

Mikrodosiertechne für die Biotechnologie und industrielle Anwendungen

Dr. Peter Koltay¹, Dipl. Ing. Reinhard Steger², Dipl. Ing. Wolfgang Streule², Prof. Dr. Roland Zengerle²

¹ BioFluidix GmbH, Georges-Köhler-Allee 106, 79110 Freiburg

² IMTEK - Anwendungsentwicklung, Universität Freiburg, D-79110 Freiburg

Kurzfassung

In diesem Beitrag werden drei verschiedene kontaktfreie Mikrodosierverfahren für die präzise und massiv parallele Dosierung von Flüssigkeiten im Nanoliter- bis Pikoliterbereich vorgestellt. Die Dosieretechniken gemäß dem TopSpot[®]-Verfahren [1] und dem Dispensing Well Plate (DWP) Verfahren [2] beruhen in entscheidender Art und Weise auf mikrotechnisch gefertigten Komponenten. Das einkanalige PipeJet-Verfahren [3] kommt ohne mikrotechnisch gefertigte Elemente aus, zur Dosierung wird lediglich ein simpler Mikroschlauch benötigt. Neben der Funktionsweise werden auch die wichtigsten Kenndaten der Dosiersysteme und typische Anwendungsgebiete vorgestellt.

1 Einleitung

Nach dem Siegeszug der Tintenstrahl-drucktechnik (engl. Drop-on-Demand (DOD) Technology) [4-6] im Büro- und Heimanwenderbereich werden Mikrodosieretechniken nun auch zunehmend in anderen Bereichen eingesetzt. Von der Biotechnologie bis zur industriellen Fertigung gibt es eine große Bandbreite von Dosieraufgaben im Nanoliter bis Pikoliterbereich, die bewältigt werden müssen [4]. Hochviskose Kleber müssen ebenso dosiert werden, wie empfindliche Proteine oder gar Zellen. Die Anzahl der verschiedenen Medien, die gleichzeitig dosiert werden sollen, kann bis in die Tausende reichen und oftmals müssen besonders empfindliche oder schwer zu dosierende Flüssigkeiten gehandhabt werden. Es ist deshalb kaum verwunderlich, dass die Tintenstrahl-drucktechnik nicht allen Anforderungen gerecht werden kann. Sie funktioniert am besten, wenn eine genau spezifizierte, nicht zu stark viskose Flüssigkeit (i.a. speziell formulierte Tinten) immer wieder mit hoher Präzision dosiert werden muss. Sobald höherviskose, empfindliche oder insbesondere ständig wechselnde Medien dosiert werden sollen, ist die DOD Technik selten das Mittel der Wahl.

In den vergangenen Jahren wurden deshalb alternative Mikrodosierverfahren für die berührungslose Dosierung im Nanoliter- bis Pikoliterbereich erforscht und entwickelt. Wesentliche Schwerpunkte waren hierbei die weitgehend Medien-unabhängige Dosierung [3;7], die Dosierung von hochviskosen Medien [8-10], die massiv parallele Dosierung einer Vielzahl unterschiedlicher Medien [1;2;11] und die Dosierung bei hohen Temperaturen [12;13]. Im folgenden sollen einige dieser Verfahren und ihre typischen Anwendungen vorgestellt werden.

2 TopSpot[®]-Verfahren

Das TopSpot[®]-Verfahren wird schon seit einiger Zeit erfolgreich für die Herstellung von Microarrays eingesetzt [1;11]. Microarrays oder auch Biochips sind hochparallele Biosensoren, die in der Forschung und medizinischen Diagnostik eingesetzt werden. Sie bestehen aus einer Vielzahl von Mikrotröpfchen, die auf einem Substrat immobilisiert sind [14]. Zur Herstellung von Microarrays müssen Hunderte bis Tausende unterschiedlicher Flüssigkeiten auf Glas oder Kunststoffoberflächen gedruckt werden.

