

Arbeitsgebiet: (4)

Anwendungsbereich: (Verfahrenstechnik)

Erzeugung von Verdünnungsreihen auf einer Laborzentrifuge

O. Strohmeier¹, M. Rombach¹, D. Mark¹, R. Zengerle^{1,2,3}, G. Roth^{1,2} und F. von Stetten^{1,2}

¹HSG-IMIT Institut für Mikro- und Informationstechnik, Freiburg

²Universität Freiburg – IMTEK, Institut für Mikrosystemtechnik, Lehrstuhl für
Anwendungsentwicklung, Freiburg

³ BIOS Centre for Biological Signalling Studies, Freiburg

Zusammenfassung

Vorgestellt wird ein neuartiges Verfahren zur automatischen Erzeugung von Verdünnungsreihen auf einer mikrofluidischen Kartusche. Die fluidische Prozessierung erfolgt lediglich durch definierte Rotation der Kartusche in einer Standard-Laborzentrifuge. Integrierte, aktiv gesteuerte Ventile sind hierbei nicht erforderlich. Das Verdünnungsverhältnis wird lediglich durch das Volumen der zu verdünnenden Flüssigkeit bestimmt. Als Anwendungsbeispiel wird die Erzeugung von 5 Verdünnungsstufen aus Fluorescein in PBS Puffer in den Verhältnissen 1:3 und 1:5 gezeigt und anschließend die Reproduzierbarkeit mittels Fluoreszenzmessung gezeigt.

Einleitung

Die manuelle Erstellung von Verdünnungsreihen mittels Pipettieren ist eine sehr zeitaufwendige und fehleranfällige Routinetätigkeit in der täglichen Laborarbeit. Für Hochdurchsatzanwendungen kann dieser Vorgang mit teuren Pipettierrobotern automatisiert werden wohingegen es für Bereiche mit geringem und mittlerem Durchsatz nur wenige automatisierte Alternativen gibt [1-3]. Typische Nachteile dieser Systeme sind die fehlende Massenproduzierbarkeit (z.Bsp. Abformung in PDMS) [1], die Integration aktiv gesteuerter Ventile [2] oder der Bedarf an zusätzlichen Geräten zur fluidischen Prozessierung [3]. Um diese Nachteile zu umgehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neuartige Methode zur Erzeugung von Verdünnungsreihen auf einer spritzgießbaren, thermoplastischen Kartusche entwickelt welche in einer Standard Laborzentrifuge prozessiert werden kann.

Materialien und Methoden

Fluidische Strukturen wurden mittels Mikrofräsen in PMMA Scheiben (Ø 130 mm, 4 mm dick) übertragen. Hydrophile (PEG in MeOH, 5 mg /mL) bzw. hydrophobe Beschichtungen (0.5 gew% Teflon AF 1600 in FC 77) wurden aufgebracht und die Kartusche mit drucksensitiver Polyolefinklebefolie gedeckelt (Abb. 1). Die Kartusche wird für die Prozessierung in eine Laborzentrifuge (Sigma 1-15, Sigma GmbH) eingelegt (Abb. 2) und es werden 200 µL Verdünnungspuffer (PBS) in Einfüllöffnung 1 (Abb. 3) pipettiert. Diese werden unter Rotation in 5 x 30 µL aliquotiert und der Überstand in eine Waste-Kammer geleitet. Durch eine Erhöhung der Rotationsfrequenz werden die Aliquots in Verdünnungskammern überführt. Das Volumen V in µL der zu verdünnenden Flüssigkeit definiert hierbei den Verdünnungsfaktor $V:(V+30)$. Für eine 1:3 Verdünnung werden 15 µL Fluorescein (bzw. 7.5 µL für eine 1:5 Verdünnung) in Einfüllöffnung 2 zugegeben. Das Fluorescein wird in die erste Verdünnungskammer überführt und dort mit den aliquotierten 30 µL PBS gemischt. Von dieser Mischung werden 15 µL (bzw. 7.5 µL) in die benachbarte Verdünnungskammer überführt und mit den dort vorgelegten 30 µL PBS gemischt usw. Für alle Experimente wurde die Rotationsgeschwindigkeit manuell eingestellt, was jedoch in Zukunft über eine integrierte RS-232 Schnittstelle automatisiert werden kann. Nach 8 Minuten ist die Erzeugung der Verdünnungsreihen abgeschlossen und 20 µL jedes Aliquots wurden zur Fluoreszenzmessung entnommen. Die Ergebnisse wurden mit einer manuell hergestellten Verdünnungsreihe verglichen (Abb. 4).

Ergebnisse und Diskussion

Für die 1:3 bzw. 1:5 Verdünnungen wurde jeweils 1 Experiment in der Laborzentrifuge und 3 Experimente auf einem Meßplatz unter identischen Bedingungen durchgeführt. Von 40 Verdünnungsschritten waren zwei aufgrund von herstellungsbedingten Fehlern nicht funktional. Die Messung des Verdünnungsverhältnis für 1:3 Verdünnungen ergab einen durchschnittlichen Verdünnungsfaktor von $3.02 \pm 14.2\%$ (n=4) Kartusche und $2.85 \pm 16.5\%$ (n=3) manuelle Referenz ($4.06 \pm 15.8\%$ (n=4) Kartusche ggü. $4.89 \pm 6.2\%$ (n=3) manuelle Referenz für die 1:5 Verdünnung) (Abb. 4)

Schlussfolgerung und Ausblick

Es konnte erfolgreich eine Einwegkartusche zur Erzeugung von Verdünnungsreihen entwickelt werden. Für ein Verdünnungsverhältnis von 1:3 wurde auf der Kartusche ein leicht besseres Ergebnis erzielt als mit der manuellen Referenz. In Zukunft könnten die erzeugten Verdünnungen durch Integration einer zusätzlichen Ventilstruktur am radial äußeren Ende der Kartusche in einzelne Tubes zentrifugiert werden und so die derzeit noch komplizierte Entnahme überflüssig machen.

