

## Miniatur-Durchfluß-PCR: ein Durchbruch?

Haralabos Zorbas\*

Am 27. August 1998 veröffentlichte die Nachrichtenagentur Associated Press folgende Mitteilung: „TI verkündet einen technischen Durchbruch: Dallas – Texas Instruments Inc. behauptet, eine Halbleiter-Technologie entwickelt zu haben, die auf winzigen Transistoren beruht und die es eines Tages ermöglichen könnte, Hörhilfen zu bauen, die klein genug sind, um direkt in das Innenohr implantiert zu werden. Der Texas-Instruments-Transistor sei so klein, daß mehr als 400 Millionen davon auf einen Chip von der Größe eines Fingernagels passen würden, sagten die Forscher am Mittwoch. Texas Instruments ließ verlauten, daß Produkte auf der Basis dieser Chips kleiner und leichter als herkömmliche Produkte sein würden, weniger Strom verbrauchen würden und Rechenoperationen viel schneller ausführen könnten. (...) Während Texas Instruments ankündigte, daß ihre Entwicklung der ‚kleinste‘ Transistor sein werde, teilten Forscher der Bell Laboratories – des Forschungs- und Entwicklungszweiges der in New Jersey ansässigen Lucent Technologies – im November mit, daß sie die ‚kleinsten, vollständig aus Metalloxid bestehenden Halbleiter-Transistoren der Welt‘ gebaut hätten. (...)“<sup>[1]</sup> Diese Nachrichten sind bezeichnend für die Feststellung, daß der menschliche Eifer, riesige Dinge wie Gebäude, Maschinen und Fahrzeuge zu bauen – von den Supermächten vor ein paar Jahrzehnten noch fieberhaft angetrieben – heutzutage anscheinend nur von der wachsenden Leidenschaft übertroffen werden kann, Funktionseinheiten bis hinunter zum Mikro- und Nanometermaßstab zu verkleinern. Dies jedoch nicht nur im Bereich der Elektrotechnik; offensichtlich hat der Siegeszug dieses Unterfangens auch die Chemie und die Biochemie erobert.

Wir alle wollen Zeit, Platz und Geld sparen. Während des letzten Jahrzehnts wurde eine Fülle von Miniatorsystemen untersucht, und einige Prototypen wurden entwickelt. Vorge stellt wurden insbesondere im Mikromaßstab gefertigte Geräte für den Transport von Flüssigkeiten („Microfluidics“, z.B. Pumpen und Ventile) sowie Mikrofiltrationssysteme, Mikrowärmeaustauscher und Mikroseparatoren, Mikromischer, Mikroreaktionskammern (für Übersichtsartikel siehe Lit. [2, 3]) sowie die durch ein elektrisches Feld gesteuerte

Hybridisierung von Nucleinsäuren auf Mikrochips.<sup>[4]</sup> Die Hochgeschwindigkeits-Kapillarelektrophorese (CE)<sup>[5]</sup> wurde erfolgreich zur Kapillar-array-Elektrophorese<sup>[6, 7]</sup> und für DNA-Analysen auf Chips auch zur zweidimensionalen Kapillar-array-Elektrophorese<sup>[8]</sup> weiterentwickelt. Die Chip-Technologie erwies sich ebenfalls als geeignet für die leistungsstarken DNA-Analysetechniken Ligasekettenreaktion (LCR)<sup>[9]</sup> und Polymerasekettenreaktion (PCR).<sup>[10]</sup> Überdies wurden Mikrosysteme mit mehreren, funktionell integrierten Eigenschaften entwickelt. Dazu gehören CE mit einer integrierten Proben-Injektionsvorrichtung für einen absolut reproduzierbaren Einspritzvorgang,<sup>[11]</sup> CE oder PCR-gekoppelte CE mit integrierter Echtzeit-Detektion,<sup>[12, 13]</sup> mit PCR gekoppelte Zellisolationssysteme unter Verwendung von Silikon-Mikrofilterkammern,<sup>[14]</sup> oder sogar noch komplexere Systeme, z.B. die Kombination einer Mikrodialyse-Einheit mit einer Mikro-Sammelleitung und integrierten Biosensoren für die Bestimmung von Glucose und Lactat in Verbindung mit passender Software.<sup>[15]</sup> Ein neues Paradigma für die genetische Analyse sind DNA-Chips, die mit Polynucleotiden dicht beladen sind. Sie dienen z.B. der Identifizierung von Genen, der gleichzeitigen Expressionsanalyse von Tausenden von Genen unter definierten Bedingungen sowie der Genotypisierung und DNA-Sequenzierung durch Hybridisierung, konfokales Epifluoreszenz-Scanning und anschließende Datenanalyse.<sup>[16]</sup> Diese letztgenannten Entwicklungen haben zu den miniaturisierten Totalanalyse-Systemen ( $\mu$ TAS) geführt, mit denen das Konzept des „Labors auf einem Chip“ verwirklicht wird (für neuere kritische Übersichten siehe Lit. [17–21]). Angaben der Firma Affymetrix (Santa Clara, Kalifornien) zufolge, einem Pionier bei der Herstellung von mit DNA beladenen Chips, ist es heute tatsächlich möglich, daß in einer Kassette aus Plastik, die kleiner ist als eine Kreditkarte, sieben verschiedene experimentelle Tätigkeiten ausgeführt werden, nachdem eine zuvor extrahierte DNA-Probe in eine Aufbewahrungskammer eingespritzt worden ist. Mit einem Computer-gesteuerten System wird die Probe an eine winzige Glaswand gebunden, gewaschen, wieder gelöst, amplifiziert, in RNA umgewandelt, markiert, fragmentiert und zu einem der Mikrorastertests dieser Firma weitergeleitet.<sup>[22]</sup>

