

Kurzfassung

Das Design und die Implementierung miniaturisierter Systeme für die Analyse von Nukleinsäuren aus verschiedenen biologischen Proben haben eine beträchtliche Entwicklung erlebt. Fortschritte wurden insbesondere bei der Integration der Nukleinsäure-Vervielfältigung und –Detektion gemacht, wobei die Vervielfältigung meistens auf der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) beruht. Die Probenvorbereitung bleibt ein Haupthemmnis bei dem Versuch, eine quantitative Analyse mit vollständig miniaturisierten Systemen zu verwirklichen. Miniaturisierte Geräte für die Probenvorbereitung, Vervielfältigung und Detektion von Nukleinsäuren müssen weiter entwickelt werden, um ein vollständig integriertes System zu verwirklichen, das letztendlich in der Lage ist, die Genomanalyse einzelner Zellen mit „sample-in-answer-out“-Fähigkeit durchzuführen.

In dieser Arbeit werden drei miniaturisierte Systeme präsentiert, die jeweils für die DNA-Aufreinigung und –Vorkonzentrierung, deren Vor-Vervielfältigung und Langzeit-Speicherung bzw. der Vervielfältigung mit Echtzeitdetektion von DNA verwendet werden können. Das erste miniaturisierte System nutzt die Isotachophorese zur Vorbehandlung der DNA, bei der die DNA-Probe in einem diskontinuierlichen Elektrolytssystem gereinigt und aufkonzentriert werden kann. Dabei können sowohl qualitative als auch quantitative Informationen simultan aufgenommen werden. Das zweite miniaturisierte System verwendet die simple Methode der isothermischen *Multiplen Displacement Amplification* (MDA) für die Vervielfältigung des gesamten Genoms (*Whole Genome Amplification*, WGA) der humanen, genomischen DNA. Der miniaturisierte WGA-Prozess zeigte eine hohe Effizienz von 95,8% und die Wiedergabetreue des vervielfachten Produkts ist extrem hoch, was durch die Ergebnisse einer *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) Analyse angedeutet wurde. Für des letzte System entwickelten wir ein kleines bidirektionales shunting-PCR-Instrument, in dem die injizierte DNA durch eine temperierte Zone mehrfach hin und her verschoben wird. Ausgestattet mit einem Fluoreszenz Detektor, erreicht man eine höhere Flexibilität und schnelle Temperaturzyklen, und kombiniert so die Vorteile der stationären PCR und der Durchfluss-PCR. Eine Echtzeitdetektion der RNase-P-PCR-Vervielfältigung von niedrig konzentrierter, humaner genomischer DNA mit einem Minimum von ~24 Kopien oder 12 Zellen wurde erreicht.

Die drei in dieser Arbeit beschriebenen Systeme können direkt an aktuelle miniaturisierte Aufbauten angepasst werden. Ein solches vollständig integriertes, zur quantitativen

Nukleinsäure-Analyse fähiges Gerät bleibt ein Mysterium, und zusammen mit weiteren Verbesserungen wäre es von großer Bedeutung für die Entwicklung von point-of-care Geräten.