

DNA-Gelelektrophorese in offenen mikrofluidischen Systemen

DNA gel electrophoresis in open microfluidic systems

Ludwig Gutzweiler^{1,*}, Lutz Riegger^{1,2}, Peter Koltay^{1,2}, Roland Zengerle^{1,3}, Laurent Tanguy³

¹Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung, IMTEK – Institut für Mikrosystemtechnik, Universität Freiburg, Georges-Köhler-Allee 103, 79110 Freiburg

²BioFluidix GmbH, Georges-Köhler-Allee 103, 79110 Freiburg

³HSG-IMIT, Georges-Koehler-Allee 103, 79110 Freiburg

*ludwig.gutzweiler@imtek.de

Kurzfassung

In diesem Beitrag wird die elektrophoretische Trennung von DNA in digital gedruckten offenen mikrofluidischen Linien präsentiert. Im Gegensatz zur gängigen, Chip-basierten Kapillarelektrophorese in mikrostrukturierten Glas-Chips, kommen bei diesem Ansatz mit Platin-Elektroden versehene, planare Polyimid-Substrate zum Einsatz. Eine mittels Teilkontaktverfahren generierte 200 µm breite Gellinie verbindet die Elektroden und fungiert als Trennkanal, in welchen kontaktfrei 500 pL der zu untersuchenden Probe dosiert werden. Um Verdunstungseffekte zu unterbinden wird das Gel bis zum Taupunkt gekühlt und mit Mineralöl überschichtet. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes an den Elektroden für 80 s konnte die Trennung der DNA-Fragmente (56 bp-Cy5 und 112 bp-Cy5, 10 µM) erfolgreich gezeigt werden.

Abstract

We present electrophoretic separation of DNA in digital printed open microfluidic lines. Thereto, a planar polyimide substrate equipped with two platinum electrodes is used as base material. A 200 µm wide gel line acting as liquid separation channel is written *via* semi-contact method across the electrodes and 500 pL of a DNA-solution is directly injected into the line by the use of a non-contact liquid dispenser. To prevent evaporation of the liquid line, the substrate is cooled to the dew point and the gel is covered with mineral oil. Clear separation of DNA-fragments (56 bp-Cy5 and 112 bp-Cy5, 10 µM) has been demonstrated by applying an electrical field of 133 V/cm for 80 s.

1 Einleitung

Die DNA-Gelelektrophorese ist eine der wichtigsten Techniken der Molekularbiologie. Hierfür werden häufig mikrotechnisch hergestellte Glas-Chips eingesetzt. Gängige Chips beinhalten in Glas geätzte Mikrokanäle mit einem Querschnitt von 50*50 µm² und fluidische T-Strukturen, um eine geringe Menge des zu separierenden Analyten zu extrahieren. Aufgrund der standardisierten Designs und der damit zusammenhängenden Massenfertigung solcher Chips ist die Flexibilität eingeschränkt. Des Weiteren können Durchlaufzeit, Preis pro Durchlauf sowie Totvolumina hoch sein. Demzufolge wurden in den letzten Jahren einige Ansätze verfolgt und entwickelt, welche in dieser Hinsicht Vorteile bieten. Beispiele hierfür sind das Rapid Prototyping von Elektrophorese-Chips in PDMS und Plastik [1, 2] oder die Durchführung von Trennungen in freistehenden Hydrogel-Strukturen in „offenen Kanälen“ [3].

Die hier präsentierte Methode ermöglicht eine einfache und schnelle Herstellung designflexibler, offener mikrofluidischer Systeme ohne die Notwendigkeit einer T-Struktur für die DNA-Gelelektrophorese.