Verglichen mit traditionellen Maschinen „normaler Größe“ schneiden Miniatorsysteme beeindruckend gut ab. Prozesse verlaufen ultraschnell (im Bereich von wenigen Sekunden bis Minuten),<sup>[12, 23]</sup> die analysierten Verbindungen werden

[\*] Priv.-Doz. Dr. H. Zorbas  
Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität  
Genzentrum  
Feodor-Lynen-Straße 25, D-81377 München  
Fax: (+49) 89-74017-448  
E-mail: zorbas@LMB.uni-muenchen.de

mit Empfindlichkeiten im Attomol- ( $10^{-18}$  mol)<sup>[12]</sup> oder sogar Zeptomolbereich ( $10^{-21}$  mol)<sup>[24]</sup> detektiert, und das Auflösungsvermögen der Mikrogeräte ist mit demjenigen herkömmlicher Systeme vergleichbar.<sup>[5, 25]</sup> Mikromaschinen ermöglichen also – wenngleich noch meilenweit von den außerordentlich kleinen Dimensionen ihrer elektronischen Wegbereiter entfernt – reproduzierbare und kostengünstige Produktionsverfahren,<sup>[26]</sup> die Arbeit mit sehr kleinen Probenvolumina (meist  $<10$   $\mu$ L) und die Verringerung von Reagentienmengen, sie haben hervorragende Wärmeleitfähigkeiten und ein schnelles Ansprechvermögen. Damit lassen sich automatisierte Assays und durch parallele Probenverarbeitung Hochdurchsatzanalysen durchführen. Offensichtlich können diese neuen analytischen Werkzeuge in der chemischen und medizinischen Analytik sehr hilfreich sein, besonders bei der Diagnose und der Erforschung von Krankheiten. Darüber hinaus kommen sie auch den Bedürfnissen der pharmazeutischen Industrie auf dem Gebiet der Arzneimittelentwicklung entgegen.

Die vielversprechenden Tugenden der biochemischen Mikromaschinen führten zu einer Welle der Begeisterung, die im Mai letzten Jahres durch die kühne und mitreißende Ankündigung von J. Craig Venter, Präsident des Institute for Genomic Research (Rockville, Maryland), zum Ausdruck gebracht wurde, das menschliche Genom in wesentlich kürzerer Zeit und zu einem Bruchteil der Kosten zu sequenzieren, die für das von der amerikanischen Regierung koordinierte Projekt geschätzt wurden.<sup>[27]</sup> Er setzt auf miniaturisierte, ohne Unterbrechung arbeitende „DNA-Taschensequenzierer“, die von Perkin-Elmer, dem weltgrößten Produzenten von automatischen Sequenziermaschinen, hergestellt werden.<sup>[22]</sup> Obwohl die notwendigen CE-Microfluidics von Perkin-Elmer noch in der Testphase sind und auch Zweifel darüber geäußert wurden, ob sie für diesen Zweck geeignet seien,<sup>[28]</sup> gaben David Burke und Mitarbeiter von der University of Michigan in Ann Arbor einen überzeugenden Vorgeschmack für die Verwirklichung dieses Vorhabens. Diese Forscher beschrieben kürzlich einen Chip für die DNA-Analyse, der die meisten Schritte, die für die Amplifikation der DNA und ihre Spaltung durch Restriktionsendonucleasen sowie für die DNA-Sequenzierung und die Detektion von einzelnen DNA-Fragmenten notwendig sind, in sich vereinigt und im Nanoliterbereich praktisch ohne menschliches Eingreifen ausführt.<sup>[26]</sup>

