

Drei-Kammer-Shuttle PCR für polymerbasierte, druckgetriebene Lab-on-a-Chip Systeme

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der

Technischen Fakultät der

Albert-Ludwigs-Universität

Freiburg im Breisgau

vorgelegt von Tim Gumbel, M.Sc.

Stuttgart, November 2015

Dekan:

Prof. Dr. Georg Lausen

Referenten:

Prof. Dr. Roland Zengerle

Prof. Dr. Thomas Hanemann

Tag der Abgabe:

25.11.2015

Tag der Prüfung:

08.02.2016

Tim Gumbel

Robert-Bosch-GmbH

Robert-Bosch-Platz 1

70839 Gerlingen

Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung

Institut für Mikrosystemtechnik – IMTEK

Technische Fakultät

Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	i
II	Danksagung	v
III	Verzeichnis, Abkürzungen und Symbole	vii
1	Kurzfassung	1
2	Ziel der Arbeit	5
3	Stand der Technik	6
3.1	Aufbau- und Verbindungstechnologie	6
3.2	PCR Konzepte auf LoC Systemen	7
3.2.1	Analyse Stationary PCR	8
3.2.2	Analyse Continuous Flow PCR	9
3.2.2.1	Fixed Loop Flow	9
3.2.2.2	Closed Loop Flow	11
3.2.2.3	Oscillation Flow	12
4	PCR Konzept: Drei Kammer Shuttle PCR	14
5	Plattformtechnologie des LoC Systems	17
5.1	Einflüsse Laserschweißen	18
5.2	Validierung Laserschweißprozess	19
5.2.1	Eingrenzung des Prozessfensters für Laserschweißprozesse	19
5.2.2	Prozessfenster Laserschweißen von PC zu TPU	23
5.2.3	Prozessfenster Laserschweißen von PC zu PC	27
5.3	Prozesstechnologie Laserschweißen	31
5.3.1	Prozesstechnologie Laserschweißen vierlagiger PC/ TPU Plattformen	32
5.3.2	Prozesstechnologie Laserschweißen mit Oberflächenbeschichtung	33
5.4	Auslegung und Design der 3 KS PCR	36
5.4.1	Auslegung des Abstandes von Funktionen	36
5.4.2	Auslegung der PCR Kammern	37
5.5	Zusammenfassung Plattformtechnologie	40
5.6	Ausblick Plattformtechnologie	41
6	3 KS PCR Einzelfunktionsmuster	42
6.1	Messstand 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster	44
6.2	Prozessierungsstationen 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster	46

6.3	Thermische Charakterisierung	49
6.3.1	Thermische Charakterisierung des Referenzsystems	49
6.3.2	Thermische Charakterisierung des Messstandes & der 3 KS PCR	51
6.3.2.1	Prozessierungsstation einseitige thermische Kontaktierung	53
6.3.2.2	Prozessierungsstation zweiseitige thermische Kontaktierung	55
6.4	Versuchsablauf 3 KS PCR	57
6.4.1	Reinigung und Aufbewahrung der 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster	58
6.4.2	PCR System caMRSa8	58
6.4.3	Versuchsdurchführung der 3 KS PCR Charakterisierung	60
6.4.4	Ansteuerung 3 KS PCR	62
6.4.5	Ergebnisinterpretation Mikroarray und qPCR	63
6.4.6	Gewichtung Prozesskontrollen PK 1, PK 2 und PK 3	65
6.5	3 KS PCR Performance	69
6.5.1	Prozessierungsstationen & Versuchsstränge 3 KS PCR	69
6.5.2	Referenzmessung der PCR Produkte: 3 KS PCR zu Blockzykler	71
6.5.3	Effizienzmessung PCR System: 3 KS PCR zu Blockzykler	74
6.5.3.1	Effizienzmessung Blockzykler	74
6.5.3.2	Effizienzmessung 3 KC PCR	75
6.5.4	Bestimmung der unteren Nachweisgrenze 3 KS PCR	78
6.6	Charakterisierung des Mikroarrays	79
6.6.1	Versuchsdurchführung der Mikroarray Charakterisierung	80
6.6.2	Ergebnis der Mikroarray Charakterisierung	80
6.7	Optimierung der 3 KS PCR	82
6.7.1	Reduzierung der Prozesslaufzeit	82
6.7.2	Analyse der pneumatischen Ansteuerung	86
6.7.3	Analyse von Additiven, Tensid Tween®80	88
6.7.4	Analyse der Beschichtung der TPU Membran	92
6.7.4.1	Parylene Beschichtung der TPU Membran	92
6.7.4.2	PTFE Beschichtung der TPU Membran	94
6.7.5	Analyse PC Makrolon 2405 zu PC Makrolon 2245	96
6.7.6	Analyse alternativer PCR Reagenzien	98
6.8	Zusammenfassung 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster	100
6.9	Ausblick 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster	105
7	3 KS PCR Systemintegration	107
7.1	LoC und erweiterte Prozessierungsstation	109
7.2	LoC Performance	112
7.3	Charakterisierung PCR & Mikroarray auf dem LoC	115
7.4	Zusammenfassung 3 KS PCR Systemintegration	119

A	3 KS PCR Reagenzien.....	121
B	qPCR Reagenzien.....	122
C	qPCR Protokoll.....	122
D	Mikroarray Reagenzien	123
E	Mikroarray, händische Prozessschritte.....	123
F	Literaturverzeichnis.....	125

II Danksagung

Es ist interessant, wie wenig man über das Thema „sich bedanken“ bei einer wissenschaftlichen Arbeit nachdenkt, dabei ist es doch ein wichtiges Thema. So gut wie keine Leistung ist eine reine Eigenleistung, es gibt immer Unterstützung, Hilfestellungen, Wohlwollen oder Tipps von allen möglichen Seiten. Ich kann mich glücklich schätzen, dass ich immer auf Mitmenschen habe zählen können, die mir ohne Eigennutz geholfen haben, diesen möchte ich hier danken. Das betrifft nicht nur ihre Unterstützung bei meiner Dissertation, sondern auch während aller Stadien meiner akademischen Ausbildung im In- und Ausland.

Viele Dinge, die ich aus der Zeit der Doktorarbeit mitnehme, stehen nicht in diesem Papier. So hätte ich mir während der Zeit auf der Schillerhöhe kein besseres Team wünschen können. An erster Stelle möchte ich meinen Betreuer Dr. Jochen Rupp erwähnen, der entscheidend zu diesem Erfolg beigetragen hat, mir immer wieder mit vielen nützlichen Ratschlägen zur Seite stand, die mich auch heute noch privat und beruflich weiterbringen. Fast von Anfang an mit dabei, ebenfalls mit einem mehr als nur prägenden Einfluss, möchte ich Frau Prof. Dr. Jenny Kehrbusch danken. Ich freue mich schon auf die nächsten Diskussionsrunden, privat und beruflich. Ein besonderes Dankeschön geht hier auch an meine Mitstreiter Dr. Thomas Brettschneider und Arne Dannenberg, wir haben viele Probleme in Lösungen verwandelt. Dr. Bernd Faltin und Dr. Karin Lemuth müssen hier genannt werden für einen exzellenten Wissenstransfer im Bereich der Biologie, klare Ansagen und auch Unterstützung weit über das Nötige hinaus. Ohne diese Expertise wäre die LoC Performanceanalyse nicht in dieser Form gelungen. Für die einerseits zielgerichtete Führung und andererseits Gewährung und Förderung nötiger Freiheiten bedanke ich mich bei Dr. Franz Lärmer und Dr. Jürgen Steigert, mir hat es nie an Unterstützung persönlicher oder materieller Art gemangelt. Mein Dank gilt dem gesamten Team Medtek, ich habe ohne Ausnahme mit jedem gerne zusammengearbeitet und bin froh, dass sich auch über die Arbeit hinaus gemeinsame Interessen ergeben haben. Hier erwähnen möchte ich weiterhin die Kollegen und Mitstreiter der Abteilung CR/ ARY (Mikrosystemtechnik) der Robert Bosch GmbH in Gerlingen. Sie haben mir die Möglichkeit geboten, nicht nur durch Diskussionen, die Arbeit im Labor und bei gemeinsamen Lösungsfindungen, sondern auch in unserer Freizeit beim Fußball, Klettern, Skifahren und natürlich dem einen oder anderen abendlichem Beisammensein die Zeit in bester Erinnerung zu behalten.

Für eine entscheidende Prägung und sein immer konstruktives Mitwirken möchte ich hier meinem Doktorvater Prof. Dr. Roland Zengerle besonders danken, nicht nur für die klaren Ansagen und die zielführende Ausrichtung in den Rücksprachen. Von ihm habe ich Vieles nicht nur für meine Dissertation mitgenommen und gelernt.

Ein großer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern, Dr. Michael und Bärbel Gumbel sowie meiner Schwester Trixi Gumbel. Wir hatten einige Höhen und Tiefen, ich habe jedoch immer auf euch zählen können. Auch meiner Freundin, Daniela Hänsel, danke ich hier für ihr Verständnis und ihre durchgehende Motivation, es war sicher nicht immer leicht. Zuletzt möchte ich allen meinen Freunden danken in Speyer, Stuttgart, Freiburg und darüber hinaus. Es ist ein wunderbares Gefühl, dass auch in arbeitsintensiven Zeiten mein Freundeskreis wachsen konnte.

III Verzeichnis, Abkürzungen und Symbole

Abkürzung/ Symbol	Beschreibung
BSA	Bovine serum albumin
bp	Basenpaar
CAD	Computer aided design
caMRSA	Community acquired Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
COP	Cyclo Olefin Polymer
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CVD	Chemical Vapour Deposition
CW	Continuous wave
Cy3	Cyanin Farbstoff
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	Doppelsträngige DNA
EFM	Einzelfunktionsmuster
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
^F (Gen ^F)	Forward Primer für ein Gen
gDNA	genomische DNA
HE	Heizelement
Hsp90	Heat Shock Protein 90
ITO	Indium Zinn Oxyd
LoC	Lab on Chip
LoD	Limit of Detection
L1, L2	Versuchsstränge 1 und 2 für 3 KS PCR Charakterisierung
<i>lukF</i> (PVL), <i>lukS</i> (PVL), <i>mecA</i> , <i>Stau nuc</i> , <i>SCC1</i> , 23S	Zielgene caMRSA Multiplex-PCR System
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MRSA	Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
n	Anzahl der PCR Zyklen
N	Negativkontrolle
Nd:YAG-Laser	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
O/V	Oberfläche zu Volumen
P	Positivkontrolle (N mit gDNA)
PC	Polycarbonat
PCR	Polymerase Chain Reaction
...	...

Abkürzung/ Symbol	Beschreibung
PDMS	Polydimethylsiloxan
PECVD	Plasme Enhanced Chemical Vapour Deposition
PEG	Polyethyleneglycol
PF	PCR Reaktionsvolumen
PK 1, 2, 3	PCR Prozesskontrollen 1, 2, 3
PMMA	Polymethylmethacrylat
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVP	Polyvinylpyrrolidon
^R (Gen ^R)	Reverse Primer für ein Gen
RT	Raumtemperatur
qPCR	Real time quantitative PCR
R1, R2	Versuchsstränge 3 und 4 für 3 KS PCR Charakterisierung
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ssDNA	Einzelsträngige DNA
TPU	Thermoplastische Polyurethane
ÜL1, ÜL2, ÜR1, ÜR2	PCR Prozesskontrollen für PCR Stränge L1, L2, R1, R2 der Einzelfunktionsmustercharakterisierung
VIS	Sichtbarer Spektralbereich
V _{LoC1} , V _{LoC2} , V _{LoC3}	Nummerierung der durchgeführten Experimente auf den drei LoC Systemen
V1, V2, ...	Ventile auf dem LoC
WC-Effizienz	Worst Case Effizienz
3 KS PCR	3 Kammer Shuttle PCR
σ	Standardabweichung

1 Kurzfassung

Die hier präsentierte Arbeit setzt sich im Kern aus zwei Themenfeldern zusammen. Zum einen wird ein drei Kammer Shuttle PCR Konzept (3 KS PCR) vorgestellt und charakterisiert, welches die Möglichkeit bietet, eine **Multiplex-PCR** (Polymerase Chain Reaction) auf einem **Lab on a Chip** System (LoC) in weniger als **30 Minuten** zu prozessieren. Zum anderen wird eine **Optimierung und Erweiterung** einer bestehenden **Plattformtechnologie**, basierend auf dem Prinzip des Laserschweißens, in Hinblick auf den erstmaligen Einsatz von **komplexen fluidischen Netzwerken** in anspruchsvoller Umgebung gezeigt, welche bei der Robert Bosch GmbH ihren Einsatz findet.

Im Themenfeld der Plattformtechnologie wird ein laserbasierter Fügeprozess der Materialien **Polycarbonat (PC)** und **thermoplastische Polyurethane (TPU)** behandelt. Der Fokus wird hierbei auf die Realisierung von **pneumatisch gesteuerten, komplexen fluidischen Netzwerken** in anspruchsvoller Umgebung für den **Einsatz in Industrieprodukten** gelegt. Hier müssen Anforderungen an Stückkosten, Produktionskosten, Herstellungszeit und an die Massenfertigung berücksichtigt werden. Erreicht wird dies durch Verwendung des Spritzgussverfahrens bei den wesentlichen Komponenten. Im Besonderen ist die Fügeverbindung dieser einzelnen Komponenten bei dem hier gezeigten PCR Konzept multifaktoriellen Einflüssen wie Temperatur, Druck und Wechselbelastungen über die Prozesszeit von bis zu einer Stunde auf einer **Fügefläche kleiner 500 µm Durchmesser** ausgesetzt. Neu und erstmals gezeigt wird die Optimierung der Prozesstechnologie für die Realisierung von laserbasierten Fügeverbindungen der polymeren Partner bei einer **Temperatur von 95 °C**, **pneumatischen Belastung von bis zu 260 kPa** und **thermischen Langzeituntersuchungen von bis zu 3 Stunden**. Realisiert werden unter diesen Bedingungen Funktionen wie Ventile oder Kammern mit einem bisher nicht erreichten minimalen **Abstand von 2,5 mm auf dem LoC**. Zum ersten Mal wird hier eine Prozesstechnologie vorgestellt, die komplexe LoCs mit einem **vierlagigen polymeren Aufbau** realisiert, welcher das Spektrum für die Anwendung erheblich erweitert. Dabei werden sowohl die Anforderungen an die Prozessbedingungen (Mischen, Lyse, Filtration, **PCR** und **Mikroarraydetektion**), als auch an den Herstellungsprozess (Materialien, Fügeverfahren, Kosten und Zeit) erfüllt. Dies ermöglicht die Herstellung von LoCs mit drei Ebenen für pneumatische und fluidische Interaktionen bei einer nachgewiesenen **Ausfallrate von < 3 %**, basierend auf 140 hergestellten PCR Systemen in der Prototypenphase. Das Themenfeld findet seinen Abschluss mit der Vorstellung einer Prozesstechnologie, die eine fügeprozesskonforme **Beschichtung des Materials TPU** ermöglicht. Eine Adaption der physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften der LoC Materialoberflächen wird dadurch erstmals für diese Plattform realisiert.

Der Schwerpunkt des zweiten Teils dieser Dissertation basiert auf dieser Plattformtechnologie. Das in der Arbeit dargestellte auf dem Shuttleprinzip beruhende PCR Konzept reduziert die thermisch zu prozessierende Masse auf ein Minimum. Das Design fußt auf drei PCR Kammern, die über Kanäle verbunden sind. Durch Minimierung der Abstände dieser PCR Kammern zueinander wird eine Reduzierung des negativen Effektes der Kanalvolumina erreicht, die konzeptbedingte Durchmischung des PCR Reaktionsvolumens wird verringert, die PCR Effizienz dadurch gesteigert. Somit ist diese Plattformtechnologie Grundvoraussetzung für die Optimierung des PCR Konzepts.

Es wird somit im zweiten Themenfeld ein PCR Konzept charakterisiert, welches eine Reduzierung der Prozesszeit der **PCR auf unter 30 Minuten** Laufzeit bei gleicher PCR Performance ermöglicht. Dies wird auf dem LoC mit einer **pentaplex caMRSA** (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) PCR validiert bei einem **Reaktionsvolumen** von **25 µl**. Typisch für dieses Konzept sind unter anderem die **frei programmierbaren PCR Parameter** wie Temperatur und Zeit, unabhängig von designbedingten Größen. Erstmalig wird dieses PCR Modell ausführlich auf konzeptbedingte Einflüsse und Systemgrenzen hin untersucht. Sowohl über eine **designbedingte** als auch über eine **thermische Charakterisierung** des Konzepts wird im Vergleich zum Blockzykler mit einer Amplifizierungseffizienz von 1,8 eine **Amplifizierungseffizienz des 3 KS PCR Konzepts von 1,7** ermittelt. Ebenfalls wird eine untere gDNA Nachweisgrenze des PCR Konzepts mit etwa **10 Genomäquivalenten pro 25 µl Reaktionsvolumen** nachgewiesen. Zusätzlich werden verschiedene Optimierungsansätze in Bezug auf das pneumatisch gesteuerte Fluidmanagement und die Oberfläche sowie auf die Materialien des LoCs erarbeitet. Hierbei wird der Fokus einerseits auf die Oberflächenbeschichtung der Plattformmaterialien mittels **Parylene C** bzw. **PTFE** (Polytetrafluorethylen) **Beschichtungen**, andererseits auf eine Oberflächenoptimierung mittels Additiven wie **Tween®80** (Polysorbat80) gerichtet.

Abschließend werden die Erkenntnisse der Themenfelder in ein **automatisiertes LoC** übertragen. Dabei werden Funktionen wie Ventile, Kammern, PCR Konzept und eine Detektion der amplifizierten Gene auf einem Mikroarray implementiert. Hier wird ein mögliches Einsatzspektrum für die Umsetzung der vierlagigen polymerbasierten Plattform, verbunden mit der Fügetechnologie und des PCR Konzepts gezeigt. Diese Ergebnisse stellen die Basis für automatisierte molekulardiagnostische Genanalysen im **industriellen Einsatz** dar.

Abstract

In this paper two central fields of application are presented. On the one hand a three chamber shuttle based **PCR** concept is shown and characterized, which offers the possibility for an implementation of **multiplex PCR** Assays on **lab on a chip** (LoC) platforms in less than **30 minutes**. On the other hand novel **laser based production technologies** for assembling complex microfluidic platforms, currently under development at Robert Bosch GmbH, are presented.

First area of application is located in the field of the development of platform technology, based on polymer materials **polycarbonate** (PC) and **polyurethane** (TPU). The domain for LoCs is located in industrial products, so requirements like unit costs, costs of production, time of production referred to mass production have to be fulfilled. Main task is to realize **complex, pneumatically forced microfluidic systems in harsh environment**. Multifactorial requirements for the laser based assembling process are defined by the PCR concept, which is presented in this work as well. The challenge is to ensure temperature- and pressure stability of the laser welded area (**<500 µm diameter**) by fulfilling a **process time less one hour**. Based on previous work, the laser welding process now fulfills polymeric bondings in respect of multifactorial strain by **temperature 95 °C** and **pressure tests up to 260 kPa** as well as **long time thermal stability for three hours**. Referred to this production technology, it is now possible, to implement functions like valves or chambers at the LoC by a **minimal distance of 2.5 mm**. For the first time, a laser welding assembling based LoC, in reference to the platform used by Robert Bosch GmbH, containing **four polymeric layers** is presented. The platform fulfills all requirements regarded to the terms of fluidic functions like mixing, lysis, PCR and detection by the use of a microarray on the one hand. On the other hand all requirements regarded the production technology, process materials, laser assembling, costs and time are completed as well. The laser welding based technology now provides the possibility for polymeric LoCs with three levels for pneumatic and fluidic interactions with a **failure rate in terms of production of < 3 %**, based on 140 developed PCR systems during prototyping. Finally a production technology manufacturing **coated surfaces** of the polymeric materials (TPU) is presented, fulfilling the requirements of the laser welding based production technologies as well. Herewith physical, biological and chemical properties of the material TPU can be modified first in this LoC concept.

The second field of application depends highly on the insights of the laser based production technology above. The PCR system shown in this work reduces the thermal mass, which is guided through one PCR cycle, to a minimum by the use of a chamber based shuttling concept. The design is based on three PCR chambers connected through channels. Reducing the space between the PCR chambers causes an decrease of the negative effects of the

channels, so as mixing of the PCR reagents is minimised. This leads to an increase of the PCR efficiency. The modified process technology is a required precondition for this PCR concept.

This technology facilitates the implementation of a **chamber based shuttle PCR concept**, which enables the reduction of **PCR process time down to 30 minutes** on the LoC by minimizing the ramping time of the **25 µl PCR volume**. For validation a **pentaplex gene multiplex caMRSA PCR** is implemented. An elementary attribute of the PCR concept is to suggest a possibility for **programming all PCR process parameters**, like temperature and time, regardless of fluid structures/ design of the LoC. For the first time, this PCR concept is analysed in detail by theory and experimental data referred to the system boundaries and limitations caused by the concept itself. By the use of a thermal and design characterization the **amplification efficiency** of the PCR on LoC is defined by **1.7**, compared to the blockcycler efficiency of 1.8. Furthermore the minimal detected genome equivalents of the shuttle based PCR concept is defined by **~10 genome equivalents per 25 µl** process volume. In addition to this characterization, further studies for surface treatment are presented as well as experiments regarded to the pneumatic forced fluid management. On the one hand, the **surface coating technology**, presented in the process technology above, is evaluated by the use of **Parylene C** and **PTFE** coated surfaces. On the other hand experiments based on additives like **Tween®80** (Polysorbat80) are presented.

Finally the results generated in the two fields of application, are combined by presenting a **full automated lab on chip system**. The LoC includes functions like valves, chambers, **PCR** and fluorescence detection by a **microarray** as well as the improved laser based production technology. The implementation in the LoC demonstrates the wide use of the laser based platform technology, the four layer based polymeric LoC in combination with the PCR concept referred to the development of full automated molecular diagnostic gene detection systems focused to the **industrial use**.

2 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die schnelle Umsetzung der Resistenzdetektion eines MRSA (**Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***) Bakteriums unter Zuhilfenahme einer **pentaplex** Genanalyse auf einem **Lab on a Chip** (LoC) System. Das LoC System soll die Möglichkeit bieten, über Funktionen wie Zellyse, DNA (Desoxyribonukleinsäure) Extraktion, **PCR** und Ergebnisdarstellung über einen **Mikroarray** innerhalb einer Stunde, von Probeneingabe bis zur Interpretation, reproduzierbare Ergebnisse nachzuweisen. Diese Anforderungen müssen auch der möglichen Umsetzung im industriellen Einsatz gerecht werden.

Die zeitkritische Funktion der PCR soll hierbei auf dem LoC in einer Zeit unter **30 Minuten** umgesetzt werden. Gefordert ist ein Limit of Detection (LoD) von **$1 * 10^2$** bis **$1 * 10^3$** gDNA Targets pro **25 µl** Reaktionsvolumen in der **multiplex** MRSA Genanalyse. Angestrebt wird die zeitliche Reduzierung der PCR durch eine **Verringerung der thermischen Masse**, die am dynamischen PCR Prozess beteiligt ist. Umzusetzen sind hierbei **drei Temperaturzonen** für ein **frei programmierbares** PCR System. Angestrebt ist die theoretische und praktische Charakterisierung und Optimierung eines auf **Kammern basierten PCR Systems** fußend auf definierten physikalischen Rahmenparametern. Im Speziellen wird der Fokus auf die konzeptbedingten Einflüsse, die **Amplifizierungseffizienz** und das **LoD** des PCR Konzeptes gelegt.

Umgesetzt werden soll ein automatisierter Assay auf einer **polymerbasierten, pneumatisch getriebenen** Plattform mit den Anforderungen an ein **universell einsetzbares, kostengünstiges** und **massenfertigungstaugliches Einwegprodukt**. Zu realisieren ist eine **vierlagige polymerbasierte** Plattform, welche auf drei Ebenen pneumatische und fluidische Interaktionen ermöglicht. Fokussiert wird die Umsetzung **komplexer fluidischer Netzwerke** unter multiplen Einflüssen, das Hauptaugenmerk wird hierbei auf die **Stabilität der Fügeverbindung** gerichtet. Untersucht wird diese Fügeverbindung bei **wechselnder mechanischer Belastung**, einer **Temperatur** bis 95 °C und einer **Druckbeständigkeit** bis zu 150 kPa_{rel}. Die Realisierung der Verbindung muss weiterhin für die effektive Umsetzung des PCR Konzeptes eine größtmögliche **Minimierung der Fügefläche** nachweisen.

3 Stand der Technik

Die Dissertation lässt sich in zwei Themenschwerpunkte unterteilen. Zum einen liegt der Fokus auf einer Erweiterung des Portfolios der bestehenden Plattformtechnologie^[6; 16; 67] der Robert Bosch GmbH^[1]. Für die Integration komplexer fluidischer Netzwerke bzw. Funktionen sind die Voraussetzungen, gegeben durch neue Konzepte mit hohen Anforderungen auf kleinem Raum, an die Aufbau und Verbindungstechnologie nicht erfüllt. Zum anderen findet eine Untersuchung der Funktionen PCR und Mikroarray, hinsichtlich Konzeptentwicklung, Auslegung, Charakterisierung und Definition bzw. Identifikation kritischer Randparameter statt. Dabei werden die erarbeiteten Ergebnisse beider Themenfelder letztendlich zu einem voll automatisierbaren Lab on a Chip (LoC) System zusammengefügt, welches die Möglichkeit der Assay-integration von Probeneingabe bis zur Detektion beinhaltet.

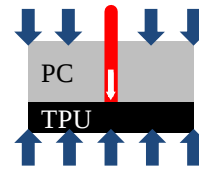
3.1 Aufbau- und Verbindungstechnologie

Der erste Aspekt dieser Dissertation hat die Weiterentwicklung und Optimierung einer schon untersuchten Aufbau- und Verbindungstechnologie, der Robert Bosch Plattform^[6; 16; 67], zum Inhalt. In diesen Arbeiten^[6; 16; 67] sind grundsätzliche Anforderungen in Bezug auf die Materialien und das Fügeverfahren dargestellt und analysiert worden^[16 S.20-29]. Die Schwerpunkte der vorliegenden Untersuchung liegen jetzt einerseits in den Anforderungen der PCR Kompatibilität, andererseits auf der Seite der mechanischen und thermischen Belastbarkeit der Fügeverbindung der LoC Komponenten. Grundsätzlich finden bei LoCs häufig Polycarbonat (PC)^[2], Polymethylmethacrylat (PMMA)^[3], Polydimethylsiloxan (PDMS)^[4], Glas^[5], Cyclo Olefin Polymer (COP)^[24], Silikon^[60], Parylene^[31] und Polytetrafluorethylen (PTFE)^[55] ihren Einsatz. Materialabhängig werden hier Verfahren bei der Verbindung der LoC Komponenten wie CO₂ (Kohlenstoffdioxid) Laserschweißen^[3], Ultraschallschweißen^[2; 15], Bonden^[5; 11], Heißprägen^[25; 40] oder Ätzen^[22; 30] angewendet.

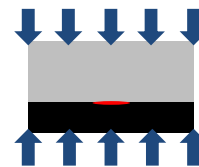
Die Plattform, entwickelt von Rupp, Schmidt und Brettschneider^[6; 16; 67] bei Robert Bosch, basiert auf den Materialien PC und TPU (thermoplastisches Polyurethan). Diese erlaubt unter Verwendung von Spritzguss, Fräsen^[2; 11; 24] und Nd:YAG-Lasern (Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser) für Laserdurchstrahlschweißen (Konturschweißverfahren) und Laserablation einen hohen Grad an Flexibilität, gute Oberflächeneigenschaften und niedrige Stückkosten. Außerdem ist eine kurze Herstellungszeit mit einem niedrigen Iterationszyklus umzusetzen. Dies sind entscheidende Voraussetzungen für die Massenproduktion der LoCs, die in dieser Kombination bei den meisten Plattformen nicht gegeben sind^[16]. Das Fügeprinzip beruht auf dem Einbringen von

Energie durch Absorption an der Fügeebene^[7]. Der Aufbauprozess von zwei polymeren Ebenen lässt sich schematisch unterteilen in:

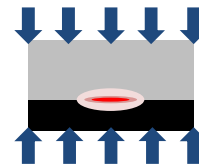
A) Energie wird mittels eines Lasers (Gaußprofil, rot) durch die transparente Ebene (PC) in die absorbierende Ebene (TPU) eingekoppelt. Eine Kontaktierung der Ebenen wird durch Anlegen von Druck (blau) gewährleistet.



B) Die eingekoppelte elektromagnetische Energie wird lokal in Wärme-Energie umgewandelt, was zu einer Schmelze in der absorbierenden Ebene führt.



C) Durch Wärmeleitung entsteht eine Schmelze beider Fügepartner.



D) Nach dem Abkühlen der Schmelze entsteht eine formstabile Schweißnaht.

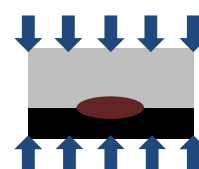


Abbildung 1: Aufbauprozess zweier polymerbasierter Ebenen mittels Laserdurchstrahlungsschweißens, PC (transparent) und TPU (absorbierend).

Die Verbindung der Plattformkomponenten PC und TPU mittels Laserdurchstrahlungsschweißens weist jedoch Grenzen in der Langzeitstabilität^[6 S.81] unter multifaktoriellen Einflüssen wie Druck, Temperatur und Wechselbelastung, näher untersucht in Kapitel 5, auf.

3.2 PCR Konzepte auf LoC Systemen

Lab on a Chip Systeme ermöglichen die Implementierung und Automatisierung biochemischer Assays^[8]. Eine Automatisierung reduziert die Handhabungsfehler während der Assayprozessierung und stellt, mit einer einfachen Ergebnisinterpretation, eine robuste Methode für die Molekular-Diagnostik dar. Zusätzlich ermöglichen LoC Systeme ein Flüssigkeitsmanagement auf kleinstem Raum. Northrup realisierte 1993^[17] als erster eine Polymerase Kettenreaktion auf einem LoC. Er bereitete damit das Feld für die Assayintegration von voll automatisierten LoC Systemen vor. Im Gegensatz zur manuellen Prozessierung der Reagenzien im Blockzykler ermöglichen LoC Systeme eine Reduzierung der Prozesszeit (Heiz-/ Kühlzeiten), indem die thermische zu prozessierende Masse minimiert wird. Konzeptbedingt kann die thermische Masse bis auf das Reaktionsvolumen reduziert werden. Einen weiteren entscheidenden Einfluss stellt das Verhältnis von

Oberfläche zu Volumen (O/V) da. Je größer die Oberfläche der PCR Funktion (Kammer, Kanäle) auf dem LoC ist, desto mehr Wärmeenergie kann pro Zeiteinheit eingebracht werden. Als limitierender Faktor stellt sich hier allerdings der negative Einfluss der Oberfläche auf die PCR Reagenzien dar^[9].

Die PCR Konzepte werden anhand der Realisierung der Temperaturzonen eingeteilt. Systeme, ähnlich dem Blockzykler, bei denen das Reaktionsvolumen an einer Stelle verbleibt und damit die PCR Reagenzien inklusive des LoC Systems temperiert werden müssen, fallen in die Kategorie der „Stationary PCR“. Im Gegensatz hierzu können auf den LoCs Konzepte nach dem „Continuous Flow PCR“ Prinzip realisiert werden. Hier werden auf dem LoC mehrere permanente Temperaturzonen generiert und die PCR Reagenzien durch ein fluidisches System zwischen den Temperaturzonen transportiert^[10].

3.2.1 Analyse Stationary PCR

Die naheliegende Realisierung einer PCR besteht in der direkten Übertragung des Konzeptes der manuellen Prozessierung im Blockzykler auf das LoC^[11; 12; 13; 14; 15; 16]. In Abbildung 2 ist das Prinzip der Stationary PCR abgebildet.

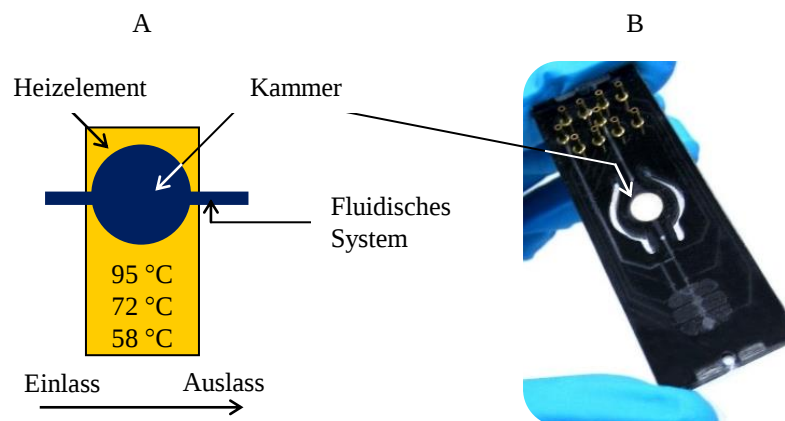


Abbildung 2: Stationary PCR; A) Schematische Darstellung PCR Kammer mit dynamisch regelbarem Heizelement; B) LoC mit integrierten Funktionen: Filtration, Stationary PCR, Mikroarray^[16].

Ziel dieser Konzepte muss es sein, die thermische Masse des LoC und des Heizsystems so gering wie möglich zu halten, um die Heiz-/ Kühlzeiten des PCR Reaktionsvolumens zu reduzieren. Neben verbreiteten Verfahren, die Wärme mittels einer Kombination aus Widerstands-^[11; 15; 22; 38; 27; 30; 56], Peltier-^[11; 24] oder ITO-^[23] (Indium Zinn Oxyd) Heizern in Kombination mit Messing-, Aluminium- oder auch Kupferblöcken zu erzeugen, finden sich gerade hier auch Konzepte auf der Basis von Infrarotstrahlung^[17] oder elektromagnetischer Anregung (Mikrowelle)^[18; 19], bei denen das Heizsystem keine thermische Masse besitzt. Auch sind hier Versuchsaufbauten mit mechanisch wechselnden isothermen Heizelementen

gezeigt^[12], die ebenfalls den thermischen Prozess beschleunigen da die Heiz-/ Kühlzeiten der Heizelemente entfällt.

Ein entscheidender Vorteil dieser Systeme ist- neben dem einfachen fluidischen Konzept- das kleine O/V Verhältnis. Da die Reagenzien immer an einem Ort verbleiben, ist die Kontaktfläche mit dem PCR Reaktionsvolumen nur durch die Kammergeometrie begrenzt. Dieser Vorteil ist nur noch bei „Oscillation Flow“ Systemen gegeben; Kapitel 3.2.2, S. 12. Weiterhin sind bei Systemen dieser Art die Parameter für die PCR (Temperaturen, Haltezeiten und Zyklenzahl) frei einstellbar.

Schwächen zeigt dieses Konzept hinsichtlich der zu prozessierenden thermischen Masse. Bei den meisten Systemen setzt sich diese aus den Massen des PCR Reaktionsvolumens, des LoCs und des Heizsystems zusammen. Weiterhin ist die Auswahlmöglichkeit der Detektion für Multiplex-Gen-Analysen begrenzt. Der Nachweis über Fluoreszenzverfahren^[38; 26] in Ein-Kammer-Systemen ist limitiert aufgrund der möglichen Bandbreite der zu unterscheidenden Emissionsspektren der Fluorophore (qPCR (real-time quantitative PCR), Detektion von vier Genen^[20]). Um die Anzahl der zu untersuchenden Gene zu erhöhen könnte, alternativ neben Standardverfahren wie der Gelelektrophorese^[15; 23; 25; 27; 30; 33; 36; 56; 63], die Detektion über eine qPCR mit vorheriger Probenseparation^[137] oder einen Mikroarray^[11; 32; 16] erfolgen.

3.2.2 Analyse Continuous Flow PCR

Das Merkmal von Continuous Flow Systemen besteht in dem Transport des PCR Reaktionsvolumens durch statisch erzeugte Temperaturzonen. Dies hat eine Reduzierung der thermisch zu zyklisierenden Masse im PCR Prozess zur Folge. Hierbei können die Systeme in „Fixed Loop Flow“, „Closed Loop Flow“ und „Oscillation Flow“ eingeteilt werden^[21].

3.2.2.1 Fixed Loop Flow

Das Prinzip der Fixed Loop Flow PCR, Abbildung 3, basiert auf einem fluidischen System, welches mäanderartig durch Temperaturzonen geführt wird.

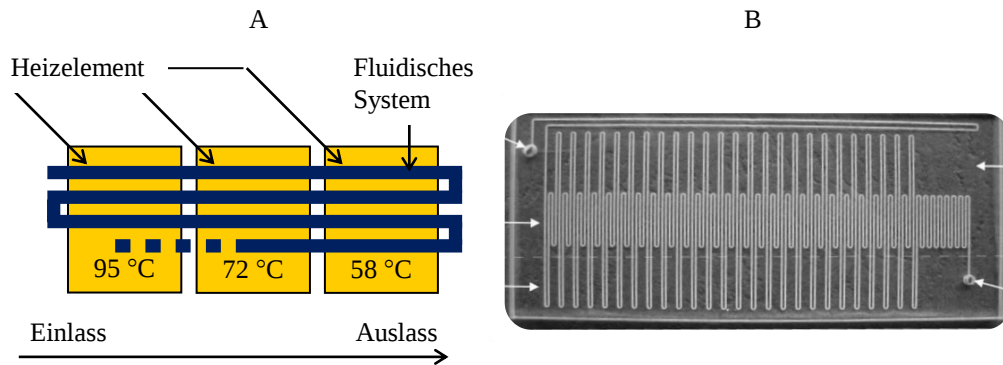


Abbildung 3: Fixed Loop Flow PCR; A) Schematische Darstellung PCR Kanal mit statisch regelbaren Heizelementen; B) LoC mit Funktion der Fixed Loop Flow PCR^[3].

Das sequenzielle Verarbeiten des PCR Reaktionsvolumens und das Eliminieren der thermischen Masse des LoCs in Bezug auf die Heiz-/ Kühlzeiten ermöglicht eine schnelle Prozessierung des PCR Reaktionsvolumens. Dieses Konzept wurde auf vielen LoC Plattformen umgesetzt^[22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30; 31; 32; 33; 34; 35; 36; 37]. Alternativ zu rein planaren Plattformen sind hier ebenfalls Plattformen mittels einer drei dimensionalen Realisierung^[29; 37], sowie auch verschiedene Ansätze von Schlauch-basierten Plattformen^[38; 39; 40] veröffentlicht, die Charakteristik des Fixed Loop Flow Konzepts bleibt aber bestehen.

Die einfache Geometrie der Fixed Loop Flow Systeme ermöglicht eine Prozessierung des Reaktionsvolumens ohne den Einsatz einer komplizierten Steuerung. Es ist auch kein aufwendiges Flüssigkeitsmanagement auf dem LoC erforderlich. Im Regelfall kann die Prozessierung extern über Spritzenpumpen^[24; 26; 33; 35; 38; 40; 56; 59] realisiert werden. Aufgrund der einfachen Steuerung bedarf der Herstellungsprozess der LoCs ebenfalls nicht komplizierten Funktionen wie sie z.B. Ventile oder Pumpen in diesen Systemen darstellen.

Negativ wirkt sich neben der großen Prozessfläche^[17] die eingeschränkte Programmierbarkeit des Systems durch designbedingte Abhängigkeiten z.B. für die Zyklusanzahl oder die Prozesszeiten auf den entsprechenden Temperaturzonen aus. Die Reduzierung bzw. Erweiterung des PCR Protokolls um einen oder mehrere Zyklen oder die Änderung einer einzelnen Haltezeit sind nur durch eine Geometrieangepassung zu ermöglichen. Ein entscheidender Nachteil des Konzeptes liegt in der großen Oberfläche des fluidischen Systems. Materialabhängig führt eine Vergrößerung des O/V Verhältnisses zu einer stärkeren Inhibierung der PCR Reagenzien^[17; 41]. Eine Reduzierung des Oberflächeneinflusses kann durch Additive wie PEG^[17; 28; 33; 35; 36; 42], PVP^[17; 48; 42], BSA^[17; 26; 28; 33; 35; 36; 42] oder Tween^[28; 36; 42; 43] erfolgen. Beschichtungsverfahren von inhibierenden Materialien mit Parylene^[17; 2; 31; 44; 45; 46] oder mittels Silanisierung^[17; 26; 28; 47; 60] werden ebenfalls verwendet.

3.2.2.2 Closed Loop Flow

Closed Loop Flow Systeme erweitern das Konzept der Fixed Loop Flow PCR. Sie zeichnen sich durch eine zyklisch geschlossene Struktur aus, bei der das fluidische System mehrfach durchlaufen wird. Dies führt zu einer drastischen Reduzierung des O/V Verhältnisses, Abbildung 4.

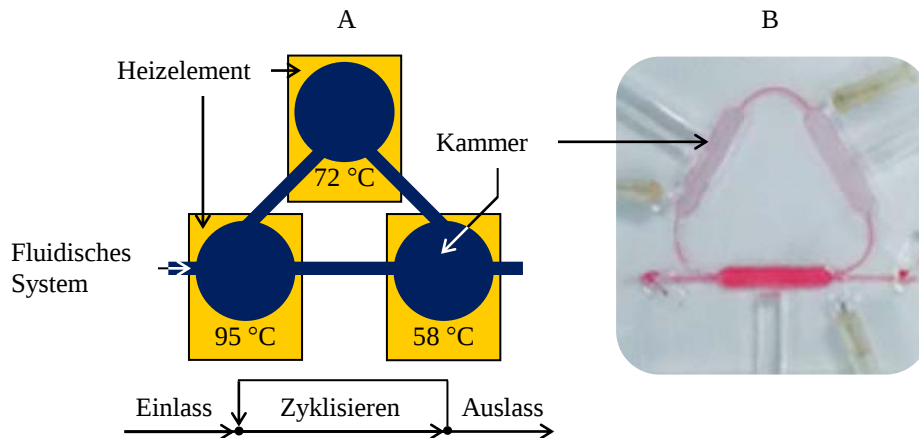


Abbildung 4: Closed Loop Flow PCR; A) Schematische Darstellung PCR Kammern mit statisch regelbaren Heizelementen; B) LoC mit Funktion der Closed Loop PCR^[48].

Für Closed Loop Flow Systeme, Abbildung 4, ist das Flüssigkeitsmanagement für die Prozessierung des PCR Reaktionsvolumens im Bereich mehrerer Mikroliter über extern angeschlossene Spritzenpumpen nicht mehr zu realisieren. Es wird eine aktive Steuerung auf der LoC Plattform z.B. über pneumatisch aktuierbare Ventile^[48] oder ein magnetfeldbasiertes Flüssigkeitsmanagement^[49; 50] benötigt. Für die Prozessierung von Flüssigkeiten im Bereich einiger Nanoliter sind rein thermisch getriebene Systeme nach dem Konzept der Closed Loop Flow PCR gezeigt^[51; 52].

Das in diesem Kapitel beschriebene Konzept zeichnet sich durch zwei entscheidende Vorteile gegenüber dem Konzept des Fixed Loop Flow Prinzips aus. Da zum Ersten das gleiche fluidische System in jedem Zyklus durchlaufen wird, verringert sich das O/V Verhältnis um den Faktor entsprechend der Anzahl der PCR Zyklen. Des Weiteren ist dieses Konzept für LoC Systeme im Bereich mehrerer Mikroliter nur mit Hilfe eines komplexen fluidischen Flüssigkeitsmanagements zu realisieren, welches die Möglichkeit einer frei programmierbaren Steuerung der PCR Parameter in Bezug auf Temperatur, Haltezeiten und Anzahl der Zyklen ermöglicht. Neben dem Wegfall der Masse des LoCs in Bezug auf die thermische zu prozessierende Masse pro Zyklus, lässt sich dieses Konzept zudem meist platzsparend realisieren.

Schwierig und deswegen auf vielen Plattformen nicht umzusetzen, ist die Realisierung eines aktiven Flüssigkeitsmanagements unter den gegebenen Anforderungen einer PCR. Neben thermischem und mechanischem Stress wirken sich hier Probleme wie z.B. Luftblasen im

fluidischen System im Vergleich zum Fixed Loop Flow Ansatz stärker aus. Im Gegensatz zum Oscillation Flow Ansatz tritt bei diesem Konzept eine starke thermische Belastung an der Grenze zwischen der Denaturierungszone zur Annealingszone, verursacht durch einen großen Temperaturgradienten, auf^[53]. Dies kann zusätzlich eine aktive Kühlung des LoCs erforderlich machen.

3.2.2.3 Oscillation Flow

Eine weitere Variante im Vergleich zum Fixed Loop Flow Ansatz stellt das Oscillation Flow Konzept dar, Abbildung 5. Ähnlich dem Closed Loop Flow Konzept wird hier ebenfalls für jeden Zyklus das gleiche fluidische System benutzt. Das PCR Reaktionsvolumen wird allerdings nicht zyklisch prozessiert, sondern vor- und rückwärts durch einen fluidischen Kanal/ Schlauch transportiert.

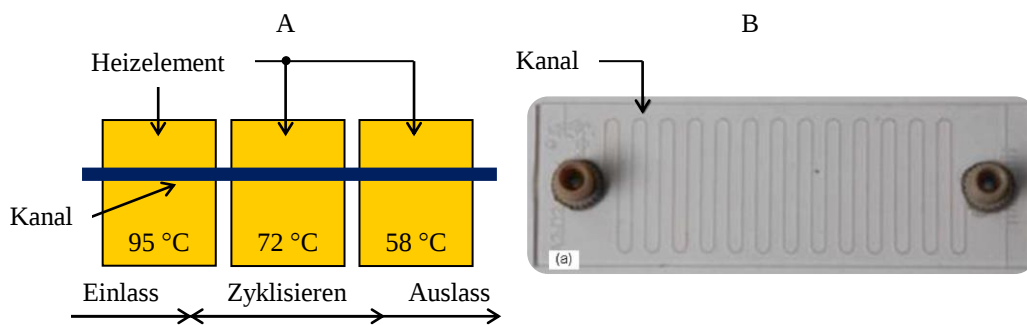


Abbildung 5: Oscillation Flow PCR; A) Schematische Darstellung PCR Kanal mit statisch regelbaren Heizelementen; B) LoC mit Funktion der Oscillation Flow PCR^[59].

Auf der Basis dieses Konzeptes zeichnen sich Plattformen zum einen durch ein geringes Volumen an PCR Flüssigkeit aus, in der Regel bis zu wenigen Mikrolitern. Zum anderen werden sie meist mittels eines Mehrphasenkonzeptes realisiert^[54; 55; 56; 57; 58; 59; 60; 61]. Durch die Prozessierung des PCR Reaktionsvolumens, z.B. wasserbasierte Plugs (PCR Reaktionsvolumen) umgeben von einem Öl-Volumen (zweite Phase), können Systeme mit einer ähnlichen PCR Effizienz im Vergleich zum Roche LightCycler^[62] hergestellt werden^[57].

Positiv wirkt sich hier die Realisierung der fluidischen Struktur auf kleinem Raum aus, vergleichbar mit der des Closed Loop Flow Prinzips. Ebenfalls können die PCR Prozessparameter (Temperatur, Haltezeit, Zyklenzahl) hier frei über eine Programmierung eingestellt werden. Einen großen Vorteil bietet dieses Konzept gegenüber dem Closed Loop Flow Ansatz einerseits in der einfachen Ansteuerung z.B. über extern angebrachte Spritzenpumpen^[56; 57; 59] und andererseits in einer geringeren thermischen Belastung, da die Denaturierungszone nicht direkt an die Annealingszone grenzt.

Der Nachteil des Oscillation Flow Konzeptes in der Umsetzung der PCR Prozessierung liegt in der Notwendigkeit des plugbasierten Ansatzes, der Handhabung mehrerer Flüssigkeitsphasen. Das präzise Flüssigkeitsmanagement von kleinen Probemengen stellt eine Herausforderung gerade in Bezug auf die Kombination dieses Konzeptes mit weiteren Funktionen auf einem LoC dar.

Abhilfe kann hier die Vergrößerung des Reaktionsvolumens schaffen, allerdings verbunden mit der Umsetzung eines aktiven Flüssigkeitsmanagements mittels kammerbasierter Verdrängung des PCR Reaktionsvolumens auf dem LoC.

4 PCR Konzept: Drei Kammer Shuttle PCR

Das in dieser Arbeit umgesetzte, erstmalig ausführlich charakterisierte und optimierte PCR Konzept vereint das Oszillationprinzip aus Kapitel 3.2.2.3 mit der Möglichkeit, große Reaktionsvolumen auf einem kammerbasierten Konzept zu prozessieren. In dem drei Kammer Shuttle PCR Konzept werden drei isotherme Temperaturzonen auf dem LoC erzeugt. In jeder der Temperaturzonen ist eine PCR Kammer enthalten. Diese PCR Kammern sind fluidisch sequenziell verbunden. Durch Verwendung des Verdrängungsprinzips wird die PCR Reaktionsflüssigkeit zwischen den PCR Kammern und damit in verschiedene Temperaturzonen bewegt. Das PCR Konzept und das im Zuge dieser Arbeit entstandene Einzelfunktionsmuster (EFM) ist in Abbildung 6 dargestellt.

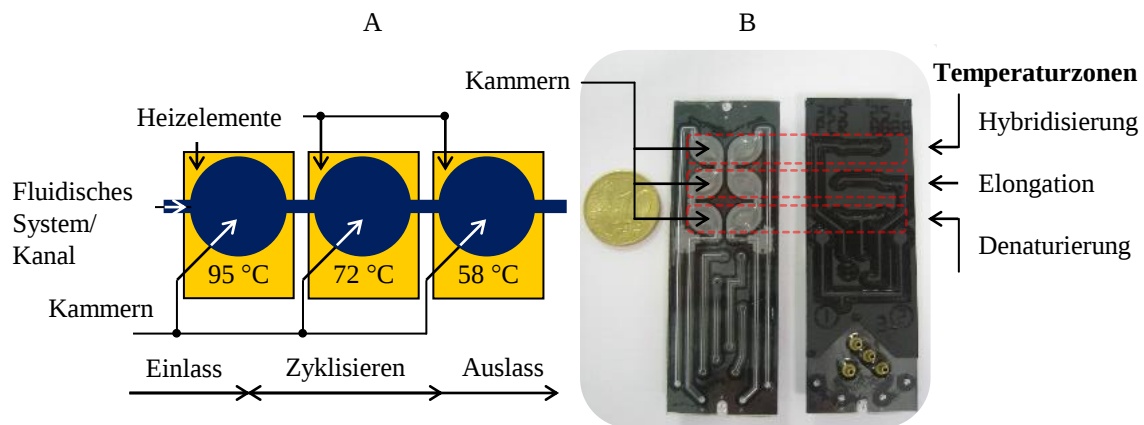


Abbildung 6: Drei Kammer Shuttle PCR (3 KS PCR); A) Schematische Darstellung der 3 Kammer Shuttle PCR mit statisch regelbaren Heizelementen; B) EFM mit Funktion der 3 Kammer Shuttle und Closed Loop Flow PCR; zwei Systeme parallel auf einem LoC; Kammern und Ventile grau eingefärbt; Unterteilung der Kammern in die Heizonen Denaturierung (95 °C), Hybridisierung (58 °C) und Elongation (72 °C).

Wie auch bei dem Closed Loop Flow PCR Konzept ist für die Umsetzung des Kammer Shuttle Konzeptes^[63; 48] ein aktives Flüssigkeitsmanagement, z.B. über magnetisch aktudierbare Ventile^[63], auf dem LoC unumgänglich.

Das System zeichnet sich durch seine kompakte Geometrie und freie Programmierung der PCR Prozessparameter aus, im Gegensatz zu dem Stationary PCR Konzept. Es ermöglicht aber zusätzlich eine schnellere Heiz-/ Kühlzeit aufgrund der geringeren thermisch zu prozessierenden Masse. Wie auch bei dem Konzept der Oscillation Flow PCR besteht keine direkte Grenzfläche zwischen den Temperaturzonen der Denaturierung und des Annealing. Dies reduziert den thermischen Stress während der PCR und erlaubt eine einfache Realisierung der thermischen Ansteuerung ohne eine aktive Kühlung. Weiterhin ermöglicht das Kammer Shuttle Konzept die Prozessierung des PCR Reaktionsvolumens im Bereich

mehrerer Mikroliter, mit dem Vorteil der Nutzung des gleichen fluidischen Systems in jedem Zyklusdurchlauf. Dies wirkt sich positiv auf das O/V Verhältnis aus.

Bei Systemen auf Basis dieses Konzepts ist ein designbedingter Faktor ausschlaggebend, das Verhältnis von Kammervolumen zu Kanalvolumen. Das Kanalvolumen zwischen den PCR Kammern beeinflusst direkt die PCR Effizienz gegenüber Systemen, welche eine Prozessierung des kompletten PCR Reaktionsvolumens pro Zyklus ermöglichen. Dieser Effekt tritt auf, da beim Verdrängen der PCR Reagenzien von einer Kammer in die nächste Kammer das Kanalvolumen substituiert wird. Dieser Einfluss ist mit weiteren Parametern in einem einfachen Modell in Abbildung 7 am Beispiel einer drei Kammer Shuttle PCR (3 KS PCR) dargestellt.

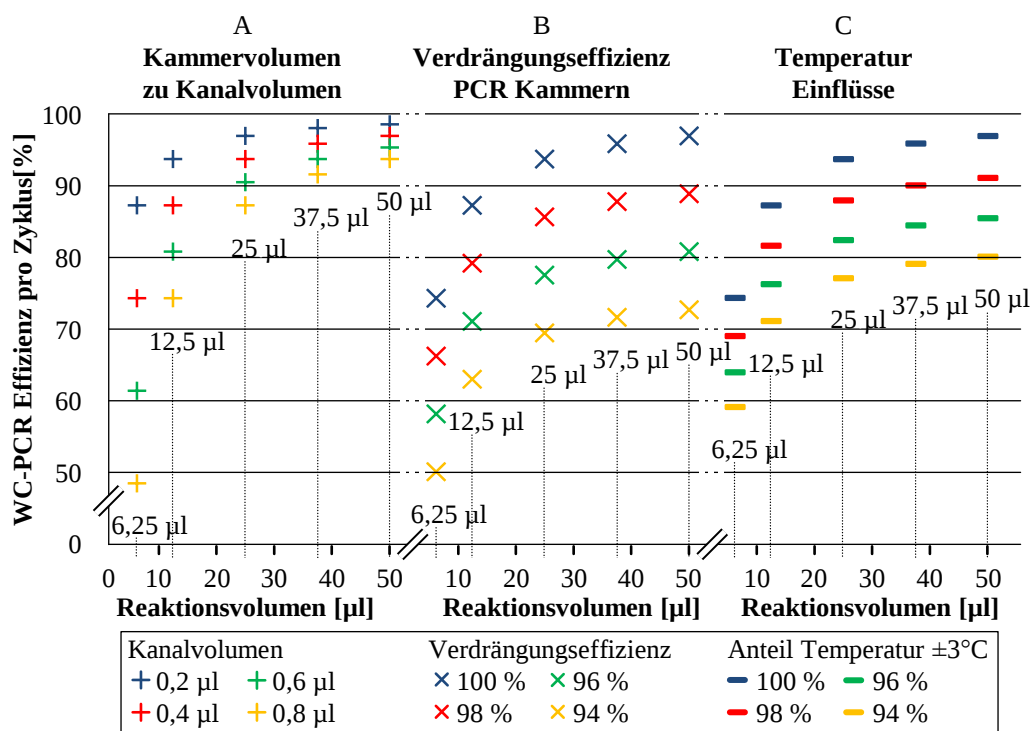


Abbildung 7: Theoretische Betrachtung der WC-Effizienz des 3 KS PCR Konzepts anhand designbedingter Einflussgrößen: A) Kanalvolumen zwischen den PCR Kammern; B) Verdrängungseffizienz der PCR Kammern; C) Anteil des Reaktionsvolumens auf Solltemperatur.