2.1 TopSpot[®] Funktionsprinzip

Das TopSpot[®]-Druckverfahren basiert auf einem mikrotechnisch hergestellten Druckkopf (vgl. Abb. 1). Dieser ist in der Lage, eine Vielzahl unterschiedlicher Reagenzien gleichzeitig, in einem sehr engen Raster und berührungslos auf das Substrat abzugeben. Hierzu werden die verschiedenen Reagenzien zunächst in Reservoirs eingefüllt, die auf dem Druckkopf im Standardraster von Mikrotiterplatten angeordnet sind (z.B. 2,25 mm). Dies geschieht mit gängigen Pipetierautomaten. Die Reservoirs fassen Reagenzien für insgesamt 1.000 - 10.000 Dosiervorgänge.

Die verschiedenen Flüssigkeiten werden daraufhin allein durch Kapillarkräfte zu den zentral gelegenen Düsen weitergeleitet, die typischerweise in einem Raster von 500 µm angeordnet sind. Diese im Druckkopf integrierte Formatwandlung vom weiten Raster der Mikrotiterplatten zum engen Raster der Microarrays ist einer der Hauptgründe für den Geschwindigkeitsvorteil der TopSpot[®]-Technologie. Für den Betrieb werden die Druckköpfe in sogenannte Druckmodule eingebracht. Diese beinhalten das

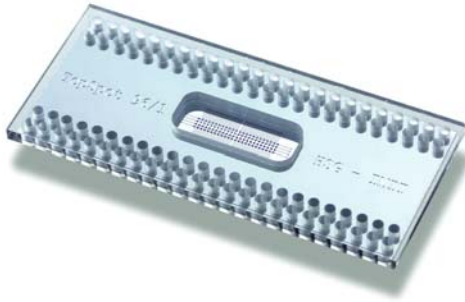


Bild 1 TopSpot® Druckkopf aus Glass/Silizium mit 96 parallelen Dispensiereinheiten.

eigentliche Antriebssystem und lösen den Druckvorgang aus. Es gibt verschiedene Verfahren, die TopSpot® Druckköpfe zu betreiben [1;15]. Das gebräuchlichste basiert auf einem Piezo-Stack-Aktor, der einen in den Druckkopf eingesetzten Kolben verdrängt. Diese Verdrängung generiert einen Druckpuls in der abgeschlossenen Luftkammer zwischen dem Kolben und den Düsen. Dieser Druckpuls wirkt auf alle Düsen gleichzeitig. Er führt dazu, dass aus allen Düsen ein Teil der enthaltenen Flüssigkeit als frei fliegendes Tröpfchen abgegeben wird (vgl. Abb. 2). Das Volumen der Tröpfchen liegt bei ca. 200 pL bis ca. 1 nL. Es kann durch Anpassung der Düsengröße beim Fertigungsprozess variiert werden.

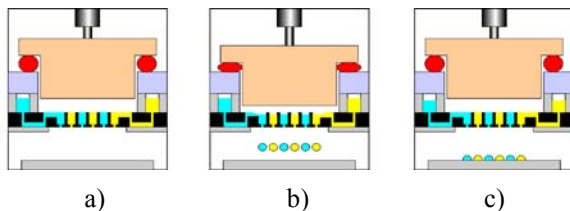


Bild 2 a) Querschnitt durch Druckkopf & Kolben b) während des Tropfenausstoßes c) nach Ende des Druckvorgangs.

2.1.2 Anwendungen für TopSpot®

Die Anwendungen für Microarrays sind sehr vielfältig und die Anforderungen deshalb extrem unterschiedlich [14]. Microarrays mit hoher Dichte (engl. High-Density-Micro-Arrays), die aus 20.000 bis 30.000 verschiedenen Mikrotröpfchen (oder engl. Features) bestehen, können u. U. das gesamte Genom einer Spezies repräsentieren. Die Herstellung solcher Microarrays ist durch das sequentielle Drucken einzelner Tropfen nicht praktikabel und wird deshalb zumeist mit alternativen Verfahren durchgeführt. Selbst mit TopSpot® ist eine derartig hohe Tropfenanzahl sehr aufwendig herzustellen: Für einen vollständigen Human Genome Chip müssten ca. 250 Druckmodule mit 96-er Druckköpfen (vgl. Abb 1) vorgesehen werden.