1.1 Offene Mikrofluidik

Die offene Mikrofluidik ist ein relativ neues Gebiet der Mikrofluidik, in welchem fluidische Strukturen durch das Drucken oder Ziehen von Flüssigkeiten/Substanzen gene-

riert werden. Hierdurch ist die Verwendung gedeckelter bzw. geschlossener Systemen zur Durchführung bestimmter fluidischer Operationen nicht mehr obligatorisch. Definitionsgemäß weisen solche offenen mikrofluidischen Systeme flüssig/flüssig oder flüssig/gasförmige Grenzflächen auf, ohne vollständig von einem Material im festen Aggregatzustand umschlossen zu sein [4]. Auf diese Art kann die Herstellung der Substrate außerhalb des Reinraums erfolgen. Den aufkommenden Trend solcher Systeme unterstreichen einige Anwendungen, die in den letzten Jahren diesbezüglich entwickelt wurden, wie das 3D-Prototyping von Hydrogelen und Tinten [5], die zeiteffiziente Herstellung von PDMS Chips [6] oder Western Blot [7]. Die Kombination der gesteigerten Flexibilität und der deutlichen Reduzierung der Chipherstellungsdauer sind vielversprechend und wegweisend für die Verbesserung mikrofluidischer Operationen insbesondere bei Trenn-Techniken wie der Kapillarelektrophorese.

1.2 Kapillarelektrophorese-Ansatz auf Basis der offenen Mikrofluidik

Eine flüssige Linie aus Polydimethylacrylamid-Gel wird auf einem planaren Substrat generiert und bildet die Trenn-Matrix zwischen zwei gesputterten Elektroden aus Platin. Mittels eines kontaktfreien Dosierers wird die zu separierende DNA-Lösung an einer definierten Stelle nahe der negativen Elektrode als frei fliegender Tropfen direkt in die Linie injiziert, wodurch auf die Integration ei-

ner T-Struktur für die Injektion der Probe verzichtet werden kann. Die Generierung eines Referenzpunktes direkt neben der Injektionsposition auf dem Substrat dient der Ermittlung der Migrationsdistanz und der Abschätzung der Migrationsgeschwindigkeiten. Dieser offene mikrofluidische Ansatz ist in Bild 1 schematisch dargestellt.

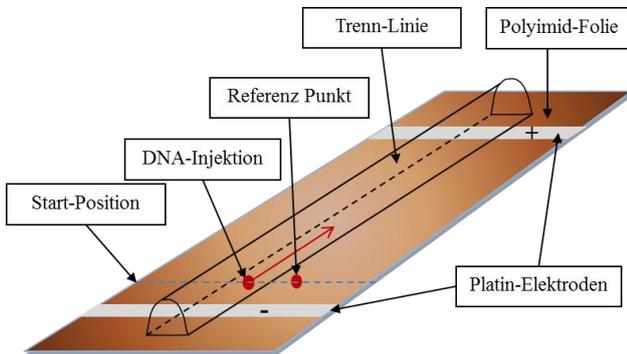


Bild 1 Darstellung des Kapillarelektrophorese-Ansatzes auf Basis der offenen Mikrofluidik. Die zweite DNA-Dosierung markiert die Injektionsstelle und dient als Referenz. Die DNA wird nahe der negativen Elektrode injiziert. Der Pfeil zeigt in Migrationsrichtung.

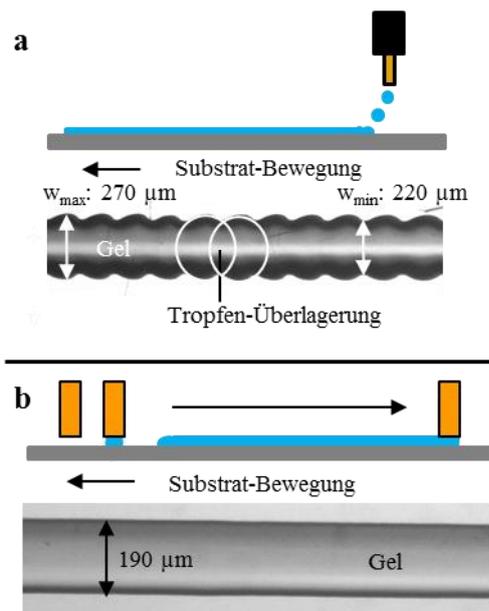


Bild 2 Zwei unterschiedliche Methoden zur Generierung einer fluidischen Linie auf einem Substrat. a) Zusammenschluss einzelner kontaktfrei dispensierter Tropfen (Einzeltröpfenvolumen ~ 7 nL). b) Hergestellte Linie durch Kapillarfluss nach der Generierung einer Kapillarbrücke (engl. „direct writing“).