Für die theoretische Betrachtung der Einflüsse des 3 KS PCR Konzepts ist hier die Minderung des Reaktionsvolumens (designbedingt), im Vergleich zur idealen Prozessierung des kompletten PCR Mix, über einem PCR Zyklus dargestellt. Variiert wird jeweils eine der drei Einflussgrößen; A) Kanalvolumen zwischen den PCR Kammern, B) Verdrängungseffizienz der PCR Kammern und C) Anteil des PCR Reaktionsvolumens $\pm 3^\circ\text{C}$ auf Solltemperatur. Da in dem 3 KS PCR Konzept keine Kanäle ohne Volumen realisierbar sind, wird für die Hochrechnung in B und C ein Kanalvolumen von 0,4 µl, entsprechend dem in Kapitel 5.4 gezeigtem Design, zugrunde gelegt. Die konzeptbedingte

theoretische Effizienz, im Folgenden Worst Case Effizienz (WC-Effizienz) genannt, entspricht dem Quotienten des PCR Reaktionsvolumens zum insgesamt prozessierten Volumen eines PCR Zyklus. Es wird angenommen, dass in nicht prozessiertem Volumen im aktuellen PCR Zyklus kein Produkt amplifiziert werden kann. Ein nicht prozessiertes Volumen zeichnet sich zum einen durch nicht verdrängtes Reaktionsvolumen, zum anderen durch die Tatsache, dass ein vorgegebenes Temperaturprofil nicht korrekt durchlaufen werden kann, aus.

Es ist ersichtlich, dass die Umsetzung des 3 KS PCR Konzepts nicht für die Prozessierung weniger Mikroliter Reaktionsvolumen (kleiner 10 μl) geeignet ist. Ansätze^[63] mit einer Verdrängungseffizienz von 90 % des Reaktionsvolumens der PCR Kammern würden bei einem Reaktionsvolumen von 8 μl eine drastische Reduzierung der WC-Effizienz zur Folge haben. Hinzukommen würde hier noch zusätzlich der negative Einfluss des Kanalvolumens, Abbildung 7 A.

Neben den designabhängigen Parametern spielt die Temperatur eine entscheidende Rolle. Werden 6 % (100 % blau zu 94 % gelb, Abbildung 7 C) des PCR Reaktionsvolumen nicht dem Protokoll entsprechend in dem Intervall von ± 3 °C Solltemperatur pro Temperaturzone prozessiert, verringert sich unabhängig von dem Reaktionsvolumen die WC-Effizienz des PCR Systems um bis zu 16 %.

Zusammengefasst muss bei einem angestrebten Reaktionsvolumen von 25 μl , einem Kanalvolumen von 0,4 μl , einer optimalen Verdrängung und thermischen Prozessierung (Annahme), in einem auf drei Kammern basierten PCR Konzept mit einer Minderung der WC-Effizienz von 6,4 % (100 % - 93,6 %, Abbildung 7 A) gegenüber einem idealen System gerechnet werden. Die PCR Effizienz des hier gezeigten Designs wird in Kapitel 6.5.3 experimentell ermittelt.

5 Plattformtechnologie des LoC Systems

Ein Schwerpunkt der Dissertation ist die Adaption einer bestehenden Plattformtechnologie^[6; 16; 67] an multifaktorielle Einflüsse, die bei komplexen mikrofluidischen Netzwerken mit Anforderung wie Temperatur, Druck und Langzeitstabilität auf kleinem Raum umgesetzt werden müssen. Hierfür wird in diesem Kapitel der Fokus auf die Fügeverbindung mittels Definition eines Anforderprofils, Adaption der Materialien, Aufzeigen von Belastungsgrenzen über experimentelle und simulative Verfahren gelegt. Die Rahmenbedingungen hierfür werden zum einen durch das Anforderungsprofil einer PCR (Temperatur, Langzeitstabilität), zum anderen durch das Konzept der 3 KS PCR (Kanalvolumen zu Reaktionsvolumen, Oberfläche zu Volumen Verhältnis) festgelegt. Weiter über die Steuerung der Ventile auf der mikrofluidischen Plattform (Druck, Wechselbelastung) sowie herstellungsbedingte Faktoren (Massenfertigung, Stückkosten, Herstellungszeit). Vorgestellt wird das Design erstens für die 3 KS PCR, Abbildung 8, zweitens für das Herstellungsverfahren zweier Aufbaukonzepte sowie drittens die Umsetzung der Erkenntnisse hinsichtlich der Herstellung von Einzelfunktionsmustern (EFM 3 KS PCR) und von voll automatisierten Lab on a Chip (LoC) Systemen.

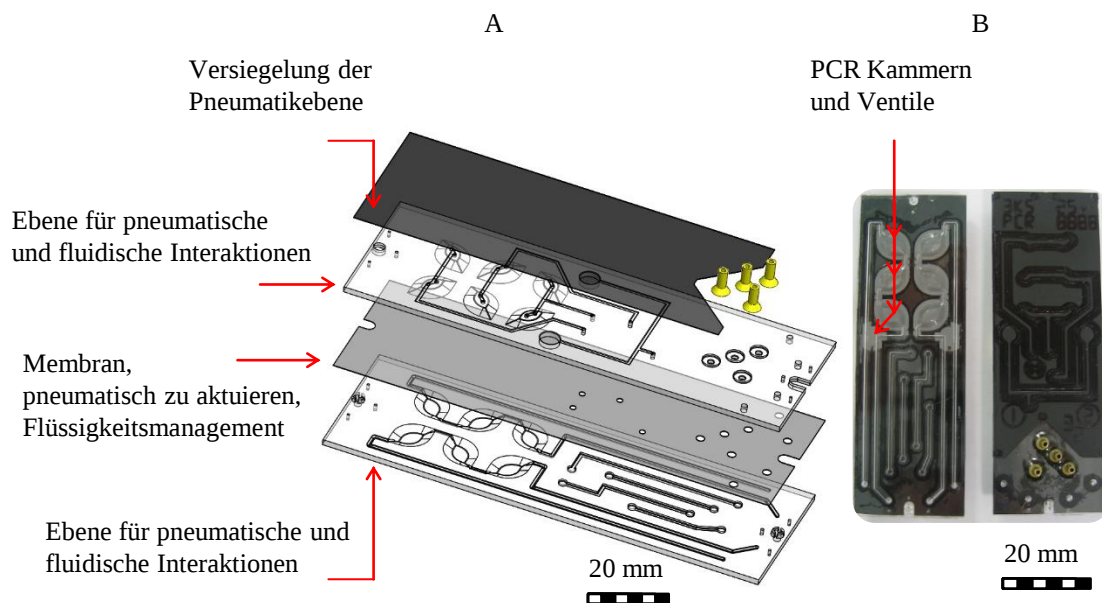


Abbildung 8: EFM 3 KS PCR; A) CAD des EFM 3 KS PCR; B) Aufgebautes 3 KS PCR EFM mit zwei PCR Strängen, Vorder- und Rückseite, PCR Kammern (Anzahl 6) und Ventil (Anzahl 2) grau eingefärbt.

Eine detaillierte Beschreibung des EFM inklusive aller Funktionen folgt in Kapitel 5.4.2.

5.1 Einflüsse Laserschweißen

Bei der Umsetzung des 3 KS PCR Prinzips ist konzeptbedingt, Kapitel 4, der Einfluss des Kanal- zu Reaktionsvolumens mit entscheidend, beschrieben in Kapitel 3.2.2 S.14. Mit Blick auf die Umsetzung eines *Escherichia coli* (*E coli*) Assay^[16] auf Basis dieser Plattformtechnologie, zeigt sich eine systembedingte Grenze: Der Abstand zwischen Funktionen (Ventile, Pumpen, Kammern,...) auf dem LoC, die thermischen Prozessen ausgesetzt sind; „[...] Wie sich bei den Dichtheitsversuchen bei 95°C gezeigt hat, ist [...] die geringe Temperaturbeständigkeit der Schweißnähte ein [...] Thema. In der praktischen Anwendung wird dieses Problem [...] durch lokales Aufheizen der Polymerase-Kettenreaktionskammer auf dem Testchip [...] unter Vermeidung einer Erwärmung der Schweißnähte gelöst [...]“^[6 S.81]. Ohne eine Adaption des Fügeprozesses müsste der Abstand der drei PCR Kammern zur Vermeidung einer Delamination der Fügeverbindung entsprechend groß gewählt werden, was sich negativ auf die WC-Effizienz des Konzeptes auswirkt.

Spezieller Fokus liegt in der Charakterisierung Kapitel 5.2 auf folgenden Einflüssen.

- Abstand zwischen den Funktionen auf dem LoC:
Der Abstand zwischen den PCR Kammern definiert zusammen mit dem Kanalquerschnitt das Volumen, welches nicht in den PCR Prozess eingebunden ist.
- Temperaturbeständigkeit der Schweißnähte:
Die zu erreichenden Grenzwerte der Temperaturen sind zum einen durch die PCR Schritte Denaturierung 94 °C, Annealing 54 °C und Elongation 72 °C^[120 S.84f.] festgelegt. Zum anderen sind sie durch Funktionen wie die Detektion über einen Mikroarray oder eine thermische Lyse bestimmt.
- Druckbeständigkeit der Schweißnähte:
Die Realisierung der Schaltlogik (Ventile, Kammern und Pumpen) auf dem LoC wird mit einem druckgesteuerten Konzept^[16] umgesetzt. Die Geometrie einer PCR Kammer ist direkt abhängig von der pneumatischen Belastbarkeit der Fügeverbindung. Es gilt, je größeren Druck die Fügeverbindung standhält, desto stärker kann die Membran ausgelenkt, bzw. desto sphärischer kann das Kammerdesign ausgelegt werden. Dies wirkt sich auf das Oberflächen/ Volumen Verhältnis aus, welchem das Reaktionsvolumen ausgesetzt ist. Angestrebt wird eine Druckbeständigkeit von mindestens 150 kPa_{rel} bei Denaturierungstemperatur.
- Langzeitstabilität der Fügeverbindung:
Mit Bezug auf die Standard PCR Laufzeit im Blockzykler von über 100 Minuten, einer Hybridisierungszeit von Mikroarrays von bis zu 60 Minuten, Kapitel E und weiteren Funktionen wie Lyse, Aufreinigung, Mischen und Pumpen, Kapitel 7, die auf einem LoC

zu realisieren sind, muss die Plattform alle Funktionen in vollem Umfang über einen Zeitraum von mindestens 160 Minuten zur Verfügung stellen können.

Zusätzlich zu den direkt untersuchten Einflüssen in Kapitel 5.2 können Aussagen über die Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit unter Einsatzbedingungen getroffen werden. Dies ist möglich durch die Anzahl der durchgeführten Charakterisierung der 3 KS PCR in Tabelle 8. Die Ausfallrate ist bei 140 Experimenten auf den 3 KS PCR Einzelfunktionsmustern mit $< 3 \%$ bestimmt.

5.2 Validierung Laserschweißprozess

Aufbauend auf den Erkenntnissen von Schmidt^[6 S.80] basiert die Adaption des Laserschweißprozesses, Kapitel 3.1, auf der Annahme, dass ein Verändern des Herstellungsprozesses von einem fokussierten hin zu einem defokussierten Schweißprozess die Nahtfestigkeit der Fügeverbindung erhöht. Die Defokussierung bewirkt eine Strahlaufweitung; die absorbierende Ebene wird nicht mehr punktuell, sondern, bei einem mit 90° zur Fügeebene einfallenden Laserstrahl, durch eine kreisförmige Laserfläche aufgeschmolzen. Schmidt stellte fest: „[...] Die Entfernung vom Fokus des Lasers bringt zunächst eine Erhöhung der Stirnabzugskräfte und auch der Nahtfestigkeit mit sich [...] Wird die Entfernung zum Fokus jedoch zu groß [...] sinkt die Festigkeit wieder. Vermutlich reicht dann die mittlere Energie [...] nicht mehr zur Erzeugung einer ausreichend fließfähigen Schmelze an beiden Grenzflächen [...] aus [...]“^[6 S.80]. Begrenzt wird das Laser-Prozessfenster für die Herstellung der Schweißnaht von Schmidt zum einen durch eine niedrige gemessene Festigkeit bei maximaler Defokussierung (10 mm), zum anderen ist festzustellen, dass bei einem hohen Energieeintrag Material aus dem Zentrum der Schweißbahn verdrängt oder zerstört wird^[6 S.48].

Die Anpassung des Herstellungsprozesses in dieser Arbeit basiert auf der Annahme, dass ein defokussiertes Schweißen in Verbindung mit über den Laser eingekoppelter Energie ausreichend gute Verbindungen erzeugt. Zusätzlich wird angenommen, dass über die Dicke der Fügepartner das Laser- Prozessfenster erweitert werden kann und damit alle Kriterien an das LoC System erfüllt sind.

5.2.1 Eingrenzung des Prozessfensters für Laserschweißprozesse

Für die Adaption der Plattformtechnologie an die Anforderungen einer 3 KS PCR bzw. an die grundsätzlichen Voraussetzungen für komplexe fluidische Netzwerke, wurde die Dicke der auf Ether basierenden Polyurethan^[64] Membran^[65] (TPU) von $(25 \pm 2,5) \mu\text{m}$ auf $(100 \pm 10) \mu\text{m}$ erweitert. Dies vergrößert, wie in Kapitel 5.2.2 gezeigt, das Prozessfenster des laserbasierten Fügeprozesses und erleichtert die manuelle Herstellung der LoCs. Der für den

Aufbau der Prüfkörper verwendete Laserstand^[66] war vorhanden und ist mit einer entsprechenden Charakterisierung^[67 S.5] gegeben. Eine grobe Eingrenzung der Herstellungsparameter erfolgte optisch über Sichtprüfung der Schweißverbindung der Polycarbonat basierten starren, transparenten Ebene (PC)^[68] mit der flexiblen TPU Membran (absorbierende Schicht, Kapitel 3.1).

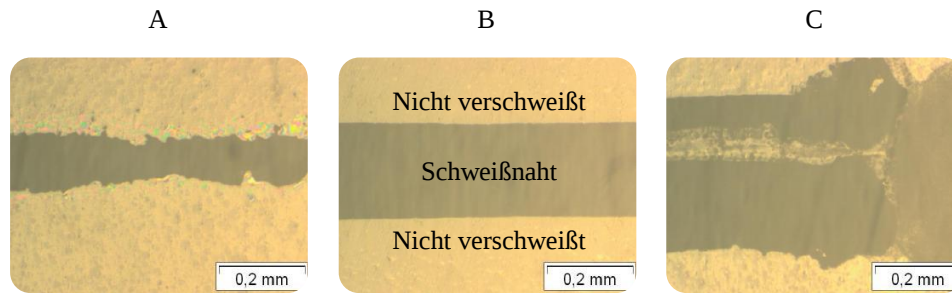


Abbildung 9: Festlegen der Laser-Prozessgrenzen über optische Bewertung, Aufsicht durch transparente PC Ebene auf absorbierende TPU Membran; A) untere Laser- Prozessgrenze, Verfahrensgeschwindigkeit 30 mm sec^{-1} , Wiederholfrequenz 500 kHz , Laserleistung 300 mW , Defokussierung -15 mm ; B) Valide Laser-Prozessparameter; Verfahrensgeschwindigkeit 30 mm sec^{-1} , Wiederholfrequenz 500 kHz , Laserleistung 1000 mW , Defokussierung -15 mm C) obere Laser- Prozessgrenze Verfahrensgeschwindigkeit 30 mm sec^{-1} , Wiederholfrequenz 500 kHz , Laserleistung 2500 mW , Defokussierung -15 mm .

In Abbildung 9 ist die visuelle Eingrenzung der Prozessparameter für die Charakterisierung der Fügeverbindung mittels Laserdurchstrahlschweißens dargestellt. Die untere Grenze A) zeichnet sich durch eine inhomogene Abgrenzung der Schweißnaht zur umgebenden, nicht verschweißten Fläche aus. In B) ist eine optisch gute Verschweißung gezeigt. Die Abbildung C) zeigt die obere Grenze des Laser- Prozessfensters. Hier lassen sich stellenweise inhomogene Ränder der Schweißnaht feststellen. Zusätzlich ist ein heller Streifen in der Mitte zu erkennen, welcher verursacht wird durch die Verdrängung oder Pyrolyse der TPU Membran.

In Abbildung 10 sind die Ergebnisse der optischen Eingrenzung für die Defokussierung des untersuchten Laser- Prozessfenster von 5, 10, 15 und 20 mm gezeigt.

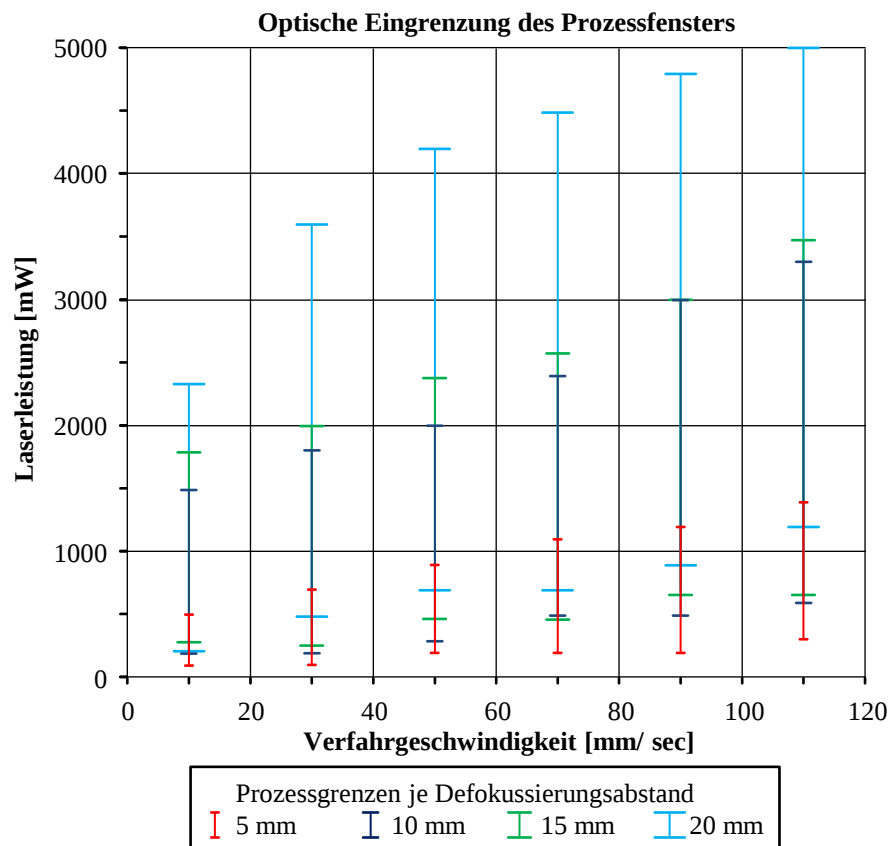


Abbildung 10: Optische Eingrenzung des Laser- Prozessfensters, Festlegen der oberen und unteren Grenze; Variiert wurde die Verfahrgeschwindigkeit, Laserleistung und Defokussierung; Wiederholfrequenz 500 kHz.

Es zeigt sich, dass die optische Eingrenzung einen Überblick gibt über den möglichen Bereich eines Laser- Prozessfensters für die Herstellung der PC/ TPU basierten Plattform.

Zusätzlich können über die ermittelte Schweißbahnbreite, exemplarisch in Abbildung 11 gezeigt, folgende Aussagen getroffen werden:

- Je größer der Defokus, desto höher liegt die obere Grenze des Laser- Prozessfensters.
- Je größer der Defokus, desto größer ist die Absorptionsfläche.

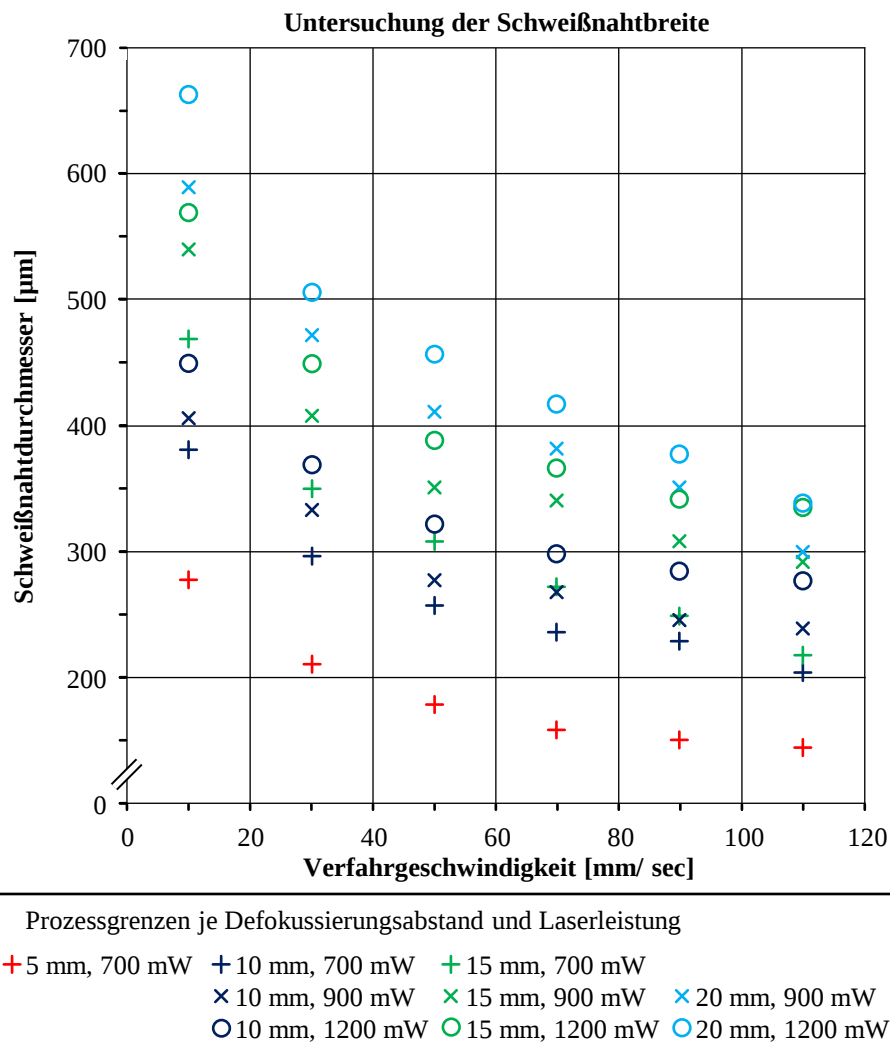


Abbildung 11: Einfluss der Verfahrensgeschwindigkeit auf Schweißnahtdurchmesser; Variiert wurde die Verfahrensgeschwindigkeit, Laserleistung und Defokussierung; Wiederholfrequenz 500 kHz.

Betrachtet man die Schweißnahtbreite z.B. bei einer Verfahrensgeschwindigkeit von 110 mm sec^{-1} für die Defokussierung von 5 und 15 mm, so kann unter der Annahme einer kreisförmigen Absorptionsfläche eine Vergrößerung derselben um den Faktor 1,6 ermittelt werden. Die obere Grenze des Prozessfensters bei diesen Parametern (1500 mW zu 3500 mW) differiert um den Faktor 2,3. Theoretisch sollten beide Faktoren identisch sein, da die Pyrolyse des Materials TPU von den Parametern Laserleistung pro Fläche, Einwirkdauer und Wärmediffusion abhängt. Zu erklären ist dieser Effekt mit einer homogeneren Verteilung der Laserenergie bei höherer Defokussierung, verursacht durch ein flacheres Gaußprofil des Laserstrahls. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 12 zusätzlich zu dem Einfluss der Laserleistung auf das Profil dargestellt.

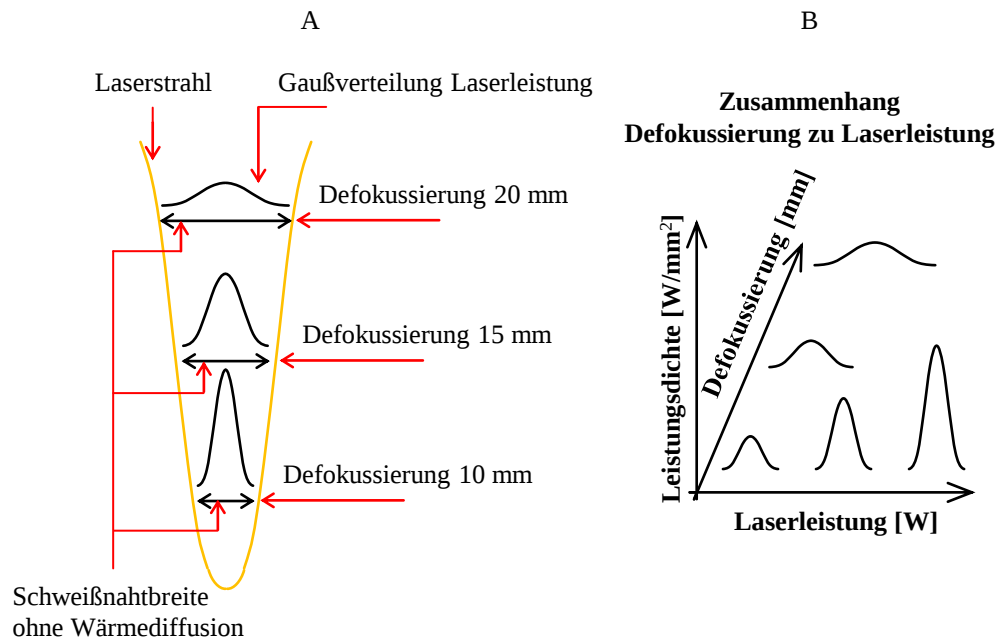


Abbildung 12: Zusammenhang zwischen Leistungsdichte (Gaußverteilung) und Defokussierung^[6 S.61]; A) Einfluss der Defokussierung bei konstanter Laserleistung; B) Einfluss der Defokussierung bei variierender Laserleistung.

Innerhalb der eingegrenzten Laser- Prozessparameter wurden Untersuchungen der Fügeverbindung auf Druckbeständigkeit bis 300 kPa_{rel}, bei Temperaturen bis 95 °C und einer Prozesszeit von bis zu drei Stunden durchgeführt. Hierbei wurde das Augenmerk auf die Herstellung einer großen Absorptionsfläche durch den Laserstrahl auf der TPU Membran gerichtet. Dies wurde erreicht durch eine Defokussierung von 10 mm - 20 mm. Neben einem größeren Laser- Prozessfenster bietet dies gegenüber kleineren Absorptionsflächen den Vorteil, dass Schwankungen der Absorptionsfläche, verursacht durch ein Auslenken des Laserstrahls aus dem Zentrum heraus (kreisförmiges zu ovalem Profil), weniger ins Gewicht fallen als bei kleinen Defokussierungen. Dies ist gerade bei der Übertragung der Herstellungsparameter von Einzelfunktionsmustern, Kapitel 6, auf LoC Systeme, Kapitel 7, mit entscheidend.

5.2.2 Prozessfenster Laserschweißen von PC zu TPU

Nach dem optischen Eingrenzen des Laser- Prozessfensters, für verschiedene Fokuslagen, werden die Anforderungen an die Plattformtechnologie untersucht. Diese sind gegeben durch das pneumatische Flüssigkeitsmanagement, die für die PCR benötigte Denaturierungstemperatur und die für den PCR Prozess benötigte Langzeitstabilität der LoCs. Die Validierung erfolgt über eine Druckprüfung von Einzelfunktionsmustern. Für die pneumatische und thermische Validierung wurden Prüfkörper hergestellt, welche mit identischen Parametern von beiden Seiten mittels Konturschweißens, Kapitel 3.1, über Laserschweißen gefügt werden. Der Aufbau einer Prüfkammer ist in Abbildung 13 gezeigt.

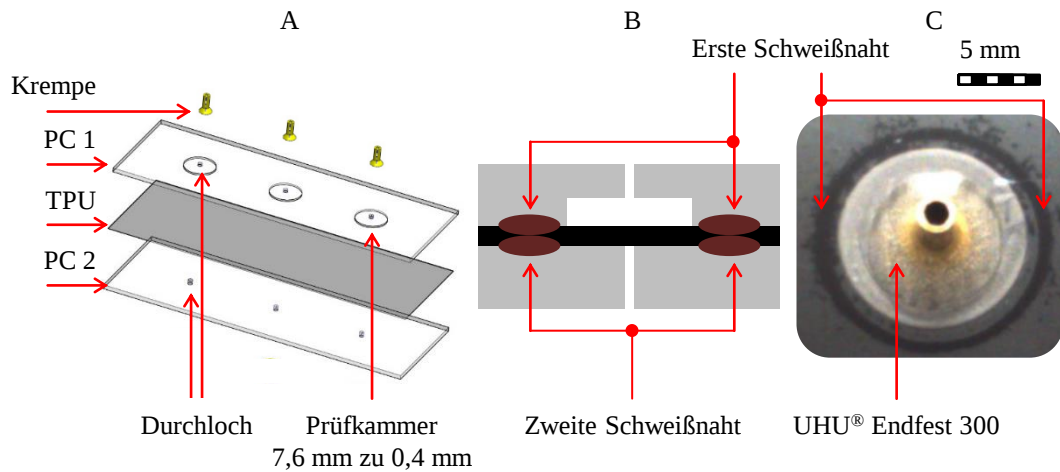


Abbildung 13: Prüfkörper für Druckprüfung PC zu TPU Schweißung; A) CAD Dreilagenaufbau; B) Schematische Darstellung Querschnitt durch Prüfkammer; C) Bild einer Prüfkammer vor der Druckprüfung, Verfahrensgeschwindigkeit 30 mm sec^{-1} , Wiederholfrequenz 500 kHz , Laserleistung 900 mW , Defokussierung -15 mm .

Die Prüfkörper werden mittels eines Silikonschlauchs kontaktiert und schrittweise über einen Druckregler belastet. Eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus ist in der Abbildung 14 gezeigt.

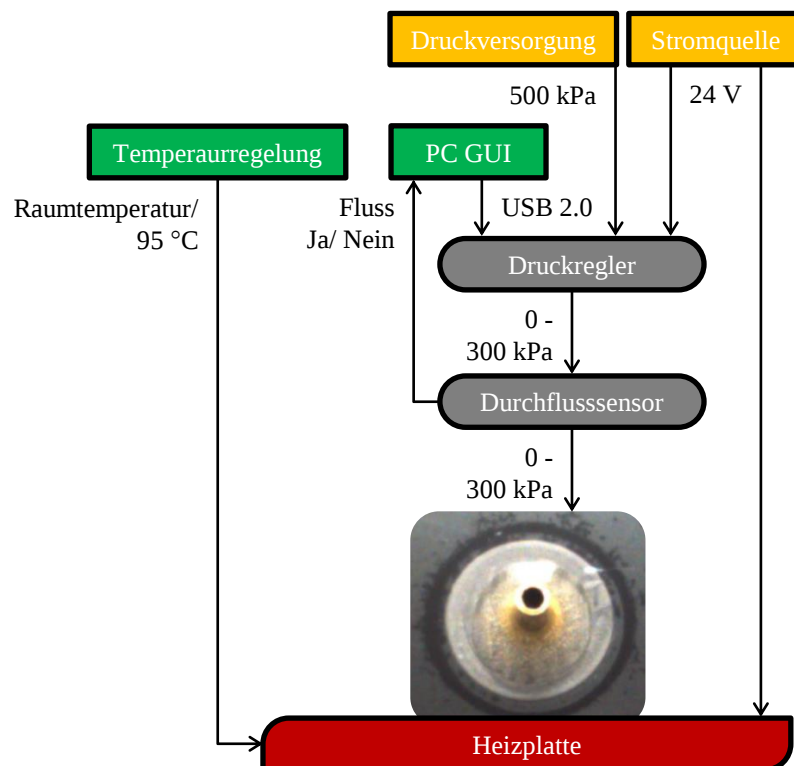


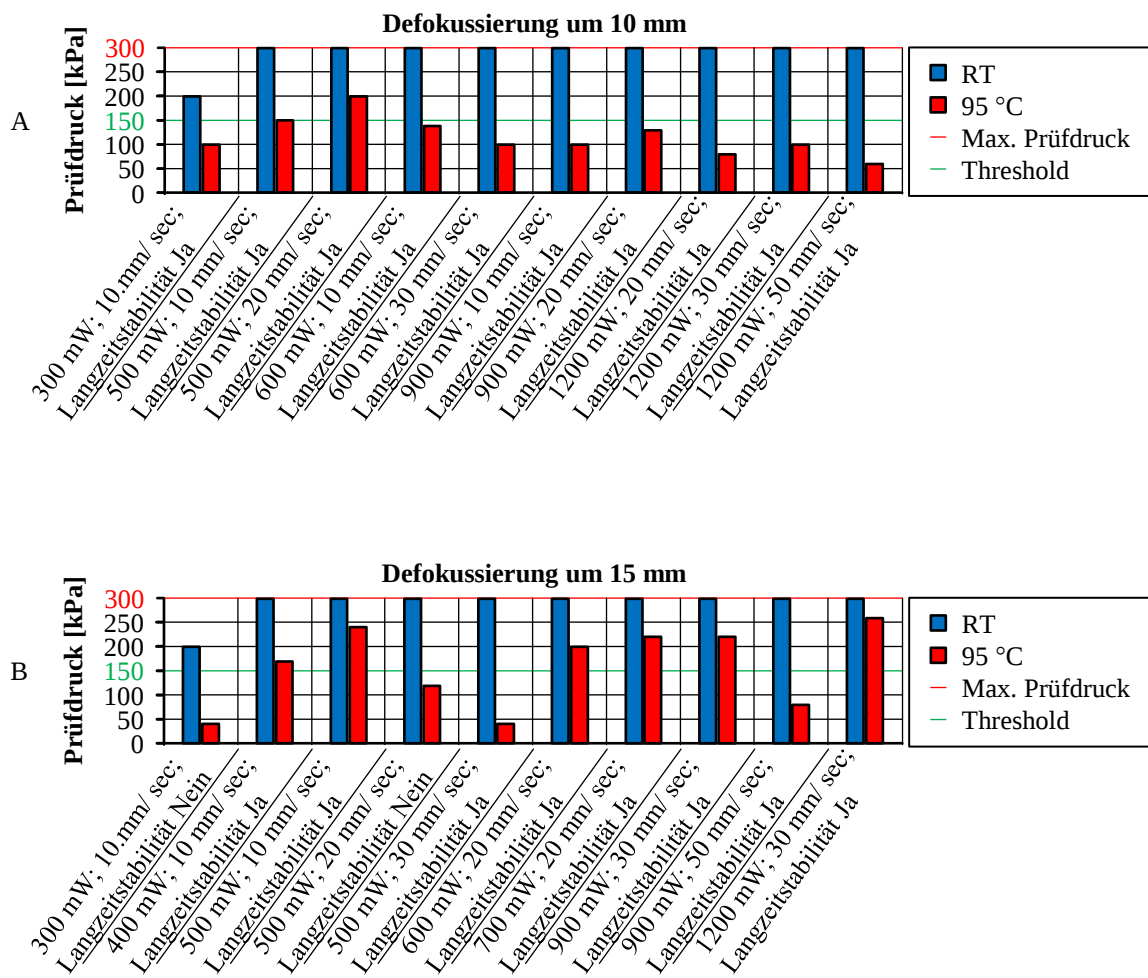
Abbildung 14: Schematische Darstellung des Prüfstands für pneumatische und thermische Validierung der Prüfkörper.

Unter anderem ermöglicht die Steuerung des Versuchszustandes über LabVIEW in Abbildung 14 eine Programmierung folgender Prüfparameter:

- Temperatur der Heizplatte, Raumtemperatur/ 95 °C.
- Aufheizzeit der Heizplatte/ Aufwärmvorgang des Prüfkörpers.
- Thermische Belastung von bis zu drei Stunden ohne Druck.
- Pneumatische Belastung (Burstversuche), schrittweise Druckerhöhung von 10 kPa alle 30 Sekunden bis zum maximalen Prüfdruck von 300 kPa_{rel.}

In Abbildung 15 ist die Auswertung der Charakterisierung des Laser- Prozessfensters für die Materialkombination PC verschweißt mit TPU für eine Defokussierung von 10 mm, 15 mm und 20 mm dargestellt. Gezeigt werden Burstversuche (x- Achse) die:

- den Mittelwert aus drei Messungen darstellen (y- Achse).
- eine pneumatische Belastung, mit (rot) bzw. ohne (blau) thermische Beanspruchung, der Prüfkörper zeigen (maximal möglicher Prüfdruck 300 kPa_{rel.}).
- eine Charakterisierung bezüglich der Langzeittemperaturstabilität über den Zeitraum von drei Stunden vermitteln.



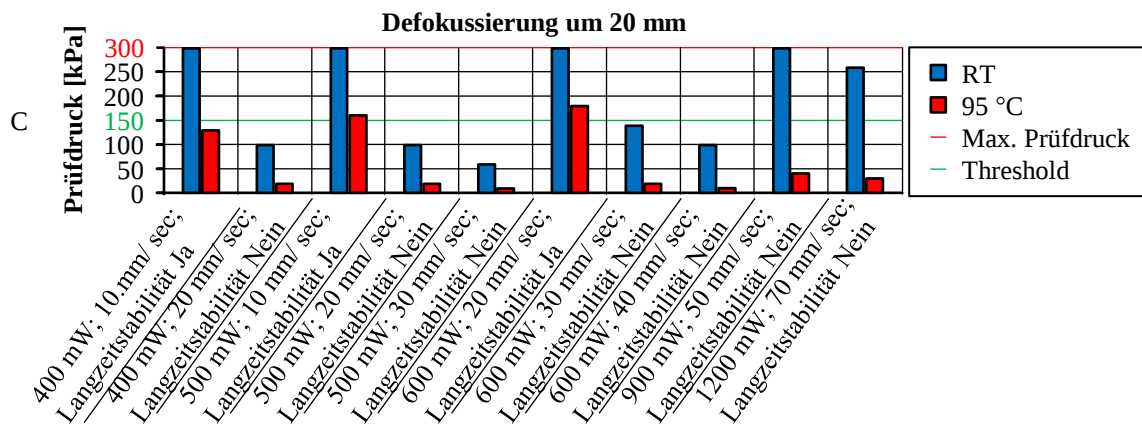


Abbildung 15: Auswertung der pneumatischen und thermischen Validierung des Prozessfensters für Laserschweißprozesse PC zu TPU; Mindestanforderung an Druckbeständigkeit ist 150 kPa_{rel}; A: Defokussierung zur Fokusebene 10 mm; B: Defokussierung zur Fokusebene 15 mm; C: Defokussierung zur Fokusebene 20 mm.

Anhand der Ergebnisse, gezeigt in Abbildung 15, können folgende Aussagen getroffen werden:

- Bei RT erfüllen alle Parameter mit einer Fokusverschiebung von 10 mm und 15 mm die Kriterien der Druckbeständigkeit bis 150 kPa_{rel}. 90 % der Messungen erreichen den Maximaldruck (Prüfstand) von 300 kPa_{rel}. Unter Einbeziehung der thermischen Beanspruchung kann in keiner der Messungen der Maximaldruck nachgewiesen werden. In allen Fällen mindert der thermische Einfluss den erreichten Druck im Vergleich ohne die thermische Belastung.
- Nachgewiesen wurde bei einer Defokussierung von 15 mm, einer Verfahrgeschwindigkeit von 30 mm sec⁻¹ und einer Laserleistung von 1200 mW eine bei 95 °C erreichte mittlere Druckbeständigkeit der Schweißnaht von 260 kPa_{rel}. Ebenfalls sind hier die Anforderungen an die Langzeitstabilität über drei Stunden bei 95 °C erreicht worden (Parameter A).
- Vergleichbar gute Ergebnisse wurden bei einem Defokus von 15 mm, einer Verfahrgeschwindigkeit von 20- 30 mm sec⁻¹ und einer Laserleistung von 600- 900 mW bei 95 °C erzielt. Hier ist neben einer Temperaturbeständigkeit der Schweißnähte über drei Stunden eine Druckbeständigkeit von 200- 220 kPa_{rel} bei 95 °C ermittelt (Parameter B).
- Die oben positiv ermittelten Parameter legen das Laser- Prozessfenster der PC zu TPU Schweißung fest. Es zeigt sich, dass mit einer Defokussierung von 15 mm, einer Verfahrgeschwindigkeit von 20- 30 mm sec⁻¹ und einer Laserleistung von 600- 1200 mW Schweißnähte erzeugt werden können, die alle Kriterien erfüllen. In diesem Prozessfenster werden durchschnittlich Schweißnähte mit einem Durchmesser von 300- 400 µm, nach Abbildung 11 erzeugt.

- Bei 93 % aller gemittelten Laser- Prozessparameter mit thermischer Belastung, wurde bei einer Druckbeständigkeit der Prüfkammern kleiner 50 kPa_{rel} keine Langzeitbeständigkeit der Schweißnähte bei 95 °C festgestellt.

Die Hypothese, dass eine vierfach dickere TPU Membran ein größeres Prozessfenster für den Laserschweißprozess ermöglicht, ist damit bestätigt. Entscheidend ist jedoch, dass über diese Charakterisierung Laser- Parameter ermittelt worden sind, die den multifaktoriellen Ansprüchen eines komplexen fluidischen Netzwerkes gerecht werden.

Es ist erfolgreich ein druck- und temperaturbeständiges Laser- Prozessfenster für die Umsetzung des 3 KS PCR Konzeptes festgelegt worden. So sind die Anforderungen an eine kleine Schweißfläche (Nahtbreite 300- 400 µm), eine Temperaturbeständigkeit von bis zu 95 °C, eine Druckbeständigkeit von bis zu 150 kPa_{rel} und einer thermischen Belastung von über drei Stunden, Kapitel 5.1, für die PC zu TPU Schweißnaht erfüllt.

Die thermische Belastung der Schweißnähte ist bei den gewählten Rahmenbedingungen als der entscheidende Einflussfaktor, bezogen auf die Stabilität/ Belastbarkeit der Fügeverbindung, identifiziert.

Weiterhin wurde festgestellt, dass in 93 % der gezeigten Messungen unter thermischer Belastung eine Langzeitstabilität der Schweißnähte bei 95 °C nicht gegeben war, wenn eine Druckbeständigkeit der Fügeverbindung kleiner 50 kPa_{rel} ermittelt wurde.

Abschließend anzumerken ist die einfachere Handhabung der 100 µm dicken Membran im Gegensatz zu einer Membran von 25 µm Dicke. Effekte wie die statische Aufladung der Membran (z.B. Anhaftung an Bauteilen oder Aufbauten) oder auch der Einfluss der Oberflächenspannung (z.B. bei der Reinigung mit Lösemitteln) behindern die manuelle Prozessierung und sind bei einer 100 µm dicken Membran in ihren negativen Auswirkungen weniger relevant.

5.2.3 Prozessfenster Laserschweißen von PC zu PC

In diesem Abschnitt wird das Schweißverfahren auf die Einsatzmöglichkeit der Fügung zweier PC Ebenen untersucht. Der Herstellungsprozess der Prüfkörper für die Validierung der PC zu PC Fügung mittels Laserschweißens wurde mittels eines Diodenlasers^[69] umgesetzt. Neben einer größeren Nähe zu einem liniengerechten Herstellungsprozess, z.B. Justage der Bauteile über Anschläge, Überwachung aller Prozessparameter und die Umsetzbarkeit einer automatisierten Herstellung, ist hier die Möglichkeit der Strahlformung, Variation des Gaußprofils, integriert. Die Erzeugung einer Laserfläche mittels Defokussierung, Kapitel 5.2.2, ist durch den Einsatz von Linsen im Strahlengang des Lasers vereinfacht. Die in den Laser integrierten Elemente erzeugen ein „M“ Profil, welches einen homogenen Energieeintrag und damit das Einkoppeln größerer Leistungen als beim

Diodenlaser^[66] in Kapitel 5.2.2 ermöglicht. Die weitere Charakterisierung, sowie der Aufbau der EFMs und der LoCs erfolgt auf dem Laserstand^[69].

Für die Validierung des PC zu PC Schweißprozesses ist neben der Betrachtung der Rahmenparametern in Kapitel 5.1 das Hauptaugenmerk auch auf die Erzeugung von Schweißnähten auf vordefinierten Strukturen gerichtet. Schematisch ist dies in Abbildung 16 dargestellt.

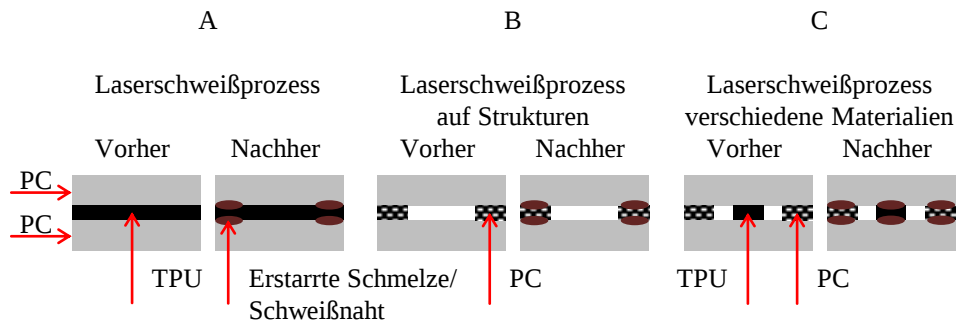


Abbildung 16: Schematische Darstellung vor und nach dem Laserschweißprozesses; A) Laserschweißprozess PC (transparent) zu TPU (absorbierend), flächige Schweißung; B) Laserschweißprozess PC zu PC, Schweißung auf Strukturen; C) Laserschweißprozess PC zu PC und TPU, Schweißung auf Strukturen.

Der Fügeprozess auf vordefinierten Strukturen in Abbildung 16 B) ermöglicht die Verarbeitung verschiedener Materialien in einer LoC Ebene C) und erweitert mit Hilfe des Fügeprozesses, Abbildung 17, das Funktionsspektrum der LoC Plattform.

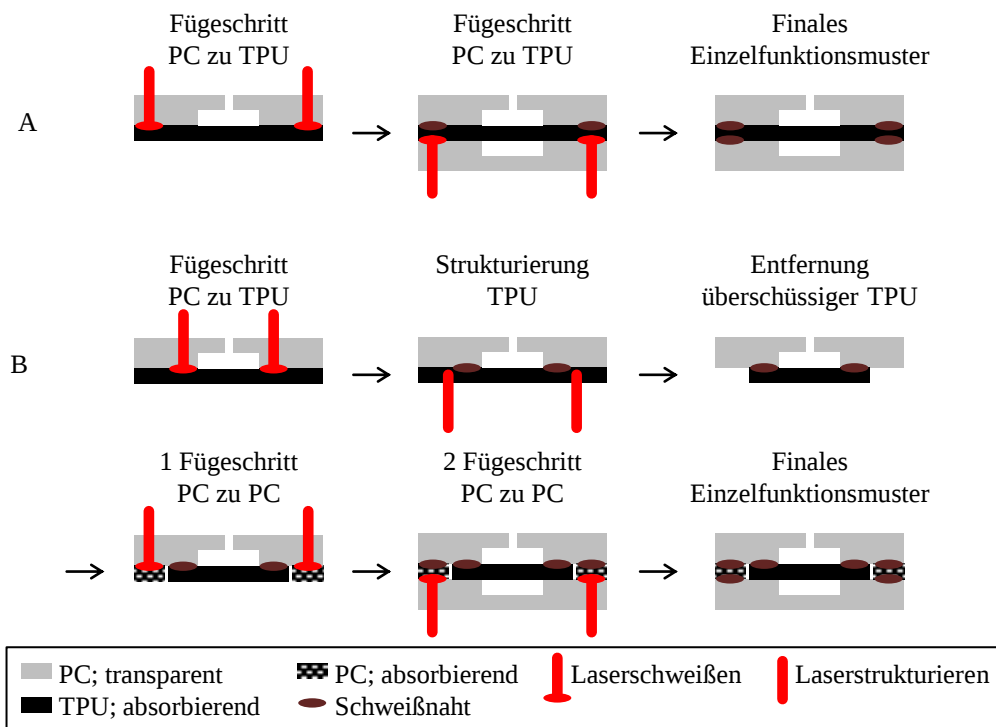


Abbildung 17: Laserbasierte Fügeprozesse für LoC Plattformen; A) Fügeprozess für PC zu TPU Fügeverfahren nach Schmidt^[6]; B) Fügeprozess für die Charakterisierung PC zu PC Fügeverfahren.

Der Prüfkörper, der die Spezifikation der PC zu PC Schweißung erfüllt und mit dem Fügeprozess aus Abbildung 17 B) hergestellt ist, wird in Abbildung 18 dargestellt.

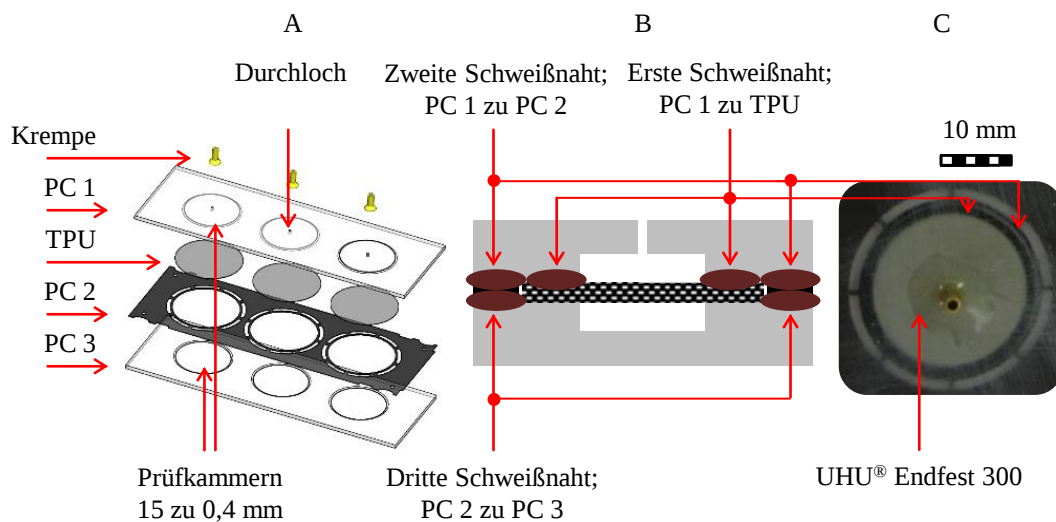


Abbildung 18: Prüfkörper für Druckprüfung PC zu PC Schweißung; A) CAD Dreilagenaufbau mit Materialien PC und TPU in einer Ebene; B) Schematische Darstellung Querschnitt durch Prüfkammer; C) Bild einer Prüfkammer vor der Druckprüfung; PC zu TPU: Verfahrensgeschwindigkeit 50 mm sec⁻¹, Wiederholfrequenz CW, Laserleistung 1600 mW, Anpressdruck 400 kPa_{rel}; PC zu PC: Verfahrensgeschwindigkeit 50 mm sec⁻¹, Wiederholfrequenz CW, Laserleistung 2170 mW, Anpressdruck 600 kPa_{rel}.

Die Eingrenzung des Laser- Prozessfensters der Fügeverbindung mehreren PC Ebenen erfolgte nach Abbildung 9 durch visuelle Analyse. Hier ist das Laser- Prozessfenster auf einen Bereich (Laserleistung) von 2170 mW bis 2740 mW eingegrenzt worden. Parameter hierbei sind: Verfahrensgeschwindigkeit von 50 mm sec⁻¹, Wiederholfrequenz CW, Anpressdruck Probe ans Glas 600 kPa_{rel}.

Der Prüfstand, beschrieben in Kapitel 5.2.2 Abbildung 14, wurde für eine optimierte thermische Kontaktierung, bessere Prozessüberwachung, des Prüfkörpers durch ein Wasserbad auf der Heizplatte erweitert. Durchgeführt wurde die Charakterisierung bei einer gemessenen Temperatur des Wasserbads von 95 °C.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Versuchsreihe der Validierung der PC zu PC Fügeverbindung gezeigt, Abbildung 19. Gezeigt werden Berstversuche von Prüfkörpern, hergestellt mit unterschiedlicher Laserleistung (x- Achse). Der maximal zur Verfügung stehende Druck liegt, limitiert durch den Prüfstand, bei 300 kPa_{rel}. Unterschieden wird hier in Prüfkörper bei denen die Belastungsgrenze der Fügeverbindung erreicht wurde (rot) und Prüfkörper bei denen die Fügeverbindung den Belastungen nicht nachgegeben hat (grün). Für die Prüfung der Belastbarkeit der Fügeverbindung wurde der Druck von Umgebungsdruck bis zum maximalen Prüfdruck schrittweise alle 30 Sekunden um 10 kPa erhöht.

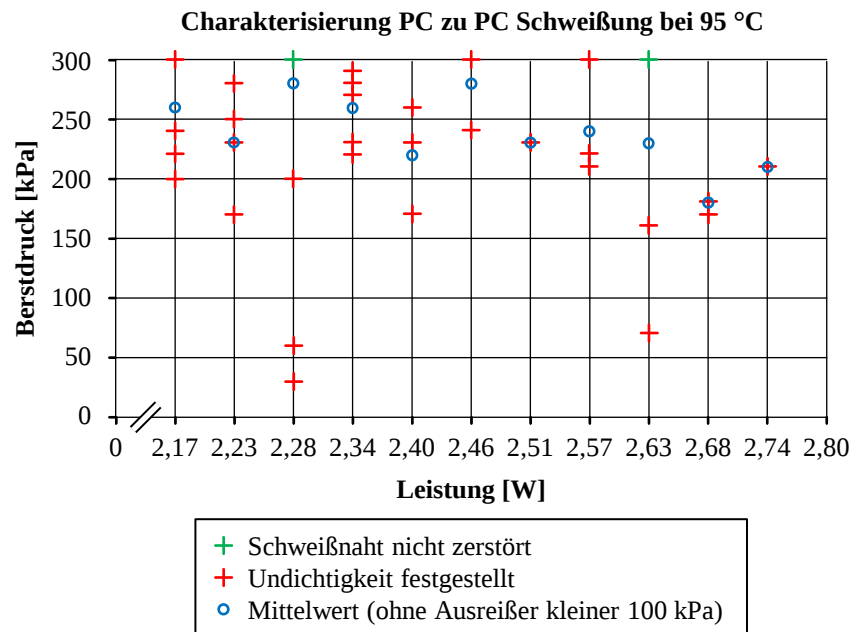


Abbildung 19: Auswertung der pneumatischen und thermischen Validierung des Prozessfensters für Laserschweißprozesse PC zu PC.

Anhand der Vermessung der 45 Prüfkammern, Abbildung 19, können folgende Aussagen getroffen werden:

- Vier Prüfkammern, mit der Laserleistung von 2200 mW und 2600 mW, haben den Versuch zerstörungsfrei bei einer Belastung von bis zu 300 kPa_{rel} durchlaufen.
- Die niedrigste Belastbarkeit kann in Kammern, hergestellt mit den Laserleistungen 2280 mW und 2630 mW, bei gemessenen Drücken von 30 kPa_{rel}, 60 kPa_{rel} und 70 kPa_{rel} nachgewiesen werden.
- Werden die drei Messungen mit einem Berstdruck kleiner 100 kPa_{rel} als zu vernachlässigende Ausreißer definiert, wird im Schnitt eine Belastungsgrenze von 180-280 kPa_{rel} erreicht.

