Grund wurde das System weiter verändert, sodass die Proben nicht mehr auf einen Objektträger abgelegt wurden, sondern direkt in ein mit TE-Puffer gefülltes Reaktionsgefäß gegeben wurden. Hierbei war eine besonders vorsichtige Handhabung notwendig, um die Kapillare nicht abzubrechen. Dies führte zu einem Verdünnungsschritt, der durch die folgende Amplifikation zu vernachlässigen war.

3.6 Kompatibilitätsuntersuchungen

Der hier beschriebene Chip bestand aus einem fotosensitiven Glas. Zu diesem Glas konnten keine weiteren Angaben in Bezug auf Kompatibilität zu biochemischen Reaktionen in der Literatur gefunden werden. Allerdings ist bekannt, dass Glas in der Lage ist Nukleinsäuren zu binden, was aus den Arbeiten von Marko und Dederich (Marko *et al.*, 1982, Dederich *et al.*, 2002) hervorgeht. Darüber hinaus sind inhibitorische Effekte von Silizium 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.

Wie stark die inhibierende Wirkung des Glases ist und ob eine Amplifikation in der Anwesenheit von Glas überhaupt möglich ist, wurde in diesem Teil der Arbeit untersucht. Um die Oberfläche des Chips zu simulieren, wurden für die nachfolgenden Versuche Glasperlen (Roth) verwendet. Als Erstes galt es zu überprüfen, welche Menge an Glasperlen eine inhibitorische Wirkung erzielt. Darüber hinaus wurde anhand des Durchmessers der Glasperlen die ungefähre Menge der Glasperlen bestimmt, die der Oberfläche des verwendeten Chips entsprechen würde. Dies waren etwa 20 mg. In dem ersten Versuch wurde ein Reaktionsansatz für eine Standard PCR, wie sie im Methodenteil beschrieben wurde, angesetzt. Diese Reaktion wurde mit einer steigenden Menge an Glas versehen. Diese Proben wurden einem PCR-Protokoll unterzogen und anschließend mithilfe der Agarosegelelektrophorese analysiert. Die Auswertung der gebildeten DNA Mengen erfolgte anhand der Intensität der spezifischen Banden und dem Bezug zum verwendeten DNA Größenstandard. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 26 dargestellt. Als Kontrolle diente ein Ansatz, bei dem kein Glas in der PCR-Reaktion vorhanden war.

3. Ergebnisse

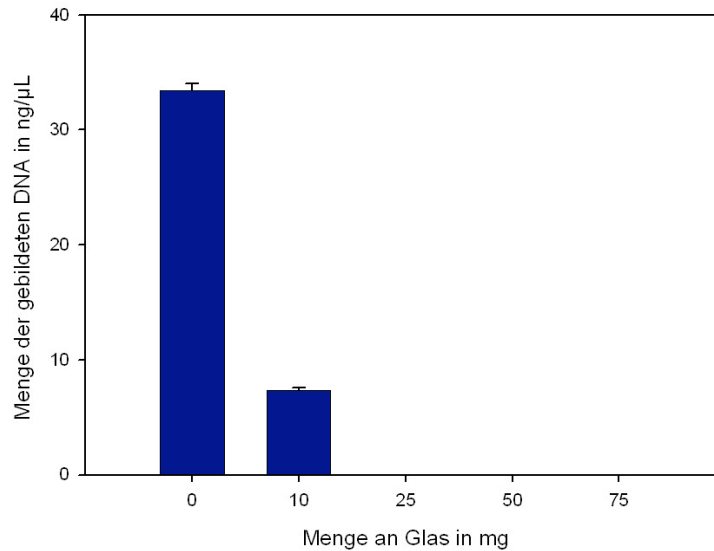


Abbildung 26: Grafische Darstellung der PCR in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge an Glas um die Oberfläche des Chips zu simulieren und den inhibitorischen Effekt des Glases zu untersuchen

Wie aus Abbildung 26 zu erkennen ist, wirken schon geringe Mengen (10 mg) an Glas stark inhibitorisch. Bei 25 mg Glas konnte keine Amplifikation mehr festgestellt werden. Die höheren Mengen an Glas von 25 mg bis zu 75 mg zeigten ebenfalls keine Amplifikate. Für die Optimierung der PCR-Bedingungen wurden 20 mg Glas eingesetzt, da diese Menge an Glas der ungefähren Oberfläche des Chips entsprach.

Nachdem die inhibitorische Wirkung des Glases eindeutig gezeigt wurde, sollte geklärt werden, wie man diese verhindern oder verringern konnte. In diesem Zusammenhang wurden einige Arbeiten in der Literatur gefunden, die sich mit ähnlichen Themen beschäftigten. In diesem Zusammenhang werden zwei Arten der Oberflächeninaktivierung unterschieden. Die dynamische Passivierung, bei der ein Aditiv zu der Reaktion hinzugegeben wird und die statische Passivierung, bei der vor der Reaktion das Glas behandelt wird. Bei der dynamischen Passivierung wird sehr häufig Rinderserum Albumin (BSA) verwendet. Dies hat schon in einigen Fällen zu einer Verbesserung der PCR geführt (Liu *et al.*, 2006, Schneegass *et al.*, 2001, Matsubara *et al.*, 2005, Pemov *et al.*, 2005). Neben dem BSA gibt es noch eine Reihe weiterer Aditive, die für die Passivierung eingesetzt werden könnten. An dieser Stelle ist zum Beispiel das Polyvinylpyrrolidon (PVP) zu nennen (Lou *et al.*, 2004, Giordano *et al.*, 2001). Darüber hinaus

3. Ergebnisse

sind noch Substanzen beschrieben, die das Schmelzverhalten der DNA beeinflussen. Dies sind in erster Linie DMSO und Betaine, welche als Mix angewendet wurden (Ralser *et al.*, 2006). Die positive Wirkung dieser Substanzen wurde auch einzeln und nicht als Mix in der Literatur erwähnt (Henke *et al.*, 1997, Pomp und Medrano, 1991, Kang *et al.*, 2005).

Nach eingehenden Literaturrecherchen wurden einige Substanzen herausgefunden, die einen positiven Einfluss haben könnten. Einheitliche Aussagen für die Verwendung und die entsprechenden Konzentrationen waren nicht zu finden. Daher war es notwendig die optimalen Konzentrationen der Aditive für die Chip PCR herauszufinden.

Als Erstes wurde versucht durch die unspezifische Bindung von Proteinen (BSA) oder Nukleinsäuren (tRNA) eine Verbesserung der Reaktion zu erhalten. Bei den ersten Untersuchungen wurden verschiedene Konzentrationen des BSA eingesetzt, die in einem Bereich zwischen 0 bis 0,5 % lagen. In diesem Bereich finden sich auch Angaben in der Literatur wieder. Darüber hinaus wurde ebenfalls untersucht, ob diese Konzentrationen einen negativen Effekt auf die Polymerase haben, wenn kein Glas vorhanden war. Diese Vermutung stützte sich darauf, dass BSA kein thermostabiles Protein ist und somit während der PCR bei Temperaturen von 94 °C denaturiert wird. Diese Denaturierung war gut zu erkennen, da nachdem die Proben dem Temperaturprogramm unterzogen worden waren, ein weißer Niederschlag in den Proben sichtbar war. Hierbei handelte es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um denaturiertes BSA.

Wie in Abbildung 27 gut zu erkennen ist, kann eine Passivierung der Oberfläche durch Zusatz

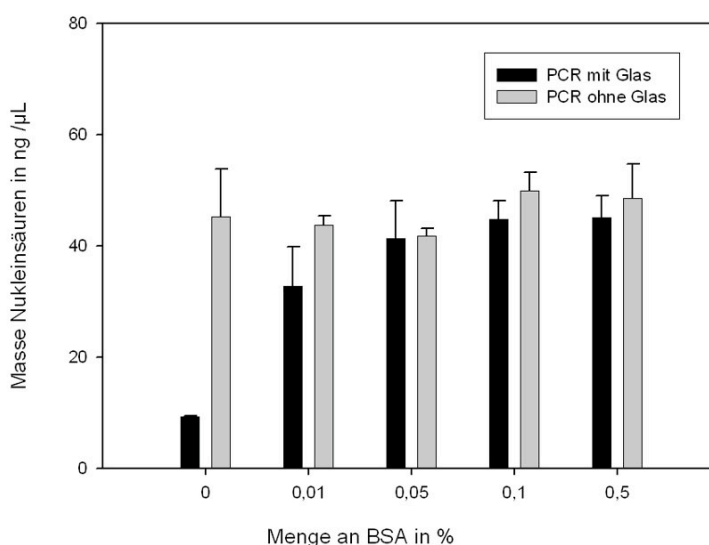


Abbildung 27 : Grafische Darstellung der PCR mit Glas in Abhängigkeit von der BSA-Konzentration

Die Reaktionen wurden in einem Standardreaktionsgefäß durchgeführt und mit 20 mg Glas versetzt.

3. Ergebnisse

von BSA erreicht werden. Schon bei einer Menge von 0,01 % BSA war eine deutliche Steigerung der gebildeten DNA-Menge zu beobachten. Der Anstieg geht bis zu einer BSA-Konzentration von etwa 0,1 % und geht dann in einen Sättigungsbereich über. Die gleichen Ansätze wurden auch ohne den Zusatz von Glas durchgeführt, wobei man keinen signifikanten Einfluss feststellen konnte.

