

Hochparallele Probenprozessierung

Modulare Plattform mit integrierter Nanoliterdosierung

Rolf M. Kaack¹, Daniela M. Dankbar², Birgit Müller-Chorus³, Alexander Jung⁴, Martina Daub¹
¹IMTEK – Universität Freiburg, Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung
²Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Universität Tübingen
³Boehringer Ingelheim microParts GmbH, Dortmund; ⁴Applied Biosystems, Überlingen

Innovative Entwicklungen in der Automatisierung und Mikrofluidik haben zu den erheblichen Fortschritten in der Genom-Forschung der vergangenen Jahre beigetragen. Ein Beispiel für diesen Fortschritt sind die ersten kommerziellen Ansätze zur hochparallelen Expressionsanalyse in miniaturisierten Formaten. Der zwangsläufig nächste Schritt sind Weiterentwicklungen hinsichtlich der Quantifizierbarkeit (Sensitivität und Selektivität), Schnelligkeit (Parallelität) und Modularität, um mit nur einer Geräteplattform eine Vielzahl möglicher Anwendungen, wie etwa die routinemäßige Diagnostik von SNPs (single nucleotide polymorphisms) oder die Identifikation und Validierung neuer Rezeptoren in der Wirkstoff-Forschung kostengünstig zu erschließen. Eine solche Weiterentwicklung stellt die Applikationsplattform dar, die im Rahmen des BMBF-Förderprojektes nanoMAP entstanden ist. Hierbei handelt es sich um eine modulare und hochfunktionale Plattform, mit der sich biologische Proben parallel prozessieren, transferieren und detektieren lassen, ohne daß auf teure und aufwendige Laborgeräte wie etwa Pipettierroboter zurückgegriffen werden muß. Auf der Plattform können mehrschrittige Assays vollständig durchgeführt werden. Aufgrund ihres modularen Charakters ergibt sich aber auch die Möglichkeit, die nanoMAP-Plattform in eine bestehende Prozeßkette zu integrieren. Die nanoMAP-Plattform besteht aus einem Prozeßmodul, einem Detektionsmodul und zwei Geräten (Abb. 1), die im folgenden näher vorgestellt werden sollen.

Key Words: Modulare Plattform, Mikrofluidik, Mikrospritzguß, Automatisierung, Hochparallele Probenprozessierung, Genotyping-Assay

Das PCR-Slide ist das zentrale mikrofluidische Bauteil des Prozeßmoduls der nanoMAP-Plattform. Es besteht aus einer

parallelen Anordnung von fluidischen Grundeinheiten, die jeweils aus einer Reaktionskavität, einer Düsenkammer mit ab-

schließender Düse und einem Verbindungskanal bestehen (Abb. 2). Das PCR-Slide weist eine Reihe von besonderen Eigenschaften auf. So erlaubt es die integrierte Dosiereinheit, Teilmengen der sich in den Kavitäten befindenden Probe im Nanoliterbereich auf nachfolgende Prozeßplattformen, wie das NanoWellSlide, zu dispensieren. Aufgrund

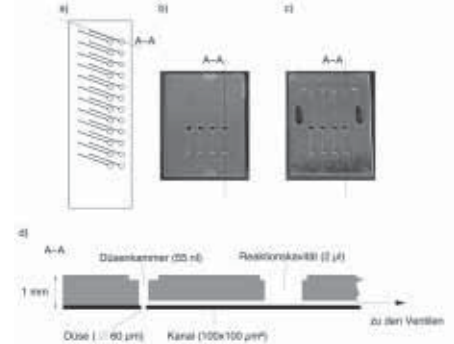


Abb. 2: PCR-Slide. a) Bild einer PCR-Slide-Variante mit 24 Kavitäten. b) „Kleine Variante“ des PCR-Slides, hergestellt mittels Spritzguß. c) PCR-Slide mit zentraler Befüllung. d) Querschnitt durch eine fluidische Grundeinheit.

der Tatsache, daß die fluidischen Grundeinheiten im gleichen Raster angeordnet sind, wie die Kavitäten einer 384er-Mikrotiterplatte (MTP), kann das PCR-Slide auch in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte dispensieren.

