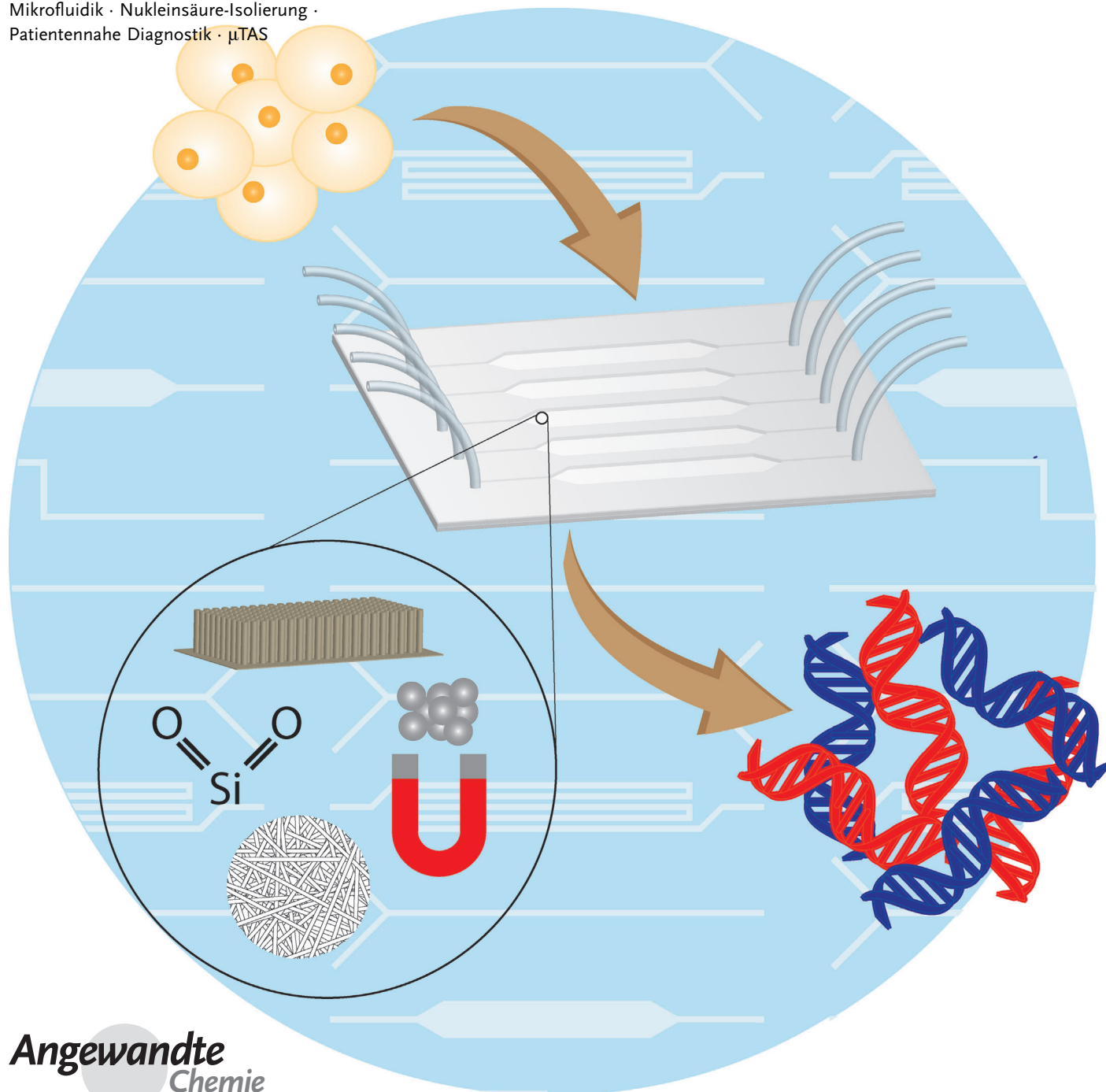


Mikrofluidische Isolierung von Nukleinsäuren

*Sarah J. Reinholt und Antje J. Baeumner**

Stichwörter:

Mikrofluidik · Nukleinsäure-Isolierung ·
Patientennahe Diagnostik · μ TAS



Die Detektion von Nukleinsäuren (NAs) in Mikrototalanalysesystemen (μ TAS) für die patientennahe Diagnostik ist ein sich rasant entwickelndes Forschungsgebiet. Damit diese Systeme die höchste Effektivität erbringen, ist eine effiziente NA-Isolierung aus der Ausgangsprobe entscheidend. Die Anwendung der Mikrofluidik erlaubt eine Reduktion der Probenmengen und des Reagentienverbrauchs, beschleunigt den Prozess, verhindert Verunreinigungen und kann zu einem automatisierten System führen. Durch die Implementierung von Mikrochips wurden neuartige Verfahren realisiert, die auf der makroskopischen Skala ungünstig und unbequem wären, aber eine exzellente Plattform für die mikroskopische NA-Aufreinigung bieten. Dieser Aufsatz diskutiert die zahlreichen Verfahren zur NA-Isolierung mithilfe miniaturisierter und mikrofluidischer Systeme sowie die zu berücksichtigenden Aspekte bei der Auswahl eines Verfahrens unter Einbeziehung der jeweiligen Vor- und Nachteile und der potenziellen Anwendungen. Die vorgestellten Verfahren umfassen die Nutzung von Silica-basierten Oberflächen, funktionalisierten paramagnetischen Beads, Oligonukleotid-modifizierten Polymeroberflächen, pH-abhängig geladenen Oberflächen, Al_2O_3 -Membranen und Flüssigphasentrennung. Dieser Aufsatz liefert grundlegende Informationen, die zur Entwicklung einer Chemie benötigt werden, die eine Optimierung der Nukleinsäure-Isolierung hin zu Effizienzen von 100 % ermöglichen soll.

1. Einführung

Die Entwicklung von Nachweisverfahren für Nukleinsäuren (NAs) hat zu einem enormen technischen Fortschritt in vielen Forschungsbereichen geführt. Zu den Anwendungen gehören der Nachweis von Pathogenen in Lebensmitteln, Umweltproben und klinischen Proben sowie die Genanalyse.^[1–9] Ein entscheidender Bestandteil der Assays zum NA-Nachweis ist die Isolierung der NAs. Ohne ausreichende NA-Reinigung in den Ausgangsproben reduziert sich die Geräteempfindlichkeit stark, und nachgelagerte Prozesse wie Amplifikation und Detektion können beeinträchtigt sein.

Der NA-Nachweis unter Anwendung von Laborverfahren im Makromaßstab hat sich gut etabliert. Diese Verfahren erfordern jedoch oftmals umfangreiche Spezialausrüstung, ausgebildetes Personal und große Probenmengen, und sie sind gewöhnlich zeitaufwendig und teuer, was ihren Einsatz auf zentralisierte Laboratorien beschränkt. Somit besteht ein starkes Interesse an der Entwicklung tragbarer Geräte für die patientennahe Diagnostik, die unter Bedingungen mit begrenzten Ressourcen eingesetzt werden können. Infolgedessen wurde das Konzept eines Mikrototalanalysesystems (μ TAS; oder Lab-on-a-Chip) vorgestellt, das zu einer deutlich effizienteren NA-Analytik führte.^[10,11] Die Hauptvorteile der Miniaturisierung von Assays zum NA-Nachweis sind, dass deutlich geringere Probenvolumina benötigt werden, geringere Reagentismengen verbraucht werden und dass sie schneller und empfindlicher sind. Außerdem wird das Risiko einer Verunreinigung nahezu ausgeschlossen, und das System

Aus dem Inhalt

1. Einführung	14209
2. Verfahren der mikrofluidischen Isolierung von Nukleinsäuren	14213
3. Schlussfolgerungen	14220

kann automatisierbar sein, weil diese Assays komplett in einem Einzelgerät durchgeführt werden. Um die miniaturisierten μ TAS zum NA-Nachweis voll nutzen zu können, muss eine effektive Isolierung der NAs erfolgen. Auch sollte man sich die spezifischen Vorteile miniaturisierter Geräte zu Nutzen machen, statt lediglich ein Verfahren von der Makro- auf die Mikroskala zu überführen. Hierbei sind Automatisierung, Ausschluss von Verunreinigungen, kurze Diffusions-

und Reaktionswege, schnelle Wärmeübertragung und einfache Handhabbarkeit von Flüssigkeiten von größter Bedeutung.

Die NA-Isolierung ist eine wichtige Stufe in einem μ TAS zum Nachweis von Zellen und spezifischen NA-Sequenzen bei der Krankheitsbekämpfung, in pharmakologischen Studien, im Umweltschutz und in Grundlagenstudien, in denen Ergebnisse für den Nachweis spezifischer NA-Sequenzen gebündelt werden. Kritische Probenaspekte in den üblicherweise komplexen klinischen^[12] und Umweltproben,^[13] in denen Zellen enthalten sind, müssen vor der Auswahl des am besten geeigneten Verfahrens zur NA-Isolierung berücksichtigt werden. Die Zelllyse ist der erste Schritt bei der NA-Isolierung, und verschiedene On-Chip- und Off-Chip-Verfahren sind in der Literatur umfangreich zusammengefasst.^[12,14] Das Lysat enthält mehrere Bestandteile, wie Proteine, Zellmembranfragmente, Polysaccharide, Metaboliten, Ionen und andere NAs als die Ziel-NA,^[15–17] die im Verfahren zur NA-Isolierung vor den nachfolgenden Analysestufen entfernt werden müssen. Nachgelagerte Prozesse schließen

[*] S. J. Reinholt, Prof. A. J. Baeumner
Department of Biological and Environmental Engineering
Cornell University, Ithaca, NY 14853 (USA)
E-Mail: ajb23@cornell.edu
Prof. A. J. Baeumner
Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik
Universität Regensburg (Deutschland)

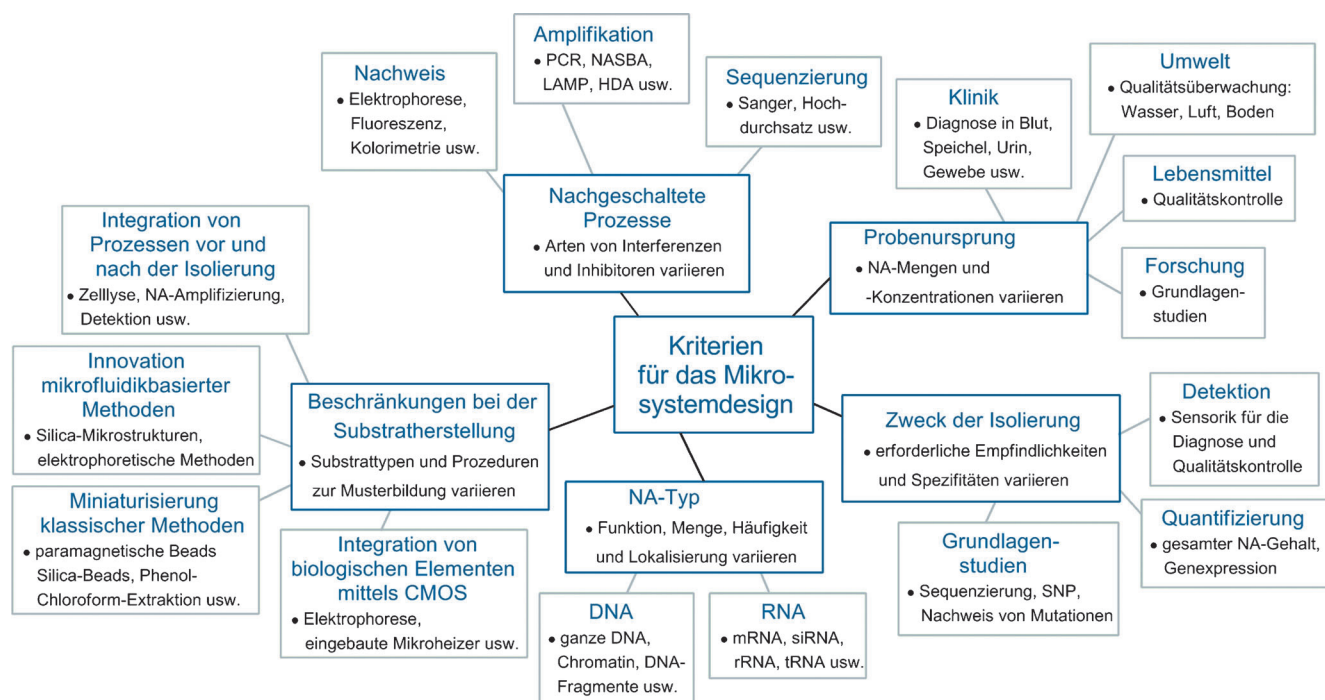


Abbildung 1. Kriterien für die Auswahl des Verfahrens zur NA-Isolierung. Aspekte, die bei der Auswahl berücksichtigt werden müssen, betreffen den Probentyp, die Spezifität der Isolierung (spezifisch oder unspezifisch), den Zweck der Isolierung, die vor- und nachgelagerten Prozesse sowie die Apparaturcharakteristika. Die nachgelagerte Prozessierung ist mit dem Zweck der Isolierung eng verknüpft, da die Schritte nach der Isolierung erforderlich sind, um das endgültige Resultat des Assays zu erzielen.