Neben dem BSA wurde auch PVP getestet. Dieses wurde in der Literatur schon zur Oberflächenpassivierung von PDMS eingesetzt. (Lou *et al.*, 2004, Giordano *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde getestet, welchen Einfluss PVP auf die Passivierung von Glas hat und in welchem Bereich die optimalen Konzentrationen liegen. Der getestete Bereich erstreckte sich von 0 bis 5 %. Eine höhere Konzentration konnte aufgrund der Löslichkeit des PVPs nicht erreicht werden. In der Abbildung 28 kann man deutlich erkennen, dass das Maximum an gebildeter DNA bei 5 % PVP erreicht wurde, wenn in dem PCR-Ansatz Glas

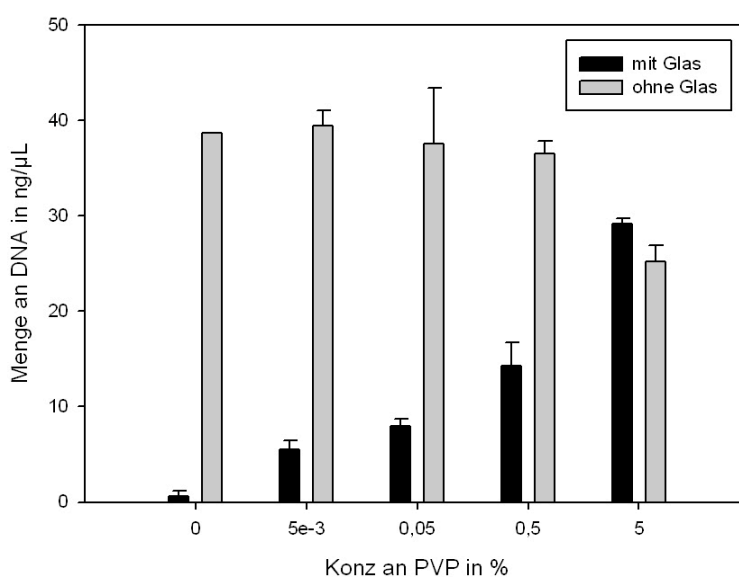


Abbildung 28: grafische Darstellung der PCR mit Glas in Abhängigkeit von der PVP-Konzentration

Die Reaktionen wurden in einem Standardreaktionsgefäß durchgeführt und mit 20 mg Glas versetzt.

vorhanden war. Es ist eine kontinuierliche Steigerung der gebildeten DNA-Menge von 0 nach 5 % zu beobachten. Bei dem Versuch, in dem PVP in eine PCR ohne Glas eingesetzt wurde, war eine inhibierende Wirkung bei einer Konzentration von 5 % festzustellen. Bei geringeren Konzentrationen scheint das PVP keinen Einfluss auf die Reaktion zu haben.

3. Ergebnisse

In weiteren Versuchen wurde untersucht, ob eine Passivierung auch durch den Zusatz von Nukleinsäuren erreicht werden konnte. Hierfür wurde tRNA in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt, was zuvor schon für die Passivierung von Oberflächen geschah (Gulliksen *et al.*, 2004). In jener Arbeit wurde zwar beschrieben, dass die tRNA für die Passivierung eingesetzt wurde, jedoch wurde nicht getestet, in welchen Konzentrationen eine optimale Wirkung erreicht werden konnte. Die Konzentration von 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ wurde von Gulliksen *et al.* eingesetzt. Hier wurden Konzentrationen zwischen 0 und 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ getestet.

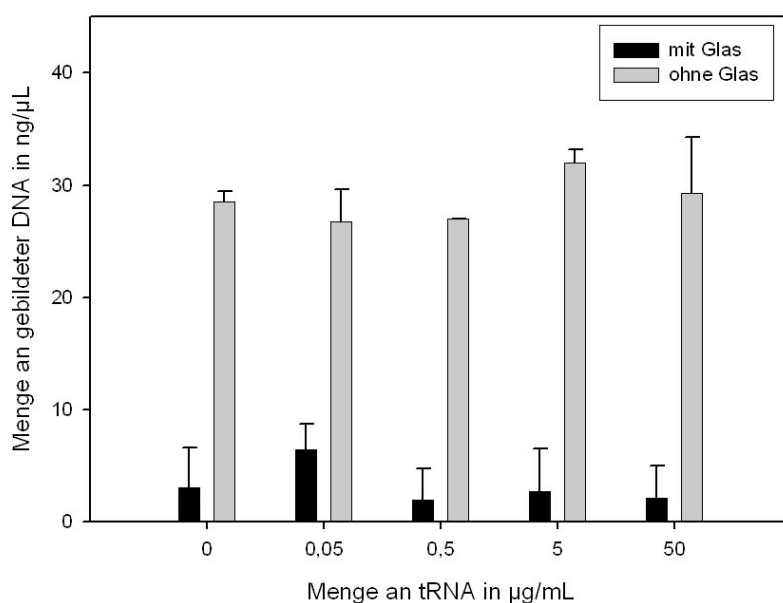


Abbildung 29: grafische Darstellung der PCR mit Glas in Abhängigkeit von der tRNA-Konzentration

Die Reaktionen wurden in einem Standardreaktionsgefäß durchgeführt und mit 20 mg Glas versetzt.

Wie aus Abbildung 29 hervorgeht, kann man keinen positiven Effekt des Zusatzes der tRNA feststellen. Die gebildete DNA-Menge konnte nicht signifikant gesteigert werden.

Diese Untersuchungen ließen die Frage aufkommen, welche der Substanzen aus dem Mix für die Polymerasekettenreaktion an das Glas bindet. Eine Bindung der DNA oder der Oligonukleotide war recht wahrscheinlich, da Glas auch für die Reinigung von Nukleinsäuren verwendet wird (Nanassy *et al.*, 2007). In der Literatur findet sich auch die Vermutung, dass die Polymerase an eine glasähnliche Oberfläche bindet (Erill *et al.*, 2003). Es wurde versucht herauszufinden, welche

3. Ergebnisse

der Komponenten an das Glas bindet und somit für die Reaktion nicht mehr zur Verfügung steht. Hierzu wurden die folgenden Komponenten getestet:

- Magnesium
- Taq-Polymerase
- Oligonukleotide
- dNTPs
- DNA

Da Glas an der Wandung durch die Silanolgruppen negativ geladen ist, wäre auch eine Bindung von negativ geladenen Komponenten unter Verwendung von Magnesium als zweiwertigem Ion denkbar gewesen. Um auch dies zu untersuchen, wurden auch die Kombinationen der aufgeführten Komponenten mit Magnesium getestet. Für diese Tests wurden die Komponenten zuvor in Puffer mit Glas für 20 Minuten inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und für

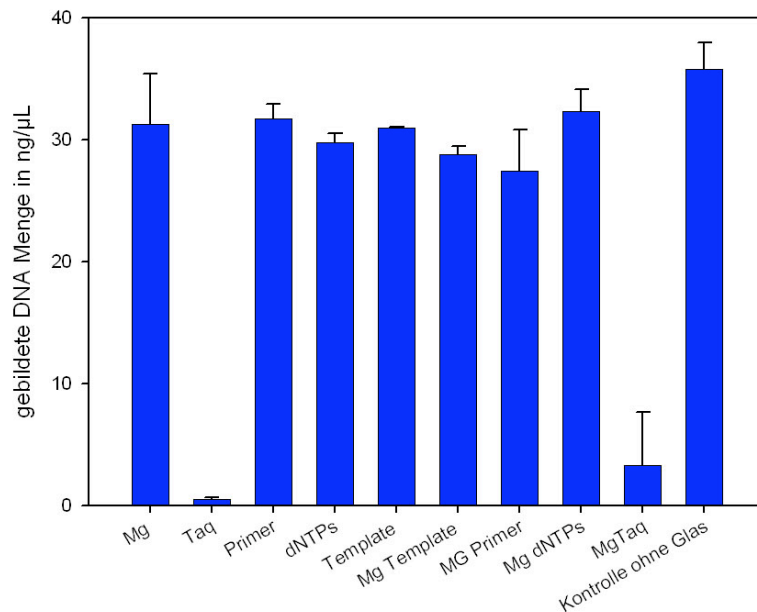


Abbildung 30: grafische Darstellung der PCR mit Komponenten, die zuvor mit Glas inkubiert wurden.

Jede einzelne Substanz wurde zuvor mit Glas inkubiert und anschließend für eine PCR eingesetzt.

3. Ergebnisse

die Amplifikation verwendet. Zum Vergleich wurde ein Ansatz mitgeführt, welcher kein Glas enthielt.

Durch diese Untersuchung (Abbildung 30) konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Polymerase nach der Inkubation keine Amplifikation mehr durchführen konnte. Auch in der Kombination mit Magnesium zeigte die Polymerase eine stark verminderte Amplifikationsleistung. Die angenommenen Interaktionen zwischen dem Glas und der DNA konnten nicht bestätigt werden. Auch die Kombinationen, bei denen es eventuell zu einer Bindung der DNA über das Magnesium kommen konnte, wurde nicht bewiesen.

Durch diese Ergebnisse bestand die Vermutung, dass es zu einer Bindung der Polymerase an das Glas kommt. Diese Vermutung bestätigt die Ergebnisse in Abbildung 27, bei denen die Leistung der Polymerase durch den Zusatz eines unspezifischen Proteins gesteigert werden konnte. Zur Absicherung dieser Ergebnisse wurde untersucht, in wie weit sich eine Steigerung der Polymerasekonzentration auswirken würde. Hierzu wurde wieder der Vergleich zwischen einer PCR, der Glas zugesetzt wurde und einer PCR ohne Glas herangezogen.

Wenn das Glas Interaktionen mit der Polymerase eingehen würde, dann sollte es möglich sein, durch Steigerung der Konzentration eine gesteigerte Amplifikation zu detektieren.

In Abbildung 31 kann man dies deutlich sehen. Durch Erhöhung der Konzentration der

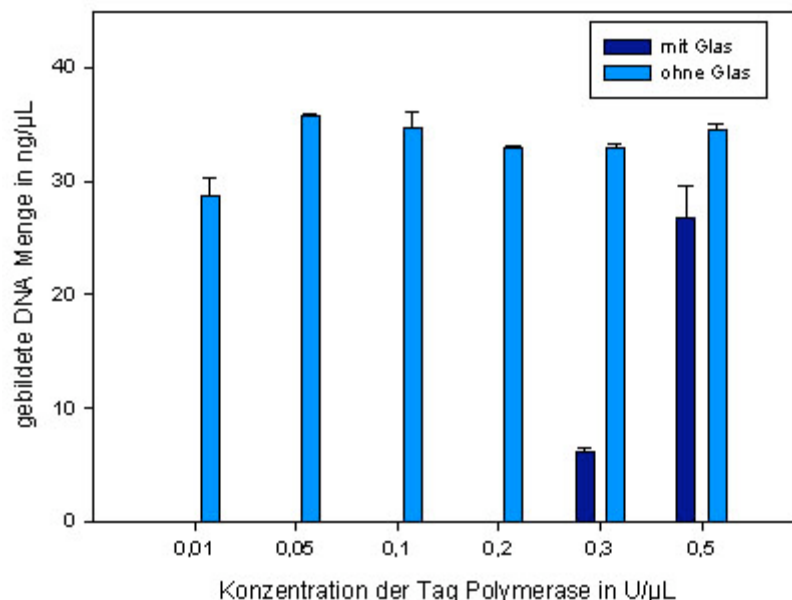


Abbildung 31: grafische Darstellung der PCR mit Glas in Abhängigkeit von der Polymerasekonzentration

Die PCR wurden mit steigender Polymerasekonzentration in Standardreaktionsgefäßen durchgeführt, wobei in einen Teil der Proben 20 mg Glas gegeben wurden.