Ein eingeschränkter Nutzen für einen reproduzierbaren Fügeprozess ist durch den letzten Fügeschritt (2 Fügeschritt PC zu PC, Abbildung 17) gegeben. In diesem Schritt werden zwei nicht kompressible Ebenen verschweißt. Im Gegensatz zum vorletzten Fügeschritt (1 Fügeschritt PC zu PC, Abbildung 17) können hier Unebenheiten im Material nicht durch externe Hilfsmittel (z.B. Silikonunterlage) ausgeglichen werden. Eine der Grundvoraussetzungen, der Kontakt der Fügepartner für eine ausreichende Wärmeleitung^[6 S.28] zwischen den Fügepartnern, ist dadurch nicht mehr gegeben. Dieser Einfluss ist in Abbildung 20 gezeigt.

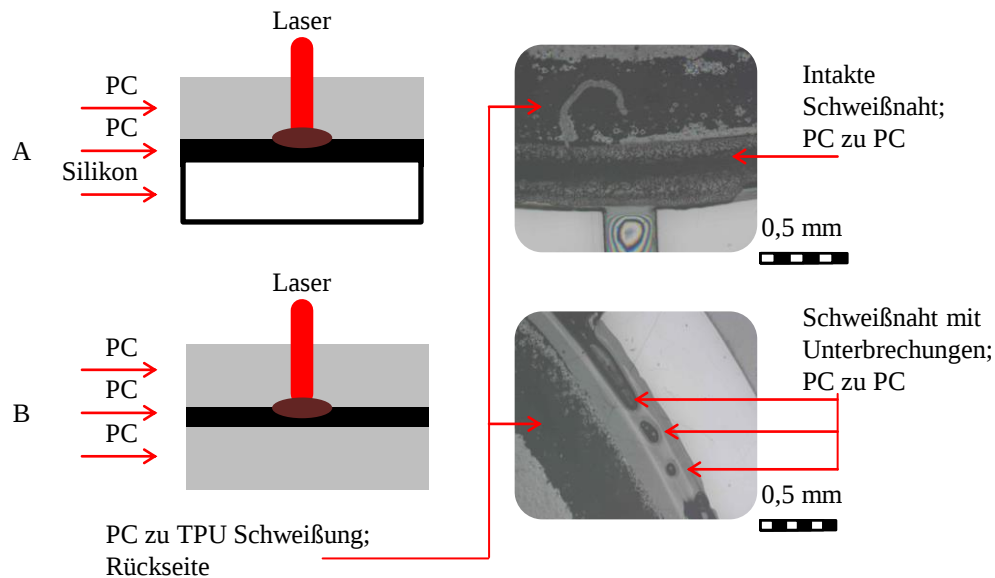


Abbildung 20: Fügung nicht kompressibler Materialien, links: schematische Darstellung des Fügeaufbaus, rechts: Einfluss von Unebenheiten im Fügeprozess auf die Schweißnaht; A) Fügung zweier PC Ebenen mit Silikonmatte zum Ausgleich von Unebenheiten; B) Fügung zweier PC Ebenen ohne Ausgleich von Unebenheiten.

Es wurde gezeigt, dass die Verschweißung zweier nicht kompressibler Materialien (PC zu PC) möglich ist, alle untersuchten Parameter, Abbildung 19, erfüllen im Schnitt die Bedingung der pneumatischen Druckbeständigkeit von mindestens $150 \text{ kPa}_{\text{rel}}$ bei einer thermischen Belastung von 95°C . Als Haupteinflussgröße auf einen reproduzierbaren Herstellungsprozess wurde hier das Konturschweißen von zwei nicht kompressiblen Materialien identifiziert. Unebenheiten an den Fugestellen verhindern eine Kontaktierung der Materialien. Die unabdingbare Voraussetzung für den Fügeprozess, die Wärmeleitung zwischen den Fügepartnern^[6 S.28], ist damit nicht reproduzierbar zu gewährleisten.

5.3 Prozesstechnologie Laserschweißen

In Kapitel 5.2.3 wurde gezeigt, dass die Verschweißung zweier nicht kompressibler Ebenen (PC) in einem großen Laser- Prozessfenster mit einer Laserleistung von 2100 mW bis zu 2700 mW zu realisieren ist. Limitiert wird der Prozess durch eine nicht sicherzustellende Kontaktierung der Fügepartner im Fugeschritt zweier starrer Ebenen ohne den Einsatz von Hilfsmitteln (z.B. Silikonunterlage, 3 mm Dicke). Unter Verwendung von kompressiblen Unterlagen im Herstellungsprozess, die diese Kontaktierung gewährleisten, sind reproduzierbare Fügeverbindungen realisierbar, Abbildung 20 A). Auf Basis dieser Erkenntnisse wird in diesem Abschnitt eine Prozesstechnologie vorgestellt, die den Aufbau von vierlagigen LoCs und dadurch die Realisierung von drei Ebenen für fluidische und pneumatische Funktionen, bereitstellt. Für die Umsetzung des vierlagigen Aufbaus wird das

bisher bekannte Schweißkonzept, unter Berücksichtigung der Integrierbarkeit in den aktuellen Herstellungsprozess und im Hinblick auf Massenfertigung und Kosten, erweitert.

5.3.1 Prozesstechnologie Laserschweißen vierlagiger PC/ TPU Plattformen

Im Gegensatz zu der bisherigen Prozesstechnologie unterscheidet sich das in Abbildung 21 gezeigte Verfahren dadurch, dass sich die Fügeebene der zu kombinierenden Materialien von der Absorptionsebene unterscheidet. Für die Bildung einer Schmelze beider Fügepartner ist der Wärmetransport durch das absorbierende Material entscheidend. Die Kombination aus Wärmetransport und Aufschmelzen der Materialien, Kapitel 3.1, direkt an der Absorptionsebene spielt keine Rolle.

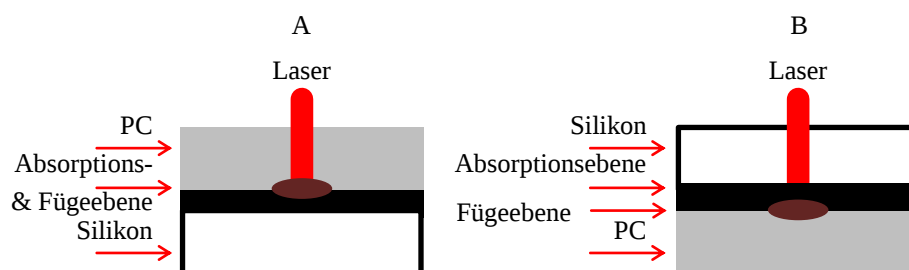


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Prozesstechnologie, Trennung von Absorptions- und Fügeebene; A) Absorptionsebene identisch mit Fügeebene; B) Absorptionsebene ungleich Fügeebene.

Aufgrund der Feststellung in Kapitel 5.2.3, dass für die Herstellung einer PC zu PC Verbindung ein großes Laser- Prozessfenster zur Verfügung steht und eine optische Eingrenzung dafür ausreicht, wurden für die Charakterisierung dieser Prozesstechnologie keine direkten Untersuchungen der Schweißnähte auf Temperatur- und Druckbeständigkeit durchgeführt.

Um eine Schmelze an der Fügeebene, Abbildung 21 B), erreichen zu können, muss ein ausreichender Wärmetransport von der Absorptionsebene hin zur Fügeebene erfolgen. Hierfür wurde zum einen die Laserleistung im Vergleich zu Kapitel 5.2.3 erhöht, zum anderen die Verfahrensgeschwindigkeit verringert. Die ermittelten Parameter; Verfahrensgeschwindigkeit 25 mm sec^{-1} , 3700 mW, Wiederholfrequenz CW und $300 \text{ kPa}_{\text{rel}}$ Anpressdruck der Probe; führen zu einer optisch durchgängigen Verschweißung der Fügepartner.

Mit diesem Prozessschritt ist der Fügeprozess für LoCs in drei Schritte zu unterteilen, gezeigt in Abbildung 22.

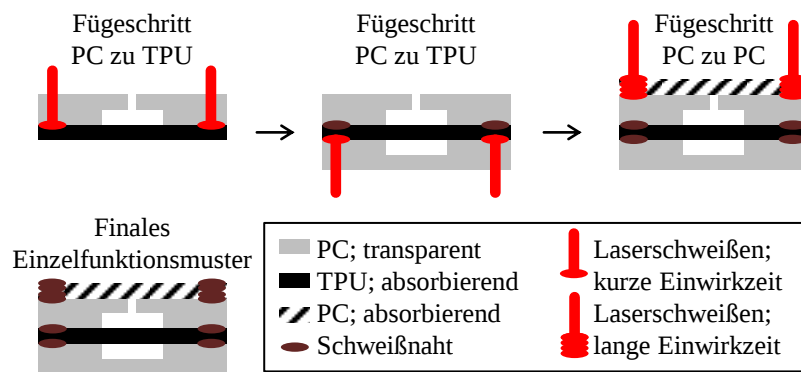


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Prozessschritte für die LoC Herstellung, Umgesetzt für die Herstellung von Einzelfunktionsmuster Kapitel 6 und LoCs Kapitel 7.

Für die Charakterisierung der 3 KS PCR mittels eines pentaplex PCR Systems, Kapitel 6 und der Integration der Funktionen 3 KS PCR und Mikroarray, Kapitel 7, sind 140 3 KS PCR EFMs und drei LoCs nach dem Schema Abbildung 22 aufgebaut worden. Die Ausfallrate der in diesem Kapitel gezeigten Erweiterung der Prozesstechnologie beträgt in den Versuchen 0 %.

5.3.2 Prozesstechnologie Laserschweißen mit Oberflächenbeschichtung

Der negative Einfluss großer Oberflächen mancher Materialien auf die PCR Reagenzien bei Lab on a Chip Systemen ist bekannt^[9; 17; 41]. In frühen Untersuchungen, Robert Bosch^[1], der Materialien PC und TPU mittels eines Blockzyklers wurde ein negativer Einfluss des Materials TPU auf die PCR Reagenzien festgestellt. Eine Möglichkeit, diesem Einfluss entgegenzuwirken, ist die Zugabe von Additiven wie PEG, PVP, BSA oder Tween zu den PCR Reagenzien^[17, 28, 33, 36, 41, 48]. Eine Alternative hierzu stellt die Beschichtung der LoC Komponenten mit bioinerten Stoffen dar. Im Gegensatz zu der Zugabe von Additiven zu den Reagenzien unterliegt ein Beschichtungsverfahren meist Anforderungen, die vom Fügeverfahren oder dem Zeitpunkt der Beschichtung abhängen.

In diesem Abschnitt wird die erfolgreiche Umsetzung eines Herstellungsprozesses, basierend auf der Prozesstechnik in Kapitel 5.2.3 Abbildung 16, vorgestellt. Die auf dieser Plattform eingesetzten Materialien, Polycarbonat und Polyurethan, sind in Vorversuchen auf ihre Verträglichkeit mit den PCR Reagenzien untersucht worden. Die Experimente (Konzentrationsreihe) mit der TPU Membran zeigen bei niedrigen Polymerase und gDNA Konzentrationen einen negativen Einfluss auf die generierte PCR Produktmenge (Gelbild-Analyse). Daraus folgt das angestrebte Ziel: Die Oberflächenbeschichtung der TPU Membran.

Spezifisch für die hier gezeigte Prozesstechnologie und im Hinblick auf die Integrierbarkeit der Oberflächenbeschichtung in die LoC Plattform, Kapitel 7, sind folgende Bedingungen:

- Die flächige Beschichtung der Materialien, die für den Fügeprozess benötigt werden, ist nicht zulässig. Eine Beschichtung an der Fügestelle verhindert das Vermischen der Fügepartner beim Schweißvorgang, Kapitel 3.1.
- Die Beschichtung eines LoCs nach der Herstellung ist nicht umzusetzen, da in diesem Schritt Funktionen wie z.B. der Mikroarray oder der Filter mit in den Beschichtungsvorgang einbezogen würden.
- Die Temperatur darf im Beschichtungsvorgang 95 °C nicht überschreiten. Auf diese Temperatur wurden die Langzeitbeständigkeit der Schweißnähte in Kapitel 5.2.2 hin charakterisiert.
- Die TPU Membran erfüllt Ventulfunktionen auf dem LoC und muss bis zu 10 % Dehnung tolerieren. Die beschichtete TPU muss entweder ebenfalls 10 % Dehnung tolerieren (100 % der TPU Membran sind im PCR Prozess beschichtet), oder es entsteht Rissbildung (90 % der TPU Membran sind im PCR Prozess beschichtet).
- Die Dicke der Beschichtung wird auf unter 1 µm festgelegt, dies entspricht 10 % der Herstellungstoleranz der TPU Membran^[65] (100 ±10) µm.
- Die Langzeitbeständigkeit der Beschichtung in Luft oder unter Lagerung von Schutzgas muss über 2 Jahre gewährleistet sein.
- Durch die Verwendung der Beschichtung in einem PCR System müssen Temperaturen von 95 °C und eine mechanische Belastung über die Laufzeit von 160 Minuten störungsfrei erreicht werden können, Kapitel 5.1.
- Die Beschichtung sollte neben bioinerten Eigenschaften eine Diffusionsbarriere für Gase, wässrige Lösungen und Lösemittel darstellen. Damit ergeben sich weitere Einsatzfelder, z.B. in der direkten, flüssigen Vorlagerung von Reagenzien auf dem LoC.

Die in dieser Arbeit umgesetzten und in der PCR Charakterisierung untersuchten Beschichtungen, Kapitel 6.7.4, sind über CVD^[70 S.335f.] (Chemical Vapour Deposition) und PECVD^[70 S.513f.] (Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition) Verfahren hergestellt worden. Sowohl die Parylene C^[71], als auch die PTFE^[72] (Polytetrafluorethylen) Oberflächenbeschichtung wurden erfolgreich mit der Prozesstechnologie Abbildung 23 umgesetzt.

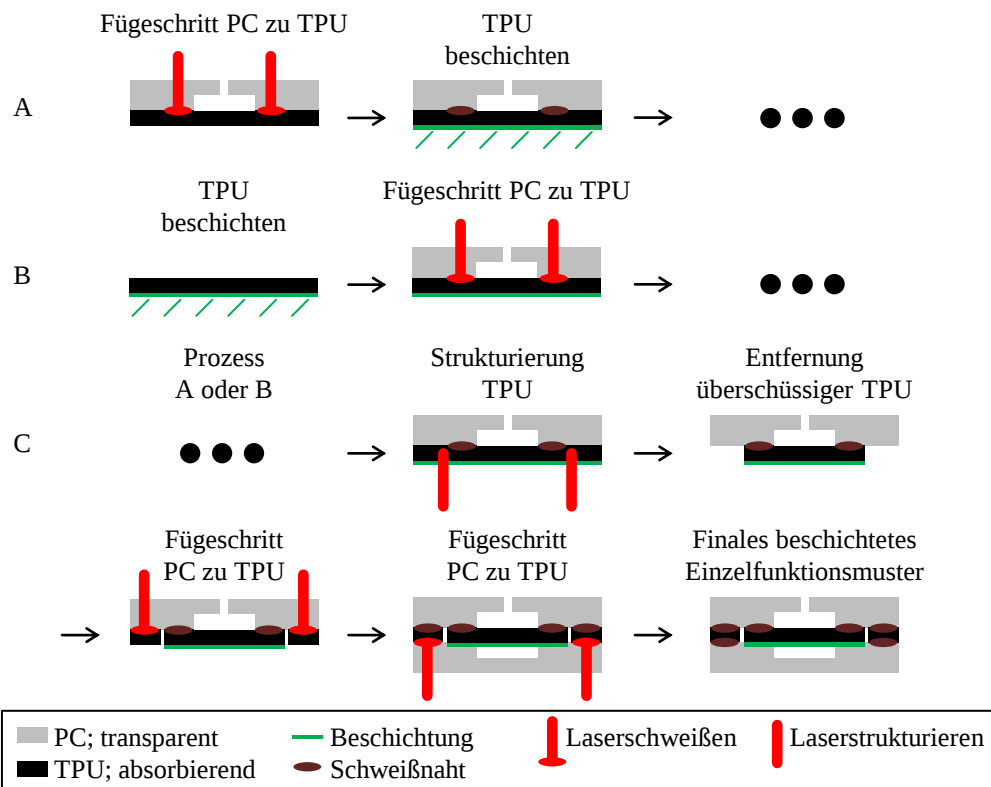


Abbildung 23: Prozesstechnologie mit Implementierung beschichteter Oberflächen (TPU); A) Beschichtung der TPU in den Fügeprozess eingebunden; B) TPU einseitig vor dem Fügen beschichtet; C) Fügeprozess für die Realisierung beschichteter LoCs nach Schritt A oder B.

Die erfolgreiche Umsetzung der gezeigten Prozesstechnologie ist in Abbildung 24 dargestellt. Im direkten Vergleich mit der Prozesstechnologie ohne beschichtete Oberflächen zeigt sich, dass für die Fügung von LoC Systemen mit Beschichtung die doppelte Fügefläche für den Aufbau der Plattform benötigt wird.

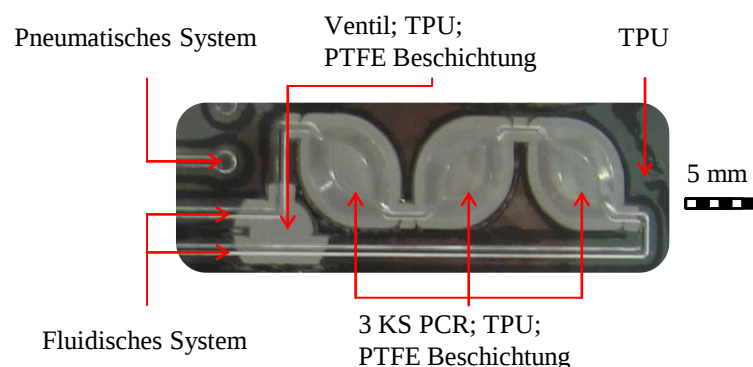


Abbildung 24: 3 KS PCR EFM; Hergestellt mit Prozesstechnologie nach Abbildung 23, Ventil und PCR Kammern einseitig mit PTFE (grau) beschichtet; PC zu TPU: Verfahrensgeschwindigkeit 50 mm sec^{-1} , Wiederholfrequenz CW, Laserleistung 1600 mW , Anpressdruck $400 \text{ kPa}_{\text{rel}}$.

In Abbildung 24 wird das 3 KS PCR EFM gezeigt. Zu sehen sind neben dem pneumatischen und fluidischen System ein Ventil und die drei PCR Kammern. Für den Prototypen wurde

die TPU einseitig mit einer grau eingefärbten PTFE Beschichtung versehen. Nach Freistellung des Ventils und der PCR Kammern mit anschließendem Fügen der PC Komponenten mittels einer unbeschichteten TPU, besteht jetzt nur noch an einer Seite der fluidischen Kanäle direkter Kontakt zwischen der TPU Membran und des PCR Reaktionsvolumens. In Kapitel 6.7.4 wird die erfolgreiche Umsetzung der TPU Oberflächenbeschichtung mittels einer Parylene C und einer PTFE Beschichtung dargestellt. Bei der Charakterisierung der vier PCR Versuche ist kein Ausfall in Bezug auf die Prozesstechnologie festzustellen.

5.4 Auslegung und Design der 3 KS PCR

In Kapitel 3.2.2 Abbildung 7 sind die Einflüsse auf die Effizienz der 3 KS PCR theoretisch untersucht worden. Identifiziert wurden hier die Haupteinflussfaktoren: Kanalvolumen zwischen den PCR Kammern, Verdrängungseffizienz der PCR Kammern und Anteil des PCR Reaktionsvolumens auf der richtigen Prozesstemperatur. Im Kapitel 5.2 sind die Herstellungsparameter des Fügeprozesses der LoC Plattform im Hinblick auch die Anforderungen an komplexe fluidische Netzwerke untersucht und die Grenzen der Prozesstechnologie aufgezeigt worden. Dieser Abschnitt setzt sich zum Ziel, die gewonnen Erkenntnisse in ein optimiertes Design für die Anwendung der 3 KS PCR umzusetzen. Hierfür wurden neben empirischen Ermittlungsverfahren auch Simulationsmodelle in COMSOL^[73] erstellt.

5.4.1 Auslegung des Abstandes von Funktionen

Einer der Haupteinflussfaktoren auf die Effizienz der 3 KS PCR ist das Kanalvolumen zwischen den PCR Kammern. Dieses Volumen wird neben dem Querschnitt des Kanals durch dessen Länge definiert. Der Abstand der Kammern (Funktionen) hängt von zwei Größen ab. Zum einen wird der Abstand begrenzt durch die Fläche, die hinsichtlich einer erfolgreichen Fügung (Festigkeit, Temperaturbeständigkeit, Wechselbelastung) der Plattform benötigt wird, Kapitel 5.2.1 Abbildung 10, zum anderen durch den Abstand der Schweißbahn zur Funktion. Darüber hinaus ist in jedem Prozessschritt der manuellen Herstellung eine Positionierungstoleranz der Bauteile zu berücksichtigen. Ein zu geringer Abstand führt einerseits dazu, dass die Schmelze, erzeugt im Schweißprozess, die TPU Membran in der Funktion verformt, Abbildung 25. Andererseits bewirkt ein zu geringer Abstand, dass flüssiges Material in die Funktion (Kanal, Kammer) gedrückt wird.

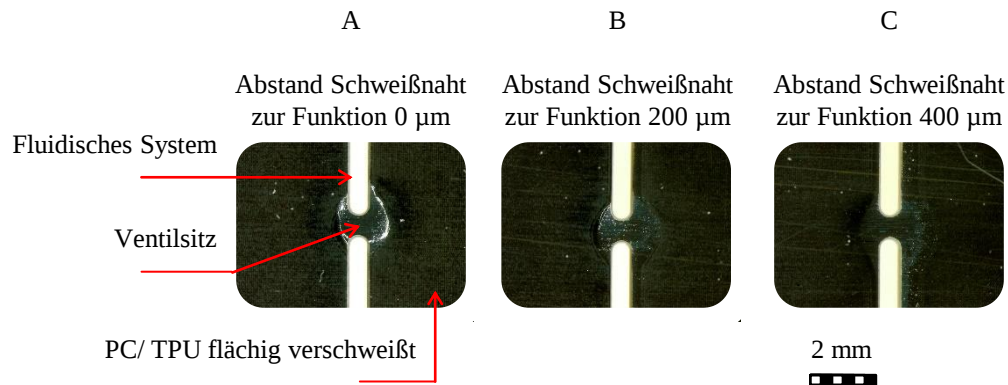


Abbildung 25: Funktion Ventil mit verformter TPU Membran; Variierende Abstände der Schweißnaht zur Funktion; Ergebnisse erzeugt durch Maskenschweißen bei Robert Bosch^[1]; A) Abstand Schweißnaht zur Funktion 0 µm, stark verformte Membran am Ventilsitz; B) Abstand Schweißnaht zur Funktion 200 µm, verformte Membran am Ventilsitz; C) Abstand Schweißnaht zur Funktion 400 µm, keine verformte Membran am Ventilsitz.

Für die Fügeprozesse der Materialien PC zu TPU ist ein Mindestabstand von 500 µm (400 µm Schweißnahtbreite) Außenkante Schweißnaht zu Außenkante Kammer (Funktion) als Grenzwert, inklusive einer Toleranz von 50 µm in jedem Arbeitsschritt, definiert. Für die Umsetzung beschichteter Oberflächen, Beschichtungen der TPU Membran mit Parylen oder PTFE, werden zwischen zwei Funktionen drei Schweißnähte à 500 µm Breite benötigt, Kapitel 5.3.2 Abbildung 23. In der Summe ist der Abstand zwischen Funktionen unter den gegebenen Anforderungen an Temperatur, Druck- und Langzeitbeständigkeit einerseits und dem Einsatz beschichteter Oberflächen andererseits, auf 2500 µm festgelegt.

5.4.2 Auslegung der PCR Kammern

Ein entscheidender Einflussfaktor in Bezug auf die theoretisch maximal zu erreichende WC-Effizienz der 3 KS PCR stellt die Verdrängungseffizienz der PCR Kammern dar, Kapitel 3.2.2 Abbildung 7. Ein Beispiel: Wird zum einen die theoretische Betrachtung auf Plattformen mit einer Verdrängungseffizienz von 90 % bei einem Reaktionsvolumen von 8 µl angewendet^[63] und zum anderen ein Kanalvolumen von 0,075 µl und keine temperaturbedingten Einflüsse vorausgesetzt, liegt die theoretisch maximal zu erreichende WC-Effizienz bei etwa 56 % gegenüber einem idealen System, das diesen Einflüssen nicht unterliegt.

Für eine optimale Verdrängung des PCR Reaktionsvolumens aus den Kammern wurde das Design anhand folgender Anforderungen ausgelegt:

- Das Reaktionsvolumen beträgt 25 µl.
- Aktuierungsdruck der Membran ist definiert zwischen -70 kPa_{rel} und +75 kPa_{rel}.
- Das Oberflächen zu Volumen Verhältnis muss klein gehalten werden.
- Die Kammerbreite ist durch die Breite der Heizfinger auf 6 mm beschränkt.

- Die Bauteildicke der starren PC Körper ist auf 1,2 mm begrenzt.
- Der Spritzguss erfordert eine Wandstärke von 0,6 mm.

Im ersten Schritt wurde die Umsetzung der Anforderungen über ein zwei dimensionales Modell in Comsol realisiert. Untersucht wird das Auslenkverhalten der 100 μm TPU Membran bei verschiedenen Drücken (0- 13 kPa_{rel}) und einem Kammerdurchmesser von 6 mm. Dieser Bereich wird über die maximale Auslenkung der TPU Membran, 0,6 mm bei 13 kPa_{rel} in Abbildung 26, definiert. Eine Validierung des Modells erfolgt mittels einer optischen Charakterisierung. Hierfür wurde auf die TPU Membran eines Prototyps unter einem Mikroskop fokussiert, Fokusebene 1. Durch Anlegen eines Drucks lenkt sich die TPU Membran aus, Fokusebene 2. Ermittelt wird die Differenz zwischen den Fokusebenen 1 und 2 über einen Abstandsmesser^[74]. Die für die Simulation der TPU Membranauslenkung nötigen Parameter sind: Elastizitätsmodul^[75] 12 MPa; Dichte^[65] 1150 kg m^{-3} und Poissonzahl^[65] 0,45.

Die Simulationsdaten zeigen eine hohe Übereinstimmung mit den gemessenen Daten, wie in Abbildung 26 zu sehen ist. Für eine weitere Auslegung des Designs wird dieses Modell als Basis verwendet werden.

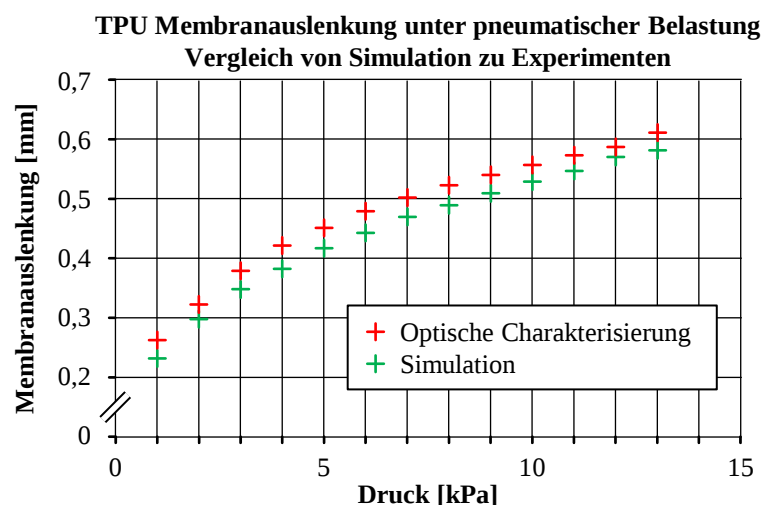


Abbildung 26: Gegenüberstellung der Ergebnisse Simulation und Experimente der TPU Membran Auslenkung bei 0- 13 kPa_{rel} , Kammerdurchmesser 6 mm.

Bei einem Druck von 13 kPa_{rel} und einem Kammerdurchmesser vom 6 mm wird die 100 μm dicke TPU Membran um 600 μm ausgelenkt.

In einem zweiten Schritt wurde das Modell durch eine Begrenzung der maximal zulässigen Kammertiefe (600 μm) erweitert. Bei einer pneumatischen Belastung der TPU Membran mit 75 kPa_{rel} und einem Durchmesser der Kammer von 6 mm stellt sich folgendes Ergebnis ein, Abbildung 27.

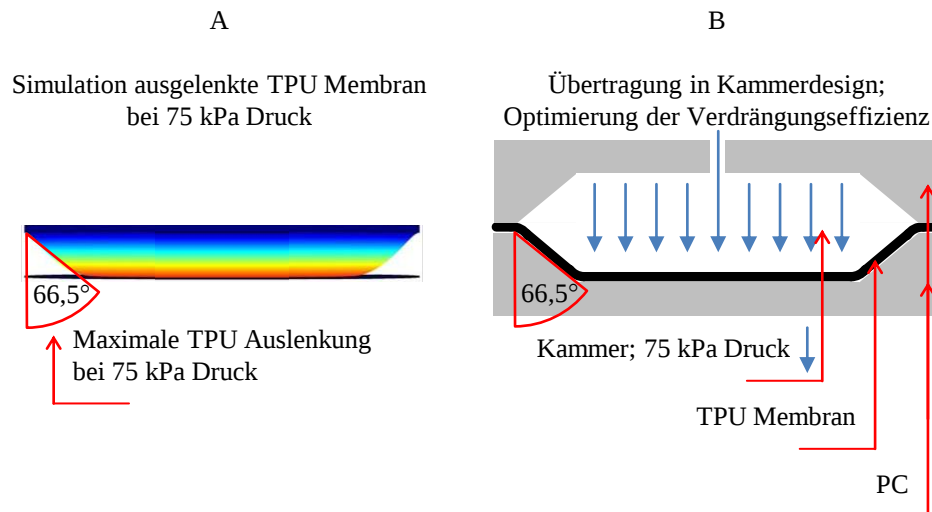


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Auslenkung der TPU Membran bei 75 kPa und einem Kammerdurchmesser von 6 mm; A) Ergebnis der Simulation, Festlegung des Auslenkwinkels; B) Querschnitt einer Kammer mit optimiertem Design.

Aus Abbildung 27 B) ist ersichtlich, dass die Einführung einer schrägen Kammerwand mit einem Winkel von $66,5^\circ$ bei einem angelegten Druck von 75 kPa und einem Kammerdurchmesser von 6 mm die Verdrängungseffizienz des Reaktionsvolumens durch die TPU Membran aus der Kammer optimiert. Im Vergleich zu einem Design mit z.B. senkrechten Kammerwänden kann hier, unter Vernachlässigung möglicher Fertigungstoleranzen im Spritzguss und Unebenheiten in der TPU, die Verdrängungseffizienz um bis zu 30 % gesteigert werden. Des Weiteren erfüllt dieses Design die Anforderungen an die maximale Tiefe und Breite der Kammer unter Berücksichtigung eines möglichst kleinem Oberflächen/ Volumen Verhältnisses von $2,8 \text{ mm}^{-1}$ pro PCR Kammer.

Aus der theoretischen Auslegung ist folgendes 3 Kammer Shuttle Design abgeleitet worden, Abbildung 28 A).

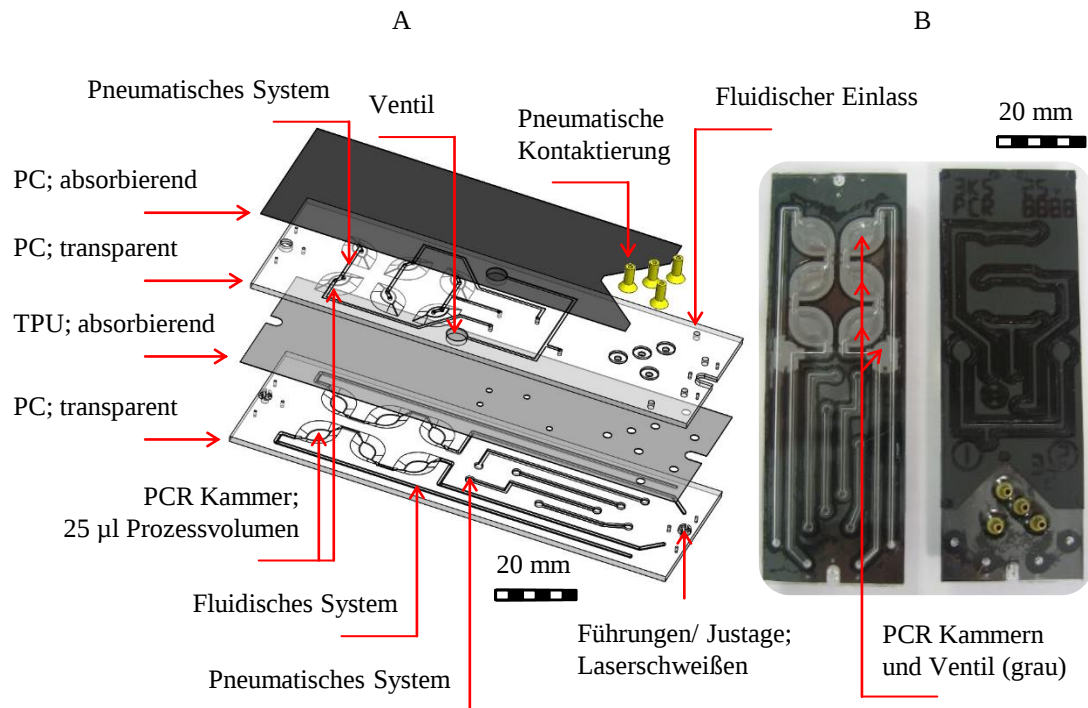


Abbildung 28: 3 KS PCR EFM; A) CAD des 3 KS PCR EFM; B) Aufgebautes 3 KS PCR EFM mit zwei PCR Strängen, Vorder- und Rückseite, PTFE beschichtete TPU (grau).

Das gezeigte Design zeichnet sich durch ein Totvolumen von $0,4 \mu\text{l}$ pro Kanal zwischen den PCR Kammern aus, welches theoretisch die PCR WC-Effizienz um 6,4 % (Kapitel 4), gegenübergestellt zu einem System ohne den Einfluss dieses Volumens, mindert.

Des Weiteren ist ersichtlich, dass hier zwei 3 KS PCR Systeme auf einem EFM gespiegelt nebeneinander mit dem Abstand von 2,5 mm realisiert sind. Dies ermöglicht zum einen eine größere Anzahl an Experimenten unter identischen Bedingungen, Kapitel 6.5.2, zum anderen eröffnet sich die Möglichkeit, auf einem 3 KS PCR EFM Experimente und Kontrollen (Detektion von Kontamination, Kapitel 6.4.6) zeitgleich zu prozessieren.

5.5 Zusammenfassung Plattformtechnologie

Vorgestellt wurde die Optimierung, Anpassung und Erweiterung einer Prozesstechnologie für polymerbasierte LoC Systeme mit dem Anspruch, komplexe fluidische Netzwerke realisieren zu können. Es ist bei dieser Dissertation gezeigt worden, dass die Prozesstechnologie den multifaktoriellen Anforderungen gerecht wird. Die Anforderungen sind im Einzelnen: a. die Temperaturbeständigkeit bis zu 95°C , b. eine pneumatische Belastung bis $260 \text{ kPa}_{\text{rel}}$, c. eine Langzeitbeständigkeit bis zu drei Stunden und d. eine Realisierung auf kleiner Fläche ($<500 \mu\text{m}$ Durchmesser der Schweißnaht). Der minimale Abstand von Funktionen auf dem LoC System wurde mit 2,5 mm ermittelt. Es wurde ein Fügeprozess zur Oberflächenbeschichtung gezeigt, der zu dem bestehenden Konzept der

Aufbau- und Verbindungstechnik kompatibel ist. Funktionen wie die Filtration und der Mikroarray werden nicht beeinträchtigt, da die Beschichtung der Materialien vor dem Zusammenschweißen der Komponenten erfolgt. Die Beschichtung der TPU Membran in den PCR Kammern und einem Ventil wurde erfolgreich umgesetzt. Die Beschichtungen mit Parylene C und PTFE erlaubten die Adaption der Eigenschaften der TPU in Bezug auf die Biokompatibilität und physikalischen Eigenschaften. Dabei mussten keine Kompromisse hinsichtlich der Prozesstechnologie (Laserschweißen) oder auch in Bezug auf die Anforderungen an den LoC eingegangen werden.

In dieser Arbeit ist eine Prozesstechnologie für die Erweiterung des dreilagigen hin zu einem prozesskonformen vierlagigen Plattformkonzept umgesetzt worden. Dies ermöglicht die Implementierung von drei Ebenen sowohl für fluidische als auch für pneumatische Interaktionen, welche in diesem Plattformkonzept für die Realisierung von Ventilen benötigt wird. Erfüllt wurden dabei die Anforderungen an die Prozessparameter der PCR, der pneumatischen Kontaktierung sowie auch an die Langzeitbeständigkeit. Gleichzeitig sind Basisbedingungen wie die einfache Umsetzung sowie niedrige Herstellungs- und Materialkosten erfüllt (Spritzguss für Stückzahlen $>1 \cdot 10^5$). Auch Rahmenparameter in Bezug auf die Herstellung der LoCs über Massenfertigungsverfahren ließen sich realisieren.

Das Design der 3 KS PCR wurde auf die bekannten Parameter hin untersucht und optimiert. Designabhängig wurde die theoretische WC-Effizienz dieses Konzeptes auf dieser Plattform mit einer 6,4 % geringeren WC-Effizienz bestimmt im Vergleich zu Konzepten ohne diese designbedingten Einflüsse. Damit ist eine Umsetzung dieses PCR Konzeptes auf eben dieser Plattform sinnvoll, im folgenden Kapitel 6 wird zusätzlich die PCR Performance dieses Konzeptes auf dieser Plattform untersucht.

5.6 Ausblick Plattformtechnologie

Die gezeigte Prozesstechnologie erfüllt die Anforderungen an einen kostengünstigen Herstellungsprozess mit der Option für die Massenfertigung. Basis des hier gezeigten Fügeprozesses stellt das Konturschweißen da. Die ermittelten Laser- Prozessfenster ermöglichen eine Herstellung der LoCs in wenigen Minuten (92 Sekunden Schweißzeit für LoC). Begrenzt ist die Prozesszeit jedoch durch die Verfahrensgeschwindigkeit des Lasers von $20\text{--}50 \text{ mm sec}^{-1}$. Die Adaption des auf konturschweißen- basierenden Prozesses hin zu Fügeverfahren auf der Basis von z.B. Maskenschweißen, könnte die Prozesszeit hier in den Bereich von Sekunden senken.

6 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster

Im letzten Kapitel wurde die Weiterentwicklung der Aufbau- & Verbindungstechnologie beschrieben. Es ist jetzt möglich, über einen Laserschweißprozess eine mikrofluidische Plattform für komplexe Systeme herzustellen, die den Anforderungen an den Systemdruck und die Temperatur über die Prozesszeit gerecht wird. Dieses Kapitel dient der Charakterisierung der Einzelfunktion der 3 KS PCR. Hierfür wird neben einer thermischen Charakterisierung erfolgreich die PCR in Bezug auf die Endpunktbestimmung an PCR Produkt, die Effizienz und das Limit of Detection des 3 KS PCR EFM in Verbindung mit einer Auswertung über einen Mikroarray analysiert. Zusätzlich gezeigt sind Optimierungen in Bezug auf die Prozesslaufzeit unter Zuhilfenahme einer Multiplex caMRSA8 PCR. Hier wird unter den Rahmenbedingungen der industriellen Einsetzbarkeit die erfolgreiche Amplifizierung von fünf Genen in unter 30 Minuten Prozesszeit gezeigt. Weiterhin ist die Oberflächenbeschichtung aus Kapitel 5.3.2 im 3 KS PCR EFM mit den Beschichtungen Parylene C und PTFE dargestellt.

Ein Ziel dieser Arbeit ist die zeitliche Optimierung einer PCR auf einer druckgetriebenen Plattform. Die PCR ist eine Methode, mit der DNA Fragmente exponentiell vervielfältigt werden können. Der enzymatische Amplifizierungsprozess wird meist über das Durchlaufen von zwei^[48] bis drei^[76] Temperaturzonen realisiert, in dieser Arbeit wird die Umsetzung einer drei Temperaturzonen PCR vorgestellt. Die Prozessschritte sind unterteilt in^[120 S.84f.]:

- Denaturierung: In dieser Phase wird die Verbindung (Wasserstoffbrücken) zwischen den Basenpaarsträngen der DNA (dsDNA, doppelsträngige DNA) gelöst, man erhält zwei komplementäre DNA Stränge (ssDNA, einzelsträngige DNA). Mit entscheidend hierbei ist das Erreichen bzw. Überschreiten der Denaturierungstemperatur von $> 90^{\circ}\text{C}$.
- Primerhybridisierung: Diese Phase dient der Anlagerung der Primer (Forward und Reverse Primer) an die ssDNA. Die richtige Hybridisierungs-Temperatur ist abhängig vom Schmelzpunkt der Primer, bestimmt durch die Länge und die Primersequenz. Als Faustregel gilt, je höher die Temperatur, desto spezifischer lagern die Primer an der ssDNA an. Zu niedrige Temperaturen können zu einer unspezifischen Bindung führen, Mutationen einzelner Basenpaare (SNPs) würden nicht detektiert.
- Elongation: In dieser Phase werden die angelagerten Primer durch die Polymerase entlang der ssDNA synthetisiert. Für diesen Prozess werden freie dNTPs (Nukleotide) komplementär zur nächsten ssDNA Base angebaut. Die entscheidenden Prozessparameter hier sind a) die Temperatur, bei der die Polymerase optimal das Produkt verlängert und b) die Geschwindigkeit (auch Temperaturabhängig), mit der die Polymerase mittels einem freien Nukleotid den Primer Strang verlängert. Überlagert sich die optimale Temperatur der Elongation mit der optimalen Temperatur der

Primerhybridisierung, könnte ein PCR Konzept mit zwei Temperaturzonen umgesetzt werden.

Für die Prozesszeit eines PCR Zyklus sind zwei Punkte ausschlaggebend:

- Die Zeit, die benötigt wird, um die biologischen Vorgänge auf einem Temperaturniveau zu realisieren.
- Die Heiz-/ Kühlzeiten, die benötigt werden, um die Reagenzien auf die verschiedenen Temperaturen zu bringen.

Der Vorteil einer PCR auf einem Lab on a Chip System liegt, neben der Möglichkeit einer Automatisierung, auch in der Reduzierung der Heiz-/ Kühlzeiten. Ziel dieser Arbeit ist unter anderem die zeitliche Optimierung des PCR Systems von Rupp^[16]. Hier wurde eine PCR nach dem Stationary PCR Konzept, Kapitel 3.2.1, realisiert. Die Optimierung basiert in erster Linie auf der Umsetzung eines Shuttleprinzips, Kapitel 4. Diese Konzeptänderung ermöglicht eine Reduzierung der zu zyklisierenden thermischen Masse, die an einem PCR Zyklus beteiligt ist, Abbildung 29 und Formel F. [1].

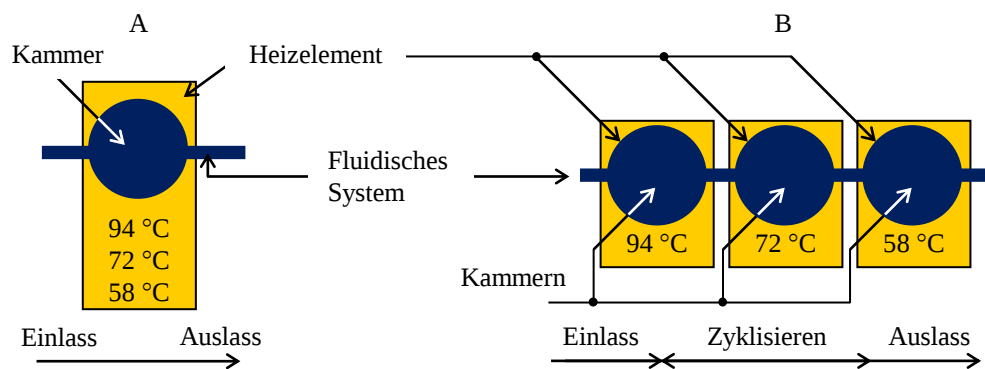


Abbildung 29: Schematische Darstellung der PCR Konzepte on Chip; A) Ein Kammer PCR; B) 3 KS PCR.

Die thermische zyklisierte Masse in Abbildung 29 A) setzt sich zusammen aus der Masse des zu prozessierenden Reaktionsvolumens, dem umgebenden LoC und der Masse des Heizelements (F. [1]). In dem Konzept B) wird die zyklisierte thermische Masse auf die Masse des zu prozessierenden Reaktionsvolumens reduziert (F. [2]).

$$Q = (m_{PF} * c_{PF} + m_{LoC} * c_{LoC} + m_{HE} * c_{HE}) * \Delta T \quad \text{F. [1]}$$

$$Q = m_{PF} * c_{PF} * \Delta T \quad \text{F. [2]}$$

Q	Wärmemenge
m	Masse
c	Spezifische Wärmekapazität
ΔT	Temperaturdifferenz
PF	PCR Reaktionsvolumen
LoC	Lab on a Chip
HE	Heizelement

Stellt man das Ein-Kammer PCR System von Rupp^[16] der hier untersuchten 3 KS PCR gegenüber (gleiches Reaktionsvolumen, vergleichbare Plattform, vergleichbares Temperaturprofil), ist durch die Reduzierung der thermischen Masse die Heiz-/ Kühlzeiten des Reaktionsvolumens in einem PCR Zyklus um 68 % senkbar (Ergebnis der Messungen gezeigt in Kapitel 6.8).

6.1 Messstand 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster

Im Zuge der Änderung des PCR Konzeptes zu Rupp^[16] wird sowohl ein Messstand für die Charakterisierung der 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster als auch für die Charakterisierung der LoCs, Kapitel 7, entworfen. Die Anforderungen an den Messstand sind gegeben durch die Plattformtechnologie Kapitel 5 und die Vorgaben an Reproduzierbarkeit, Zuverlässigkeit und Sicherheit:

- Die Aufnahme der Plattform Abbildung 28 auf Basis der Prozesstechnologie Kapitel 5.
- Die Realisierung von drei isothermen Temperaturzonen, Abbildung 6, für die 3 KS PCR.
- Eine kostengünstige und robuste Realisierung der Temperaturzonen.
- Die Justage des 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters über Anschläge.
- Eine zuverlässige und reproduzierbare thermische Kontaktierung des 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters.
- Die thermische Kontaktierung des 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters von zwei Seiten.
- Die Verwendung eines einfachen Ansteuer- und Regelkonzeptes.
- Die Bereitstellung von mindestens drei pneumatischen Anschlüssen.
- Eine einstellbare Flussrate der pneumatischen Anschlüsse für $12,5 \mu\text{l s}^{-1}$.
- Ein Versorgungsdruck der 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster mit bis zu 300 kPa_{rel}.
- Die thermische Überwachung von bis zu 13 Messpunkten.
- Eine Absicherung gegen Brandgefahr.

Der Messstand, Abbildung 30 und Abbildung 31, erfüllt diese Anforderungen. Er ist unterteilt in die Ansteuereinheit mit der pneumatischen Steuerung und der Temperaturregelung/ -überwachung und in die Prozessierungsstation für die Einzelfunktionsmustersaufnahme. In Tabelle 1 sind die einzelnen Komponenten des Messstandes aufgeführt.

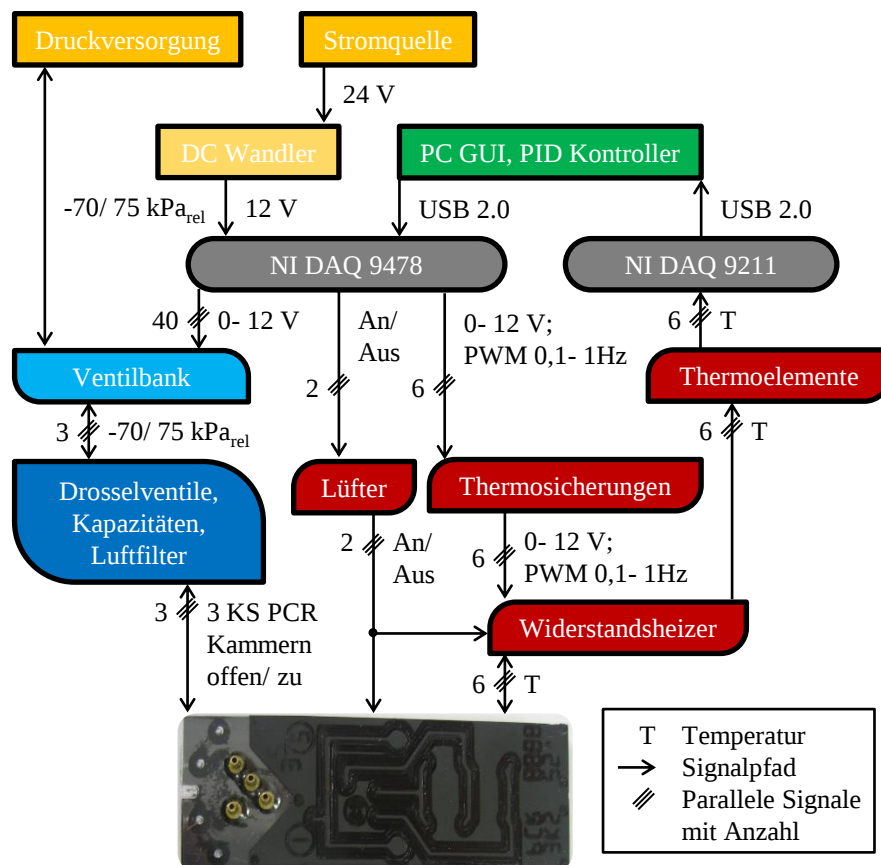


Abbildung 30: Blockschaltbild PCR Messstand 3 KS PCR EFM.

Mit Ausnahme des Computers wurde der Messstand in eine DNA Arbeitsstation^[77] integriert. Das gewährleistet einen kontaminationsfreien Ablauf.

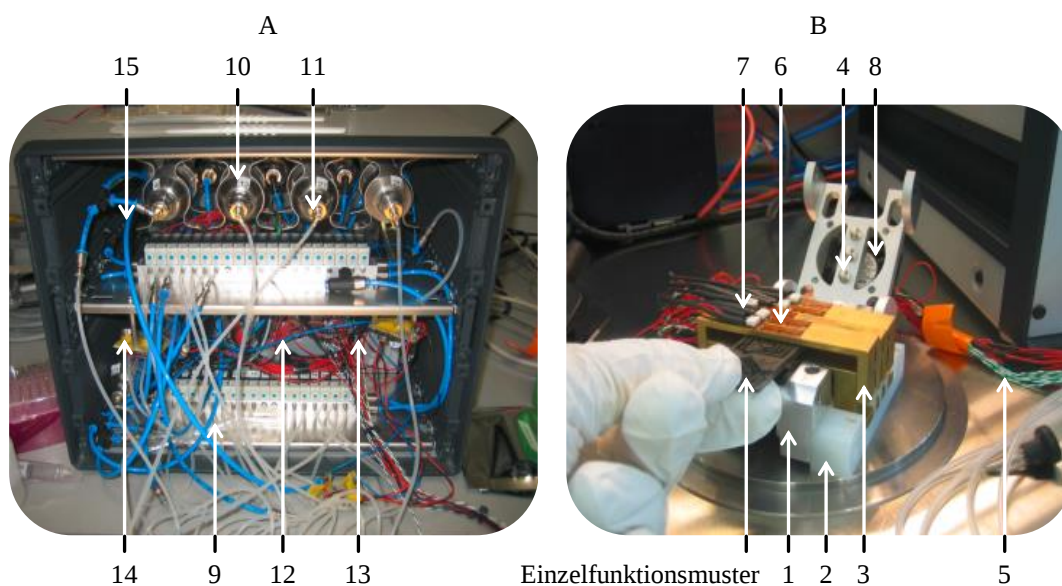


Abbildung 31: Messstand 3 KS PCR EFM bestehend aus; A) Ansteuereinheit; B) Prozessierungsstation; Komponenten sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Komponenten Messstand 3 KS PCR EFM.

Nr.	Komponenten Prozessierungsstation	
1	Klemmvorrichtung	Aluminium; Aufnahme des 3 KS PCR EFMs
2	Heizfingeraufnahme	Polyamid; thermische Entkopplung Heizfinger zu Klemmvorrichtung
3	Heizfinger	Messing; erzeugen stationäre Heizzonen
4	Federstifte	Polyamid-Pin; gewährleisten Andruck der Heizfinger zum LoC
5	Thermoelemente	Typ K; liefern Temperaturen der Heizfinger ^[78]
6	Widerstandsheizter	20 Ohm; 12 V ^[79]
7	Thermosicherung	+145 °C; Überhitzungsschutz ^[80]
8	Lüfter	12 V; Kühlung des Messstandes nach PCR ^[81]
Nr.	Komponenten Ansteuereinheit	
9	Ventilbank	40 Ventile; Schaltzeit ~5 ms; Aktuierung von Ventilen/ Kammern on Chip ^[82]
10	Kapazitäten	100 ml; RC Kombination für Schaltzeiteinstellung Ventile on Chip; wenige ms bis ~2 s ^[83, 84]
11	Drosselventile	
12	NI DAQ 9478	4 Karten; Mess-, Steuer- und Regelelektronik ^[85]
13	NI DAQ 9211	4 Karten; Messelektronik; Temperaturüberwachung der Heizfinger und Raumtemperatur ^[85]
14	DC Wandler	24 V zu 12 V Wandler ^[86]
15	Pneumatische Versorgung	Druckluft 75 kPa _{rel} ; Unterdruck 70 kPa _{rel}
	Nicht in Abbildung 31 enthalten.	
	NI PS 10	Power Supply 24 V ^[85]
	Filter	Kontaminationsschutz der Ventilbänke ^[87]
	PC	LabVIEW; Benutzeroberfläche und Temperaturregelung ^[85]

6.2 Prozessierungsstationen 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster

Im Zuge der Arbeit werden zwei Konzepte für die Realisierung der Temperaturzonen, Abbildung 6, auf den 3 KS PCR Einzelfunktionsmustern entwickelt.

Hierbei stehen zum einen die Kosten und eine geringe Fehleranfälligkeit der Prozessierungsstation in Bezug auf die Justage der 3 KS PCR EFM den Anforderungen an ein optimales thermisches System gegenüber. Der Fokus dieses thermischen Systems liegt

auf einer homogenen Temperaturverteilung in den PCR Kammern, verbunden mit einer optimalen Heizrate.

Konzept 1: einseitige thermische Kontaktierung

Die Umsetzung des Konzepts 1 hat sein Augenmerk auf den Einsatz im industriellen Bereich. Ziel ist es, mit wenigen Bauteilen die Anforderung von drei Temperaturzonen sicher zu realisieren. Die Prozessierungsstation Konzept 1 ist in Abbildung 32 dargestellt.