Wortzahl: 549

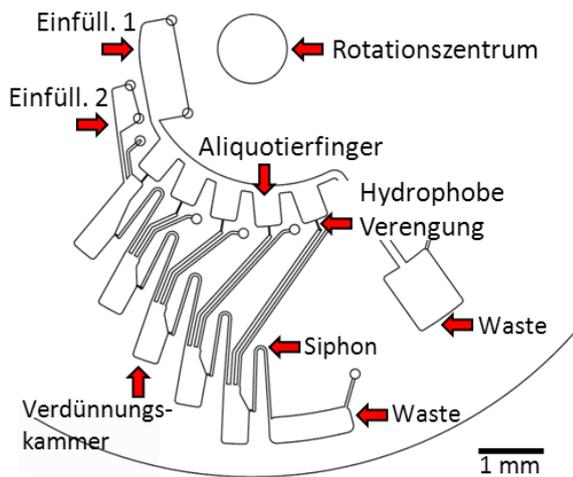


Abb 1: Verdünnungsstruktur mit zwei Einfüllöffnungen für Verdünnungspuffer (1) und zu verdünnende Substanz (2), Aliquotierfinger und Verdünnungskammern. Aliquotierfinger und Verdünnungskammern sind über hydrophobe Verengungen verbunden. Kapillare Siphons überführen eine definierte Menge an Flüssigkeit von einer Verdünnungskammer in die benachbarte Kammer.

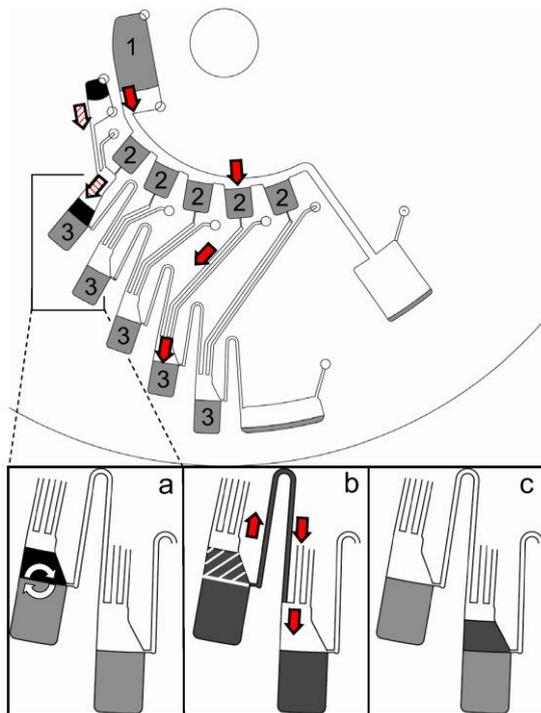


Abb. 3: 200 μL PBS aus Einfüll. 1 (1) werden bei einer Frequenz von 15 Hz in fünf 30 μL Aliquots unterteilt (2) und der Überstand in die Wastekammer geleitet. Bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 50 Hz werden die Aliquots in die Verdünnungskammern geleitet. Die Disk stoppt und es werden 15 μL (bzw 7,5 μL) Fluorescein in Einfüll. 2 zugegeben. Bei 50 Hz wird das Fluorescein in die erste Kammer geleitet (gestrichelter Pfeil). Fluorescein und PBS werden gemischt (a). Disk stoppt und Siphon befüllt sich kapillar (b). 15 μL (bzw. 7,5 μL) werden in die benachbarte Verdünnungskammer überführt (c).



Abb. 2: (a) Kartusche (weiss) in Standard Laborzentrifuge. (b) Vergrößerte Ansicht einer Verdünnungsreihe aus grüner Tinte in PBS (1:3)

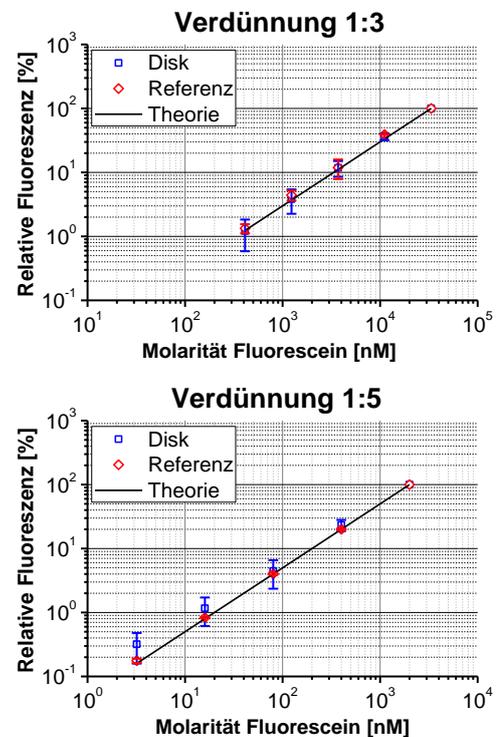


Abb 4: Normalisierte Fluoreszenz für 1:3 verdünntes Fluorescein (100 μM) und 1:5 verdünntes Fluorescein (10 μM). Ergebnisse der Disk-Verdünnung (Quadrat) vs. manuell pipettierte Referenz (Raute) verglichen mit theoretischen Werten (schwarze Linie).

Referenzen

- [1] C.-Y. Chen et al., Proc. of μTAS , 2010, p 752-754
- [2] Samsung Electronics, 2008, US 2008/0193336 A1
- [3] J. Koehler et al., Assay Drug Develop., 2002, 1, p 91-96