3. Ergebnisse

Polymerase konnte eine erfolgreiche Amplifikation erreicht werden. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass es durch Erhöhung der Polymerasekonzentration zu einer Absättigung der Glasoberfläche gekommen ist. Die Konzentration der Polymerase wurde gegenüber den Reaktionen ohne Glas um den Faktor 10 erhöht und erreichte dadurch noch immer nicht die gleiche Amplifikationsleistung, die ohne den Zusatz von Glas möglich war. Die gleiche Steigerung der Amplifikation war auch durch den Zusatz von BSA (Abbildung 27) oder PVP (Abbildung 28) zu erreichen, was gegenüber der Polymerase die preiswertere Alternative ist.

Es konnte also eine Steigerung der Amplifikation in Anwesenheit von Glas durch die Zugabe von BSA und von PVP gezeigt werden. Aufgrund dieser Resultate wurde untersucht, ob eine weitere Steigerung durch die Kombination dieser Substanzen möglich wäre. Hierzu wurde ein statistischer Versuchsplan aufgestellt. Die beiden Substanzen wurden auf einem hohen und einem niedrigen Niveau untersucht. Bei den hohen Konzentrationen wurde bei BSA 0,1 %, bei PVP 5 % verwendet und bei den geringen Konzentrationen waren es bei BSA 0,01 % und bei PVP 0,5 %. Auch hier wurde die Differenz zwischen Reaktionen, welche Glas enthielten und denen die kein Glas enthielten sichtbar. Durch diesen Versuch konnte keine weitere Steigerung

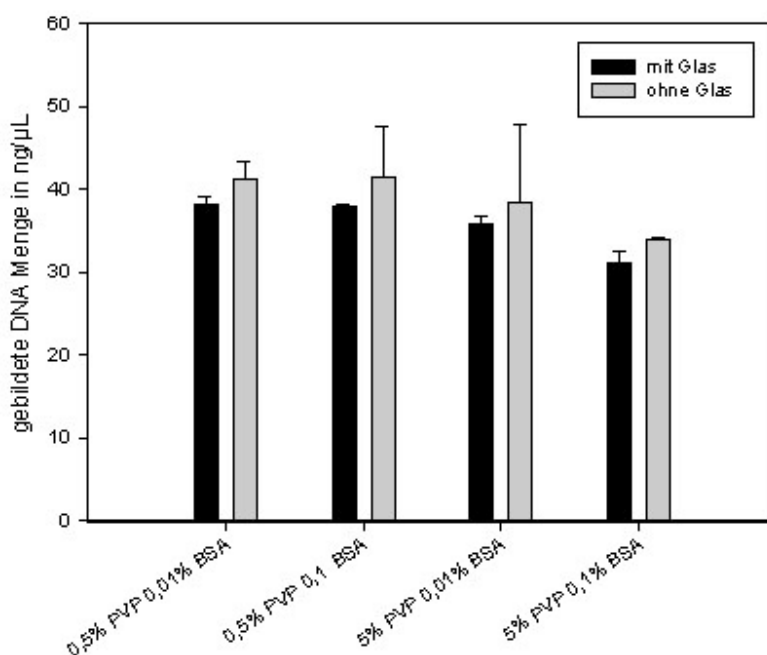


Abbildung 32: grafische Darstellung des statistischen Versuchsplans, bei dem die PCR mit Glas und Zusatz von PVP und BSA auf zwei Niveaus getestet wurden

der Leistung der PCR erreicht werden. Bei der statistischen Auswertung des Versuches zeigte

3. Ergebnisse

sich, dass PVP in höheren Konzentrationen einen inhibierenden Effekt hatte. Dieses Ergebnis stimmt auch mit den Beobachtungen in Abbildung 28 überein. Es konnte also gezeigt werden, dass mit einer dynamischen Passivierung eine Inaktivierung der Polymerase verringert werden konnte.

Abschließend sollte untersucht werden, ob verschiedene PCR-Verstärker (Enhancer) einen Einfluss auf die PCR mit Glas haben. Hierzu wurden drei verschiedene Enhancer getestet und diese Proben mit denen verglichen die keine Enhancer beinhalteten. Bei den PCR-Verstärkern handelte es sich um Q-Solution (Qiagen), den 10x PCR-Enhancer (Invitrogen) und einem Gemisch aus BSA und Betaine, welches in früheren Arbeiten gute Ergebnisse erzielten (Ralsler *et al.*, 2006). Wie bereits aus Abbildung 33 hervorgeht, konnte durch den Zusatz von verschiedenen Enhancern die Effektivität der PCR deutlich gesteigert werden. Dies ist bei dem Vergleich der Proben, in welchem Glas und kein Enhancer vorhanden war, mit den Proben, in welchen die drei verschiedenen Enhancer vorhanden waren, gut zu erkennen. Auch bei der Probe, welche kein Glas enthielt, war eine Steigerung durch die Verwendung von verschiedenen Enhancern möglich. Darüber hinaus wurde untersucht, ob eine weitere Steigerung durch die Verwendung von BSA in einer Konzentration von 0,1 % möglich wäre. Wie bereits schon beschrieben, hat BSA einen signifikant positiven Einfluss auf die PCR, wenn Glas vorhanden ist. Bei dem Vergleich der

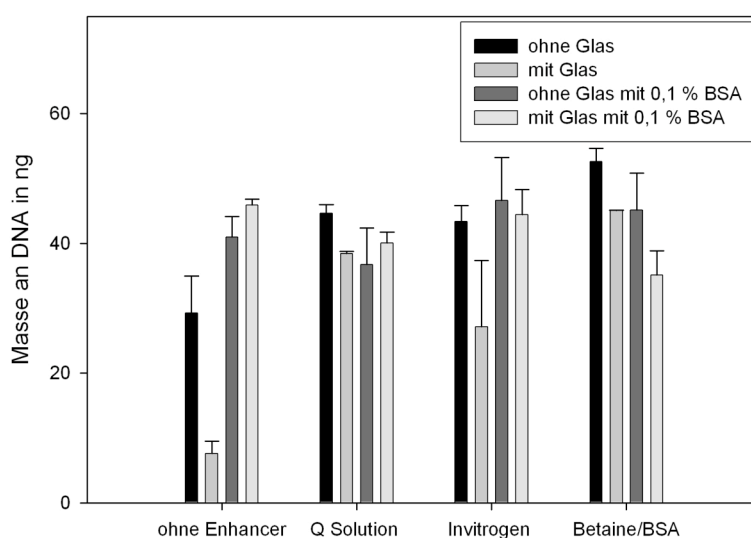


Abbildung 33: grafische Darstellung der PCR mit Glas in Abhängigkeit vom verwendeten Verstärker. Die Reaktionen wurden im Standardreaktionsgefäß durchgeführt und mit 20 mg Glas versetzt.

Abbildung 33 mit der Abbildung 27 kann man feststellen, dass sich die alleinige Zugabe von BSA

3. Ergebnisse

genauso stark auswirkt wie der Zusatz von verschiedenen Enhancern mit BSA. Es konnte keine signifikante Verbesserung der Amplifikation gegenüber der Amplifikation mit BSA erreicht werden. Aus diesem Grund wurde bei den folgenden Versuchen auf die Verwendung des Enhancers verzichtet. Bei den bis hierhin beschriebenen Methoden handelte es sich um dynamische Passivierungen.

In der Literatur sind neben der dynamischen Passivierung auch noch statische Methoden beschrieben, bei denen die Oberfläche beschichtet wird. Auch bei der statischen Passivierung wurde BSA in der Literatur beschrieben (Burns *et al.*, 1998, Hong *et al.*, 2001, Khandurina *et al.*, 2000). Neben Substanzen wie dem BSA werden häufig Silane für die statische Passivierung verwendet. Das Dichlordimethylsilan wurde mehrfach in der Literatur für die Beschichtung von Oberflächen verwendet, um diese mit biochemischen Reaktionen kompatibel zu machen (Kopp *et al.*, 1998, Obeid *et al.*, 2003, Felbel *et al.*, 2004). Bei der Verwendung von Glas hat sich die Beschichtung mit verschiedenen Silanen durchgesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Silane getestet. Zum einen das Dichlordimethylsilan (DCDMS), welches zu einer hydrophoben Oberfläche führt, und zum anderen das Aminopropyltriethoxysilan, welches zu einer hydrophilen Oberfläche führt.

Zur Untersuchung der Kompatibilität der PCR mit den beiden Silanen wurde Glas mehrfach mit Wasser und Ethanol gesäubert und anschließend in eine 2%ige Lösung des Silans in Aceton gegeben. Nach diesem Schritt wurde das Glas mehrfach mit Aceton gewaschen, getrocknet und dann zur PCR eingesetzt. Da sich BSA und PVP schon als sehr effektiv für die Verstärkung der PCR gezeigt hatten (Abbildung 27, Abbildung 28), wurde das beschichtete Glas auch in der Kombination mit diesen Zusätzen untersucht. Für beide Substanzen wurde die zuvor bestimmte optimale Konzentration eingesetzt.

3. Ergebnisse

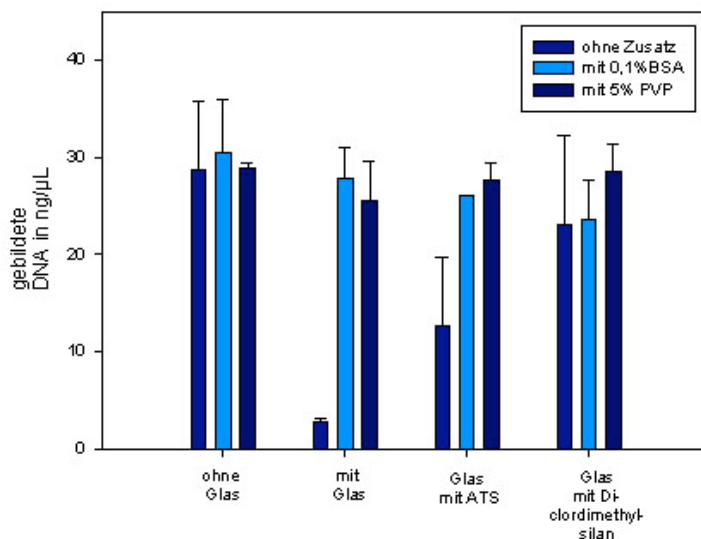


Abbildung 34: grafische Darstellung der PCR mit beschichtetem Glas unter Zusatz von BSA und PVP. Die Reaktionen wurden im Standardreaktionsgefäß durchgeführt und mit 20 mg Glas versetzt.