Weiterhin ist es möglich, von einem PCR-Slide in ein anderes PCR-Slide zu dosieren. Diese Eigenschaft erlaubt es, mehrere Schritte eines Assays auf ein- und derselben Plattform ablaufen zu lassen. Dank der Tatsache, daß sich mit der Dosiereinheit Aliquots dosieren lassen, können auf diese Weise sogar Verdünnungsschritte realisiert werden, ohne auf externe Pipettierhilfen zurückgreifen zu müssen, was wiederum eine Reduktion der notwendigen Assayvolumina impliziert.

Trotz einer hohen Funktionalität ist das PCR-Slide einfach im Aufbau. Damit ergibt sich die Möglichkeit, das PCR-Slide mit Methoden der Massenherstellung kostengünstig als Einwegartikel zu produzieren. Der hier vorgestellte Prototyp des PCR-Slides wurde im Spritzgußverfahren von Boehringer Ingelheim microParts GmbH hergestellt.

Der integrierten Dosiereinheit liegt das sogenannte DispensingWellPlate™ (DWP™)-Verfahren zugrunde^{1,2}. Mit diesem Verfahren können Teilmengen der sich im Reservoir befindlichen Flüssigkeit durch einen pneumatischen Druckpuls, der auf die gesamte Oberseite des PCR-Slide gegeben wird,

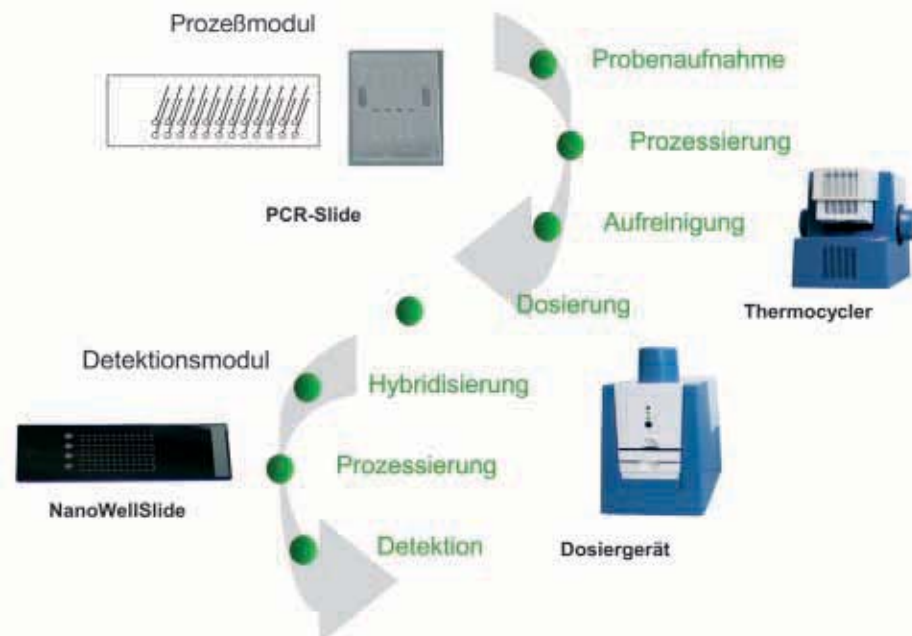


Abb. 1: Komponenten der nanoMAP-Plattform: Prozeßmodul, Detektionsmodul und Geräte. Entlang der Pfeile sind die verschiedenen möglichen Assay-Schritte aufgezeigt.

Alle Komponenten für
ein erfolgreiches Produkt.
Anwendung nach Bedarf.



For Pharmaceutical Confidence

Ausgehend von der Wirkstoffsuche bis zur Produktion hält Waters alle Werkzeuge bereit, die Sie für die Entwicklung eines erfolgreichen Pharmaprodukts benötigen. Unsere Palette von Technologien und Services rund um die Probenvorbereitung, die Chromatographie, die Detektion, das Informationsmanagement und vieles mehr erweitert sich ständig. Mit unserer Hilfe können Sie Ihre Abläufe effizienter gestalten und die Zeit bis zur Marktreife neuer Produkte signifikant verkürzen. Hinzu kommen die Zuverlässigkeit und die Präzision, die Sie von allen Waters Produkten selbstverständlich erwarten können. Dies alles sind gute Gründe, sich an Waters zu wenden, wenn es um Komplettlösungen und wirklich verlässliche Resultate geht. Bitte besuchen Sie für weitere Informationen

www.waters.com/pharma

Waters GmbH
Hauptstrasse 87 • D-65760 Eschborn
Tel. 06196/400-600 • Fax 06196/48 23 88 • eMail deutschland@waters.com