Nach der Injektion wird die Gellinie mit Mineralöl überschichtet um deren Verdunstung zu verhindern sowie den Abtransport der basierend auf dem Joule'schen Effekt entstehenden Wärme zu erhöhen. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes an den Substrat-Elektroden kön-

nen die injizierten DNA-Fragmente innerhalb der generierten Gellinie aufgetrennt werden.

Die Generierung der Gellinie mittels Einzeltropfen-Dispensierung neigt zur Bildung wellenförmiger Linien Grenzen [8] (Bild 2-a), wohingegen die Linie im Teilkontaktverfahren mit gleichmäßigerer Kontur hergestellt werden kann [9] (Bild 2-b).

2 Experimenteller Abschnitt

2.1 Experimenteller Aufbau

Das verwendete Substrat ist eine Polyimid-Folie mit Platinelektroden, die im Abstand von 15 mm aufgesputtert wurden (Bild 3). Das offene mikrofluidische System wird unter Verwendung des in Bild 3 dargestellten 3-Achsen-Roboters mit zwei integrierten Dosierern generiert. Für die Herstellung der Gellinie wird der PipeJet P9 Dispenser (BioFluidix GmbH) [10] verwendet, welcher mit einem Dosierschlauch mit einem Innendurchmesser von 200 μm ausgestattet ist. Für die Abgabe geringer Injektionsvolumina wird ein pL-Dispenser nach dem Bubble-Jet Verfahren (PicoInjector, IMTEK [11]) verwendet, der mit der zu analysierende DNA-Lösung befüllt ist.

Das Substrat wird auf einem Peltierelement platziert, welches die Temperatur während des Prozesses auf 10°C reguliert und somit die Verdunstung des Gellösemittels reduziert.

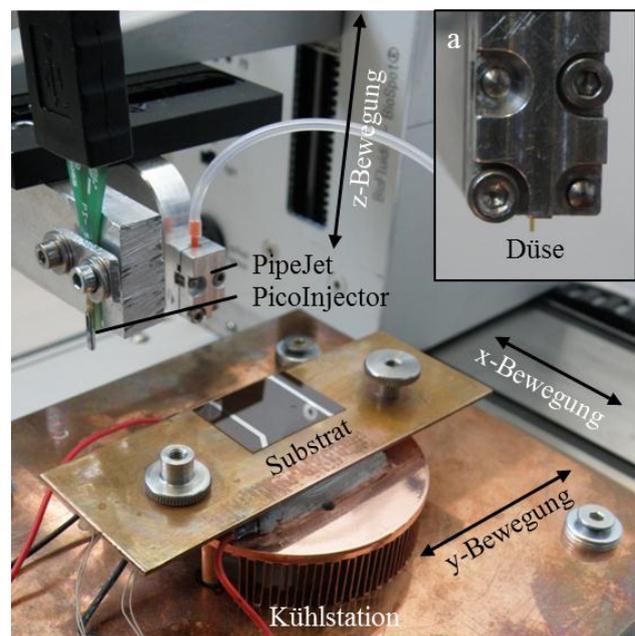


Bild 3 3-Achsen-System mit Kühlstation, aufgelegtem PI-Substrat mit gesputterten Platinelektroden und den zwei verwendeten Dosierern. a) Detailansicht der PipeJet P9 (BioFluidix GmbH) Düse und des Schlauchs für das Teilkontaktverfahren.