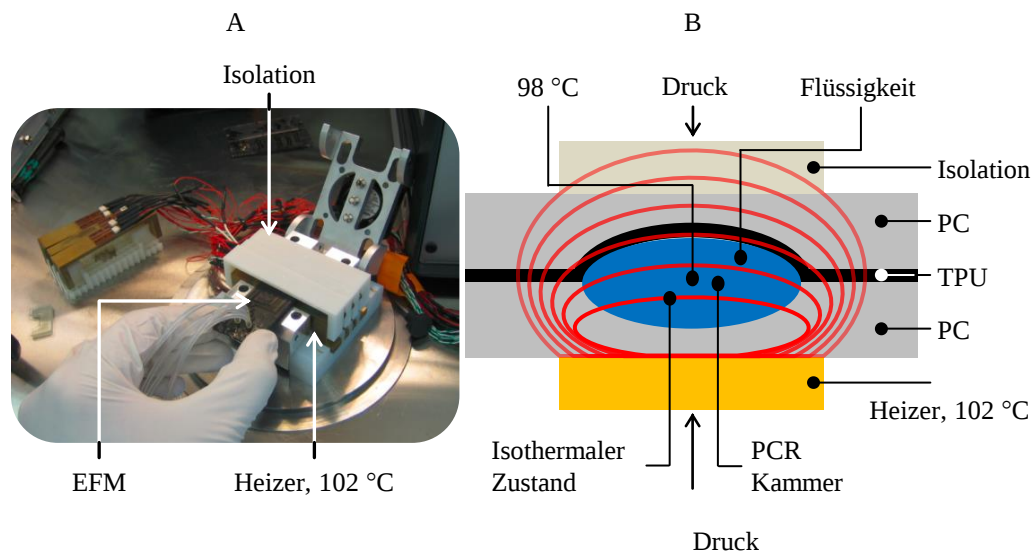


Abbildung 32: Prozessierungsstation mit thermischer Kontaktierung des 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters von einer Seite, Konzept 1; A) Bild der Prozessierungsstation mit eingelegtem 3 KS PCR EFM; B) Schematische Darstellung, Querschnitt durch eine mit Flüssigkeit gefüllte PCR Kammer mit ausgebildetem Temperaturprofil, Temperaturen Heizer zu Flüssigkeit 102 °C zu 98 °C gemessen in Kapitel 6.3.2.1.

Konzept 2: zweiseitige thermische Kontaktierung

Im Konzept 2, Abbildung 33, liegt der Schwerpunkt auf der Optimierung der thermischen Voraussetzungen auf dem 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster. Ziel ist die Ausbildung eines homogenen Temperaturprofils im Vergleich zum Konzept 1. Dies bewirkt einerseits, dass die Flüssigkeit in der PCR Kammer im Vergleich zum Konzept 1 einheitlich auf der Solltemperatur liegt, sich kein Offset von 4 °C zwischen den Heizern zur Flüssigkeit einstellt. Andererseits wird insgesamt mehr Wärmeenergie im Vergleich zum Konzept 1 in das 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster eingebracht. Dies verkürzt die Heiz-/ Kühlzeiten in einem PCR Zyklus um bis zu 23 %, Kapitel 6.3.2.2.

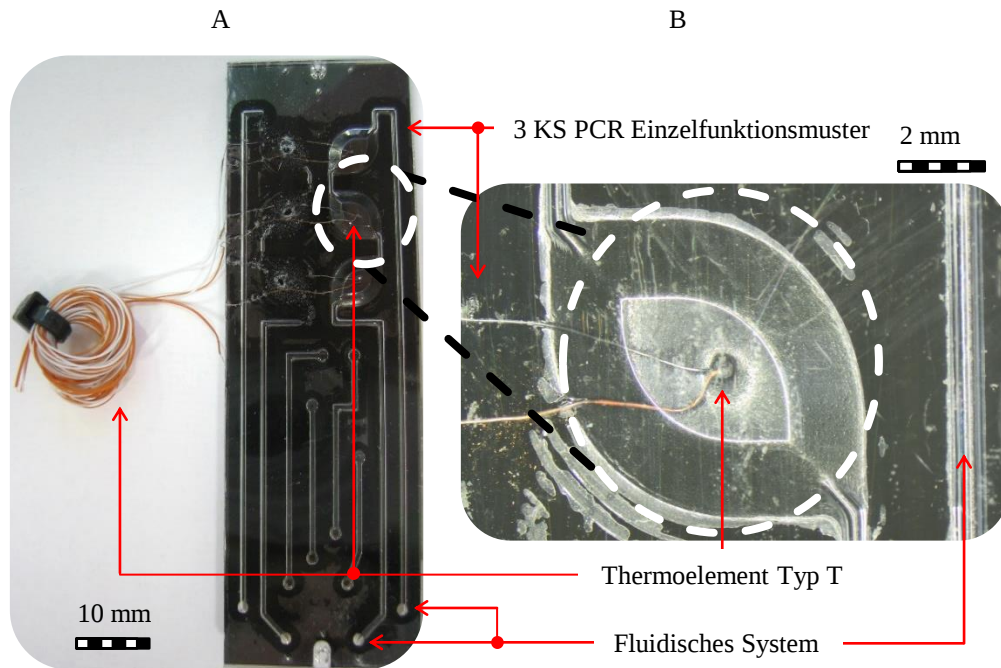


Abbildung 34: 3 KS PCR EFM mit Möglichkeit der thermischen Charakterisierung; Thermoelemente^[89] ins fluidische System eingebracht; A) 3 KS PCR EFM mit drei implementierten Thermoelementen; B) Vergrößerung der mittleren PCR Kammer.

6.3 Thermische Charakterisierung

Grundlage für die Charakterisierung der 3 KS PCR in Kapitel 6.5 ist eine thermische Untersuchung des 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters mit Ansteuerung über den Messstand. Die thermische Untersuchung ist unumgänglich, da der Einfluss der Temperatur in Kapitel 4 als einer der drei Haupteinflussfaktoren bei dem 3 KS PCR Konzept identifiziert wurde. Für die thermische Charakterisierung wird als Basis das PCR Protokoll^[151] für die Prozessierung des caMRSA8 Assays auf dem Blockzykler genutzt. Im ersten Schritt wird der Blockzykler charakterisiert. Anhand dieser Daten werden Anforderungen definiert und die Prozessierungsstationen anhand dieser Kenngrößen charakterisiert.

6.3.1 Thermische Charakterisierung des Referenzsystems

Um die Anforderungen an das 3 KS PCR System zu definieren, ist als Referenzsystem der Blockzykler^[88] von Eppendorf herangezogen worden. Das gegebene PCR Protokoll, Tabelle 2, legt hierbei den zu erreichenden Standard fest. Für die Messungen werden Thermoelemente des Typs T class 1^[89] in je 25 μ l Wasser in PCR Tubes platziert. Für die Charakterisierung sind fünf dieser präparierten Tubes im Blockzykler zeitgleich bei einer laufenden PCR vermessen worden (Messpunkt Abstand $\sim$ 280 Millisekunden). Untersucht

worden ist die Tube-Aufnahme des Blockzyklers an den äußeren Eckpunkten und zentral. Das gemittelte Ergebnis ist in Abbildung 35 dargestellt.

Tabelle 2: PCR Protokoll Blockzykler.

PCR Schritte	Temperatur	Haltezeit
Denaturierung	95 °C	10 s
Hybridisierung	54 °C	15 s
Elongation	72 °C	75 s

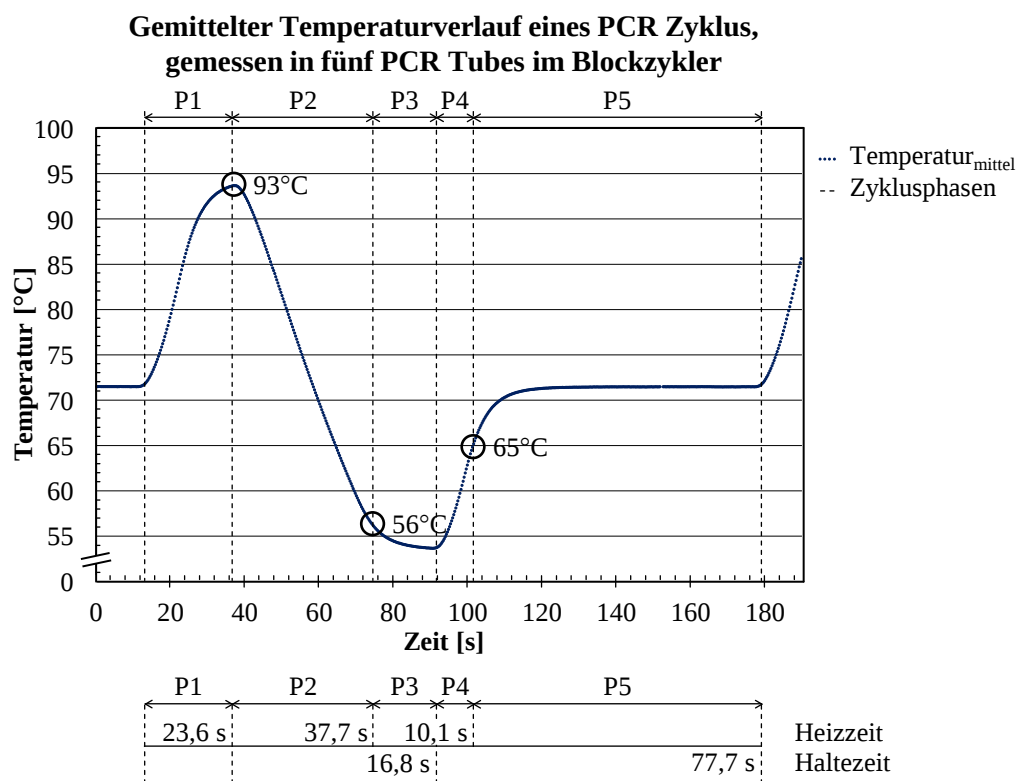


Abbildung 35: Referenzmessung Blockzykler Mastercycler gradient Eppendorf; Mittelwert ($\text{Temperatur}_{\text{mittel}}$) von fünf Messpunkten, äußere Eckpunkte und zentral; Messungen in 25 μl Wasser in PCR Tubes, Thermoelemente des Typs T class 1^[89]; Unterteilung des PCR Zyklus in P1 $\triangleq$ Phase 1 (Elongation zu Denaturierung), P2 $\triangleq$ Phase 2 (Denaturierung zu Primerhybridisierung), P3 $\triangleq$ Phase 3 (Primerhybridisierung), P4 $\triangleq$ Phase 4 (Primerhybridisierung zu Elongation) und P5 $\triangleq$ Phase 5 (Elongation).

Es ist ersichtlich, dass sich die Messwerte in Abbildung 35 nicht mit dem Protokoll aus Tabelle 2, eingegeben in den Blockzykler, deckt.

- Die Solltemperatur, laut Protokoll, für die Denaturierung von 95 °C wird bis zum Ende der Phase 1 nicht erreicht.
- In den 15 Sekunden Haltezeit für die Primerhybridisierung, Zeitfenster ist durch die Anzeige des Blockzyklers ermittelt, hält sich das Reaktionsvolumen in den Tubes nicht konstant auf der Solltemperatur von 54 °C. Die gemittelte Temperatur fällt in dieser Zeit, Phase 3, um 2 °C von 56 °C auf 54 °C.

- Die Elongationsphase, Phase 5, ist ebenfalls durch die Anzeige des Blockzyklers ermittelt. Beim Start der Haltezeit von 75 Sekunden (Ausgabefenster Blockzykler) liegt die gemessene Temperatur bei 65 °C. Die Temperatur nähert sich dem Sollwert von 72 °C in 22,5 Sekunden auf 71,4 °C an und stagniert dort.
- Die Phasen 1, 2 und 4 stellen die Heiz-/ Kühlzeiten des Blockzyklers zwischen den Temperaturzonen da.

Das thermische System ist nicht direkt übertragbar. Um einen optimalen Startpunkt für die Übertragung der thermischen Anforderungen auf das 3 KS PCR EFM festzulegen, werden folgende Kriterien für die Prozessierung auf dem 3 KS PCR EFM festgelegt:

- Für die Denaturierung der PCR Produkte in dem Reaktionsvolumen sind Temperaturen von 93 °C zu erreichen.
- Die Haltezeit für die Primerhybridisierung startet bei einem Abstand zur Solltemperatur von 2 °C.
- Die Haltezeit für die Elongation der Primer startet bei einem Abstand zur Solltemperatur von 7 °C.

Anhand dieser drei Anforderungen wird der Messstand in Kombination mit dem 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster in den Kapiteln 6.3.2.1 und 6.3.2.2 charakterisiert.

6.3.2 Thermische Charakterisierung des Messstandes & der 3 KS PCR

In diesem Abschnitt werden die Grenzen des Messstandes unter den gegebenen Anforderungen dargestellt. Hierfür werden beide vorgestellten thermischen Konzepte, Kapitel 6.2, analysiert und das jeweils beste Ergebnis in Bezug auf Heizraten und das Erreichen der Zieltemperaturen präsentiert. Es wird über thermische Messungen im fluidischen System gezeigt, dass die Umsetzung des 3 KS PCR Konzepts eine Reduzierung der Heiz-/ Kühlzeiten gegenüber dem Blockzykler um bis zu 56 % erreicht.

Für die Ansteuerung der Widerstandsheizer und damit der Realisierung der Temperaturzonen, Abbildung 6, werden verschiedene Optimierungszyklen durchlaufen. Im ersten Schritt werden die Temperaturzonen statisch vermessen und fest auf den zu erreichenden Sollwert in der PCR Kammer geregelt. Danach erfolgt eine schrittweise Optimierung der einzelnen Temperaturzonen, die finale Umsetzung für die drei Zonen stellt sich wie folgt dar.

Temperaturzone Denaturierung:

In diesem Schritt wird das Reaktionsvolumen von der Temperaturzone Elongation in die Temperaturzone Denaturierung gepumpt.

Durch die Rahmenbedingungen Kapitel 6.3.1 muss das Reaktionsvolumen im 3 KS PCR EFM die Temperatur von 93 °C überschreiten. Da der Denaturierungsprozess von PCR Produkten im Bereich von einigen Millisekunden abläuft, wird die Temperatur des Heizfingers der Denaturierungszone so eingestellt, dass die über die Thermoelemente gemessene Temperatur im fluidischen System der Denaturierungskammer auf maximal 98 °C steigt. Das Ende der Denaturierung wird zeitlich gesteuert, indem das Reaktionsvolumen wieder aus der Denaturierungszone verdrängt wird. Da immer Restflüssigkeit in einer Kammer verbleibt und auch der an die Denaturierungskammer angrenzende Kanal mit Flüssigkeit gefüllt ist, wird eine höhere Temperatur nicht empfohlen, da die Flüssigkeit sonst kochen würde.

Temperaturzone Primerhybridisierung:

In diesem Schritt wird das Reaktionsvolumen von der Temperaturzone Elongation kommend in die Temperaturzone Primerhybridisierung gepumpt.

Diese Temperaturzone wird unabhängig vom Konzept der thermischen Kontaktierung, Kapitel 6.2, auf den Sollwert der Primerhybridisierung geregelt. Die Möglichkeiten einer Optimierung sind bei der Verwendung von Widerstandsheizern begrenzt, da diese Temperaturzone zum größten Teil passiv über die Temperaturzone der Elongation geheizt wird.

Temperaturzone Elongation:

Die Temperaturzone Elongation ist sowohl in den Schritt der Primerhybridisierung als auch in den Schritt der Elongation, Kapitel 6, eingebunden.

So wird einerseits im Schritt der Primerhybridisierung das Reaktionsvolumen von der Temperaturzone Denaturierung durch die Temperaturzone Elongation in die Temperaturzone Primerhybridisierung gepumpt, Abbildung 6. Hierbei wird die Temperatur in der Temperaturzone Elongation gesenkt, um das Reaktionsvolumen während des Durchpumpens abzukühlen.

Andererseits wird das Reaktionsvolumen im Schritt der Elongation von der Temperaturzone Primerhybridisierung in die Temperaturzone Elongation gepumpt. Hierfür wird die Temperaturzone Elongation über den Sollwert (+2 °C) der Elongation geregelt. Der Erwärmungsvorgang des Reaktionsvolumens geht mit dem Abkühlungsvorgang der Temperaturzone Elongation einher, so dass sich stationär die Solltemperatur der Elongation, in der Kammer gemessen über Thermoelemente, einstellt.

In den Kapiteln 6.3.2.1 und 6.3.2.2 wird diese Ansteuerung der Temperaturzonen auf die beiden Konzepte (1 und 2) aus Kapitel 6.2 angewendet.

6.3.2.1 Prozessierungsstation einseitige thermische Kontaktierung

In diesem Kapitel erfolgt die thermische Charakterisierung für das Konzept 1, die einseitige thermische Kontaktierung des 3 KS PCR EFM, Kapitel 6.2. Hierfür wird in Abbildung 36 der Temperaturverlauf dargestellt, gemessen in den PCR Kammern über Thermoelemente in einem PCR Zyklus. Die Messungen erfolgen unter Einsatzbedingungen (Temperatur, Druck, Schaltungsvorgänge) in einem mit Wasser gefüllten 3 KS PCR EFM, Abbildung 34. Anschließend wird der gemessene Temperaturverlauf entsprechend der Phasen 1- 5, Kapitel 6.3.1, analysiert. Das untersuchte Protokoll ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Ansteuerprotokoll einseitige thermische Kontaktierung.

Protokoll Temperatur, einseitige Kontaktierung	Phasen aus Abbildung 36	Temperatur PID-Regler Denat./Hybri./Elong. [°C]	Zeit [s]
Denaturierungs Phase	Phase 1	102/54/73	20
Schaltzeit Ventile		102/54/73	4
Hybridisierungs Phase	Phase 2 und 3	102/54/76	31
Schaltzeit Ventile		102/54/76	3
Elongations Phase	Phase 4 und 5	102/54/74	77
Schaltzeit Ventile		102/54/74	2

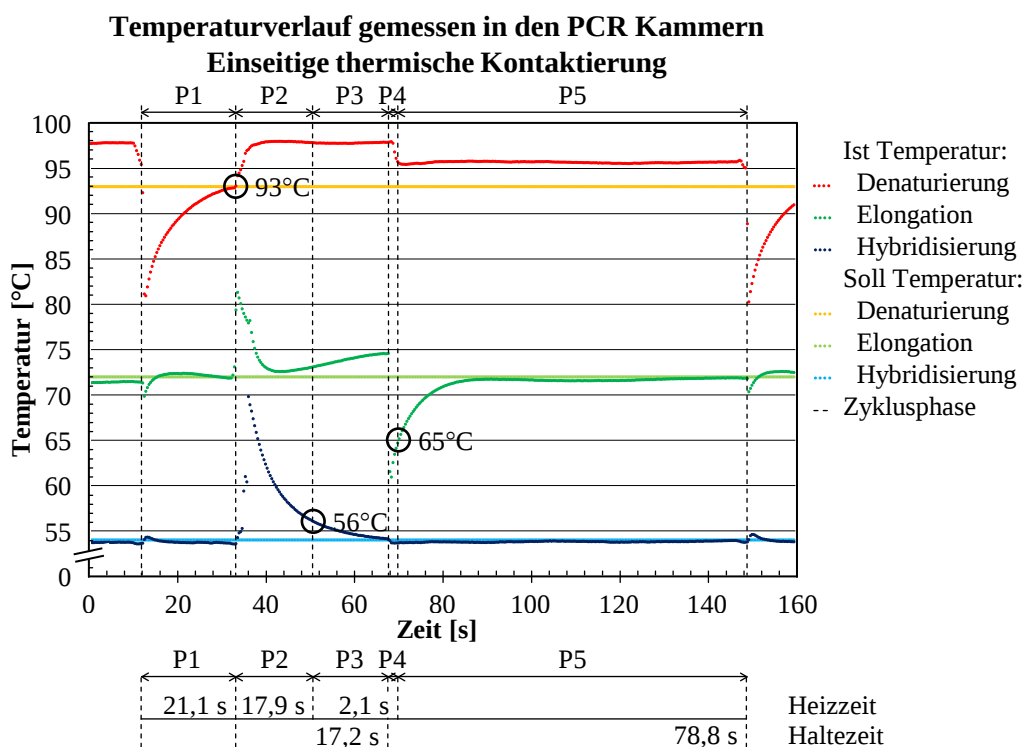


Abbildung 36: Vermessung 3 KS PCR EFM mit thermischer Kontaktierung von einer Seite; Messort in Kammermitte der PCR Kammern über Thermoelemente des Typs T class 1^[89]; Unterteilung des PCR Zyklus in P1 $\triangleq$ Phase 1 (Elongation zu Denaturierung), P2 $\triangleq$ Phase 2 (Denaturierung zu Primerhybridisierung), P3 $\triangleq$ Phase 3 (Primerhybridisierung), P4 $\triangleq$ Phase 4 (Primerhybridisierung zu Elongation) und P5 $\triangleq$ Phase 5 (Elongation).

Phase 1:

In Phase 1 wird das Reaktionsvolumen von der Elongationskammer (grün) in die Denaturierungskammer (rot) gepumpt. Das in der Denaturierungskammer eingebaute Thermoelement zeigt einen sprunghaften Anstieg der Temperatur von 72 °C auf 93 °C in etwa 21 Sekunden. In dieser Phase können zeitliche Optimierungen, Minimierung der Heizzeiten, unabhängig von dem zu implementierenden Assay umgesetzt werden.

Phase 2:

Hier wird das Reaktionsvolumen von der Denaturierungskammer (rot) über die Elongationskammer (grün) in die Hybridisierungskammer (blau) gepumpt. Fokussiert wird in der Abbildung 36 der Ausschlag der Thermoelemente der Kammern Hybridisierung und Elongation. Nach etwa 17 Sekunden erreicht das Reaktionsvolumen die festgelegte Starttemperatur der Hybridisierungsphase von 56 °C. In dieser Phase können zeitliche Optimierungen, Minimierung der Kühlzeiten, unabhängig von dem zu implementierenden Assay umgesetzt werden.

Phase 3:

Phase 3 spiegelt den Abschnitt wieder, in der das Reaktionsvolumen auf der Hybridisierungstemperatur (blau) verweilt. Die Temperatur des Reaktionsvolumens sinkt in dieser Zeit um weitere 2,5 °C. Die Hybridisierungszeit in dieser Phase ist durch biologische Vorgänge limitiert und ist damit direkt von dem zu implementierenden Assay abhängig.

Phase 4:

In der vierten Phase wird das Reaktionsvolumen aus der Hybridisierungskammer (blau) in die Elongationskammer (grün) gepumpt. Nach etwa 2 Sekunden erreicht das Reaktionsvolumen die Starttemperatur für die Elongation der PCR Produkte von 65 °C. In dieser Phase können zeitliche Optimierungen, Minimierung der Heizzeiten, unabhängig von dem zu implementierenden Assay umgesetzt werden.

Phase 5:

In der letzten Phase eines PCR Zyklus verbleibt das Reaktionsvolumen in der Elongationskammer (grün). Die Temperatur des Reaktionsvolumens steigt um 7 °C auf die Solltemperatur der Elongation an. Die Elongationszeit in dieser Phase ist durch biologische Vorgänge limitiert und ist damit direkt von dem zu implementierenden Assay abhängig. Mit der Phase 5 ist ein PCR Zyklus abgeschlossen, je nach PCR Protokoll werden die Phasen bis zu 40 Mal durchlaufen^[120 S.88].

Ein detaillierter Vergleich dieses Konzeptes zu der zweiseitigen thermischen Kontaktierung und des Blockzyklers ist in Tabelle 5 im nächsten Kapitel gezeigt.

6.3.2.2 Prozessierungsstation zweiseitige thermische Kontaktierung

Für die Optimierung der thermischen Voraussetzungen und damit einhergehend auch einer Reduzierung der Heizraten auf dem 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster ist ein weiteres Konzept mit einer zweiseitigen thermischen Kontaktierung vorgestellt worden, Kapitel 6.2. Der Vorteil des Konzepts 2 liegt in einer homogenen Temperaturverteilung durch die Realisierung der Temperaturzonen auf dem 3 KS PCR EFM zwischen zwei Heizfingern, Tabelle 1. Gezeigt wird der Temperaturverlauf, gemessen in den PCR Kammern des Einzelfunktionsmusters über Thermoelemente Typ T class 1^[89], unter Einsatzbedingungen (Temperatur, Druck, Schaltungsvorgänge) in einem mit Wasser gefüllten fluidischen System. Die Phasen des PCR Zyklus werden unterteilt nach Kapitel 6.3.1 in Phase 1- 5, das Protokoll für die Ansteuerung des Messstandes wird in Tabelle 4 dargestellt. Das Messergebnis eines PCR Zyklus der thermischen Charakterisierung ist in Abbildung 37 gezeigt.

Tabelle 4: Ansteuerprotokoll zweiseitige thermische Kontaktierung.

Protokoll Temperatur, zweiseitige Kontaktierung	Phasen aus Abbildung 37	Temperatur PID-Regler Denat./Hybri./Elong. [°C]	Zeit [s]
Denaturierungs Phase	Phase 1	98/54/71	9
Schaltzeit Ventile		98/54/71	4
Hybridisierungs Phase	Phase 2 und 3	98/54/74	31
Schaltzeit Ventile		98/54/74	3
Elongations Phase	Phase 4 und 5	98/54/73	77
Schaltzeit Ventile		98/54/73	2

Eine detaillierte Definition bzw. Interpretation der einzelnen Phasen, Phase 1 bis Phase 5 ist Kapitel 6.3.2.1 zu entnehmen.

Der Vergleich des in diesem Kapitel gezeigten Kontaktierungskonzeptes und des Konzeptes 1, Kapitel 6.3.2.1, miteinander und die Gegenüberstellung dieser Konzepte zum Blockzykler (Referenz) Kapitel 6.3.1, ist in Tabelle 5 gezeigt.

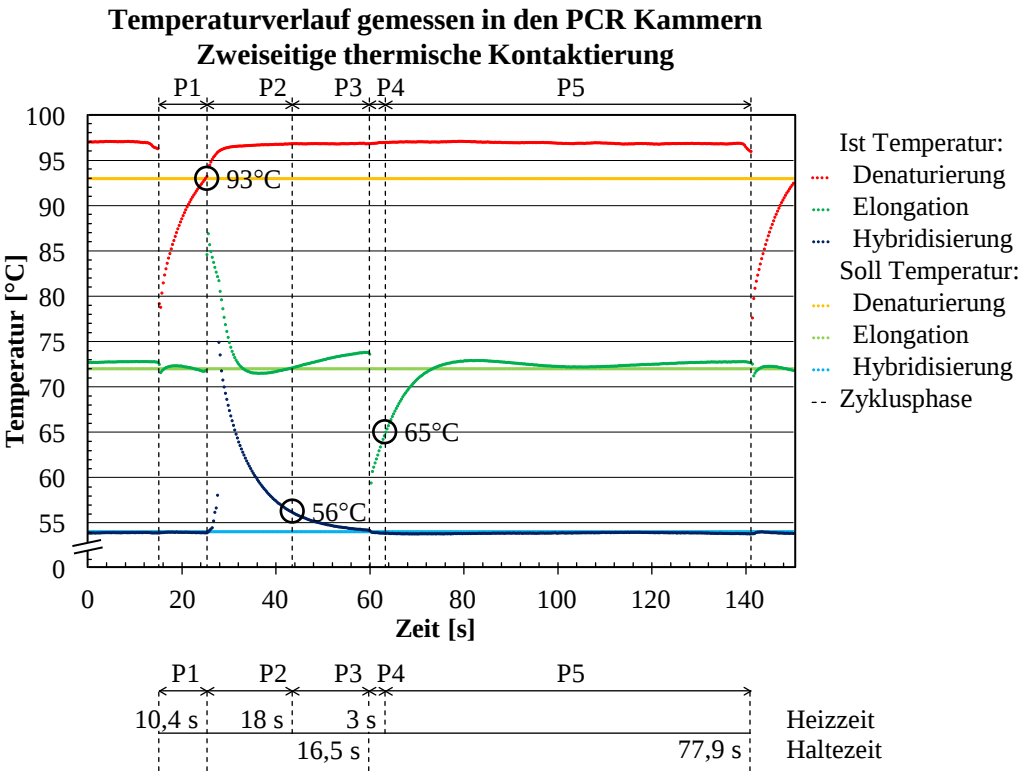


Abbildung 37: Vermessung 3 KS PCR EFM mit thermischer Kontaktierung von zwei Seiten; Messort in Kammermitte der PCR Kammern über Thermoelemente des Typs T class 1^[89]; Unterteilung des PCR Zyklus in P1 $\triangleq$ Phase 1 (Elongation zu Denaturierung), P2 $\triangleq$ Phase 2 (Denaturierung zu Primerhybridisierung), P3 $\triangleq$ Phase 3 (Primerhybridisierung), P4 $\triangleq$ Phase 4 (Primerhybridisierung zu Elongation) und P5 $\triangleq$ Phase 5 (Elongation).

Tabelle 5: Thermische Charakterisierung Blockzykler zu 3 KS PCR EFM.

PCR Zyklus Phase	Blockzykler Eppendorf ^[88]		Einseitige Kontaktierung		Zweiseitige Kontaktierung	
	ΔT [°C]	Zeit [s]	ΔT [°C]	Zeit [s]	ΔT [°C]	Zeit [s]
Phase 1	71,4/ 93,3	23,6	71,3/ 93,0	21,1	72,4/ 94,3	10,4
Phase 2	93,3/ 56,2	37,7	93,0/ 56,0	17,5	94,3/ 56,0	18,0
Phase 3	56,2/ 53,7	16,8	56,0/ 53,9	17,2	56,0/ 53,9	16,5
Phase 4	53,7/ 65,1	10,1	53,9/ 65,1	2,1	53,9/ 64,9	3,0
Phase 5	65,1/ 71,4	77,7	65,1/ 71,8	78,8	64,9/ 72,5	77,9
Σ Zeit Phase 1, 2 und 4		71,4		40,7		31,4

Für die Prozesszeit der PCR auf dem 3 KS PCR EFM sind die Phasen 1, 2 und 4 die nach dieser Charakterisierung optimierten Fixgrößen, welche unter den gegebenen Bedingungen (Temperaturdifferenz der Temperaturzonen, thermische Masse Heizfinger, Design PCR Kammern,...) nicht weiter optimiert bzw. verkürzt werden können. Die Phasen 3 und 5 sind Haltezeiten des Reaktionsvolumens in den entsprechenden Temperaturzonen. Da diese beiden Phasen hauptsächlich vom zu implementierenden Assay abhängen

(Abschreibegeschwindigkeit der Polymerase, Länge des PCR Produktes, ...), beeinflussen sie nicht diese thermische Charakterisierung des 3 KS PCR Konzeptes in Bezug auf die minimal zu erreichende Prozesszeit eines PCR Zyklus durch Konzept- und Plattformbedingte Einflussgrößen.

Anhand der Gegenüberstellung der Messergebnisse aus Tabelle 5 können folgende Aussagen getroffen werden:

- Beide thermischen Kontaktierungskonzepte erlauben eine signifikant schnellere Heizrate als der Blockzykler. Mit Bezug auf die Summe der Zeiten der Phasen 1, 2 und 4 ist im Blockzykler eine durchschnittliche Heizrate von etwa $1\text{ }^{\circ}\text{C sec}^{-1}$, in dem Reaktionsvolumen gemessen, nachgewiesen. Das Konzept mit einseitiger thermischer Kontaktierung erreicht hier durchschnittlich eine Heizrate von etwa $1,7\text{ }^{\circ}\text{C sec}^{-1}$. Das Konzept mit einer thermischen Kontaktierung von zwei Seiten erreicht eine durchschnittliche Heizrate von etwa $2,2\text{ }^{\circ}\text{C sec}^{-1}$.
- Die thermische Kontaktierung des 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters von zwei Seiten reduziert die Heiz-/ Kühlzeiten gegenüber der einseitigen thermischen Kontaktierung in Summe um etwa 23 % mit Bezug auf die Summe der Zeiten der Phasen 1, 2 und 4.
- Die einseitige thermische Kontaktierung zeigt einen Offset von etwa $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zwischen der Temperatur des Denaturierungsheizfingers und der gemessenen Temperatur im fluidischen System. Bei der zweiseitigen thermischen Kontaktierung ist kein signifikanter Offset messbar. Eine homogenere Temperaturverteilung im fluidischen System bei der Anwendung eines zweiseitigen thermischen Konzeptes ist dadurch bewiesen.

Die thermische Charakterisierung ist damit abgeschlossen. Alle Anforderungen aus der theoretischen Betrachtung, Kapitel 4, an die Umsetzung des 3 KS PCR Konzeptes in Bezug auf die Plattformtechnologie, Kapitel 5 und die thermischen Rahmenbedingungen, Kapitel 6.3, sind erfüllt. Im folgenden Teil dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Charakterisierung und Optimierung des 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters anhand einer caMRSA8 pentaplex PCR.

6.4 Versuchsablauf 3 KS PCR

Für die Charakterisierung der 3 KS PCR mittels eines PCR Multiplex Systems in Kapitel 6.5 sind insgesamt 140 PCR Versuche auf 3 KS PCR Einzelfunktionsmustern durchgeführt worden. Dieses Kapitel dient der Betrachtung und Bewertung der Durchführung der Versuche von der Herstellung von 3 KS PCR Einzelfunktionsmustern, über die Versuchsdurchführung bis hin zur Bewertung der Ergebnisse, generiert über einen Mikroarray und eine Real-Time-Quantitative-PCR (qPCR). Für die Bewertung der einzelnen

Prozessschritte sind Kontrollen durchgeführt worden, welche abschließend zu diesem Kapitel analysiert werden. Hier ist neben einer sauberen Durchführung der Versuche von der Herstellung bis zur Ergebniserzeugung eine Ausfallrate der 3 KS PCR EFM von < 3 % gezeigt.

6.4.1 Reinigung und Aufbewahrung der 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster

Ein Ziel für diese Arbeit muss neben einem kostengünstigen Fügeprozess, Kapitel 5, die Reproduzierbarkeit in der Herstellung der 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster sein. Zusätzlich muss für die Interpretation der Ergebnisse eine biologische Verunreinigung durch DNA oder PCR Produkt ausgeschlossen werden. Hierfür ist eine Vorbehandlung der Ausgangsmaterialien genauso unumgänglich wie die Validierung der Lagerbedingungen. Rückstände in der Herstellung oder eine biologische Verunreinigung im Fügeprozess bzw. der Lagerung der 3 KS PCR EFM müssen ausgeschlossen oder erkannt werden.

Die Ausgangsmaterialien, PC und TPU, sind nach folgendem Protokoll vor dem Fügen zu einem 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster von Rückständen befreit und anschließend gelagert worden:

- Entfernung grober Rückstände (Öl, Partikel aus Spritzguss) mittels 2-Propanol^[90] und einem Tuch^[91] über Reibung (PC/TPU).
- Entfernung feiner Rückstände im fluidischen System mittels 10 Minuten Ultraschall in einem Becken gefüllt mit 2-Propanol^[90] und anschließender Spülung mit dest. H₂O (PC).
- Trocknung der Komponenten mit Stickstoff (PC/TPU).
- Sonnenlicht geschützte Lagerung, einzeln eingeschweißt (Luftdicht) mit Trockenbeuteln^[92].

Eine Bewertung des Reinigungsverfahrens und der Lagerung ist in Kapitel 6.4.6 gegeben.

6.4.2 PCR System caMRSA8

Für die Charakterisierung der 3 KS PCR ist aufgereinigte genomische DNA des Bakteriums caMRSA8 (community acquired Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) in einem Multiplexansatz untersucht worden. Der Fokus liegt hierbei auf den Genen 23S, PVL, SCC1, Stau *nuc* und *mecA*. Über diese Gene kann für die Klassifizierung von MRSA z.B. eine Linezolid-Resistenz, PBP2-Resistenz (Penicillin Bindeprotein 2), Methicillin- und beta-Lactam-Resistenz, der Nachweis für Toxine oder der Nachweis für die temperaturstabile Nuklease bei *Staphylococcus aureus* nachgewiesen werden^[93; 94; 95; 96; 97; 98].

Zur Fehlerreduzierung bei der Charakterisierung ist ein Assay auf der Basis von PCR Beads der Firma GE Healthcare^[99] umgesetzt. Entscheidend hierbei ist die einfache Lagerung und

Verarbeitung der Reagenzien. Ebenfalls ermöglicht dieser Ansatz die Trockenvorlagerung der Reagenzien direkt in dem PCR System, indem das PCR Bead im Fügeprozess direkt in eine der PCR Kammern eingebaut wird. Wenn nichts anderes angegeben ist, werden für die Charakterisierung der 3 KS PCR, Kapitel 6.5 f., die Reagenzien aus Tabelle 6 zugrunde gelegt.

Tabelle 6: PCR Reagenzien, 3 KS PCR für gDNA caMRSA8.

Reagenzien	Volumen	Anmerkung
GE PCR Bead	1 Bead	GE-Life Sciences PuReTaq™ Hot Start Ready-To-Go PCR Beads ^[99]
Wasser	18,5 µl	Carl Roth ^[100]
Polysorbat80 (Tween®80, 5 %)	0,5 µl	Carl Roth ^[101]
gDNA caMRSA8 + Primer	6 µl	Sequenzen werden nicht veröffentlicht ^[151]
23S		Produktlänge 100 bp - 400 bp
<i>SCC1</i>		Produktlänge 100 bp - 400 bp
PVL		Produktlänge 100 bp - 400 bp
<i>nuc</i>		Produktlänge 100 bp - 400 bp
<i>mecA</i>		Produktlänge 100 bp - 400 bp
gDNA Heat Shock Protein (Hsp90)	1 µl	Prozesskontrolle; auf Bakterien und Eukaryoten ^[102] ; Abstrich zu Array

Die Basis aller Versuche der Charakterisierung der 3 KS PCR mittels eines pentaplex PCR Systems, Kapitel 6.5 f., stellt eine gDNA (genomische DNA) Lösung mit $1 \cdot 10^8$ ^[103] Kopien pro 25 µl da. Als Standard für die Charakterisierung wurde eine gDNA Verdünnungsreihe von $1 \cdot 10^6$ Kopien pro 25 µl bis $1 \cdot 10^1$ Kopien pro 25 µl aus dieser gDNA Lösung erstellt. Dieser Standard dient sowohl für die folgende Charakterisierung der 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster als zu untersuchendes Probenmaterial, als auch für die Erstellung eines Standards für die Quantifizierung der PCR Produkte über eine qPCR, Kapitel 6.4.5.

Für die Integration der 3 KS PCR in Kapitel 7 ist die Auswertung der PCR Produkte mit einem Mikroarray vorgesehen. Da der Mikroarray nur eine qualitative und keine quantitative Aussage über die PCR liefert, erfolgt die Analyse der 3 KS PCR in dieser Arbeit zusätzlich über eine zweite, quantitative Methode. Als Standard wird hier eine Real-Time-Quantitative-PCR (qPCR^[104]) entwickelt. Im Gegensatz zu dem Prinzip der 3 KS PCR kann hierbei der PCR Prozess in Echtzeit quantitativ z.B. unter dem Einsatz von fluoreszenzmarkierten Sonden überwacht werden^[105, 106, 107]. Die qPCR dient der Identifizierung und Quantifizierung der PCR Produkte, wird allerdings nicht in die Plattform, Kapitel 7, integriert. Die Zusammensetzung der Reagenzien und eine Übersicht über das qPCR

Protokoll wird deshalb lediglich im Anhang, Kapitel B und C, aufgeführt. Als Leitfaden für die Entwicklung der qPCR sind die MIQE Guidelines^[108] zugrunde gelegt.

6.4.3 Versuchsdurchführung der 3 KS PCR Charakterisierung

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Bewertung des Fügeprozesses mit Fokus auf die durchgeführte Reinigung und Lagerung der Einzelfunktionsmuster. Hierfür ist in Abbildung 38 schematisch der Versuchsaufbau mit Entnahmepunkten von Prozesskontrollen gezeigt.

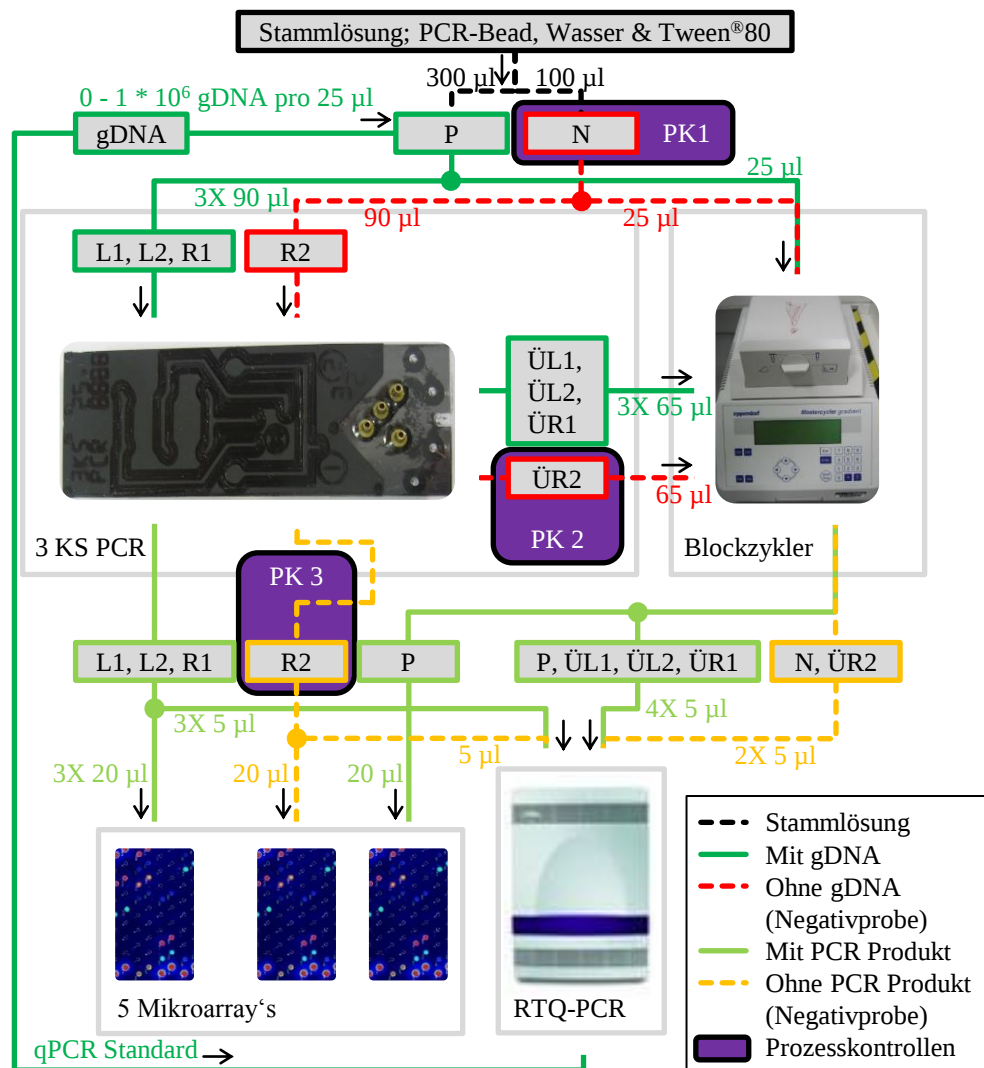


Abbildung 38: Schematische Darstellung der PCR Charakterisierung inklusive Kontrollen; P = Reagenzien mit gDNA; N = Reagenzien ohne gDNA (Negativkontrolle); L1, L2, R1, R2 = Versuche auf 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster; ÜL1, ÜL2, ÜR1, ÜR2 = Überschuss aus 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster; PK1 = Prozesskontrolle der Reagenzien; PK2 = Prozesskontrolle des Fügeprozesses; PK3 = Prozesskontrolle auf Querkontamination auf 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster; Blockzyklus^[88]; qPCR^[109].

Mit diesen Kontrollen lassen sich Aussagen über den Fügeprozess, die Lagerung, Kontamination des Labors oder der Reagenzien, sowie Aussagen über eine

Querkontamination auf dem 3 KS PCR EFM treffen. Zur Vermeidung von Kontamination wird in einem DNA (MRSA) freien Raum, eine Stammlösung nach Tabelle 6 (Puffer, Primer, Polymerase, ...) angesetzt. Diese Lösung wird anschließend in einem zweiten Raum, mit dem Hsp90 Kontrollplasmid versetzt und anschließend separiert in eine Positivlösung (P) und eine Negativlösung (N). In P wird dem Versuch entsprechend $0-1 \cdot 10^6$ gDNA pro 25 µl zugegeben. N dient als Negativkontrolle, das entsprechende Volumen zugegeben an gDNA in P wird mit Wasser substituiert. Hier wird jeweils eine Prozesskontrolle PK 1 entnommen und im Blockzykler^[110] prozessiert. Die Prozesskontrolle PK 1 ist die wichtigste Prozesskontrolle in dem Versuchsablauf. Hier kann eine Kontamination der Stammlösung bzw. der Reagenzien detektiert werden. Eine hier auftretende Kontamination verfälscht die gemessenen Absolutmengen an PCR Produkt im Kapitel 6.4.6.

Für eine Aussage werden drei Versuche P und ein Versuch N auf den 3 KS PCR Einzelfunktionsmustern durchgeführt. Ein entscheidendes Merkmal der hier gezeigten Charakterisierung ist die gleichzeitige Prozessierung von zwei 3 KS PCR Strängen auf einer Plattform. Die PCR Stränge, Abbildung 28, sind mit einem Abstand von 2,5 mm den gleichen thermischen Bedingungen ausgesetzt. Dies bietet die Möglichkeit auf einem 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster einen Versuch P und N gleichzeitig unter identischen Bedingungen zu prozessieren. Das fluidische System der 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster wird mittels einer Pipette mit der Lösung P oder N befüllt. Für diesen Schritt liegen die PCR Kammern des 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters an der pneumatischen Seite an Unterdruck an und sind somit geöffnet.

Nach der Befüllung werden zwei der drei Kammern über das Anlegen von Druckluft im pneumatischen System entleert, dies bewirkt ein Auslenken der TPU Membran. Hiermit ist eine luftblasenfreie Befüllung des fluidischen Systems erreicht. Die überschüssige Lösung (50 µl je Strang: ÜL1, ÜL2, ÜR1 und ÜR2) aus den Kammern wird aufgenommen und im Blockzykler^[110] prozessiert. Hier wird die zweite Prozesskontrolle PK 2 entnommen. Da die überschüssige Lösung ÜR2 durch das fluidische System des 3 KS PCR EFMs gepumpt und zu Anfangs nicht mit gDNA versetzt wurde, spricht eine Detektion von DNA hier für eine Kontamination der 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster im Herstellungsprozess oder der Lagerung. Zu beachten ist, dass eine hier detektierte Kontamination sich nicht zwangsläufig auf den gesamten Versuch auswirken muss, da die Kontamination eines Versuchstranges nicht automatisch eine Kontamination des gesamten 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters, bzw. der Charge bedeutet.

Nach der Prozessierung der 3 KS PCR und des Blockzyklers werden die generierten PCR Produkte separiert und einerseits auf fünf Mikroarrays hybridisiert (P, L1, L2, R1 und R2),

andererseits in der qPCR quantifiziert¹. Damit ist ein direkter Vergleich der qualitativen Ergebnisse der Mikroarrays mit den quantitativen Ergebnissen der qPCR möglich. Zusätzlich erfolgt hier die letzte Prozesskontrolle PK 3. Diese Kontrolle ermöglicht die Detektion einer Kontamination, wenn diese bei der Prozessierung der PCR auf dem 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster auftritt. Gerade mit Bezug auf die Prozessierung der Versuche P und N gleichzeitig auf einem 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster, deutet hier nachgewiesenes Produkt auf eine Querkontamination z.B. durch das pneumatische System oder Leckagen zwischen den Versuchssträngen hin.

6.4.4 Ansteuerung 3 KS PCR

Für die Ansteuerung des Messstandes, Kapitel 6.1, ist in der Charakterisierung, Kapitel 6.5 f., auf Basis der einseitigen thermischen Kontaktierung, Kapitel 6.2 und der optimierten thermischen Ansteuerung, Kapitel 6.3.2.1, das 3 KS PCR Protokoll in Tabelle 7 für die Prozessierung des 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters zugrunde gelegt.

Tabelle 7: Ansteuerprotokoll 3 KS PCR Messstand und Blockzykler.

Phase		3 KS PCR Temperatur [°C]/ Zeit [s]	Blockzykler Temperatur [°C]/ Zeit [s]
Initiale Denaturierung		100/ 180	95/ 120
35 Zyklen	Denaturierung	102/ 20	95/ 10
	Schaltzeit	-/ 4	-/ -
	Hybridisierung	54/ 30	54/ 15
	Schaltzeit	-/ 3	-/ -
	Elongation	73 – 76/ 76	70/ 75
	Schaltzeit	-/ 2	-/ -
Finale Elongation		74/ 60	70/ 300

Die einzige Ausnahme bilden hier die Experimente zur Verkürzung der Prozesslaufzeit der 3 KS PCR auf den Einzelfunktionsmustern. Die Protokolle für die thermische Kontaktierung von zwei Seiten, welche eine PCR Prozessierung auf den 3 KS PCR Einzelfunktionsmustern in unter 30 Minuten ermöglichen, sind Kapitel 6.7.1 zu entnehmen.

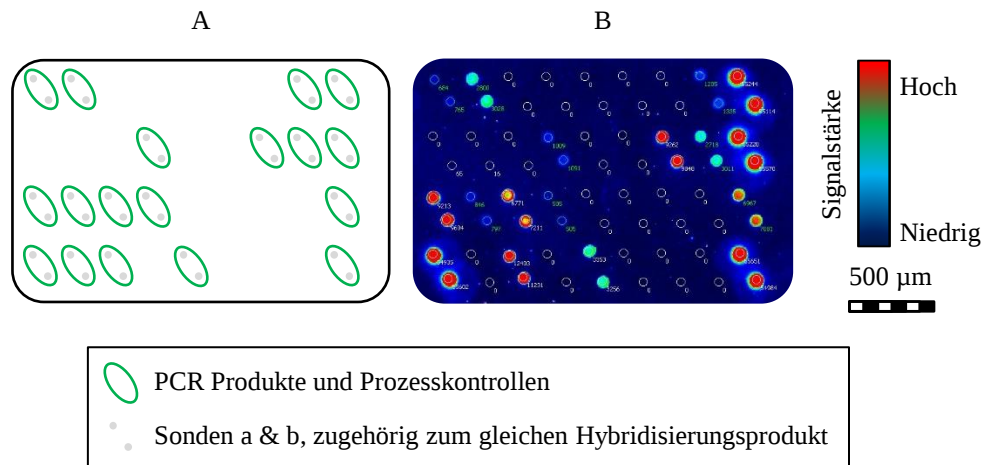
¹ Stichproben ergeben einen Fehler im quantifizierten Ergebnis der qPCR im Schnitt von Faktor 1,3 - 3; Die Kontrollen P und N wurden zur Fehlerreduzierung in Dublikaten, L1, L2, R1 und R2 in Triplikaten in der qPCR analysiert.

6.4.5 Ergebnisinterpretation Mikroarray und qPCR

Mikroarray

Die Genexpressionsanalyse über Mikroarrays geht auf Southern- und Northern-Blots zurück und findet ihr Einsatzgebiet z.B. in der Tumorklassifizierung und der Auswertung viraler oder bakterieller Gene^[111]. Hierbei ist es möglich, auf einer Fläche von 1- 2 cm²^[112] über 1000 Spots^[113, 114] zur Identifizierung von verschiedenen Genen unterzubringen. Als Basis dient meist ein dünnes Plättchen aus Glas, Kunststoff oder Silikon^[111, 112, 115]. Je nach Herstellungsverfahren (Drucken oder Synthetisieren^[111]) können Spots mit einem Durchmesser von 10- 500 µm^[112] hergestellt werden. Der Vorteil gegenüber anderen Methoden (qPCR) liegt, neben niedrigen Herstellungs- und Hybridisierungskosten^[111], in der einfachen Erkennung von Single Nucleotide Polymorphism (SNPs)^[116], Mutationen. Die Signalstärke der Sonden ist hauptsächlich durch die Konzentration des Gens und der Hybridisierungszeit (diffusionsgetriebener Prozess^[117]) gegeben. Optimieren lässt sich der Hybridisierungsprozess auf einem LoC durch aktives Pumpen der Zielgene über den Mikroarray^[116].

Der in dieser Arbeit verwendete Mikroarray^[151] besteht aus bedrucktem Glas (Breite x Länge x Höhe) 4 mm x 3 mm x 0,1 mm und kann mit einer Anzahl von etwa 70 Spots eine ausreichende Anzahl an Genen (15) für die caMRSA8 Detektion zusätzlich zu verschiedenen Kontrollen (Hsp90, Hybridisierungskontrollen, ...) nachweisen. Da sich die Charakterisierung der 3 KS PCR hauptsächlich auf das Standardverfahren der qPCR stützt, werden die Minimum Guidelines MIAME für die Charakterisierung des Mikroarrays nicht erfüllt^[118]. Die Vergleichbarkeit der Analysemethoden wird jedoch in Kapitel 6.6 gezeigt. Die verwendeten Reagenzien und Protokolle sind dem Anhang Kapitel D und E zu entnehmen. Die Versuchsauswertung über den Mikroarray erfolgt durch doppelt aufgetragene Sonden (a, b) für das gleiche Gen. Es sind sowohl Sonden für eine Hybridisierung der Forwardprimer (^F), als auch Sonden mit den Reverseprimern (^R) der Gene aufgetragen. Alle Primer sind für die Detektion mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3^[119] markiert. In Abbildung 39 ist exemplarisch ein Ergebnis der Mikroarray Charakterisierung gezeigt.



Die Datenerfassung erfolgt automatisiert über einen Mikroarrayscanner^[151]. Es ist bekannt^[16], dass die Intensität der Signale auf dem Mikroarray unter anderem von der Konzentration der untersuchten PCR Produkte abhängt. Die Ergebnisse der Mikroarrays werden in dieser Arbeit jedoch nur für einen semiquantitativen Nachweis der PCR Produkte herangezogen.

Kriterium für die Ergebnisauswertung ist, dass das Sondenpaar (a, b) eines hybridisierten PCR Produktes:

- Sich in der Intensität um 1000 gegen den Hintergrund abheben.
- Sich an ihrer vorgegebenen Stelle befinden.
- Keine Rückstände aufweist, die im Bereich der Sonden die Messung verfälschen würden.

Die gemessene Fluoreszenz wird in der Scannereinheit auf den Wertebereich von 0 (Hintergrund) bis 65535 umgerechnet.

qPCR

Die qPCR ist laut Mülhardt^[120 S.109 f.] das modernste Standardverfahren für die Quantifizierung von Nukleinsäuren. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, quantitativ die Menge von gDNA und PCR Produkt zu bestimmen. Hierfür ist für die fünf Gene (Targets), Kapitel 6.4.2, je eine Singelplex qPCR (Kapitel B), bestehend aus Forwardprimer, Reverseprimer und Sonde entwickelt worden. Die qPCR Primer und Sonden sind spezifisch für die PCR Produkte, damit also auch für die gDNA. Vorversuche haben gezeigt, dass die qPCR mit vergleichbarer Effizienz sowohl die gDNA als auch die PCR Produkte amplifiziert. Es kann also ein direkter Vergleich der eingegebenen Menge an gDNA vor der 3 KS PCR zur amplifizierten Menge an PCR Produkt nach der 3 KS PCR gezogen werden.