Der hauptsächliche Anwendungsbereich von TopSpot® liegt deshalb bei Microarrays mit mittlerer bis geringer Dichte (engl. Medium and Low Density Micro Arrays) im Bereich von 10 bis 1.000 Features. Im Gegensatz zu den Genome Chips, die im wesentlichen - je nach Hersteller mehr oder weniger identisch - das gesamte Genom einer Spezies repräsentieren, sind Medium- und Low-Density-Microarrays für eine bestimmte Analyse ausgelegt. Anwendungen reichen von der medizinischen Diagnostik über die Protein- und pharmazeutische Wirkstoffforschung bis hin zur Lebensmittelüberwachung.

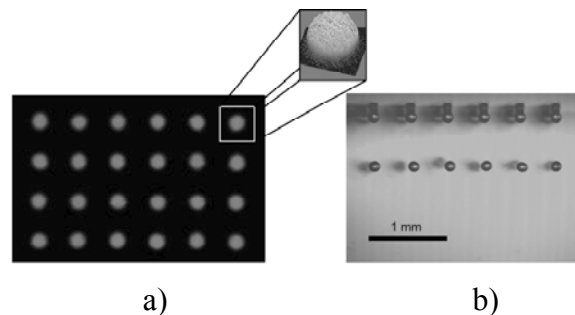


Bild 3 a) Fluoreszenzaufnahme eines mit TopSpot® gedruckten Microarrays b) Stroboskopaufnahme der Tropfenbildung beim Druckvorgang

Neben der Parallelisierung des Druckvorgangs, ist die sehr gute Druckqualität ein besonderes Merkmal des TopSpot® Verfahrens. Wie in Abb. 3 a) zu erkennen, ergibt sich eine sehr gute Tropfenmorphologie und eine sehr gute Homogenität der Tropfen innerhalb eines Arrays (ca. 2 –3 % relative Abweichung im Fluoreszenzsignal) bei unterschiedlichsten Printmedien. Die gute Tropfenqualität zeigt sich bereits direkt nach Tropfenausstoß an den Düsen, welche die Mikrotropfen als nahezu ideal geformte Kugeln verlassen (vgl. Abb. 3 b). Durch den sehr definierten Tropfenabriss wird auch eine hohe Reproduzierbarkeit des einzelnen Druckvorganges erreicht (typischerweise um die 0.5% relative Abweichung im Fluoreszenzsignal).

3 Dispensing Well Plate (DWP)

Das Dispensing Well Plate Verfahren (DWP) weist gewisse Ähnlichkeiten zum TopSpot®-Verfahren auf: Auch hier ist das Herzstück ein mikrotechnisch gefertigter Dosierchip, der die Funktionselemente Reservoir, Kapillarkanal und Düse enthält (vgl. Abb. 4 a). Im Unterschied zu TopSpot® wird beim DWP-Verfahren das Dosiervolumen jedoch durch das geometrische Volumen der Düse bestimmt. D.h. das gesamte in der Düse enthaltene Volumen - je nach Auslegung zehn bis mehrere hundert Nanoliter - wird im Freistrahldosiert.

