

Analytik in Picoliter-Volumina

Miniaturisierung des Laboralltages durch Lab-on-a-Chip Systeme

Lucas Armbrecht, Dr. Felix Kurth und Prof. Dr. Petra S. Dittrich
Bioanalytik, Departement Biosysteme, ETH Zürich, Schweiz

Zeit, Kosten und personellen Aufwand senken – viele grundlegende sowie angewandte analytische und diagnostische Herausforderungen können mit Lab-on-a-Chip Systemen realisiert werden. Sie erlauben die Verringerung von Probenmengen, die Automatisierung und Parallelisierung von Arbeitsschritten und sind bestens kombinierbar mit hochsensitiven analytischen Methoden. Die Gruppe Bioanalytik an der ETH Zürich ist auf die Entwicklung innovativer Lab-on-a-Chip Technologien und deren breites Anwendungsfeld in biologischen und diagnostischen Fragestellungen spezialisiert.

Schneller, kostengünstiger und automatisiert: Wie kann man kleinste Volumina erzeugen, kontrollieren und analysieren?

Viele biochemische und zellbiologische Tests werden heutzutage in Mikrotiterplatten mit 96 oder 384 Reaktionskammern durchgeführt. Durch Änderung in den Konzentrationen oder Reaktionsbedingungen werden dabei systematische Untersuchungsreihen erstellt. Das für einen Test verwendete Volumen an Probe und Reagenzien beträgt dabei üblicherweise zwischen 10 µl und einigen 100 µl (Abb. 1). Hierfür sind oft viele zeitintensive Arbeitsschritte einschließlich Pipettieren erforderlich, die eine hohe Fehleranfälligkeit aufweisen. Bei einer steigenden Anzahl an Tests wächst entsprechend auch der Zeit- und Personalbedarf stark an. Mikrofluidische Systeme – auch Lab-on-a-Chip genannt – erlauben es, die benötigten Probe- und Reagenzvolumenta und damit einhergehend die Kosten pro Test um Größenordnungen zu senken und gleichzeitig eine Vielzahl von verschiedenen Experimenten parallelisiert in einem einzigen Chip durchzuführen (siehe Infobox) [1].

Modulare Bausteine auf kleinstem Raum

Mithilfe photolithographischer Prozesse und neuerdings auch durch 3D-Druckverfahren kann eine Vielzahl an

fluidischen Operationen in einem kostengünstigen mikrofluidischen Chip auf einer Fläche von wenigen Quadratzentimetern kombiniert werden (siehe Abb. 2). Das Spektrum der integrierten Module reicht von einfachen Kanälen in der Größenordnung von 1 bis 500 µm, die eine Probelösung zu einem Sensor oder Detektor zu führen, bis hin zu sehr komplexen Systemen, in denen unterschiedliche Arbeitsschritte wie z. B. Wasch- oder Trennungsschritte automatisiert und parallel für Hunderte Proben gleichzeitig durchgeführt werden [2]. Neben Kanälen und Kammern sind heute auch aktive Elemente wie Ventile und Pumpen integrierbar, die zeitlich abgestimmtes Vermischen mit hoher Präzision und die Messung von dynamischen Prozessen (Kinetiken) mit hoher Zeitauflösung erlauben.

Die meisten gängigen Chipmaterialien (Glas und Polymere) sind transparent und daher bestens für optische Messmethoden einsetzbar. Daneben rücken zudem Schnittstellen von mikrofluidischen Systemen und anderen analytischen Methoden wie die Massenspektrometrie in den Fokus der Entwicklung [3].