Wie in Abbildung 34 zu erkennen, haben die unterschiedlichen Beschichtungen verschiedene Einflüsse. So konnte in beiden Fällen eine signifikante Steigerung der Amplifikation erreicht werden. Durch die Beschichtung mit ATS wurde eine Steigerung um den Faktor 4,5 gegenüber der Amplifikation, bei der unbehandeltes Glas zugesetzt wurde, erreicht. Eine deutlich größere Steigerung war bei der Amplifikation mit einer Dichlordimethylsilanbeschichtung zu beobachten. Hier wurde ein Faktor von 8,2 gegenüber unbehandeltem Glas erzielt. Eine weitere Steigerung war durch den Zusatz von PVP möglich. In diesem Fall war die Amplifikation mit der zu vergleichen, bei der kein Glas hinzugesetzt wurde. Aus den Erkenntnissen der vorangegangenen Seiten wurde versucht, eine PCR im Chip durchzuführen.

3.7 Chip PCR

Die Optimierung, die in Standardreaktionsgefäßen durchgeführt wurde, sollten auf den Chip übertragen werden. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass es eine Vergrößerung des Oberfläche- zu Volumen-Verhältnis gab. Auf den zunehmenden Einfluss der Oberfläche machte schon Krishnan (Krishnan *et al.*, 2004) aufmerksam. Dass die Bedingungen der Amplifikation für ein großes Oberflächen- zu Volumenverhältnis signifikant verschieden von denen in einem Standardreaktionsgefäß sind, zeigte Taylor (Taylor *et al.*, 1997).

Der Nachweis von Polymerasekettenreaktionen in einem geringen Volumen wurde in der Literatur auf verschiedenen Wegen beschrieben. Als Erstes ist hier die Beobachtung einer

3. Ergebnisse

Fluoreszenzzunahme bei der Verwendung von TaqMan-Proben (Matsubara *et al.*, 2002, Nagai *et al.*, 2001, Matsubara *et al.*, 2005) zu nennen. Eine zweite Möglichkeit wurde an verschiedenen Stellen bei der Verwendung von mikrofluidischen Systemen beschrieben. Bei diesen Chips wurde eine PCR mit einer Kapillarelektrophorese auf einem Chip vereint.

In dem hier vorgestellten System wurden zwei andere Wege gewählt, um die PCR nachzuweisen. Bei der ersten Methode wurde die Gesamtheit der Proben analysiert. Hierzu wurde eine PCR im Chip unter Verwendung von radioaktiv markiertem α ^{32}P -dCTP durchgeführt. Anschließend wurden mithilfe der in Abbildung 23 dargestellten Absauganlage die Proben aus dem Chip gesaugt und dieser mit 1 mL TE-Puffer gespült. Das hieraus resultierende Volumen war für die gelelektrophoretische Auftrennung zu groß und musste reduziert werden. Darüber hinaus war die Probe aus dem Chip nach dem Absaugen noch mit Öl kontaminiert, welches sich bei der Elektrophorese negativ auswirken würde. Beide Probleme ließen sich durch die Fällung mit Ammoniumacetat lösen. Das Ammoniumacetat hatte noch den Vorteil, dass ein Großteil der nicht eingebauten dNTPs mit entfernt wurde. Die so gewonnenen Proben wurden durch ein Agarosegel aufgetrennt. Nach der Auftrennung folgte die Fixierung der Proben im Gel durch Trichloressigsäure (TCA). Das Gel wurde getrocknet und auf einen PhosphorImager-Screen gelegt. Nach dem Scannen dieses Screens konnte folgendes Bild (Abbildung 35) aufgenommen werden:

3. Ergebnisse

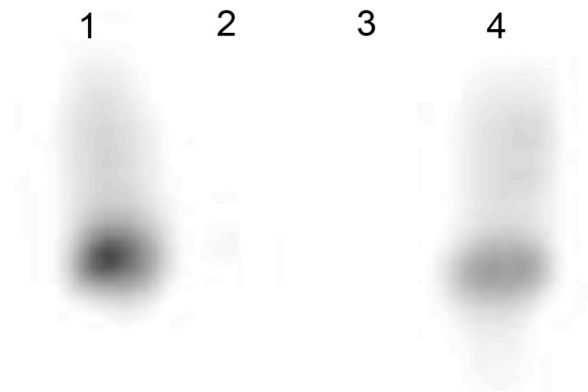


Abbildung 35: Darstellung der Autoradiografie von dem Vergleich einer PCR im Chip und einer in einem Standardreaktionsgefäß

- Spur 1: PCR aus dem Chip 10 μ L**
- Spur 2: Negativkontrolle aus dem Chip 10 μ L**
- Spur 3: Negativkontrolle aus dem Tube 5 μ L**
- Spur 4: PCR aus dem Tube 5 μ L**

Die Abbildung 35 zeigt den Vergleich der Amplifikation in einem Kapillarchip und in einem Standardreaktionsgefäß. Die Intensitäten der beiden Banden sind nicht direkt miteinander zu vergleichen, da bei der Spur 1 die doppelte Volumen aufgetragen wurde. Das veränderte Auftragsvolumen wurde gewählt, um etwa gleiche Intensitäten auf dem Gel zu erhalten. Bei vorangegangenen Versuchen wurde dieser Punkt nicht berücksichtigt und die Proben aus dem Chip und die aus dem Standardreaktionsgefäß direkt nebeneinander aufgetragen. Dies führte dazu, dass die Probe aus dem Chip nicht mehr detektiert werden konnte, da die Strahlung in der zweiten Probe zu stark war. Die Negativkontrollen in den Spuren 2 und 3 in Abbildung 35 zeigen keine Banden. Sowohl im Chip (Spur 1) als auch im Tube (Spur 4) konnte man einen leichten Schmier nach oben erkennen.

Nachdem gezeigt wurde, dass in dem Chip eine Amplifikation erfolgen konnte, sollte diese Amplifikation auch für die einzelne Kapillare gezeigt werden. Hierzu wurde in die quantitative PCR eingesetzt.

3. Ergebnisse

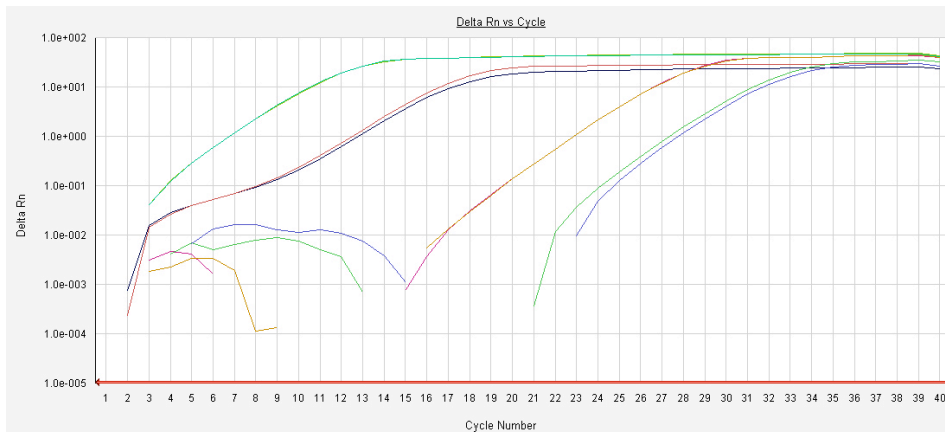


Abbildung 36: grafische Darstellung der quantitativen PCR nach erfolgter PCR im Chip. Hierzu wurden mit dem Mikromanipulator vor der PCR aus dem Chip Proben entnommen und mit Proben verglichen, die nach erfolgter PCR entnommen wurden. Die entnommenen Proben dienten als Ausgangsmaterial für die quantitative PCR.

Kurven von links nach rechts

Probe nach Chip-PCR mit $2 \cdot 10^5$ Molekülen (2x grün)

Probe nach Chip-PCR mit $4 \cdot 10^2$ Molekülen (lila + blau)

Probe vor Chip-PCR mit $2 \cdot 10^5$ Molekülen (2x braun)

Probe vor Chip-PCR mit $4 \cdot 10^2$ Molekülen (grün + blau)

Es wurde ein Chip mit einem vollständigen PCR-Ansatz befüllt, dieser in das Ölbad gelegt und anschließend mehrere Proben mit dem Mikromanipulator entnommen. Diese Proben stellten die Ausgangssituation des Chips dar. Das Ölbad mit dem Chip wurde einem PCR-Temperaturprogramm unterzogen. Nach 35 Cycles wurden aus dem Chip wieder Proben entnommen und auch diese zur quantitativen PCR eingesetzt. Bei dieser Reaktion sollten sich die CT-Werte der Proben vor und nach der PCR deutlich voneinander unterscheiden.

Dies kann man eindeutig in der Abbildung 36 erkennen. Hier sind die Kurven von zwei verschiedenen Chips dargestellt, wobei zwei unterschiedliche Konzentrationen eingesetzt wurden. Mithilfe einer Eichgeraden konnte bestimmt werden, wie viele Moleküle vor und nach der Chip-PCR in den Kapillaren enthalten waren. Bei der höheren Konzentration lagen vor der PCR etwa 2×10^5 Moleküle vor, und nach der PCR im Chip konnten 9×10^9 Moleküle detektiert werden. Bei der zweiten Probe wurden als Ausgang 4×10^2 Moleküle eingesetzt und nach der PCR im Chip wurden 8×10^7 Moleküle ermittelt. Hier konnte ein Amplifikationsfaktor von 10^5 ermittelt werden.

3. Ergebnisse

Für die bessere Darstellung wurden die Kurven aus der Abbildung 36 ausgewertet und mithilfe der Eichgeraden die enthaltenen Molekülzahlen berechnet. Diese sind in der folgenden Grafik (Abbildung 37) dargestellt. Die Anreicherung der DNA durch die PCR im Chip ist hier deutlich zu erkennen.