3.1 DWP Funktionsprinzip

Vor der Dosierung wird jedes Reservoir des DWP-Dosierchips mit einer Flüssigkeit befüllt. Kapillarkräfte leiten diese dann - wie bei TopSpot® - weiter in die Düse. Durch Anlegen eines pneumatischen Druckpulses auf der gesamten Oberseite des Dosierchips wird die in den Düsen enthaltene Flüssigkeit vollständig ausgestoßen. (Abb. 4 b) und c)). Weil Reservoir und Düse dem gleichen pneumatischen Druck ausgesetzt sind, findet im Verbindungskanal kein druckgetriebener Flüssigkeitstransport statt. Deshalb wird im wesentlichen das in der Düse enthaltene Volumen abgegeben. Nach Abschalten des pneumatischen Drucks befüllen sich die Düsen durch Kapillarkräfte getrieben wieder von neuem.

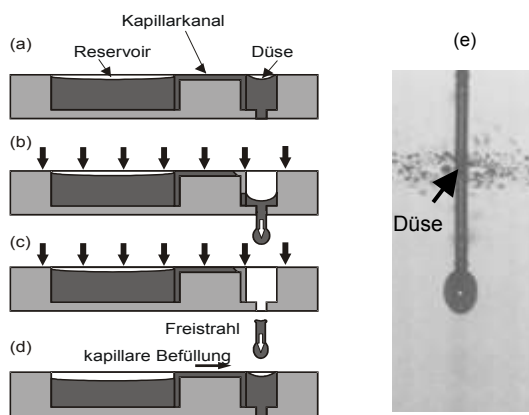


Bild 4 a) Funktionselemente einer DWP-Dosiereinheit im Querschnitt b) Entleeren der Düse durch pneumatischen Druck c) Abriss des Dosiervolumens im Freistrah d) Wiederbefüllung durch Kapillarkräfte e) Photo des Strahlaustritts aus der Düse mit Spiegelbild des Strahls im oberen Bildbereich.

Aufgrund des beschriebenen Funktionsprinzips ist die präzise mikrotechnische Fertigung einer DWP unabdingbare Voraussetzung für die genaue Dosierung. Die erforderliche Präzision kann z.B. mit Verfahren der Silizium Mikromechanik erreicht werden. Der in Abb. 5 dargestellte Prototyp mit 384 Dispensiereinheiten wurde durch DRIE Trockenätzen in 1 mm starkem Silizium Material hergestellt. Aus Anwendersicht sollten die DWP Dosierchips eher als kostengünstige Einwegteile ausgelegt sein, da eine Reinigung in den meisten Anwendungsfällen inakzeptabel ist. Deshalb wurden verschiedene Verfahren zur kostengünstigen Fertigung von DWP Strukturen untersucht. Neben der spanabhebenden Fertigung und der lithographischen Herstellung in SU-8 wurde auch das direkte Spritzgießen der DWP in Kooperation mit dem HSG-IMAT erforscht. Aktuell laufen weitere Forschungsarbeiten in Kooperation mit dem Forschungszentrum Karlsruhe, um DWP Strukturen in Größe einer Mikrotiterplatte mit Heißprägeverfahren herzustellen.

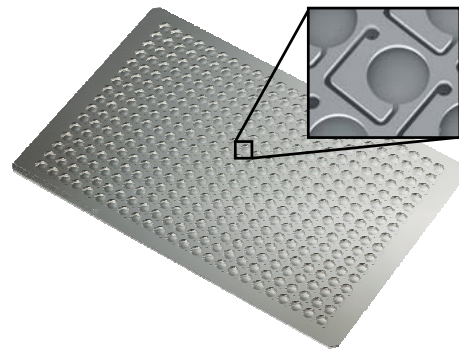


Bild 5 DWP aus Silizium mit 384 Dosiereinheiten auf einer Fläche von ca. 8 cm x 12 cm.