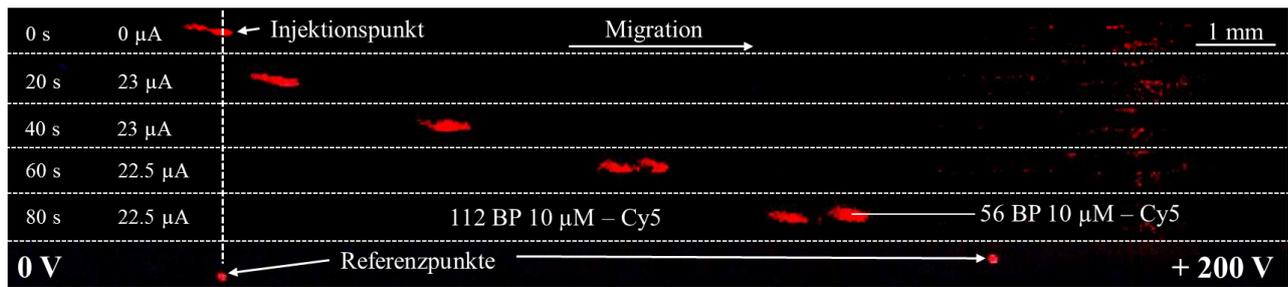


Bild 5 Echtzeit-Beobachtung der DNA-Auftrennung (56 und 112 bp, markiert mit Cy5). Das Injektionsvolumen betrug ca. 500 pL bei einer Konzentration von 10 µM. Der sich in der Gellinie einstellende elektrische Strom wurde bei einem angelegten elektrischen Feld von 133 V/cm für 80 s zu jedem Zeitpunkt aufgezeichnet.

2.2 Herstellung der offenen mikrofluidischen Trennlinie

Der PipeJet-Dosierer wird mit einer Lösung aus in Tris-Tricin-Puffer gelöstem Polyacrylamid befüllt, welches sich für die Trennung von DNA-Fragmenten im Längenbereich zwischen 25 und 500 Basenpaaren (bp) eignet. Zur Liniengenerierung wird die Düse des PipeJets in vertikaler Richtung nahe an die Substratoberfläche gefahren. Durch die Abgabe eines Einzeltropfens wird eine kapillare Brücke zwischen Substrat und Düse realisiert (Bild 4-a). Über die definierte horizontale Bewegung des Substrats wird eine Gellinie auf dem Substrat aufgrund des Kapillardrucks erzeugt (4-b). Die Dimensionen der auf diese Art erzeugten Linien sind maßgeblich von der Verfahrensgeschwindigkeit abhängig. In diesem Fall ist die Linienbreite minimal kleiner als der Innendurchmesser der Schlauchdüse (193 +/- 8 µm).

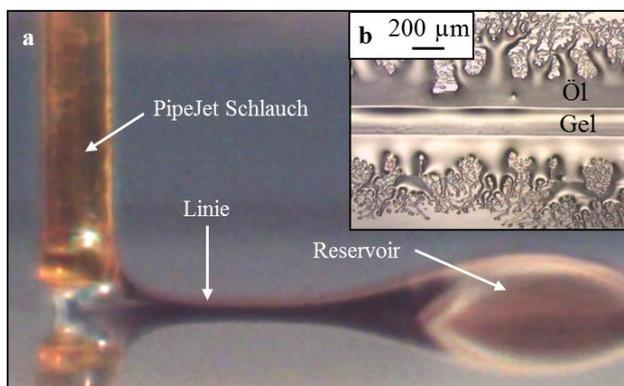


Bild 4 a) Reservoir, Trennlinie und Kapillarbrücke zwischen Dosierschlauch und Polyimid-Substrat. b) Aufsicht auf die 190 µm breite resultierende Gellinie mit Mineralöl-Überschichtung.

Über die Kontaktwinkelmessung der Gel Matrix auf dem Substrat und die Messung des elektrischen Widerstands der Gellinie wurde die theoretische Höhe der Linie von ungefähr 20 µm berechnet. Wie in Bild 4-a zu sehen wurden Gelreservoirs (~ 1.5 µL) in Form von Tropfen direkt auf den Elektroden generiert um der Verarmung der Ladungsträger während des Trennprozesses entgegenzuwirken.

2.3 Elektrophoretische Trennung

Nach der Liniengenerierung wird ein Volumen von ca. 500 pL (50 Tropfen) künstlicher, einsträngiger und mit Cy5 fluoreszenzmarkierter DNA (biomers.net) direkt und kontaktfrei in die Gellinie nahe der negativen Elektrode injiziert. Im Anschluss wird die Gellinie zum Verdunstungsschutz mit Mineralöl (Qiagen) überschichtet (Bild 4-b). Als zusätzlicher Effekt wird hierdurch der Wärmeaustausch mit der Umgebungsluft gefördert und die aufgrund des Joule'schen Effekts entstehende Wärme effizienter abgeführt. Nach diesem Schritt wird das offene mikrofluidische System in der Aufnahme der Hochspannungsquelle positioniert und ein elektrisches Feld von 133 V/cm zwischen den Pt-Elektroden angelegt. Die Trennung der DNA-Fragmente wird in Echtzeit mit einem System bestehend aus einem Mikroskop (Leica MZ12.5), einem Diodenlaser (635 nm, Lasiris, StockerYale Inc.) mit Linienspektroskop, einer CCD Kamera (Zeiss Axiocam MRC) und einem Bandpassfilter (Semrock, 670 +/- 20 nm) beobachtet. Aufgrund der Linienspektroskopie kann die Migration der DNA-Fragmente von der Injektionsposition bis zur positiven Elektrode visualisiert werden. Der in der Gellinie fließende elektrische Strom wird aufgezeichnet um die Stabilität des offenen mikrofluidischen Systems während des Prozesses zu überwachen.