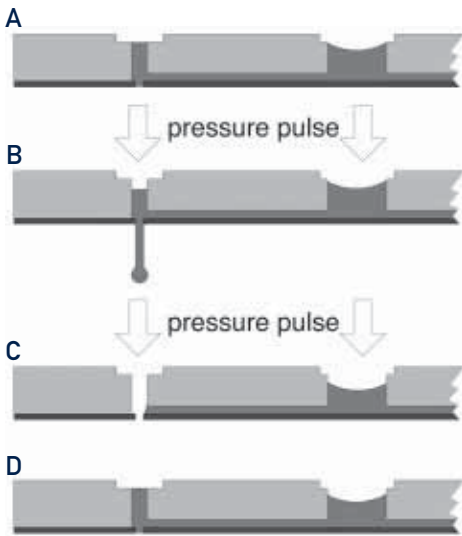


Abb. 3: Ablauf des Dosiervorgangs. A. Im Anfangszustand ist die Düsenkammer durch Kapillarkräfte befüllt. B. C. Durch einen Druckpuls auf die gesamte Oberseite des PCR-Slides wird die Flüssigkeit aus der Düsenkammer vollständig als Jet ausgestoßen. D. Nachdem der Druckpuls beendet ist, befüllt sich die Düsenkammer über Kapillarkräfte erneut.

aus allen Düsen gleichzeitig dispensiert werden (Abbildung 3). Die Dosiermenge wird hierbei durch das geometrische Volumen der Düsenkammer bestimmt und ist in weiten Bereichen unabhängig von den Flüssigkeitseigenschaften (Oberflächenenergie, Viskosität) sowie von den Aktuationsparametern (Höhe und Dauer des angelegten Druckpulses). Im Falle des PCR-Slides liegt das Dosiervolumen bei 55 nl (Abbildung 4).

Für die Probenprozessierung im PCR-Slide wurde ein Thermocycler entwickelt (Abb. 1), dessen zwei Heizplatten unabhängig voneinander geregelt werden können. Einige Varianten des PCR-Slides haben zusätzlich einen zentralen Befüllport, über den mittels eines einzigen Pipettiervorgangs alle Kavitäten mit einer Flüssigkeit befüllt werden können. Anschließend werden die einzelnen Zulaufkanäle mittels einer von Boehringer Ingelheim microParts entwickelten Ventiltechnik verschlossen, um Querkontaminationen zu vermeiden.

Das NanoWellSlide

Das zentrale Bauteil des Detektionsmoduls ist das NanoWellSlide (NWS) (Abb. 5). Das NWS kann als „mikrofluidische Nanotiterplatte“ betrachtet werden. Auf jedem NWS können parallel vier unterschiedliche Proben auf jeweils 24 verschiedene Merkmale untersucht werden, wobei der Probenverbrauch mit weniger als 2 µl äußerst gering gehalten wird. Die in den Befüllport einpipettierte Probe durchläuft einen mikrofluidischen Kanal, der 24 Nanoliterkavitäten (Nanowells) miteinander verbindet. Das Volumen eines Nanowells beträgt 35 nl.

Die NanoWellSlides wurden von Boehringer Ingelheim microParts mittels Mikrospritzguß aus zyklischen Olefin-Polymeren hergestellt. Die Formate des Slides wurden auf existierende Laborsysteme abgestimmt. Das Objektträgerformat ermöglicht das

Auslesen des Slides zum Beispiel in einem handelsüblichen Fluoreszenzreader. Die insgesamt 96 Nanowells sind in einem 8x12-Array angeordnet und mit einem Rasterabstand von 2,25 mm kompatibel zum 1.536-MTP-Format. Die Befüllports liegen mit einem Rasterabstand von 4,5 mm im 384-MTP-Format. Somit können mit bestehenden Pipettiersystemen sowohl die Sonden in die Nanowells vorgelegt, als auch die Proben in die Befüllports appliziert werden. Als besonders geeignet für eine parallele Sondendosierung hat sich das TopSpot-System erwiesen, mit Hilfe dessen alle 96 Nanowells gleichzeitig über ein kontaktfreies Printing-Verfahren mit bis zu 96 verschiedenen Sonden beschickt werden können³.