3.2 DWP-Anwendungen

Der wesentliche Anwendungsbereich des DWP-Verfahrens liegt im Bereich der Mikrotiterplatten-Technologie. In Mikrotiterplatten werden biochemische Reaktionen im kleinsten Maßstab mit Volumina von wenigen Mikrolitern im hohen Durchsatz durchgeführt. Auf einer Mikrotiterplatte aus Kunststoff der Größe ca. 85 mm x 127 mm finden typischerweise 96, 384 oder bis zu 1536 Experimente gleichzeitig statt. Jedes Experiment benötigt dabei drei bis vier flüssige Komponenten, die zudosiert werden müssen. In der Pharmaforschung werden bis zu mehreren hundert solcher Mikrotiterplatten täglich prozessiert, so dass zu deren Befüllung Millionen von Dosiervorgängen im Sub-Mikroliterbereich erforderlich sind. Solche Dosieraufgaben können mit dem DWP-Verfahren hochpräzise gelöst werden, da innerhalb weniger Millisekunden der Inhalt einer ganzen Mikrotiterplatte (d.h. bis zu 1536 Flüssigkeiten gleichzeitig) transferiert werden kann.

Der Flüssigkeitstransfer beim DWP-Verfahren ist darüber hinaus auch sehr präzise. Unterschiedlichste Medien können in dem Volumenbereich von 10 nl bis 1000 nl gleichermaßen genau und reproduzierbar dosiert werden [2]. Ferner ist auch die Tropfenqualität so gut, dass sogar chemische Experimente in Mikrotröpfchen – ganz ohne Reaktionsgefäß – betrieben werden könnten (vgl. Abb. 6).

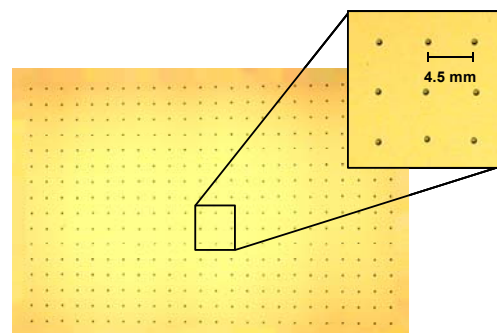


Bild 6 384 mit der DWP aus Abb. 5 dosierte Mikrotröpfchen aus DMSO auf einer Glasoberfläche.

4 PipeJet-Verfahren

Das PipeJet Verfahren erlaubt die variable Dosierung von Flüssigkeiten im Bereich von 1 nL bis ca. 1000 nL. Im Gegensatz zu den beiden anderen Verfahren werden keine mikrotechnisch hergestellten Komponenten benötigt, sondern lediglich Kunststoffschläuche mit kleinen Durchmessern (typischerweise kleiner 500µm), die durch Extrusion oder Spritzguß hergestellt werden können.

4.1 PipeJet Funktionsprinzip

Kernstück des Verfahrens ist ein elastischer Mikroschlauch, der durch einen Piezo-Stack-Aktor mit hoher Geschwindigkeit (ca. 200µm/ms) um bis zu 40 µm verdrängt wird. Die Flüssigkeit wird aufgrund der schnellen Volumenkompression durch das Schlauchende ausgestoßen. Das Dosiervolumen ist dabei in einem gewissen Bereich unabhängig von der Viskosität und der Oberflächenspannung der zu dosierenden Flüssigkeit [3].

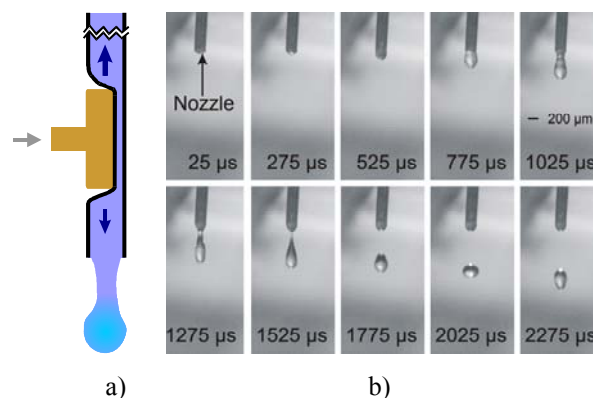


Bild 7 a) Schematische Darstellung des Dosierprinzips b) Bildsequenz des Tropfenausstoßes (Wasser) aus einem Schlauch mit 200µm Durchmesser.