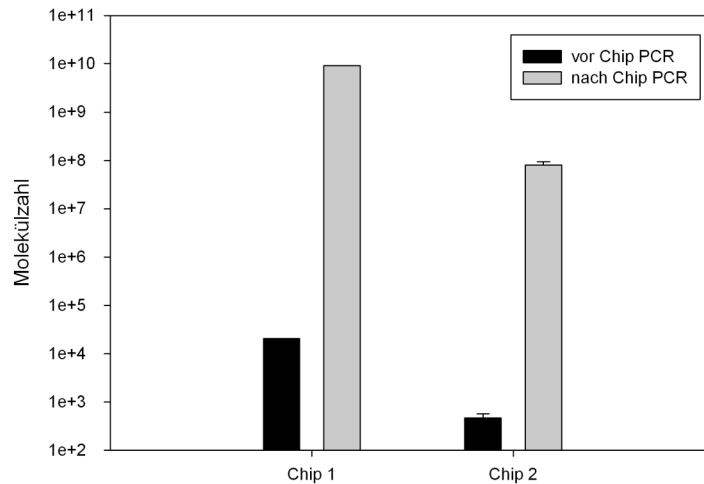


Abbildung 37: grafische Darstellung der quantitativen PCR vor und nach der PCR im Chip. In den beiden dargestellten Chips wurden unterschiedliche Verdünnungen der Zielmoleküle in der Chip PCR verwendet.

Durch die Verwendung einer anderen Polymerase sollte getestet werden, ob eine höhere Amplifikationsrate erreicht werden kann. Hierfür wurde die Phusion-Polymerase (NEB) ausgewählt, welche sich durch eine besonders hohe Prozessivität auszeichnet. Diese hohe Prozessivität beruht auf der Verbindung von einer Polymerase mit einem Protein, welches unspezifisch an einen DNA-Doppelstrang bindet (Yan Wang, 2004).

3. Ergebnisse

Durch die Verwendung dieser Polymerase sollte die Geschwindigkeit der Reaktion erhöht werden können. Der Versuch wurde analog zu dem in Abbildung 37 dargestellten Experiment

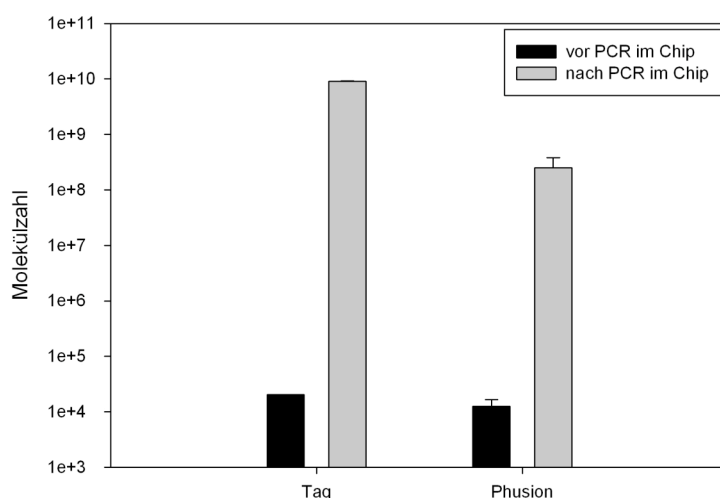


Abbildung 38: grafische Darstellung des Vergleichs von zwei Polymerasen im Chip durch quantitative PCR

durchgeführt. Die Proben unterschieden sich nicht in der eingesetzten DNA-Menge, sondern in der verwendeten Polymerase.

Aus der Abbildung 38 kann man entnehmen, dass die Phusion ebenfalls für die Amplifikation im Chip geeignet ist, jedoch konnte mit der Taq-Polymerase eine höhere Amplifikation erreicht werden. Die Ausgangskonzentrationen sind in beiden Fällen identisch. Für die weiteren PCR-Reaktionen im Chip wurde die Taq-Polymerase verwendet. Nachdem die PCR im Chip sowohl für die einzelne Kapillare (Abbildung 36, Abbildung 37, Abbildung 38) als auch für den gesamten Chip (Abbildung 35) gezeigt werden konnte, sollte versucht werden ein einzelnes DNA-Molekül im Chip zu amplifizieren.

3.8 Einzelmolekül-PCR

Die erste Einzelmolekül-PCR wurde von Nakamura (Nakamura *et al.*, 1993) beschrieben. In der Arbeit von Nakamura war die RNA der Ausgangspunkt der Amplifikation. Hier fand als erste Reaktion die Synthese der DNA statt. Die Möglichkeit der Amplifikation von Einzelmolekülen wurde auch durch Vogelstein gezeigt (Vogelstein und Kinzler, 1999). Der Nachweis, der Einzelmolekül-PCR in der Literatur erfolgte zum einen über die statistische Verteilung (Nakano *et al.*, 2005) als auch über die Randomisierung der Nukleotidsequenz mit anschließender

3. Ergebnisse

Sequenzierung (Ohuchi *et al.*, 1998). Ein weiterer Ansatz ist die Amplifikation von verschieden großen Fragmenten mit anschließender Elektrophorese (Fradkov *et al.*, 1998, Lukyanov *et al.*, 1996).

In dieser Arbeit wurde zuerst versucht die Ergebnisse von Lukyanov und Siebert (Lukyanov *et al.*, 1996, Siebert *et al.*, 1995) auf den Chip zu übertragen und die genomische DNA des Phi X 174 Phagen zu amplifizieren. Hierzu wurde das Genom des Phagen mit Restriktionsenzymen zerschnitten und die Fragmente, welche sich in der Größe unterschieden, anschließend amplifiziert. Die verschiedenen Größen von DNA-Fragmenten konnten durch die Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden. Über diesen Weg kann man eine Vereinzelnung der Fragmente durch die Verwendung der Einzelmolekül PCR zeigen. Bei der Amplifikation von Einzelmolekülen wurde ein ähnliches System von Nakano verwendet (Nakano *et al.*, 2005).

Die in der Literatur beschriebenen Systeme stellten eine Grundlage für das in dieser Arbeit gezeigte System dar. In dem ersten Versuch hierzu wurde das mit Hae III geschnittene Phi X 174 Genom verwendet und an die Enden Restriktionsfragmente Oligonukleotide ligiert. Durch die Ligation von Oligonukleotiden an beide Seiten der Fragmente sollten diese durch die Polymerasekettenreaktion amplifiziert werden. Die verwendeten Oligos wurden zuvor miteinander hybridisiert, um dann an die Fragmente ligieren zu können.

Bei diesen Versuchen konnte das Gelbild (Abbildung 39) aufgenommen werden. In dieser Abbildung sind nur noch die größeren Fragmente des Phi X 174-Genoms zu erkennen, wobei keine klaren Banden erzielt werden konnten. Dies ist besonders deutlich, wenn man die Spuren 1 (nach der Ligation) und die Spur 2 (vor der Ligation) miteinander vergleicht. Es wurde versucht die Probe 1 zur PCR einzusetzen, was jedoch nicht zum Erfolg führte.

Hierbei entstand sich die Vermutung, dass es Probleme geben könnte, wenn an beiden Seiten der Fragmente dieselben Sequenzen ligiert wurden. Dies könnte bei Anlagerung der Primer in der PCR dazu führen, dass die einzelsträngige DNA mit sich selbst paart und dadurch keine Anlagerung von Primern mehr möglich ist. Wenn dies der Fall ist, sollte man dieses durch Erhöhung der Primerkonzentration erkennen können.

3. Ergebnisse

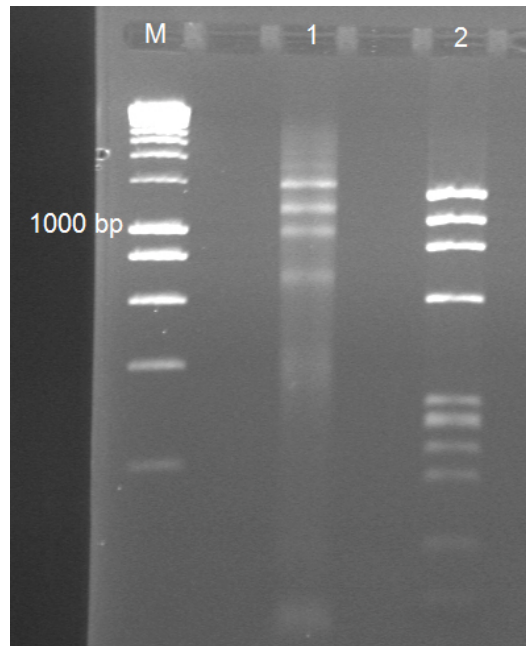


Abbildung 39: Darstellung der Agarosegelelektrophorese nach der Ligation der Linker an das mit Hae III geschnittene Phi X 174-Genom

M: Marker Hyper Ladder I

1: Ligation der Linker an phi X 174

2: Phi X 174 ohne Linker

3.8.1 Untersuchung des Homo-Tails

Die Amplifikation mit nur einem Primer wurde von Brownie (Brownie *et al.*, 1997) als Methode angeführt, um die Anreicherung von Primerdiemeren zu verhindern. Gerade bei der Amplifikation von Einzelmolekülen könnten diese sich als störend erweisen (Nakano *et al.*, 2000). Jedoch führten die Beobachtungen aus der vorliegenden Arbeit zu der Annahme, dass es bei der Amplifikation mit nur einem Primer zu den Schwierigkeiten der Selbstanlagerung der Fragmente kommen kann. Um dies zu überprüfen, wurde eine vergleichende PCR mit eigenem Primer und mit einem Primerpaar angefertigt. Darüber hinaus ist durch die Erhöhung der Primerkonzentration festzustellen, ob ein verändertes Anlagerungsverhalten auftritt und dadurch eine höhere Menge an DNA amplifiziert werden kann. Um dies zu klären, wurden Vektoren hergestellt, die Fragmente des YFP-Gens enthielten. Es wurden durch PCR-Reaktionen an die Fragmente Sequenzen angehängt, die im 3'- und im 5'-Bereich der DNA homolog waren. Der Aufbau der Fragmente ist der folgenden Abbildung (Abbildung 40) zu entnehmen.