Für die Anbindung der Sonden wurde eine an das Kunststoffmaterial TOPAS® angepaßte Oberflächenchemie entwickelt. Diese basiert auf der Methode der lichtinduzierten Immobilisierung oder „Photolinking“. Photolinker sind Moleküle, die

bei Bestrahlung mit UV-Licht eine Photoreaktion mit einem Substrat eingehen – in diesem Fall mit der Kunststoffoberfläche – und so zu einer kovalenten Bindung der Sonden führen. Ein Vorteil dieser Oberflächenchemie ist die Möglichkeit der parallelen Anbindung verschiedener Sonden gleichzeitig ohne vorherige Vorbehandlung der Oberfläche. Die Photolinker können für verschiedene Arten von Sonden verwendet werden, wie zum Beispiel DNA oder Proteine.

Applikationen

Die Applikationen für das NanoWellSlide reichen von einfachen Arrayexperimenten bis hin zu heterogenen Bindungsassays. Im Falle der untersuchten DNA-Detektion wurde das NanoWellSlide zunächst als „mikrofluidischer DNA-Array“ verwendet – das heißt, in den Nanowells wurden DNA-Oligonukleotide immobilisiert – und die Bindung der fluoreszenzmarkierten Proben-DNA an verschiedene Spots beobachtet (Abb. 6). Bereits bei dieser einfachen Anwendung zeigten sich die Vorteile des NanoWellSlides gegenüber planaren Arrays durch eine einfache Handhabbarkeit des Slides und eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Darüber hinaus wurde ein spezieller 3'-Exonucleaseassay entwickelt, der die Detektion unmarkierter DNA-Proben in Nanoliterkavitäten ermöglicht.

Experimentelle Validierung der nanoMAP-Plattform und deren Komponenten

Der zur Validierung des Prozeßmoduls integrierte Assay basiert auf dem SNPlex™-

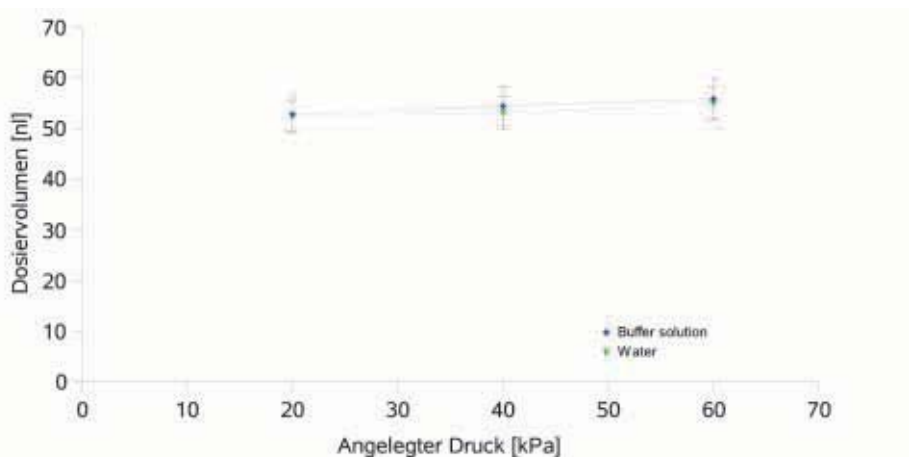


Abb. 4: Dosierverhalten des PCR-Slides. Gezeigt ist das mittlere Dosiervolumen pro fluidischer Einheit. Die Meßergebnisse zeigen, daß das Dosiervolumen unabhängig vom anliegenden Druck ist. Das Dosierverhalten ist reproduzierbar, die ermittelten CVs (coefficient of variation) liegen bei < 7%.



Business Plan Award "Plant Biotechnology"

SEED YOUR IDEAS...

...AND GET THE AWARD!