Picoliter-Volumina – vielfältig einsetzbar und präzise kontrollierbar

Durch Verwendung von Ventilen oder durch Erzeugung von segmentierten Flüssen – der sogenannten Tropfenmikrofluidik – können kleinste Volumina in der Größen-

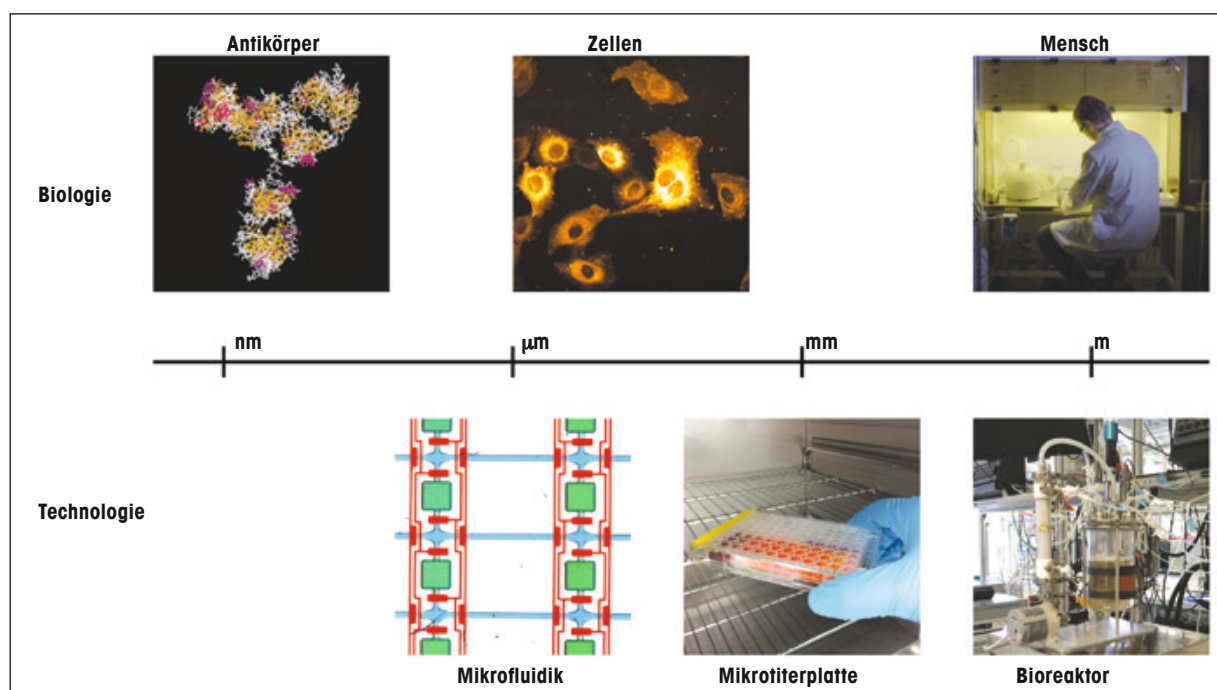


Abb. 1 Konventionelle und mikrofluidische Instrumente zur Inkubation und Untersuchung von lebenden Zellen.

ordnung von Pico- und Nanolitern reproduzierbar erzeugt werden [4]. Durch Ventile werden kleine Kammern abgegrenzt, die sich unter anderem zum Festhalten und zur Kultivierung von Zellen bestens eignen. Lebende Zellen können so über längere Zeiträume beobachtet werden, während sie – systematisch und zeitlich gesteuert – Testsubstanzen ausgesetzt werden. Der Flüssigkeitsaustausch in solchen Kammern erfolgt innerhalb von Bruchteilen einer Sekunde (Abb. 3). Das Volumen innerhalb der Kammern ist durch die Form und die Anordnung der Ventile festgelegt, d. h. die abgemessene Menge – ob nL oder pL – ist immer identisch. Im Gegensatz zum Einsatz von Ventilen werden in der Tropfenmikrofluidik kleine Wasserkompartimente von einer nichtmischbaren Fluidphase umgeben, sodass schnell und reproduzierbar kleine Tropfen entstehen [3, 4]. Da die Tropfenerzeugung in sehr hoher Frequenz bis in den kHz-Bereich möglich ist, wird diese Strategie insbesondere für Hochdurchsatzanalysen verwendet.

