

Automatisiertes Drucken einzelner Zellen mittels eines kontaktfreien Druckverfahrens im Picoliterbereich

Non-contact Automated Single Cell Printing with Picoliter Droplets

J. Schöndube¹, A. Yusof¹, A. Gross¹, S. Rubenwolf¹, D. Liang¹, G. Roth¹, R. Zengerle¹ and P. Koltay^{1,2}

¹ Institut für Mikrosystemtechnik - IMTEK, Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung,

Georges-Köhler-Allee 106, 79100 Freiburg, jonas.schoendube@imtek.de

²BioFluidix GmbH, Georges-Koehler-Allee 106, 79110 Freiburg

Kurzfassung

Wir präsentieren einen **Einzelzellmanipulator (EZM)** zum automatisierten Drucken einzelner Zellen. Der EZM ist Teil eines Projekts zur Realisierung einer „**Platform for Advanced Single Cell-Manipulation and Analysis**“ (PASCA, www.pasca.eu). Zellen werden in einem mikrofluidischen Tropfenerzeuger (NanoJet™-Chip) von einer Kamera erkannt und mit hohen Überlebensraten einzeln in Picoliter großen Tropfen auf beliebige Substrate kontaktfrei gedruckt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Hefe-Zellen (*S. cerevisiae*), Krebszellen (HeLa-Zellen) und Stammzellen (Fibroblasten, Keratinozyten) gedruckt. Nach dem Drucken wurden **Überlebensraten von bis zu 95%** und **Einzelzellraten von bis zu 84%** experimentell ermittelt.

Abstract

We present a Single-Cell-Manipulator (SCM) to automatically print single cells. The SCM is part of a project aiming for a “**Platform for Advanced Single Cell-Manipulation and Analysis**” (PASCA, www.pasca.eu). Cells are detected within a microfluidic droplet dispenser (NanoJet™-Chip) and are non-contact printed on various substrates. Droplets are in the pico liter range and cell viability is high. Within the framework of this work yeast cells (*S. cerevisiae*), cancer cells (HeLa cells) and stem cells (fibroblasts, keratinocytes) have been dispensed. After printing **cell survival rates up to 95%** and **single cell efficiency of up to 84%** have been determined by experiments.

1 Einleitung

Die Analyse von einzelnen Zellen ist ein wichtiges Ziel in vielen Bereichen der Lebenswissenschaften. Eine vollautomatisierte Plattform für Einzelzellanalysen verspricht neue Möglichkeiten in den Anwendungsfeldern der Zellbiologie, des Tissue Engineerings und der medizinischen Diagnostik. Experimentelle Zellanalysen werden derzeit überwiegend noch an ganzen Populationen vorgenommen. Dadurch können Heterogenitäten innerhalb einer Zellpopulation nicht beobachtet werden. Solche Ergebnisse können fehlleitend oder mehrdeutig sein (Bild 1). Das Arbeiten mit einzelnen Zellen bietet daher entscheidende Vorteile. Die biologischen Experimente werden aussagekräftiger, da statt Durchschnittswerten einer ganzen Population, Werte für jede einzelne Zelle gewonnen werden (siehe [1] und Referenzen darin). Auch aus wirtschaftlicher Sicht ist die Einzelzellanalyse vorteilhaft, da die benötigte Menge an Zellen und Verbrauchsmaterial reduziert wird.

Das kontaktfreie Drucken einzelner Zellen ist als Vereinzlungstechnologie besonders geeignet, weil damit auf beliebige Substrate, beliebige Zellmuster erstellt werden können. Allerdings konnte bisher das automatisierte Drucken von einzelnen Zellen nur statistisch, durch Anpassen der Zellkonzentrationen und des Tropfenvolumens, erreicht werden [2]. Dabei werden üblicherweise Einzelzell-

raten von lediglich ca. 50% erreicht [3]. Das automatisierte Dispensieren einzelner Zellen mit Hilfe eines automatischen optischen Detektionssystems konnte kürzlich erstmals gezeigt werden [4].