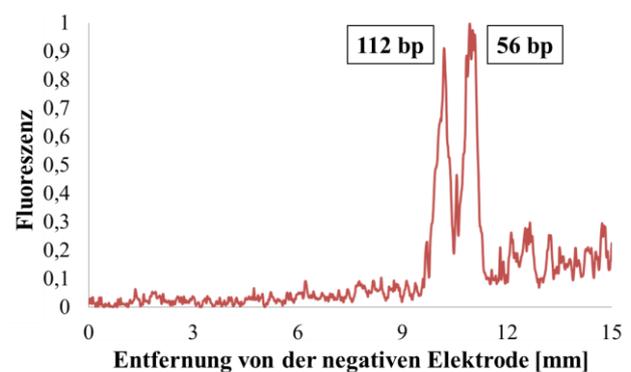


Bild 6 Migrationsdistanzen nach 80 s für zwei DNA-Fragmente. Der linke Peak zeigt das 112 bp-Cy5 Fragment, welches langsamer migriert als das 56 bp-Cy5 Fragment (rechts).

Der komplette Prozess von der Herstellung der Trennlinie bis zur vollständigen Trennung der Fragmente dauert weniger als 5 Minuten. Die Bilder 5,6, und 7 zeigen typische Resultate aufgetrennter Banden zweier unterschiedlicher DNA-Fragmente (56 bp-Cy5 und 112 bp-Cy5, 10 μ M).

In Bild 5 ist die Echtzeit-Trennung dieser Moleküle zu definierten Zeitpunkten zu sehen. Während der ersten 20 s ist die Migration aufgrund der unvollständigen Einstellung des elektrischen Feldes langsamer. Anschließend stabilisiert sich der Strom bei 23 μ A und die elektrophoretische Trennung findet statt. Nach 60 Sekunden zeichnet sich die Trennung der Fragmente ab und nach 80 Sekunden (Migrationsdistanz: 8 mm) sind zwei deutlich getrennte Peaks zu sehen (Bild 6).

Anhand der Echtzeit-Beobachtung können die Migrationsgeschwindigkeiten berechnet werden. Bild 7 zeigt die Geschwindigkeitsabhängigkeit der Fragmente vom elektrischen Feld. Wie erwartet ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen elektrischer Feldstärke und Migrationsgeschwindigkeit, wobei das Verhältnis der Geschwindigkeiten der zwei Fragmente zueinander (0.86 und 0.88) in Übereinstimmung mit der zugrundeliegenden Theorie konstant bleibt.

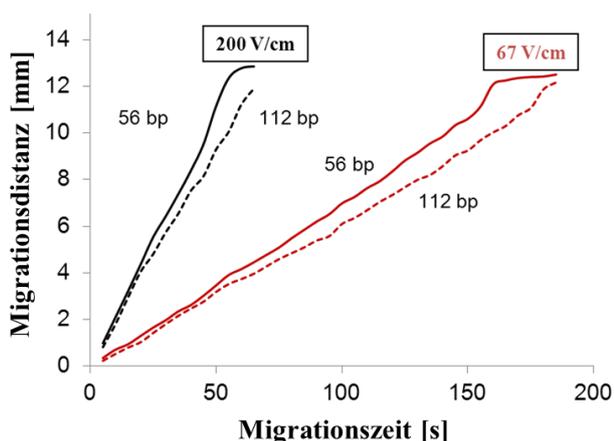


Bild 7 Migrationsdistanzen der zwei Fragmente in Abhängigkeit der Migrationszeit für zwei verschiedene Feldstärken (67 und 200 V/cm). Eine Verdreifachung des elektrischen Feldes führt zu einer Verdreifachung der Geschwindigkeit.