Neue Methoden in der Bioanalytik

Die Analyse von biologischen Proben, d. h. Bakterien- oder Zellkulturen, innerhalb ultrakleiner Volumina liefert einen detaillierten Einblick in eine Vielzahl biologischer Abläufe. Zellbasierte Studien eröffnen über die Grundlagenforschung hinausgehend zahlreiche Anwendungen, z.B. für Toxizitätsanalysen, in der Arzneimittelentwicklung, Biotechnologie und vielen weiteren Industriezweigen. Eine besondere Herausforderung hierbei ist die Analyse einzelner Zellen, von der man sich wertvolle Informationen für die Systembiologie, insbesondere über das Verhalten und die Anpassungsfähigkeit individueller Zellen, erhofft. Hierfür wird in unserer Gruppe eine Kombination aus hochempfindlicher Fluoreszenzmikroskopie und mikrofluidischen Chips eingesetzt.

Abbildung 4 zeigt ein Beispiel, bei dem die individuelle Zellantwort (hier der Anstieg des Botenstoffes cyclisches Adenosinmonophosphat, cAMP) nach Stimulierung mit einem Hormon (hier Lutropin) ermittelt wurde. Dazu werden einzelne Zellen (hier die Tumorzelllinie MLTC) in einem Array aus Miniaturkammern zunächst immobilisiert. Dies gelingt durch im Kanal positionierte Zellfallen, die aus zwei in geringem Abstand zueinanderstehenden Säulen bestehen. Auf diese Weise wird genau eine Zelle festgehalten, weitere Zellen jedoch passieren bereits besetzte Zellfallen. Nun können sequenziell verschiedene Stimulierungs- und Waschschritte ausgeführt werden. Anschließend werden die Zellen lysiert und die runden



Abb. 2 Auswahl an elementaren mikrofluidischen Operationen

Infobox

Vorteile von Lab-on-a-Chip Systemen

- Drastische Verringerung des Probenverbrauchs
- Klein, mobil, stand-alone Nutzung (z. B. für Point-of-Care)
- Schnellerer Wärme- und Massentransport
- Parallelisierung
- Automatisierbare Abläufe
- Modulare Entwürfe erlauben die Integration von Unit Operations
- Präzise Kontrolle von kleinsten Flüssigvolumina sowie kleinen Objekten (z.B. Tropfen, Partikel oder Zellen) [3, 4]
- Ermöglicht die Simulation biologischer Systeme (künstliche Zellen, Organs-on-a-Chip)

Ventile aktuiert, sodass das Lysat in einem 500 pL großen Volumen eingeschlossen ist. Die Menge an cAMP wird mittels eines kompetitiven Immunoassays ermittelt, bei dem das freigesetzte cAMP an spezifische Antikörper bindet. Mit dieser Methode lässt sich eine Dosis-Wirkungskurve ermitteln, die sowohl die Mittelwerte vieler Zellen