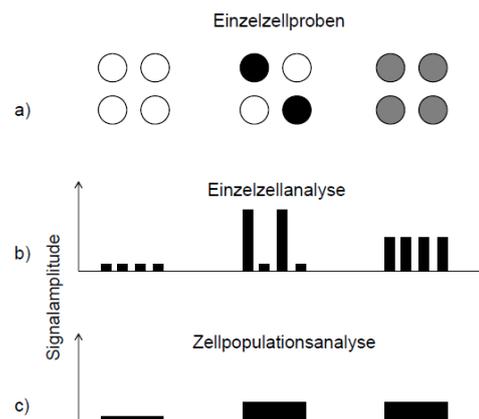


Bild 1 Bei der Einzelzellanalyse können Heterogenitäten innerhalb einer Population erkannt werden. a) Schematische Darstellung von drei Proben mit je vier Einzelzellen in verschiedenen Zuständen. b) Messergebnisse einer Einzelzellanalyse. c) Messergebnisse einer Zellpopulationsanalyse.

2 Konzept des Einzelzellmanipulators (EZM)

2.1 Dispensier-Chip

Der NanoJet™ Dispensier-Chip [6] (Biofluidix GmbH, Freiburg) wird mikrotechnisch hergestellt. Ein Siliziumwafer (300 µm) wird mit dem Boschverfahren 40 µm tiefe geätzt. In einen Pyrex-Wafer (300 µm) werden Durchgangslöcher mit Flusssäure geätzt. Schließlich werden beide Wafer anodisch aufeinander gebondet. Die resultierende mikrofluidische Struktur besteht aus einem Einlass, einer Dosierkammer und der Düse. Das Funktionsprinzip ist in Bild 2 dargestellt. Ein Stößel, getrieben durch einen Piezo-Stapelaktor, deformiert die Siliziummembran, wobei das Volumen der Dosierkammer verringert wird. Das verdrängte Fluidvolumen entweicht daraufhin sowohl in Richtung Einlass als auch durch die Düse. Eine Verjüngung zwischen Einlass und Dosierkammer wirkt als fluidischer Widerstand, so dass ausreichend Fluid durch die Düse entweicht um einen Tropfen zu formen.

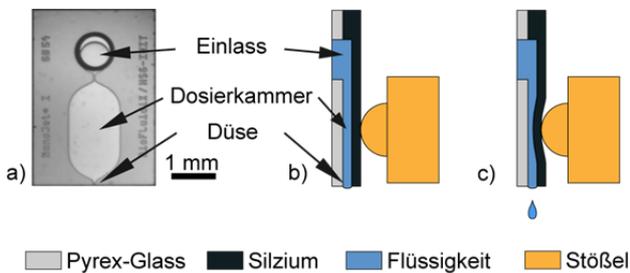


Bild 2 Funktionsschema des NanoJet™-Verfahrens. a) Draufsicht auf den Silizium/Glass-Chip. b) befüllter Chip im Normalzustand. c) der Stößel wird gegen die Siliziummembran gedrückt, wodurch das Volumen der Dosierkammer verkleinert und ein Tropfen ausgestoßen wird.

2.2 Gesamtaufbau

Der hier beschriebene EZM besteht maßgeblich aus einem Laborroboter und einem neu entwickelten Druckkopf (Bild 3). Der Druckkopf besteht aus einem Tropfenerzeuger und einer Digitalkamera inkl. Optik und Beleuchtung zur Zellerkennung. Der wichtigste Bestandteil des Tropfenerzeugers ist der NanoJet™ Chip (Bild 2). Der Bereich in der Nähe der Düse wird von der Digitalkamera beobachtet. Ein Objekterkennungsalgorithmus erfasst, ob sich eine einzelne Zelle in dem Fluidbereich befindet, der den nächsten Tropfen bilden wird [7]. Befindet sich keine oder mehrere Zellen vor der Düse, wird der Tropfen an einer Ausschussposition dispensiert. Der EZM wird mithilfe der BioSpot®-Software (Biofluidix GmbH, Freiburg) gesteuert. Bei den ersten Experimenten mit Bäckerhefe und HeLa-Zellen war der Tropfenerzeuger horizontal montiert, um Verstopfung der Düse durch Sedimentation zu verhindern. Als in den ersten Experimenten keine Probleme durch Sedimentation festgestellt wurde, wurde bei den weiteren Versuchen mit Keratinozyten und Fib-

roblasten die Düse vertikal nach unten positioniert, wie in Bild 3 dargestellt.