In jedem Fall treten aber bei den Microfluidics spezielle Probleme auf, mit denen man bei Maschinen normaler Größe nicht konfrontiert ist. Zum Beispiel stellen Handhabung und Verarbeitung von Mikroproben immer noch eine Herausforderung dar und weisen eine Reihe von Begleitproblemen auf, wie Probenverlust an den Wänden der Transfervorrichtungen, Verluste durch Verdunstung, Verlust von Probenbestandteilen während der Handhabung und Verarbeitung sowie das Entnehmen einer repräsentativen Probe aus einem inhomogenen Gemisch. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, daß die erwartete Analytkonzentration das Ausmaß der Miniaturisierung der Probe einschränkt.<sup>[2]</sup> Die Verkleinerung bedingt unweigerlich eine Verringerung der Oberflächen, die für eine effiziente chemische oder enzymatische Reaktion benötigt werden; diesem Problem kann jedoch

durch die Verwendung von porösem Silicium wirkungsvoll begegnet werden.<sup>[29]</sup> Zusätzlich ist noch besondere Vorsicht in bezug auf die Kompatibilität der neuen Materialien – soweit diese nicht aus Polyethylen bestehen – mit der gewünschten Reaktion geboten, z.B. bei einer PCR, die in auf Chips konstruierten Mikromaschinen stattfinden soll.<sup>[30]</sup> Ganz offensichtlich gibt es hier noch viele ungelöste Aufgaben.

Zusätzlich könnten nichttechnische Probleme eine schnelle Verbreitung und eine Anwendung der Microfluidics im größeren Maßstab gefährden oder verlangsamen. Insbesondere sind gerasterte DNA-Beschichtungen (DNA arrays) immer noch sehr teuer und müssen für eine Anwendung in der Medizin, z.B. um den Beginn einer Erkrankung festzustellen oder um die Medikation für Patienten mit besonderen genetischen Veranlagungen genau abzustimmen, „wind their way through clinical trials and regulatory approval“.<sup>[31]</sup> Darüber hinaus könnten Patentstreitigkeiten und Fragen über Eigentumsrechte auf Schlüsselaspekte der Technologie und auf Gensequenzen diesen neuen Goldrausch zum Stillstand bringen. Aber die Rechtsstreitigkeiten der Firmen und die Angst zu unterliegen fördern eigentlich auch das Aufkommen neuartiger Ideen und das Erfinden neuer Prinzipien.

Eine bedeutende neue Entwicklung in der Welt der Miniatursysteme wurde in diesem Zusammenhang von Kopp et al. (Zeneca/SmithKline Beecham, Großbritannien) in *Science* vom 15. Mai 1998 vorgestellt.<sup>[32a]</sup> Diese Autoren beschreiben einen PCR-Chip für die Amplifikation von DNA-Fragmenten im Durchflußverfahren. Der Glas-Mikrochip wurde im Alberta Microelectronic Centre in Kanada hergestellt und ist ca. 1 mm dick und ca. 4 cm lang und breit. Die PCR-Mischung wird zusammen mit der zu amplifizierenden DNA-Probe mit einer Präzisions-Spritzenpumpe unter gleichzeitigem und konstantem Pufferfluß durch eine winzige Öffnung in der Abdeckplatte in einen einzelnen Kanal eingebracht, der in den Glaschip eingätzt und 40  $\mu$ m tief, 90  $\mu$ m breit und 2.2 m lang ist (Abbildung 1 A). Der Kanal durchläuft 20mal drei verschiedene Temperaturzonen, die durch kontrollierte thermostatisierte Kupferblöcke auf