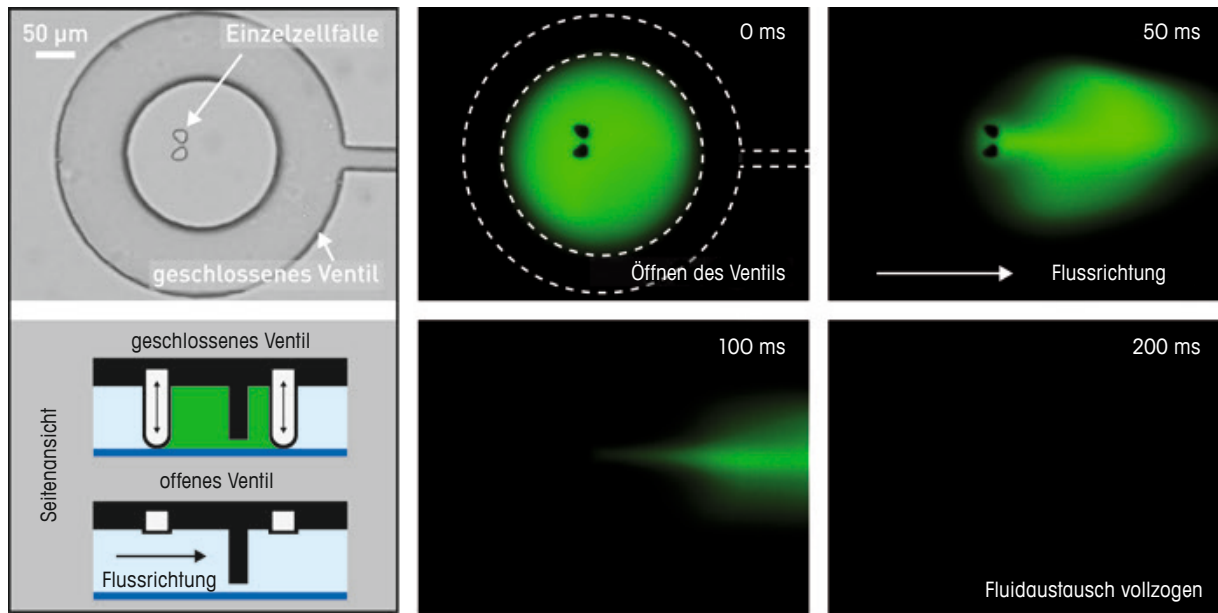


Abb. 3 Waschschrift on-chip. Der gezeigte mikrofluidische Chip enthält integrierte, runde Ventile, hier kreisringförmige Stempel, die in den Kanal gedrückt werden und so kleine Kammern bilden. Bei geschlossenem Ventil wird ein Volumen von wenigen Hundert Picolitern eingeschlossen. Das Öffnen und Schließen des Ventils erlaubt einen vollständigen Flüssigkeitsaustausch innerhalb von

ca. 200 ms, was in der Einzelzellanalytik z. B. für die Zufuhr eines frischen Wachstumsmediums oder als Waschschrift genutzt werden kann. Die Bilderserie hier zeigt eine eingeschlossene fluoreszierende Flüssigkeit, die durch Öffnen des Ventils durch die außen fließende, nicht fluoreszierende Pufferlösung ausgetauscht wird.

(rote Symbole) aufzeigt, als auch die Werte für individuelle Zellen (schwarze Symbole) beinhaltet (Graph in Abb. 4). Die Ergebnisse dokumentieren die starke Heterogenität der Zellantworten und unterstreichen somit die besondere Relevanz der Einzelzellanalytik [5].

Aktuelle Trends

Mikrofluidik leistet bereits heute einen wichtigen Beitrag in der Bioanalytik und ermöglicht innovative, komplexe Methoden für forschungsrelevante Fragestellungen.

Daneben beinhaltet die Entwicklung mikrofluidischer diagnostischer Tests ein großes Potenzial, unter anderem für personalisierte Therapien. Miniaturisierte Analytik, verbunden mit einfachen, kostengünstigen Fluidik-Chips wird es erlauben, an nahezu jedem Ort der Welt bedarfsgerecht komplexe biologische und chemische Tests schnell und online durchzuführen [6]. Weiterhin können mikrofluidische Systeme auch durch den Nachbau von Gewebe („Organ-on-a-Chip“) die biologische Umgebung von Zellen simulieren und dadurch detaillierte und realitätsnahe Erkenntnisse z.B. über den Verlauf von Krankheiten oder die Metabolisierung von Medikamenten