The award is intended for small and medium-sized companies from all over the world working in the fields of plant biotechnology and willing to settle in the Biotech-Park in Gatersleben, Saxony-Anhalt (Germany). The winning companies will receive an equity finance by IBG Beteiligungsgesellschaft Sachsen-Anhalt GmbH as lead investor.

The closing date for application is on 15 June 2005.

For more information about your application:

www.biopark-gatersleben.com



Foto: www.photocase.de

WHAT YOU'LL DISCOVER IN GATERSLEBEN:

- high concentration of research institutes, enterprises and start up companies working in plants biotechnology
- research focused on plant's resistance as well as system solutions aimed at the practical application of raw plant materials in industry
- spatial facilities for laboratories and greenhouses
- strong political support
- well trained and experienced people
- fields for your ideas



BUSINESS PLAN AWARD
"PLANT BIOTECHNOLOGY"

An initiative of BIO Mitteldeutschland in cooperation with IBG and the Ministry of Economic Affairs and Employment of Saxony-Anhalt



Abb. 5: NanoWellSlide. A. Foto eines NanoWellSlides. B. Befüllvorgang im NanoWellSlide. Zur Visualisierung wurde der Flüssigkeit ein Fluoreszenzfarbstoff beigemischt.

System von Applied Biosystems. Der Assay wird für Genotypisierungs-Studien im Hochdurchsatz-Bereich eingesetzt. Eine ausgeklügelte Assay-Komposition erlaubt es, Multiplex-Reaktionen durchzuführen. Pro Reaktion können 48 verschiedene Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) untersucht werden.

Der Assay umfaßt mehrere Schritte. Nach einer Aktivierungsreaktion werden mit Hilfe des Oligonucleotide Ligase-Assays (OLA)^{4,5} Genotyp-spezifische DNA-Sequenzen erzeugt, die anschließend über einen Exonuclease-Verdau aufgereinigt und mit PCR amplifiziert werden. Bei jedem Schritt wird das prozessierte Probenmaterial vom vorhergehenden Schritt zu einem neuen Puffergemisch dazugegeben. Es konnte gezeigt werden, daß alle Schritte auf der nanoMAP-Plattform einfach durchzuführen sind. Ferner wurden die benötigten Reaktionsvolumina dank des integrierten Nanoliterdispensers deutlich reduziert⁶. Ein weiterer Assay, der auf dem PCR-Slide

gezeigt werden konnte, umfaßte eine PCR mit anschließendem Exonuclease-Verdau. Das Produkt wurde auf das NWS übertragen und konnte dort erfolgreich nachgewiesen werden. Um die Modularität des Systems nachzuweisen, wurde die Detektion parallel dazu auch auf einer planaren Arrayplattform durchgeführt⁷.

Schlußfolgerung

Mithilfe des PCR-Slides, des Dosiergeräts und des Thermocyclers sowie des NanoWellSlides wurde eine neuartige Plattform geschaffen, auf der sich DNA-basierte Testverfahren durchführen lassen. Das PCR-Slide ermöglicht die parallele Probenaufbereitung in einem Modul, das sich sehr flexibel einsetzen läßt. Die integrierte Dosiereinheit erlaubt die Abgabe von Teilmengen der prozessierten Flüssigkeit, womit mehrere Schritte eines Assays auf ein- und derselben Plattform durchgeführt werden können, ohne daß es externer Geräte wie Pipettierroboter bedarf.

Das NanoWellSlide als formatangepaßtes Detektionsmodul ermöglicht den Nachweis der prozessierten Proben in paralleler Weise. Der einfache Aufbau der Kunststoff-Slides erlaubt die wirtschaftliche Umsetzung als kostengünstige Einwegartikel.

Danksagungen

Die in diesem Beitrag vorgestellten Arbeiten sind im BMBF-Verbundprojekt „nanoMAP“ entstanden (Förderkennzeichen 0312001). Die Autoren bedanken sich beim BMBF für die Unterstützung.

Ferner bedanken sich die Autoren allen, die noch im nanoMAP-Projekt mitgewirkt haben: Prof. Dr. Roland Zengerle, Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung, IMTEK - Universität Freiburg, Prof. Dr. Günter Gauglitz, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Universität Tübingen, Dr. Simone Günther, Dr. Michael Wenz, Dr. Michael Steinwand, Applied Biosystems, Dr. Holger Bartos, Ralf-Peter Peters, Boehringer Ingelheim microParts GmbH, Dortmund.