oft einen Amplifikationsschritt ein, und obwohl die PCR das am häufigsten angewendete On-Chip-Verfahren ist,^[18,19] werden Verfahren der isothermen Amplifikation häufiger, da es schwierig ist, die Thermozyklisierung in einen Mikrochip zu integrieren.^[20]

Weitere entscheidende Aspekte beinhalten die Art der zu isolierenden NA, den Zweck der NA-Isolierung und den Umfang der erforderlichen Arbeitsgänge, da diese auf begrenztem Raum auf einem μ TAS-Chip realisiert werden müssen. In Zellen gibt es unterschiedliche Arten von NAs, die jeweils spezifische Merkmale aufweisen (Funktion, Masse, Häufigkeit und Lokalisierung innerhalb der Zelle), die bei ihrem Nachweis besondere Herausforderungen darstellen.^[20] In Abbildung 1 sind die maßgeblichen Designaspekte zusammengefasst, die Forscher und Anwender bei der Festle-

gung kritischer Geräte- und Assayeigenschaften anleiten. Dieser Aufsatz liefert einen umfassenden Überblick über Verfahren zur NA-Isolierung, die in Mikrosystemen durchgeführt werden. Die Verfahren werden bezüglich ihrer Vor- und Nachteile sowie ihrer Leistungsfähigkeit bei speziellen Anwendungen miteinander verglichen. Die Integration der mikrofluidischen NA-Isolierung in einem vollständigen μ TAS-Chip ermöglicht die Entwicklung schneller, empfindlicher und transportabler Assays zum NA-Nachweis, die unter Bedingungen mit begrenzten Ressourcen eingesetzt werden können. Eine kurze Zusammenfassung der Verfahren, zu denen ein Überblick gegeben wurde, eine kritische Analyse ihrer Vor- und Nachteile sowie viele aufgezeigte Anwendungen sind in Tabelle 1 aufgeführt.



Sarah Reinholt erhielt 2011 ihren BSc in Nanotechnology Engineering (2011) an der University of Waterloo, Ontario. Sie forschte unter der Leitung von Prof. Antje Baeumner an der Cornell University (Biological and Environmental Engineering) und promovierte derzeit bei Prof. Harold Craighead in Applied and Engineering Physics. Ihre Forschungen gelten der Entwicklung von Biosensoren für den patientennahen Nachweis von Pathogenen und von Systemen für die effiziente Selektion von Aptameren und aptamerbasierten Sensoren.



Antje Baeumner ist Professorin am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität Regensburg. Bis 2013 war sie Professorin für Biological Engineering an der Cornell University, wo sie 1999 als Assistant Professor begonnen hatte. Ihre Forschungen gelten der Entwicklung von Lab-on-a-Chip-Systemen und Biosensoren auf Papierbasis für den Nachweis von pathogenen Organismen und Toxinen. Sie erhielt zahlreiche Auszeichnungen, darunter den Chancellor's Award in Excellence in Teaching, ein Alexander von Humboldt-Stipendium und eine Mercator-Gastprofessur.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Verfahren zur Nukleinsäure-Isolierung.

Isolierungsverfahren	Vorteile	Nachteile	Isolierungsanwendung	Lit.
Gepackte Silica-Beads	<ul style="list-style-type: none"> ● Gängiges Verfahren ● Einfaches Konzept 	<ul style="list-style-type: none"> ● Verdichtung der Beads, was zu steigendem Gegendruck und abnehmender Strömung führt ● Keine verlässliche Wiederverwendbarkeit ● Gebrauch von amplifikationshemmenden Lösungen ● Apparative Beschränkungen 	<ul style="list-style-type: none"> ● RNA aus Sperma, unechtem Spermafleck und alveolärem Rhabdomyosarkom ● DNA aus <i>B. anthracis</i> in Vollblut und DNA aus <i>B. pertussis</i> in Nasenaspirat ● STR-DNA-Fragmente in Vollblut und Sperma 	[37] [38] [39]
Sol-Gele mit inkorporierten Silica-Beads	<ul style="list-style-type: none"> ● Großes SA/V-Verhältnis ● Gewöhnlich wiederverwendbar 	<ul style="list-style-type: none"> ● Postfabrikationsschritte erforderlich ● Hohe Herstellungstemperatur ● Teures Substrat ● Ungleichmäßige Verteilung der Beads ● Gebrauch von amplifikationshemmenden Lösungen 	<ul style="list-style-type: none"> ● DNA aus <i>S. typhimurium</i> und <i>B. anthracis</i> in Vollblut ● Genomische DNA in Vollblut und DNA aus <i>B. anthracis</i> in einem Nasenabstrich 	[24] [41]
Poröse Polymermonolithe mit inkorporierten Silica-Beads	<ul style="list-style-type: none"> ● Großes SA/V-Verhältnis ● Einwegartikel ● Kostengünstig 	<ul style="list-style-type: none"> ● Postfabrikationsschritte erforderlich ● Ungleichmäßige Verteilung der Beads ● Gebrauch von amplifikationshemmenden Lösungen 	<ul style="list-style-type: none"> ● RNA aus dem Influenza-A-Virus in kultivierten MDCK-Zellen von Säugetieren ● RNA aus dem Influenza-A-Virus und Influenza-B-Virus in einem Nasen-Rachen-Abstrich und Nasen-Rachen-Aspirat ● DNA aus <i>E. coli</i> in Urin ● DNA aus <i>E. coli</i>, <i>B. subtilis</i> und <i>E. faecalis</i> in Vollblut ● DNA aus <i>C. difficile</i> im Stuhl 	[44] [48] [47] [45] [46]
Silica-Mikrostrukturen	<ul style="list-style-type: none"> ● Keine Postfabrikationsschritte ● Wiederverwendbar ● Hohe Durchflussraten 	<ul style="list-style-type: none"> ● Teures Substrat ● Langer, komplizierter, teurer Herstellungsprozess ● Geringeres SA/V-Verhältnis ● Gebrauch von amplifikationshemmenden Lösungen 	<ul style="list-style-type: none"> ● Genomische DNA aus Leukozyten in Vollblut ● DNA aus Lachssperma ● Genomische DNA in Vollblut und A549-Zellsuspensionen ● Bakterien-DNA aus <i>L. monocytogenes</i> 	[50] [51] [52] [53]
Poröse Silicat-Monolithe	<ul style="list-style-type: none"> ● Großes SA/V-Verhältnis 	<ul style="list-style-type: none"> ● Postfabrikationsschritte erforderlich ● Gebrauch von amplifikationshemmenden Lösungen 	<ul style="list-style-type: none"> ● Genomische DNA in Vollblut ● Genomische DNA aus bukkalen Zellen ● RNA aus Rattenleberzellen ● DNA aus Zellen von <i>Mus musculus</i> 	[27, 54] [55] [56] [57]
Silicat-Membranen	<ul style="list-style-type: none"> ● Einfache Integration in die Mikrofluidikapparatur 	<ul style="list-style-type: none"> ● Teuer ● Gebrauch von amplifikationshemmenden Lösungen 	<ul style="list-style-type: none"> ● DNA aus <i>B. cereus</i> und RNA aus dem HIV-1-Virus in Speichel ● G6PDH- und BCR-ABL-Krebs-Transkripte in K562-Zellen 	[59] [60]
Silica-beschichtete paramagnetische Beads	<ul style="list-style-type: none"> ● Hohe Durchflussraten möglich ● Großes SA/V-Verhältnis 	<ul style="list-style-type: none"> ● Magnetfeld erforderlich ● Einschränkungen hinsichtlich Material und Abmessungen der Apparatur ● Gebrauch von amplifikationshemmenden Lösungen ● Beads sind teuer 	<ul style="list-style-type: none"> ● Genomische DNA in Vollblut ● Deletionen der DNA bei α-Thalassämie 1 in Speichel ● RNA aus RSV-infizierten HEp-2-Zellen ● RNA aus dem HIV-1-Virus in Plasma 	[65] [66] [67] [69]
Paramagnetische Beads mit umschaltbaren Ladungen	<ul style="list-style-type: none"> ● Hohe Durchflussraten möglich ● Großes SA/V-Verhältnis ● Keine PCR-hemmenden Lösungen 	<ul style="list-style-type: none"> ● Magnetfeld erforderlich ● Einschränkungen hinsichtlich Material und Abmessungen der Apparatur ● Beads sind teuer 	<ul style="list-style-type: none"> ● RNA aus T98-Zellen ● Genotypisierung von Einzelnukleotidpolymorphismen in genomischer Leukozyten-DNA ● DNA aus <i>M. tuberculosis</i> in Speichel 	[70] [72] [73]

Tabelle 1: (Fortsetzung)

Isolierungsverfahren	Vorteile	Nachteile	Isolierungsanwendung	Lit.
Paramagnetische Beads mit Oligo-dT-Adsorbat	<ul style="list-style-type: none"> ● Nur Einfang von mRNA ● Nachweis lebensfähiger Organismen ● Hohe Durchflussraten möglich ● Großes SA/V-Verhältnis 	<ul style="list-style-type: none"> ● Poly-A-Schwanz der mRNA erforderlich ● Einschränkungen hinsichtlich der Probendichte ● Magnetfeld erforderlich ● Einschränkungen hinsichtlich Material und Abmessungen der Apparatur ● Beads sind teuer 	<ul style="list-style-type: none"> ● mRNA aus dem Bicoid-Gen von <i>Drosophila melanogaster</i> [75] ● mRNA aus einer NIH/3T3-Einzelzelle [76] ● Multiple Isolierung von mRNA aus MCF-7-Zellen [77] 	
Paramagnetische Beads mit spezifischen Nukleotidadsorbaten	<ul style="list-style-type: none"> ● Direktes Einfangen der Ziel-NA ● Niedrigere LODs 	<ul style="list-style-type: none"> ● Einschränkungen hinsichtlich der Probendichte ● Magnetfeld erforderlich ● Einschränkungen hinsichtlich Material und Abmessungen der Apparatur ● Beads sind teuer 	<ul style="list-style-type: none"> ● Ringförmige RNA aus <i>E. coli</i> [78] ● RNA aus dem Nervennekrose-Virus in Wasserproben [80] ● DNA aus Methicillin-resistentem <i>S. aureus</i> in Auswurf, Serum und Milch [82] ● RNA aus dem Influenza-A-Virus und Influenza-B-Virus [81] 	
Oligonukleotide auf Polymeroberflächen	<ul style="list-style-type: none"> ● Keine apparativen Einschränkungen ● Großes SA/V-Verhältnis 	<ul style="list-style-type: none"> ● Postfabrikationsschritte erforderlich ● Verwendung von reaktiven Stoffen, die nachgelagerte Prozesse hemmen können 	<ul style="list-style-type: none"> ● mRNA aus <i>C. parvum</i> [74] ● mRNA aus Rattenleberzellen [84] ● gag-RNA aus HIV-Viren in Serum [85] 	
Chitosan-beschichtete Beads	<ul style="list-style-type: none"> ● Keine PCR-hemmenden Lösungen ● Schnelle Elution in kleinem Volumen 	<ul style="list-style-type: none"> ● Geringeres Aufnahmevermögen für NAs ● Verdichtung der Beads, was zu steigendem Gegendruck und abnehmender Strömung führt ● Apparative Einschränkungen 	<ul style="list-style-type: none"> ● RNA aus Krebszellen des alveolären Rhabdomyosarkoms und bukkalen Zellen [88] ● Genomische DNA aus Vollblut [89] ● RNA aus dem Influenza-A-Virus in einem Pseudonasenabstrich [87] 	
Aluminiumoxid-Membranen	<ul style="list-style-type: none"> ● Keine Hemmung der PCR 	<ul style="list-style-type: none"> ● Nicht wiederverwendbar 	<ul style="list-style-type: none"> ● DNA aus <i>B. cereus</i> und synthetische HIV-gag-RNA-Fragmente [90] ● DNA aus Methicillin-empfindlichem und Methicillin-resistentem <i>S. aureus</i> in Speichel [91] 	
Photoaktivierte Polycarbonat-Oberflächen	<ul style="list-style-type: none"> ● Kostengünstig ● Einfach zu strukturieren ● Keine Bindung von SPS ● Einwegartikel 	<ul style="list-style-type: none"> ● Reduzierte Stabilität der aktivierten Oberfläche 	<ul style="list-style-type: none"> ● Genomische DNA aus Vollblut und RNA aus <i>E. coli</i> [93, 95] ● Multiple Isolierung von DNA aus <i>B. subtilis</i>, <i>S. aureus</i> und <i>E. coli</i> [96] 	
Amin-beschichtete Oberflächen	<ul style="list-style-type: none"> ● Keine PCR-hemmenden Lösungen ● Viele Möglichkeiten zur Erzeugung von Amin-Oberflächen 	<ul style="list-style-type: none"> ● Anziehung anderer negativ geladener Spezies ● Hoher pH-Wert des Elutionspuffers kann nachgelagerte Prozesse hemmen 	<ul style="list-style-type: none"> ● Genomische DNA aus Vollblut [97] 	
Elektrophoretische Verfahren	<ul style="list-style-type: none"> ● Keine externen Pumpen erforderlich (geringerer experimenteller Aufwand) ● Keine PCR-hemmenden Lösungen ● Keine apparativen Einschränkungen 	<ul style="list-style-type: none"> ● Nachgelagerte Prozesse schwierig zu integrieren ● Elektrophoretische Mobilität der NAs muss bekannt sein 	<ul style="list-style-type: none"> ● Genomische DNA aus Vollblut mittels ITP [98] ● DNA aus <i>P. falciparum</i> in Vollblut mittels ITP [99] ● Chromatin aus <i>E. coli</i> durch Einfangen mittels DEP [101] ● RNA aus <i>E. coli</i> und <i>S. thermophilus</i> mittels Gel-EP [102] 	
Isolierung durch organische Flüssigkeiten	<ul style="list-style-type: none"> ● Gängiges Verfahren im Makromaßstab ● Hohe Reinigungseffizienz ● Aufnahme sehr kleiner Proben 	<ul style="list-style-type: none"> ● Verwendung organischer Lösungsmittel 	<ul style="list-style-type: none"> ● Multiple Isolierung von DNA und RNA aus <i>P. aeruginosa</i> und <i>S. aureus</i> [104] 	

