

Automatisiertes Liquid Handling im Nanoliterbereich

P. Koltay, B. de Heij, H. Sandmaier, R. Zengerle

Ein wichtiger Teil der Automatisierung in der Biotechnologie ist das „Liquid-Handling“: die Dosierung von kleinsten Flüssigkeitsmengen, die in hochgradig paralleler Art und Weise erfolgen muss. Dabei sind die Anforderungen an die Systeme oft so unterschiedlich, dass individuelle Lösungen gefunden werden müssen.

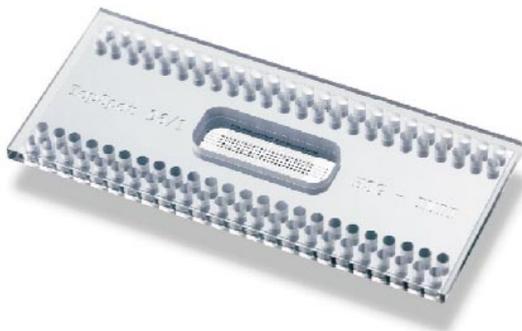
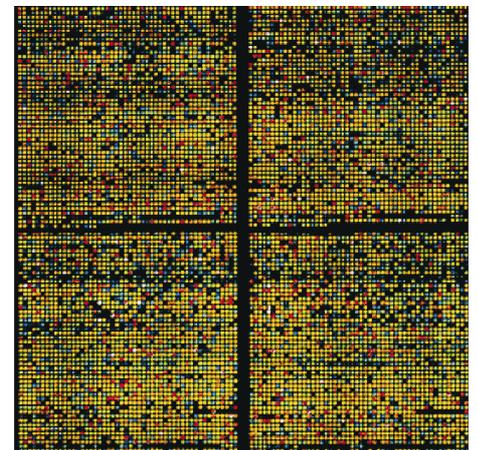


Abb. 1: Rechts: Biochip nach Aufbringen der Probenflüssigkeit unter dem Fluoreszenz-Reader. Links: TopSpot Druckkopf mit 96 Reservoiren.



Durch innovative Konzepte und durch Einsatz mikrotechnischer Elemente kann die Produktivität derartiger Anlagen erheblich gesteigert werden.

Biochips & Microarrays

Die Microarray-Technologie, oftmals auch einfach als Biochip Technologie bezeichnet, ist eine neuartige, massiv parallele Analyseverfahren. Mit ihr können z. B. Lebensmittel auf eine Vielzahl möglicher Verunreinigungen untersucht werden, oder es lassen sich Prognosen erstellen, ob ein bestimmtes Medikament bei einem Patienten aufgrund seiner genetischen Disposition wirken wird oder nicht. Das grundlegende Konzept hinter den Microarrays ist, dass eine Vielzahl von unterschiedlichen Substanzen in einem regelmäßigen Muster auf ein Trägermaterial aufgebracht und mit der zu untersuchenden Substanz zur Reaktion gebracht wird. Da die aufgebrachten Substanzen und deren Positionen bekannt sind, können, je nachdem an welcher Stelle des Substrats eine chemische

Reaktion stattfindet, Rückschlüsse über die Zusammensetzung der unbekanntes Probenflüssigkeit gezogen werden. Das Besondere an der Methode ist dabei, dass je nach Anzahl der aufgebrachten Substanzen mehrere 100 bis 100.000 Analysen gleichzeitig durchgeführt werden können.

Die entscheidende Frage bei der Herstellung der Microarrays besteht darin, wie man die Vielzahl der verschiedenen Substanzen in Form kleinster Tröpfchen im Volumenbereich zwischen 0,1 nl – 1 nl möglichst eng benachbart und möglichst kostengünstig auf das Substrat aufbringen kann. Nach dem Stand der Technik werden dazu feine Nadeln auf die Substratoberfläche abgesetzt (Pin-Printing-Verfahren). Der Vorgang lässt sich zwar auch automatisieren und parallelisieren, jedoch ist der durch Pin-Printer erreichbare Durchsatz für eine kostengünstige Fertigung von Biochips deutlich zu gering. Die Nadeln müssen nach einigen Druckvorgängen wieder in einen Vorratsbehälter eingetaucht werden, um neues Medium aufzunehmen.



Abb. 3: Mikrotiterplatten mit 1.536 Reservoiren, wie sie im High-Throughput-Screening Verwendung finden.



Abb. 2: Produktionsanlage mit mehreren hintereinander angeordneten TopSpot Druckköpfen zur Massenfertigung von Biochips mit bis zu 1.440 verschiedenen Substanzen pro Chip.

Einen neuen Weg bei der Produktion von Biochips geht das TopSpot-Verfahren, das vom Institut für Mikro- und Informationstechnik der Hahn-Schickard Gesellschaft (HSG-IMIT) entwickelt wurde. Herzstück ist ein mikrotechnisch gefertigter Druckkopf aus Silizium und Glas, in den die zu dosierenden Substanzen eingefüllt werden (vgl. Abb.1). Durch im Druckkopf integrierte Kapillarkanäle werden die Flüssigkeiten ohne äußeres Zutun zu Mikrodüsen transportiert, die sich in der Mitte des Druckkopfes befinden und in einem dichten Raster von 500 μm angeordnet sind. Der Druckkopf wird in ein Druckmodul eingesetzt, das die Aktorik für das Auslösen der Tropfen beinhaltet. Über einen Piezoaktor wird ein pneumatischer Druckpuls erzeugt, durch den aus allen 96 Kanälen gleichzeitig ein Mikrotröpfchen berührungslos auf das Substrat abgegeben wird. Das zu Grunde liegende physikalische Prinzip ist hierbei ähnlich dem eines Tintenstrahldruckers, allerdings können durch den TopSpot-Druckkopf nicht nur 5, sondern bis zu 96 verschiedene „Farben“ gleichzeitig und in einem regelmäßigen Raster von 500 μm gedruckt werden. Das Vorratsvolumen des Druckkopfes reicht dabei für mehrere tausend Druckvorgänge.