Die Basis aller Versuche der Charakterisierung mittels des pentaplex PCR Systems, Kapitel 6.5 f., stellt eine gDNA Lösung mit $1 * 10^8$ [121] Kopien pro 25 µl da. Als Standard für die Quantifizierung wurde pro Target und Versuch eine gDNA Verdünnungsreihe in Duplikaten von $1 * 10^6$ pro 25 µl bis $1 * 10^1$ pro 25 µl für jeden Versuch in der qPCR^[104] untersucht. Die PCR Produkte N und P, Kapitel 6.4.3, werden ebenfalls in Duplikaten in der qPCR quantifiziert, die PCR Produkte ÜL1, ÜL2, ÜR1 und ÜR2, Kapitel 6.4.3, werden einfach aufgetragen. Zusätzlich werden für die Quantifizierung der PCR Produkte L1, L2, R1 und R2, Kapitel 6.4.3, jeweils Triplikate untersucht.

6.4.6 Gewichtung Prozesskontrollen PK 1, PK 2 und PK 3

Vor der biologischen Charakterisierung des 3 KS PCR Konzepts, bzw. Vermessung und Maximierung der PCR Performance anhand eines gegebenen Multiplex-PCR Systems, das den Kern dieser Arbeit darstellt, werden in diesem Kapitel die Prozesskontrollen analysiert. Eine detaillierte Beschreibung der Prozesskontrollen mit einem Überblick über die Versuchsdurchführung ist in Kapitel 6.4.3 dargestellt.

Die Prozesskontrollen gewährleisten eine Überwachung des gesamten Versuchsablaufs vom Fügeprozess der Einzelfunktionsmuster über die Lagerung, die Reagenzien und die Experimente auf dem Einzelfunktionsmuster selbst. Untersucht wird der Einfluss der Kontamination durch fremde DNA bzw. PCR Produkt. Die Prozesskontrollen sind unterteilt in:

- Prozesskontrolle 1 (PK 1); wichtigste Kontrolle, zeigt Kontamination in der Stammlösung (Reagenzien), beeinflusst das gesamte Experiment.
- Prozesskontrolle 2 (PK 2); zeigt Kontamination in dem Fügeprozess oder der Lagerung der 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster
- Prozesskontrolle 3 (PK 3); zeigt Kontamination während der 3 KS PCR Prozessierung auf dem Einzelfunktionsmuster

In Abbildung 40 ist eine Klassifizierung der Ergebnisse der 3 KS PCR, L1, L2 und R1 beschrieben in Kapitel 6.4.3, anhand der untersuchten Prozesskontrollen, PK 1, PK 2 und PK 3, dargestellt. Zum einen ist über diese Klassifizierung eine generelle Aussage über den Versuchsablauf (Planung und Durchführung), Tabelle 8, zu treffen. Zum anderen erfolgt hier eine Bewertung der PCR Ergebnisse (L1, L2 und L3) hin zu der Aussortierung oder Weiterverwendung für die Ergebnisinterpretation.

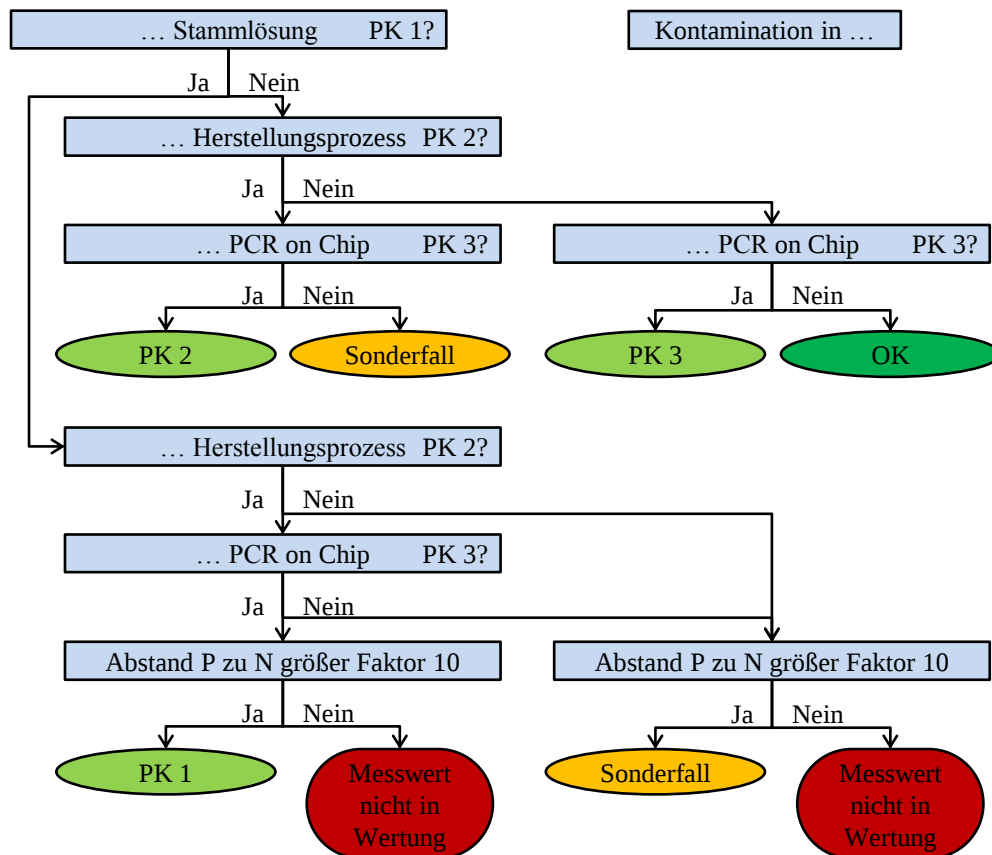


Abbildung 40: Schematische Darstellung der Klassifizierung der PCR Ergebnisse L1, L2 und R1 anhand der Prozesskontrollen PK 1, PK 2 und PK 3 nach Kapitel 6.4.3.

Kontamination der Stammlösung (PK 1):

Diese Prozesskontrolle ist die wichtigste Kontrolle für die folgende Charakterisierung der 3 KS PCR auf dem Einzelfunktionsmuster. Die Stammlösung, aus der die Proben P und N hergestellt werden, wird auf eine Kontamination hin untersucht. Wird hier in N eine Kontamination festgestellt, zeigt in der Regel danach jede weitere Kontrolle (PK 2 und PK 3) eine Kontamination an. Ist dies nicht der Fall liegt ein Handhabungsfehler im Pipettiervorgang vor, die Prozesskontrolle wird nicht gewertet (Sonderfall). Zeigen die Kontrollen PK 2 und PK 3 eine Kontamination wird untersucht, ob sich die Menge an quantifiziertem Produkt in N von der quantifizierten Produktmenge in P um mindestens den Faktor 10 unterscheidet. Ist dies nicht der Fall, wird der Versuch abgebrochen, ansonsten geht er in die Ergebnisinterpretation ein.

Kontamination im Herstellungsprozess/ Lagerung (PK 2):

Diese Prozesskontrolle PK 2 (Proben ÜL1, ÜL2, ÜR1 und ÜR2, Kapitel 6.4.3) werden nach dem Befüllen der einzelnen PCR Stränge (L1, L2, R1 und R2), aber vor der 3 KS PCR Prozessierung auf dem Einzelfunktionsmuster generiert. Wird in dieser Prozesskontrolle ein PCR Produkt nachgewiesen, ist dies ein Hinweis auf eine Kontamination im Fügeprozess der Einzelfunktionsmuster oder deren Lagerung. Eine hier nachgewiesene Kontamination

sollte ebenfalls in der Prozesskontrolle PK 3 nachgewiesen werden. Ist dies nicht der Fall liegt ein Handhabungsfehler im Pipettiervorgang vor, die Prozesskontrolle wird nicht gewertet (Sonderfall). Es kann bei dieser Kontrolle keine generelle Aussage über den gesamten Versuch getroffen werden, da hier schon eine Separation in die verschiedenen Versuchsstränge (L1, L2, R1 und R2) stattgefunden hat. Die quantifizierten Werte werden auf ihren Erwartungswert hin untersucht und gegebenenfalls aus der Wertung genommen.

Kontamination der PCR auf dem 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster (PK 3):

Die Prozesskontrolle PK 3 ermöglicht die Detektion einer Kontamination bei der Prozessierung der PCR auf dem Einzelfunktionsmuster. Eine hier angezeigte Kontamination würde auf eine Leckage im fluidischen/ pneumatischen System oder generelle Probleme bei der Prozessierung hinweisen. Es kann bei einer festgestellten Kontamination PK 3 keine Aussage über den gesamten Versuch getroffen werden, da, wie auch schon in PK 2, eine Separation der Proben stattgefunden hat.

Tabelle 8: Auswertung der Prozesskontrollen PK 1, PK 2 und PK 3 nach Abbildung 40, Anzahl aller Versuche ist 106 (ohne Negativkontrollen).

Gene		PK 1	PK 2	PK 3	Sonderfall	OK	Defekt bei PCR	Nicht in Wertung	Kein Wert (LoD)
23S	Anz. Versuche	57			9	3	4	33	
	Anteil in %	53,8	-	-	8,5	2,8	3,7	31,1	-
PVL	Anz. Versuche	6	3		23	42	4	22	6
	Anteil in %	5,7	2,8	-	21,7	39,6	3,7	20,8	5,7
SCC1	Anz. Versuche	2	6		9	62	4	19	4
	Anteil in %	1,9	5,7	-	8,5	58,5	3,7	17,9	3,8
nuc	Anz. Versuche	13	3	10	11	43	4	19	3
	Anteil in %	12,3	2,8	9,4	10,4	40,6	3,7	17,9	2,8
mecA	Anz. Versuche	3	3	6	12	57	4	19	2
	Anteil in %	2,8	2,8	5,7	11,3	53,8	3,7	17,9	1,9

In Tabelle 8 sind die 106 3 KS PCR Versuche aufgelistet, bei denen gDNA dem Versuch hinzugegeben wurde. Die Kontrollen, prozessiert auf dem 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster, für die Detektion einer Kontamination sind nicht aufgeführt. Insgesamt wurden für die Charakterisierung 140 3 KS PCR Versuche durchgeführt. Mechanische Ausfälle in den Kontrollen (N, nicht in Tabelle 8 aufgeführt) sind nicht aufgetreten, die Ausfallrate aller 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster (140 Versuche) ist demnach mit < 3 % (4/ 140) bestimmt. An einem Versuchstag wurden im Schnitt vier 3 KS PCR-, 6 Blockzykler PCR-, 206 qPCR Experimente und 5 Mikroarrays mit ungefähr 530 Pipettierschritten prozessiert.

Festzustellen in Tabelle 8 ist eine hohe Anzahl (54 %) von Versuchen, die eine Kontamination in der Stocklösung (PK 1) mit 23S Produkten aufweisen. Dies ist durch eine dauerhafte Kontamination des Labors mit 23S PCR Produkten zu erklären. Durch diese Kontamination ist die Anzahl der nicht auswertbaren Ergebnisse im Vergleich zu den verbleibenden Targets höher, gerade bei Versuchen mit niedriger Eingangskonzentration (Kapitel 6.5.4) sind hier vermehrt Ausfälle zu verzeichnen.

15 Messwerte pro Gen, die nicht in die Auswertung einbezogen wurden, sind nicht verwertbaren Kontrollen geschuldet. Die Ursache hierfür liegt meistens in einem defekten 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster auf dem die Negativkontrolle N prozessiert wurde.

Die Targets *PVL*, *SCC1*, *nuc* und *mecA* zeigen bei der Kontrolle PK 2 nur einen geringen Anteil, 3 % bis 6 %, an kontaminierten Ergebnissen. Es kann also angenommen werden, dass sowohl die Überwachung des Herstellungsprozesses als auch die Lagerung der 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster ausreichend sind.

Für die Gene *nuc* und *mecA* sind Kontaminationen auf PK 3 festzustellen. Dies könnte auf eine Leckage während des Prozesses auf dem 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster hindeuten. Da auf dem 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster allerdings nicht ein Gen alleine, sondern alle fünf gleichzeitig prozessiert werden, ist eine Verunreinigung durch nur ein Gen ausgeschlossen. Die gemessenen Kontaminationen sind auf Handhabungsfehler (Pipettierfehler) nach der 3 KS PCR Prozessierung bei der Quantifizierung durch die qPCR zurückzuführen. Eine Kontamination während der Prozessierung auf dem 3 KS PCR EFM hat damit nicht stattgefunden.

Zum Abschluss werden die quantifizierten Messungen der Kontrollen ÜL1, ÜR1 und ÜR2 mit den quantifizierten Messungen der Stocklösung P verglichen. Die Proben unterscheiden sich darin, dass die Kontrollen ÜL1, ÜR1 und ÜR2 durch das fluidische System des 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters vor der Prozessierung auf dem Einzelfunktionsmuster gepumpt wurden, die Probe P ist nie mit einem Einzelfunktionsmuster in Kontakt gekommen. Würden Faktoren wie z.B. die Materialien des LoCs einen Einfluss auf die gDNA ausüben, müssten hier gerade bei niedrigen gDNA Konzentrationen Unterschiede in der generierten PCR Produktmenge gleichermaßen in allen fünf quantifizierten Targets sichtbar werden. Bei 8 Versuchen mit einer Eingangskonzentration von $1 \cdot 10^1$ bis $1 \cdot 10^2$ pro 25 µl gDNA wurde festgestellt, dass in keinem Versuch eine Minderung² des PCR Produktes bei allen Genen in den Kontrollen ÜL1, ÜR1 und ÜR2 im Vergleich zu den Proben P festgestellt werden kann. Es ist hier keine Beeinflussung durch die Materialien des

² Stichproben ergeben einen Fehler im quantifizierten Ergebnis der qPCR im Schnitt von Faktor 1,3 - 3; Kontrollen ÜL1, ÜL2, ÜR1 und ÜR2 wurden nicht mehrfach in der qPCR aufgetragen.

3 KS PCR Einzelfunktionsmusters bei Raumtemperatur hinsichtlich des Durchpumpens der gDNA durch das fluidische System festzustellen.

6.5 3 KS PCR Performance

Die Performance der 3 KS PCR wird anhand von drei Merkmalen bestimmt:

- Der Referenzmessung der PCR Produkte generiert auf dem 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters gegenübergestellt denen des Blockzyklers. Dies ist die entscheidende Einflussgröße für den Mikroarray.
- Die Effizienz des 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters, bei der neben vielen biologischen Faktoren das Prozessierungskonzept einen Einfluss hat.
- Die untere Nachweisgrenze des 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters, dies gibt die kleinste noch zu amplifizierende Menge an gDNA an, die noch sicher amplifiziert wird.

6.5.1 Prozessierungsstationen & Versuchsstränge 3 KS PCR

Für die Validierung eines Ergebnisses wurden aus einem Stock drei positiv- und ein negativ Experiment auf dem Einzelfunktionsmuster gefahren. Die Ergebnisse unterscheiden sich hauptsächlich dadurch, dass die 3 KS PCR auf verschiedenen Prozessierungsstationen und Versuchssträngen durchgeführt wurde. Zuerst werden also die Versuchsstränge und damit die Aufbauten untereinander verglichen. Als Datenbasis dient die Verdünnungsreihe mit Eingangskonzentrationen von $1 \cdot 10^1$ - $1 \cdot 10^6$ Targets pro 25 μ l.

Gezeigt werden in Abbildung 41 die quantifizierten Mengen an PCR Produkt über das Verfahren der qPCR. Die Ergebnisse der 3 KS PCR werden im doppelt logarithmischen Raum dargestellt. Es wird der Zusammenhang zwischen Eingangskonzentration vor der 3 KS PCR (Anzahl gDNA Fragmente pro 25 μ l PCR Reaktionsvolumen), zur Ausgangskonzentration (Anzahl PCR Produkte pro 25 μ l PCR Reaktionsvolumen) nach der 3 KS PCR gezeigt. Im betrachteten Bereich wird das Verhalten des Systems als linear angenommen und somit über $y=m \cdot x+b$ beschrieben. Mit m gleich 1 wird ein ideales System angenommen, d.h. Faktor 10 mehr Eingangsprodukt (gDNA) ergibt Faktor 10 mehr Ausgangsprodukt (PCR Produkt). Die Variable b beschreibt den Threshold; hier gilt: Die Erhöhung um 1 entspricht einem Faktor 10 mehr PCR Produkt. Um alle Targets und Versuchsstränge miteinander zu vergleichen, werden in Tabelle 9 die Parameter einzeln herausgestellt. Der Versuchsstrang L2 dient als Kontrolle und wird nicht aufgeführt.

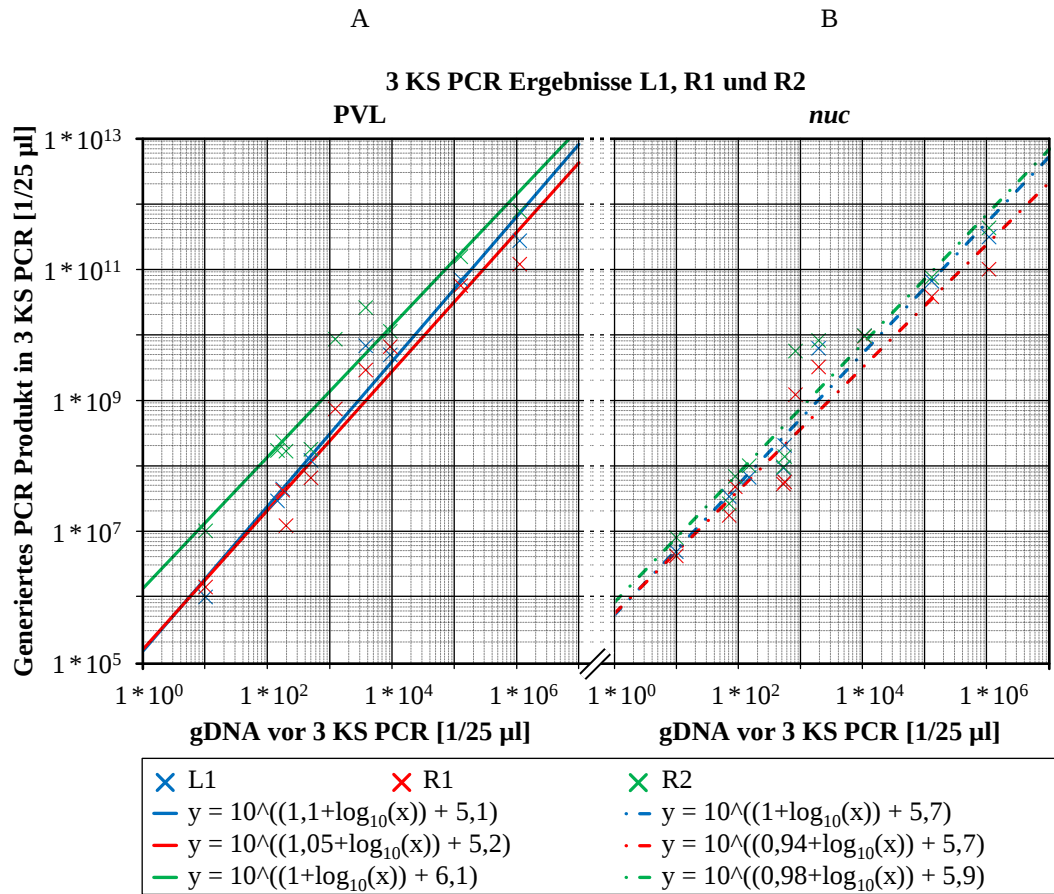


Abbildung 41: Verdünnungsreihe gDNA Eingangskonzentration $1 \cdot 10^1$ bis $1 \cdot 10^6$ Targets pro 25 µl; Unterteilung in Versuchsstränge L1 (Prozessierungsstation 1), R1 und R2 (Prozessierungsstation 2); Am Beispiel A: gDNA zu PCR Produkt Gen PVL; B: gDNA zu PCR Produkt Gen *nuc*.

Tabelle 9: Gegenüberstellung der Prozessierungsstationen und Versuchsstränge.

Parameter der Ausgleichsgeraden je Target		L1	R1	R2	Θ	Abw. [%]
23S (26 DP*)	m	0,78 ±0,06	0,67 ±0,11	0,75 ±0,08	0,73	8,6
	b	7,7 ±0,2	8,1 ±0,4	7,9 ±0,2	7,9	2,5
	R ²	0,97	0,94	0,94	0,95	2,1
PVL (27 DP*)	m	1,10 ±0,08	1,05 ±0,09	1,00 ±0,09	1,05	4,8
	b	5,1 ±0,3	5,2 ±0,3	6,1 ±0,3	5,47	11,6
	R ²	0,98	0,97	0,96	0,97	1
SCC1 (30 DP*)	m	1,14 ±0,15	1,08 ±0,17	1,13 ±0,15	1,12	3,3
	b	4,3 ±0,5	4,6 ±0,5	4,6 ±0,5	4,5	4,4
	R ²	0,93	0,91	0,92	0,92	1,1
...		...				

Parameter der Ausgleichsgeraden je Target		L1	R1	R2	Θ	Abw. [%]
<i>nuc</i> (30 DP*)	m	1,00 $\pm$ 0,08	0,94 $\pm$ 0,10	0,98 $\pm$ 0,10	0,97	3,4
	b	5,7 $\pm$ 0,2	5,7 $\pm$ 0,3	5,9 $\pm$ 0,3	5,77	2,3
	R ²	0,97	0,95	0,95	0,96	1,4
<i>mecA</i> (30 DP*)	m	1,09 $\pm$ 0,10	0,96 $\pm$ 0,10	1,06 $\pm$ 0,13	1,04	7,4
	b	4,6 $\pm$ 0,3	5,0 $\pm$ 0,3	4,9 $\pm$ 0,4	4,83	4,8
	R ²	0,97	0,95	0,93	0,95	2,1

* DP = Datenpunkte

Die Werte in Tabelle 9 zeigen, dass die Parameter der Ausgleichsgeraden der verschiedenen Versuchsstränge nicht signifikant um den Mittelwert schwanken. Die maximale Abweichung von 12 % zeigt das Target PVL beim Threshold. Betrachtet man jedoch die verbleibenden Targets, zeigt sich nur ein geringer Unterschied (2- 5 %) zwischen den Strängen L1, R1 und R2, Abbildung 41 B), die Ausgleichsgeraden liegen deckungsgleich. Des Weiteren befindet sich der Versuchsstrang R2 2,5 mm neben dem Versuchsstrang R1. Die Charakterisierung beider Stränge findet auf der gleichen Prozessierungsstation parallel statt und daher sind die Stränge den gleichen Rahmenbedingungen- Temperatur, Druck, Schaltzeiten, Oberfläche zu Volumen, Prozesszeit, ...- ausgesetzt. Die Abweichung des Targets PVL auf dem Versuchsstrang R2 zu den Versuchssträngen L1 und R1 scheint also Targetabhängig und damit nicht durch die Prozessierungsstationen oder die Versuchsstränge beeinflusst zu sein. Verbleibende Einflüsse sind z.B. variierende Primer- oder Pufferkonzentrationen während der Versuche in den PCR Strängen sein.

Es ist keine Beeinflussung der 3 KS PCR durch die Prozessierungsstationen oder die Versuchsstränge festzustellen. Eine Differenzierung hierauf findet in den weiteren Kapiteln nicht statt.

6.5.2 Referenzmessung der PCR Produkte: 3 KS PCR zu Blockzykler

Das 3 KS PCR EFM wurde nach dem Blockzykler in Bezug auf Zieltemperaturen und Haltezeiten vermessen, Kapitel 6.3. Bei einem Vergleich der Konzepte 3 KS PCR zu Blockzykler sollte unter identischen Bedingungen (Primer-, Pufferkonzentration, ...) kein Unterschied in der generierten Menge des PCR Produktes festzustellen sein. Eine Differenz in der generierten PCR Produktmenge deutet auf die Systemgrenzen der 3 KS PCR zur statischen PCR im Tube hin. Untersucht wurde die Verdünnungsreihe mit einer Eingangskonzentration von $1 \cdot 10^1$ bis $1 \cdot 10^6$ gDNA pro 25 μ l. Zu beachten ist, dass die

Datenbasis des Blockzyklers ein Drittel der des 3 KS PCR Systems beträgt, Kapitel 6.4.3. Die 3 KS PCR und der Blockzykler sind im direkten Vergleich in Abbildung 42 gezeigt.

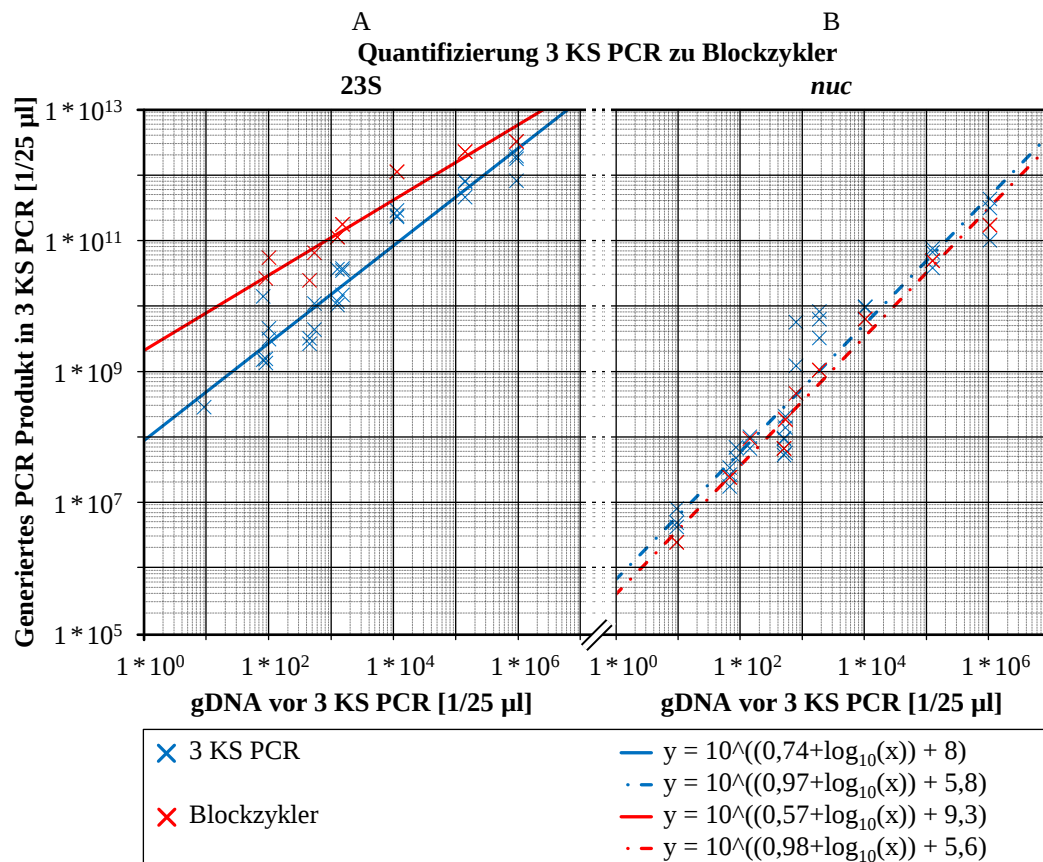


Abbildung 42: Verdünnungsreihe gDNA Eingangskonzentration $1 \cdot 10^1$ bis $1 \cdot 10^6$ Targets pro 25 μ l; Gegenüberstellung 3 KS PCR zu Blockzykler; Am Beispiel A: gDNA zu PCR Produkt Gen 23S; B: gDNA zu PCR Produkt Gen *nuc*.

Tabelle 10: Gegenüberstellung des generierten PCR Produkts 3 KS PCR zum Blockzykler.

Parameter der Ausgleichsgeraden je Target		3 KS PCR	Blockzykler	$\ominus$	Abw. [%]
23S	m	0,74±0,05	0,57±0,04	0,66	13
	b	8,0 ±0,2	9,3 ±0,1	8,65	7,5
	R ²	0,96	0,96	0,96	0
PVL	m	1,05 ±0,07	0,97 ±0,02	1,01	4
	b	5,6 ±0,2	5,8 ±0,1	5,7	1,8
	R ²	0,95	0,99	0,97	2,1
SCC1	m	1,12 ±0,09	1,07 ±0,06	1,1	2,3
	b	4,6 ±0,3	4,9 ±0,2	4,75	3,2
	R ²	0,92	0,96	0,94	2,1
...		...			

Parameter der Ausgleichsgeraden je Target		3 KS PCR	Blockzykler	$\ominus$	Abw. [%]
<i>nuc</i>	m	0,97 $\pm$ 0,06	0,98 $\pm$ 0,03	0,98	0,5
	b	5,8 $\pm$ 0,2	5,6 $\pm$ 0,1	5,7	1,8
	R ²	0,96	0,99	0,98	1,5
<i>mecA</i>	m	1,04 $\pm$ 0,06	1,01 $\pm$ 0,05	1,03	1,5
	b	4,9 $\pm$ 0,2	4,8 $\pm$ 0,2	4,85	1
	R ²	0,95	0,97	0,96	1

Die Targets PVL, *SCC1*, *nuc* und *mecA* zeigen im Vergleich Blockzykler zum 3 KS PCR EFM keinen signifikanten Unterschied in den generierten PCR Produktmengen, die Ausgleichsgeraden sind nahezu deckungsgleich. Das Target 23S weist im direkten Vergleich ein deutlich unterschiedliches Verhalten auf, was sich gerade im Bereich kleiner Eingangskonzentrationen zeigt. Zu sehen ist, dass der Blockzykler bei einer Eingangskonzentration von $1 \cdot 10^1$ gDNA pro 25 μ l über einen Faktor 10 mehr PCR Produkt generiert als das 3 KS PCR EFM. Dieser Einfluss ist bedingt durch eine unterschiedliche Amplifizierungseffizienz des 3 KS PCR Systems im Vergleich zum Blockzykler, Kapitel 6.5.3.

In der Charakterisierung Kapitel 6.6 f. wird auf diese Konzentrationsreihe als zu vergleichender Standard für die 3 KS PCR zurückgegriffen. Die Ergebnisse der weiteren Charakterisierung werden auf die folgenden Kriterien hin untersucht.

Positiver Einfluss

- Die Messergebnisse aller Targets liegen über den jeweiligen Ausgleichsgeraden aus Tabelle 10.
- Die Messergebnisse einzelner Targets liegen über der entsprechenden Ausgleichsgeraden, in der Größenordnung mindestens der zweifachen Standardabweichung.

Negativer Einfluss

- Die Messergebnisse aller Targets liegen unter den jeweiligen Ausgleichsgeraden aus Tabelle 10.
- Die Messergebnisse einzelner Targets liegen unter der entsprechenden Ausgleichsgeraden im Bereich größer der zweifachen Standardabweichung.

Kein Einfluss

- Die Messergebnisse aller Targets schwanken um die jeweiligen Ausgleichsgeraden aus Tabelle 10 im Bereich der zweifachen Standardabweichung.

Die Ergebnisse des Blockzyklers dienen als Kontrollen und sind deswegen nicht in Triplikaten prozessiert worden. Ausreißer einzelner Targets, prozessiert im Blockzykler, werden in den Kapitel 6.6 f. nicht beachtet. Die Ergebnisse der 3 KS PCR sind nur dann beeinflusst, wenn alle Targets prozessiert im Blockzykler ein unerwartetes Verhalten aufweisen. So würde zum Beispiel ein quantitativer Rückgang aller PCR Produkte auf eine Degenerierung der gDNA hinweisen.

6.5.3 Effizienzmessung PCR System: 3 KS PCR zu Blockzykler

Das zweite wichtige Merkmal für die Charakterisierung eines PCR Systems ist die Effizienz der Genamplifizierung. In qPCR Systemen wird die Effizienz über eine Verdünnungsreihe bestimmt^[120 S.109 f.]. Bei Systemen mit einer Endpunktbestimmung (3 KS PCR) wird der exponentielle Bereich der Amplifizierung über eine Quantifizierung der PCR Produkte in jedem einzelnen PCR Zyklus ermittelt. Idealerweise sollte in jedem PCR Zyklus eine Verdoppelung, (Faktor 2) der PCR Produkte stattfinden. In diesem Kapitel wird die Effizienz des Blockzyklers mit 1,8 und des 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters mit 1,7 bestimmt.

6.5.3.1 Effizienzmessung Blockzykler

Für das Festlegen des exponentiellen Bereiches für die Ermittlung der Effizienz werden im Blockzykler 12 Proben (Reihe A, Abbildung 43) à 25 µl der gleichen Stocklösung prozessiert. Die 12 Proben werden im Abstand von 2 PCR Zyklen ab dem Zyklus 14 entnommen und anschließend in der qPCR analysiert. Die quantifizierten PCR Produkte pro Zyklus und Gen, prozessiert im Blockzykler, sind in Abbildung 43 gezeigt.

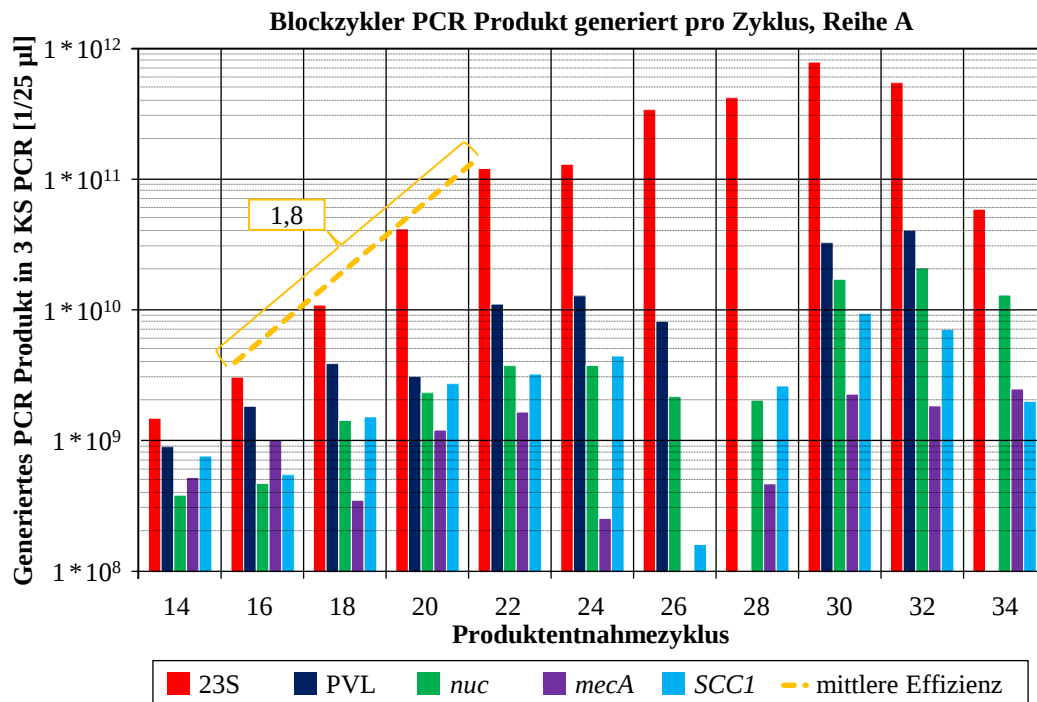


Abbildung 43: PCR Produkt generiert im Blockzykler (Reihe A) pro Zyklus; gDNA Eingangskonzentration 1×10^5 gDNA pro 25 µl; Entnahmeschritte PCR Produkt für Zyklus 14, 16, 18, 20, 24, 26, 28, 30, 32 und 34.

Gezeigt wird die Menge an im Blockzykler generiertem PCR Produkt pro Entnahmeschritt. Idealerweise stellt sich für jedes Produkt ein sigmoidaler Verlauf ein. In Abbildung 43 ist zu erkennen, dass sich in dem untersuchten Multiplex-PCR System dieser Verlauf nur für das Produkt 23S klar abzeichnet. Die Targets PVL, *nuc*, *mecA* und *SCC1* zeigen keinen definiert abgrenzbaren Bereich, in dem die Effizienz des Multiplex-PCR Systems im Blockzykler bestimmt werden könnte. Das Target 23S zeigt einen exponentiellen Anstieg in dem Zyklus 16, 18 und 20. Um den Zyklus 22 geht die Kurve über in die Plateauphase, ab Zyklus 30 ist keine Zunahme an 23S PCR Produkt mehr zu verzeichnen. Die gemittelte Effizienz des Blockzyklers ist über die Steigung der Geraden im logarithmischen Raum des Target 23S (Zyklus 16 bis 22) mit 1,8 bestimmt.

6.5.3.2 Effizienzmessung 3 KC PCR

In Kapitel 6.5.2 ist die Referenzmessung (Blockzykler) dem 3 KS PCR EFM gegenübergestellt. Hier ist für das PCR Produkt 23S im 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster eine geringere Produktmenge nach der PCR festgestellt worden. Hieraus schließt sich eine geringere Effizienz des 3 KS PCR Konzepts. Dies bedeutet, dass der exponentielle Bereich für die Effizienzbestimmung in einem späteren Intervall liegt als im Blockzykler. Für die Effizienzbestimmung auf dem 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster ist der Bereich von Zyklus 16, 18, 20, 22, 24 und 26 des Target 23S untersucht worden.

Die Effizienzbestimmung des 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters (Reihe B, Abbildung 44) ist an verschiedenen Tagen durchgeführt worden. Eine Schwankung der gDNA

Eingangskonzentration der Stammlösung für die Versuche ist anzunehmen. Unter der Annahme, dass beim Blockzykler die Effizienz keinen Schwankungen unterliegt, wurden die gemittelten Werte der Ergebnisse aus drei Messungen der 3 KS PCR anhand der Proben (P, Kapitel 6.4.3) normiert, F. [3], um diese Schwankungen auszugleichen.

$$EFM_{Bn}' = \frac{Blockzykler_{Bn}}{Blockzykler_{An}} \times EFM_{Bn} \quad \text{F. [3]}$$

EFM_{Bn} : Einzelfunktionsmuster 3 KS PCR Produkt Reihe B

EFM_{Bn}' : Einzelfunktionsmuster 3 KS PCR Produkt Reihe B normiert

$Blockzykler_{Bn}$: Blockzykler PCR Produkt Reihe B

$Blockzykler_{An}$: Blockzykler PCR Produkt Reihe A

n : Entnahmezyklus

In Abbildung 44 ist die quantifizierte PCR Produktmenge pro Zyklus des Target 23S im Vergleich Blockzykler, Reihe A, zu den normierten 3 KS PCR Messungen, Reihe B, aufgetragen.

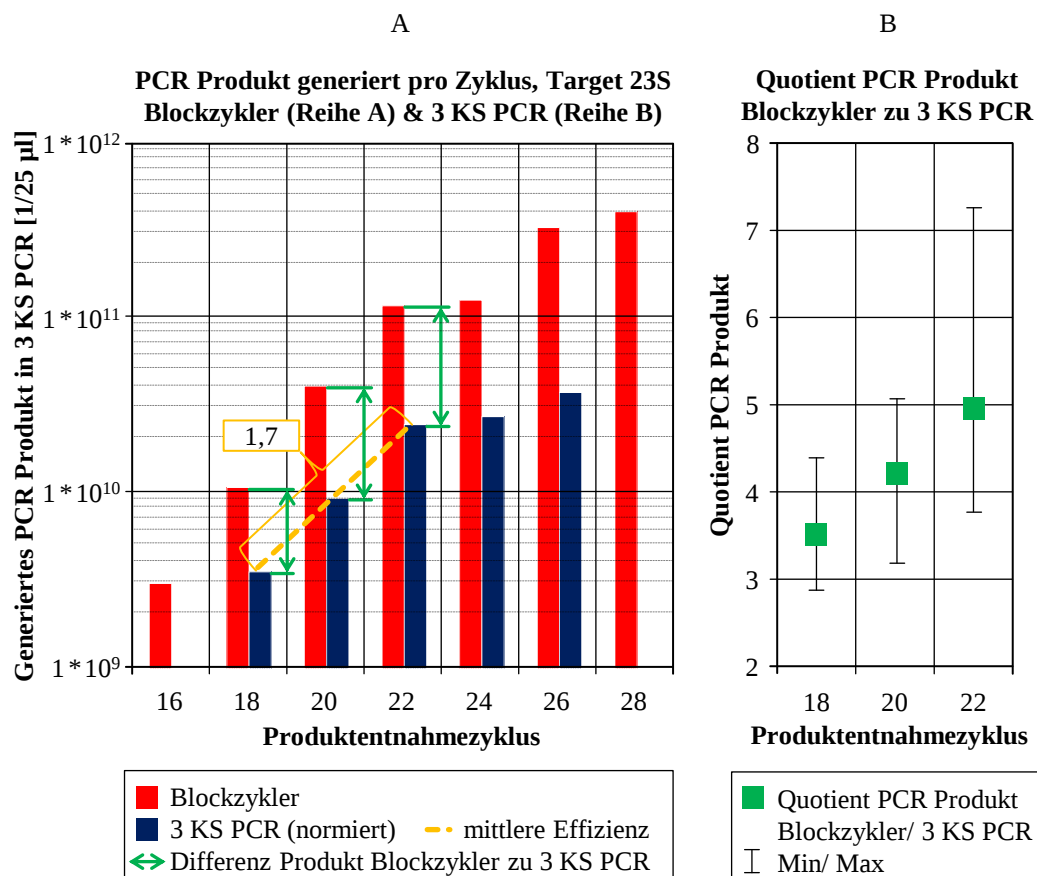


Abbildung 44: A) PCR Produkt generiert pro Zyklus, Gen 23S, Blockzykler (Reihe A) zu normierter 3 KS PCR (Reihe B); gDNA Eingangskonzentration $1 \cdot 10^5$ pro 25 µl; Entnahmeschritte 3 KS PCR Produkt Zyklus 16, 18, 20, 22, 24 und 26; B) Quotient PCR Produkt Blockzykler zu 3 KS PCR (normiert); gDNA Eingangskonzentration $1 \cdot 10^5$ pro 25 µl; Entnahmeschritte 3 KS PCR Produkt Zyklus 18, 20 und 22.

Die 3 KS PCR Messungen in Abbildung 44 A) zeigen:

- Im Bereich Zyklus 18 bis Zyklus 22 einen exponentiellen Bereich.
- Einen Übergang in die Plateauphase, wie auch beim Blockzykler, bei Zyklus 22.
- Dass das 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster zum gleichen Entnahmezyklus weniger PCR Produkt generiert als der Blockzykler.
- Einen geringeren PCR Produktzuwachs in den Zyklen 18 bis 22 im Vergleich zum Blockzykler.

In Abbildung 44 B) ist der Quotient des PCR Produktes des Blockzyklers zur 3 KS PCR im Zyklus 18, 20 und 22 gezeigt. Es wird deutlich:

- Dass das 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster gegenüber dem Blockzykler zum gleichen Zyklus 3,5- 5 (Mittelwert) mal weniger Produkt generiert.
- Dass die Differenz über die Zyklenzahl (18- 22) steigt.

Dies bedeutet, dass das 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster mit einer geringeren Effizienz als der Blockzykler arbeitet. Die mittlere Effizienz wurde über die Zyklen 18, 20 und 22 mit 1,7 ermittelt. Dies bedeutet, dass das 3 KS PCR EFM mit einer 5,6 % geringeren Effizienz gegenüber dem Blockzykler mit einer gemittelten Effizienz von 1,8 (entspricht 100 %) arbeitet.

Es ist gezeigt, Abbildung 43, dass die Effizienz von Zyklus zu Zyklus variiert^[120 S.106 f.; 122; 123]. Im Allgemeinen wird deshalb für die PCR eine mittlere Effizienz angegeben. Legt man die gemittelten Effizienzen, Blockzykler 1,8 und 3 KS PCR 1,7 für die Zyklen 1- 18 zu Grunde, generiert der Blockzykler bis zum Zyklus 18 theoretisch die 3,3-fache Menge an PCR Produkt. Der über die Messungen ermittelte Faktor liegt bei 3,5-fach mehr PCR Produkt, Abbildung 44 B, die Messungen liegen also im Erwartungsbereich.

Im Kapitel 4 wurden die 3 KS PCR spezifischen Einflussfaktoren auf die WC-Effizienz theoretisch betrachtet. Untersucht wurden a) Einflüsse von nicht förderbarem Volumen und b) der Einfluss der Temperatur. Theoretisch sinkt die WC-Effizienz geometriebedingt durch die Verbindungskanäle der Kammern dieses 3 KS PCR Konzeptes um 6,4 % gegenüber einem PCR Konzept mit einer Kammer. Vergleicht man den theoretisch errechneten Rückgang der WC-Effizienz, 6,4 % mit dem über Experimente ermittelten, 5,6 %, zeigt sich, dass zum einen die über die Messungen ermittelte Effizienz im Erwartungsbereich liegt, zum anderen, dass das 3 KS PCR EFM nahe der theoretisch maximal zu erreichenden WC-Effizienz operiert.

In Abbildung 44 A) ist gezeigt, dass bei beiden Systemen der Übergang in die Plateauphase im gleichen Zyklus (22) stattfindet. Entscheidend ist, dass der Zyklus 22 im Blockzykler nach 63 Minuten 50 Sekunden, im 3 KS PCR EFM nach 52 Minuten 12 Sekunden erreicht

wird. Die Differenz von 11 Minuten 38 Sekunden entspricht 5 Zyklen in dem 3 KS PCR EFM. Für den Eintritt in die Plateauphase gibt es verschiedene Gründe^[120 S.106]. In diesem Fall ist zwischen zeitabhängigen (Effizienzurückgang der thermostabilen Polymerase) und zyklusabhängigen (Produktsättigung, schwindende Anzahl an Primern oder Nukleotiden) Einflüssen zu unterscheiden. Da der Eintritt in die Plateauphase zum gleichen Zyklus, nicht aber zum gleichen Zeitpunkt stattfindet, wird die Plateauphase durch zyklusbedingte Einflüsse eingeleitet.

6.5.4 Bestimmung der unteren Nachweisgrenze 3 KS PCR

Für die Charakterisierung der 3 KS PCR wurde in Kapitel 6.5.2 eine Verdünnungsreihe mit einer Konzentration von $1 * 10^1$ bis $1 * 10^6$ Targets pro 25 µl PCR Ansatz untersucht. Für die Bestimmung der unteren Nachweisgrenze sind Versuche mit einer Konzentration von $1 * 10^0$ Targets pro 25 µl prozessiert worden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt. Die Eingangskonzentration der gDNA konnte nicht in der qPCR ermittelt werden. Aus der $1 * 10^1$ gDNA Stammlösung ist für diese Versuche eine 1:10 Verdünnung erstellt worden, die Konzentration der gDNA ist damit zwischen $1 * 10^1$ und $1 * 10^0$ pro 25 µl.

Tabelle 11: Bestimmung der unteren Nachweisgrenze für gDNA der 3 KS PCR, Ergebnisse mit detektierten Prozesskontrollen sind unterstrichen.

Untere Nachweisgrenze		Versuchstag 1		Versuchstag 2	
		Blockzykler	3 KS PCR	Blockzykler	3 KS PCR
23S	L1	<u>$2,49 * 10^8$</u>	<u>$2,50 * 10^7$</u>	<u>$7,16 * 10^6$</u>	<u>$2,26 * 10^6$</u>
	R1		<u>$4,27 * 10^7$</u>		<u>$1,17 * 10^7$</u>
	R2		<u>$7,45 * 10^7$</u>		<u>$2,04 * 10^7$</u>
	N	<u>$5,05 * 10^8$</u>	<u>$8,38 * 10^6$</u>	<u>$2,01 * 10^7$</u>	<u>$3,08 * 10^7$</u>
PVL	L1...N	-	-	-	-
SCC1	L1	-	-	-	-
	R1		-		$7,15 * 10^5$
	R2		-		$1,22 * 10^5$
	N	-	-	-	-
nuc	L1	-	$2,24 * 10^4$	-	-
	R1		$4,48 * 10^6$		-
	R2		-		<u>$1,48 * 10^4$</u>
	N	-	-	-	<u>$3,48 * 10^4$</u>
mecA	L1	-	-	-	$2,05 * 10^6$
	R1		$1,43 * 10^7$		$4,77 * 10^5$
	R2		-		$2,31 * 10^6$
	N	-	-	-	-

In Tabelle 11 sind die Ergebnisse der Charakterisierung des 3 KS PCR EFM für die Bestimmung der unteren Nachweisgrenze für gDNA gezeigt. Unterstrichen sind die Ergebnisse, bei denen eine Kontamination festgestellt worden ist. Zu sehen ist, dass das Target 23S in allen Kontrollen (N) eine Kontamination aufweist. Diese Kontamination ist in gleicher Höhe quantifiziert wie die Versuche L1, R1 und R2. Daraus kann geschlossen werden, dass die generierten Signale nicht durch die zugegebene Menge an gDNA erzeugt werden, sondern dass sich hier das kontaminationsbedingte Grundrauschen, verursacht durch ein kontaminiertes Labor Kapitel 6.4.6, zeigt. Eine Charakterisierung des Targets 23S ist bei dieser Eingangskonzentration nicht möglich. Nicht gewertet ist auch das Ergebnis des Targets *nuc* vom Versuchstag 2 R2. Hier ist ebenfalls eine Kontamination quantifiziert worden die 2,5 mal größer ist als das generierte Signal im 3 KS PCR EFM. Unter Berücksichtigung dieser beiden Punkte kann konstatiert werden, dass bei einer theoretischen Eingangskonzentration von $1 \cdot 10^0$ Amplikons pro 25 μ l von 30 möglichen Ergebnissen 7 kontaminiert sind, diese werden nicht in die Auswertung einbezogen. Von den erwarteten Ergebnissen, 23 Ergebnisse, sind 8 Ergebnisse (~35 %) für die Auswertung nach den Kriterien Abbildung 40 zugelassen. Im Vergleich hierzu wurden bei den Versuchen mit einer Eingangskonzentration von $1 \cdot 10^1$ pro 25 μ l 15 Messungen durchgeführt, bei denen 2 mit einer Kontamination behaftet sind und nicht gewertet werden. Von den verbleibenden 13 Messungen ergeben alle (100 %) ein Signal im erwarteten Spektrum. Das Festlegen einer genauen Grenze (LoD) nach NCCLS^[124] ist aufgrund der geringen Anzahl der Messwerte nicht möglich. Die untere Nachweisgrenze ist jedoch auf eine Konzentration von etwa 10 Genomäquivalenten (Targets) pro 25 μ l PCR Ansatz festzulegen, da hier unabhängig vom untersuchten Gen in den Versuchen ein Nachweis von gDNA im 3 KS PCR EFM gegeben ist (Bezug auf 100 %). Für niedrigere Konzentrationen ist dieses Resultat nicht immer gegeben (Bezug auf ~35 %), da der Anteil an Versuchen ohne den Nachweis von PCR Produkt im Verhältnis zu Versuchen mit nachgewiesenem PCR Produkt steigt.

Das Target PVL ist in keinem der Versuche Tabelle 11 nachgewiesen. Ein Mangel an gDNA ist hier nicht anzuführen, da die anderen Gene zum Teil nachgewiesen worden sind. Daraus folgt, dass bei niedrigen gDNA Konzentrationen, um $1 \cdot 10^1$ Targets pro 25 μ l, das Gen PVL schlechter amplifiziert wird als die verbleibenden vier Gene.

6.6 Charakterisierung des Mikroarrays

Für eine Implementierung der Einzelfunktionen in ein Gesamtkonzept (Kapitel 7) ist es erforderlich, die Grenzen der Funktion 3 KS PCR in Kombination mit dem Mikroarray zu kennen. Eine für die Implementierung notwendige Charakterisierung der 3 KS PCR ist im Kapitel 6.5.2 erfolgt. Hier kann errechnet werden, wie viel PCR Produkt aus einer gegebenen Menge an gDNA Strängen erzeugt werden kann. In diesem Abschnitt wird die Menge an

PCR Produkt ermittelt, die notwendig ist, um bei einer Hybridisierung Signale auf dem Mikroarray auszulösen. Die Rahmenbedingungen der manuellen Prozessierung sind in Kapitel 6.4.5 festgelegt. Gesucht ist die Konzentration an PCR Produkt die bei einer Hybridisierung (Zeit: 60 min, Temperatur: 45 °C) Signale, durch die Sonden eines PCR Produktes mit einer Intensität größer 1000, generiert.

6.6.1 Versuchsdurchführung der Mikroarray Charakterisierung

Für die Charakterisierung des Mikroarrays sind die 3 KS PCR Produkte und die PCR Produkte der Kontrolle P (Blockzykler), Kapitel 6.4.3, der Konzentrationsreihe aus Kapitel 6.5.2 neben der qPCR auch auf dem Mikroarray prozessiert worden. Durch die Quantifizierung der qPCR und die Verdünnung des PCR Produktes (1/ 3,25 PCR Produkt [µl]/ Hyb. Puffer [µl]) mit Hybridisierungspuffer, ist die Konzentration der PCR Produkte in der Hybridisierung zu berechnen. Die Reagenzien und Prozessierungsschritte für den Mikroarray sind in Kapitel D und E aufgeführt.

6.6.2 Ergebnis der Mikroarray Charakterisierung

Zusätzlich zu den bekannten Ausgleichsgeraden aus Kapitel 6.5.2 ist in Abbildung 45 horizontal, nach Farbe (PCR System) und Strichart (Forwardprimer ‘--’, Reverseprimer ‘--’) getrennt, der ermittelte Threshold an PCR Produkt gezeigt, der benötigt wird um Signale an den Sonden nach Kapitel 6.4.5 zu generieren. In Tabelle 12 sind die Ergebnisse der Mikroarray Charakterisierung zusammengefasst.

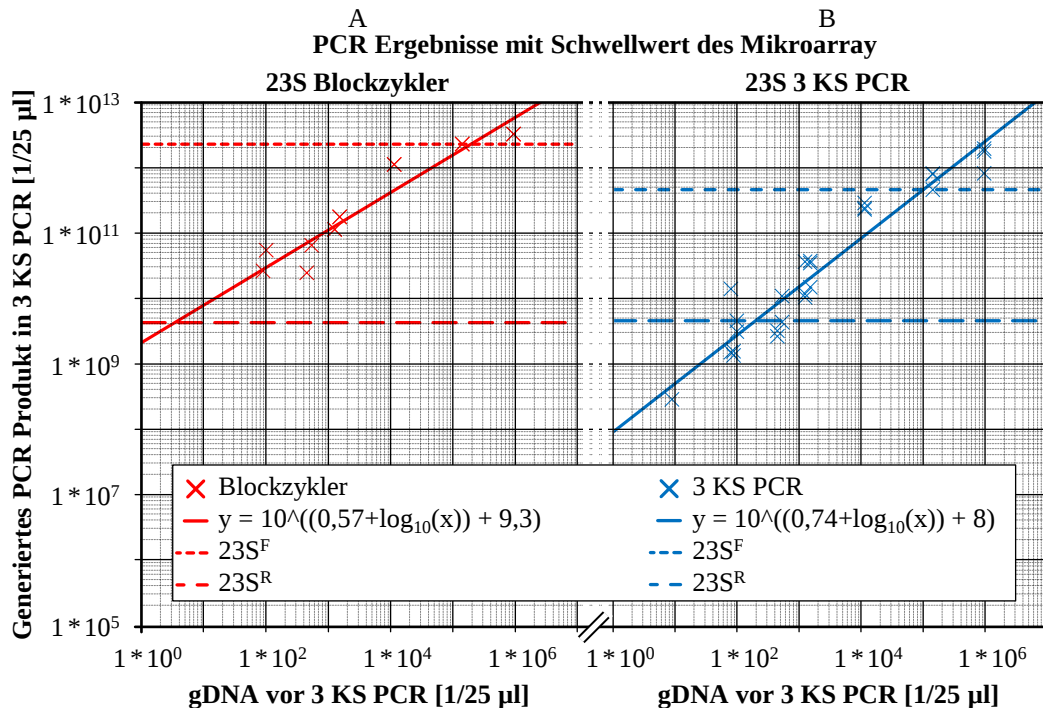


Abbildung 45: Verdünnungsreihe gDNA Eingangskonzentration $1 \cdot 10^1$ bis $1 \cdot 10^6$ Targets pro 25 µl; Schwellwertermittlung der Mikroarray Sonden $23S^F$ und $23S^R$ des Gens 23S; Am Beispiel A: gDNA zu PCR Produkt Blockzykler; B: gDNA zu PCR Produkt 3 KS PCR.