2. Verfahren der mikrofluidischen Isolierung von Nukleinsäuren

2.1. Verfahren auf Silicabasis

Schon früh wurden Verfahren auf Silicabasis in Mikrofluidiksystemen entwickelt und untersucht, in Anlehnung an die erfolgreiche silicabasierte Boom-Isolierungstechnologie, die gegenwärtig von bioMérieux vermarktet wird.^[21–23] Diese Techniken nutzen die nichtspezifische Bindung von NA-Molekülen an Silica zur Abtrennung von anderen Probenbestandteilen. Chaotrope Salze wie Guanidiniumiodid und Natriumiodid schirmen die negative Ladung der Silicaoberfläche ab, wodurch die NA-Abstoßung verringert und Silica und NAs dehydratisiert werden. Dadurch wird eine hydrophobe Umgebung erzeugt, die die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den NAs und den Silanolgruppen begünstigt.^[24] Die gebundenen NAs werden mit einem organischen Lösungsmittel wie Ethanol oder Isopropylalkohol gewaschen, und nach Elution mit einer Lösung geringer Ionenstärke werden hochreine NAs erhalten.

Dieses chemische Prinzip wurde bei einer Vielzahl von Mikrofluidikdesigns genutzt, die die Stärken der Mikrofabrikation und der Silicachemie in sich vereinen. Mikroskopaufnahmen einiger dieser Plattformen sind in Abbildung 2 dargestellt. Anfangs haben Mikrofluidiksysteme das makroskopische Prinzip gepackter Silica-Beads oder den Einschluss von Silica-Beads in Polymermatrices kopiert, bevor bald darauf Silica-Mikrostrukturen als nächster Ent-

wicklungsschritt einer zielspezifischen Gerätefertigung vorgeschlagen wurden.

2.1.1. Gepackte Silica-Beads

Silica-Beads werden seit über zwei Jahrzehnten bei der NA-Reinigung eingesetzt. Die erste Anwendung waren mit Silica-Beads gepackte Zentrifugationssäulen.^[21,30–32] Das Konzept wurde miniaturisiert, indem Silica-Beads in Mikrokapillaren eingebracht wurden, wodurch relativ kurze Zentrifugationszeiten zur schnellen NA-Isolierung resultierten.^[33,34] Die meisten Mikrofluidiksysteme, die für den Einsatz von gepackten Silica-Beads konstruiert wurden, enthalten einen wehrartigen Aufbau, der als Fritte wirkt, um die Beads auf einen spezifischen Platz im Kanal zu begrenzen, sodass ausschließlich die Flüssigkeit strömt.^[35] Sowohl DNA als auch RNA wurden mit dieser Technik erfolgreich isoliert.^[36,37] Die direkte Verknüpfung der NA-Isolierung mit einer Amplifikationsreaktion ist ein wichtiger Schritt hin zu einem vollständigen μ TAS-Chip und wurde bei der DNA-Isolierung mit gepackten Silica-Beads und On-Chip-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) demonstriert.^[38,39] Hier ist es entscheidend, die chaotropen Salze und organischen Lösungsmittel vollständig zu entfernen, da diese die PCR beeinträchtigen können.^[39] Deshalb enthielten diese Systeme getrennte Kanäle/Reservoirs zur Isolierung und Amplifikation mittels PCR, um eine Störung der PCR durch die Inhibitoren zu verhindern. Die Ergebnisse waren jedoch oft nicht reproduzierbar, und die Beadschicht wies nur eine geringe Stabilität auf, was nach längerer Anwendung zur

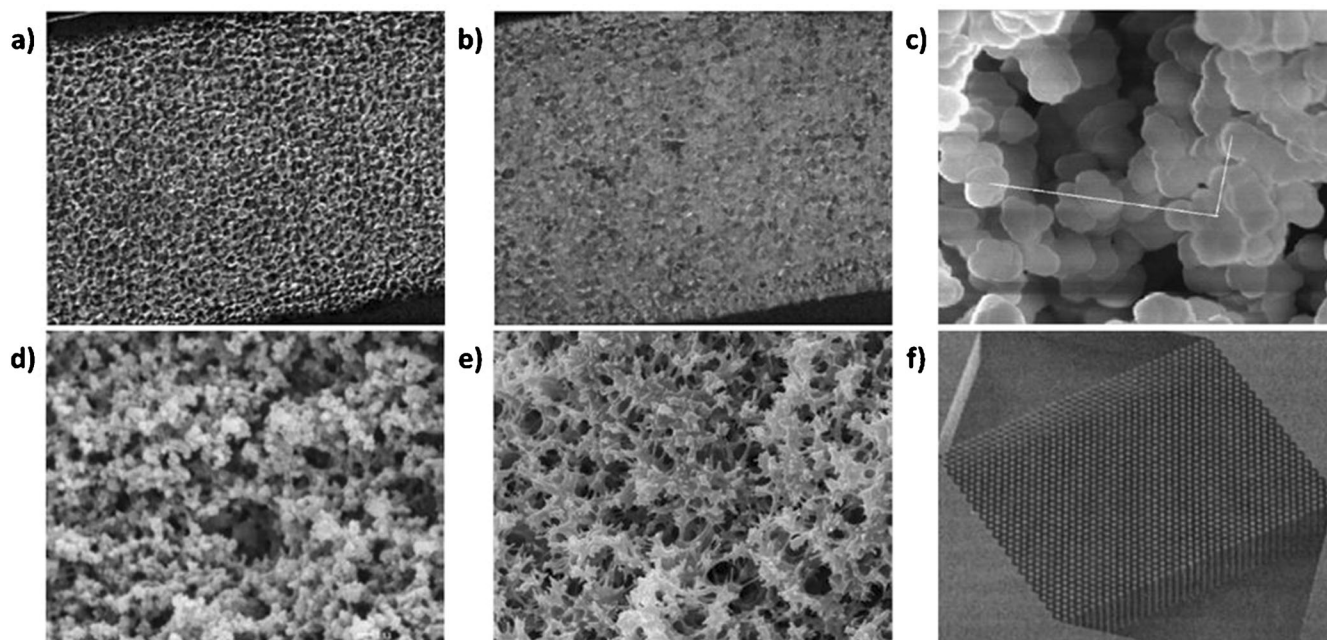


Abbildung 2. Mikroskopaufnahmen der verschiedenen zur NA-Isolierung verwendeten Silica-Oberflächen. a) Silica-Beads in einem Mikrokanal (mit Genehmigung aus Lit. [25], Copyright 2002 Wiley-VCH). b) In einer Sol-Gel-Matrix eingeschlossene Silica-Beads in einem Mikrokanal (mit Genehmigung aus Lit. [25], Copyright 2002 Wiley-VCH). c) In einem porösen Polymermonolithen eingeschlossene Silica-Beads (mit Genehmigung aus Lit. [26], Copyright 2010 American Chemical Society). d) Sol-Gel auf Silicabasis (mit Genehmigung aus Lit. [27], Copyright 2006 American Chemical Society). e) Poröser Polymermonolith auf Silicabasis (mit Genehmigung aus Lit. [28], Copyright 2009 Elsevier). f) Array von Siliciumdioxid-Mikrosäulen (mit Genehmigung aus Lit. [29], Copyright 1999 ASME).

Zerstörung des Mikrochips führte.^[25] Außerdem sind Aspekte wie Verdichtung der Beads, steigender Gegendruck und abnehmende Strömung aufgrund der dynamischen Beschaffenheit der Beadpackung üblicherweise auftretende Nachteile. Eine Lösung für einige dieser Probleme bestand darin, die Silica-Beads in Polymermatrices einzuschließen.^[25]

2.1.2. *Matrices mit Silica-Beads*

Der nächste Fortschritt war der Einschluss von Silica-Beads in porösen Materialien wie Sol-Gel-Matrices und porösen Polymermonolithen. Im Fall der Sol-Gel-Matrices werden die Silica-Partikel in den Gelbildungs- oder Polykondensationsprozess eingebunden,^[40] und es entsteht ein Monolith für die NA-Isolierung. Untersuchungen ergaben, dass die wichtigsten Faktoren, die die Effizienz beeinflussen, die Größe der Silica-Beads, das Matrixmaterial, der Typ der Kondensationsreaktion und die Methode zum Aufbau des Monolithen waren.^[25] Außerdem zeigten Untersuchungen, dass ein abnehmender pH-Wert zu einer verringerten Abstoßung zwischen der Silica-Oberfläche und den DNA-Molekülen und wiederum zu einer schnelleren DNA-Adsorption führt, wodurch höhere Durchflussraten möglich sind. Auf diese Weise konnten schnelle Extraktionen von Bakterien-DNA und Viren-DNA sowie von DNA aus Vollblut durchgeführt werden.^[24] Zudem wurde die erfolgreiche DNA-Isolierung und PCR-Amplifikation im selben Mikrosystem demonstriert.^[41] Eine erhebliche Einschränkung der Verwendung von Sol-Gel-Matrices stellt allerdings der erforderliche hohe Wärmeeintrag dar, der wiederum den Einsatz von Glas als Mikrofluidikplattform erfordert, das ein relativ teures Material für die Strukturierung ist.