Das TopSpot-Verfahren stellt eine wesentliche Verbesserung der Produktionstechnologie für Biochips dar, da es sehr schnell, massiv parallel, wartungsarm und verschleißfrei arbeitet. Die Produktivität des TopSpot-Verfahrens kann aber noch weiter erhöht werden, indem durch herkömmliche Automatisierungstechnik mehrere Druckköpfe seriell angeordnet werden. Bei Einsatz von 15 Druckköpfen können so Microarrays mit bis zu 1.440 verschiedenen Substanzen hergestellt werden. Eine derartige Anla-

ge, welche für die Firma GeneScan Europe AG in Freiburg realisiert wurde, ist in Abb. 2 dargestellt. Es wird ein Durchsatz von bis zu 300 Microarrays pro Stunde erreicht.

High-Throughput-Screening (HTS)

In der pharmazeutischen Forschung wird durch High-Throughput-Screening (HTS) versucht, neue Wirkstoffe für die Medikamentenentwicklung zu identifizieren. Dabei werden für jeden Stoff einer chemischen Substanzbibliothek - typischerweise einige 100.000 verschiedene Substanzen - biochemische Experimente (sog. Assays) durchgeführt, die Aufschluss auf dessen Wirksamkeit geben. Aussichtsreiche Substanzen werden nachfolgend intensiver untersucht und stellen möglicherweise Ausgangsstoffe für eine spätere Medikamentenentwicklung dar. Der Test von 100.000 Substanzen pro Tag ist heute Stand der Technik. Der technische Aufwand und der Automatisierungsgrad, der hierbei betrieben wird, sind jedoch enorm. Dennoch ist eine weitere Erhöhung des Durchsatzes und eine Reduktion des Reagenzienverbrauchs erwünscht.

Das Liquid-Handling spielt hierbei eine zentrale Rolle, da die Befüllung der Mikrotiterplatten, in denen die Experimente durchgeführt werden, sehr zeitintensiv ist. Derzeit werden in den modernsten Anlagen hierfür Pipettierautomaten verwendet, die bis zu 384 Pipettier- oder Dispensiervorgänge gleichzeitig durchführen können. Allerdings haben die Mikrotiterplatten mittlerweile bereits das 1.536-er Format



erreicht (s. Abb. 3). Eine Platte der Größe 128 mm x 86 mm beherbergt dabei 1.536 Reservoirs im Raster von 2,25 mm mit einem jeweiligen Fassungsvermögen von ca. 5 μl . In jedem dieser Reservoirs läuft eine andere chemische Reaktion ab, so dass jedes Reservoir einzeln und präzise mit Chemikalien befüllt werden muss. Viele Substanzen besitzen eine maximale Löslichkeit von 1 %. Dies erfordert also bereits heute beim Zudosieren der Substanzen die Kontrolle von Volumina im Bereich von 50 nl.

Eine wesentliche Beschleunigung verspricht die „Dispensing Well Plate“ (DWP). Die Grundidee dieses Systems besteht darin, dass alle 1.536 parallelen Kanäle einer Mikrotiterplatte in eine entsprechende darunter liegende Platte abgegeben werden. Hierzu sind bei der dispensierenden Mikrotiterplatte zusätzlich zu den Reservoirs auch mikrotechnisch gefertigte Düsen mit einem definierten Volumen von 50 nl angebracht. Der Flüssigkeitsausstoß wird durch einen pneumatischen Druckpuls bewirkt, der homogen auf die gesamte Platte wirkt. Er entleert die Düsen vollständig und gibt so das durch die Düsengeometrie definierte Volumen von 50 nl bei allen 1.536 Kanälen gleichzeitig ab.

Herkömmliche Pipettierautomaten erlauben die Kontrolle eines minimalen Volumens von ca. 500 nl. Das neue, patentierte Verfahren ermöglicht eine Reduktion des Volumens um den Faktor 10 und hat darüber hinaus das Potenzial, deutlich schneller zu sein. Entsprechend dem aktuellen Entwicklungsstand wurde ein Prototyp der DWP mit 96 Kanälen als Silizium/Glas-Bauteil realisiert (vgl. Abb. 4) und erfolgreich getestet.

Abb. 4: Prototyp einer DWP mit 96 Reservoirs und Düsen im Format einer 1.536-er Mikrotiterplatte (Rastermaß 2,25 x 2,25 mm).

Das Zielvolumen von 50 nl konnte mit unterschiedlichen Medien (DMSO, Wasser, etc.) sehr genau und homogen über alle 96 Kanäle erreicht werden. Der nächste Entwicklungsschritt mit 1.536 parallelen Kanälen erscheint daher innerhalb kurzer Zeit realisierbar. ▶