Tabelle 12: PCR Produkt pro 25 µl aus 3 KS PCR zu Mikroarray Intensität.

Gen	3 KS PCR		Blockzykler	
	Amplikons/ 25 µl	Intensität Sonden a/ b	Amplikons/ 25 µl	Intensität Sonden a/ b
$23S^F$	$(4,60 \pm 0,64) \cdot 10^{11}$	16221 ± 545	$(2,28 \pm 0,14) \cdot 10^{12}$	1458 ± 24
$23S^R$	$(4,59 \pm 0,71) \cdot 10^9$	1164 ± 24	$(4,30 \pm 0,05) \cdot 10^9$	1115 ± 40
$PVL lukS^F$	$(5,69 \pm 2,58) \cdot 10^{10}$	2573 ± 32	$(2,84 \pm 1,23) \cdot 10^{11}$	8790 ± 211
$PVL lukF^F$	$(1,21 \pm 0,46) \cdot 10^{11}$	1425 ± 89	-	-
$SCC1^R$	$(1,71 \pm 0,13) \cdot 10^{10}$	1066 ± 8	$(3,37 \pm 0,30) \cdot 10^{10}$	1498 ± 16
$nuc S^F$	$(3,86 \pm 0,11) \cdot 10^{10}$	1938 ± 16	$(4,94 \pm 0,18) \cdot 10^{10}$	2841 ± 40
$nuc AS^F$	$(3,86 \pm 0,11) \cdot 10^{10}$	1368 ± 32	$(4,94 \pm 0,18) \cdot 10^{10}$	2263 ± 16
$mecA^F$	$(8,92 \pm 0,75) \cdot 10^{10}$	1107 ± 32	-	-

Bei der Charakterisierung des Mikroarrays war es nicht möglich alle verfügbaren Sonden zu hybridisieren. Für eine erfolgreiche Detektion des caMRSA8 über den Mikroarray muss für jedes Gen entweder der Forward (F)- oder der Reverse (R) Primer über den Mikroarray detektiert werden; dies ist für die fünf untersuchten Gene der Fall.

In Tabelle 12 korreliert mit Ausnahme der Sonden $23S^F$, $PVL lukF^F$ und $mecA^F$, die Menge an PCR Produkt mit der gemessenen Intensität der Mikroarray Sonde im Vergleich

3 KS PCR zu Blockzykler. Abhängig von der Mikroarraysonde erzeugt mehr PCR Produkt ein stärkeres Signal der Sonden. Festgehalten werden kann, dass $4 \cdot 10^9$ bis $4 \cdot 10^{11}$ Amplikons (PCR Produkt) pro 25 μ l nach der 3 KS PCR benötigt werden, um ein Signal bei einer Hybridisierungszeit von einer Stunde und einer Temperatur von 45 °C auf dem Mikroarray generieren zu können. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den gemittelten Werten der Verdünnungsreihe der Targets PVL, *SCC1*, *nuc* und *mecA*, entspricht das einer gDNA Eingangskonzentration von $8 \cdot 10^4$ bis $7 \cdot 10^5$ Targets pro 25 μ l. Dies ist das LoD (Limit of Detection) für die Kombination der 3 KS PCR verknüpft mit dem Mikroarray und dem Assay mit den GE PCR Beads als Basis.

Mit der Charakterisierung des Mikroarrays und der Charakterisierung der 3 KS PCR aus Kapitel 6.5.2 ist es nun möglich, die Anforderungen an die Einzelfunktionen - 3 KS PCR und Mikroarray - für eine Integration in ein Gesamtsystem, Kapitel 7, festzulegen. Die Charakterisierung der Funktionen ist damit abgeschlossen.

6.7 Optimierung der 3 KS PCR

In der bisherigen Abhandlung wurde der Versuchsaufbau und das 3 KS PCR EFM untersucht. In diesem Teil der Arbeit liegt der Fokus auf der Optimierung bzw. Untersuchung von:

- Prozesslaufzeit
- Pneumatische Ansteuerung
- Oberflächenoptimierung
 - Additive (Tween)
 - Beschichtungen (PTFE, Parylene)
- Alternative Materialien
- Alternative PCR Reagenzien (Promega)

6.7.1 Reduzierung der Prozesslaufzeit

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, den zeitlichen Vorteil eines drei Kammer Konzeptes dem bisherigen Konzept mit einem Ein Kammer System gegenüberzustellen. Der entscheidende Faktor, der zur Beschleunigung des PCR Prozesses beiträgt, ist die Verkürzung der Heiz-/Kühlzeiten des PCR Systems. Dies erfolgt durch eine hardwareseitige Charakterisierung und Optimierung des 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters und des Messstandes, Kapitel 6.3. In diesem Abschnitt werden die verbleibenden Möglichkeiten, die Haltezeiten auf den entsprechenden Temperaturen, optimiert. Das Ziel soll sein, die PCR Prozesszeit ohne

quantitative Einbußen am Arbeitspunkt $1 \cdot 10^2$ bis $1 \cdot 10^3$ Eingangstargets gDNA pro 25 µl in unter 30 Minuten zu prozessieren. Für die Versuche liegt das Protokoll Kapitel 6.4.4 zugrunde. Gezeigt werden die kürzesten Protokolle jeweils für das einseitige- und das zweiseitige Heizkonzept, Kapitel 6.2, der Prozessierungsstation. Die Optimierung erfolgte empirisch, es sind folgende Kriterien zu erfüllen:

- Für die Denaturierung der PCR Produkte ist das Erreichen der Temperatur in der PCR Kammer, fluidisches System, von 90 °C ausreichend. Diese Temperatur ist nach 14 Sekunden im einseitigen- und nach 7 Sekunden im zweiseitigem Konzept bei einer Starttemperatur von 72 °C (Elongationstemperatur) erreicht.
- Die Hybridisierungsphase (Phase 2 und 3, Abbildung 36) besteht zum einen aus einer Heizphase (~18 Sekunden), die zeitlich nicht weiter zu reduzieren ist. Zum anderen aus der Haltezeit, die benötigt wird, damit sich die Primer an die Targets anlagern können (12 Sekunden). Hier wird durch schrittweise Reduzierung der Haltezeit ein lokales Optimum ermittelt.
- In der Elongationsphase (Phase 4 und 5, Abbildung 36) werden die hybridisierten Primer durch die Polymerase verlängert. Die Polymerase synthetisiert allerdings auch unter nicht optimalen Temperaturbedingungen^[120 S.92; 125 S.520]. Die Haltezeit ist hier schrittweise reduziert worden, um ein lokales Optimum zu finden.

Tabelle 13: Protokolle der Reduzierung der Prozesszeit der 3 KS PCR.

3 KS PCR Protokoll		Standard Protokoll EFM [s]	Thermische Kontaktierung von	
			einer Seite [s]	zwei Seiten [s]
Initiale Denaturierung		180	180	150
35 Zyklen	Denaturierung	20	14	7
	Hybridisierung	30	22	23
	Elongation	76	11	6
Finale Elongation		60	60	60
Σ Prozesszeit		82 Minuten	36 Minuten	29 Minuten
		45 Sekunden	40 Sekunden	45 Sekunden

Die Standardproben/ Kontrollen (P, N, ÜL1 ...) sind ebenfalls mit den reduzierten Zeiten prozessiert worden, z.B. Elongation von 76 Sekunden auf 11 Sekunden entspricht Reduktion der Haltezeit von 72 Sekunden auf 8 Sekunden im Blockzykler. Für die Interpretation der Ergebnisse, Tabelle 14 und Tabelle 15, werden die Messungen gegen die Konzentrationsreihe Kapitel 6.5.2 abgeglichen, Abbildung 46.

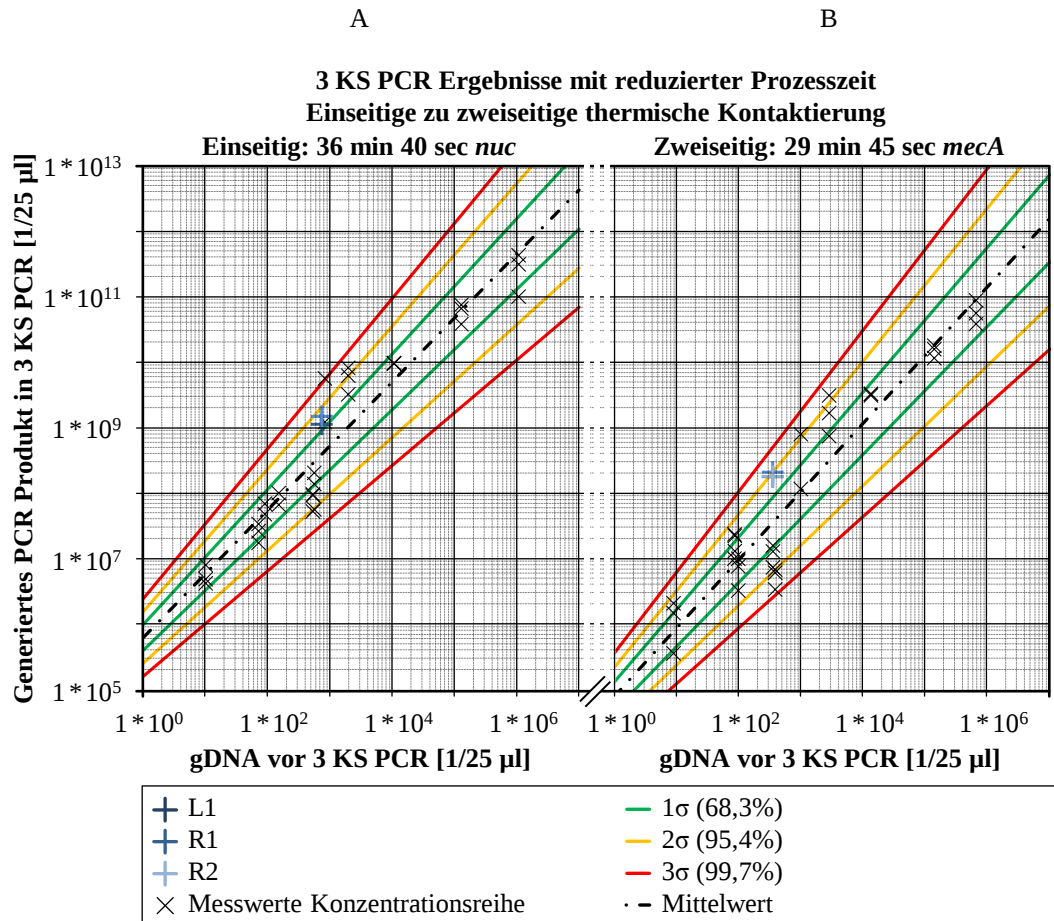


Abbildung 46: 3 KS PCR Verdünnungsreihe, gDNA Eingangskonzentration $1 \cdot 10^1$ bis $1 \cdot 10^6$ Targets pro 25 µl mit σ , 2σ und 3σ der Ausgleichsgeraden; Reduzierung der Prozesszeit zweiseitiges Heizkonzept; Am Beispiel A: gDNA zu PCR Produkt, Gen *nuc*; B: gDNA zu PCR Produkt, Gen *mecA*.

Tabelle 14: Reduzierung Prozesszeit, einseitige thermische Kontaktierung.

36 Minuten 40 Sekunden	gDNA Targets/ 25 µl	Blockzykler Produkt/ 25µl	σ	3 KS PCR Produkt/ 25µl	σ
23S	$6,20 \cdot 10^2$	$4,47 \cdot 10^{10}$	-2σ	$1,47 \cdot 10^{10}$	$+1\sigma$
				$1,16 \cdot 10^{10}$	$+1\sigma$
PVL	$1,29 \cdot 10^2$	$2,02 \cdot 10^8$	$>-3\sigma$	$1,22 \cdot 10^9$	$+1\sigma$
				$3,05 \cdot 10^9$	$+2\sigma$
SCC1	$4,45 \cdot 10^2$	$1,24 \cdot 10^7$	-2σ	$4,21 \cdot 10^7$	$+1\sigma$
				$6,72 \cdot 10^7$	$+1\sigma$
<i>nuc</i>	$7,36 \cdot 10^2$	$1,15 \cdot 10^8$	-2σ	$1,15 \cdot 10^9$	$+2\sigma$
				$1,51 \cdot 10^9$	$+2\sigma$
<i>mecA</i>	$5,24 \cdot 10^2$	$1,17 \cdot 10^7$	-2σ	$5,24 \cdot 10^7$	$+1\sigma$
				$1,62 \cdot 10^8$	$+2\sigma$

Aus Tabelle 14 können folgende Schlüsse gezogen werden:

- Die quantifizierten PCR Produkte der 3 KS PCR liegen für alle Targets über den entsprechenden Ausgleichsgeraden.
- Die Ergebnisse des Blockzyklers
 - liegen für alle Targets unterhalb der entsprechenden Ausgleichsgeraden.
 - weisen für das Target PVL einen negativen Einfluss auf, da die Quantifizierung einen Messwert mit einer Abweichung $>-3\sigma$ ergab.

Per Definition Kapitel 6.5.2 ist durch die Reduzierung der Prozesszeit auf 36 Minuten 40 Sekunden mit dem einseitigen thermischen Heizkonzept kein negativer Einfluss im 3 KS PCR EFM nachzuweisen, eine Verkürzung der Prozesszeit führt nicht zum Rückgang der in der 3 KS PCR generierten Produktmenge. Eine Reduzierung der Haltezeiten hat auf die PCR Produktbildung im Blockzykler einen negativen Einfluss.

In Tabelle 15 sind die Ergebnisse des am schnellsten prozessierten 3 KS PCR Versuches aufgezeigt.

Tabelle 15: Reduzierung Prozesszeit, zweiseitige thermische Kontaktierung.

29 Minuten 45 Sekunden	gDNA Targets/ 25 µl	Blockzykler Produkt/ 25µl	σ	3 KS PCR Produkt/ 25µl	σ
23S	$4,00 * 10^2$	$9,99 * 10^9$	$>-3\sigma$	$2,62 * 10^9$	-2σ
				$2,72 * 10^9$	-2σ
PVL	$3,08 * 10^2$	$2,76 * 10^9$	$+3\sigma$	$9,64 * 10^8$	$+2\sigma$
				$6,7 * 10^8$	$+2\sigma$
				$1,08 * 10^9$	$+3\sigma$
SCC1	$3,49 * 10^2$	$3,66 * 10^7$	-1σ	$3,58 * 10^7$	$+1\sigma$
				$2,49 * 10^7$	-1σ
				$6,63 * 10^6$	-2σ
nuc	$4,09 * 10^2$	$1,12 * 10^9$	$>+3\sigma$	$5,88 * 10^8$	$+2\sigma$
				$4,20 * 10^8$	$+1\sigma$
				$3,16 * 10^8$	$+1\sigma$
mecA	$3,52 * 10^2$	$2,37 * 10^8$	$>+3\sigma$	$1,82 * 10^8$	$+2\sigma$
				$2,14 * 10^8$	$+3\sigma$
				$1,84 * 10^8$	$+2\sigma$

Nach den Ergebnissen Tabelle 15 können folgende Aussagen getroffen werden:

- Die Ergebnisse der 3 KS PCR und des Blockzyklers liegen verteilt sowohl über als auch unter den entsprechenden Mittelwerten der Ausgleichsgeraden.

- Die Targets PVL und *mecA* zeigen in den 3 KS PCR Experimenten Ergebnisse auf, welche nahe oder über der Grenze der 3 fachen Standardabweichung zu finden sind, Abbildung 46.
- Die Targets PVL, *nuc* und *mecA* zeigen eine positive, das Target 23S in Bezug auf die Reduzierung der Zeiten eine negative Resonanz in dem 3 KS PCR EFM.

Grundsätzlich ist eine Realisierung der Multiplex-PCR in unter 30 min Prozesslaufzeit auf dem 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster mit der Prozessierungsstation mit zweiseitiger thermischer Kontaktierung möglich. Bei 29 Minuten und 45 Sekunden PCR Laufzeit ist kein negativer Einfluss auf die generierte Menge an PCR Produkt der fünf untersuchten Gene im Multiplexansatz, prozessiert auf dem 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster, nachzuweisen. Die Umsetzung der PCR, mit der Amplifizierung von 5- 7 Zehnerpotenzen mehr PCR Produkt zu gDNA Targets, bei einer Eingangskonzentration gDNA von 300- 400 Targets, ist damit in unter 30 Minuten erbracht.

6.7.2 Analyse der pneumatischen Ansteuerung

Die pneumatische Ansteuerung der 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster, hergestellt durch Fräsen, beruht auf einer Auslenkzeit der TPU Membran in den PCR Kammern von etwa 2 Sekunden. Eine Auslenkzeit der Membran von wenigen Millisekunden bewirkt in Verbindung mit einer rauen Oberfläche der gefrästen Einzelfunktionsmuster eine Schaumbildung beim Pumpen, wie in Vorversuchen ermittelt wurde. Die Oberflächenrauigkeit der gefrästen Einzelfunktionsmuster beträgt 1,7 μm , im Gegensatz zu 0,1 μm von spritzgegossenen Oberflächen^[16]. Da zum einen die Einzelfunktionsmuster für diese Charakterisierung im Spritzgussverfahren hergestellt sind und das pneumatische Ansteuerungskonzept mit Regulierung der Auslenkzeit von etwa 2 Sekunden fehleranfällig ist, wurden Untersuchungen auf den Vorteil einer langsamen Aktuierung der Membran in Verbindung mit spritzgegossenen Systemen durchgeführt, Abbildung 47. Ohne zusätzliche pneumatische Widerstände und Kapazitäten ist die Auslenkzeit der Membran in erster Linie durch die Schaltzeit der Steuerventile, durch den Durchmesser und das Volumen der Steuerleitungen und auch durch das zu befördernde Reaktionsvolumen (25 μl) begrenzt. Dies führt zu einer Auslenkzeiten der TPU Membran von wenigen (20- 50) Millisekunden. In Abbildung 47 sind die Ergebnisse mit einer Auslenkzeit von etwa 2 Sekunden in Verbindung mit 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster, hergestellt mit dem Spritzgussverfahren, gezeigt.

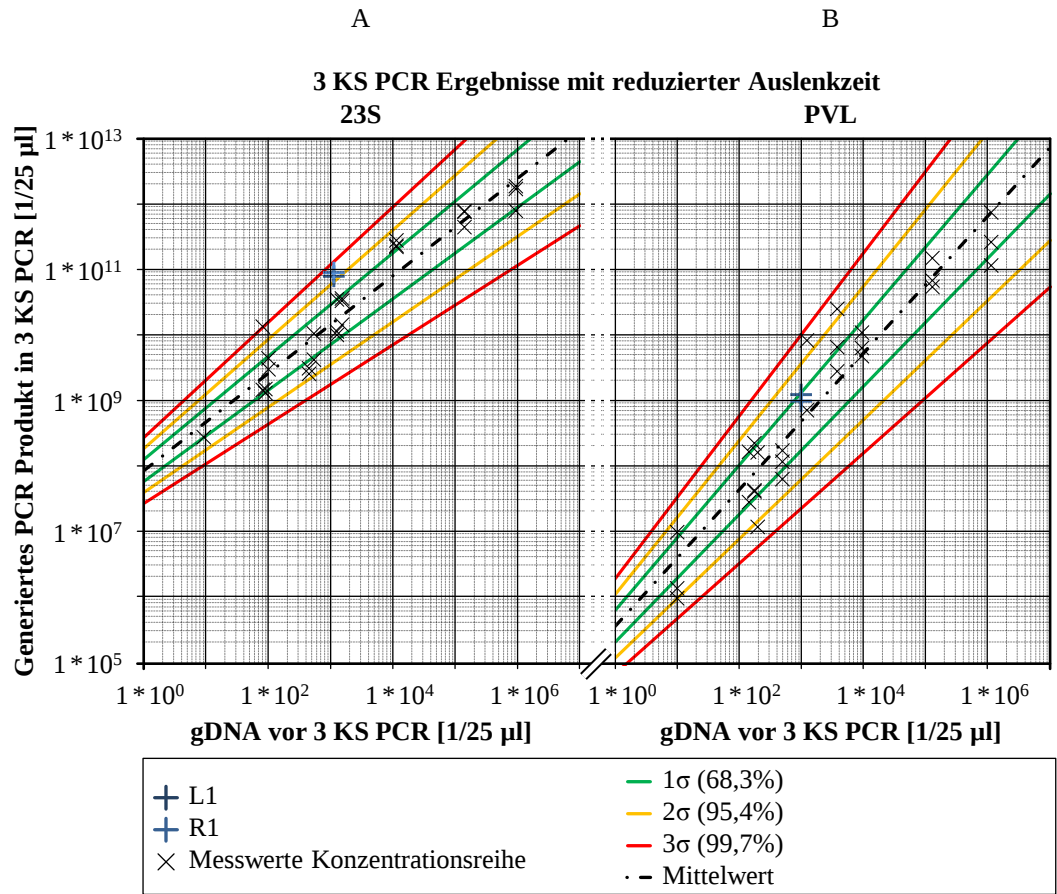


Abbildung 47: 3 KS PCR Verdünnungsreihe, gDNA Eingangskonzentration $1 \cdot 10^1$ bis $1 \cdot 10^6$ Targets pro 25 µl mit σ , 2σ und 3σ der Ausgleichsgeraden; Optimierung der pneumatischen Ansteuerung; Am Beispiel A: gDNA zu PCR Produkt, Gen 23S; B: gDNA zu PCR Produkt, Gen PVL.

Tabelle 16: Charakterisierung TPU Membran mit Auslenkzeit von etwa 2 Sekunden.

Auslenkzeit ~2 Sekunden	gDNA Targets/ 25 µl	3 KS PCR Produkt/ 25 µl	σ
23S	$1,11 \cdot 10^3$	$8,20 \cdot 10^{10}$	+3σ
		$9,35 \cdot 10^{10}$	+3σ
PVL	$9,84 \cdot 10^2$	$1,29 \cdot 10^9$	+1σ
		$1,04 \cdot 10^9$	+1σ
SCC1	$9,50 \cdot 10^2$	$9,79 \cdot 10^8$	+2σ
		$9,21 \cdot 10^8$	+2σ
nuc	$1,10 \cdot 10^3$	$2,52 \cdot 10^9$	+2σ
		$2,50 \cdot 10^9$	+2σ
mecA	$1,06 \cdot 10^3$	$5,19 \cdot 10^8$	+2σ
		$5,20 \cdot 10^8$	+2σ

In Tabelle 16 sind die Untersuchungsergebnisse der Auslenkzeit der TPU Membran gezeigt.

- Die Ergebnisse der 3 KS PCR liegen für alle Targets über den entsprechenden Ausgleichsgeraden.
- Das Target 23S zeigt eine positive Resonanz auf eine langsamere Auslenkung der TPU Membran.

Es ist ersichtlich, dass eine langsamere Aktuierung (~2 Sekunden) der TPU Membran einen positiven Einfluss auf die generierte Menge an PCR Produkt im 3 KS PCR EFM hat.

Für die Charakterisierung der 3 KS PCR in dieser Arbeit ist die pneumatische Ansteuerung mit einer Auslenkzeit von wenigen Millisekunden gewählt worden, obwohl die Ergebnisse Tabelle 16 darauf hinweisen, dass eine langsamere Auslenkzeit der Membran zu einer größeren Ausbeute an PCR Produkt auf dem Einzelfunktionsmuster führt. Die Begründung liegt in der nicht verlässlich einstellbaren Ansteuerung. Die unzuverlässige Kalibrierung der Durchflussventile^[126] verbunden mit Verschmutzungen in den pneumatischen Steuerleitungen, verursachen Schwankungen in der Aktuierungszeit der TPU Membran von bis zu 50 %.

6.7.3 Analyse von Additiven, Tensid Tween®80

In verschiedensten Veröffentlichungen^[41, 42, 17] werden Additive zur optimierten Prozessierung auf dem LoC System hinzugegeben. Ein Bestandteil der PCR Beads von GE ist das Additiv BSA, eine PCR gänzlich ohne Additive kann mit dieser beadbasierten Lösung deshalb nicht durchgeführt werden. Zusätzlich zu dem im Bead gebundenen BSA ist im Standardansatz, Tabelle 6, das Additiv Tween®80 hinzugegeben. Polysorbat80 (Tween®80) gehört in die Gruppe der Tenside. In Flüssigkeit gelöst tendieren Tenside dazu, sich mit dem hydrophoben Molekülteil der nicht wässrigen Phase zuzuwenden. Der hydrophile Teil richtet sich zur Flüssigkeit hin aus^[127]. Dadurch entsteht ein dünner Tensidfilm zwischen dem LoC Material und des PCR Reaktionsvolumens, der negative Oberflächeneffekte reduzieren kann. BSA ist ein Albumin, das ebenfalls zur Reduzierung von Oberflächeneinflüssen beiträgt. In Lab on a Chip Systemen wird BSA hauptsächlich zur Absättigung von proteinbindenden Strukturen eingesetzt. Es trägt dazu bei, die negativen Einflüsse auf die Polymerase und die Nukleinsäuren zu reduzieren^[128, 129].

Im ersten Schritt werden Untersuchungen ohne die Zugabe des Tensids Tween durchgeführt, Abbildung 48 und Tabelle 17.

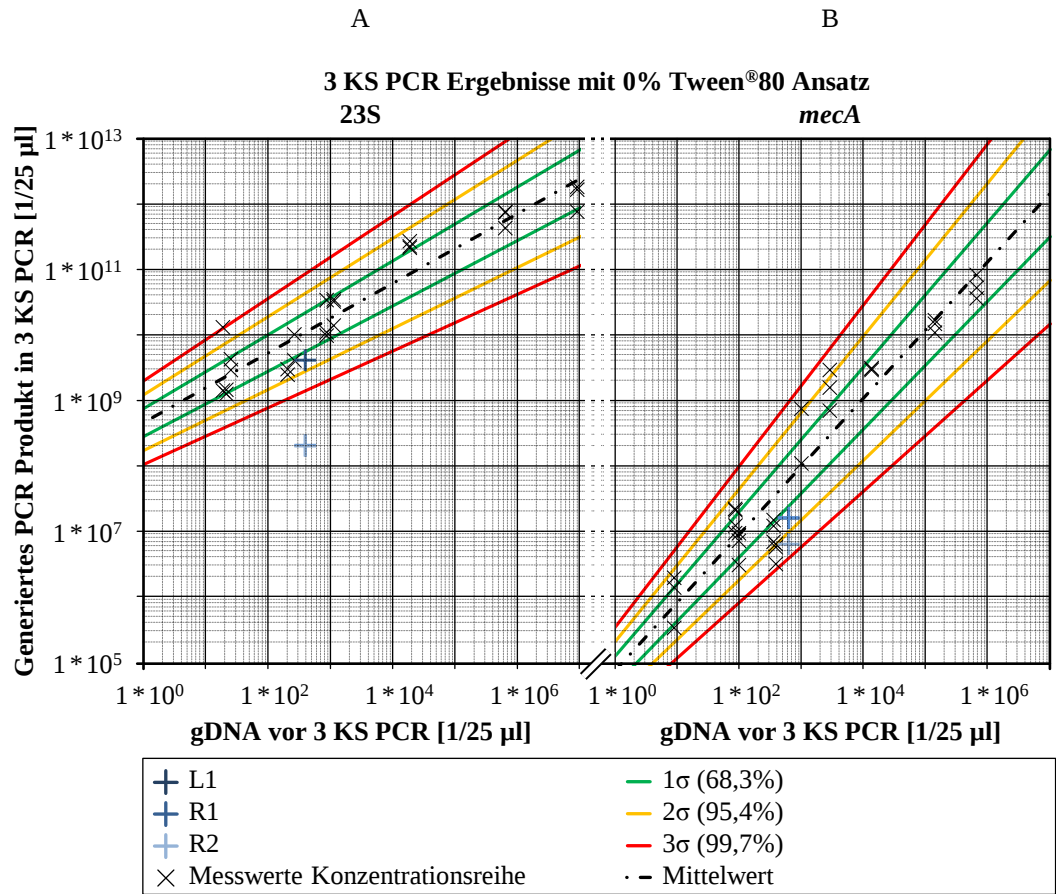


Abbildung 48: 3 KS PCR Verdünnungsreihe, gDNA Eingangskonzentration $1 \cdot 10^1$ bis $1 \cdot 10^6$ Targets pro 25 µl mit σ , 2σ und 3σ der Ausgleichsgeraden; Versuchsreihe ohne Tween®80; Am Beispiel A: gDNA zu PCR Produkt, Gen 23S; B: gDNA zu PCR Produkt, Gen *mecA*.

Tabelle 17: PCR ohne Zugabe von Tween®80.

Kein Tween®80	gDNA Targets/ 25 µl	Blockzykler Produkt/ 25µl	σ	3 KS PCR Produkt/ 25µl	σ
23S	$7,07 \cdot 10^2$	$2,37 \cdot 10^{11}$	$+2\sigma$	$4,41 \cdot 10^9$	-2σ
				$2,22 \cdot 10^8$	$->3\sigma$
				$2,18 \cdot 10^8$	$->3\sigma$
PVL	$5,90 \cdot 10^2$	$6,50 \cdot 10^8$	$+3\sigma$	$1,33 \cdot 10^8$	-1σ
				$5,79 \cdot 10^7$	-2σ
				$1,56 \cdot 10^8$	-1σ
SCC1	$7,54 \cdot 10^2$	$3,79 \cdot 10^7$	-1σ	$1,24 \cdot 10^7$	-2σ
				$1,24 \cdot 10^7$	-2σ
				$1,29 \cdot 10^7$	-2σ
nuc	$8,54 \cdot 10^2$	$3,43 \cdot 10^8$	$+1\sigma$	$1,97 \cdot 10^8$	-2σ
				$3,94 \cdot 10^7$	-3σ
				$3,23 \cdot 10^7$	$->3\sigma$
...	...				

Kein Tween®80	gDNA Targets/ 25 µl	Blockzykler Produkt/ 25µl	σ	3 KS PCR Produkt/ 25µl	σ
<i>mecA</i>	$6,24 * 10^2$	$1,24 * 10^7$	-2σ	$1,73 * 10^7$	-2σ
				$1,76 * 10^7$	-2σ
				$6,94 * 10^6$	-3σ

In Tabelle 17 sind die PCR Ergebnisse der Experimente ohne Tween®80 Zugabe aufgeführt. Es zeigt sich, dass:

- die Ergebnisse der 3 KS PCR für alle Targets unter den entsprechenden errechneten Mittelwerten, Kapitel 6.5.2, liegen.
- die Targets 23S und *nuc* eine deutlich negative Resonanz in der PCR auf dem Einzelfunktionsmuster ohne die Zugabe von Tween®80 haben.
- die Ergebnisse des Blockzyklers um die Ausgleichsgeraden schwanken, das Target PVL zeigt eine positive Reaktion auf die Reduzierung des Tween®80.

Das im GE PCR Bead gebundene Additiv BSA allein reicht nicht aus, um negative Effekte im 3 KS PCR EFM beseitigen zu können. Die Reduzierung von Einflüssen, zurückzuführen auf die PCR Kammer-Oberfläche, durch weitere Additiven wie Tween®80 ist notwendig.

Es stellt sich die Frage, ob durch eine Erhöhung der Tweenkonzentration eine Verbesserung der PCR erzielt werden kann. Dafür ist die Tweenkonzentration von einer 5 prozentigen auf eine 10 prozentige Lösung erhöht worden, Abbildung 49, Tabelle 18.

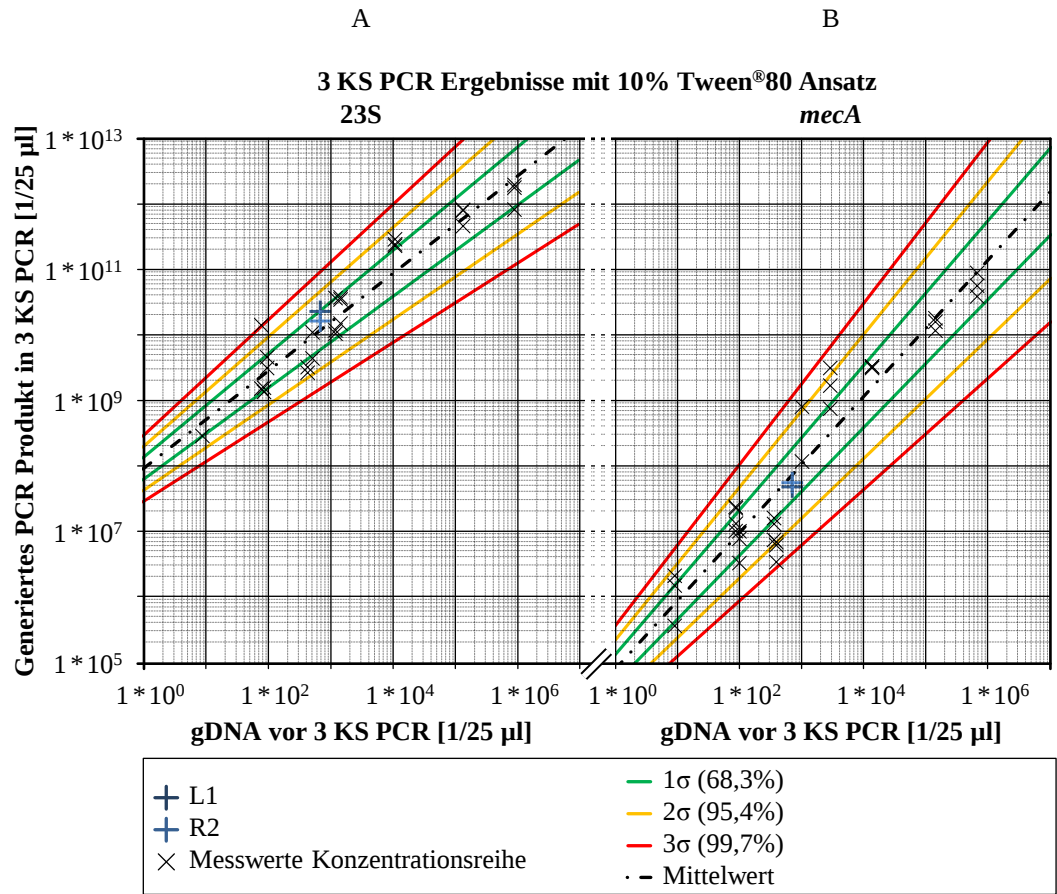


Abbildung 49: 3 KS PCR Verdünnungsreihe, gDNA Eingangskonzentration $1 \cdot 10^1$ bis $1 \cdot 10^6$ Targets pro 25 µl mit σ , 2σ und 3σ der Ausgleichsgeraden; Versuchsreihe mit 10 % Tween®80; Am Beispiel A: gDNA zu PCR Produkt, Gen 23S; B: gDNA zu PCR Produkt, Gen *mecA*.

Tabelle 18: PCR mit 10 prozentiger Zugabe von Tween®80.

10 % Tween	gDNA Targets/ 25 µl	Blockzykler Produkt/ 25µl	σ	3 KS PCR Produkt/ 25µl	σ
23S	$7,07 \cdot 10^2$	$2,00 \cdot 10^{11}$	$+2\sigma$	$2,29 \cdot 10^{10}$	$+1\sigma$
				$1,64 \cdot 10^{10}$	$+1\sigma$
PVL	$5,65 \cdot 10^2$	$8,20 \cdot 10^8$	$+>3\sigma$	$3,50 \cdot 10^8$	$+1\sigma$
				$8,54 \cdot 10^8$	$+2\sigma$
SCC1	$7,22 \cdot 10^2$	$7,72 \cdot 10^7$	-1σ	$3,34 \cdot 10^7$	-1σ
				$4,30 \cdot 10^7$	-1σ
nuc	$1,15 \cdot 10^3$	$4,42 \cdot 10^8$	$+1\sigma$	$4,26 \cdot 10^8$	-1σ
				$4,97 \cdot 10^8$	-1σ
mecA	$6,98 \cdot 10^2$	$2,99 \cdot 10^7$	-1σ	$4,84 \cdot 10^7$	-1σ
				$5,62 \cdot 10^7$	-1σ

Tabelle 18 fasst die Ergebnisse der Versuche mit einer erhöhten Tweenkonzentration (10 %) zusammen.

- Die Ergebnisse der 3 KS PCR und des Blockzyklers liegen verteilt über und unter den entsprechenden Ausgleichsgeraden.

Es ist hier gezeigt, dass eine Erhöhung der Tweenkonzentration auf eine 10 prozentige Lösung keinen positiven Einfluss auf die PCR in dem 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster hat.

6.7.4 Analyse der Beschichtung der TPU Membran

Eine weitere Möglichkeit, den Einfluss der Materialoberfläche zu minimieren, ist der Einsatz von Beschichtungen. In Kapitel 5.3.2 ist ein Verfahren gezeigt, das die Möglichkeit einer Beschichtung der TPU Membran bietet. Aus Kapitel 6.5.2 ist zu entnehmen, dass alle Targets, außer 23S, in Bezug auf die generierte Menge an PCR Produkt im Vergleich Blockzykler zum 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster übereinstimmen. Um den Einfluss der Beschichtung der TPU Membran zeigen zu können, müssen die Experimente ohne die Zugabe des Tensids Tween durchgeführt werden. Für das Feststellen eines Einflusses durch die beschichtete TPU, ist der Vergleich der Ergebnisse zu Tabelle 17 zu ziehen.

6.7.4.1 Parylene Beschichtung der TPU Membran

In Abbildung 50 sind die Ergebnisse der 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster mit einer Beschichtung der TPU Membran mittels Parylene gezeigt.

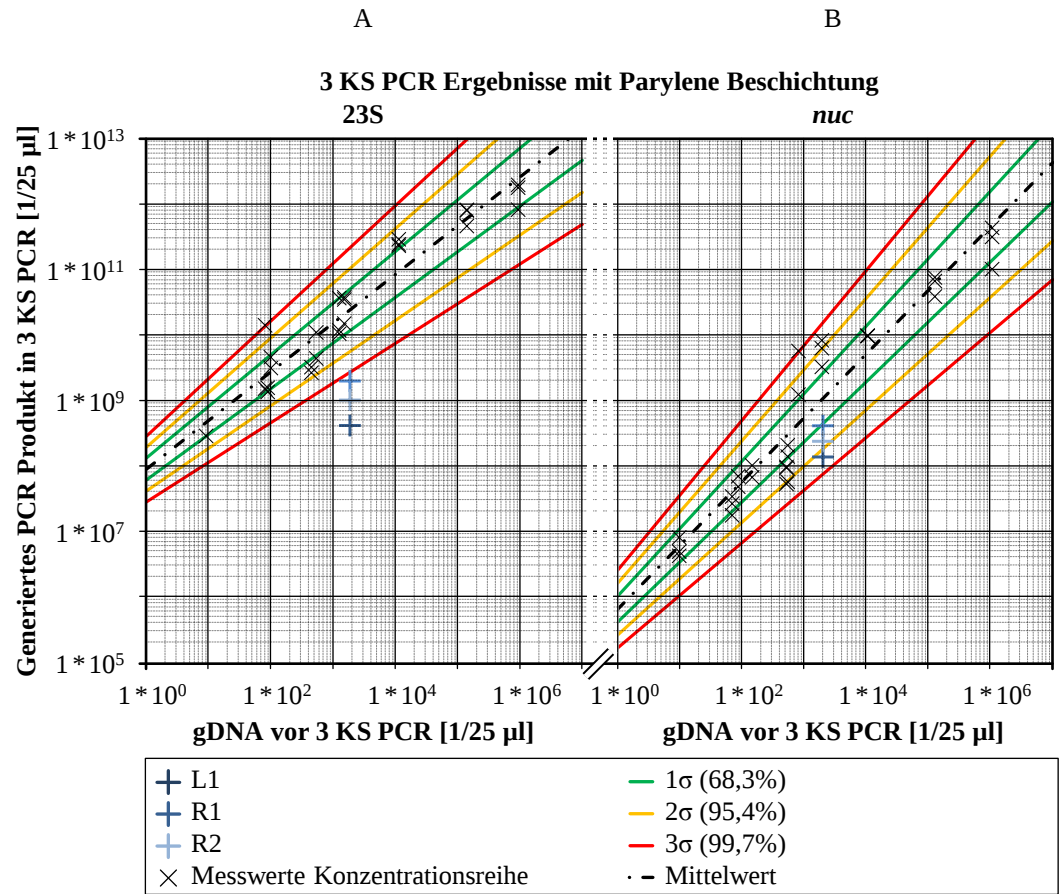


Tabelle 19: TPU Membran mit Parylene Beschichtung.

Parylene	gDNA Targets/ 25 µl	3 KS PCR Produkt/ 25µl	σ
23S	$1,85 \cdot 10^3$	$4,15 \cdot 10^8$	$>-3\sigma$
		$1,98 \cdot 10^9$	$>-3\sigma$
		$1,01 \cdot 10^9$	$>-3\sigma$
PVL	$3,13 \cdot 10^3$	$1,34 \cdot 10^9$	-1σ
		$1,13 \cdot 10^9$	-1σ
		$5,73 \cdot 10^8$	-1σ
SCC1	$2,04 \cdot 10^3$	$3,74 \cdot 10^7$	-2σ
		$1,65 \cdot 10^8$	-1σ
		$1,01 \cdot 10^8$	-1σ
nuc	$2,04 \cdot 10^3$	$1,38 \cdot 10^8$	-3σ
		$4,13 \cdot 10^8$	-2σ
		$2,40 \cdot 10^8$	-2σ
...	...		

Parylene	gDNA Targets/ 25 µl	3 KS PCR Produkt/ 25µl	σ
<i>mecA</i>	$2,30 * 10^3$	$1,56 * 10^8$	-1σ
		$2,48 * 10^8$	-1σ
		$1,82 * 10^8$	-1σ

In Tabelle 19 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe von 3 KS PCR Einzelfunktionsmustern mit einer Parylene Beschichtung der TPU Membran gezeigt. Es können folgende Aussagen getroffen werden:

- Die Ergebnisse der 3 KS PCR liegen für alle Targets unter den entsprechenden errechneten Mittelwerten der jeweiligen Targets.
- Die Targets 23S und *nuc* zeigen einen deutlichen Rückgang an generiertem PCR Produkt gegenüber dem Standard, Kapitel 6.5.2.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Versuche mit Parylene beschichteten 3 KS PCR Einzelfunktionsmustern und einem Ansatz ohne die Zugabe des Tensid Tween schlechtere Ergebnisse liefern als der Standard, Kapitel 6.5.2. Zusätzlich kann, werden diese Ergebnisse mit denen aus Tabelle 17 verglichen, festgehalten werden, dass sich beide Versuchsreihen vergleichbar schlecht gegenüber dem Standard darstellen. Über die Beschichtung der TPU mittels Parylene ist keine Verbesserung der Einzelfunktionsmuster in Bezug auf das quantifizierte PCR Produkt zu erzeugen.

6.7.4.2 PTFE Beschichtung der TPU Membran

Des Weiteren wurde eine Beschichtung der TPU mit PTFE untersucht. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 51 dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde auch in dieser Versuchsreihe das Tensid Tween nicht in den PCR Ansatz hinzugegeben, sondern mit Wasser substituiert.

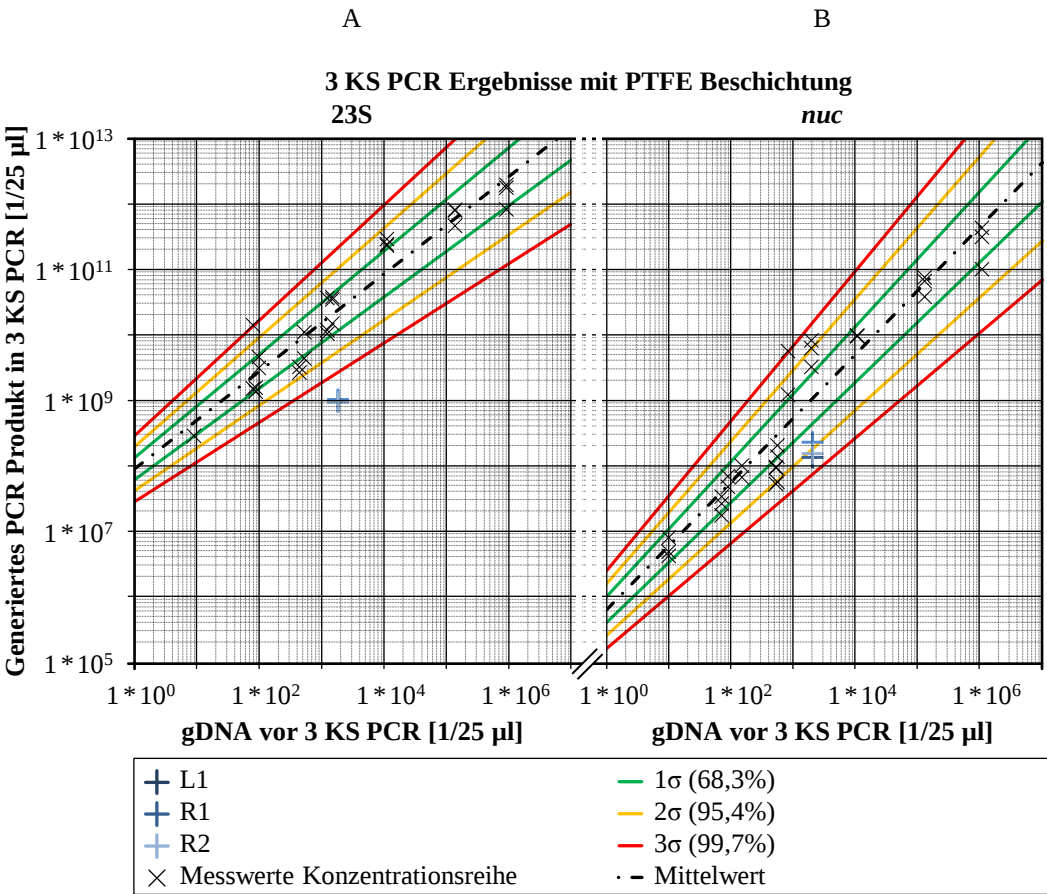


Abbildung 51: 3 KS PCR Verdünnungsreihe, gDNA Eingangskonzentration $1 \cdot 10^1$ bis $1 \cdot 10^6$ Targets pro 25 µl mit σ , 2σ und 3σ der Ausgleichsgeraden; PTFE beschichtete TPU; Am Beispiel A: gDNA zu PCR Produkt, Gen 23S; B: gDNA zu PCR Produkt, Gen *nuc*.

Tabelle 20: TPU Membran mit PTFE Beschichtung.

PTFE	gDNA Targets/ 25 µl	3 KS PCR Produkt/ 25µl	σ
23S	$1,85 \cdot 10^3$	$9,63 \cdot 10^8$	$>-3\sigma$
		$1,03 \cdot 10^9$	$>-3\sigma$
		$9,35 \cdot 10^8$	$>-3\sigma$
PVL	$3,13 \cdot 10^3$	$4,56 \cdot 10^8$	-2σ
		$3,90 \cdot 10^8$	-2σ
		$3,45 \cdot 10^8$	-2σ
SCC1	$2,04 \cdot 10^3$	$8,69 \cdot 10^7$	-1σ
		$1,15 \cdot 10^8$	-1σ
		$9,37 \cdot 10^7$	-1σ
nuc	$2,04 \cdot 10^3$	$1,37 \cdot 10^8$	-3σ
		$2,33 \cdot 10^8$	-2σ
		$1,57 \cdot 10^8$	-3σ
...	...		

PTFE	gDNA Targets/ 25 µl	3 KS PCR Produkt/ 25µl	σ
<i>mecA</i>	$2,30 * 10^3$	$1,20 * 10^8$	-1σ
		$1,94 * 10^8$	-1σ
		$8,16 * 10^7$	-2σ

In Tabelle 20 sind die Ergebnisse der Versuchsreihe von 3 KS PCR Einzelfunktionsmustern mit einer PTFE Beschichtung der TPU Membran gezeigt. Es können folgende Aussagen getroffen werden:

- Die Ergebnisse der 3 KS PCR liegen für alle Versuche unter den entsprechenden errechneten Mittelwerten der jeweiligen Targets.
- Die Targets 23S und *nuc* zeigen einen deutlichen Rückgang an generierten PCR Produkt gegenüber dem Standard, Kapitel 6.5.2.

Die Ergebnisse der Messungen mit PTFE beschichteten 3 KS PCR Einzelfunktionsmustern liefern vergleichbare Messwerte, wie sie in Tabelle 19, Parylene Beschichtung und in Tabelle 17, Tensid Tween, nachzulesen sind. Auch mit dieser Beschichtung ist keine Verbesserung der generierten PCR Produktmenge nachzuweisen.

Generell können beide der hier untersuchten Beschichtungen, Parylene und PTFE, nicht zur Verbesserung der PCR auf dem 3 KS PCR EFM beitragen.

6.7.5 Analyse PC Makrolon 2405 zu PC Makrolon 2245

Im Verlauf der Promotion wurde die Plattformtechnologie weiterentwickelt. Das zu Beginn der Arbeit bevorzugte Material hierbei war PC Makrolon 2405. Diesem Material sind Additive im Spritzguss zugegeben, die im sichtbaren Bereich (VIS) ein optisch ansprechendes Bauteil erzeugen. Diese zugegebenen Additive besitzen eine Eigenfluoreszenz im Bereich um 570 nm. In dieser Bandbreite liegt das Emissionsspektrum der Mikroarraysonden, was zu Komplikationen bei dem Auslesen des Mikroarrays in Kapitel 7 führt. Als Alternative wurde PC Makrolon 2245 festgesetzt. Diesem Material sind die fluoreszierenden Additive im Spritzguss nicht beigemischt. Da das LoC System aus Kapitel 7 mit Makrolon 2245 aufgebaut ist und ein Vergleich der in diesem Kapitel gewonnen Erkenntnisse auf dem 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster mit dem LoC angestrebt wird, soll hier der Einfluss der Materialien Makrolon 2405 zu Makrolon 2245 untersucht werden, Abbildung 52.

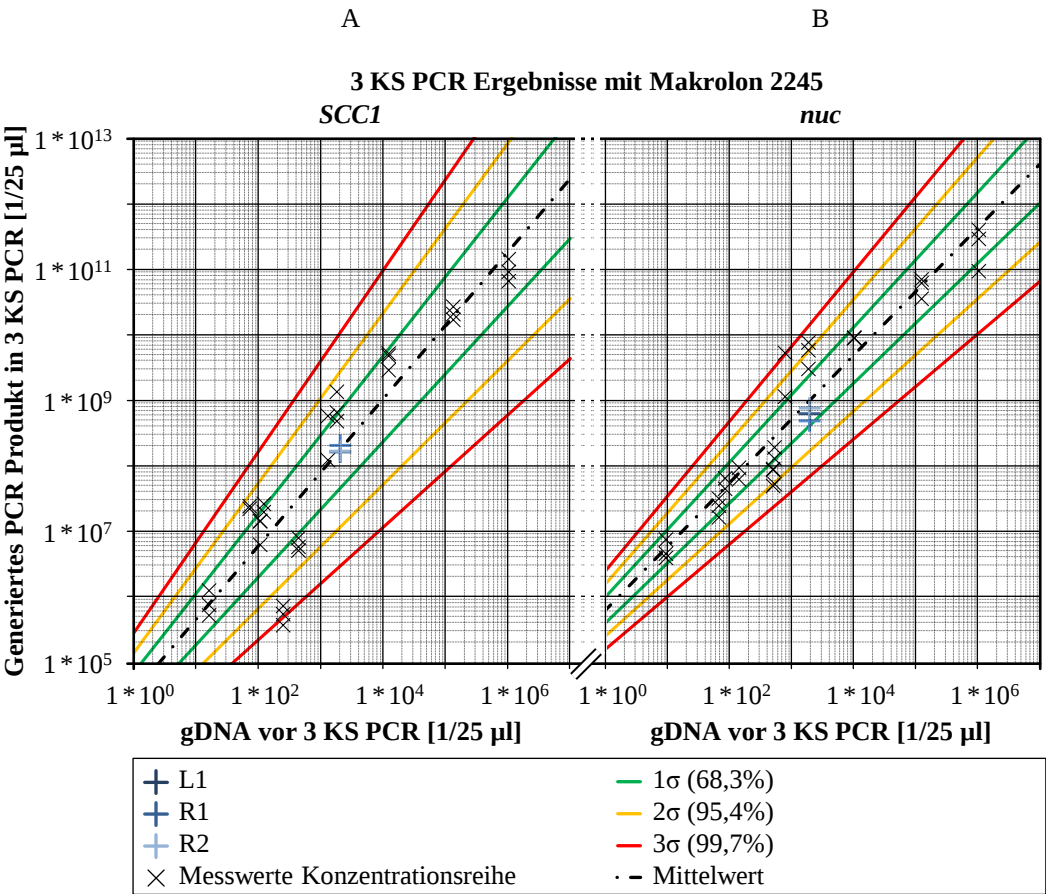


Abbildung 52: 3 KS PCR Verdünnungsreihe, gDNA Eingangskonzentration $1 \cdot 10^1$ bis $1 \cdot 10^6$ Targets pro 25 µl mit σ , 2σ und 3σ der Ausgleichsgeraden; Vergleich PC Makrolon 2245 zu 2405; Am Beispiel A: gDNA zu PCR Produkt, Gen *SCC1*; B: gDNA zu PCR Produkt, Gen *nuc*.

Tabelle 21: Materialversuche Makrolon 2405 gegen 2245.

Makrolon 2245	gDNA Targets/ 25 µl	3 KS PCR Produkt/ 25µl	σ
23S	$1,85 \cdot 10^3$	$3,40 \cdot 10^{10}$	+1σ
		$1,87 \cdot 10^{10}$	-1σ
		$3,65 \cdot 10^{10}$	+1σ
PVL	$3,13 \cdot 10^3$	$5,08 \cdot 10^8$	-2σ
		$9,04 \cdot 10^8$	-1σ
		$1,51 \cdot 10^9$	-1σ
<i>SCC1</i>	$2,04 \cdot 10^3$	$1,66 \cdot 10^8$	-1σ
		$2,08 \cdot 10^8$	+1σ
		$1,70 \cdot 10^8$	-1σ
<i>nuc</i>	$2,04 \cdot 10^3$	$6,80 \cdot 10^8$	-1σ
		$5,28 \cdot 10^8$	-1σ
		$8,28 \cdot 10^8$	-1σ
...	...		

Makrolon 2245	gDNA Targets/ 25 µl	3 KS PCR Produkt/ 25µl	σ
<i>mecA</i>	$2,30 * 10^3$	$1,13 * 10^8$	-1σ
		$1,79 * 10^8$	-1σ
		$1,56 * 10^8$	-1σ

In Tabelle 21 sind die Ergebnisse der 3 KS PCR Messungen mit dem Material Makrolon 2245 gezeigt. Es ist festzuhalten:

- Die Ergebnisse der 3 KS PCR liegen verteilt über und unter den errechneten Mittelwerten der jeweiligen Targets.

Eine Änderung des Materials, konkret das nicht Beimengen der fluoreszierenden Additive im Spritzguss, hat keinen Einfluss auf die PCR in dem 3 KS PCR EFM. Die bisher gezeigten Ergebnisse, generiert auf dem 3 KS PCR EFM, können unabhängig vom eingesetzten Material (PC) mit dem LoC System Kapitel 7 verglichen werden.