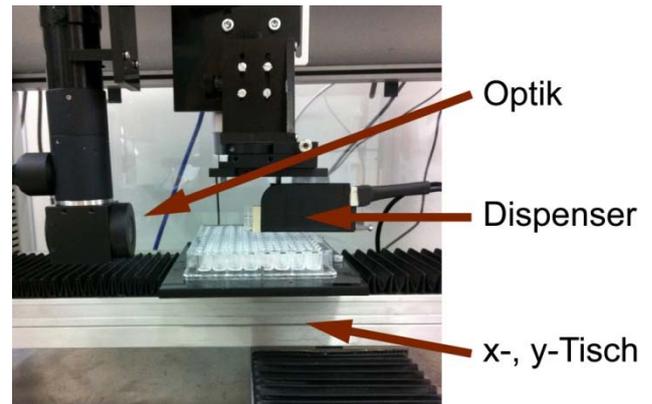


Bild 3 Experimenteller Aufbau mit Zoomoptik, Dispenser über einer Mikrotiterplatte und Kreuztisch.

3 Experimentelle Ergebnisse

3.1 Dosierverhalten

Das Dosierverhalten der NanoJet™ Chips ist in Bild 4 und Bild 5 gezeigt. Es wurde das Gewicht von 100 Tropfen destilliertem Wasser mit einer Waage (XP2U/M, Mettler Toledo, Giessen) gemessen. Dabei wurde in ein Gefäß dispensiert das 500 µl Wasser enthielt, dessen Oberfläche mit 200 µl Silikonöl (Dow Corning 200) vor Verdunstung geschützt wurde. Einzelne Tropfen konnten gravimetrisch nicht aufgelöst werden. Die Fehlerbalken stellen eine Standardabweichung von 10 Messungen mit je 100 Tropfen dar. Bild 4 beschreibt das Dosierverhalten in Abhängigkeit vom Hubweg des Aktors. Der Hubweg des sog. P9-Piezoaktors wurde nach Herstellerangaben (Biofluidix GmbH, Freiburg) berechnet und nicht experimentell bestimmt. Bei kleinen Hüben (< 9 µm) ist das Tropfenvolumen im Bereich 50 – 150 pl sehr gut durch den Hubweg einstellbar.

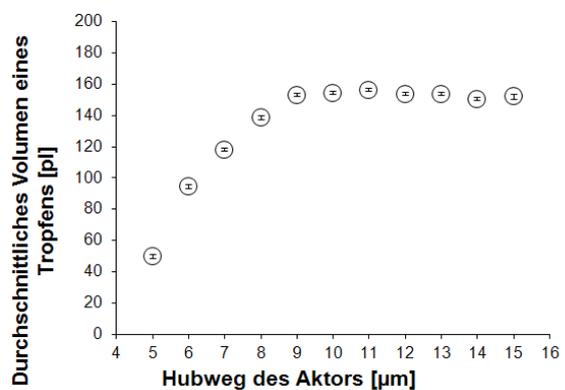


Bild 4 Beispielhafte Dosierkurve des Tropfenerzeugers in Abhängigkeit des Hubwegs des Aktors.

Bild 5 zeigt die Abhängigkeit des Dosiervolumens von der Geschwindigkeit mit der sich der Aktor bewegt. Diese Messung wurde mit 10 µm Aktorhub durchgeführt. Höhere Geschwindigkeiten erzeugen größere, schnellere Tropfen. Der große Fehlerbalken bei 140 µm/ms könnte dadurch entstanden sein, dass die Aktorgeschwindigkeit nicht mehr ausreichend war, um bei jeder Auslenkung stabil einen Tropfen zu erzeugen.