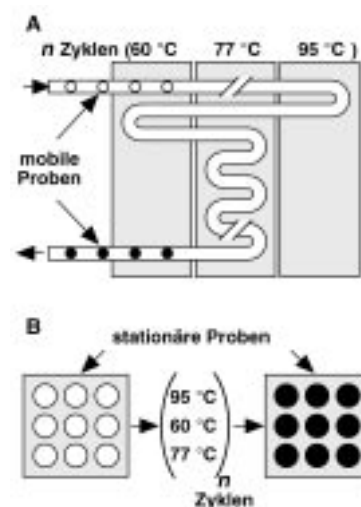


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Durchfluß-PCR (A) und der PCR nach dem klassischen Batch-Verfahren (B). ○ = Edukt-DNA (Templat), ● = Produkt-DNA (Amplifikat).

95 °C, 60 °C und 77 °C gehalten werden, wodurch ein thermischer Kreisprozeß von insgesamt 20 identischen Zyklen durchlaufen wird. Die Probe (10 µL) wird hydrostatisch durch den Kanal gepumpt, und das PCR-Produkt (ebenfalls 10 µL) wird an einer Austrittskapillare gesammelt. Die Analyse erfolgt durch eine konventionelle Gelelektrophorese. Durch Veränderung der Durchflußgeschwindigkeit in diesem System konnten zufriedenstellende Amplifikationen erreicht werden, d. h. einige Nanogramm des Endprodukts, eines 176 bp langen Fragmentes, nach nur 3–4 min Gesamtreaktionszeit, wobei ca.  $10^8$  Moleküle des Templats eingesetzt wurden. Die Durchflußgeschwindigkeiten lagen zwischen 5.8 und 72.9 nL s<sup>-1</sup>, was einer Gesamtamplifikationszeit von 18.8 bzw. 1.5 min für die 20 Zyklen entsprach.

Um diesen Bericht kritisch zu bewerten, müssen die vorgestellten Ergebnisse mit dem angestrebten Ziel der Arbeit sowie mit vorhandenen Alternativen verglichen werden. Ebenso muß eine Beurteilung im Hinblick auf mögliche Weiterentwicklungen erfolgen. Kopp et al. behaupten, ein Beispiel für einen „chemical amplifier“ präsentiert zu haben. Letzterer ist als ein System definiert, das ein schwaches Signal *kontinuierlich* verstärken sollte (kontinuierlicher Zu- und Abfluß von Material), und zwar um einen großen *konstanten* Faktor, also unabhängig von der ursprünglichen Größe oder Menge des Signals. Im Gegensatz zu elektronischen Verstärkern, die eine Vergrößerung von schwachen Signalen fast ohne Zeitverzögerung ermöglichen, benötigt die chemische Amplifikation jedoch Zeit, sowohl wegen des diffusionslimitierten Stofftransports als auch wegen der Abhängigkeit von der spezifischen Reaktivität der Verbindungen. Bei einem „echten“ chemischen Verstärker sollte aber, so wie von Kopp et al. gefordert, die Amplifikation auch mit *derselben* Zeitabhängigkeit erfolgen, also wiederum ungeachtet der Ausgangsgröße des Signals.

Meines Wissens ist dort zum ersten Mal eine Mikromaschine für eine Durchfluß-PCR beschrieben worden. Dieses Gerät vervielfältigt die Ausgangs-DNA in der Tat kontinuierlich, was durch eine Zeit-Raum-Umkehr erreicht wird: Die Temperatur wird an bestimmten Stellen konstant gehalten, und die Probe durchfließt diese verschiedenen Temperaturzonen. Normalerweise werden in konventionellen Thermocyclern die Proben, die sich an einem festen Ort befinden, abwechselnd aufgeheizt und abgekühlt<sup>[33]</sup> (Abbildung 1B). Zusätzlich führen diese Geräte die Amplifikation der Ziel-DNA in einer einzigen Charge (batch) aus, so daß man nicht von „echten“ chemischen Verstärkern sprechen kann. Noch wichtiger ist, daß man sie nicht mit anderen Systemen mit kontinuierlichem Fluß verknüpfen kann (siehe unten). Da gezeigt wurde, daß Kreuzkontamination anscheinend kein größeres Problem ist, könnte der Durchfluß-PCR-Chip für die serielle Injektion verschiedener zu analysierender Proben verwendet werden. Durch einmaliges Waschen mit Puffer zwischen zwei Durchläufen können die Proben kontinuierlich eine nach der anderen eingespritzt werden. Dies führt zu einem hohen Durchsatz, der bei anderen Mikrogeräten durch Parallelanordnung der einzelnen Elemente erzielt wird (siehe oben).

