

PCR auf dem Chip – Schnellere Analysen in den Life Sciences mit einem innovativen Ansatz



Claudia Gärtner



Thomas Clemens¹



Regina Hartung²



Stefanie Kirsch³



Richard Klemm³



Michael Köhler²



Ines Twers³

Ein neues Konzept für die PCR erlaubt die Vervielfältigung von DNA in weniger als 10 min im Vergleich zu mehr als einer halben Stunde in konventionellen Systemen. PCR – die Polymerrasekettenreaktion: Die Amplifikation von Nukleinsäuren mit einem hitzestabilen Enzym ist eine der dominierenden Technologien in den Life Sciences seitdem diese Reaktion im Jahr 1993 zu Nobel-Preis-Ehren gelangte. Das zugrunde liegende Konzept der PCR ist die Nutzung von drei verschiedenen Temperaturzonen: In der ersten Zone – der so genannten Denaturierungszone – wird die doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge getrennt, in der nächsten Temperaturzone – Annealing Zone – werden kleine Stücke komplementärer DNA – die so genannten Primer – an den DNA-Einzelstrang angelagert. In der dritten Temperaturzone – Elongationszone – arbeitet das Enzym Polymerase, um von den beiden Einzelsträngen zwei Doppelstränge zu erhalten. Dieser Zyklus wird 15–40 Mal durchlaufen, jedes Mal mit einer Verdopplung der DNA-Zielmoleküle.

In konventionellen Systemen wird die komplette Probe einschließlich des Reaktionsgefäßes hochgeheizt und heruntergekühlt, wobei die Wärmezu- und -abführung der zeitlimitierende Schritt ist. In dem Lab-on-a-Chip-PCR-System wird die Probe durch drei unterschiedliche, aber konstante Temperaturzonen gepumpt, die in dem entsprechenden Betriebsgerät, dem Thermocycler, vorgehalten werden. In diesem Fall wird die Probe, die ein sehr viel kleineres Volumen besitzt, lediglich hochgeheizt und heruntergekühlt, was deshalb deutlich schneller erfolgt. Ein Chipdesign arbeitet im kontinuierlichen Fluss /1/ mit einem Fluidsystem, das bereits die Anzahl der PCR-Zyklen vorgibt. Die PCR-Lösung wird mit kontinuierlichem Fluss durch den Chip gefördert. Abbildung 1 (links) zeigt

diesen Chip. Eine andere Möglichkeit zur Durchführung der Chip-PCR ist, die PCR-Lösung von einer zur nächsten Temperaturzone zu pumpen und nach dem Durchlaufen eines Zyklus wieder zurück zu saugen, um mit dem nächsten Zyklus zu starten. Mit diesem Chip-Typ, s. Abb. 1 (rechts), kann die Anzahl der Zyklen für jede Reaktion frei gewählt werden.

Um die PCR auf dem Chip in der Handhabung einfach zu gestalten, sind die Fluidanschlüsse, das Chip-to-world-Interface, direkt auf den Chip integriert, der kostengünstig mittels Mikrospritzguss gefertigt wird.

Speziell für die Lab-on-a-Chip-Anwendungen wurde ein neuer Thermocycler entwickelt, der nicht nur die Möglichkeit bietet, die Temperaturzonen auf gleichbleibender Temperatur zu belassen, sondern auch unabhängig voneinander zu cyclen. In dem im kontinuierlichen Fluss arbeitenden PCR-Chip aus Polycarbon wurden Amplifikationen von DNA erfolgreich durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3 dokumentiert. Die Banden aus Spalte 4–6 wurden bei unterschiedlichen PCR-Bedingungen erhalten. Die Kombination von PCR-Chip und Thermocycler ermöglicht einen innovativen Weg zur Durchführung der PCR. Insbesondere ist durch das Chip-Prinzip die Integration weiterer vor- oder nachgeschalteter Prozesse auf dem Chip möglich, was der größte Vorteil der Chip-PCR ist.

Ein Teil der Ergebnisse stammt aus den Projekten μ Flubak und Zellex.

Literatur:

- /1/ Poser, S.; Schulz, T.; Dillner, U.; Baier, V.; Köhler, J. M.: "Chip elements for fast thermocycling", EuroSensors X–The 10th European Conference on Solid-State Transducers, Leuven, Belgium, 1996, 4, pp. 1197–1199.