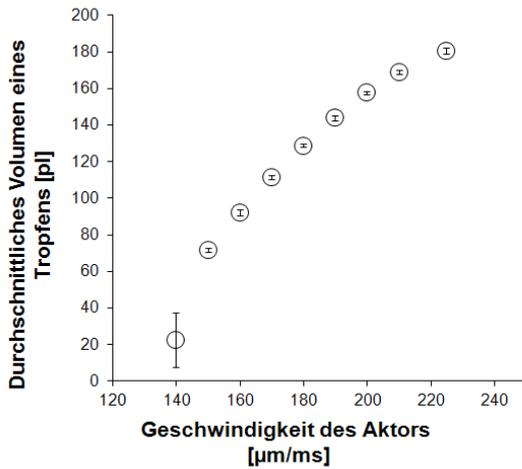


Bild 5 Beispielhafte Dosierkurve des Tropfenerzeugers in Abhängigkeit der Geschwindigkeit des Piezoaktors.

In den durchgeführten Experimenten wurde Zellen mit Hüben des Aktors von 8 µm bis 10 µm und Aktorgeschwindigkeiten von 200 µm/ms (ca. 150 pL Tropfen) dispensiert, um sowohl zu große Scherspannung als auch zu kleine Tropfen zu verhindern. Große Scherspannungen sind eine Belastung für Zellen, kleine Tropfen hingegen verdunsten schneller während des Fluges.

3.2 Zelldispensierung

Vor jedem Zell Experiment wurde der Tropfenerzeuger mit 70% Ethanol sterilisiert. Danach erst wurde die Zellsuspension (ca. 10⁵ Zellen/ml) ins Reservoir gegeben. Bäckerhefe-Zellen (*Saccharomyces cerevisiae*) wurden in phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) suspendiert und in eine mit Agar (YGC; Carl ROTH, Karlsruhe) beschichtete Petrischale gedruckt. Bild 4 zeigt ein 5x5 Array von Bäckerhefe-Zellen. Der Tropfenabstand beim Drucken betrug 500 µm. Auf Bild 6 a) kann man erkennen, dass 21 von 25 (84%) Tropfen genau eine einzelne Zelle enthielten. Bild 6 b) illustriert das Vermehren und damit das Überleben von 95% der Bäckerhefe-Zellen.

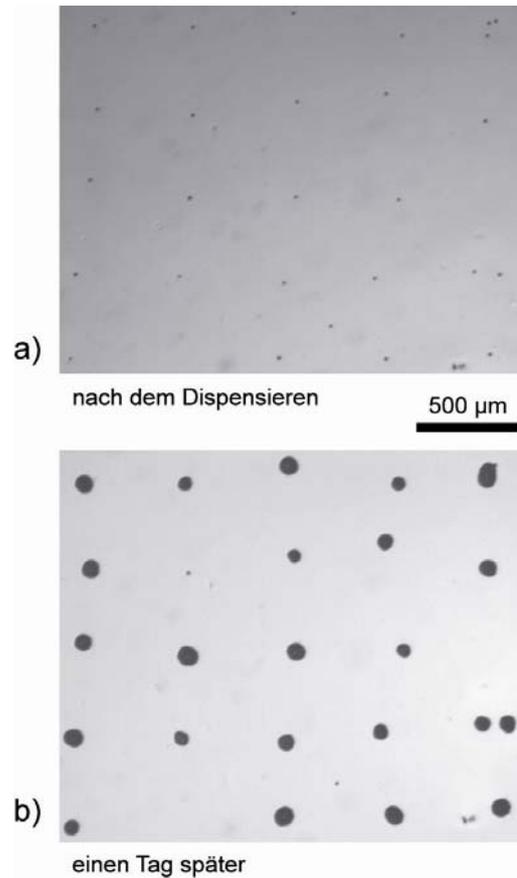


Bild 6 5x5 Hefe-Zellen Array. a) 25 Tropfen wurden in eine Agarplatte dispensiert. b) Das gleiche Array einen Tag später. Durch Teilung sind aus lebenden Zellen Zellcluster entstanden.