3. Ergebnisse

Die Amplifikation der Fragmente wurde in Abhängigkeit der Primerkonzentration verglichen. Hierbei war zu berücksichtigen, dass bei den Reaktionen mit nur einem Primer jeweils die

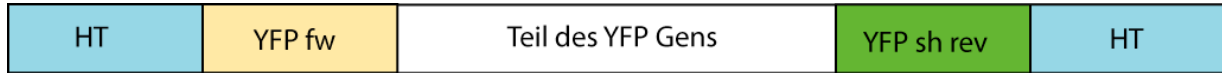


Abbildung 40: Darstellung des Fragments für den Test des Bindungsverhaltens der Primer

HT stellt die homologen Bereiche dar

YFP fw und YFP sh rev stellen die Primer dar, die für eine Standardamplifikation eingesetzt werden. Das Produkt was mit diesem Primerpaar entsteht ist um 40 bp kürzer als das mit den HT Primern

doppelte Konzentration verwendet wurde, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Nach erfolgter PCR und anschließender Gelelektrophorese, konnte das folgende Bild (Abbildung 41) aufgenommen werden. Man kann hier einen deutlichen Unterschied im Amplifikationsverhalten

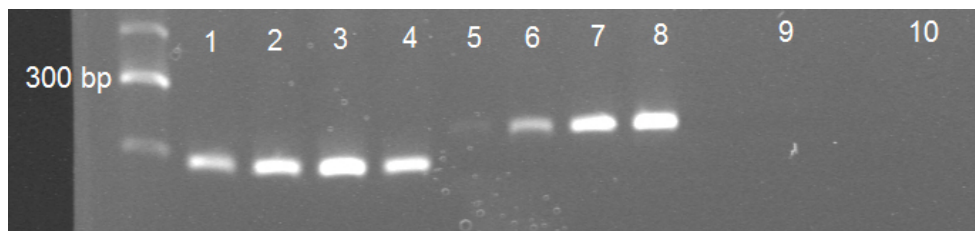


Abbildung 41: Darstellung der Agarosegelelektrophorese (2% Agarose) nach der PCR zum Vergleich der Amplifikation mit einem und zwei Primern um das Bindungsverhalten aufzuklären.

- 1: Amplifikation mit zwei Primer mit je 200 nM
- 2: Amplifikation mit zwei Primer mit je 400 nM
- 3: Amplifikation mit zwei Primer mit je 800 nM
- 4: Amplifikation mit zwei Primer mit je 1000 nM
- 5: Amplifikation mit einem Primer mit 400 nM
- 6: Amplifikation mit einem Primer mit 800 nM
- 7: Amplifikation mit einem Primer mit 1600 nM
- 8: Amplifikation mit einem Primer mit 2000 nM
- 9: Negativkontrolle mit zwei Primern ohne DNA
- 10: Negativkontrolle mit einem Primer ohne DNA

feststellen. Die Spuren 1 bis 4 in Abbildung 41 zeigen alle eine gute Amplifikation, wobei man eine Steigerung der Amplifikation durch Erhöhung der Primerkonzentration feststellen konnte. Dies gilt mit einer Einschränkung, denn die Probe, bei welcher der Primer mit einer

3. Ergebnisse

Konzentration von 1000 nM eingesetzt wurde, zeigte eine geringere Amplifikation. Darüber hinaus ist festzustellen, dass die Amplifikate kleiner sind, als die in den Spuren 5-8, was durch die Konstruktion des Zielmoleküls zu erklären ist (Abbildung 40).

Vergleicht man die Spuren 1-4 mit den Spuren 5-8 in Abbildung 41, so kann man feststellen, dass die Amplifikation mit nur einem Primer schlechter funktioniert und erst durch die Erhöhung der Primerkonzentration eine vergleichbare Amplifikation stattgefunden hat. Die oben aufgestellte Vermutung bestätigte sich durch dieses Ergebnis. Aus diesem Grund wurde bei den weiteren Versuchen immer mit zwei Primern gearbeitet. Um die Bildung von unspezifischen Amplifikationen zu verringern, wurde auf eine Zwei-Schritt-PCR zurückgegriffen, bei der verschachtelte Primer verwendet wurden.

3.8.2 Herstellung einer Bibliothek

Für den Nachweis der Single Molecule-PCR wurde der erste Teil des YFP-Gens verwendet. Durch die Polymerasekettenreaktion wurden Fragmente hergestellt, welche durch die Verwendung eines einzelnen Primerpaars amplifiziert werden konnten. Eine schematische Darstellung der Herstellung ist in Abbildung 42 zu sehen.

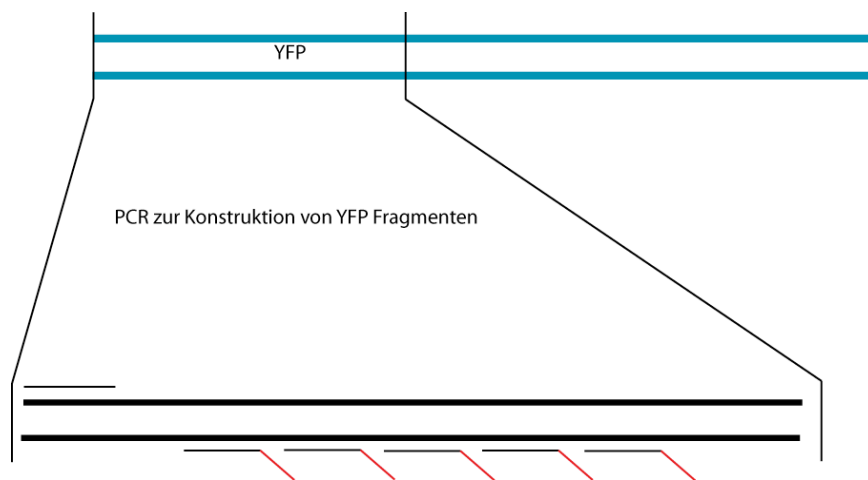


Abbildung 42: grafische Darstellung der Strategie zur Herstellung der Fragmente für den Nachweis der Einzelmolekül-PCR. Hierzu wurden mehrere sequenzspezifische Oligonukleotide verwendet, die einen identischen 5'Bereich aufweisen. Dieser 5'Bereich diente anschließend für die Anlagerung des Primers

Durch diesen Ansatz entstanden Fragmente, die man mit einem Primerpaar amplifizieren konnte und die alle eine unterschiedliche Größe hatten, sodass man sie durch die Auftrennung in der Gelelektrophorese unterscheiden konnte (Abbildung 43).

3. Ergebnisse

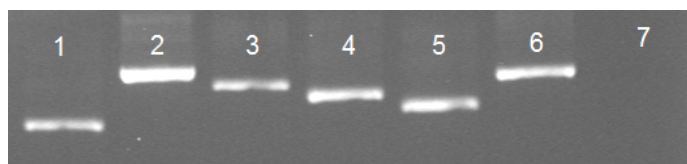


Abbildung 43: Darstellung der Agarosegelelektrophorese nach der Amplifikation mit einem Primerpaar zur Herstellung der Fragmente unterschiedlicher Größe (272 bp, 381 bp, 357 bp, 343 bp, 308 bp und 402 bp)

Spur 1-6: Fragmente für Einzelmolekül-PCR

Spur 7: Negativkontrolle ohne DNA

Die hergestellten Fragmente wurden mit demselben Primerpaar amplifiziert, welches in Abbildung 43 dargestellt wurde. Um immer gleich bleibendes Material zu erhalten, wurden diese Fragmente mithilfe des pGEM T easy Kit (Promega) in einen Vektor eingeführt, dieser in *E.coli* transformiert und anschließend das Plasmid aus diesem Vektor aufgereinigt. Die so gewonnenen Plasmide wurden in einem molarem Verhältnis gemischt und zur PCR im Chip eingesetzt.

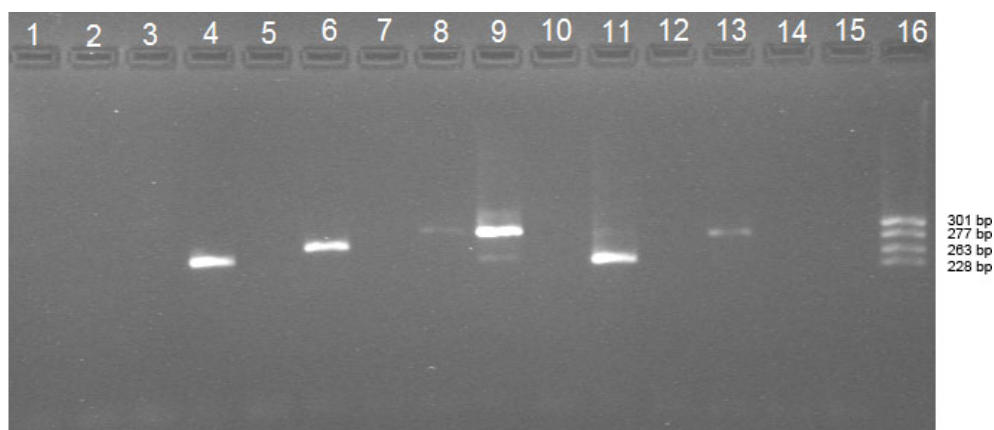


Abbildung 44: Darstellung der Agarosegelelektrophorese (2%) nach der PCR im Chip und einer zweiten PCR im Standardreaktionsgefäß

1-15: Proben aus verschiedenen Kapillaren im Chip

16: das Ausgangsgemisch der Proben, welches im Standardreaktionsgefäß amplifiziert wurde und nicht durch den Chip vereinzelt wurde

Für die erste PCR, welche im Chip stattfand, wurden Primer verwendet, welche an den Vektor binden konnten. Nachdem die erste PCR im Chip stattgefunden hatte, wurden Proben mithilfe des Mikromanipulators aus dem Chip entnommen und in eine zweite PCR überführt. Hierbei wurden die inneren Primersequenzen verwendet. Die dabei amplifizierten Fragmente waren

3. Ergebnisse

jeweils 80 bp kleiner. Um auch Einzelmoleküle zu erreichen, wurde im Vorfeld versucht, die Konzentrationen der Vektoren so genau wie möglich zu bestimmen. Hierzu wurde die Methode mit Pico Green verwendet, um zu gewährleisten, dass die geeignete Konzentration im Chip eingesetzt wurde. Es wurden verschiedene Verdünnungen verwendet. Eine der Verdünnungen wurde in der Abbildung 44 dargestellt.

Was man in dieser Abbildung gut erkennen kann, ist, dass in einigen Spuren keine Amplifikate zu detektieren sind. Des Weiteren sind Spuren vorhanden, in denen Amplifikate unterschiedlicher Größe zu erkennen sind. Die Ausgangslösung für die Vereinzelung im Chip ist in Spur 16 aufgetragen. In Spur 9 und 11 scheinen mehrere Ausgangsmoleküle vorhanden gewesen zu sein, da in diesen Spuren zwei Banden sichtbar sind. Die unterschiedliche Intensität der Banden ist wahrscheinlich auf die Probenentnahme aus dem Chip zu zurückzuführen, bei der der Mikromanipulator eingesetzt wurde. Eine genaue Dosierung war mit dem Mikromanipulator nicht möglich.