Die Arbeitsgruppe von Klapperich demonstrierte eine neue Methode zur Erzeugung von porösen Polymermonolithen mit inkludierten Silica-Beads in kostengünstigen Mikrofluidikplattformen auf Kunststoffbasis, die durch Heißprägen leicht strukturiert werden können. Die erhebliche Reduzierung der Herstellungskosten ermöglicht die Verwendung dieser Vorrichtungen als Einwegartikel, wodurch das Risiko einer Verunreinigung zwischen den Anwendungen ausgeschlossen wird. Die Monolithe weisen Mikro- und Nanoporen auf, die eine Flüssigkeitsströmung bei geringen Gegendrücken ermöglichen und eine große Oberfläche für die NA-Adsorption bereitstellen.^[42] Mit Polymeren wie Cycloolefin-Copolymeren, die hervorragende optische Eigenschaften aufweisen, gelingt der anschließende Nachweis in ein und demselben Mikrofluidiksystem.^[43,44] Systeme dieser Art konnten unter verschiedenartigen Probenbedingungen angewendet werden.^[44–47] Einige dieser Assays wurden in μ TAS-Chips mit integrierter On-Chip-NA-Amplifikation eingebunden.^[46,48] Obwohl diese Verfahren der Immobilisierung von Silica-Beads in porösen Materialien viele der mit gepackten Silica-Beads verbundenen Probleme lösen, erfordern sie zusätzliche Fertigungsschritte nach der Konstruktion des Mikrofluidiksystems. Zudem kann die sichere Wiederverwendung von Systemen, die nicht zum Einmalgebrauch bestimmt sind, schwierig sein.

2.1.3. *Silica-Mikrostrukturen*

Durch die Verwendung von Silica-Mikrostrukturen gelingt es, eine NA-bindende Oberfläche während der Fertigung des Mikrofluidiksystems zu erzeugen. Da im Vergleich zu gepackten Beads und Matrices ein wesentlich geringerer Gegendruck herrscht, können höhere Durchflussgeschwindigkeiten und somit höhere Durchsätze erzielt werden, wodurch die Aufbereitung größerer Volumina möglich ist. Die Mikrostrukturen werden gewöhnlich aus Silicium- oder Glassubstraten mittels reaktiver Ionenätzung hergestellt.^[29,49–51] Die Maximierung der verfügbaren Oberfläche und der Mischprozess bilden den Schlüssel zur Optimierung der Extraktionseffizienz.

Die Oberfläche und der Mischprozess werden durch die Größe, Dichte und Form der Mikrostrukturen sowie durch die Gesamtgröße und Form der Isolierungskammer bestimmt. In der Regel wird das Oberfläche/Volumen-Verhältnis (SA/V-Verhältnis) als Kompromiss zwischen Maximierung der Oberflächengröße, einfacher Herstellung und Begrenzung der Durchflussgeschwindigkeit aufgrund des Gegendrucks gewählt. Diese Aspekte beeinflussen letztendlich die Extraktionseffizienz, die mit dem SA/V-Verhältnis positiv^[49] und mit der Durchflussgeschwindigkeit negativ korreliert.^[29,51] Die Form der Mikrostrukturen und Mikrokanäle ist der entscheidende Faktor für die Festlegung des idealen Strömungsmusters. Beim Vergleich von Mikrostrukturformen fanden Wu et al., dass eine Schicht aus pyramidenförmigen Säulen eine höhere Extraktionseffizienz als eine Schicht aus kegelstumpfförmigen Säulen hat. Das ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass pyramidenförmige Säulen die Strömung stärker stören (d.h. stärkere Vermischung) und deshalb mehr DNA-Moleküle mit der bindenden Oberfläche in Kontakt kommen.^[52] Hinsichtlich der Abmaße der mikrofluidischen Kanäle verringert ein breiterer, kürzerer Kanal den hydrodynamischen Widerstand und ermöglicht höhere Durchflussgeschwindigkeiten, was günstiger ist bei größeren Proben mit hohen Zielkonzentrationen, die sonst zu einer Beeinträchtigung der Extraktionseffizienz führen können. Dagegen erhöht ein dünnerer, längerer Kanal den Widerstand, was bei kleineren Proben mit geringer NA-Zielkonzentration idealer ist.^[51] Abbildung 3 fasst die entscheidenden Designkriterien für die Herstellung von Silica-Mikrostrukturen in mikrofluidischen Kanälen zur NA-Isolierung zusammen.

Zusammengefasst wurden Silica-Mikrostrukturen als effiziente Plattformen zur NA-Isolierung genutzt. Diese Technik wurde auch in μ TAS-Chips integriert, die NA-Amplifikations- und Nachweisschritte umfassen.^[52,53] Dieses Isolierungsverfahren ist jedoch mit Mikrofluidiksystemen verbunden, die in komplexen Herstellungsverfahren, die zeitaufwendig sind und Reinraumbedingungen erfordern, aus relativ teuren Materialien konstruiert werden.

2.1.4. *Andere silicabasierte Oberflächen*

Andere silicabasierte Oberflächen, die in Mikrofluidiksystemen zur NA-Isolierung genutzt wurden, umfassen poröse Polymermonolithe auf Silicatbasis und Silicatmem-

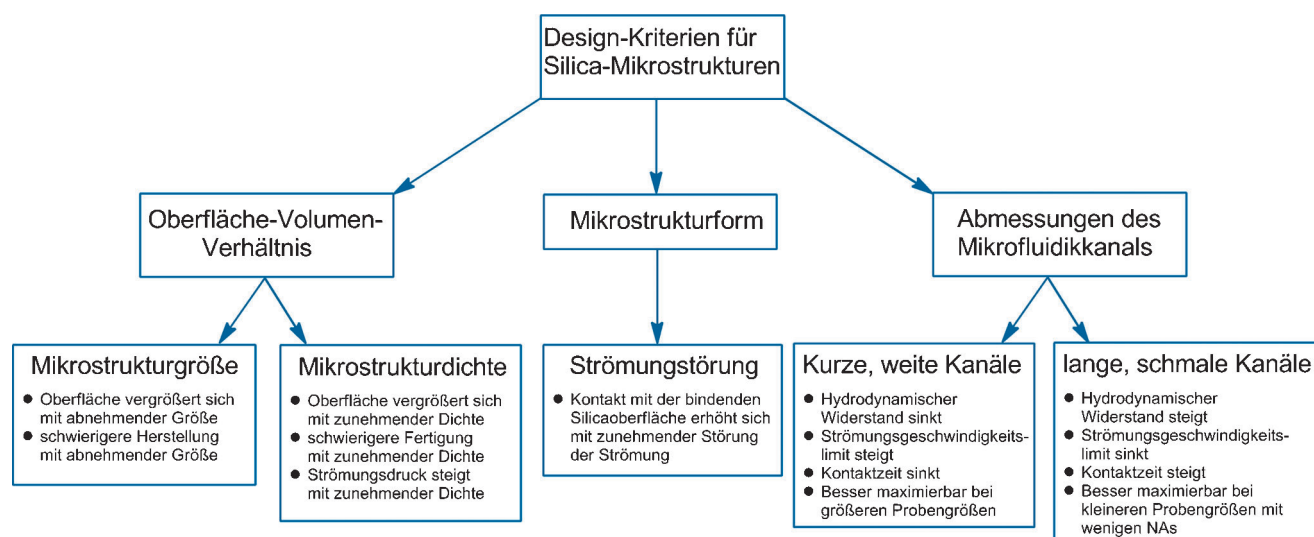


Abbildung 3. Kriterien für die Herstellung von Silica-Mikrostrukturen zur NA-Isolierung. Entscheidende Merkmale der Mikrostrukturen sind ihre Größe, Dichte und Form. Die Auswahl der geeigneten Abmessungen der Mikrofluidikkanäle ist ebenfalls von großer Bedeutung und sollte auf Basis der Probenmenge und -konzentration erfolgen.

branen. Diese Systeme vermeiden Probleme wie Bead-Verdichtung, ungleichmäßige Verteilung der Beads in den Matrices und hohe Kosten der Mikrofabrikation. Einige Arbeitsgruppen verwendeten poröse Polymermonolithe, die aus Lösungen von Tetramethylorthosilicat (TMOS)^[27,54] und Kaliumsilicat^[55–57] hergestellt wurden, um NAs aus unterschiedlichen Proben zu isolieren. Besonders bei kleinen Volumina der verdünnten Probe wird üblicherweise empfohlen, eine Träger-RNA einzusetzen, um ausreichende Extraktionseffizienzen zu erzielen.^[58] Kashkary et al. konnten unter Verwendung eines Silicat-Monolithen auch ohne Träger mit hoher Effizienz DNA aus Proben extrahieren.^[57] Dies belegt, dass poröse Polymermonolithe auch ohne Silica-Beads ein sehr großes SA/V-Verhältnis aufweisen und NAs in ausreichender Weise isolieren können.

Eine andere Ausführung der NA-Isolierung auf Silica-basis ist der Einsatz von Silicatmembranen, die aus einem Netzwerk von Glasfasern bestehen. Typischerweise sind die Membranen in die Mikroapparaturen integriert, indem sie einfach in einer Kammer fixiert werden. Diese Methode wurde auch in vollständige μ TAS-Chips implementiert, mit Lyse, Amplifikation, Nachweis und NA-Reinigung vor der PCR-Amplifikation.^[59] Diese μ TAS-Chips wurden eingesetzt, um DNA und RNA aus verschiedenen Viren,^[59] Bakterien^[59] und anderen Zellen abzutrennen.^[60] In allen Fällen war der Schritt der NA-Isolierung erforderlich, um die erforderlichen niedrigen Nachweisgrenzen (LODs, limits of detection) zu erreichen.

2.2. Verfahren auf Basis paramagnetischer Beads

Trennungsassays unter Verwendung paramagnetischer Beads werden seit den 1970er Jahren umfassend genutzt und wurden in der Literatur eingehend behandelt.^[61–64] Die Integration paramagnetischer Beads in mikrofluidische biologi-

sche Assays wurde kürzlich beschrieben.^[65,66] In Assays zur NA-Isolierung bieten paramagnetische Beads gegenüber Schichten gepackter Beads mehrere Vorteile. Rohproben mit vielen festen Verunreinigungen unterschiedlicher Größe sind leichter zu behandeln, da es das bei dicht gepackten Beads auftretende Problem der Verklumpung nicht gibt. Es kann außerdem ein breiter Bereich von Probenvolumina abgedeckt werden, da die Beads ein großes SA/V-Verhältnis aufweisen und die Durchflussgeschwindigkeit nicht durch kleine Porengrößen zwischen den gepackten Beads und der wehrartigen Struktur begrenzt wird. Diese Vorteile resultieren daraus, dass die Beads ungehindert in die Probenlösung suspendiert werden können, wodurch die Wechselwirkung zwischen den Beads und der Probe maximiert wird, und dass sie nicht durch Zentrifugieren oder Filtrieren, sondern lediglich durch Anlegen eines Magnetfeldes gesammelt werden. Weitere Vorteile der Miniaturisierung dieses Verfahrens in einem Mikrofluidiksystem sind, dass unabhängig vom Probenvolumen viel weniger Beads eingesetzt werden müssen und man eine geringere Magnetfeldstärke anwenden kann. Dass ein Magnetfeld erforderlich ist, ist jedoch mit Einschränkungen beim Design des Mikrofluidikchips verbunden. Die Art des Materials und seine Dicke wirken sich auf die Stärke des Magnetfeldes aus,^[65] und der Mikrokanal sollte so entworfen werden, dass der Verlust an Beads minimiert wird. Mittels paramagnetischer Beads mit unterschiedlichen Oberflächenmodifizierungen konnten sowohl spezifische als auch nicht-spezifische NA-Isolierungen demonstriert werden.

2.2.1. Silica-beschichtete paramagnetische Beads

Das oben beschriebene allgemeine Verfahren unter Verwendung von Silica-Beads kann durch den Einsatz von Silica-beschichteten paramagnetischen Beads verbessert werden. Anstatt dass die paramagnetischen Silica-Beads gepackt und durch die als „Wehr“ dienende Kammer abgegrenzt sind,

können sie frei in Lösung vorliegen und durch ein Magnetfeld gesammelt werden, wodurch sich die für die NA-Bindung verfügbare Silica-Oberfläche vergrößert. Für die Wasch- und Elutionsphase der NA-Isolierung wurden verschiedene Verfahren genutzt. Es gibt herkömmliche Verfahren, bei denen ein Magnetfeld angewendet wird, um die Beads zu fixieren, während Waschpuffer die Mikrokanäle durchströmen. Bei einem eher unkonventionellen Verfahren wird ein Magnetfeld genutzt, um die paramagnetischen Beads durch eine ruhende Waschlösung zu bewegen.