PCR-on-a-chip – An innovative tool to speed up in life sciences

The novel concept of carrying out PCR on a chip allows the replication of DNA to be speeded up a process lasting more than half an hour in conventional systems to much less than 10 minutes in the new PCR system. PCR – Polymerase Chain Reaction: the amplification of nucleic acids by a thermostable enzyme has been one of the dominating technologies in the life sciences since its Nobel Prize winning year 1993. The underlying concept of PCR is the use of three different temperature zones, where in the first – so called denaturation zone – the double stranded DNA is separated, in the second – annealing zone – small pieces of complementary DNA, the primers, attach to the single DNA strands. Finally, during the elongation zone the enzyme polymerase generates two double strands of DNA, each one consisting of one original template and one newly replicated single strand. This cycle is carried out 15–40 times, each time doubling the number of target DNA molecules. In conventional systems the complete reaction vessel is heated up and cooled down and the

heat transfer is the time limiting step. In the new system, the sample is moved through three different but constant temperature zones on an instrument called a thermocycler. In this case only the sample is heated up and cooled down, which having a much smaller volume can therefore undergo much faster temperature changes. One chip works in continuous flow /1/ mode with a fluidic system which already defines the number of PCR-cycles. The PCR solution is pumped in a continuous flow through the whole chip. This chip is shown in Fig. 1 (left). Another way to run PCR on the chip is to pump the PCR solution from one temperature zone to the next, and after each complete temperature cycle the solution is sucked back to start the temperature cycle once again. With this chip type, see Fig. 1 (right), the number of cycles can be freely defined for each reaction.

To make these PCR chips easy to use, the fluidic interface – the chip-to-world-interface – is directly integrated into the microfluidic chips and moreover, this system can be realized in a cost-efficient way by injection molding.

A novel thermocycler specially adapted to Lab-on-a-chip applications was developed that, not only allows the temperature zones to be kept at constant temperatures, but also permits the individual control of their cycling. With the continuous flow PCR-chip the amplification is carried out in a chip made from polycarbonate. Successful amplification is documented in Fig. 3 where lanes 4–6 represent different PCR conditions which led to an amplification of the DNA in the continuous flow chip. The package PCR-chip and thermocycler offers an innovative way to carry out PCR. In particular this system offers the potential to combine further steps before or after the PCR on the chip. This is the outstanding advantage of chip-PCR for further systems.

Parts of the work have been carried out within the projects μ Flubak and Zellex.

References:

- /1/ Poser, S.; Schulz, T.; Dillner, U.; Baier, V.; Köhler, J. M.: "Chip elements for fast thermocycling", Eurosensors X–The 10th European Conference on Solid-State Transducers, Leuven, Belgium, 1996, 4, pp. 1197–1199.

Abb. 1: Chip für die PCR im kontinuierlichen Fluss (links) und Chipdesign für das Pumpen und Zurücksaugen der PCR-Lösung (rechts).

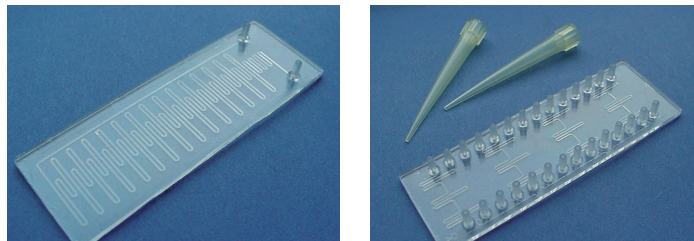


Fig. 1: PCR-chip for continuous flow PCR (left) and chip design for pumping the PCR solution forwards and backwards (right).

Abb. 2: Thermocycler mit drei verschiedenen Temperaturzonen, die unabhängig voneinander temperiert werden können.

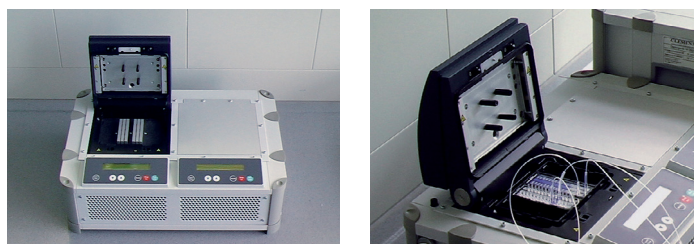


Fig. 2: Thermocycler with three temperature zones for individual cycling of each zone.

Abb. 3: DNA-Gel mit DNA-Standard (Spalte 1), PCR-Ansätzen ohne erfolgreiche PCR (Spalte 2 und 3) und PCR-Ansätzen mit unterschiedlichen Protokollen mit guter Amplifikation der DNA.

Fig. 3: DNA gel with standard (lane 1), PCR attempts where no amplification occurred (lanes 2 and 3), and PCR under conditions which led to a good amplification of the DNA template.