Betrachtet man jedoch die Forderung nach der Konstanz des Verstärkungsfaktors und einer gleichbleibenden Zeitab-

hängigkeit der Amplifikation, so sind die Leistungen des vorgestellten Mikrogerätes nicht ganz überzeugend. Keines dieser Merkmale wurde in diesem Bericht experimentell nachgewiesen. Überdies ist der Amplifikationsfaktor einer Ausgangs-DNA durchaus nicht einzig und allein durch die (konstante) Zahl von PCR-Zyklen festgelegt. Die theoretische Ausbeute einer PCR-Amplifikation wird nach Gleichung (1) berechnet, wobei  $N$  die Zahl der vervielfältigten

$$N = N_0 2^n \quad (1)$$

Moleküle (PCR-Produkt),  $N_0$  die Zahl der ursprünglich vorhandenen Moleküle vor der Amplifikation (Templat) und  $n$  die Zahl der Zyklen ist. Nach dieser idealen Gleichung verdoppelt sich in der Tat die Zahl der Moleküle mit jedem Zyklus. Jedoch wird in der Praxis das Ergebnis der Amplifikation besser durch Gleichung (2) beschrieben, wobei  $E$  die

$$N = N_0 (1 + E)^n \quad (2)$$

Effizienz der Reaktion darstellt, die jeden Wert zwischen 0 und 1 annehmen kann. Experimentell wurden für eine optimierte PCR Werte von 0.8 bis 0.9 für  $E$  gefunden.<sup>[34]</sup> Überdies fällt gegen Ende einer PCR  $E$  stark ab, da die Komponenten des Reaktionsansatzes verbraucht werden, die Polymeraseaktivität abnimmt usw. Aus diesen Gründen ist eine Amplifikation über eine Zahl von ungefähr  $10^{13}$  Molekülen als Endprodukt einer einzigen PCR hinaus normalerweise nicht möglich. Wegen der Nichtlinearität der Amplifikation suchte man in den letzten Jahren nach Möglichkeiten, wie solche Abweichungen quantitativ festgestellt und korrigiert werden können („quantitative“, „competitive“ PCR).<sup>[35]</sup>

Die Durchfluß-PCR auf einem Chip teilt mehrere Charakteristika mit anderen Mikrogeräten, z. B. ein kleines Probenvolumen, eine hohe Wärmeleitfähigkeit (Aufheiz- und Abkühlzeiten von weniger als 100 ms) und die enorm kurze Zeit für die Reaktionsdurchführung. Unter einigen Aspekten sind jedoch Thermocycler herkömmlicher Größe mit Chargenbetrieb dem beschriebenen Durchfluß-PCR-Mikrogerät überlegen. Zum Beispiel können mit einem kommerziellen Gerät in einem einzigen Experiment bis zu zwölf Temperaturen für das Annealing der Primer ausprobiert werden (RoboCycler von Stratagene), was die Erfolgsrate für die Vervielfältigung erhöht. Ein anderes käufliches Gerät (LightCycler von Boehringer Mannheim) kombiniert eine hohe Analysengeschwindigkeit (15–20 min für 30 Zyklen) und ein ausreichend kleines Volumen (5–20 µL) für bis zu 32 Proben mit Online- und Echtzeit-Detektion des vervielfältigten Produkts über ein kinetisches Meßverfahren.