Silica-beschichtete paramagnetische Beads wurden in konventionellen Mikrofluidiksystemen mit verschiedenen Substratmaterialien eingesetzt, und auch ein Array aus acht parallelen Kanälen wurde beschrieben.^[65] Dabei trat allerdings das Problem der Inhomogenität des Magnetfeldes auf, wodurch jeder Kanal eine andere Extraktionseffizienz besaß. Darüber hinaus wurde ein μ TAS-Chip zum Nachweis von genetischen Deletionen in Zellen aus Speichelproben demonstriert, womit die Kompatibilität dieses Verfahrens mit anderen Prozessschritten aufgezeigt wurde.^[66]

Mikrofluidikapparaturen mit ruhenden Lösungen und strömenden paramagnetischen Beads wurden mit unterschiedlicher Geometrie und Komplexität entwickelt. Die Waschlösungen wurden sowohl durch Luftblasen^[67] als auch durch hydrophobe, nicht mischbare Flüssigkeiten separiert.^[68] die auch als Waschphasen zwischen Bindungs- und Elutionschritten dienen, um ein Verschleppen zu minimieren.^[69] Ein Beispiel eines Verfahrens mit Luft zur Trennung von Lösungen ist in Abbildung 4 dargestellt. Der größte Nachteil des Einsatzes von Silica-beschichteten paramagnetischen Beads ist letztendlich, dass trotzdem die Verwendung von chaotropen Salzen und organischen Lösungsmitteln erforderlich ist,

die nachgelagerte Prozesse wie NA-Amplifikation stören können.

2.2.2. Paramagnetische Beads mit umschaltbaren Ladungen

Ähnlich wie Silica-Oberflächen können auch geladene Oberflächen genutzt werden, um NAs aus komplexen Proben aufgrund des geladenen Charakters der NAs zu isolieren. Manche Materialien können je nach pH-Wert der umgebenden Lösung unterschiedliche Oberflächenladungen aufweisen. Dieses Phänomen wurde zur NA-Isolierung mithilfe von Materialien genutzt, die zwischen einer positiven Ladung (Bindung der negativ geladenen NAs) und einer negativen Ladung (Elution) geschaltet werden können. Materialien dieser Art wurden auf paramagnetischen Beads abgeschieden, und ein niedriger pH-Wert erzeugte dann eine positive Oberflächenladung für die Bindung, während ein hoher pH-Wert eine negative Oberflächenladung für die Elution herstellte.^[70] Viele Arbeitsgruppen – und besonders jene, deren Schwerpunkt auf der Mikrofluidik liegt – verwenden kommerzielle Beads und beschichten diese mit einem selbst entwickelten Material mit umschaltbarer Ladung. Ein bekanntes Material, das auch auf magnetischen Beads verwendet wird, ist Polyethylenimin, ein multivalentes kationisches Polymer, das je nach pH-Wert der Lösung eine positive oder negative Ladung aufweisen kann.^[71] Diese Klasse magnetischer Beads wurde nicht nur in Mikroapparaturen eingesetzt, sondern auch in vollständige μ TAS-Chips integriert.^[72] Darüber hinaus wurde ein Multiplex- μ TAS entwickelt, das zehn Proben parallel prozessieren kann und eine hervorragende LOD von nur 10 Bakterien erreichte.^[73] Dieses Beispiel verdeutlicht das große Potenzial der Anwendung paramagnetischer Beads mit umschaltbaren Ladungen für die Entwick-

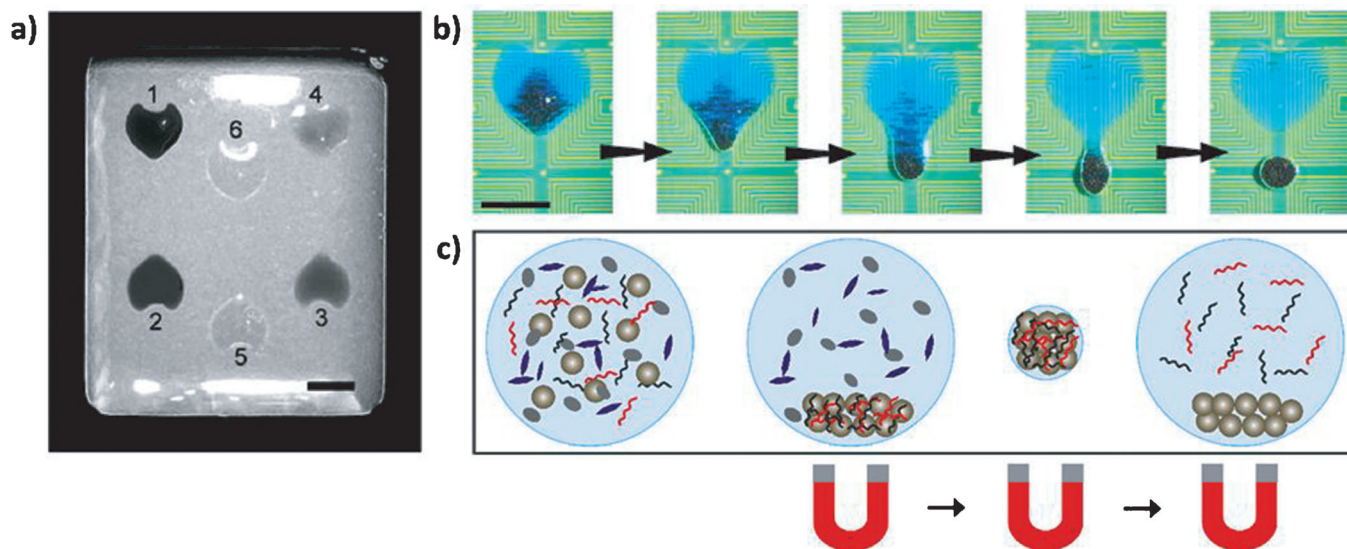


Abbildung 4. Isolierung von NAs unter Verwendung ruhender, durch Luft getrennter Lösungen und eines Magneten, um Silica-beschichtete paramagnetische Beads durch die Lösungen zu bewegen. a) Aufnahme, die die Wascheffizienz des Verfahrens veranschaulicht. Der Puffer wurde mit einem Farbstoff gemischt. Da die paramagnetischen Beads mit gebundenen NAs von Lösung zu Lösung wandern, bleiben der Puffer und andere Bestandteile in den Waschpuffertröpfchen zurück. b) Zeitliche Abfolge beim Herausziehen der paramagnetischen Beads aus dem Puffertröpfchen. Die Tröpfchenverschleppung ist minimal. c) Schematische Darstellung des Prozesses der NA-Isolierung. Die NAs sind an die Beads gebunden, die Beads werden gewaschen, und die NAs werden von den Beads eluiert. (a) und (b) mit Genehmigung aus Lit. [68], Copyright 2006 Wiley-VCH.

lung hochempfindlicher μ TAS-Chips. Als ein genereller Nachteil dieser Verfahren muss allerdings erwähnt werden, dass nach wie vor DNasen und RNasen eingesetzt werden müssen, um die unerwünschten Arten von NAs abzubauen.

2.2.3. Mit Oligo-dT beschichtete paramagnetische Beads

Im Fall der nichtspezifischen Isolierung von NAs sind mitunter zusätzliche Reinigungsschritte erforderlich, um die Probe auf einen bestimmten NA-Typ einzuengen. Die große Zahl von NAs in manchen Proben kann sogar zur Sättigung der Silica-Oberfläche führen, wodurch die Extraktion der Ziel-NAs beeinträchtigt wird. In den meisten eukaryotischen Organismen hat die Boten-RNA (mRNA) einen Polyadenosin(Poly-A)-Schwanz, und eine elegante Methode zur Erhöhung der Spezifität der NA-Isolierung ist die Verwendung des Thymidin-Oligonukleotids, Oligo-dT. Oligo-dT hybridisiert mit dem Poly-A-Schwanz aller mRNA-Moleküle, während andere Arten von NAs nicht binden. Ein weiterer Vorteil des mRNA-Nachweises besteht darin, dass im Gegensatz zum gewöhnlichen Nachweis von DNA-Sequenzen nur lebensfähige Zellen erfasst werden.^[74] Eine spezifische mRNA-Extraktion ist außerdem günstig, da die Menge an mRNA gegenüber der gesamten RNA, bei der noch mehrere Kopien jeder Sequenz vorliegen, sehr gering ist. Dementsprechend wurde Oligo-dT auf paramagnetischen Beads immobilisiert und in Mikrofluidiksystemen eingesetzt, um winzige Mengen an mRNA zu isolieren.^[75] Auf einem μ TAS-Chip zur Herstellung von Sequenzierungsdatenbanken wurde sogar die Extraktion von Pikogramm- und Subpikogramm-Mengen aus Einzelzellen demonstriert.^[76] Des Weiteren wurde die NA-Isolierung unter Verwendung von mit Oligo-dT beschichteten paramagnetischen Beads für Hochdurchsatzanwendungen aufskaliert, wobei standardisierte Mikrotiterplatten zur parallelen Extraktion von 384 oder 1536 Proben Anwendung fanden.^[77] In diesen Mikrofluidiksystemen werden die Beads innerhalb von nur 10 s magnetisch durch Bindungs- und Elutionslösungen gezogen, die durch eine nichtmischbare hydrophobe Phase separiert sind. Dieses Prinzip der spezifischen RNA-Isolierung kann hin zur Isolierung spezifischer Sequenzen weiter spezialisiert werden.

2.2.4. Mit spezifischen Sequenzen beschichtete paramagnetische Beads

Die Modifizierung paramagnetischer Beads mit spezifischen Oligonukleotidsequenzen ermöglicht den direkten Nachweis von NA-Sequenzen ohne weitere Reinigung, da nur die NA-Sequenzen von Interesse komplementär zu den paramagnetischen Beads hybridisieren, während die restlichen NAs und Verunreinigungen gewaschen werden. Ein wichtiger Parameter, der bei der Entwicklung dieser Systeme berücksichtigt werden muss, ist die Dichte der Oligonukleotidsonden auf der Oberfläche der magnetischen Beads. Bei zu hoher Dichte kann die Isolierung durch sterische Effekte gehindert sein.^[78,79] Bei zu geringer Dichte kann eine nichtspezifische Bindung an die Oberfläche der Beads resultieren und die Probe verunreinigen.^[78] Verschiedene μ TAS-Chips unter Verwendung von paramagnetischen Beads mit spezifi-

schen Oligonukleotidsequenzen wurden entwickelt, die sowohl schnell als auch empfindlich sind und zur Detektion von Viren-RNA,^[80,81] Bakterien-RNA^[78] und Bakterien-DNA^[82] aus einer Bandbreite von Proben typen eingesetzt wurden. Der spezifische Charakter der NA-Isolierung in diesen Systemen ermöglichte sehr niedrige LODs. Das Isolieren spezifischer Sequenzen kann allerdings durch hohe Gesamtkonzentrationen an DNA und RNA in einer Probe beeinträchtigt sein, sodass die Entwicklung zweistufiger Verfahren erforderlich sein kann.

Ein genereller Nachteil der Verwendung magnetischer Beads sind mitunter die Kosten für die Erzeugung qualitativ hochwertiger paramagnetischer Beads, was einer weiten Verbreitung dieser Verfahren im Wege stehen könnte.

2.3. Spezifische Oberflächenmodifizierung

Die Isolierung von NAs kann auch durch direktes Modifizieren einer Oberfläche mit Oligonukleotiden oder aber durch Anwendung spezieller Oberflächen, die unter bestimmten Pufferbedingungen NAs nichtspezifisch binden, realisiert werden. Diese Verfahren werden nachstehend erörtert.

2.3.1. Oligonukleotide auf Polymeroberflächen

Die kovalente Modifizierung von Polymeroberflächen mit Oligonukleotiden bietet große Vorteile für die NA-Isolierung, da Einschränkungen der Geräteabmessungen zum Einschluss der Beads entfallen. Darüber hinaus kann die Synthese dieser Oberflächen leicht dem Herstellungsprozess hinzugefügt werden. Eine Einschränkung besteht allerdings darin, dass die Erzeugung spezifischer Oberflächenmuster nur mithilfe komplizierter Verfahren möglich ist, z. B. durch Anwendung von Masken oder in Form alternierender Arrays.^[83] Ebenfalls beschrieben wurde die Modifizierung von Mikrostrukturen in Kanälen mit Oligonukleotiden (ähnlich wie oben für silicabasierte Techniken diskutiert) zur Erzeugung einer kohäsiven Plattform für die hochempfindliche NA-Isolierung.