Literatur

- [1] Koltay, P., Birkenmeier, B., Steger, R., Sandmaier, H., Zengerle, R., Proc. of Actuator 2002, Bremen, Germany (2002), pp. 235 -239
- [2] Koltay, P., Kalix, J., Zengerle, R., Sensors and Actuators A 116 (2004), pp. 472-482
- [3] Gutmann, O., Kuehlewein, R., Reinbold, S., Niekrawietz, R., Steinert, C. P., de Heij, B., Zengerle, R., Daub, M., Biomedical Microdevices 6:2 (2004), pp. 131-137
- [4] Landegren, U., Kaiser, R., Sanders, J., Hood, L., Science 241 (1998), pp. 1077- 1080
- [5] Barany, F., Barany, G., Hammer, R.P., Kempe, M., Blok, H., Zirvi, M., U.S. Pat. Appl. Publ., 70 pp., Cont.-in-part of U.S. Ser. No. 794,851, CODEN: USXXCO US 2002150921 A1 20021017 CAN 137:305710 AN 2002:794202, 2002
- [6] Kaack, R.M., Jung, A., Wenz, M. H., Zengerle, R., Daub, M., Proc. of IEEE-MEMS 2004, Maastricht, The Netherlands (2004), pp. 338-342
- [7] Kaack, R.M., Reinbold, S., Zengerle, R., Daub, M., Proc. of MicroTAS 2004, Malmö, Sweden (2004), pp. 436-438

Korrespondenzadresse

Dr. Martina Daub
 Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung
 IMTEK – Universität Freiburg
 Georges-Köhler-Allee 106
 D-79110 Freiburg
 Tel.: +49-(0)761-203-7447
 Fax.: +49-(0)761-203-7539
 eMail: daub@imtek.de

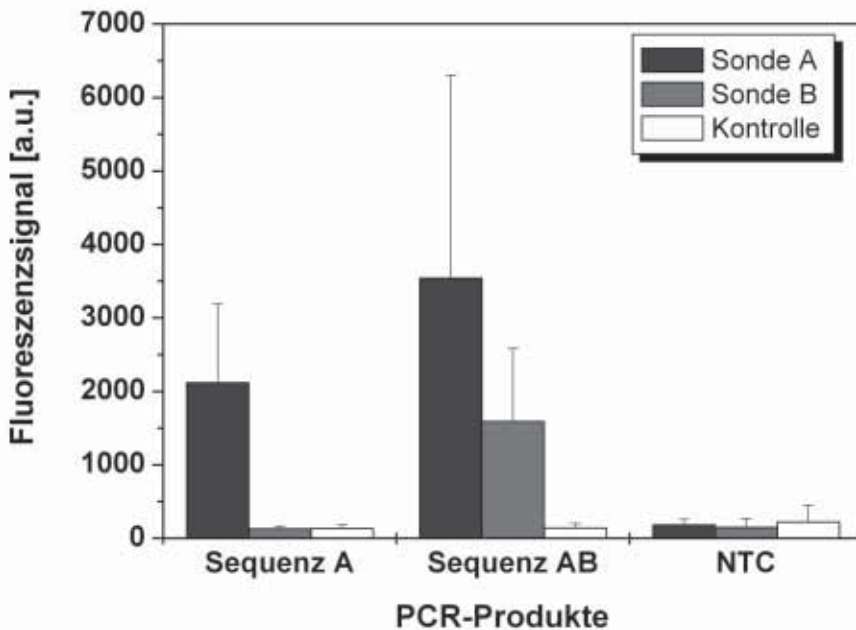


Abb. 6: Prozessierung und Detektion von DNA-Proben auf der nanoMAP-Plattform. Im PCR-Slide wurden parallel 3 Proben prozessiert (2 DNA-Templates, A und AB, sowie eine non-template control, NTC) und auf 3 Kanäle des NWS übertragen. Hier konnten die PCR-Produkte durch immobilisierte Oligonucleotide-Sonden (A und B) spezifisch nachgewiesen werden.