3.9 Immobilisierung der Oligonukleotide

Nachdem gezeigt wurde, dass eine Vereinzelung der Fragmente realisiert werden konnte, musste eine Methode gefunden werden, um die Flüssigkeit aus den Kapillaren zu entfernen. Dabei durfte die gebildete DNA nicht mit entfernt werden.

Die einfachste Möglichkeit die Flüssigkeit zu entfernen, war das Öl durch eine Zentrifugation zu beseitigen und im Anschluss die Flüssigkeit in den Kapillaren verdunsten zu lassen. Diese Methode konnte recht einfach realisiert werden unter der Verwendung des Adapter Combi Slide (Eppendorf). Dabei handelte es sich um einen Adapter, in dem es möglich war, die Chips zu zentrifugieren und dadurch das Öl von der Oberfläche zu entfernen. Diese Methode hatte den Nachteil, dass alle Bestandteile der PCR-Reaktion auch in der Nachfolgenden *in vitro*-Proteinsynthese vorhanden waren. Ein Reinigungsschritt war bei dieser Methode nicht möglich. Die meisten Substanzen aus der Polymerasekettenreaktion sollten keinen negativen Einfluss auf die *in vitro*-Proteinsynthese haben. Um eventuell vorhandene Effekte ausschließen zu können, wäre ein Reinigungsschritt wünschenswert. Hierzu sollte versucht werden, Oligonukleotide an die Wand der Kapillare zu immobilisieren und anschließend mit diesen eine PCR durchzuführen. Eine PCR mit an der Glasoberfläche immobilisierten Oligonukleotiden wurde schon an anderen Stellen gezeigt. Für die Immobilisierung von Oligonukleotid an Glasoberflächen sind in der Literatur eine ganze Reihe von verschiedenen Protokollen zu finden. Viele dieser Verfahren beginnen mit der Silanisierung der Oberfläche (Beier und Hoheisel, 1999, Steinberg *et al.*, 2004).

3. Ergebnisse

Für die Immobilisierung wurde die Methode verwendet, die Adessi (Adessi *et al.*, 2000) beschrieben hatte. Nach einigen Vorversuchen wurde die Methode über die Silanisierung mit ATS und anschließender Umsetzung mit sulfo SIAB als Quervernetzer gewählt. Das SIAB wurde erstmals von Weltman *et al.* (Weltman Joel K., 1983) beschrieben. Eine Grundvoraussetzung für diese Reaktion war eine Aktivierung der Glasoberfläche mit dem ATS. Durch diese Silanisierung sollte eine einheitliche Oberfläche geschaffen werden, an der freie Aminogruppen an der Oberfläche sind, welche dann durch das sulfo SIAB umgesetzt werden, sollten.

Die Silanisierung ist in der Literatur auf unterschiedliche Weise beschrieben. Es unterschieden sich vor allem die Zeiten der Silanisierung und die Konzentration des verwendeten Silans. Nach Rücksprache mit dem Hersteller des Silans (Pierce) konnte festgestellt werden, dass vor allem die Konzentration des Silans für die einheitliche Silanisierung wichtig ist. Es sollte überprüft werden, ob auf der Oberfläche Aminogruppen vorhanden sind, welche in der Lage sind, eine biochemische Reaktion einzugehen. Hierzu wurde versucht, die Aminogruppen mit NBD-F umzusetzen. Dies ist ein Reagenz, welches in der Lage ist mit primären Aminogruppen eine kovalente Bindung einzugehen. Darüber hinaus ist NBD-F fluoreszent und kann durch das Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Die Auswertung erfolgte durch die Messung der Pixel mithilfe der Analysis D-Software (SIS). Um die optimale Konzentration an ATS zu bestimmen, wurden Objektträger mit unterschiedlichen Konzentrationen beschichtet. Nach der Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen konnte ein Diagramm (Abbildung 45) erstellt werden. Hieraus ist zu erkennen, dass mit zunehmender Konzentration des Silans auch eine höhere Fluoreszenz detektiert werden konnte. Auch bei den Proben, die nicht mit einem Silan beschichtet wurden, konnte eine Fluoreszenz festgestellt werden. Hier ist von einer unspezifischen Bindung des NBD-F mit dem Glas auszugehen. Die Steigerung der Fluoreszenz ist bis etwa 1,5 % des Silans linear. Beim Überschreiten dieser Konzentration nimmt die Steigerung der Fluoreszenz ab.

3. Ergebnisse

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass an der Glasoberfläche reaktionsfähige Aminogruppen vorhanden waren. Für die weitere Umsetzung mit dem Quervernetzer wurde eine Konzentration von 2 % gewählt.

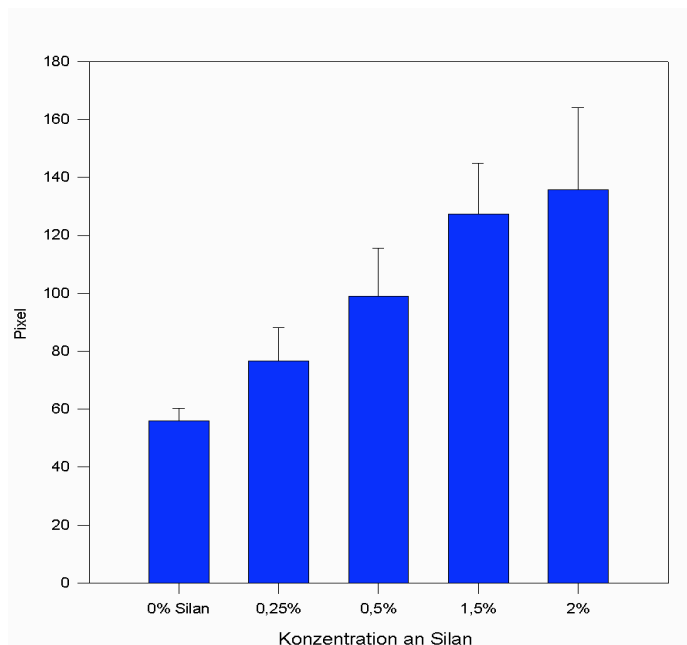


Abbildung 45: grafische Darstellung der Silanisierung in Abhängigkeit von der Konzentration des ATS

Die ersten Untersuchungen mit dem sulfo SIAB wurden auf Objektträgern durchgeführt. Der Nachweis der Bindung erfolgte über radioaktiv markierte Oligonukleotide. Die markierten Oligonukleotide wurden auf das aktivierte Glas pipettiert und in einer Kammer mit hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mehrfach mit Puffer gewaschen und getrocknet. Nachdem Trocknen konnten sie auf einen PhosphorImager-Screen analysiert werden. In der Negativkontrolle wurde anstelle des sulfo SIAB ein sulfo NHS-Acetat verwendet. Diese Substanz hat die gleiche reaktive Gruppe wie der Quervernetzer ohne eine aktivierte Oberfläche zu schaffen.

Es konnte festgestellt werden, dass eine Immobilisierung an die Oberfläche des Glases mithilfe des Quervernetzers möglich war (Abbildung 46). Für die Immobilisierung auf dem Chip wäre es wünschenswert, wenn die Immobilisierung reversibel wäre. Dies hätte den Vorteil, dass der Chip dadurch mehrfach verwendbar wäre. Für die Entfernung der radioaktiv markierten Oligonukleotide wurden die Objektträger einer Behandlung mit konzentrierter Schwefelsäure und einer Behandlung mit 2%iger Flußsäure unterzogen. Es folgte eine Säuberung mit Wasser und die Analyse der Radioaktivität.

3. Ergebnisse

Abbildung 46 zeigt die Stabilität der Immobilisierung. Erst durch die Behandlung mit Flusssäure

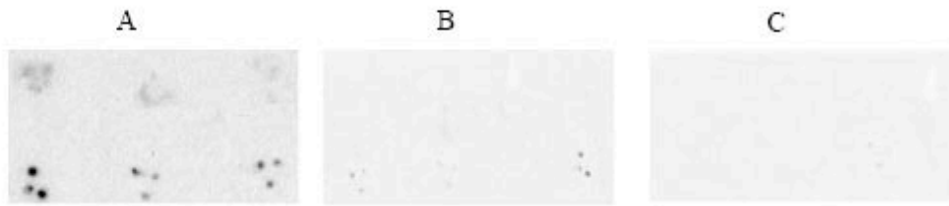


Abbildung 46: Darstellung der Autoradiografie nach der Immobilisierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden

Obere Zeile: Immobilisierung mit sulfo NHS Acetat

Untere Zeile Immobilisierung mit sulfo SIAB

A: nach der Immobilisierung

B: nach der Reinigung mit konzentrierter Schwefelsäure

C: nach der Reinigung mit 2,5%iger Flusssäure

waren die immobilisierten Proben zu entfernen. Der Teil B zeigt den Versuch nach der Reinigung mit konzentrierter Schwefelsäure für 30 Minuten. Im unteren Teil der Abbildung kann man noch Spuren der Radioaktivität feststellen. Das deutet daraufhin, dass keine vollständige Reinigung durch diese Behandlung möglich war. Teil C zeigt die Reinigung mit 2%iger Flusssäure. Die Objektträger wurden für 10 Minuten in der Lösung geschwenkt und anschließend mit Wasser gespült. Daraufhin konnten keine Reste der Radioaktivität mehr detektiert werden. Durch diese Behandlung wurde die obere Schicht der Oberfläche des Objektträgers entfernt.