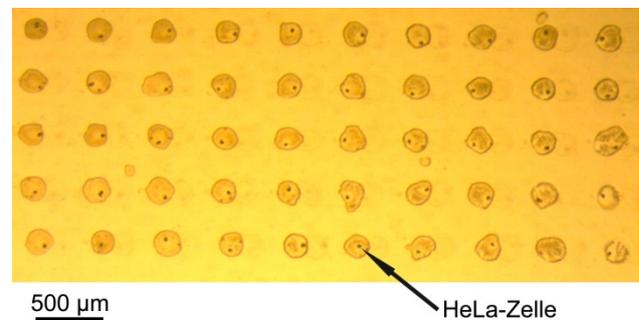


Bild 7 Einzelne HeLa-Zellen (Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) wurden in Tropfen auf einen Objektträger gedruckt. Die schwarzen Punkte sind die Zellen, in deren Umgebung Reste des verdunsteten Tropfens sichtbar sind. Das Bild wurde direkt nach dem Druck aufgenommen.

Des Weiteren wurden HeLa-Zellen (ATCC CCL-2) einzeln auf einen Objektträger dispensiert (Bild 7). Das experimentelle Vorgehen entsprach dem von Yusof et al. beschriebenen Verfahren [4]. Die Objektträger (Carl Roth, Karlsruhe) wurden über Nacht in NaOH-Lösung (1 M) getaucht, mit gefiltertem Wasser gespült und schließlich mit N₂ trocken geblasen. HeLa-Zellen wurden in Kulturmedium, bestehend aus Minimum Essential Medium (MEM Eagle; Lonza, Schweiz), FBS, Penicillin,

Streptomycin (Invitrogen, USA) und Aminosäuren (Lonza, Schweiz), kultiviert. Inkubationsbedingungen waren 37 °C und 5% CO₂. Die Zellen wurden bei 80% Konfluenz geerntet, zentrifugiert und in Kulturmedium resuspendiert. Auf Bild 7 sieht man ein 5x10 HeLa-Zellen Array (Tropfenabstand 500 µm). HeLa-Zellen konnten mit einem Einzelzellanteil von 87% gedruckt werden.

Als dritter und vierter Zelltyp wurden Fibroblasten und Keratinozyten (ProVitro, Berlin) untersucht. Bei Fibroblasten handelt es sich um Stammzellen des menschlichen Wundgewebes, Keratinozyten sind menschliche hautbildende Stammzellen. Beide Zelltypen konnten lebend einzeln dispensiert und anschließend kultiviert werden, aber eine quantitative Aussage zur Einzelzellrate und Überlebensrate konnte bisher noch nicht ermittelt werden. Beide Zelltypen wurden in entsprechendem Kulturmedium (ProVitro, Berlin) bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert und wie oben beschrieben für das Dispensieren präpariert. In Bild 8 sind Mikroskopaufnahmen von dispensierten Zellen gezeigt. Bild 8a) ist eine Aufnahme eines einzelnen dispensierten Fibroblasts direkt nach dem Dispensieren. Auf Bild 8b) sieht man einen angewachsen und somit lebenden Fibroblast nach Inkubation über Nacht. Ein Keratinozyt nach dem Dispensieren ist auf Bild 8c) zu sehen. Bild 8d) zeigt denselben Keratinozyt nach der Inkubation über Nacht. Hier sieht man, dass der Keratinozyt sich geteilt hat.