Sowohl Oligo-dT als auch spezifische Oligonukleotide wurden auf porösen Polymeroberflächen immobilisiert und zur Isolierung von Säugetier-mRNA^[84] und spezifischen NA-Sequenzen aus Viren genutzt.^[85] Die Erzeugung dieser modifizierten Polymere in mikrofluidischen Kanälen benötigt zusätzliche Schritte, die den Einsatz reaktiver Komponenten erfordern, die die Isolierung oder andere Prozesse beeinträchtigen können – allerdings braucht man diese Polymere, um eine ausreichend große Oberfläche zur Immobilisierung genügender Oligonukleotidsonden zu schaffen. Im Gegensatz dazu entwickelte unsere Arbeitsgruppe ein Verfahren zur Modifizierung von Mikrokanälen mit hoher Immobilisierungseffizienz, das ohne die Synthese einer porösen Matrix auskommt. Dabei wurden Oligo-dT-Proben mit hoher Effizienz an Polyamidoamin-Dendrimeren der 5. Generation immobilisiert, was in einer hohen Hybridisierungseffizienz resultierte.^[74] Abbildung 5 veranschaulicht das Konzept und zeigt, wie die Mikroapparaturen hergestellt werden. Die

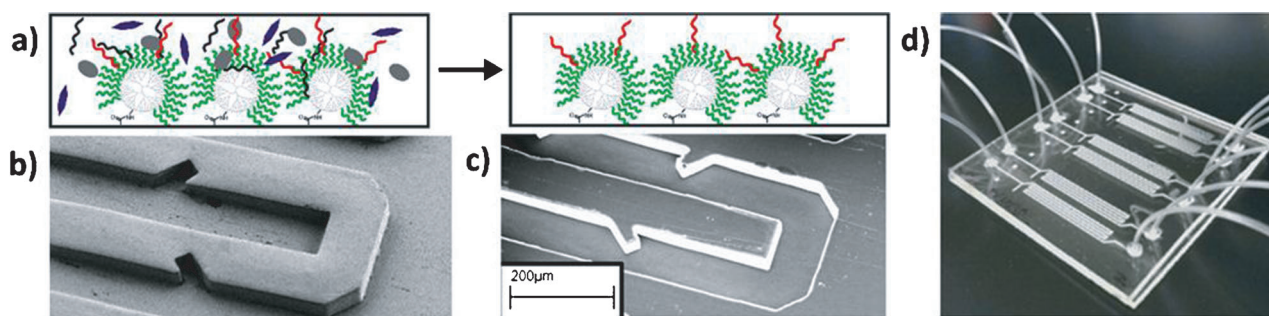


Abbildung 5. Isolierung von mRNA mit an die Peripherie von Dendrimern konjugiertem Oligo-dT, das in mikrofluidischen PMMA-Kanälen immobilisiert wurde. Die Mikrokanäle können durch Heißprägen und UV/Ozon-unterstützte thermische Polymerisation leicht und kostengünstig hergestellt werden.^[86] a) Schematische Darstellung des Isolierungsverfahrens: mRNA-Moleküle werden durch Oligo-dT-Sonden eingefangen, die im Mikrokanal an Dendrimern immobilisiert sind. Vor der isothermen Amplifikation ist keine Elution der mRNA erforderlich. b) Aufnahme der zum Prägen der PMMA-Mikrokanäle (c) verwendeten Kupfervorlage (mit Genehmigung aus Lit. [68], Copyright 2008 Springer. d) Aufnahme der fertigen Mikrofluidikapparatur (mit Genehmigung aus Lit. [74], Copyright 2013 American Chemical Society).

Verwendung modifizierter Oberflächen als Isolierungsmedium bietet insbesondere Vorteile für μ TAS-Anwendungen in Fällen begrenzter Ressourcen, da die Arbeitsabläufe vereinfacht und die apparativen Kosten reduziert werden.

2.3.2. Chitosan-beschichtete Beads

Die Arbeitsgruppe von Landers entwickelte ein Verfahren zur NA-Isolierung unter Verwendung von Chitosan-beschichteten Beads, die sie in Mikroapparaturen zur Extraktion von RNA und DNA aus Viren^[87] und Säugetierzellen^[88,89] verwendeten. Es handelt sich um ein nichtspezifisches Isolierungsverfahren mit einem pH-abhängigen Ladungszustand des Chitosans, das NAs bei pH 5 bindet und bei pH 9 eluiert. Gegenüber der Verwendung von Silica-Beads bietet es den Vorteil, dass anstatt chaotroper Puffer und organischer Lösungsmittel, die nachgelagerte Prozesse hemmen können, wässrige Puffer eingesetzt werden können. Zwar verfügen Chitosan-Oberflächen im Vergleich zu Silica-Oberflächen über ein geringeres Gesamtaufnahmevermögen für NAs (das aber für die gewünschten Anwendungen immer noch genügend hoch ist), dafür ist die Elution der NAs aus Chitosan-Oberflächen deutlich schneller.^[88] Davon abgesehen gelten die allgemeinen Vor- und Nachteile Bead-basierter mikrofluidischer Apparaturen (siehe Tabelle 1).

2.3.3. Aluminiumoxidmembranen

Aluminiumoxidmembranen können auf ähnliche Weise wie Silicatmembranen zum Isolieren von NAs verwendet werden. Eine hohe Salzkonzentration bewirkt, dass die NAs fest an die Membranoberfläche binden. Eine positive Eigenschaft dieser Membranen ist, dass sie nicht die PCR hemmen, sofern das Membranvolumen relativ zum Reaktionsvolumen der PCR unter einem bestimmten Schwellenwert gehalten wird.^[90] Die NAs bleiben in Gegenwart des PCR-Gemischs an die Membran gebunden, die somit als Matrix für aufeinanderfolgende PCR-Reaktionen genutzt werden kann. Falls eine Elution durchgeführt werden soll, können die NAs durch Zugabe von Rinderserumalbumin und zusätzlicher Taq-Po-

lymerase zum PCR-Reaktionsgemisch eluiert werden.^[91] Aluminiumoxidmembranen wurden in Mikroapparaturen integriert, welche die Isolierung und Amplifikation von RNA und DNA ermöglichten.^[90] Auch ein Multiplexsystem wurde entwickelt, das den parallelen Nachweis von bis zu sieben Ziel-NAs ermöglichte.^[91] Die Kompatibilität mit nachgelagerten Prozessen macht Aluminiumoxidmembranen zu sehr attraktiven Plattformen für die NA-Isolierung. Aufgrund der festen Bindung der NAs ist es allerdings schwierig, die Oberfläche der Membran zu regenerieren.

2.3.4. Photoaktivierte Polycarbonat-Oberflächen

Es wurde gezeigt, dass photoaktivierte Polycarbonat(PC)-Oberflächen NAs in Gegenwart hoher Konzentrationen an Polyethylenglykol (PEG) und NaCl nichtspezifisch binden.^[92] Die Photoaktivierung von PC erzeugt eine carboxylierte Oberfläche, und die NA-Bindung erfolgt analog zur Bindung an Silicaoberflächen. PC kann durch Heißprägetechniken auf einfache und kostengünstige Weise strukturiert werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass das als Antikoagulans in Blutproben eingesetzte Natriumpolyanetholsulfonat (SPS), das als Inhibitor der PCR bekannt ist und in Gegenwart chaotroper Salze an Silica koordiniert, nicht an PC bindet.^[93] Photoaktivierte PC-Oberflächen wurden in Mikrofluidiksysteme integriert und zunächst in einem Schichtformat beschrieben.^[94] Basierend auf diesen erfolgversprechenden Ergebnissen wurden Mikrosäulenarrays in Mikrofluidikkanälen erzeugt und charakterisiert^[95] und anschließend aufskaliert, um DNA und RNA im 96er Mikroplattenformat zu extrahieren.^[93,96] Mit 96 Reinigungen in weniger als 30 min konnten die Extraktionen sehr schnell durchgeführt werden, und da die Apparaturen kostengünstig sind, können sie als Einwegartikel verwendet werden. In Abbildung 6 sind das Isolierungsverfahren und die Herstellung der Mikroapparaturen dargestellt. Eine Einschränkung dieses Verfahrens könnte sich aus der mangelnden Langzeitstabilität der photoaktivierten Oberfläche ergeben.

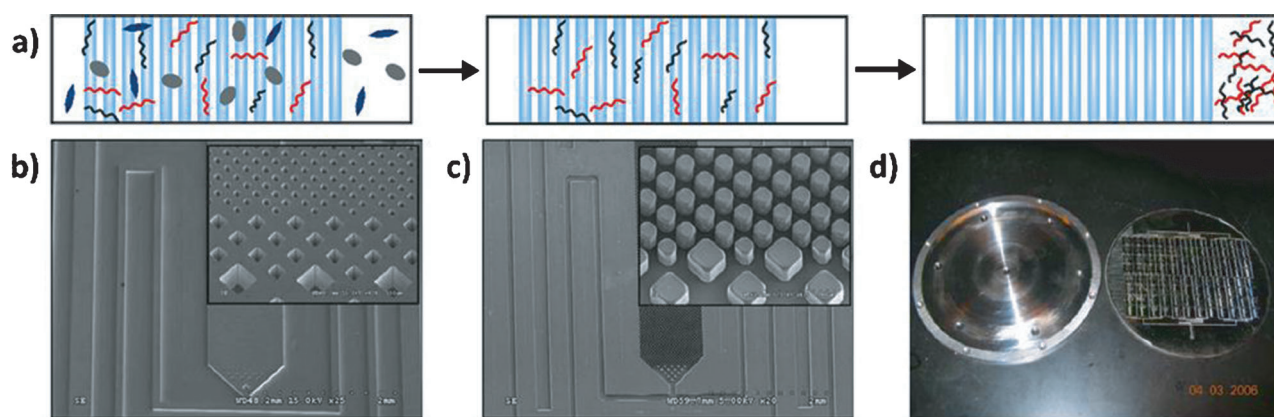


Abbildung 6. Isolierung von NAs mithilfe von Mikrosäulenarrays aus photoaktiviertem PC. Die Arrays wurden durch Heißprägen und UV-unterstützte thermische Polymerisation hergestellt. a) Schematische Darstellung des Verfahrens zur NA-Isolierung. Photoaktiviertes PC besitzt eine carboxylierte Oberfläche, die NAs in Gegenwart hoher Konzentrationen an PEG und NaCl bindet. Die unerwünschten Zellbestandteile werden gewaschen, und die NAs werden zur Weiterbehandlung von der Oberfläche eluiert. b) Aufnahme der zum Prägen von PC verwendeten Nickelform. c) Aufnahme der gut ausgebildeten PC-Mikrosäulen. d) Aufnahme einer 96er Mikroplatte für die NA-Isolierung durch Mikrosäulenarrays. (Mit Genehmigung aus Lit. [96], Copyright 2007, Springer.)

2.3.5. Amin-beschichtete Oberflächen

Amin-beschichtete Oberflächen wurden ebenfalls für Anwendungen in der mikrofluidischen NA-Isolierung untersucht. Amingruppen sind in Pufferlösungen mit niedrigerem pH-Wert positiv geladen, sodass NAs über elektrostatische Wechselwirkungen nichtspezifisch binden können. Hohe pH-Werte ermöglichen dann die Elution der gebundenen NAs.^[97] Aminierte Oberflächen können auf vielfältige Weise auf verschiedensten Oberflächen erzeugt werden, und das Verfahren ist einfach und robust. Die erfolgreiche Extraktion von NAs mit Amin-beschichteten Oberflächen wurde demonstriert.^[97] Zu bedenken ist, dass der rein elektrostatische Charakter der Immobilisierung eine Oberfläche präsentiert, die jegliche negativ geladene Spezies anzieht. Darüber hinaus kann der hohe pH-Wert des Elutionspuffers zu Problemen in nachfolgenden Prozessen führen oder ein Einstellen des pH-Wertes erfordern.

2.4. Verfahren der Flüssigphasenisolierung

Eine Reihe von mikrofluidischen Isolierungsverfahren wurde entwickelt, die keine Oberflächen oder Sonden zur Bindung von NAs verwenden. Diese Techniken basieren stattdessen auf der Elektrophorese oder auf Methoden der Lösungschemie, um NAs von den Probenverunreinigungen abzutrennen.