6.7.6 Analyse alternativer PCR Reagenzien

Die bisherigen Untersuchungen basieren auf den Reagenzien der GE PCR Beads, Kapitel 6.4.2. Um den Einfluss dieser Reagenzien auf die PCR zu zeigen, wurde eine Versuchsreihe mit alternativen Reagenzien, voraussetzend der Möglichkeit einer Flüssigvorlagerung der Reagenzien auf dem LoC, durchgeführt. Der verwendete Ansatz von Promega^[130], Tabelle 22, ist im Hinblick auf die Kombination PCR im Tube mit Analyse des PCR Produktes über das Mikroarray auf den caMRSA8 Multiplex Assay hin optimiert.

Tabelle 22: PCR Reagenzien der Firma Promega.

Reagenzien	Volumen	Anmerkung
Go taq flexi DNA polymerase	0,75 µl	Promega ^[131]
Wasser	7,25 µl	Carl Roth ^[100]
Puffer	5 µl	Promega ^[132]
MgCl ₂	2,5 µl	Promega ^[133]
dNTPs 2,5 mM	2 µl	^[151]
Polysorbat80 (Tween®80, 5 %)	0,5 µl	Carl Roth ^[101]
gDNA Heat Shock Protein (Hsp90)	1 µl	Prozesskontrolle, auf Bakterien und Eukaryoten
gDNA caMRSA8 + Primer	6 µl	Siehe Tabelle 6

In Abbildung 53 sind die Ergebnisse des Target 23S und *SCC1* gezeigt.

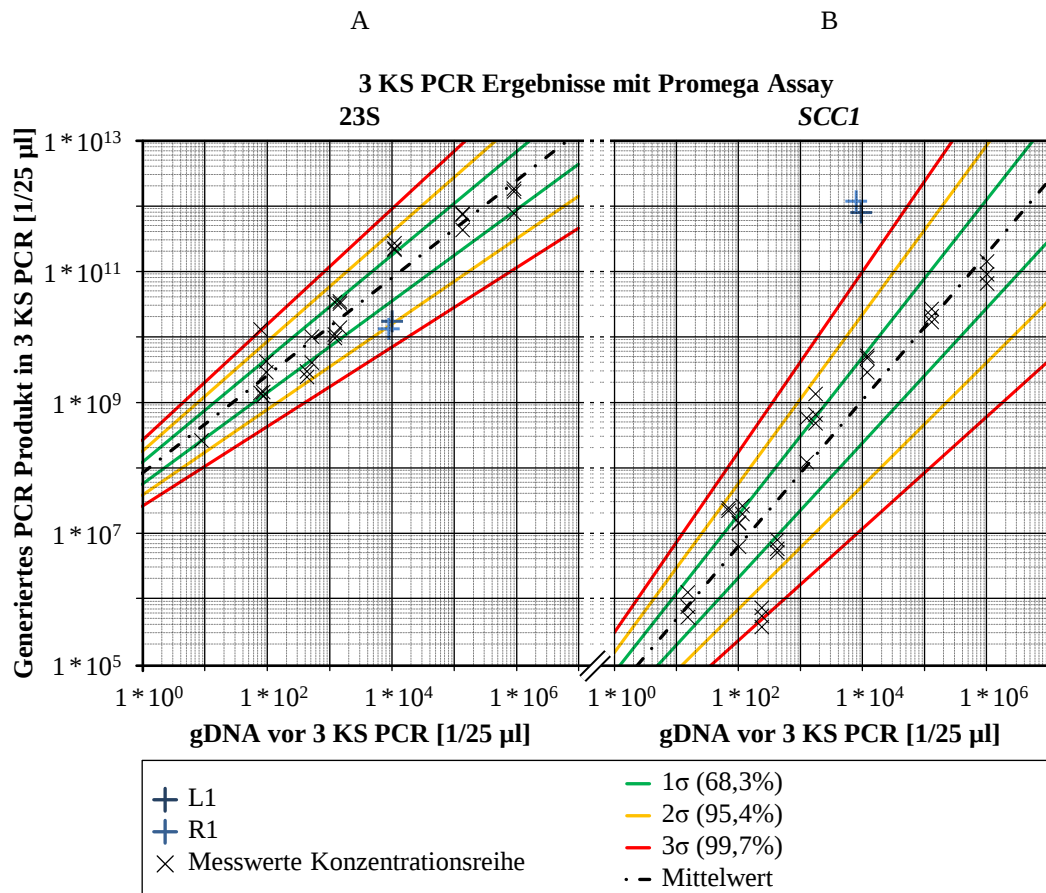


Abbildung 53: 3 KS PCR Verdünnungsreihe, gDNA Eingangskonzentration $1 \cdot 10^1$ bis $1 \cdot 10^6$ Targets pro 25 μ l mit σ , 2σ und 3σ der Ausgleichsgeraden; Alternative PCR Reagenzien der Firma Promega; Am Beispiel A: gDNA zu PCR Produkt, Gen 23S; B: gDNA zu PCR Produkt, Gen SCC1.

Tabelle 23: 3 KS PCR Promega Assay.

Promega Assay	gDNA Targets/ 25 µl	3 KS PCR Produkt/ 25µl	σ
23S	$1,03 * 10^4$	$1,87 * 10^{10}$	-2σ
	$9,09 * 10^3$	$1,43 * 10^{10}$	-3σ
PVL	$1,30 * 10^4$	$1,32 * 10^{12}$	>+3σ
	$1,04 * 10^4$	$2,85 * 10^{12}$	>+3σ
SCC1	$9,76 * 10^3$	$7,97 * 10^{11}$	>+3σ
	$8,11 * 10^3$	$1,19 * 10^{12}$	>+3σ
nuc	$1,13 * 10^4$	$2,25 * 10^{11}$	>+3σ
	$8,95 * 10^3$	$3,72 * 10^{11}$	>+3σ
mecA	$1,05 * 10^4$	$8,32 * 10^{10}$	>+3σ
	$1,30 * 10^4$	$1,84 * 10^{11}$	>+3σ

In Tabelle 23 sind die 3 KS PCR Ergebnisse, prozessiert mit den Reagenzien von Promega, dargestellt. Es kann festgestellt werden, dass:

- die Messwerte aller Targets mit Ausnahme 23S deutlich (Tabelle 24) oberhalb der Mittelwerte der Standardreihe, ermittelt mit den Reagenzien von GE, liegen.
- das Target 23S eine negative Resonanz auf den Promega Assay zeigt.

Vergleicht man die Mittelwerte der generierten PCR Produktmenge des Promega Assays mit den theoretischen Mittelwerten der Ausgleichsgeraden des GE Bead basierten Assays am gleichen Arbeitspunkt, wird der Einfluss der Reagenzien des Promega Assays noch deutlicher.

Tabelle 24: Unterschied GE Bead Reagenzien zu Promega Reagenzien.

Gen	gDNA pro 25 µl vor 3 KS PCR	GE Bead Assay Ausgleichsgerade	Promega Assay Mittelwert	PCR Produkt Promega/ GE
23S	$9,69 * 10^3$	$8,23 * 10^{10}$	$1,65 * 10^{10}$	0,2
PVL	$1,17 * 10^4$	$6,63 * 10^9$	$2,08 * 10^{12}$	313
<i>SCC1</i>	$8,93 * 10^3$	$9,48 * 10^8$	$9,91 * 10^{11}$	1045
<i>nuc</i>	$1,01 * 10^4$	$5,17 * 10^9$	$2,99 * 10^{11}$	57
<i>mecA</i>	$1,17 * 10^4$	$1,40 * 10^9$	$1,34 * 10^{11}$	95

Der Einfluss der Promega Reagenzien zeigt sich deutlich an dem Target *SCC1*, Tabelle 24. Hier wird im Vergleich zum GE Bead basierten Assay unter gleichen PCR Bedingungen 1045 mal mehr PCR Produkt generiert. Auch die Targets PVL, *nuc* und *mecA* zeigen mit 57 bis 313 mal mehr PCR Produkt, generiert mit den Reagenzien von Promega, ein signifikant besseres Ergebnis. Zusätzlich zeigt sich, dass das Target 23S mit dem Promega Reagenzien basierten Assay das Target mit der geringsten Amplifizierungsrate ist, im Gegensatz zum Standard Assay auf GE PCR Bead Basis.

Legt man das charakteristische Verhalten der einzelnen Targets aus Kapitel 6.5.2 zugrunde, ist das LoD für die Kombination der 3 KS PCR mit den Mikroarraysonden 23S^R, PVL^F, *SCC1*^R, *nuc*^S/*nuc*^A^F und *mecA*^F auf Basis des Promega Assays auf $2 * 10^2$ bis $9 * 10^3$ gDNA Stränge pro 25 µl festzulegen. Dies stellt eine deutliche Verbesserung im Vergleich zu den Ergebnissen Kapitel 6.6 dar.

6.8 Zusammenfassung 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster

Das Ziel dieser Arbeit liegt in der Charakterisierung und zeitlichen Optimierung der EFM PCR auf Basis der hier vorgestellten Plattform. Angestrebt ist dafür die Prozessierung einer

Multiplex-PCR in 30 Minuten. Erreicht worden ist dieses Ziel durch die Umsetzung des 3 Kammer Shuttle PCR Konzeptes.

Das PCR Konzept von 2011^[16], Kapitel 3.2.1 und das hier gezeigte 3 KS PCR Konzept sind anhand folgender Kriterien verglichen:

- Phase 1 (Elongation zu Denaturierung) ist abgeschlossen, wenn die Solltemperatur erreicht ist.
- Phase 2 (Denaturierung zu Primerhybridisierung) ist bei einem Offset von 2,5 °C zur Solltemperatur erreicht.
- Phase 4 (Primerhybridisierung zu Elongation) ist bei einem Offset von 6,3 °C zur Solltemperatur erreicht.

Tabelle 25: Zusammenfassung Phasen 1, 2 und 4 von einem PCR Zyklus bei 25 µl Reaktionsvolumen.

Phase	Einseitige thermische Kontaktierung			Zweiseitige thermische Kontaktierung			PCR Konzept 2011		
	Temperatur-differenz [°C]	Zeit [s]	Heizrate [°C/s]	Temperatur-differenz [°C]	Zeit [s]	Heizrate [°C/s]	Temperatur-differenz [°C]	Zeit [s]	Heizrate [°C/s]
1	71,3-93,0	21,1	1,0	72,4-94,3	10,4	2,1	72,0-92,0	43,5	0,4
2	93,0-56,0	17,5	2,1	94,3-56,0	18,0	2,1	92,0-57,5	46,1	0,7
4	53,9-65,1	2,1	5,3	53,9-64,9	3,0	3,6	55,3-65,7	10,4	1,0
Σ		40,7			31,4			100	

In Tabelle 25 sind die Heiz-/ Kühlzeiten der zwei hier untersuchten PCR Konzepte, Kapitel 6.2, dem PCR Konzept von 2011, Stationary PCR^[16], gegenübergestellt. Durch die Umsetzung der 3 Kammer Shuttle PCR ist die Zeit für das Realisieren des Temperaturprofils von 100 Sekunden pro PCR Zyklus durch das zweiseitige Heizkonzept auf etwa ein Drittel der Heiz-/ Kühlzeit reduziert worden. Unter Verwendung der zweiseitigen thermischen Kontaktierung und einer optimierten dynamischen Temperaturregelung einerseits, der Zugabe von Tween[®]80 zu den PCR Reagenzien und einer schrittweisen Reduzierung der Haltezeiten auf den Temperaturniveaus andererseits, ist eine pentaplex caMRSA8 PCR in 29 Minuten und 45 Sekunden realisiert. Die gDNA Eingangskonzentration der Experimente zur Optimierung der Prozesslaufzeit erstreckte sich dabei von einigen hundert bis zu etwa 700 gDNA Targets pro 25 µl. Bewiesen ist, dass:

- die zeitliche Reduzierung der Prozesszeit keinen negativen Einfluss auf die generierte Menge an PCR Produkt der fünf untersuchten Gene auf dem 3 KS PCR EFM hat.
- im Durchschnitt 5- 7 Zehnerpotenzen mehr PCR Produkt generiert worden sind als gDNA Targets in die PCR gegeben wurden.

Ein Vergleich mit bekannten Plattformen^[48; 63], die dieses PCR Konzept umgesetzt haben, gestaltet sich schwierig, da in diesen Veröffentlichungen kein quantitativer Nachweis von PCR Produkt durchgeführt wurde. So wurden hier zwar PCR Prozesszeiten für die Amplifizierung eines singelplex Produktes von 12 min bis 24 min^[48] angegeben, eine Aussage über die PCR Performance in dieser Zeit wurde aber nicht getroffen. Zusätzlich müssen für Vergleiche bezüglich der PCR Prozessdauer zeitaufwendige Schritte vor der PCR Prozessierung mit einbezogen werden, wenn diese einen zeitlichen Vorteil für die PCR Prozessierung bieten. So ist z.B. die Reduzierung von Oberflächeneinflüssen auf dem LoC durch eine 30 minütige Inkubation des PCR Systems mit PVP^[48] direkt vor der PCR umgesetzt worden. Dies erlaubt ein großes O/V Verhältnis der PCR Kammern, was einen direkten Einfluss auf die Heizrate des Reaktionsvolumens hat. Der Vorteil der in dieser Dissertation veröffentlichten Plattform ist, dass für die Umsetzung der PCR hier keine vorherige Inkubation des PCR Systems benötigt wird. Dies ist entscheidend, da ansonsten der zeitliche Vorteil einer schnellen PCR bei einer Integration der PCR in ein Gesamtkonzept nicht mehr gegeben ist.

Die bisher rein qualitativen Charakterisierungen^[48; 63] dieses PCR Konzeptes erlauben ebenfalls nur ungenügend Rückschlüsse auf Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, Aussagen über die Ausfallrate der Plattform, PCR Performance, Limit of Detection, PCR Effizienz sowie Einflüsse von LoC-Materialien und Beschichtungen. Im Folgenden ist zu diesen Punkten die Charakterisierung des Einzelfunktionsmusters zusammengefasst.

Gezeigt wurde das charakteristische Verhalten des PCR Systems über eine Konzentrationsreihe der genomischen DNA, Kapitel 6.5.2. Der untersuchte Bereich erstreckt sich hier von einer Eingangskonzentration von $1 * 10^6$, über die Zielkonzentration für die Optimierungen (Zeit, Oberflächeneinflüsse, ...) von caMRSA8 bei $1 * 10^3$, bis zum Limit of Detection bei Konzentrationen kleiner $1 * 10^1$ Targets pro 25 µl. Es wurde im Multiplexansatz gezeigt, dass die Ergebnisse von verschiedenen Prozessierungsstation und Versuchssträngen, Kapitel 6.5.1, vergleich- und reproduzierbar sind.

Weiterhin ist die Effizienz des 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters mit 1,7 bestimmt, Kapitel 6.5.3.2. Die Effizienz ist damit 5,6 % niedriger als die des Blockzyklers mit 1,8, Kapitel 6.5.3.1. Der größte Anteil (WC-Effizienz: 6,4 %) dieser Reduzierung ist Designbedingt durch das Verhältnis des Kammervolumens zum Kanalvolumen der PCR Kammern, Kapitel 4. Dieser im Vordergrund wirkende Parameter lässt die Schlussfolgerung

zu, dass die übrigen Einflüsse wie z.B. Temperatur, Temperaturhomogenität, Materialien, Scherkräfte und Luftblasen keinen signifikanten Einfluss in diesem PCR System unter den gegebenen Bedingungen haben. Das 3 KS PCR EFM liefert für die Effizienz Ergebnisse nahe dem optimalen Arbeitspunkt.

Festzuhalten ist hier auch, dass bei einer Betrachtung der Effizienzermittlung die generierte Menge an PCR Produkt des Targets 23S ab dem Zyklus 22 in die Plateau-Phase geht, Abbildung 44, also nach diesem Zyklus die Amplifizierungsphase für das Target 23S abgeschlossen ist. Dies bedeutet, dass bei einer reinen Betrachtung des Targets 23S hier eine Singelplex PCR prozessiert wurde in nur 22 Zyklen. Der Übergang in die Plateau-Phase des Target 23S ist auch im Blockzykler ab Zyklus 22 erreicht. Dies lässt vermuten, dass hier zyklusbedingte und nicht zeitliche Einflüsse diese Phase einleiten. Unter dieser Annahme und dem Wissen, dass eine Reduzierung der Prozesslaufzeit keinen negativen Einfluss auf die generierte Menge an PCR Produkt ausübt, kann hier mit dem schnellsten PCR Protokoll und einer Zyklusanzahl von 22 eine Singelplex PCR in 15 Minuten und 42 Sekunden angenommen werden.

Die sichere Nachweisgrenze von gDNA ist bei einer Eingangskonzentration von $1 \cdot 10^1$ Targets pro 25 μl ermittelt. Das Limit of Detection ist aufgrund der dafür hohen erforderlichen Anzahl an Messungen nicht nach NCCLS^[124] bestimmt. Es ist jedoch bewiesen, dass bei niedrigeren Konzentrationen als $1 \cdot 10^1$ Targets pro 25 μl das Verhältnis von erzielten zu erwarteten Ergebnissen sinkt, also nicht jeder kontaminationsfreie Versuch zu einem nachgewiesenem PCR Produkt führt. Daraus folgt, dass das Limit of Detektion im Bereich um $1 \cdot 10^1$ Targets pro 25 μl liegen muss.

Ein in dieser Arbeit durchgehend untersuchter Einfluss ist die Kontamination der Experimente, Kapitel 6.4.6. Hier kann eine entscheidende Kenngröße bewertet werden, die Sauberkeit im Herstellungsprozess und der Arbeit im Labor. Für die Überwachung von Kontaminationen sind Kontrollen über den gesamten Prozess, von der Herstellung der 3 KS PCR Einzelfunktionsmustern, über die Ausgangsmaterialien der Reagenzien bis hin zu Kontrollen vor und nach der PCR auf den 3 KS PCR Einzelfunktionsmustern umgesetzt. Festgestellt wurde bei den 140 3 KS PCR Einzelfunktionsmusterversuchen eine Kontamination bei bis zu acht der 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster direkt nach der Herstellung und Lagerung. Die Sauberkeit kann hier noch verbessert werden, ist für diese Arbeit aber ausreichend gegeben. Die Überwachung der PCR direkt auf den Einzelfunktionsmustern hat ergeben, dass eine Querkontamination zwischen mehreren, gleichzeitig prozessierten PCR Strängen auf einem EFM ausgeschlossen werden kann. Die festgestellte dauerhafte Kontamination durch das Target 23S ist Laborgebunden und kann nicht für Aussagen über den Herstellungsprozess oder das saubere Arbeiten im Labor herangezogen werden.

In der Charakterisierung sind Einflüsse der in der Plattform verwendeten Materialien PC und TPU untersucht. Es ist gezeigt, dass das Verwenden von Additiven wie Tween[®]80, Kapitel 6.7.3, einen positiven Einfluss auf die Generierung von PCR Produkt hat. Daraus lässt sich schließen, dass die verwendeten Materialien oder die Oberfläche der PCR Kammern des 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters aus biologischer Sicht nicht optimal sind. Die Untersuchung der TPU mit PTFE- und Parylenen Beschichtungen, Kapitel 6.7.4, hat keinen positiven Einfluss auf die PCR ergeben, die Ergebnisse mit diesen Oberflächenbeschichtungen sind direkt vergleichbar mit den Ergebnissen ohne die Zugabe von Tween[®]80 zu den Reagenzien. Unter der Annahme, dass die Beschichtungen auch nach den Experimenten noch funktional sind (kein optischer Defekt) und diese Beschichtungen andere Materialeigenschaften als die TPU haben, ist der in Vorversuchen festgestellte negative Einfluss des Materials TPU fragwürdig. Hinzu kommt, dass in den Vorversuchen bezüglich der Materialeigenschaften der Einfluss großer Oberflächen ebenfalls mit eine Rolle spielte, aber nur unzureichend beachtet wurde. Die Annahme aus Kapitel 5.3.2, welche auf Erkenntnissen von Vorversuchen basieren, nämlich dass das Material der TPU einen negativen Einfluss auf die PCR hat, ist damit in Frage gestellt. Schließt man den Einfluss der Materialien des 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters aus, deutet der positive Effekt der Tween[®]80 Zugabe zu den PCR Reagenzien auf einen generellen Einfluss der Oberfläche der PCR Kammern hin. Eine weitere Differenzierung ist in dieser Arbeit nicht erfolgt. Entscheidend ist jedoch, dass das Beschichtungsverfahren an sich funktional ist, die Plattformmaterialien keinen kritischen Einflussfaktor darstellen und damit auch in dieser Plattform das Verhältnis von Oberfläche zu Kammervolumen nicht vernachlässigt werden darf.

Es ist gezeigt, dass in diesem System die Geschwindigkeit, mit der das PCR Reaktionsvolumen verdrängt wird, einen Einfluss auf die generierte Menge an PCR Produkt hat. Eine langsamere Verdrängung des Reaktionsvolumens, die untersuchten Variationen lagen bei Zeiten zwischen wenigen Millisekunden bis zu zwei Sekunden, führt zu einem Anstieg der Menge an generiertem PCR Produkt um den Faktor 2- 12, Kapitel 6.7.2.

Für die gezeigten Ergebnisse sind insgesamt 140 PCR EFM Experimente durchgeführt, Kapitel 6.4.6. Die verwendeten Plattformkomponenten sind ausschließlich mit Verfahren hergestellt worden, die für den Einsatz in der Massenproduktion geeignet sind, Kapitel 5. Durch die hohe Anzahl an hergestellten 3 KS PCR Einzelfunktionsmustern und der niedrigen Ausfallrate von < 3 % ist zum einen die Eignung für ein in Masse herstellbares Produkt mit komplexen fluidischen Funktionen, zum anderen die Zuverlässigkeit im Einsatz gezeigt.

Für die Integration des 3 KS PCR Konzeptes in ein Gesamtsystem, Kapitel 7, mit weiteren Einzelfunktionen wie Lyse, Aufreinigung und Auswertung ist die Kombination der PCR mit

dem Mikroarray als Ausleseseinheit mitentscheidend. Hierfür ist eine Nachweisgrenze der PCR von $1 \cdot 10^3$ gDNA Targets pro 25 μ l ermittelt. Es ist nachgewiesen, dass die amplifizierte Menge an PCR Produkt im 3 KS PCR EFM bei der gegebenen Eingangskonzentration nicht die erforderliche Menge an PCR Produkt für das Aktivieren der Mikroarraysonden generiert. Dies gilt allerdings auch für die Prozessierung im Blockzykler und ist damit nicht Konzeptbedingt. Für eine erfolgreiche Integration in ein Gesamtkonzept muss also entweder der Assay auf biologischer Seite optimiert, Kapitel 6.7.6, oder die Ausleseroutine der hybridisierten Sonden auf Seite der Hardware oder der Software des Scanners optimiert werden.

Abschließend festgestellt ist, dass ein Durchpumpen der gDNA (Vergleich Probe P zu Kontrollen ÜL1, ÜR1 und ÜR2), bei einer gDNA Eingangskonzentration von $1 \cdot 10^1$ bis $1 \cdot 10^2$ pro 25 μ l durch das fluidische System des 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters bei Raumtemperatur sich nicht negativ auf die gDNA Konzentration auswirkt, Kapitel 6.4.6. Die Materialien PC und TPU sind unter Beachtung der Kriterien Raumtemperatur und transportiertes Reaktionsvolumen für die Anwendung von biologischen Assays geeignet.

6.9 Ausblick 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster

Es hat sich gezeigt, dass die Effizienz des 3 KS PCR EFMs auf dieser Plattform durch das nicht prozessierte Volumen in den Kanälen zwischen den PCR Kammern beeinflusst wird. Es ist also möglich, die 3 KS PCR Effizienz über eine Designänderung weiter zu steigern, bzw. den Einfluss soweit zu minimieren, dass er für den Einsatz in einem Industrieprodukt nicht mehr relevant ist. Folgende Optimierungen könnten umgesetzt werden:

- Die Kanäle zwischen den Kammern könnten verkürzt werden. Das Design des 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters ist, Kapitel 5.4.1, auf den Einsatz von beschichteten TPUs ausgelegt. Für diese Aufbautechnik ist der Abstand der Kammern auf 2,5 mm dimensioniert. Es ist gezeigt, Kapitel 5.2.2, dass eine geringere Anzahl an Schweißbahnen für ein funktionales LoC ausreichend ist. Zu beachten ist allerdings, dass die Verringerung des Abstandes zu einem stärkeren Temperaturgradienten zwischen den Temperaturzonen, Kapitel 4, führt und damit der thermische Stress an Bedeutung gewinnt.
- In einem weiteren Ansatz könnte der Querschnitt der Kanäle reduziert werden. Diese Reduzierung würde allerdings auch den fluidischen Widerstand zwischen den PCR Kammern erhöhen, was sich negativ (Scherkräfte, Schaumbildung) auf das System auswirken würde. Eine Optimierung der pneumatischen Ansteuerung der Verdrängerkammern nach Kapitel 6.7.2, würde einer Erhöhung des fluidischen Widerstandes entgegenwirken.

Eines der Ziele dieser Arbeit ist die Verkürzung der Prozesslaufzeit der PCR auf dem 3 KS PCR EFM. Die Forderung, eine Multiplex-PCR in unter 30 Minuten zu prozessieren, ist erreicht. Für eine weitere Reduzierung der Heiz-/ Kühlzeit könnte der Prozessschritt von Denaturierung zu Hybridisierung (Phase 2, Kapitel 6.3.2.1) auf der Basis einer zweiseitigen thermischen Kontaktierung, Kapitel 6.3.2.2, beschriftet werden. In diesem Arbeitsschritt wird das Reaktionsvolumen von der Denaturierungskammer durch die Elongationskammer in die Hybridisierungskammer gepumpt. Für diesen Schritt wird die Temperatur der Elongationskammer in der vorliegenden Versuchsanordnung gesenkt. Limitierend wirkt sich hierbei allerdings zum einen die thermische Masse der Heizfinger aus, zum anderen das Fehlen einer aktiven Kühlung. Eine Reduzierung der thermischen Masse der Heizfinger, siehe Kapitel 7.1 und der Austausch des Widerstandsheizers durch ein Peltierelement, würden diesen Prozessschritt deutlich verkürzen.

Eine weitere Möglichkeit ist die Vergrößerung der Kammeroberfläche, wie sie auch in einigen Veröffentlichungen umgesetzt ist. Das hat einen Anstieg des Wärmestromes zur Folge, F. [4].

$$\dot{Q} = A * \alpha * (T_1 - T_2)$$

F. [4]

$\dot{Q}$	Wärmestrom
A	Kontaktfläche
α	Wärmeübergangskoeffizient
T_1, T_2	Temperatur der Medien

In dieser Arbeit finden sich Hinweise auf den negativen Einfluss der Oberfläche dieser Plattform. Eine beliebige Erhöhung des Oberflächen zu Volumen Verhältnisses der PCR Kammern ist also nicht zu empfehlen. Jedoch kann bei einer abgeschlossenen Entwicklung der PCR, von biologischer Seite, das Kammerdesign diesbezüglich nochmals optimiert werden.

7 3 KS PCR Systemintegration

Das Ziel dieser Arbeit beschränkt sich nicht ausschließlich auf die Plattformtechnologie und die Charakterisierung von Einzelfunktionen. Ziel für Lab on a Chip Anwendungen muss die Integration verschiedenster Standardfunktionen (Aliquotieren, Vermischen, Separieren, Amplifizieren, Inkubieren...)^[8, 134, 135, 136] eines molekulardiagnostischen Labors sein. Die Verknüpfung der gezeigten Einzelfunktionen zu einem voll automatisierten Lab on a Chip System (LoC), unter Verwendung der ermittelten Herstellungsparameter, liegt ebenfalls im Fokus.

Vorteile von LoCs zeigen sich hauptsächlich in folgenden Punkten:

- LoC Systeme beinhalten meistens ein internes, intelligentes Flüssigkeitsmanagement. Dies erlaubt eine Automatisierung^[8] der Prozesse, welche gegenüber der Standarddiagnostik im Labor keine Handhabungsfehler während der Analyse zu lässt. Das hat z.B. in Hinblick auf Qualitätskontrollen einen direkten Einfluss auf die Sensitivität der Tests.
- Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Zeitersparnis^[8] von der Probenentnahme bis zur Diagnose. Standardverfahren können standortbedingt hier bis zu mehreren Tagen benötigen, LoCs arbeiten im Bereich von wenigen Stunden.
- Die Senkung der Kosten ist ein weiterer Punkt^[8]. Die Einwegsysteme sollten auf kostengünstigen Plattformen realisiert werden, die für eine Massenproduktion geeignet sind. Des Weiteren ist für die Analyse kein Labor mit hochwertiger und damit teurer Infrastruktur (Pipetten, Sicherheitswerkbank,...) erforderlich. Personalkosten können eingespart werden. Für die Prozessierung automatisierter LoCs ist kein speziell geschultes Personal erforderlich.
- Die Miniaturisierung von Funktionen und Integration in ein LoC erlaubt weiterhin den mobilen Einsatz der Diagnostiksysteme bei Nutzung minimaler Infrastruktur^[137] (Stromanschluss).
- Ein entscheidender Punkt dieser Arbeit ist das frei programmierbare und präzise Flüssigkeits- und Temperaturmanagement. Hier können LoCs den zeitlichen Vorteil, Kapitel 6.8, voll ausspielen.

Aktuell veröffentlichte LoC Systeme, die eine Vollintegration verschiedenster Funktionen inklusive einer Multiplex-Gen-Analyse beinhalten, bedienen sich meist des Zentrifugal-Prinzips, eine sogenannte Lab on a Disc^[137, 138, 139, 140] Plattform, oder auch des Prinzips Continuous Flow^[11, 32, 141, 142]. Ein Teil der Lab on a Disc Plattformen bieten die Möglichkeit, eine große Anzahl an Genen in Echtzeit zu untersuchen^[137, 138]. Eine Alternative bietet die Detektion über Membranen/ Teststreifen^[139]. Ein hoher Multiplexgrad ist nicht nur für die Anzahl der untersuchten Gene entscheidend; ebenfalls können dabei verschiedenste

Prozesskontrollen realisiert werden, die eine entscheidende Bedeutung für einen Einsatz in einem Industrieprodukt haben^[137]. Das Konzept einer Disc Analyse sieht meist die Aufteilung der Probe in kleinere Untereinheiten (6- 7 Kammern à 10 µl^[137, 138]) vor. Eine Reduzierung des Reaktionsvolumens führt zu einer Abnahme der thermischen durch die PCR prozessierten Masse. Dies kann zu kurzen Heizphasen führen, was den Vorgang der PCR maßgeblich beschleunigt. Das Konzept der Probenaufteilung führt allerdings immer zu einer Verschlechterung des Limit of Detection des Systems, da sichergestellt werden muss, dass in allen Aliquots die gleiche Menge an Probenmaterial vorhanden ist. Liegt das LoD einer Kammer bei z.B. 10 Targets pro µl, so liegt das LoD eines Systems mit 7 Kammern konzeptbedingt bei mindestens 70 Targets pro µl. Umgangen werden kann dieses Problem mit einer Voramplifikation des Probenmaterials, was allerdings damit auch die Integration dieser Funktion in das LoC zur Folge hat. Ein weiterer Nachteil stellt die designabhängig fest vorgegebene Aliquotierung der Probe dar. Mit einer qPCR sind bis zu vier Gene^[20] in einer Kammer zu unterscheiden. Werden für einen Assay z.B. 14 Nachweise benötigt, so könnte dies in vier Kammern mit jeweils einer vierfach Multiplex-PCR oder mittels einer zweifach Multiplex-PCR in sieben Kammern realisiert werden. Für das Limit of Detection ist eine minimale Aufteilung der Proben von Vorteil.

Continuous Flow LoC Systeme bieten meistens eine schnelle und effiziente Prozessierung der PCR^[141, 142]. Eine qPCR für die Detektion wirkt sich bei diesen Konzepten allerdings nicht immer vorteilhaft aus, z.B. ist für den Nachweis des caMRSA8 eine Unterscheidung von bis zu 15 Genen erforderlich. Zusätzlich müssen hier noch Prozesskontrollen mitgeführt werden, was den Rahmen der Nachweismöglichkeit dieser Konzepte ohne eine Probenaliquotierung sprengt. Zusätzlich kommt hinzu, dass viele dieser Systeme nicht frei in der Wahl der Prozessparameter sind, da diese durch das Design festgelegt werden^[142].

Das Ziel dieser Arbeit ist die Integration der Einzelfunktionen PCR und Mikroarray in ein LoC System. Dies ermöglicht im Zusammenhang mit weiteren Funktionen eine automatisierte Analyse von der Eingabe einer Probe bis hin zur Ergebnisdarstellung. Diese Funktionen sind im Einzelnen:

- Vorlagerung von Reagenzien.
- Probenvorbereitung, Aliquotieren von Flüssigkeiten, Einstellen von Pufferkonzentrationen.
- Lyse, Zerstörung von Zellen, Freisetzung der DNA.
- Aufreinigung der DNA.
- PCR, Amplifizierung der Zielsequenzen.
- Hybridisierung des PCR Produktes und Ergebnisinterpretation der Analyse mittels eines Mikroarray.

7.1 LoC und erweiterte Prozessierungsstation

Der Fokus dieser Dissertation liegt zum einen in der Erweiterung und Optimierung der Aufbau und Fügetechnologie der LoC Plattform hin zu der Realisierbarkeit komplexer mikrofluidischer Funktionen, zum anderen in der Charakterisierung der 3 KS PCR und des Mikroarrays. Bisher sind die Funktionen der PCR und des Mikroarrays separat auf Einzelfunktionsmustern behandelt. In diesem Kapitel werden die Einzelfunktionen der 3 KS PCR und des Mikroarrays kombiniert in eine Plattform integriert. Ziel ist es, die Vergleichbarkeit der Ergebnisse, generiert auf dem 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster, mit denen des LoC zu zeigen. Damit können die gewonnenen Erkenntnisse aus Kapitel 5 und 6 auf das automatisierte Gesamtsystem übertragen werden. Zu diesem Zweck ist ein LoC im Spritzgussverfahren aus Makrolon 2245, Abbildung 54, mit den Funktionen aus Tabelle 26 hergestellt worden.

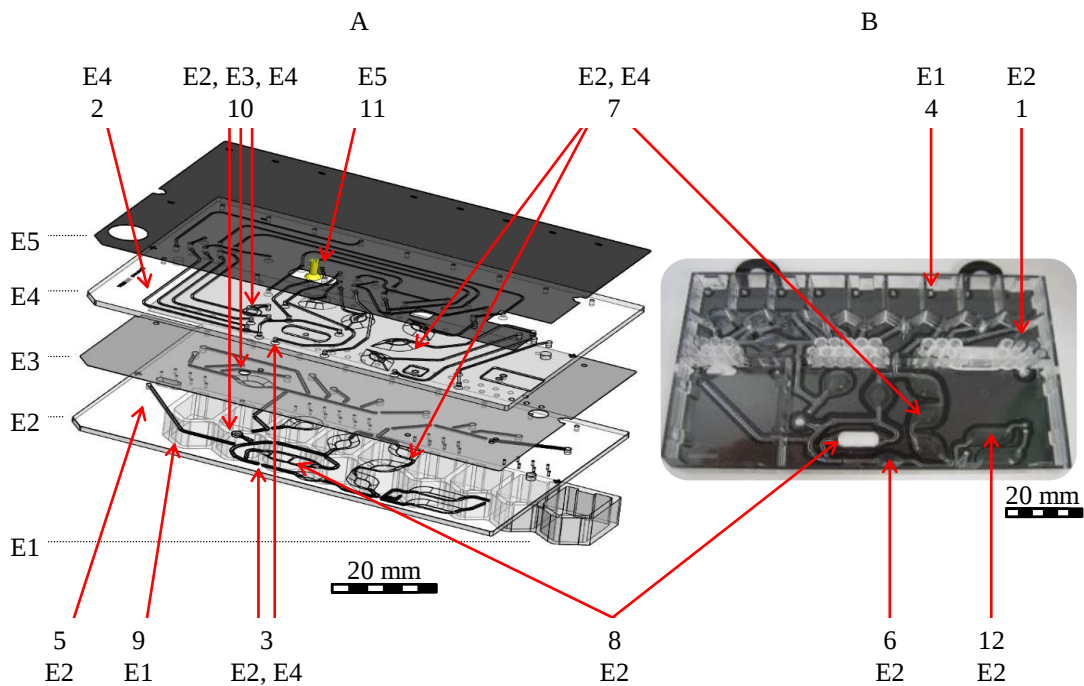


Abbildung 54: Spritzgegossenes LoC mit integrierten Einzelfunktionen A) CAD; E1: PC, Reagenzienvorlagerung; E2: PC, fluidische Ebene; E3: TPU, flexible Membran; E4: PC, pneumatische Steuerebene; E5: PC, Versiegelung pneumatische Steuerebene, Zusatzanschluss für Mikroarray; B) Rückansicht, fluidische Ebene eines mittels Laserdurchstrahlsschweißens, Kapitel 5, hergestellten LoC.

Tabelle 26: Funktionen des LoC, Abbildung 54.

Nr.	Funktion
1	32 pneumatische Anschlüsse; Ansteuern der on LoC Ventile
2	Pneumatische Kanäle; Verbindung pneumatische Anschlüsse zu Ventilen
3	25 Ventile; Unterbrechung fluidisches Netzwerk bei pneumatischer Aktuation
...	...

Nr.	Funktion
4	Reservoirre (10); Vorlagerung und Entsorgung von Reagenzien/ Proben
5	Fluidische Kanäle; Verbindung von Funktionen
6	Kammern; Flüssigkeitstransport; pumpen; mischen; aliquotieren
7	PCR; integriertes 3 KS PCR Konzept; Kapitel 6
8	Mikroarraykammer; Aufnahme von Mikroarrays
9	Lyse; Freisetzung der DNA
10	Filtration; Aufreinigung der DNA
11	Pneumatischer Port; Zusatzanschluss für Mikroarraydetektion
12	Probeentnahmekammern; Prozessüberwachung mittels qPCR

Für den Vergleich der Systeme ist die Prozessierstation der 3 KS PCR EFM zu erweitern, Abbildung 55. Zusätzlich zu den Anforderungen aus Kapitel 6.1 muss eine größere Prototypenaufnahme und die Ansteuerung von bis zu 32 pneumatischen Anschlüssen auf dem LoC realisiert werden. Für eine Optimierung der Prozesslaufzeit wurde die thermische Masse des Elongationsheizfingers (Messing) von 4524 mm³ im Einzelfunktionsmuster-aufbau auf 1931 mm³ reduziert. Eine Optimierung der Prozesslaufzeit nach Kapitel 6.9 kann hier umgesetzt werden.

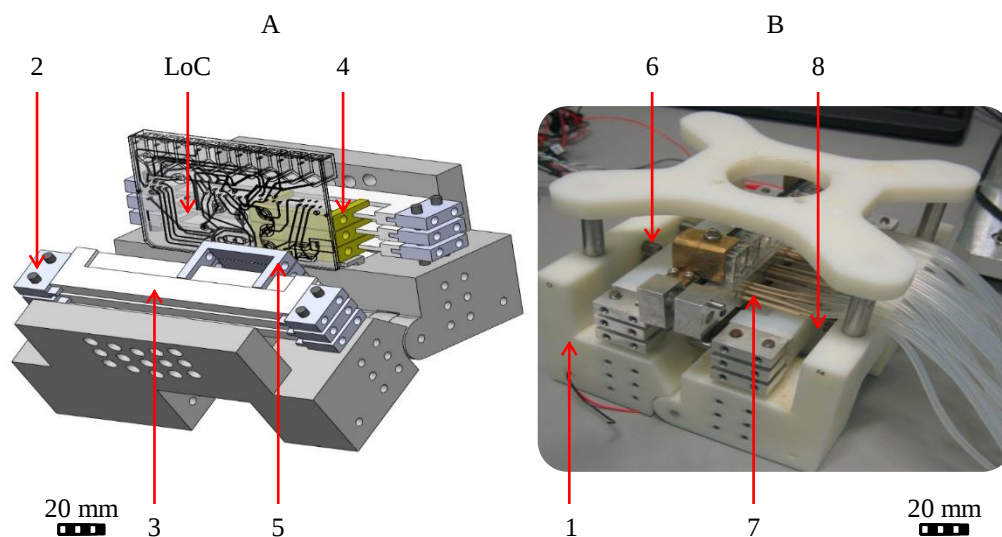


Abbildung 55: A) CAD der aufgeklappten LoC Prozessierstation mit eingelegetem LoC; B) Bild der geschlossenen LoC Prozessierstation mit eingelegetem LoC, pneumatisch und thermisch kontaktiert.

Tabelle 27: Erweiterung der Komponenten der Prozessierungsstation aus Tabelle 1.

Nr.	Komponenten Prozessierstation LoC	
1	Klemmvorrichtung	Polyamid; Aufnahme des LoC
2	Vertikale Heizfingerausrichtung	Stahl; Aluminium
3	Horizontale Heizfingerausrichtung	Polyamid; thermische Entkopplung der Heizfinger zu Klemmvorrichtung
4	Heizfinger, Thermoelement, Widerstandsheizter	Messing; erzeugen stationäre Heizzonen; Heizfinger für PCR Hybridisierung, Heizfinger für Mikroarraykammer ^[78, 79]
5	Pseudoheizfinger	Polyamid; Erzeugung von Anpressdruck bei einseitiger thermischer Kontaktierung
6	Federstifte	Stahl; gewährleisten Kontakt der Heizfinger zum LoC
7	Pneumatische Kontaktierung	Aluminiumschiene mit Kautschukdichtung
8	Lüfter	12 V; Kühlung der Prozessierungsstation nach PCR ^[81]

Eine Kalibrierung der Temperaturen im laufenden Prozess nach Kapitel 6.3.2 ist im LoC aufgrund von Leckagen, verursacht durch die eingeschweißten Thermoelemente, nicht durchgeführt worden. Die Differenz zwischen den Thermoelementen, verbaut in dem fluidischen Systems des LoC und den Heizfingern der Prozessierungsstation, ist statisch bestimmt. Für den Vergleich der Systeme ist die Differenz der Temperatur im Heizfinger zur Temperatur gemessen im fluidischen System des 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters, bei einem mit Wasser gefüllten fluidischen System ermittelt worden. Dieser Vorgang wird für das LoC wiederholt und die Temperaturen anschließend abgeglichen, so dass im fluidischen System des LoCs die gleichen thermischen Bedingungen vorliegen wie im 3 KS PCR EFM. Eine Regelung der Heizfinger nach Kapitel 6.3.2 für eine Optimierung der Heiz-/ Kühlzeiten ist nicht umgesetzt.

Tabelle 28: Gemessener Offset, Temperaturen 3 KS PCR zu LoC.

	3 KS PCR, einseitige thermische Kontaktierung		LoC	
	Fluid. System	Heizfinger	Fluid. System	Heizfinger
Denaturierung	98 °C	102 °C	94,5 °C	100 °C
Hybridisierung	54 °C	54 °C	54 °C	54 °C
Elongation	73 °C	73 °C	70,4 °C	73 °C

Das unterschiedliche Systemverhalten ist durch die größere Masse des LoC, die kleinere Masse der Heizfinger und die geringere Kontaktfläche der Heizfinger zu dem LoC zu erklären.

Das Flüssigkeitsmanagement auf dem LoC wird durch Kanäle, Ventile und Kammern realisiert. Für die Prozessierung der 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster in Kapitel 6 ist ein Druckniveau ausreichend. Die Verdrängung der Flüssigkeit aus einer Kammer (z.B. PCR Kammer) ist nach Kapitel 5.4.2 durch Anlegen eines Drucks von 75 kPa_{rel} an der pneumatischen Seite realisiert. Das LoC muss für das Flüssigkeitsmanagement neben den Kammern auch Ventile bereitstellen. Die pneumatische Ansteuerung der Kammern (Abbildung 56, PCR A 1, 2 und 3, Dosierungskammer 5 µl und 25 µl) auf dem LoC ist designbedingt mit 75 kPa_{rel} umgesetzt, Ventile werden mit 130 kPa_{rel} aktuiert.

7.2 LoC Performance

Für den Vergleich der Ergebnisse der Einzelfunktionsmuster mit den Resultaten des LoC sind drei Experimente durchgeführt worden. Das Blockschaltbild in Abbildung 56 stellt das fluidische System für die Prozessierung der PCR mit anschließender Mikroarrayhybridisierung schematisch dar.

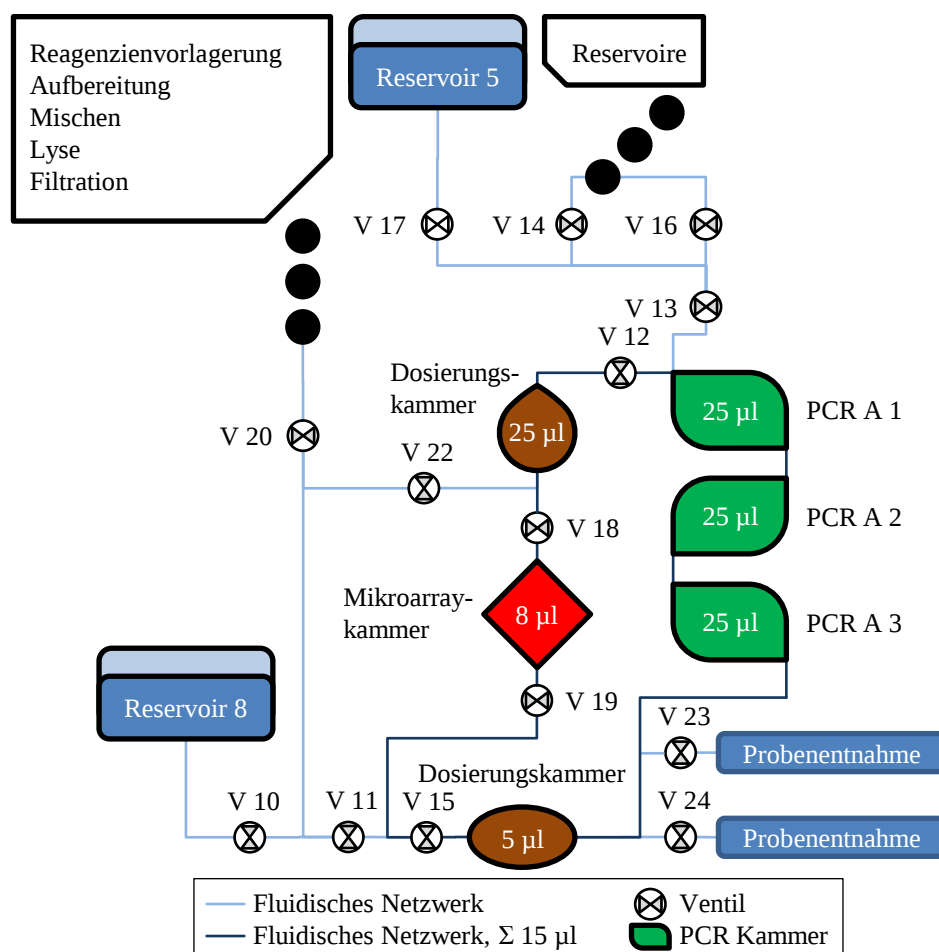


Abbildung 56: Blockschaltbild, automatisierte PCR mit anschließender Mikroarrayhybridisierung auf dem LoC.

Für die Untersuchung der PCR auf dem LoC mit anschließender Mikroarrayhybridisierung wird ein angepasster Ablauf realisiert, da Funktionen wie die Reagenzienfreisetzung, die Lyse oder Filtration nicht Bestandteil dieser Arbeit sind. Hierbei werden alle nicht genannten Ventile und Kammern als geschlossen angesehen (pneumatische Kontaktierung ist hergestellt), die Reagenzien, Kapitel 6.4.2, befinden sich vorgemischt in den Reservoiren und das LoC ist in die Prozessierungsstation Kapitel 7.1 eingelegt.

PCR on LoC

Im ersten Schritt werden von Reservoir 5 über V 17 und V 13 schrittweise die Kammern PCR A 1, PCR A 2, PCR A 3 und die Dosierungskammer (5 µl) mit PCR Mix gefüllt, Abbildung 56. Hierfür wird die pneumatische Seite des LoC auf Unterdruck geschaltet. Anschließend werden die Kammern PCR A 2, PCR A 3 und die Dosierungskammer (5 µl) über die Ventile V 15, V 11 und V 10 ins Waste (Reservoir 8) entleert. Das PCR System des LoC ist jetzt luftblasenfrei befüllt und der PCR Mix befindet sich in der Kammer PCR A 1. Nach Erreichen der Zieltemperaturen, Tabelle 29, wird die 3 KS PCR gestartet. Hierzu wird der PCR Mix zwischen den Kammern PCR A 1 über PCR A 2 in PCR A 3 nach Schema Kapitel 6.3 prozessiert.

Tabelle 29: LoC PCR Protokoll.

Phase		3 KS PCR Temperatur [°C]/ Zeit [s]	LoC Temperatur [°C]/ Zeit [s]
Initiale Denaturierung		100/ 180	100/ 180
35 Zyklen	Denaturierung	102/ 20	100/ 20
	Schaltzeit	-/ 4	-/ 4
	Hybridisierung	54/ 30	54/ 30
	Schaltzeit	-/ 3	-/ 3
	Elongation	73 – 76/ 76	73/ 76
	Schaltzeit	-/ 2	-/ 2
Finale Elongation		74/ 60	73/ 60

Analyse 3 KS PCR über qPCR

Nach Ablauf der 3 KS PCR wird das PCR Produkt über V 23 in eine Probenentnahmekammer geleitet, so dass es über eine Pipette aufgenommen werden kann. Von der Probe wird 1 µl des PCR Produktes entnommen, um es mit der qPCR, Kapitel 6.4.5, zu quantifizieren. Dieser Schritt dient der Quantifizierung der generierten PCR Produkte und wird bei einer späteren Integration aller Funktionen nicht umgesetzt.

Mikroarray hybridisieren

Um eine weitere luftblasenfreie Prozessierung nach der Probeentnahme zu gewährleisten, wird im nächsten Schritt das gesamte System mit Hybridisierungspuffer 2, Kapitel D, über Reservoir 5 befüllt. Dieser Vorgang wird dreimal durchgeführt, ähnlich wie die Befüllung der PCR Kammern. Die Entleerung des Systems erfolgt zum einen über V 15, V 11 und V 10, zum anderen über V 12, Dosierungskammer (25 µl), V 22 und V 10. Im Anschluss wird die Mikroarraykammer luftblasenfrei durch Verdrängen des Hybridisierungspuffers über die Dosierungskammer (5 µl), V 15, V 19, Mikroarraykammer, V 18, V 22 und V 10 befüllt. Nach Aktuierung aller Kammern wird das entnommene PCR Produkt zusammen mit 80 µl Hybridisierungspuffer 2, Kapitel D, in Reservoir 5 eingebracht. Der Mix aus PCR Produkt und Hybridisierungspuffer wird über V 17, V 13, V 15 und V 19 in die Kammern PCR A 1, PCR A 2, PCR A 3 und Mikroarraykammer gepumpt.

Für die Hybridisierung des Mikroarrays werden alle Heizfinger auf 45 °C Solltemperatur eingestellt, anschließend wird mittels peristaltischen Pumpens (0,1 Hz) über die Kammern PCR A 1, PCR A 2, PCR A 3 und Dosierungskammer (25 µl) im Uhrzeigersinn die Flüssigkeit für 30 Minuten prozessiert.

Mikroarray waschen

Um im nachfolgenden Schritt den Mikroarray auslesen zu können, ist ein Verdrängen der ungebundenen Oligonukleotide des Hybridisierungspuffers 2, Kapitel D, aus der Arraykammer notwendig. Im Gegensatz zum Standardprotokoll wird der Mikroarray auf dem LoC nicht mit Waschpuffer, sondern mit Hybridisierungspuffer 1, Kapitel D, gespült. Hierfür wird mittels der Dosierungskammer (25 µl) von Reservoir 5 über V 17, V 13, PCR A 1, PCR A 2, PCR A 3, Dosierungskammer (5 µl), V 15, V 19, Mikroarraykammer, V 18 zu V 22 und V 10 dreimal 25 µl Hybridisierungspuffer 1 mit 0,1 Hz in das Waste gepumpt.

Mikroarray auslesen

Eine Funktion für die Detektion der Sonden des Mikroarrays ist in der LoC Prozessierungsstation nicht integriert. Zum Auslesen des Mikroarrays wird das LoC in einen Mikroarrayscanner^[151] gelegt. Die optische Detektion erfolgt anschließend durch die fluidische Seite des LoC.

Für die Prozessierung der PCR und der Hybridisierung des Mikroarrays auf dem LoC wurden insgesamt 580 Schaltvorgänge benötigt, in einem Schaltvorgang können alle Ventilzustände und Temperaturen angepasst werden. Da eine thermische Charakterisierung der LoC Prozessierungsstation und des LoC im Gegensatz zu der 3 KS PCR Prozessierungsstation und dem 3 KS PCR EFM (Kapitel 6.3) nicht erfolgte, ist die PCR

Laufzeit auf das nicht zeitlich optimierte PCR Protokoll festgelegt. Die Laufzeit der PCR beträgt 82 Minuten und 45 Sekunden, die Mikroarraysonden werden in 30 Minuten hybridisiert. Weitere Schritte, z.B. für Pumpen und Waschen, summieren sich auf eine Laufzeit von etwa 3 Minuten.

7.3 Charakterisierung PCR & Mikroarray auf dem LoC

Im Kapitel 6.6 wurde die Nachweisgrenze der Mikroarrays für die Detektion aller Gene auf eine Eingangskonzentration an gDNA in die PCR von $7 \cdot 10^5$ pro 25 μl bei einem Mischungsverhältnis von 1/ 3,25 PCR Produkt zu Hybridisierungspuffer ermittelt. Für die Charakterisierung des LoC wurde ein Mischungsverhältnis von 1/ 3,33 eingestellt. Da das LoC vor der Hybridisierung mit Puffer befüllt wird, ist eine weitere Verdünnung des PCR Produktes zu erwarten. Mit dem GE PCR Bead basierenden Assay in Kombination mit PCR und Mikroarray ist die geforderte Nachweisgrenze von $1 \cdot 10^3$ gDNA Targets sowohl auf dem 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster als auch im Blockzykler nicht erreicht worden. Da eine größere Verdünnung des PCR Produktes mit Hybridisierungspuffer auf dem LoC zu erwarten ist, wurde die Charakterisierung des LoC mit einer Eingangskonzentration von $1 \cdot 10^6$ gDNA Targets pro 25 μl , angesetzt in der Stammlösung, durchgeführt.

3 KS PCR auf dem LoC

In Abbildung 57 sind die Ergebnisse aus drei Versuchen (V_{LoC1} , V_{LoC2} , V_{LoC3}) der 3 KS PCR, auf drei verschiedenen LoCs prozessiert, im Vergleich zu den Ergebnissen der Verdünnungsreihe der 3 KS PCR, prozessiert auf dem Einzelfunktionsmuster in Kapitel 6.5.2, gezeigt.