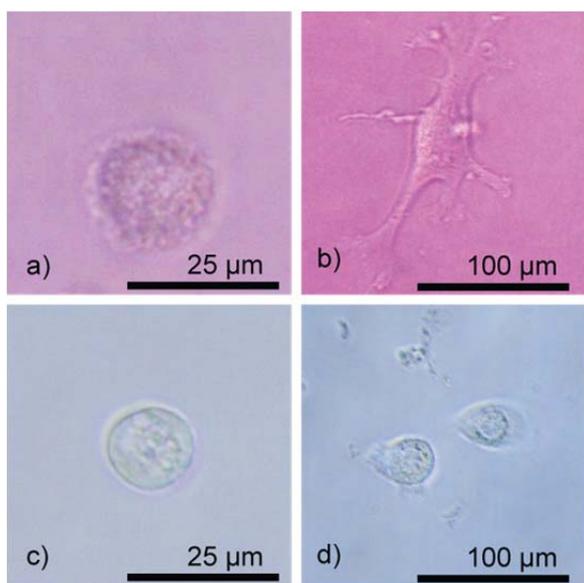


Bild 8 Dispensierte Zellen. a) ein Fibroblast, Stammzelle des Wundgewebes (nach dem Dispensieren). b) ein Fibroblast nach Inkubation über Nacht. c) Keratinozyt, hautbildende Stammzelle (nach dem Dispensieren). d) Derselbe Keratinozyt hat sich während der Inkubation über Nacht geteilt.

4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Der aktuelle Prototyp eines Einzelzellmanipulators kann einzelne lebende Zellen verschiedener gebräuchlicher Zellkulturen kontaktfrei dispensieren. Dies ermöglicht das

Untersuchen einzelner Zellen in automatisch gedruckten Zell-Arrays oder in Mikrotiterplatten, wobei das Drucken von beliebigen zweidimensionalen Tropfenmustern möglich ist. In zukünftigen Arbeiten werden kontinuierlich weitere Zellexperimente durchgeführt, um für die gezeigten und weitere Zellen quantitative Daten der Einzelzellrate und der Überlebensrate zu gewinnen. Weiterhin werden aussagekräftigere zytometrische Methoden (wie z.B. Impedanzspektroskopie und Fluoreszenzmikroskopie) in den Einzelzellmanipulator implementiert, um die Möglichkeiten der Einzelzellsortierung mit diesem Verfahren zu untersuchen.

5 Danksagung

Diese Arbeit wurde von Bundesministerium für Bildung und Forschung (Projekt Zepto, FKZ 16SV50066) und von der Europäischen Kommission (Project PASCA, www.pasca.eu, FP7 GA257073) gefördert.

6 Literatur

- [1] N. de Souza, "Foreword to the Supplement on Single Cell Analysis," *Nature Methods*, vol. 8, Apr. 2011, pp. 307-307.
- [2] W.C. Wilson and T. Boland, "Cell and organ printing 1: protein and cell printers," *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*, vol. 272, Jun. 2003, pp. 491-6.
- [3] A.R. Liberski, J.T. Delaney, and U.S. Schubert, "'One cell-one well': a new approach to inkjet printing single cell microarrays," *ACS combinatorial science*, vol. 13, Mar. 2011, pp. 190-5.
- [4] A. Yusof, H. Keegan, C.D. Spillane, O.M. Sheils, C.M. Martin, J.J. O'Leary, R. Zengerle, and P. Koltay, "Inkjet-like printing of single-cells," *Lab on a chip*, Jun. 2011, pp. 6-10.
- [5] J. den Toonder, "Circulating tumor cells: the Grand Challenge," *Lab on a chip*, Jan. 2011.
- [6] P. Koltay, R. Steger, G. Birkle, H. Huang, H. Sandmaier, and R. Zengerle, "Microdispenser array for highly parallel and accurate liquid handling," *SPIE's MICRO/MEMS*, 2001.
- [7] D. Liang, A. Gross, J. Schöndube, S. Rubenwolf, A. Yusof, A. Ernst, R. Zengerle, G. Roth, and P. Koltay, "Improved Machine Vision for Single Cell Printing," *Mikrosystemtechnik Kongress 2011*.