Worin liegt dann die Bedeutung dieser Arbeit? Zuerst dürfte diese neue Erfindung der Firma Zeneca/SmithKline Beecham helfen, Rechtsstreitigkeiten zu vermeiden, indem sie Einschränkungen durch bestehende Patente umgeht. Außerdem müssen meiner Meinung nach auch zwei – eher wissenschaftliche – Aspekte betont werden. Erstens die Tatsache, daß die Durchführung einer Durchfluß-PCR überhaupt möglich ist. Die PCR ist bekanntermaßen eine hochempfindliche Methode, die selbst Spuren von Templat ver-

vielfältigen kann, die folglich aber auch zu falschen Amplifikationen auf Grund von Kontaminationen neigt. Für mich ist es sehr überraschend – aber auch sehr erfreulich! –, daß der beschriebene PCR-Chip anscheinend ohne diesen Mangel arbeitet. Wahrscheinlich unterbinden die eine Diffusion limitierenden Eigenschaften des chemischen Reaktors, der die Form einer Kapillare hat, in Kombination mit der silanisierten Oberfläche der Kanalwände sowie die Verwendung eines nichtionischen Detergens im Puffer effizient den Prozeß des gegenseitigen Vermischens und Kontaminierens der aufeinanderfolgenden Fraktionen. Es wäre allerdings interessant gewesen zu untersuchen, ob ein *anderes* Templat, das nach dem ersten eingespritzt wird, ein viel längeres Templat oder auch der Einsatz von weniger als  $10^8$  Molekülen eines Templates zu ähnlich befriedigenden Ergebnissen geführt hätten. Zweitens sind die Möglichkeiten einer Weiterentwicklung von Totalanalyse- oder Synthesesystemen durch die Integration des Durchfluß-Mikroverstärkers vielfältig. Beispielsweise kann man sich vorstellen, den Mikroverstärker mit Mikrogeräten für die Zellisolation,<sup>[14]</sup> mit automatisierten Probeninjektoren definierten Volumens<sup>[11]</sup> und Online-Sensoren<sup>[6, 12]</sup> zu koppeln, um damit ein  $\mu$ TAS für die schnelle, integrierte und kontinuierliche DNA-Analyse von Zellpopulationen herzustellen. Für diesen Zweck sollten alle Bausteine eine kontinuierliche Arbeitsweise aufweisen, so wie der von Kopp et al. beschriebene Mikroverstärker. In der Tat sind Durchfluß-Mikrosysteme schon stark im Kommen, worauf auch die Autoren hinweisen.<sup>[32b]</sup> Diese Kombinationen würden den Durchfluß-PCR-Mikroverstärker nicht nur für eine schnelle und zuverlässige klinische Routinediagnostik geeignet, sondern ihn auch vielseitig genug machen, um als echte Alternative für viele Anwendungen auch in Forschungslaboratorien eingesetzt werden zu können. Bedeutet der Bericht von Kopp et al. demnach einen Durchbruch in der PCR-Technologie? Vielleicht nicht, aber es ist ein (guter) Schritt in die richtige Richtung.

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1055–1058

**Stichwörter:** Analytische Methoden • Kapillarelektrophorese • Mikroreaktoren • Nucleinsäuren • Polymerase-Kettenreaktion

- [1] Der dieser Übersetzung zugrundeliegende englische Originaltext ist im Internet unter folgender Adresse zu finden: <http://www.usatoday.com:80/life/cyber/tech/ctd352.htm>.
- [2] „Microsystem Technology In Chemistry And Life Science“: J. Cheng, L. J. Kricka, E. L. Sheldon, P. Wilding, *Top. Curr. Chem.* **1998**, 194, 215–231.
- [3] „Microsystem Technology In Chemistry And Life Science“: W. Ehrfeld, V. Hessel, H. Lehr, *Top. Curr. Chem.* **1998**, 194, 233–252.
- [4] C. F. Edman, D. E. Raymond, D. J. Wu, E. Tu, R. G. Sosnowski, W. F. Butler, M. Nerenberg, M. J. Heller, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 4907–4914.