3 Diskussion

Im Vergleich zur Standard-Kapillarelektrophorese bietet der hier vorgestellte offene mikrofluidische Ansatz folgende Vorteile: i) Das offene fluidische System kann einfach und kostengünstig direkt vor der Durchführung einer Trennung generiert werden. ii) Die Durchlaufzeit von der Herstellung bis zum analytischen Ergebnis dauert weniger als 5 Minuten. iii) das Design der Trennstrecke kann jederzeit für die jeweilige Applikation angepasst werden, iv) Die kontaktfreie Probeninjektion ersetzt komplexe Injektions- und Dosiervorgänge via T-Strukturen bei herkömmlichen Kapillarelektrophorese-Chips.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Es wurde die erfolgreiche Trennung zweier unterschiedlicher DNA-Fragmente in einem offenen mikrofluidischen System bestehend aus einem planaren Polyimid-Substrat mit zwei Pt-Elektroden und einem flüssigen mit Öl überschichteten Trennkanal gezeigt.

Zukünftige Arbeiten widmen sich der Optimierung der Liniengenerierung und der Verbesserung und Automatisierung des Detektionsprozesses. Durch eine leistungsstarke Punktdetektionsoptik soll die Sensitivität sowie die Basenpaar-Auflösung zur Detektion kleinerer Konzentrationen in Zukunft deutlich verbessert werden.

5 Literatur

- [1] Duffy, D. C.; McDonald, J. C.; Schueller, O. J. A.; Whitesides, G. M.: Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane), *Anal. Chem.*, vol. 70, 1998, pp. 4974–4984
- [2] Miserere, S.; Mottet, G.; Taniga, V.; Descroix, S.; Viovy, J.-L.; Malaquin, L.: Fabrication of thermoplastics chips through lamination based techniques, *Lab on a Chip*, vol. 12, 2012, pp. 1849
- [3] Duncombe, T. A.; Herr, A.: Photopatterned free-standing polyacrylamide gel for microfluidic protein electrophoresis, *Lab on a Chip*, vol. 13, 2013, pp. 2115-2123
- [4] Pfohl, T.; Mugele, F.; Seemann, R.; Herminghaus, S.: Trend in Microfluidics with Complex Fluids, *Chemphyschem*, vol. 4, 2003, pp. 1291-1298
- [5] Barry, R.; Shepherd, R.; Hanson, J.; Nuzzo, R.; Wiltzius, P.; Lewis, J.: Direct-write assembly of 3D hydrogel scaffolds for guided cell growth, *Advanced materials*, vol. 21, 2009, pp. 2407-2410
- [6] Goff, C.; Chao, S.-H.; Johnson, R.; Meldrum, D.: Surface tension-controlled three-dimensional water molds: theory and applications, *Microfluid Nanofluid*, vol. 13, 2012, pp. 891-897
- [7] Duncombe, T.; Tran, T.; Benito-Lopez, B.; Diamond, D.; Herr, A.: Freestanding hydrogel microarrays: openchannel microfluidics for massively parallel protein electrophoresis, *Proceedings of microTAS 2012*, Okinawa, Japan
- [8] Lewis, J.; Gratson, G.: Direct writing in three dimensions, *Materials today*, vol. 7 (7-8), 2004, pp. 32-39
- [9] G. Gratson, M. Xu, J. Lewis, "Direct writing of three dimensional webs", *Nature*, vol. 428, 2004, pp. 386
- [10] Streule, W.; Lindemann, T.; Birkle, G.; Zengerle, R.; Koltay, P.: Pipejet: a simple disposable dispenser for the nano- and microliter range, *JALA*, vol. 9, 2004, pp. 300-306
- [11] Steigert, J.; Strasser, M.; Wangler, N.; Brett, O.; Streule, W.; Koltay, P.; Daub M.; Zengerle, R.: A modular diffusion barrier based on phase separation for localized delivery of discrete drug volumes in aqueous environments, *Lab on a Chip*, vol. 9, 2009, pp. 1801-1805