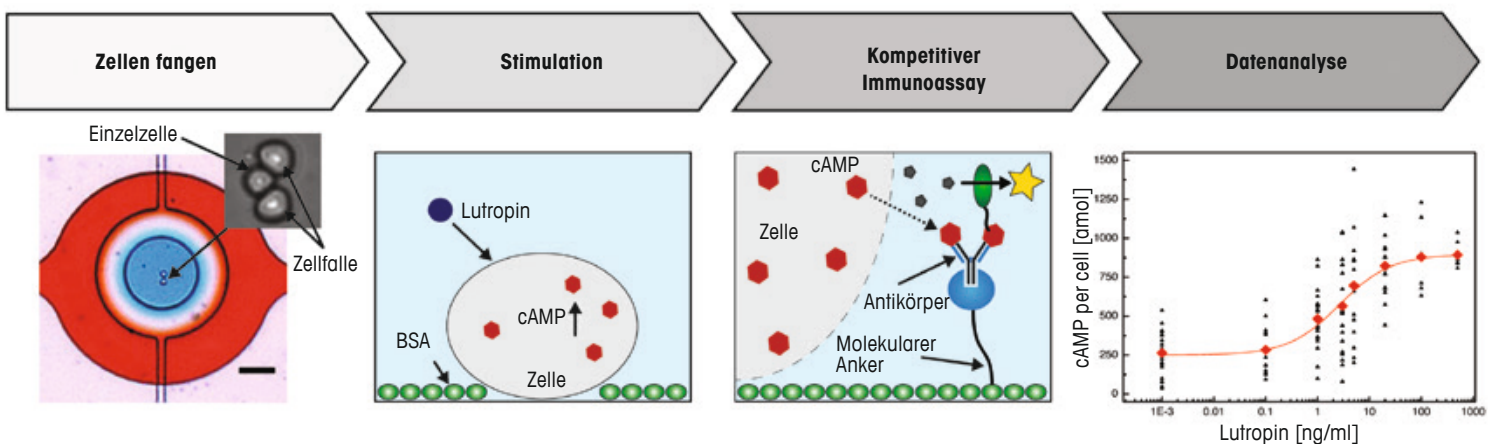
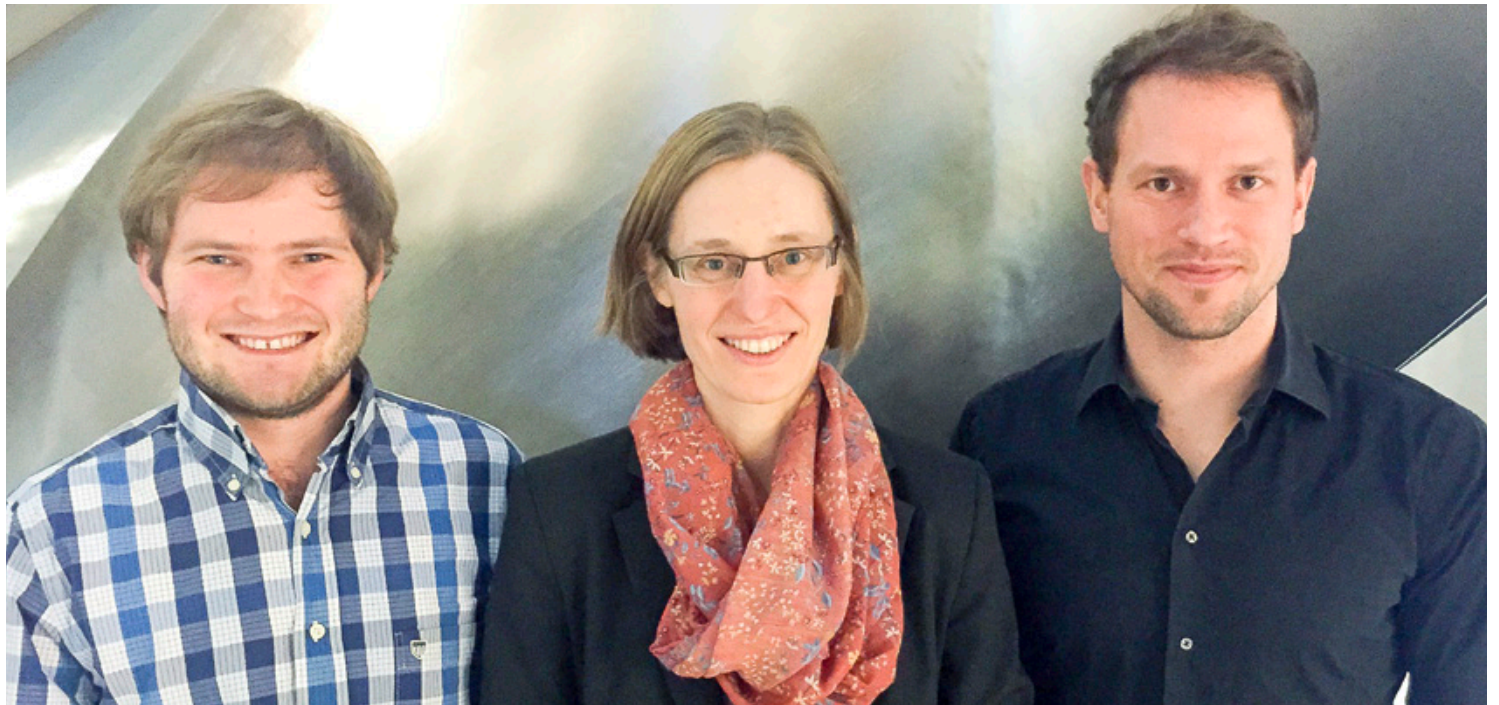