- [5] A. T. Woolley, R. A. Mathies, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 3676–3680.
- [6] A. T. Woolley, G. F. Sensabaugh, R. A. Mathies, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2181–2186.
- [7] P. C. Simpson, D. Roach, A. T. Woolley, T. Thorsen, R. Johnston, G. F. Sensabaugh, R. A. Mathies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 2256–2261.
- [8] H. Becker, K. Lowack, A. Manz, *J. Micromech. Microeng.* **1998**, 8, 24–28.
- [9] J. Cheng, M. A. Shoffner, K. R. Mitchelson, L. J. Kricka, P. Wilding, *J. Chromatogr. A* **1996**, 732, 151–158.
- [10] J. Cheng, M. A. Shoffner, G. E. Hviehcia, L. J. Kricka, P. Wilding, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 380–385.
- [11] C. S. Effenhauser, A. Paulus, A. Manz, H. M. Widmer, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 2949–2953.
- [12] A. T. Woolley, K. Lao, A. N. Glazer, R. A. Mathies, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 684–688.
- [13] A. T. Woolley, D. Hadley, P. Landre, A. J. de Mello, R. A. Mathies, M. A. Northrup, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 4081–4086.
- [14] P. Wilding, L. J. Kricka, J. Cheng, G. Hviehcia, M. A. Shoffner, P. Fortina, *Anal. Biochem.* **1998**, 257, 95–100.
- [15] R. Freaney, A. McShane, T. V. Keaveny, M. McKenna, K. Rabenstein, F. W. Scheller, D. Pfeiffer, G. Urban, I. Moser, G. Jobst, A. Manz, E. Verpoorte, M. W. Widmer, D. Diamond, E. Dempsey, D. V. F. Saez, M. Smyth, *Ann. Clin. Biochem.* **1997**, 34, 291–302.
- [16] „Microsystem Technology In Chemistry And Life Science“: R. C. Anderson, G. McGall, R. J. Lipshutz, *Top. Curr. Chem.* **1998**, 194, 117–129.
- [17] C. S. Effenhauser, G. J. Bruin, A. Paulus, *Electrophoresis* **1997**, 18, 2203–2213.
- [18] „Microsystem Technology In Chemistry And Life Science“: C. S. Effenhauser, *Top. Curr. Chem.* **1998**, 194, 51–82.
- [19] „Microsystem Technology In Chemistry And Life Science“: S. Shoji, *Top. Curr. Chem.* **1998**, 194, 163–188.
- [20] „Microsystem Technology In Chemistry And Life Science“: A. van den Berg, T. Lammerink, *Top. Curr. Chem.* **1998**, 194, 21–49.
- [21] G. Blankenstein, U. D. Larsen, *Biosens. Bioelectron.* **1998**, 13, 427–438.
- [22] R. F. Service, *Science* **1998**, 282, 399–401.
- [23] F. von Heeren, E. Verpoorte, A. Manz, W. Thormann, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2044–2053.
- [24] C. S. Effenhauser, G. Bruin, A. Paulus, M. Ehrat, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 3451–3457.
- [25] D. E. Raymond, A. Manz, H. M. Widmer, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2515–2522.
- [26] M. A. Burns, B. N. Johnson, S. N. Brahmasandra, K. Handique, J. R. Webster, M. Krishnan, T. S. Sammarco, P. M. Man, D. Jones, D. Heldsinger, C. H. Mastrangelo, D. T. Burke, *Science* **1998**, 282, 484–487.
- [27] E. Marshall, E. Pennisi, *Science* **1998**, 280, 994–995.
- [28] R. F. Service, *Science* **1998**, 280, 995.
- [29] J. Drott, K. Lindstrom, L. Rosengren, T. Laurell, *J. Micromech. Microeng.* **1997**, 7, 14–23.
- [30] M. A. Shoffner, J. Cheng, G. E. Hviehcia, L. J. Kricka, P. Wilding, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 375–379.
- [31] R. F. Service, *Science* **1998**, 282, 396–399.
- [32] a) M. U. Kopp, A. J. Mello, A. Manz, *Science* **1998**, 280, 1046–1048; b) Fußnoten 8–11 in Lit. [32a].
- [33] Mir ist eine bemerkenswerte Ausnahme dieser Regel bekannt, die beim von Stratagene verkauften RoboCycler verwirklicht ist: Dieser bewegt die Reaktionsgefäße auch zu den verschiedenen Heizblöcken.
- [34] G. Haberhausen in *Bioanalytik* (Hrsg.: F. Lottspeich, H. Zorbas), Spektrum, Heidelberg, **1998**, S. 673–703.
- [35] S. Diviacco, P. Norio, L. Zentilin, S. Menzo, M. Clementi, G. Biamonti, S. Riva, A. Falaschi, M. Giacca, *Gene* **1992**, 122, 313–320.