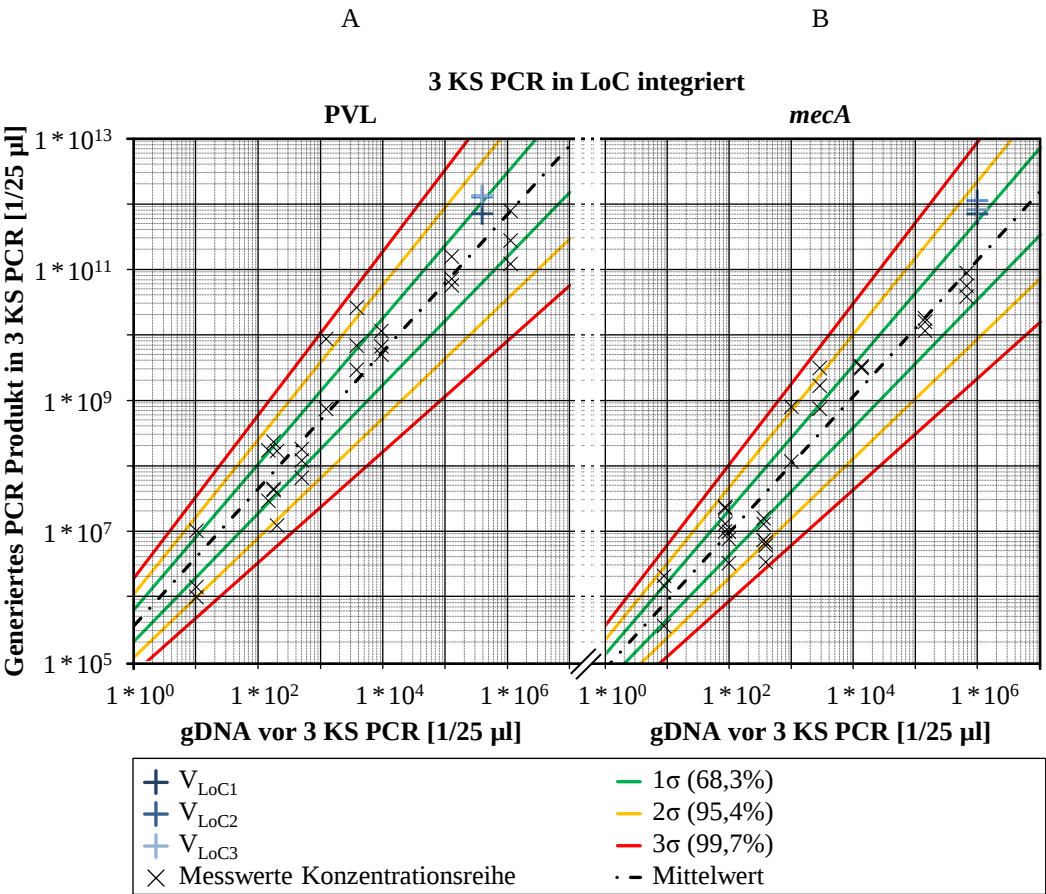


Abbildung 57: 3 KS PCR Verdünnungsreihe, gDNA Eingangskonzentration $1 \cdot 10^1$ bis $1 \cdot 10^6$ Targets pro 25 µl mit σ , 2σ und 3σ der Ausgleichsgeraden; Vergleich 3 KS PCR Einzelfunktion mit 3 KS PCR LoC (V_{LoC1} , V_{LoC2} , V_{LoC3}); Am Beispiel A: gDNA zu PCR Produkt, Gen PVL; B: gDNA zu PCR Produkt, Gen *mecA*.

Tabelle 30 zeigt das quantifizierte PCR Produkt der drei LoC Experimente mit der entsprechenden Abweichung zu den Experimenten der Verdünnungsreihe, erstellt in Kapitel 6.5.2 auf dem 3 KS PCR Einzelfunktionsmuster.

Tabelle 30: Integration 3 KS PCR in LoC Plattform.

Integration 3 KS PCR in LoC		gDNA Targets/ 25 µl	3 KS PCR auf LoC/ 25 µl	σ
23S	V_{LoC1}	$1,35 \cdot 10^6$	$2,00 \cdot 10^{12}$	-1σ
	V_{LoC2}		$2,14 \cdot 10^{12}$	-1σ
	V_{LoC3}		$1,52 \cdot 10^{12}$	-1σ
PVL	V_{LoC1}	$3,88 \cdot 10^5$	$7,08 \cdot 10^{11}$	+1σ
	V_{LoC2}		$1,27 \cdot 10^{12}$	+2σ
	V_{LoC3}		$1,34 \cdot 10^{12}$	+2σ
...	...			

Integration 3 KS PCR in LoC		gDNA Targets/ 25 μ l	3 KS PCR auf LoC/ 25 μ l	σ
<i>SCC1</i>	V_{LoC1}	$1,16 * 10^6$	$4,38 * 10^{11}$	$+1\sigma$
	V_{LoC2}		$6,10 * 10^{11}$	$+1\sigma$
	V_{LoC3}		$5,59 * 10^{11}$	$+1\sigma$
<i>nuc</i>	V_{LoC1}	$1,01 * 10^6$	$1,55 * 10^{12}$	$+1\sigma$
	V_{LoC2}		$2,43 * 10^{12}$	$+2\sigma$
	V_{LoC3}		$1,66 * 10^{12}$	$+2\sigma$
<i>mecA</i>	V_{LoC1}	$9,70 * 10^5$	$7,10 * 10^{11}$	$+2\sigma$
	V_{LoC2}		$1,13 * 10^{12}$	$+2\sigma$
	V_{LoC3}		$8,27 * 10^{11}$	$+2\sigma$

Die Ergebnisse der Charakterisierung stellen sich somit wie folgt dar:

- Die Messwerte aller Targets liegen um die Mittelwerte der jeweiligen Standardreihe.
- Alle Targets prozessiert in der 3 KS PCR auf dem LoC ergeben Messwerte mit einer Abweichung im Bereich -1σ bis $+2\sigma$.

Die Versuche zeigen, dass eine Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse der PCR, ermittelt auf den 3 KS PCR Einzelfunktionsmustern, auf die LoC Plattform möglich ist. Alle fünf Targets liefern im Multiplexansatz auf dem LoC mit vergleichbaren PCR Protokollen Ergebnisse im erwarteten Bereich, die über die qPCR quantifizierten Messungen der LoCs liegen mit einer Abweichung von -1σ bis $+2\sigma$ vergleichbar zum Standard, Kapitel 6.5.2.

Mikroarrayhybridisierung auf dem LoC

Die Ergebnisse der Mikroarrayhybridisierung können nicht direkt mit den Ergebnissen der Einzelfunktionsmuster verglichen werden, da zum einen die Prozessierung der Arrays in Kapitel 6 per Hand erfolgte und zum anderen sich die Prozesse in Bezug auf die Hybridisierungszeit und das Waschprotokoll unterscheiden. Die Hybridisierung des dritten Versuches (V_{LoC3}) ist erfolgreich abgeschlossen, der Schritt - Mikroarray waschen - konnte aufgrund von Luftblasen im fluidischen System nicht mit einem positiven Ergebnis durchgeführt werden. In Abbildung 58 ist das Ergebnis der Mikroarrayhybridisierung der Charakterisierung V_{LoC1} dargestellt.

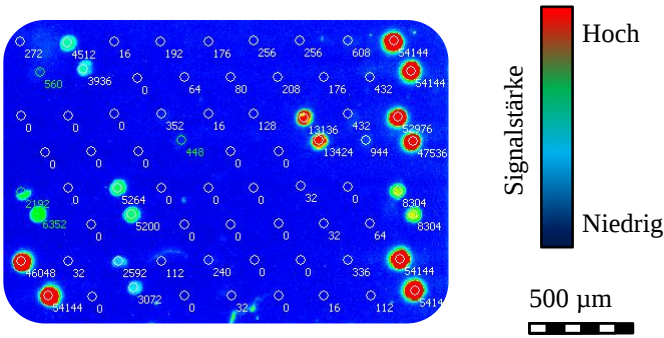


Abbildung 58: Hybridisierter Mikroarray auf LoC, Versuch V_{LoC1}.

In Tabelle 31 sind hybridisierten Sonden des Mikroarrays aus den Versuchen V_{LoC1} und V_{LoC2}, prozessiert auf dem LoC, zusammengefasst.

Tabelle 31: PCR Produkt zu Intensität der Mikroarraysonden, LoC, V_{LoC1} und V_{LoC2}.

Sonde	V _{LoC1}		V _{LoC2}	
	PCR Produkt/ 25 µl	Intensität	PCR Produkt/ 25 µl	Intensität
23S ^R	2,00 * 10 ¹² ±0,07	2832 ±240	2,14 * 10 ¹² ±0,06	2128 ±864
PVL <i>lukS</i> ^F	7,08 * 10 ¹¹ ±0,57	13280 ±144	1,27 * 10 ¹² ±0,05	10640 ±5184
SCC1 ^R	4,38 * 10 ¹¹ ±0,05	4224 ±288	6,10 * 10 ¹¹ ±0,02	6416 ±2448
<i>nuc S</i> ^F	1,55 * 10 ¹² ±0,03	4272 ±2080	2,43 * 10 ¹² ±0,02	11776 ±720
<i>nuc AS</i> ^F	1,55 * 10 ¹² ±0,03	5232 ±32	2,43 * 10 ¹² ±0,02	4656 ±48

Die Sonden für die PCR Produkte *mecA* und PVL *lukF* sind nicht detektiert worden. Beide Targets zeigen in der Quantifizierung über die qPCR, Tabelle 30, in vergleichbarer Menge PCR Produkte zu den verbleibenden Targets.

Vergleicht man die über die qPCR nachgewiesene Konzentration an PCR Produkt- amplifiziert auf dem LoC- mit der Konzentration, nachgewiesen auf dem 3 KS PCR EFM, ist festzustellen, dass eine höhere Konzentration an Produkt- generiert auf dem LoC- nicht ausreicht, um alle Sonden sicher nachzuweisen. Die Ursachen liegen hierfür zum einen in einem unterschiedlichen Waschprotokoll, zum anderen an der Dauer der Hybridisierungszeit. So ist abschließend anzunehmen, dass das Volumen, verbleibend in den Kanälen vor der Hybridisierung, die Konzentration an PCR Produkt für die Hybridisierung verringert. Ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen aus Kapitel 6 ist nicht möglich.

Die erfolgreiche Integration der Funktionen 3 KS PCR und Mikroarray in die LoC Plattform sind damit nachgewiesen.

7.4 Zusammenfassung 3 KS PCR Systemintegration

Gezeigt ist die Umsetzung des 3 KS PCR Konzeptes auf eine polymerbasierte Plattform mit der Möglichkeit der multiplex Gen-Analyse. Dabei ist die Anzahl der detektierten Gene weitestgehend nur begrenzt durch die Anzahl der Hybridisierungssspots auf dem oder den Mikroarrays. Die Kombination dieses PCR Konzeptes, Kapitel 4, mit der Detektion über das Mikroarray erlaubt auf kleinem Raum eine Vielzahl von Einsatzmöglichkeiten, da sowohl die Rahmenparameter für die PCR als auch für die der Hybridisierung frei über eine entsprechende Programmierung wählbar sind. Für die Implementierung eines Assays sind, neben den Reagenzien, lediglich die PCR und weiter die Hybridisierungsbedingungen zu ermitteln und ein entsprechendes Mikroarray einzusetzen. Änderungen im Design des LoC sind nicht nötig.

Weiterhin ist festzuhalten, dass die gezeigten Funktionen (PCR und Mikroarrayhybridisierung) zu den anspruchsvollsten Funktionen auf einem Lab on a Chip System gehören. Die Anforderungen an Temperaturbeständigkeit, Langzeitstabilität und bei diesem Plattformkonzept auch an die Druckbeständigkeit der Fügeverbindung, sind bei anderen Funktionen wie Pumpen, Mischen, Reagenzienfreisetzung und Filtration nicht in Kombination auf so kleinem Raum gegeben.

Des Weiteren wurde das LoC auf Basis der gewonnen Erkenntnisse in Kapitel 5 mittels Spritzgussverfahren und Laserdurchstrahlschweißtechnik hergestellt. Dies zeigt, dass die gewonnenen Erkenntnisse nicht nur für kleine mikrofluidische Systeme umsetzbar sind, sondern dass auch große komplexe, automatisierte Netzwerke damit realisiert werden können.

Weiterhin wurde gezeigt, dass nach einer statischen Temperaturcharakterisierung des fluidischen Systems der PCR auf der LoC Plattform einige Ergebnisse des 3 KS PCR Einzelfunktionsmusters aus Kapitel 6 direkt auf das LoC übertragen werden können. Die Experimente führten bei einer PCR Laufzeit von etwa 83 Minuten zu Ergebnissen im erwarteten Bereich bezüglich der Menge an amplifiziertem PCR Produkt bei gegebener Eingangskonzentration, Abbildung 57. Eine Bestätigung, dass alle Erkenntnisse bezüglich der PCR Charakteristik aus Kapitel 6, PCR Effizienz, LoD und Optimierung der Prozesslaufzeit, auf das LoC übertragen werden können steht noch aus. Hierfür muss erst noch eine ausführliche thermische Charakterisierung, vergleichbar mit Kapitel 6.3.2 und die Bestimmung des LoD, Kapitel 6.5.4, erfolgen.

Die Integration bzw. die Hybridisierung des Mikroarrays für die Detektion der amplifizierten Gene ist in 30 Minuten Prozesszeit umgesetzt. Es sind bis auf zwei Sondenpaare alle erforderlichen PCR Produkte und Prozesskontrollen für die Detektion des caMRSa8 in

dieser Zeit nachgewiesen worden. Die hybridisierten Sonden zeigen sowohl für die Gene als auch für die Kontrollen eine Intensität in erwarteter Höhe.

Für die Analyse auf der LoC Plattform wurde eine Prozesslaufzeit von 116 Minuten benötigt, inklusive der Funktionen PCR, Pumpen, Waschen und Hybridisieren. Erfolgt eine entsprechende Charakterisierung der LoC Plattform und der erweiterten Prozessierungsstation, sollte auch hier die PCR- Laufzeit von aktuell 83 Minuten (LoC Plattform) auf unter 30 Minuten (3 KS PCR Einzelfunktionsmuster) ohne Verlust von PCR Performance zu realisieren sein. Hiermit würde sich dann die Prozesszeit, inklusive PCR, Pumpen, Waschen und Hybridisieren auf etwa eine Stunde belaufen. Somit ist eine auch in der praktischen Anwendung vertretbare Prozesszeit zu realisieren.

A 3 KS PCR Reagenzien

Tabelle 32: PCR Reagenzien, 3 KS PCR für gDNA caMRSA8.

Reagenzien		Volumen	Anmerkung
GE PCR Bead			GE-Life Sciences PuReTaq™ Hot Start Ready-To-Go PCR Beads ^[143]
Wasser		18,5 µl	Carl Roth ^[100]
Polysorbat80 (Tween®80, 5 %)		0,5 µl	Carl Roth ^[144]
gDNA caMRSA8 + Primer Mix		1 µl + 5 µl	Sequenzen werden nicht veröffentlicht ^[151]
23S	gDNA	-	100 bp - 400 bp
	Forward Primer	-	19 bp
	Reverse Primer	-	24 bp
SCC1	gDNA	-	100 bp - 400 bp
	SCC1 Forward Primer	-	21 bp
	SCC1 Reverse Primer	-	21 bp
PVL	gDNA	-	100 bp - 400 bp
	<i>lukS</i> Forward Primer	-	21 bp
	<i>lukF</i> Reverse Primer	-	19 bp
<i>nuc</i>	gDNA	-	100 bp - 400 bp
	Forward Primer	-	21 bp
	Reverse Primer	-	21 bp
<i>mecA</i>	gDNA	-	100 bp - 400 bp
	Forward Primer	-	21 bp
	Reverse Primer	-	19 bp
gDNA HPV		1 µl	Humanes Papilloma Virus
Forward Primer		-	(HPV), PCR Kontrolle
Reverse Primer		-	

B qPCR Reagenzien

Tabelle 33: qPCR Reagenzien, für 3 KS PCR Produkt caMRSA8.

Reagenzien		Konzentration	Volumen	Anmerkung
FastStart Universal Probe Master (ROX)			10 µl pro Gen	Roche Diagnostics ^[145]
Wasser			7 µl pro Gen	Carl Roth ^[100]
Gen				Primer und Sonden von Roche Diagnostics ^[146] , Sequenzen werden nicht veröffentlicht.
23S	3 KS PCR Produkt		2 µl	
	Forward Primer	10 µM	0,4 µl	20 bp
	Reverse Primer	10 µM	0,4 µl	20 bp
	Sonde	10 µM	0,2 µl	22 bp
SCC1	3 KS PCR Produkt		2 µl	
	Forward Primer	10 µM	0,4 µl	20 bp
	Reverse Primer	10 µM	0,4 µl	20 bp
	Sonde	10 µM	0,2 µl	29 bp
PVL	3 KS PCR Produkt		2 µl	
	Forward Primer	10 µM	0,4 µl	23 bp
	Reverse Primer	10 µM	0,4 µl	20 bp
	Sonde	10 µM	0,2 µl	32 bp
nuc	3 KS PCR Produkt		2 µl	
	Forward Primer	10 µM	0,4 µl	20 bp
	Reverse Primer	10 µM	0,4 µl	20 bp
	Sonde	10 µM	0,2 µl	27 bp
mecA	3 KS PCR Produkt		2 µl	
	Forward Primer	10 µM	0,4 µl	20 bp
	Reverse Primer	10 µM	0,4 µl	23 bp
	Sonde	10 µM	0,2 µl	35 bp

C qPCR Protokoll

Tabelle 34: qPCR Protokoll Applied Biosystems.

Phase		7500 Applied Biosystems Temperatur [°C]/ Zeit [s]
Initiale Denaturierung		95/ 600
40 Zyklen	Denaturierung	95/ 15
	Hybridisierung/ Elongation	60/ 60

D Mikroarray Reagenzien

Tabelle 35: Mikroarray Reagenzien, für 3 KS PCR Produkt caMRSA8.

Reagenzien	Konzentration	Anmerkung
SSC (20 Fach)	88,23 g/L 175,32 g/L	tri-Natriumcitrat Natriumchlorid, Pufferfunktion ^[147]
Denhardt's Lösung (DL) (50 Fach)	0,1 g/10 ml 0,1 g/10 ml 0,1 g/10 ml	Albumin Fraktion V Ficoll® 400 Polyvinylpyrrolidon- K30 Unspezifische Bindungen ^[148]
Hybridisierungspuffer 1		
SSC	20 Fach	
DL	50 Fach	
Natriumazid	18 Fach	Verhinderung von mikrobiellen Wachstum ^[149]
Hybridisierungspuffer 2		
Hybridisierungspuffer 1		
Oligonukleotid Cy3 rcET1	100 µM	Farbstoff
Oligonukleotid Cy3 A628	100 µM	Farbstoff
Waschpuffer 1		
SSC	1 x	
SDS	0,1 %	Dodecylsulfate sodium salt, Pufferfunktion ^[150]
Waschpuffer 2		
SSC	0,1 x	
SDS	0,1 %	
Waschpuffer 3		
SSC	1 x	

E Mikroarray, händische Prozessschritte

Die manuelle Prozessierung der Mikroarrays ist nach folgendem Schema durchzuführen.

1. Verdünnen des PCR Produktes mit Hybridisierungspuffer 1 im Verhältnis (PCR/ Hybridisierungspuffer 1) = (1/ 3,25).
2. Inkubieren der Mikroarrays caMRSA8 mit Produkt aus Schritt 1 bei 45 °C für 1 Stunde.
3. Waschen der Mikroarrays mit Waschpuffer 1 (kurz dippen).

4. Waschen der Mikroarrays mit neuem Waschpuffer 1 für 1 Minute.
5. Waschen der Mikroarrays mit Waschpuffer 2 für 2 Minuten.
6. Waschen der Mikroarrays mit Waschpuffer 3 für 15 Sekunden.
7. Trocknen der Mikroarrays mit N₂.
8. Auslesen der Mikroarrays über Mikroarrayscanner^[151].

F Literaturverzeichnis

¹ Robert Bosch GmbH; Geringen-Schillerhöhe; Stuttgart; Germany

² Rolfe C. Anderson, Xing Su, Gregory J. Bogdan and Jeffery Fenton, 2000: A miniature integrated device for automated multistep genetic assays, *Nucleic Acids Research*, 2000, vol. 28, no. 12, doi: 10.1093/nar/28.12.e60

³ Yi Sun, M.V.D. Satyanarayan, Nam Trung Nguyen, Yien Chian Kwok, 2007: Continuous flow polymerase chain reaction using a hybrid PMMA-PC microchip with improved heat tolerance, *Sensors and Actuators*, B 130, (2008), 836–841, doi: 10.1016/j.snb.2007.10.058

⁴ W. Hilber and B. Jakoby, 2012: Controlled liquid flow in a microfluidic network with pressure sensitive valves based on polydimethylsiloxane (PDMS) / neodymium (NdFeB) composites, *Proc. Euroensors XXVI*, September 9–12, 2012, Kraków, Poland, doi: 10.1016/j.proeng.2012.09.163

⁵ D. Y. Kong, S. W. Kim, C. T. Seo, J. H. Lee, C. S. Cho, B. H. Kim, 2011: Fabrications of a continuous-flow PCR-chip using dry film resist, proceedings of the 2011 6th IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems February 20–23, 2011, Kaohsiung, Taiwan

⁶ Manuela Schmidt, 2011: Untersuchung zum Aufbau hybrider Mikrosysteme unter Verwendung von Polymermaterialien, Dissertation, 2012, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, Germany

⁷ Edmund Haberstroh, Wolf-Martin Hoffmann, Reinhart Poprawe, Fahri Sari, 2005: 3 Laser transmission joining in microtechnology, *Microsyst Technol.* (2006), 12: 632–639, doi: 10.1007/s00542-006-0096-0

⁸ Daniel Mark, Stefan Haeberle, Günter Roth, Felix von Stetten and Roland Zengerle, 2009: Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, 39, 1153–1182, doi: 10.1039/b820557b

⁹ Giles H.W. Sanders, Andreas Manz, 2000: Chip-based microsystems for genomic and proteomic analysis, trends in *analytical chemistry*, vol. 19, no. 6, 2000, doi: 10.1016/S0165-9936(00)00011-X

¹⁰ Stephen A. Bustin, 2010: The PCR revolution, Cambridge University Press, ISBN-13: 978-0-521-88231-6

¹¹ Robin Hui Liu, Jianing Yang, Ralf Lenigk, Justin Bonanno, and Piotr Grodzinski, 2004: Self-contained, fully integrated biochip for sample preparation, polymerase chain reaction amplification, and DNA microarray detection, *Anal. Chem.* 2004, 76, 1824–1831

¹² Chao-Heng Chien, Hui-Min Yu, 2006: The design and fabrication of platform deviec for DNA amplification, DTIP, 2006, Stresa, Lago Maggiore, Italy, ISBN: 2-916187-03-0

¹³ Xiaoyan Pan, Lei Jiang, Kaiying Liu, Bingcheng Lin, Jianhua Qin, 2010: A microfluidic device integrated with multichamber polymerase chain reaction and multichannel separation for genetic analysis, *Analytica Chimica Acta* 674 (2010) 110–115, doi: 10.1016/j.aca.2010.06.005

¹⁴ John B. Findlay, Susan M. Atwood, Lynn Bergmeyer, John Chemelli, Kenneth Christy Thomas Cummins, William Donish, Tobias Joseph Falvo, David Patterson, John Puskas, John Quenin, Janak Shah, David Sharkey, J. W. H. Sutherland, Richard Sutton, Harold Warren, and Jeffrey Wellman, 1993: Automated closed-vessel system for in vitro diagnostics based on polymerase chain reaction, *CLIN. CHEM.* 39/9, 1927–1933 (1993)

- ¹⁵ M. Bu, I. R. Perch-Nielsen, K. S. Sørensen, J. Skov, Y. Sun, D. D. Bang, M. E. Pedersen, M. F. Hansen, A. Wolff, 2012: A novel temperature control method for shortening thermal cycling time to achieve rapid polymerase chain reaction (PCR) in a disposable polymer microfluidic device, *J. Micromech. Microeng.* 23 (2013) 074002
- ¹⁶ Jochen Rupp, 2011: Multilayer pressure driven microfluidic platform – μ FLATLab, Dissertation, 2011, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, Germany
- ¹⁷ P.-A. Auroux, Y. Koc, A. deMello, A. Manz and P. J. R. Day, 2004: Miniaturised nucleic acid analysis, *Lab Chip*, 2004, 4, 534 – 546, doi: 10.1039/b408850f
- ¹⁸ Christian Fermer, Peter Nilsson, Mats Larhed, 2002: Microwave-assisted high-speed PCR, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 18 (2003) 129–132, doi: 10.1016/S0928-0987(02)00252-X
- ¹⁹ Kirsty J. Shaw, Peter T. Docker, John V. Yelland, Charlotte E. Dyer, John Greenman, Gillian M. Greenway and Stephen J. Haswell, 2010: Rapid PCR amplification using a microfluidic device with integrated microwave heating and air impingement cooling, *Lab Chip*, 2010, 10, 1725–1728, doi: 10.1039/c000357n
- ²⁰ Qiagen GmbH, <http://www.qiagen.com/products/catalog/assay-technologies/real-time-pcr-and-rt-pcr-reagents/quantifast-multiplex-pcr-kits>, Cat.no: 204XXX, 27.06.2014
- ²¹ Yonghao Zhang, Pinar Ozdemir, 2009: Microfluidic DNA amplification-A review, *Analytica Chimica Acta* 638 (2009) 115–125, doi: 10.1016/j.aca.2009.02.038
- ²² E. Mavraki, D. Moschou, G. Kokkoris, N. Vourdas, S. Chatzandroulis, A. Tserepi, 2011: A continuous flow μ PCR device with integrated microheaters on a flexible polyimide substrate, *Procedia Engineering* 25 (2011) 1245 – 1248, doi: 10.1016/j.proeng.2011.12.307
- ²³ Sandeep Kumar Jha, Gi-Sung Joo, Gyu-Sik Ra, Hyun Ho Lee, and Yong-Sang Kim, 2011: Development of PCR microchip for early cancer risk prediction, *IEEE SENSORS JOURNAL*, vol. 11, no. 9, 2011
- ²⁴ Yusuke FUCHIWAKI, Masato SAITO, Shin-ichi WAKIDA, Eiichi TAMIYA, and Hidenori NAGAI, 2011: Practical liquid plug flow-through polymerase chain-reaction system based on a heat-resistant resin chip, *ANALYTICAL SCIENCES*, MARCH 2011, vol. 27
- ²⁵ Daniel Sang-Won Park, Pin-Chuan Chen, Byoung Hee You, Namwon Kim, Taehyun Park, Tae Yoon Lee, Proyag Datta, Yohannes Desta, Steven A Soper, Dimitris E Nikitopoulos and Michael C Murphy, 2009: Titer plate formatted continuous flow thermal reactors for high throughput applications: fabrication and testing, *J. Micromech. Microeng.* 20 (2010) 055003 (11pp), doi: 10.1088/0960-1317/20/5/055003
- ²⁶ Ilija Pješčić, Collin Tranter, Patrick L. Hindmarsh, Niel D. Crews, 2009: Glass-composite prototyping for flow PCR with in situ DNA analysis, *Biomed Microdevices* (2010) 12:333–343, doi: 10.1007/s10544-009-9389-2
- ²⁷ Anett Reichert, Jana Felbel, Mark Kielpinski, Matthias Urban, Benno Steinbrecht, Thomas Henkel, 2008: Micro flow-through thermocycler with simple meandering channel with symmetric temperature zones for disposable PCR-devices in microscope slide format, *Journal of Bionic Engineering* (2008) vol. 5, no. 4
- ²⁸ Niel Crews, Carl Wittwer, Robert Palais and Bruce Gale, 2008: Product differentiation during continuous-flow thermal gradient PCR, *Lab Chip*, 2008, 8, 919–924, doi: 10.1039/b716437h

-
- ²⁹ Joel Grover, Robert D. Juncosa, Nancy Stoffel, Mark Boysel, Andrew I. Brooks, Michael P. McLoughlin, and David W. Robbins, 2008: Fast PCR thermal cycling device, *IEEE SENSORS JOURNAL*, vol. 8, no. 5, MAY 2008
- ³⁰ Niel Crews, Carl Wittwer, Bruce Gale, 2007: Continuous-flow thermal gradient PCR, *Biomed Microdevices* (2008) 10:187–195, doi: 10.1007/s10544-007-9124-9
- ³¹ Chi-Yuan Shih, Yang Chen, Yu-Chong Tai, 2005: Parylene-strengthened thermal isolation technology for microfluidic system-on-chip applications, *Sensors and Actuators A* 126 (2006) 270–276, doi: 10.1016/j.sna.2005.09.024
- ³² Yi-Wen Chen, Hong Wang, Mateusz Hupert, Makgorzata Witek, Udara Dharmasiri, Maneesh R. Pingle, Francis Barany and Steven A. Soper, 2012: Modular microfluidic system fabricated in thermoplastics for the strainspecific detection of bacterial pathogens, *Lab Chip*, 2012, 12, 3348–3355, doi: 10.1039/c2lc40805h
- ³³ Naoki Nagatani, Keiichiro Yamanaka, Hiromi Ushijima, Ritsuko Koketsu, Tadahiro Sasaki, Kazuyoshi Ikuta, Masato Saito, Toshiro Miyahara and Eiichi Tamiya, 2011: Detection of influenza virus using a lateral flow immunoassay for amplified DNA by a microfluidic RT-PCR chip, *Analyst*, 2012, 137, 3422, doi: 10.1039/c2an16294f
- ³⁴ Ilija Pjescic and Niel Crews, 2012: Genotyping from saliva with a one-step microdevice, *Lab Chip*, 2012, 12, 2514–2519, doi: 10.1039/c2lc00010e
- ³⁵ QingQing Cao, Min-Cheol Kim, and Catherine M. Klapperich, 2012: Plastic microfluidic chip for continuous-flow polymerase chain reaction: Simulations and experiments, *Biotechnol J.* 2011 February ; 6(2): 177–184. doi: 10.1002/biot.201000100.
- ³⁶ Chiyang Yu, Wenshian Liang, Iching Kuan, Chehung Wei, Weiguo Gu, 2006: Fabrication and characterization of a flow-through PCR device with integrated chromium resistive heaters, *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers* 38 (2007) 333–339, doi: 10.1016/j.jcice.2007.05.001
- ³⁷ Kyudong Han, Tae Yoon Lee, Dimitris E. Nikitopoulos, Steven A. Soper, Michael C. Murphy, 2011: A vertically stacked, polymer, microfluidic point mutation analyzer: Rapid high accuracy detection of low-abundance K-ras mutations, *Analytical Biochemistry* 417 (2011) 211–219, doi: 10.1016/j.ab.2011.06.030
- ³⁸ Yuyuan Li, Chunsun Zhang, Da Xing, 2010: Integrated microfluidic reverse transcription-polymerase chain reaction for rapid detection of food- or waterborne pathogenic rotavirus, *Analytical Biochemistry* 415 (2011) 87–96, doi: 10.1016/j.ab.2011.04.026
- ³⁹ Yuyuan Li, Da Xing, Chunsun Zhang, 2008: Rapid detection of genetically modified organisms on a continuous-flow polymerase chain reaction microfluidics, *Analytical Biochemistry*, 385, 2009, 42–49, doi: 10.1016/j.ab.2008.10.028
- ⁴⁰ Bowen Shu, Chunsun Zhang, Da Xing, 2012: Highly sensitive identification of foodborne pathogenic *Listeria monocytogenes* using single-phase continuous-flow nested PCR microfluidics with on-line fluorescence detection, 2012, *Microfluid Nanofluid*, doi: 10.1007/s10404-013-1138-4
- ⁴¹ Ivan Erill, Susana Campoy, Nadina Erill, Jordi Barbé, Jordi Aguiló, 2002: Biochemical analysis and optimization of inhibition and adsorption phenomena in glass–silicon PCR-chips, *Sensors and Actuators B* 96 (2003) 685–692, doi: 10.1016/S0925-4005(03)00522-7

-
- ⁴² Chunsun Zhang and Da Xing, 2006: Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends, *Nucleic Acids Research*, 2007, vol. 35, no. 13 4223–4237, doi: 10.1093/nar/gkm389
- ⁴³ T. Maturos, T. Pogfay, S. Mongpraneet, A. Wisitsoraat, T. Lomas, and A. Tuantranont, 2009: Temperature cycle and surface treatment study of thermoelectric based micro PCR, proceedings of the 2010 5th IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems January 20-23, Xiamen, China
- ⁴⁴ John P. Hilton, ThaiHuu Nguyen, Mihaela Barbu, Renjun Pei, Milan Stojanovic, Qiao Lin, 2012: Bead-based polymerase chain reaction on a microchip, *Microfluid Nanofluid*, 2012, doi: 10.1007/s10404-012-0993-8
- ⁴⁵ Young Shik Shin, Keunchang Cho, Sun Hee Lim, Seok Chung, Sung-Jin Park, Chanil Chung, Dong-Chul Han and Jun Keun Chang, 2003: PDMS-based micro PCR chip with Parylene coating, *J. Micromech. Microeng.* 13 (2003) 768–774, PII: S0960-1317(03)61077-6
- ⁴⁶ Penvipha Satsanarukkit, Hsiwen Lo, and Yu Chong Tai: A free-standing and flexible parylene PCR device, *NEMS 2012*, Kyoto, JAPAN, March 5-8, 2012
- ⁴⁷ Braden C. Giordano, Ebony R. Copeland, James P. Landers, 2000: Towards dynamic coating of glass microchip chambers for amplifying DNA via the polymerase chain reaction, *Electrophoresis* 2001, 22, 334-340
- ⁴⁸ Zhang-Run Xu, Xin Wang, Xiao-Feng Fan, Jian-Hua Wang, 2009: An extrusion fluidic driving method for continuous-flow polymerase chain reaction on a microfluidic chip, *Microchim Acta* (2010) 168:71–78, doi: 10.1007/s00604-009-0262-z
- ⁴⁹ Y. Sun, Y. C. Kwok, N. T. Nguyen, : A novel circular ferro-fluid driven flow-through microchip for rapid DNA amplifikation, *TRANSDUCERS & EUROSENSORS*, 2007, International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, Lyon, France, June 10-14, 2007
- ⁵⁰ Jifeng Chen, Musundi Wabuyele, Hengwu Chen, Donald Patterson, Mateusz Hupert, Hamed Shadpour, Dimitris Nikitopoulos, and Steven A. Soper, 2004: Electrokinetically synchronized polymerase chain reaction microchip fabricated in polycarbonate, *Anal. Chem.* 2005, 77, 658-666
- ⁵¹ Pin-Chuan Chen, Daniel S. Park, Byoung-Hee You, Namwon Kim, Taehyun Park, Steven A. Soper, Dimitris E. Nikitopoulos, Michael C. Murphy, 2009: Titer-plate formatted continuous flow thermal reactors: Design and performance of a nanoliter reactor, *Sensors and Actuators B* 149 (2010) 291–300, doi: 10.1016/j.snb.2010.05.068
- ⁵² K.H. Chung, Y.H. Choi, B.K. Kim, and G.Y. Sung: Fast PCR utilizing buoyant convection in a disposable chip, *MEMS 2011*, Cancun, MEXICO, January 23-27, 2011
- ⁵³ Chunsun Zhang, Jinliang Xu, Wenli Ma, Wenling Zheng, 2005: PCR microfluidic devices for DNA amplification, *Biotechnology Advances* 24 (2006) 243–284, doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.10.002
- ⁵⁴ P. A. Auroux, P. J. R. Day, A. Manz: Sample-shunting based PCR microfluidic Device, *NSTI-Nanotech* 2004, www.nsti.org, ISBN 0-9728422-7-6 vol. 1, 2004
- ⁵⁵ Jeff Chiou, Paul Matsudaira, Ain Sonin, and Daniel Ehrlich, 2000: A closed-cycle capillary polymerase chain reaction machine, *Anal. Chem.* 2001, 73, 2018-2021

-
- ⁵⁶ Chunsun Zhang, Haiying Wang, Da Xing: Multichannel oscillatory-flow multiplex PCR microfluidics for high-throughput and fast detection of foodborne bacterial pathogens, *Biomed Microdevices*, 2011, 13:885–897, doi: 10.1007/s10544-011-9558-y
- ⁵⁷ Dayu Liu, Guangtie Liang, Xiuxia Lei, Bin Chen, Wei Wang, Xiaomian Zhou, 2011: Highly efficient capillary polymerase chain reaction using an oscillation droplet microreactor, *Analytica Chimica Acta* 718, 2012, 58– 63, doi: 10.1016/j.aca.2011.12.066
- ⁵⁸ Tohru Suwa, Hamid Hadim ans Yong Shi: Multidisciplinary design and optimization for oscillating flow polymerase chain reaction microfluidics device, ASME 2009 International Mechanical Engineering Congress and Exposition, vol. 2: Biomedical and Biotechnology Engineering, Lake Buena Vista, Florida, USA, November 13–19, 2009, IMECE2009-11820, pp. 187-193; 7 pages, doi: 10.1115/IMECE2009-11820
- ⁵⁹ D. Sugumar, Asma Ismail, Manickam Ravichandran, Ismail Aziah, and L. X. Kong, 2010: Amplification of SPPS150 and Salmonella typhi DNA with a high throughput oscillating flow polymerase chain reaction device, *BIOMICROFLUIDICS* 4, 024103 (2010)
- ⁶⁰ Wei Wang, Zhi-Xin Li, Rong Luo, Shu-Hai Lü, Ai-Dong Xu and Yong-Jun Yang, 2004: Droplet-based micro oscillating-flow PCR chip, *J. Micromech. Microeng.* 15, (2005), 1369–1377, doi: 10.1088/0960-1317/15/8/001
- ⁶¹ Lin Chen, Jonathan West, Pierre-Alain Auroux, Andreas Manz, and Philip J. R. Day, 200007: Ultrasensitive PCR and real-time detection from human genomic samples using a bidirectional flow microreactor, *Anal. Chem.* 2007, 79, 9185-9190
- ⁶² Roche diagnostics GmbH; Germany; Roche LightCycler 480; Real-Time PCR machine
- ⁶³ B. T. Chia, S.-A. Yang, M.-Y. Cheng, C.-W. Lin and Y.-J. Yang, 2011: A self-contained portable polymerase-chain-reaction system integrated with electromagnetic mini-actuators for bi-directional fluid transport. *Journal of Mechanics*, 27, pp 357-364 doi: 10.1017/jmech.2011.38
- ⁶⁴ Jiri George Drobný: Thermoplastic Polyurethane Elastomers. Handbook of thermoplastic elastomers, 2007, 9, pp 215-234, Publisher William Andrew, ISBN-13: 978-0-8155-1549-4
- ⁶⁵ Epurex films; Bayer MaterialScience AG; Leverkusen; Germany; Walopur®
- ⁶⁶ Laser Systems GmbH; München; Deutschland; LS 9000
- ⁶⁷ Thomas Brettschneider, 2013: Combining polymer microfluidics with electrical functionality: Novel perspectives for the Bosch lab-on-chip platform, Dissertation 2014, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, Germany
- ⁶⁸ Bayer MaterialScience AG; Leverkusen; Germany; Makrolon®
- ⁶⁹ Leister AG, Schweiz; Novolas WS-AT Laser Systems
- ⁷⁰ Favia Pietro, Fracassi Francesco, d'Agostino Ricardo: Plasma processing of polymers, Springer Netherlands 1997, ISBN 978-0-7923-4859-7
- ⁷¹ Karlsruher-Institut für Technologie KIT; Karlsruhe; Deutschland; Parylene C Beschichtung
- ⁷² Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB; Stuttgart; Deutschland; PTFE Beschichtung
- ⁷³ Comsol Multiphysics; Version 4.3; Comsol Multiphysics GmbH; 37073 Göttingen, Deutschland

-
- ⁷⁴ Haidenhain MT25; Encoders UK Ltd; West Midlands B75 7BU; Großbritannien
- ⁷⁵ Frank Teichmann: Untersuchung eines Mikroventils und eines mikrofluidischen Netzwerks zur Probenaufbereitung, Diplomarbeit 2012, Robert-Bosch GmbH, Schillerhöhe, Germany
- ⁷⁶ Steffen Hardt and Friedhelm Schönfeld: Microfluidic technologies for miniaturized analysis systems, 2007 Springer Science+Business Media, LLC, ISBN 978-0-387-28597-9
- ⁷⁷ Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland; DNA workstation, Nr. L-020-XL-GC
- ⁷⁸ Farnell GmbH, Aschheim, Deutschland; Thermoelement, Typ K; Nr. XF-321-FAR
- ⁷⁹ Minco Europa, Aston, Frankreich; Heizwiderstände, 6,4x19,1 mm; Nr. HK5567R20.0L12D
- ⁸⁰ RS Components GmbH; Mörfelden-Walldorf; Panasonic; Thermosicherungen; +145° C; Nr. EYP2BH145
- ⁸¹ RS Components GmbH; Mörfelden-Walldorf; Lüfter; DC 12V; KDE1204PFVX
- ⁸² Festo AG & Co. KF; Esslingen; Deutschland; Ventilbank; 40 Ventile; Nr. MH1-A-24VDC-C-HC-20V-PR-K05-LED-N-QB-AC-BC-CC-DC
- ⁸³ Festo AG & Co. KF; Esslingen; Deutschland; Kapazitäten; 100 ml; Nr. CRVZS-0.1
- ⁸⁴ Festo AG & Co. KF; Esslingen; Deutschland; Drosselventile; GRLO M3
- ⁸⁵ National Instruments Germany GmbH; München; Deutschland
- ⁸⁶ Farnell GmbH; Aschheim; Deutschland; TRACOPOWER, DC 24 V zu 12 V Wandler, Nr. TEP 150-2412WI
- ⁸⁷ VWR International GmbH; Deutschland; Filter, PTFE Membran; 0,2 µmx25 mm; Nr. 100 514-0070
- ⁸⁸ Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland; Mastercycler gradient, sample capacity 96 well; Sn: 5331YN056729
- ⁸⁹ Farnell GmbH; Aschheim; Deutschland; Thermoelemente, Typ T Klasse 1, Nr. ZO-PFA-T-1 X 5
- ⁹⁰ VWR International GmbH; Deutschland; 2-Propanol; VLSI Selectipur; BASF; VWR: 51152037
- ⁹¹ VWR International GmbH; Deutschland; Tuch; KIMTECH SCIENCE; VWR: 115-2235
- ⁹² VWR International GmbH; Deutschland; Trockenbeutel; Silicagel Rubin Trockenbeutel; Sigma-Aldrich; VWR: SIAL72811-1KG-F
- ⁹³ Sotirios Tsiodras, Howard S Gold, George Sakoulas, George M Eliopoulos, Christine Wennersten, Lata Venkataraman, Robert C Moellering Jr, Mary Jane Ferraro: Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*, *Lancet* 2001; 358: 207–08
- ⁹⁴ Tomasz A. Leski and Alexander Tomasz, 2004: Role of Penicillin-Binding Protein 2 (PBP2) in the antibiotic susceptibility and cell wall cross-linking of *staphylococcus aureus*: Evidence for the cooperative functioning of PBP2, PBP4, and PBP2A, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Mar. 2005, p. 1815–1824, doi: 10.1128/JB.187.5.1815–1824.2005
- ⁹⁵ Teruyo Ito, Yuki Katayama, Kazumi Asada, Namiko Mori, Kanae Tsutsumimoto, Chuntima Tiensasitorn, and Keiichi Hiramatsu, 2000: Structural comparison of three types of *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, May 2001, p. 1323–1336, doi: 10.1128/AAC.45.5.1323–1336.2001
- ⁹⁶ A. Huletsky, R. Giroux, V. Rossbach, M. Gagnon, M. Vaillancourt, M. Bernier, F. Gagnon, K. Truchon, M. Bastien, F. J. Picard, A. van Belkum, M. Ouellette, P. H. Roy, and M. G. Bergeron, 2003: New real-time PCR assay for rapid detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a

mixture of Staphylococci; *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, May 2004, p. 1875–1884, doi: 10.1128/JCM.42.5.1875–1884.2004

⁹⁷ W. Witte, C. Braulke, C. Cuny, B. Strommenger, G. Werner, D. Heuck, U. Jappe, C. Wendt, H.-J. Linde, D. Harmsen: Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Panton–Valentine leukocidin genes in central Europe, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2005) 24: 1–5, doi: 10.1007/s10096-004-1262-x

⁹⁸ Odd G. Brakstad, Kjetill Aasbakk, and Johan A. Maeland, 1991: Detection of staphylococcus aureus by polymerase chain reaction amplification of the nuc Gene, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, JULY 1992, p. 1654-1660

⁹⁹ GE-Life Sciences PuReTaq Hot Start Ready-To-Go PCR Beads; GE Healthcare Europe GmbH; Nr.: 28-9006-53

¹⁰⁰ Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland; Wasser; Nr.: T143.3

¹⁰¹ Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland; Tween80; Nr.: 4859.1

¹⁰² Hans Wiech, Johannes Buchner, Richard Zimmermann, & Ursula Jakob, 1992: HSP90 chaperones protein folding in vitro, *Nature* vol. 358, 1992

¹⁰³ Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham; MA; USA; Nano Drop products; NanoDrop 2000

¹⁰⁴ Life Technologies GmbH; Darmstadt; Deutschland; Real time PCR system Applied Biosystems® 7500

¹⁰⁵ Christian A. Heid, Junko Stevens, Kenneth J. Livak, and P. Mickey Williams, 1996: Real time quantitative PCR, *Genome Res.* 1996, 6: 986-994, doi: 10.1101/gr.6.10.986

¹⁰⁶ Russell Higuchi, Carita Fockler, Gavin Dollinger, and Robert Watson, 1993: Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nature Biotechnology*, 11(9):1026–1030, September 1993.

¹⁰⁷ I. A. Nazarenko, S. K. Bhatnagar, R. J. Hohman, 1997: A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer, *Nucl. Acids Res.* 1997, 25: 2516-2521, doi: 10.1093/nar/25.12.2516.

¹⁰⁸ Stephen A. Bustin, Vladimir Benes, Jeremy A. Garson, Jan Helleman, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, Tania Nolan, Michael W. Pfaffl, Gregory L. Shipley, Jo Vandesompele, and Carl T. Wittwer: The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clinical Chemistry*, April 2009 vol. 55, no. 4 611-622, doi: 10.1373/clinchem.2008.112797

¹⁰⁹ Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham; MA; USA; Lifetechnologies; Bild:

<http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-instruments/7500-fast-real-time-pcr-system.html>, 05.2014

¹¹⁰ Life Technologies GmbH; Darmstadt; Deutschland; Applied Biosystems; 2720 Thermal Cycler; Software 2.09

¹¹¹ Monika Jansohn, Sophie Rothhämel: Gentechnische Methoden, Springer Verlag 2012, pp 531-555, ISBN: 978-3-8274-2429-7

¹¹² Michael J. Heller: DNA microarray technology: Devices, systems, and applications, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2002. 4:129–53, doi: 10.1146/annurev.bioeng.4.020702.153438

¹¹³ Microarray standards at last, *Nature* vol. 419, no. 6905, p323 (26 September 2002), doi: 10.1038/419323a

- ¹¹⁴ Mark Schena, Dari Shalon, Renu Heller, Andrew Chai, Patrick O. Brown, and Ronald W. Davis: Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 93, pp. 10614-10619, October 1996, Biochemistry
- ¹¹⁵ Joseph Wang, 2000: Survey and summary from DNA biosensors to gene chips, *Nucleic Acids Research*, 2000, vol. 28, no. 16 3011-3016
- ¹¹⁶ Linda M. Weigel, Christine D. Steward and Fred C. Tenover, 1998: gyrA mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of enterobacteriaceae, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Oct. 1998, p. 2661–2667
- ¹¹⁷ Axel E. Nkodo, Jean M. Garnier, Bernard Tinland, Hongji Ren, Claude Desruisseaux, Laurette C. McCormick, Guy Drouin, Gary W. Slater, 2001: Diffusion coefficient of DNA molecules during free solution electrophoresis, *Electrophoresis* 22 (2001), S.2424-2432
- ¹¹⁸ Brazma A., Hingamp P., Quackenbush J., Sherlock G., Spellman P., Stoeckert C., Aach J., Ansorge W., Ball CA., Causton HC., Gaasterland T., Glenisson P., Holstege FC., Kim IF., Markowitz V., Matese JC., Parkinson H., Robinson A., Sarkans U., Schulze-Kremer S., Stewart J., Taylor R., Vilo J., Vingron M., 2001: Minimum information about a microarray experiment (MIAME)- toward standards for microarray data, *Nature Genetics* 29, 365 - 371 (2001), doi: 10.1038/ng1201-365
- ¹¹⁹ Judith E. Berlier, Anca Rothe, Gayle Buller, Jolene Bradford, Diane R. Gray, Brian J. Filanoski, William G. Telford, Stephen Yue, Jixiang Liu, Ching-Ying Cheung, Wesley Chang, James D. Hirsch, Joseph M. Beechem, Rosaria P. Haugland, and Richard P. Haugland: Quantitative comparison of long-wavelength alexa fluor dyes to Cy dyes: Fluorescence of the dyes and their bioconjugates, *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 51(12): 1699–1712, 2003, doi: 10.1177/002215540305101214
- ¹²⁰ Cronel Mülhardt: Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics, Spektrum akademischer Verlag, 6. Auflage, 2009, ISBN 978-3-8274-2036-7
- ¹²¹ Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham; MA; USA; Nano Drop products; NanoDrop 2000
- ¹²² Christine S. Booth, Elsje Pienaar, Joel R. Termaat, Scott E. Whitney, Tobias M. Louw, and Hendrik J. Viljoen: Efficiency of the polymerase chain reaction, *Chem Eng Sci*. 2010 September 1; 65(17): 4996–5006. doi: 10.1016/j.ces.2010.05.046.
- ¹²³ Weihong Liu and David A. Saint, 2002: Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294 (2002) 347–353, PII: S0 0 06 -2 9 1X(0 2)0 04 78 -3
- ¹²⁴ Daniel W. Tholen, Kristian Linnet, Marina Kondratovich, David A. Armbruster, Patricia E. Garrett, Robert L. Jones, Martin H. Kroll, Rudolf M. Lequin, Thomas J. Pankratz, G. A. Scassellati, Heinz Schimmel, Jane Tsai: Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation; Approved guideline, NCCLS document EP17-A, ISBN 1-56238-551-8. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004
- ¹²⁵ U. Linz, H. Degenhardt: Die Polymerase Kettenreaktion, Springer Verlag 1990, Naturwissenschaften 77,515- 530 (1990)
- ¹²⁶ Festo AG & Co. KF; Esslingen; Deutschland; Drosselventile GRLO, Mini

- ¹²⁷ Fabry, B. (1991), Tenside. Eigenschaften, Rohstoffe, Produktion, Anwendungen. *Chemie in unserer Zeit*, 25: 214–222. doi: 10.1002/ciuz.19910250407
- ¹²⁸ Julia Khandurina, Timothy E. McKnight, Stephen C. Jacobson, Larry C. Waters, Robert S. Foote, and J. Michael Ramsey, 1999: Integrated system for rapid PCR-based DNA analysis in microfluidic devices, *Anal. Chem.* 2000, 72, 2995–3000
- ¹²⁹ T B Christensen, C M Pedersen, K G Grøndahl, T G Jensen, A Sekulovic, D D Bang and A Wolff, 2007: PCR biocompatibility of lab-on-a-chip and MEMS materials, *J. Micromech. Microeng.* 17 (2007) 1527–1532, doi: 10.1088/0960-1317/17/8/015
- ¹³⁰ Promega GmbH; Mannheim; Germany; Kit M5005
- ¹³¹ Promega GmbH; Mannheim; Germany; Polymerase; Hot start; M500B
- ¹³² Promega GmbH; Mannheim; Germany; Puffer; 5X GoTaq® Flexi Green Buffer, Mg Free; M890
- ¹³³ Promega GmbH; Mannheim; Germany; MgCL2, 25 mM; M891
- ¹³⁴ Stefan Haeberle and Roland Zengerle, 2007: Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications, *Lab Chip*, 2007, 7, 1094–1110, doi: 10.1039/b706364b
- ¹³⁵ Curtis D. Chin, Vincent Linder and Samuel K. Sia, 2011: Commercialization of microfluidic point-of-care diagnostic devices, *Lab Chip*, 2012, 12, 2118–2134, doi: 10.1039/c2lc21204h
- ¹³⁶ Amir M. Foudeh, Tohid Fatanat Didar, Teodor Veres and Maryam Tabrizian, 2012: Microfluidic designs and techniques using lab-on-a-chip devices for pathogen detection for point-of-care diagnostics, *Lab Chip*, 2012, 12, 3249–3266, doi: 10.1039/c2lc40630f
- ¹³⁷ Oliver Strohmeier, Nico Marquart, Daniel Mark, Günter Roth, Roland Zengerle and Felix von Stetten, 2013: Real-time PCR based detection of a panel of foodborne pathogens on a centrifugal microfluidic “LabDisk” with on-disk quality controls and standards for quantification, *Anal. Methods*, 2014, 6, 2038, doi: 10.1039/c3ay41822g
- ¹³⁸ Sascha Lutz, Patrick Weber, Max Focke, Bernd Faltin, Jochen Hoffmann, Claas Müller, Daniel Mark, Günter Roth, Peter Munday, Niall Armes, Olaf Piepenburg, Roland Zengerle and Felix von Stetten, 2009: Microfluidic lab-on-a-foil for nucleic acid analysis based on isothermal recombinase polymerase amplification (RPA), *Lab Chip*, 2010, 10, 887–893, doi: 10.1039/b921140c
- ¹³⁹ Tae-Hyeong Kim, Juhee Park, Chi-Ju Kim, and Yoon-Kyoung Cho, 2013: Fully integrated Lab-on-a-Disc for nucleic acid analysis of food-borne Pathogens, *Anal. Chem.* 2014, 86, 3841–3848, doi: 10.1021/ac403971h
- ¹⁴⁰ Charles E. Nwankire, Monika Czugala, Robert Burger, Kevin J. Fraser, Triona M. O'Connell, Thomas Glennon, Blessing E. Onwuliri, Isikaku E. Nduaguibe, Dermot Diamond, Jens Ducreé, 2013: A portable centrifugal analyser for liver function screening, *Biosensors and Bioelectronics* 56 (2014) 352–358, doi: 10.1016/j.bios.2014.01.031.
- ¹⁴¹ Dafeng Chen, Michael Mauk, Xianbo Qiu, Changchun Liu, Jitae Kim, Sudhir Ramprasad, Serge Ongagna, William R. Abrams, Daniel Malamud, Paul L. A. M. Corstjens, Haim H. Bau: An integrated, self-contained microfluidic cassette for isolation, amplification, and detection of nucleic acids, *Biomed Microdevices* (2010) 12:705–719, doi: 10.1007/s10544-010-9423-4

-
- ¹⁴² Andrew C. Hatch, Tathagata Ray, Kelly Lintecum and Cody Youngbull, 2013: Continuous flow real-time PCR device using multi-channel fluorescence excitation and detection, *Lab Chip*, 2014, 14, 562, doi: 10.1039/c3lc51236c
- ¹⁴³ GE-Life Sciences PuReTaq Hot Start Ready-To-Go PCR Beads; GE Healthcare Europe GmbH; Nr.: 28-9006-53
- ¹⁴⁴ Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland; Tween80; Nr.: 4859.1
- ¹⁴⁵ Roche Diagnostics GmbH; Mannheim; Deutschland; Fast start universal probe master (ROX); Nr.: 04914058001
- ¹⁴⁶ Roche Diagnostics GmbH; Mannheim; Deutschland
- ¹⁴⁷ AppliChem GmbH; Darmstadt; Deutschland; Nr.: A1396,1000
- ¹⁴⁸ AppliChem GmbH; Darmstadt; Deutschland; Nr.: A2248,0005
- ¹⁴⁹ AppliChem GmbH; Darmstadt; Deutschland; Nr.: A1430,0010
- ¹⁵⁰ AppliChem GmbH; Darmstadt; Deutschland; Nr.: A2263,0100
- ¹⁵¹ Informationen liegen in Kompetenzfeld eines Projektpartners und werden nicht veröffentlicht