Abb. 4 Ermittlung einer Dosis-Wirkungs-Kurve, aufgelöst für einzelne Zellen auf Basis eines antikörperbasierten Nachweisverfahrens (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay). Die Zellen werden in einer Zellfalle festgehalten, lysiert und

analysiert. Die Zugabe einer stimulierenden Substanz kann dabei vor Injektion in den Chip oder nach der Immobilisierung der Zelle erfolgen. (Daten aus [5] mit Erlaubnis reproduziert, Copyright ACS).



Lucas Armbrecht, Jg. 1989, studierte Mikrosystemtechnik an der Albert-Ludwigs Universität in Freiburg im Breisgau. Während seines Masterstudiums konzentrierte er sich auf die Bereiche Sensorik und Lab-on-a-Chip. Seit dem Juni 2015 forscht er in der Arbeitsgruppe für Bioanalytik im Bereich Einzelzellanalytik. In seiner Doktorarbeit konzentriert er sich auf die Entwicklung mikrofluidischer Methoden zur Multiparametermessung an selektiv gefangenen Einzelzellen.

Petra Dittrich, Jg. 1974, ist Außerordentliche Professorin am Department Biosysteme der ETH Zürich. Sie studierte Chemie an der Universität Bielefeld und Universidad de Salamanca (Spanien). Nach der Promotion am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen war sie Postdoktorandin am ISAS Institut für Analytische Wissenschaften in Dortmund und von 2008 bis 2014 Assistenzprofessorin für Bioanalytik am Department Chemie und Angewandte Biowissenschaften an der ETH Zürich (Schweiz). Ihre Forschungsinteressen liegen in der Miniaturisierung bioanalytischer Methoden insbesondere für die Analyse von Zellen und Membranen und zur Erzeugung von einfachen Zellmodellen. Für ihre Arbeit auf dem Gebiet der Einzelzellanalyse mit immunologischen Methoden wurde sie 2015 mit dem Heinrich-Emmanuel-Merck-Preis ausgezeichnet.

Felix Kurth, Jg. 1982, studierte Bioingenieurwesen an der Technischen Universität Dortmund und an der Königlich Technischen Hochschule in Stockholm. Für seine Promotion, die er 2015 von der Eidgenössisch Technischen Hochschule in Zürich erlangte, entwickelte er Lab-on-a-Chip Systeme und Methoden zur Quantifizierung von mechanisch-biologischen Fragestellungen auf Einzelzellebene, insbesondere die Charakterisierung von mechanisch-sensitiven Kationenkanälen. Sein Forschungsschwerpunkt ist nunmehr die Implementierung mechanisch-sensitiver Trans-Membranproteinkomplexe in artifizielle Zellstrukturen.

(Pharmakokinetik) liefern [7]. Die geringe Messdauer, gepaart mit der hohen Parallelisierung von Tests, ermöglicht schnellere und kostengünstigere Ergebnisse als konventionelle Tests und erlaubt zudem Verbesserungen in der Standardisierung von zellbasierten Assays.

Literatur

- [1] Sackmann, E. K. et al. (2014) Nature 507, 181–189
- [2] Dittrich, P.S., Manz, A. (2006) Nat. Rev. Drug Disc. 5, 210–218
- [3] Küster, S. K. et al. (2015) Angew. Chem. Int. Ed. 54, 1671–1675
- [4] Hümmer, D. et al. (2016) Lab Chip 16, 447–458
- [5] Eyer, K. et al. (2012) Lab Chip 12, 765–772
- [6] Eyer, K. et al. (2015) Sci. Rep. 5, 16551
- [7] Kurth, F. et al. (2012) Curr. Opin. Chem. Biol. 16, 400–408

- petra.dittrich@bsse.ethz.ch
- felix.kurth@bsse.ethz.ch
- lucas.armbrecht@bsse.ethz.ch



Den Beitrag finden Sie auch online im q&more-Portal
■ www.bit.ly/qmore1601-05