2.4.1. Elektrophoretische Verfahren

Verschiedene elektrophoretische Verfahren wurden entwickelt und in Mikrofluidikapparaturen integriert. So wird bei der Isotachophorese (ITP) ein aus zwei Puffern bestehendes System mit einem Leitelektrolyt und einem Schlepp-elektrolyt verwendet. Die Elektrolyten sind so gewählt, dass ihre elektrophoretische Mobilität größer bzw. geringer als die der NAs ist. Die elektrophoretische Mobilität des Schlepp-

elektrolyten sollte geringer sein als die der NAs, aber höher als die der negativ geladenen Verunreinigungen (die positiv geladenen Verunreinigungen wandern nicht in die gleiche Richtung wie die negativ geladenen NAs). Wenn an die beiden Puffer ein elektrisches Feld angelegt wird, wandern die NAs zur Grenzfläche zwischen den beiden Puffern, wo ein elektrischer Feldgradient vorliegt. Diese Methode wurde in einem Mikrochip demonstriert, und DNA aus Vollblutproben wurde erfolgreich isoliert.^[98,99]

Ein anderes Beispiel ist der dielektrophoretische Einfang. In diesem Verfahren werden Zonen mit großen elektrischen Feldgradienten genutzt, um DNA aufgrund ihres polaren Charakters einzufangen. Nanogen Inc. nutzt das gleiche Verfahren, um Zellen in Mikroapparaturen einzufangen.^[100] Durch Anlegen eines Wechselstromfeldes wurde Chromatin eingefangen, und ein schwaches Gleichstromfeld wurde genutzt, um Verunreinigungen zu entfernen.^[101] Hierzu wurde die Mikroapparatur mit einer speziellen Geometrie entworfen, die die Lokalisierung des großen elektrischen Feldgradienten und damit die Einfangzonen steuert.

Gelelektrophorese wurde ebenfalls in einer Mikrofluidikapparatur zur Extraktion von RNA aus komplexen Proben verwendet. Ein konstanter Wechselstrom wird an den die Probe enthaltenden Mikrokanal angelegt, und negativ geladene Spezies wandern durch den Kanal, wobei sich kleinere, stärker geladene Spezies schneller als größere, weniger geladene Spezies bewegen. Unter Anwendung dieses Verfahrens wurde niedermolekulare RNA isoliert, indem das Gel als „Absperrung“ für höhermolekulare Spezies wirkte.^[102] Dies ist ein weiteres Beispiel für ein gängiges Laborverfahren, das zu einem Mikrofluidikverfahren miniaturisiert wurde.

Die Elektrophoreseverfahren zur NA-Isolierung haben gegenüber der typischen Festphasenextraktion mehrere Vorteile: 1) Anstelle externer Pumpen wird eine Spannungsquelle verwendet, womit sich die Gesamtgröße der Apparatur verringert. 2) PCR-hemmende Lösungen werden vermieden, und im Wesentlichen kann jedes Substratmaterial eingesetzt werden. 3) Im Fall der ITP beeinflusst die Geo-

metrie der Mikrokanäle nicht das Verfahren. Diese Vorteile machen elektrophoretische Verfahren für die NA-Isolierung attraktiv, es gibt jedoch auch einige Bedenken. Am wichtigsten ist, dass keine dieser Methoden in einen Mikrochip integriert wurde, der auch Amplifikation und Detektion ausführt. Zudem erfordern sie die Entnahme der Probe mittels Pipette, und die elektrophoretische Mobilität der zu isolierenden NAs, die mit Ladung und hydrodynamischer Größe der NAs variiert, muss bekannt sein.^[103]

2.4.2. Isolierung durch organische Lösungsmittel

Das gängige Laborverfahren der Phenol/Chloroform-Flüssigphasenextraktion wurde ebenfalls zu einem Mikrofluidikverfahren miniaturisiert. Bei diesem Verfahren verteilen sich Proteine und Zellfragmente von der wässrigen Probenphase in die organische Phase, da dies ein energetisch günstiger Übergang ist. Dieses Verfahren wurde mit On-Chip-PCR kombiniert, und es ermöglicht nicht nur die NA-Isolierung, sondern auch das Entfernen von Inhibitoren.^[104] Die Empfindlichkeit wurde dadurch verbessert, dass Isolierung und Amplifikation in derselben Kammer durchgeführt und daher mit der Probenüberführung verbundene NA-Verluste vermieden werden, wie wir es in ähnlicher Weise auch in unseren Studien demonstriert hatten.^[74] Der Hauptvorteil dieses Verfahrens gegenüber der Festphasenextraktion in Mikroapparaturen ist, dass die Reinigungseffizienz höher ist. Der hauptsächliche Nachteil besteht jedoch im Einsatz organischer Lösungsmittel, die eine gefahrlose Handhabung und Entsorgung erfordern. Das schränkt die Verwendung dieser Apparaturen in den meisten Feld- und patientennahen Anwendungen sowie in Anwendungen mit begrenzten Ressourcen deutlich ein.

3. Schlussfolgerungen

Die in diesem Aufsatz diskutierten Verfahren der NA-Isolierung (zusammengefasst in Tabelle 1) bieten ein großes Potenzial für die Entwicklung von empfindlichen μ TAS-Chips für die patientennahe Diagnostik. Diese miniaturisierten und in Mikrofluidiksysteme integrierten Prozesse bieten viele Vorteile gegenüber normalen, makroskaligen Laborverfahren, z.B. geringere Kosten, schnellere Prozessierung, mögliche Automatisierung und weniger Abfälle. Da viele unterschiedliche Verfahren aufgezeigt wurden, kann das am besten geeignete Isolierungsverfahren anhand der Analyseparameter (Probentyp und -menge, Material der Apparatur, verfügbare Herstellungstechniken) und der dem Isolierungsschritt vor- und nachgeschalteten Prozesse ausgewählt werden. Außerdem ermöglicht die Miniaturisierung die Bündelung dieser Techniken zur simultanen Prozessierung mehrerer Proben und bietet eine Plattform für die Hochdurchsatz-Probenprozessierung.

In manchen Fällen werden keine hochgereinigten NAs benötigt, und eventuell ist nicht einmal eine Isolierung erforderlich. Bei Einzelzellstudien wird mitunter ohne vorausgehende NA-Isolierung amplifiziert. Hier liegt der Fokus darauf, Zellen in der Weise zu isolieren, dass man eine ein-

zelne Zelle in einer reinen Lösung vorliegen hat, sodass der Schritt der NA-Isolierung übergangen werden kann. Ein solches Experiment wurde auf einem integrierten Chip mit Zelleinfang und -reinigung, reverser Transkription von RNA und quantitativer PCR in einem Eintopfprozess demonstriert.^[105] Die mikrofluidische Isolierung und Behandlung von Einzelzellen ohne NA-Reinigung wurde als Fluidigm-Verfahren für die Hochdurchsatz-Sequenzierung kommerzialisiert.^[106] Allerdings ist selbst in Einzelzellanalysen eine NA-Isolierung nach wie vor erforderlich.^[20,107,108]

Obwohl die Entwicklung der Verfahren zur mikrofluidischen NA-Isolierung erheblich vorangeschritten ist, gibt es noch einen großen Spielraum für Verbesserungen sowohl bei den Verfahren selbst als auch bei der Verknüpfung und Kompatibilität mit anderen Prozessen. So ist es bisher noch nicht gelungen, bei komplexen Proben eine Extraktionseffizienz nahe 100 % zu erreichen. Wen et al. demonstrierten die Anwendung eines Proteinentsorgungsschrittes vor der NA-Isolierung, der die Effizienz der NA-Extraktion deutlich erhöhte.^[54] Letztendlich besteht die Herausforderung für Chemiker darin, Reaktionen zu entwickeln, die auf einfachste Weise ablaufen und keine energischen Bedingungen erfordern, um so die Kompatibilität zwischen sämtlichen Schritten der Probenbehandlung und -analyse zu maximieren. Da die NA-Isolierung selbst auf einem Mikrochip relativ schwierig ist, wäre es vorteilhaft, Assays für die NA-Analyse zu entwickeln, die keine Isolierung erfordern. Von den hier diskutierten Verfahren wurden nur sehr wenige in vollständige μ TAS-Chips integriert, die alle Schritte von der Prozessierung der Rohproben bis zur Detektion umfassen. Eine solche Integration wird ein notwendiger Schritt hin zur Entwicklung von Apparaturen für echte patientennahe Anwendungen sein.

Die Autoren danken der Cornell University, College of Engineering, Lester B. Knight Fellowship, sowie dem Multistate Federal Formula Grant „Development of a novel rapid-on-site biosensor for food safety“ (2012-13-132).

Eingegangen am 4. November 2013

Online veröffentlicht am 13. Oktober 2014

Übersetzt von Kerstin Mühle, Chemnitz

- [1] J. R. Epstein, I. Biran, D. R. Walt, *Anal. Chim. Acta* **2002**, 469, 3–36.
- [2] L. J. Kricka, *Clin. Chem.* **1999**, 45, 453–458.
- [3] I. Palchetti, M. Mascini, *Analyst* **2008**, 133, 846–854.
- [4] J. Wang, *Anal. Chim. Acta* **2003**, 500, 247–257.
- [5] T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1192–1199.
- [6] E. Palecek, *Talanta* **2002**, 56, 809–819.
- [7] J. Wang, G. Rivas, X. Cai, E. Palecek, P. Nielsen, H. Shiraishi, N. Dontha, D. Luo, C. Parrado, M. Chicharro et al., *Anal. Chim. Acta* **1997**, 347, 1–8.
- [8] N. L. Rosi, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1547–1562.
- [9] R. G. Cotton, *Biochem. J.* **1989**, 263, 1–10.
- [10] A. Manz, N. Graber, H. M. Widmer, *Sens. Actuators B* **1990**, 1, 244–248.
- [11] D. R. Reyes, D. Iossifidis, P.-A. Auroux, A. Manz, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 2623–2636.