Ähnliche Versuche im Chip bestätigten durch mikroskopische Vermessung den Materialabtrag im Chip. Durch diese Behandlung waren die Chips frei von Oligonukleotiden, allerdings nahm die Oberflächenrauigkeit stark zu. Aus diesem Grund konnten die Chips nur eingeschränkt wieder verwendet werden.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Immobilisierung auf der Oberfläche von Objektträgern möglich war, wurde diese Immobilisierung im Chip durchgeführt. Hierzu wurden fluoreszent markierte Oligonukleotide verwendet. Als Fluorophor wurde das Alexa 488 verwendet. Die Oligonukleotide besaßen neben dem Fluorophor am 3'-Ende noch einen Abstandhalter von 10 Thyminen am 5'-Ende. Die Kopplung erfolgte über eine Thiolgruppe. Nach dem Versuch der Immobilisierung wurden die Chips mehrfach gewaschen, um alle unspezifisch gebundenen Nukleinsäuren zu entfernen. Die Auswertung erfolgte über die Betrachtung am Fluoreszenzmikroskop. Es wurden verschiedenste Punkte in den mikroskopischen Bildern vermessen und die ermittelten Pixel statistisch ausgewertet. In

3. Ergebnisse

Abbildung 47 ist zu erkennen, dass eine Immobilisierung erfolgte. Der erste Teil (Teil A) der Abbildung zeigt eine starke Fluoreszenz. Dem gegenüber ist im zweiten Teil der Abbildung (Teil B) keine Fluoreszenz zu beobachten. Bei der Negativkontrolle wurde eine Substanz verwendet, die dem ersten Teil des Quervernetzers entspricht. Ein Weglassen dieser Substanz würde zu einer unspezifischen Bindung von DNA an der Oberfläche des Glases führen. Die Bindung würde über elektrostatische Wechselwirkung der positiv geladenen Aminogruppen (des Silans) erfolgen.

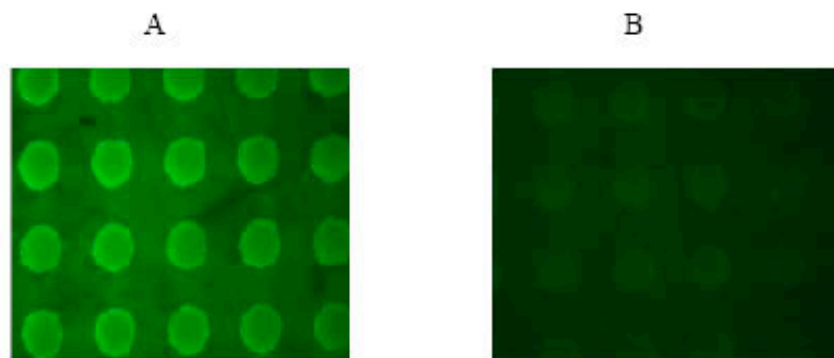


Abbildung 47: mikroskopische Aufnahme der Immobilisierung mit Alexa 488 markierten Oligonukleotiden

A: mit sulfo SIAB

B: mit sulfo NHS Acetat (Negativkontrolle)

3.10 Festphasen-PCR

Nach der Immobilisierung sollte gezeigt werden, dass über diese gebundenen Oligonukleotide eine Festphasen-PCR realisierbar ist. Eine vereinfachte Variante der PCR stellt dabei die einfache Verlängerung der gebundenen Primer dar. Dieses konnte durch Erdogan (Erdogan *et al.*, 2001) gezeigt werden. Die vollständige Amplifikation an einer Glasoberfläche konnte Adessi (Adessi *et al.*, 2000) realisieren.

Hierzu wurden die Chips mit nicht markierten Oligonukleotiden beschichtet, um ein freies 3'Ende zu erhalten. Anschließend wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt. Als Zielmolekül diente der in Abbildung 40 dargestellte Teil des YFP Gens.

Für den Nachweis der Festphasen-PCR wurde fluoreszent markiertes dUTP mit in der PCR verwendet, welches in das PCR-Produkt eingebaut wurde. Für die Reaktion wurde die Taq-

3. Ergebnisse

Polymerase eingesetzt, da diese in der Anwesenheit von Glas gute Resultate erzielte und dazu in der Lage war dUTP mit in den DNA-Strang einzubauen. Durch die Verwendung von dUTP-Alexa 488 konnten die Produkte an der Wandung des Chips sichtbar gemacht werden. Nach erfolgter PCR wurden die Chips mehrfach gewaschen und anschließend unter dem Mikroskop betrachtet. Es konnten die folgenden Bilder (Abbildung 48) aufgenommen werden.

Abbildung 48 zeigt die Festphasen-PCR. In Teil A der Abbildung kann man die eingebaute

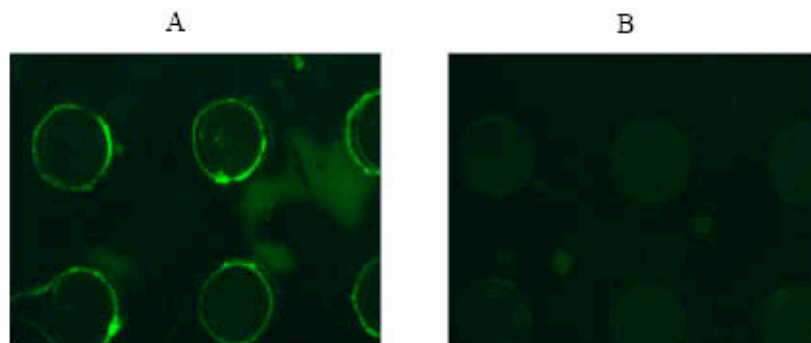


Abbildung 48: mikroskopische Aufnahme der Festphasen PCR mit Alexa 488 markiertem dUTP

A: PCR an der Wand mit DNA

B: PCR an der Wand ohne DNA (Negativkontrolle)

Fluoreszenz an der Wandung der Kapillare erkennen. Die Negativkontrolle (Teil B), bei welcher die gleiche PCR jedoch ohne immobilisierte Primer durchgeführt wurde, zeigt sich keine Fluoreszenz. Die immobilisierte DNA überstand mehrere Waschschrte. Dadurch konnten die nicht erwünschten Nebenprodukte der PCR entfernt werden. Nachdem auch die Festphasen-PCR gezeigt werden konnte, stand die Etablierung der *in vitro*-Expression in einem Volumen von weniger als 4 nL an.

3.11 Herstellung der Fragmente für die *in vitro*-Expression

Für den Nachweis der Expression im Chip wurde das Yellow Fluoreszent Protein (YFP) verwendet. Dieses stammte aus dem pEYFP-N1-Vektor der Firma Clontec. Für die Verwendung der *in vitro*-Proteinsynthese war es notwendig, einen Vektor mit einem T7 Promoter einzusetzen. Ein System, welches für die zellfreie Proteinsynthese optimiert wurde, beinhaltet den Vektor pIVEX 2.3d (Roche Diagnostics). In diesen Vektor wurde das Gen des YFP eingeführt.

In einem ersten Schritt wurde eine PCR durchgeführt, durch welche an beiden Seiten des Gens Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme angehängt wurden. Am 5'-Ende wurde das NcoI und am 3'-Ende das XmaI verwendet. Durch die Erkennungssequenz des NcoI erreichte man, korrekte Platzierung des Startcodon. Nach erfolgter PCR wurden die PCR-Produkte aufgereinigt und mit den Restriktionsenzymen NcoI und XmaI (NEB) zerschnitten. Der Vektor (pIVEX 2.3d) wurde ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen geöffnet und anschließend über ein Agarosegel aufgereinigt. Es folgte die Ligation des Vektors und der PCR-Produkte. Die so geschaffenen Vektoren wurden in *E.coli* XL1-Blue-Zellen transformiert. Nach erfolgter Kultivierung konnten die Plasmide aus den Bakterien isoliert und für die *in vitro*-Synthese eingesetzt werden. Zur Überprüfung der Möglichkeit der Expression wurde eine gekoppelte Transkription und Translation verwendet. Der Nachweis der Expression erfolgte über den Einbau von radioaktivem ^{14}C Leucin. Durch eine Autoradiografie und durch eine Szintillationszählung konnte nachgewiesen werden, dass ein Produkt mit der Größe von ca. 26 kDa entstand. Diese Produkte konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Die Fluoreszenz des Proteins diente als Nachweismethode der zellfreien Proteinsynthese im Chip.

3.12 Zellfreie Proteinsynthese im Chip

Das so hergestellte Plasmid wurde für die *in vitro*-Proteinsynthese im Chip verwendet. Für die

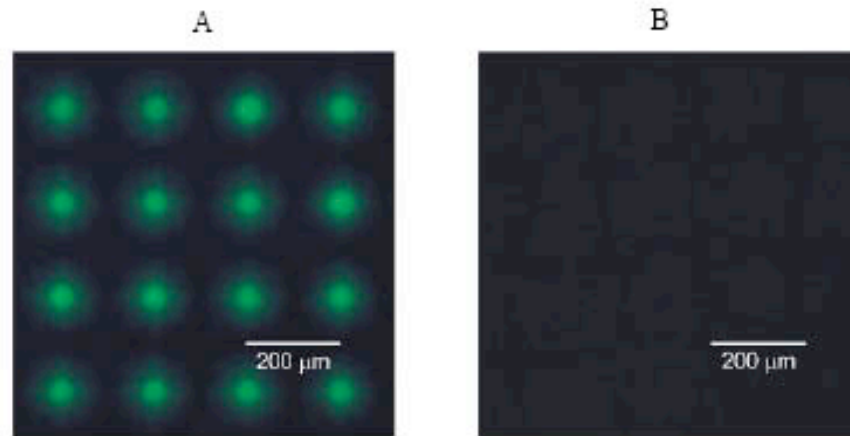


Abbildung 49: mikroskopische Aufnahme der *in vitro*-Expression im Chip

Hierzu wurde ein vollständiger *in vitro* Expressionsansatz nach den Angaben des Herstellers (Qiagen) durchgeführt. Die Inkubation erfolgte unter Ölabschluss für 1 Stunde bei 37°C.

A: mit pIVEX 2.3 YFP

B: ohne pIVEX 2.3d YFP (Negativkontrolle)

Expression kam das EasyXpress Protein Synthesis Kit (Qiagen GmbH) zum Einsatz. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von einer Stunde bei 37 °C. Anschließend wurden die Chips unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Hier wurden Chips, in denen das Plasmid mit dem YFP-Gen vorhanden war, mit Chips ohne Plasmid verglichen. Es konnten die folgenden Aufnahmen (Abbildung 49) gemacht werden. Man kann deutlich eine Fluoreszenz im ersten Teil (A) der Abbildung erkennen. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die zellfreie Proteinsynthese auch in einem Volumen von weniger als 4 nL realisierbar ist.

Eine Expressions-PCR wurde ebenfalls getestet, bei der die regulatorischen Sequenzen nicht aus einem Vektor verwendet wurden, sondern mithilfe von zwei Polymerasekettenreaktionen an das Zielmolekül angefügt wurde. Die Expression zeigte ähnliche Ergebnisse wie die, die in Abbildung 49 dargestellt wurden.

Abschließend lässt sich sagen, dass sowohl eine Polymerasekettenreaktion als auch eine zellfreie Proteinsynthese in dem hier vorgestellten Chip realisiert werden konnte.