4.2 PipeJet Anwendungen

Eines der herausragendsten Merkmale des PipeJet-Verfahrens ist, dass die Dosiermedien lediglich mit dem Mikroschlauch in Kontakt kommen. Dieser ist leicht zu wechseln und kann als Einwegprodukt ausgelegt werden. Es müssen beim Medienwechsel also keine mikromechanischen oder feinmechanischen Komponenten gereinigt werden. Deshalb eignet sich PipeJet besonders bei häufigem Medienwechseln in technischen oder biochemischen Anwendungen. Wegen der einfachen Geometrie der Fluidleitung ist das Verfahren auch wenig anfällig gegen Verstopfung und ist deshalb auch sehr gut für gefüllte Stoffe, wie z.B. Farben oder Klebstoffe einsetzbar. Aufgrund der hohen mit dem Piezostack erreichbaren

Beschleunigungen lassen sich sogar mittelviskose Medien dosieren.

Bei der Dosierung im Nanoliterbereich wird mit dem PipeJet-Verfahren typischerweise eine Präzision im Bereich 0.5% bis 3% erreicht. Darüber hinaus ist das Dosiervolumen im Viskositätsbereich bis 25 mPas weitestgehend von den Medieneigenschaften unabhängig und durch den Hub des Piezoaktors steuerbar. Im Gegensatz zu den zuvor diskutierten DOD Verfahren oder Festvolumendispensern wie DWP ein eindeutiger Vorteil.

Schließlich bieten Mikroschläuche mit sehr dünnen Wandstärken (um die 20 µm) zusätzlich einen wirksamen Schutz vor ungewolltem Auslaufen der Dosiermedien, das bei flächigen Düsen häufig auftritt. Deshalb können mit PipeJet auch organische Lösungsmittel mit sehr geringer Oberflächenspannung, wie z.B. Ethanol, Methanol, Isopropanol etc., und sogar Kriechöle dosiert werden. Da einige der getesteten Schlauchtypen zudem sehr hohe Standzeiten aufweisen (mehr als 10 Mio. Dosierungen), kann das Verfahren nicht nur in der Biotechnologie, sondern auch sehr gut in der industriellen Produktion eingesetzt werden. Typische Anwendungsfelder sind hier das kontaktfreie Auftragen von Ölen, Klebstoffen und Farbstoffen in der Mikromontage oder Kennzeichnungstechnik.

6 Literatur

- [1] O. Gutmann et al., Biomed. Microdevices 6, 131 (2004).
- [2] P. Koltay, et al., Sensors and Actuators A-Physical 116, 483 (2004).
- [3] W. Streule et al., Journal of the Association for Laboratory Automation 9, 300 (2005).
- [4] E. R. Lee, Microdrop Generation (CRC Press, Boca Raton, 2002).
- [5] Hartwig and M. Döring, Adhäsion Kleben & Dichten 7-8, 31 (1996).
- [6] H. P. Le, Journal of Imaging Science and Technology, vol. 42, no. 1, pp. 49-62, Jan.1998
- [7] N. Hey et al., in IEEE MEMS (1998), pp. 429.
- [8] H. Beine, Productronic 05-06, 2 (2005).
- [9] T. Gaugel, Adhäsion. Kleben und Dichten 47, 13 (2003).
- [10] N. Othman, Adhäsion. Kleben und Dichten 48, 22 (2004).
- [11] O. Gutmann et al., The Analyst 129, 835 (2004).
- [12] W. Wehl, et al., in IMPAS (2003).
- [13] D. J. Hayes, et al., J. Electron. Manufact. 8, 209 (1998).
- [14] M. Schena, Microarray Biochip Technology (Eaton Publishing Company/Biotechniques Books, Natick, 2000).
- [15] B. de Heij et al., Sensors and Actuators A-Physical 103, 88 (2003).