- [12] J. Kim, M. Johnson, P. Hill, B. K. Gale, *Integr. Biol.* **2009**, *1*, 574–586.
- [13] J. T. Keer, L. Birch, *J. Microbiol. Methods* **2003**, *53*, 175–183.
- [14] R. B. Brown, J. Audet, *J. R. Soc. Interface* **2008**, *5*, S131–8.
- [15] M. G. Murray, W. F. Thompson, *Nucleic Acids Res.* **1980**, *8*, 4321–4326.
- [16] K. Wilson, *Current Protocols in Molecular Biology* **2001**, *00*, 2.4.1–2.4.5.
- [17] J. Wen, C. Guillo, J. P. Ferrance, J. P. Landers, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 6135–6142.
- [18] C. Zhang, J. Xu, W. Ma, W. Zheng, *Biotechnol. Adv.* **2006**, *24*, 243–284.
- [19] Y. Zhang, P. Ozdemir, *Anal. Chim. Acta* **2009**, *638*, 115–125.
- [20] P. J. Asciello, A. J. Baeumner, *Lab Chip* **2011**, *11*, 1420–1430.
- [21] R. Boom, C. J. Sol, M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. Wertheim-van Dillen, J. van der Noordaa, *J. Clin. Microbiol.* **1990**, *28*, 495–503.
- [22] S. A. Rutjes, R. Italiaander, H. H. J. L. van den Berg, W. J. Lodder, A. M. de Roda Husman, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 3734–3740.
- [23] K. Loens, K. Bergs, D. Ursi, H. Goossens, M. Ieven, *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, 421–425.
- [24] M. C. Breadmore, K. A. Wolfe, I. G. Arcibal, W. K. Leung, D. Dickson, B. C. Giordano, M. E. Power, J. P. Ferrance, S. H. Feldman, P. M. Norris et al., *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1880–1886.
- [25] K. A. Wolfe, M. C. Breadmore, J. P. Ferrance, M. E. Power, J. F. Conroy, P. M. Norris, J. P. Landers, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 727–733.
- [26] A. Chatterjee, P. L. Mirer, E. Z. Santamaria, C. Klapperich, A. Sharon, A. F. Sauer-Budge, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 4344–4356.
- [27] Q. Wu, J. M. Bienvenue, B. J. Hassan, Y. C. Kwok, B. C. Giordano, P. M. Norris, J. P. Landers, J. P. Ferrance, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 5704–5710.
- [28] K. J. Shaw, L. Thain, P. T. Docker, C. E. Dyer, J. Greenman, G. M. Greenway, S. J. Haswell, *Anal. Chim. Acta* **2009**, *652*, 231–233.
- [29] L. A. Christel, K. Petersen, W. McMillan, M. A. Northrup, *J. Biomech. Eng.* **1999**, *121*, 22–27.
- [30] D. N. Miller, J. E. Bryant, E. L. Madsen, W. C. Ghiorse, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 4715–4724.
- [31] R. A. Haugland, N. Brinkman, S. J. Vesper, *J. Microbiol. Methods* **2002**, *50*, 319–323.
- [32] C. Kneuer, M. Sameti, E. G. Haltner, T. Schiestel, H. Schirra, H. Schmidt, C. M. Lehr, *Int. J. Pharm.* **2000**, *196*, 257–261.
- [33] S. G. Bavykin, J. P. Akowski, M. Vladimir, V. E. Barsky, A. N. Perov, D. Mirzabekov, V. M. Zakhariev, A. D. Mirzabekov, *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 922–928.
- [34] H. Tian, A. F. Hühner, J. P. Landers, *Anal. Biochem.* **2000**, *283*, 175–191.
- [35] D. Erickson, D. Li, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *507*, 11–26.
- [36] R. Zhong, D. Liu, L. Yu, N. Ye, Z. Dai, J. Qin, B. Lin, *Electrophoresis* **2007**, *28*, 2920–2926.
- [37] K. A. Hagan, J. M. Bienvenue, C. A. Moskaluk, J. P. Landers, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8453–8460.
- [38] C. J. Easley, J. M. Karlinsey, J. M. Bienvenue, L. A. Legendre, M. G. Roper, S. H. Feldman, M. A. Hughes, E. L. Hewlett, T. J. Merkel, J. P. Ferrance et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 19272–19277.
- [39] J. M. Bienvenue, L. A. Legendre, J. P. Ferrance, J. P. Landers, *Forensic Sci. Int. Genet.* **2010**, *4*, 178–186.
- [40] L. L. Hench, J. K. West, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 33–72.
- [41] L. A. Legendre, J. M. Bienvenue, M. G. Roper, J. P. Ferrance, J. P. Landers, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 1444–1451.
- [42] K. J. Shaw, E. M. Hughes, C. E. Dyer, J. Greenman, S. J. Haswell, *Lab. Invest.* **2013**, *93*, 961–966.
- [43] A. Bhattacharyya, C. M. Klapperich, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 788–792.
- [44] A. Bhattacharyya, C. M. Klapperich, *Sens. Actuators B* **2008**, *129*, 693–698.
- [45] M. Mahalanabis, H. Al-Muayad, M. D. Kulinski, D. Altman, C. M. Klapperich, *Lab Chip* **2009**, *9*, 2811–2817.
- [46] S. Huang, J. Do, M. Mahalanabis, A. Fan, L. Zhao, L. Jepeal, S. K. Singh, C. M. Klapperich, *PloS One* **2013**, *8*, e60059.
- [47] M. D. Kulinski, M. Mahalanabis, S. Gillers, J. Y. Zhang, S. Singh, C. M. Klapperich, *Biomed. Microdevices* **2009**, *11*, 671–678.
- [48] Q. Cao, M. Mahalanabis, J. Chang, B. Carey, C. Hsieh, A. Stanley, C. A. Odell, P. Mitchell, J. Feldman, N. R. Pollock et al., *PloS One* **2012**, *7*, e33176.
- [49] N. C. Cady, S. Stelick, C. A. Batt, *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *19*, 59–66.
- [50] H. M. Ji, V. Samper, Y. Chen, W. C. Hui, H. J. Lye, F. B. Mustafa, A. C. Lee, L. Cong, C. K. Heng, T. M. Lim, *Sens. Actuators A* **2007**, *139*, 139–144.
- [51] J. West, M. Boerlin, A. D. Jadhav, E. Clancy, *Sens. Actuators B* **2007**, *126*, 664–671.
- [52] Q. Wu, W. Jin, C. Zhou, S. Han, W. Yang, Q. Zhu, Q. Jin, Y. Mu, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 3336–3342.
- [53] N. C. Cady, S. Stelick, M. V. Kunnakkam, C. A. Batt, *Sens. Actuators B* **2005**, *107*, 332–341.
- [54] Lit. [17].
- [55] K. J. Shaw, D. A. Joyce, P. T. Docker, C. E. Dyer, G. M. Greenway, J. Greenman, S. J. Haswell, *Lab Chip* **2011**, *11*, 443–448.
- [56] Lit. [42].
- [57] L. Kashkary, C. Kemp, K. J. Shaw, G. M. Greenway, S. J. Haswell, *Anal. Chim. Acta* **2012**, *750*, 127–131.
- [58] R. H. Schiestl, R. D. Gietz, *Curr. Genet.* **1989**, *16*, 339–346.
- [59] D. Chen, M. Mauk, X. Qiu, C. Liu, J. Kim, S. Ramprasad, S. Ongagna, W. R. Abrams, D. Malamud, P. L. A. M. Corstjens et al., *Biomed. Microdevices* **2010**, *12*, 705–719.
- [60] M. Kokoris, M. Nabavi, C. Lancaster, J. Clemmens, P. Maloney, J. Capadanno, J. Gerdes, C. F. Battrell, *Methods* **2005**, *37*, 114–119.
- [61] C. H. Setchell, *J. Chem. Technol. Biotechnol. Biotechnol.* **1985**, *35*, 175–182.
- [62] B.-I. Haukanes, C. Kvam, *Nat. Biotechnol.* **1993**, *11*, 60–63.
- [63] O. Olsvik, T. Popovic, E. Skjerve, K. S. Cudjoe, E. Hornes, J. Ugelstad, M. Uhlen, *Clin. Microbiol. Rev.* **1994**, *7*, 43–54.
- [64] K. Aguilar-Arteaga, J. A. Rodriguez, E. Barrado, *Anal. Chim. Acta* **2010**, *674*, 157–165.
- [65] G. R. M. Duarte, C. W. Price, B. H. Augustine, E. Carrilho, J. P. Landers, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 5182–5189.
- [66] K.-Y. Lien, C.-J. Liu, P.-L. Kuo, G.-B. Lee, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 4502–4509.
- [67] H. Bordelon, N. M. Adams, A. S. Klemm, P. K. Russ, J. V. Williams, H. K. Talbot, D. W. Wright, F. R. Haselton, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3*, 2161–2168.
- [68] U. Lehmann, C. Vandevyver, V. K. Parashar, M. A. M. Gijs, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3132–3137; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3062–3067.
- [69] K. Sur, S. M. McFall, E. T. Yeh, S. R. Jangam, M. A. Hayden, S. D. Stroupe, D. M. Kelso, *J. Mol. Diagn.* **2010**, *12*, 620–628.
- [70] C. Liu, K. Lien, C. Weng, J.-W. Shin, T.-Y. Chang, G.-B. Lee, *Biomed. Microdevices* **2009**, *11*, 339–350.
- [71] C.-L. Chiang, C.-S. Sung, T.-F. Wu, C.-Y. Chen, C.-Y. Hsu, *J. Chromatogr. B* **2005**, *822*, 54–60.
- [72] K.-Y. Lien, C.-J. Liu, Y.-C. Lin, P.-L. Kuo, G.-B. Lee, *Microfluid. Nanofluid.* **2008**, *6*, 539–555.
- [73] D. Liu, G. Liang, Q. Zhang, B. Chen, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 4698–4704.
- [74] S. J. Reinhold, A. Behrent, C. Greene, A. Kalfe, A. J. Baeumner, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 849–856.
- [75] G. Jiang, D. J. Harrison, *Analyst* **2000**, *125*, 2176–2179.

- [76] J. S. Marcus, W. F. Anderson, S. R. Quake, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 3084–3089.
- [77] S. M. Berry, E. T. Alarid, D. J. Beebe, *Lab Chip* **2011**, 11, 1747–1753.
- [78] S. W. Yeung, I.-M. Hsing, *Biosens. Bioelectron.* **2006**, 21, 989–997.
- [79] J. Wang, K. Morabito, J. X. Tang, A. Tripathi, *Biomicrofluidics* **2013**, 7, 044107.
- [80] C.-H. Wang, K.-Y. Lien, T.-Y. Wang, T.-Y. Chen, G.-B. Lee, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, 26, 2045–2052.
- [81] C.-H. Wang, K.-Y. Lien, L.-Y. Hung, H.-Y. Lei, G.-B. Lee, *Microfluid. Nanofluid.* **2012**, 13, 113–123.
- [82] C.-H. Wang, K.-Y. Lien, J.-J. Wu, G.-B. Lee, *Lab Chip* **2011**, 11, 1521–1531.
- [83] M. B. Esch, L. E. Locascio, M. J. Tarlov, R. A. Durst, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 2952–2958.
- [84] B. C. Satterfield, S. Stern, M. R. Caplan, K. W. Hukari, J. A. A. West, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 6230–6235.
- [85] B. E. Root, A. K. Agarwal, D. M. Kelso, A. E. Barron, *Anal. Chem.* **2011**, 83, 982–988.
- [86] S. R. Nugen, P. J. Asciello, A. J. Baeumner, *Microsyst. Technol.* **2008**, 15, 477–483.
- [87] K. A. Hagan, C. R. Reedy, M. L. Uchimoto, D. Basu, D. A. Engel, J. P. Landers, *Lab Chip* **2011**, 11, 957–961.
- [88] K. A. Hagan, W. L. Meier, J. P. Ferrance, J. P. Landers, *Anal. Chem.* **2009**, 81, 5249–5256.
- [89] W. Cao, C. J. Easley, J. P. Ferrance, J. P. Landers, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 7222–7228.
- [90] J. Kim, M. Mauk, D. Chen, X. Qiu, J. Kim, B. Gale, H. H. Bau, *Analyst* **2010**, 135, 2408–2414.
- [91] E. A. Oblath, W. H. Henley, J. P. Alarie, J. M. Ramsey, *Lab Chip* **2013**, 13, 1325–1332.
- [92] T. L. Hawkins, T. O'Connor-Morin, A. Roy, C. Santillan, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 4543–4544.
- [93] M. A. Witek, M. L. Hupert, D. S.-W. Park, K. Fears, M. C. Murphy, S. A. Soper, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 3483–3491.
- [94] Y. Xu, B. Vaidya, A. B. Patel, S. M. Ford, R. L. McCarley, S. A. Soper, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 2975–2984.
- [95] M. A. Witek, S. D. Llopis, A. Wheatley, R. L. McCarley, S. A. Soper, *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, e74.
- [96] D. S.-W. Park, M. L. Hupert, M. A. Witek, B. H. You, P. Datta, J. Guy, J.-B. Lee, S. A. Soper, D. E. Nikitopoulos, M. C. Murphy, *Biomed. Microdevices* **2008**, 10, 21–33.
- [97] T. Nakagawa, T. Tanaka, D. Niwa, T. Osaka, H. Takeyama, T. Matsunaga, *J. Biotechnol.* **2005**, 116, 105–111.
- [98] A. Persat, L. A. Marshall, J. G. Santiago, *Anal. Chem.* **2009**, 81, 9507–9511.
- [99] L. A. Marshall, L. L. Wu, S. Babikian, M. Bachman, J. G. Santiago, *Anal. Chem.* **2012**, 84, 9640–9645.
- [100] Y. Huang, S. Joo, M. Duhon, M. Heller, B. Wallace, X. Xu, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 3362–3371.
- [101] C. Prinz, J. O. Tegenfeldt, R. H. Austin, E. C. Cox, J. C. Sturm, *Lab Chip* **2002**, 2, 207–212.
- [102] P. Vulto, G. Dame, U. Maier, S. Makohliso, S. Podszun, P. Zahn, G. A. Urban, *Lab Chip* **2010**, 10, 610–616.
- [103] B. M. Olivera, P. Baine, N. Davidson, *Biopolymers* **1964**, 2, 245–257.
- [104] R. Zhang, H.-Q. Gong, X. Zeng, C. Lou, C. Sze, *Anal. Chem.* **2013**, 85, 1484–1491.
- [105] A. K. White, M. VanInsberghe, O. I. Petriv, M. Hamidi, D. Sikorski, M. Marra, J. Piret, S. Aparicio, C. L. Hansen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 13999–14004.
- [106] F. Ozsolak, P. M. Milos, *Nat. Rev. Genet.* **2011**, 12, 87–98.
- [107] R. N. Zare, S. Kim, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2010**, 12, 187–201.
- [108] Y. Zeng, R. Novak, J. Shuga, M. T. Smith, R. A. Mathies, *Anal. Chem.* **2010**, 82, 3183–3190.