

## **Das Labor in Scheckkartengröße: Synthese, Analyse und Trennung von Biomolekülen**

*Martin Bertau, Institut für Technische Chemie, TU Bergakademie Freiberg, 09596 Freiberg, Deutschland*

### **Einleitung**

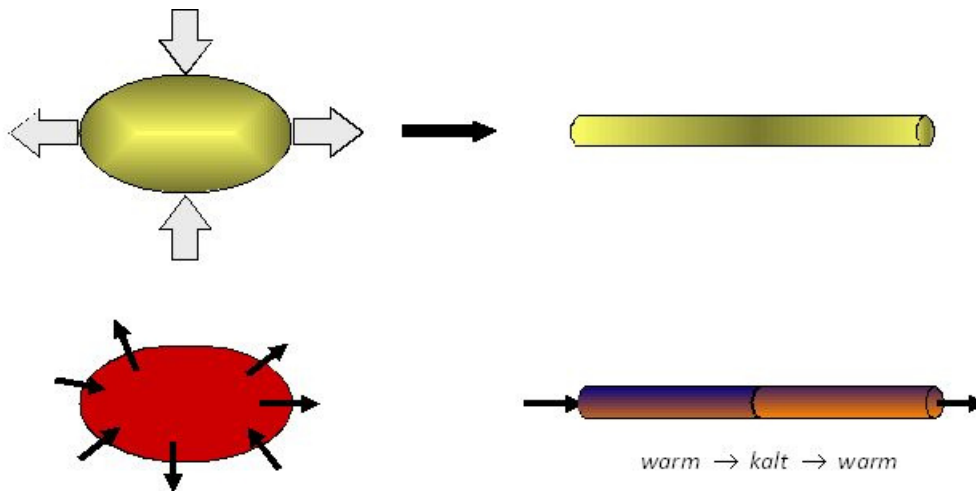
Automatisierte Systeme für Fragestellungen aus den Bereichen Analytik, Diagnostik und Synthese sind seit geraumer Zeit auf dem Vormarsch. Die Erwartungen sind hoch, erhofft man sich doch erhebliche Einsparungen hinsichtlich Reagenzienverbrauch und Zeit, aber auch einen reduzierten Personalaufwand. Ziel ist es, mehr Analysen in kürzerer Zeit bei mindestens gleichbleibender Qualität durchzuführen. Hier bieten sich Lab-on-Chip-Systeme an, typischerweise objektträger- bis scheckkartengroße Apparate, die in stark miniaturisierter Form alle für eine analytische oder diagnostische Fragestellung erforderlichen Komponenten enthalten.

Attraktiv ist ihre geringe Größe, die es häufig gestattet, eine Messung vor Ort vorzunehmen, vor allem aber sind sie dadurch charakterisiert, daß alle Prozeßschritte automatisiert in einem einzigen Reaktionssystem stattfinden, das die Probenaufbereitung bis hin zur abschließenden Detektion umfaßt. Ihr hauptsächliches Einsatzgebiet umfaßt qualitative und quantitative Analysen im Mikromaßstab von DNA, RNA, Proteinen und lebenden Zellen.

### **Was ist ein Lab-on-Chip?**

Ihre besonderen Eigenschaften erhalten die Scheckkartenlabors durch eine Anleihe bei der Natur. Streng genommen sind sie Mikroreaktoren, genauer Mikrorohrreaktoren, deren innere Weite zwischen 10 und 100 µm liegt. Damit bewegen sie sich in der Größenordnung von Mikroorganismen. Diese können aufgrund ihrer geringen Größe und vor dem Hintergrund der Vielzahl der pro Zeiteinheit in ihnen ablaufenden chemischen Reaktionen als Mikroreaktoren aufgefaßt werden. Sie sind damit durch eine hohe Medienhomogenität gekennzeichnet, ein Umstand, von dem genau die Lab-on-Chip-Technologie Gebrauch macht. Zieht man nun gedanklich einen solchen zellulären Mikroreaktor in die Länge und übt senkrecht dazu Druck auf die Zelle aus, so erhält man letztlich eben jenen Mikrorohrreaktor mit seinen faszinierenden Eigenschaften, wie er in Abbildung 1 skizziert ist. Damit nicht genug, die Zelle ist durch einen extrem schnellen diffusionskontrollierten Konzentrationsausgleich in ihrem Inneren gekennzeichnet, und auch die Temperatur darf im gesamten Volumen als konstant angesehen werden; doch der Stoffaustausch mit der Umgebung ist ungerichtet. Dies umgeht der Mikrorohrreaktor durch die Undurchlässigkeit seiner Wandung sowie der vorgegebenen Strömungsrichtung. Und ein zweites wichtiges Kriterium kommt hinzu, die bereits angesprochene Temperaturkonstanz. Sie ist Folge des hohen Oberflächen/Volumen-Verhältnisses (O/V). Im Gegensatz zur Oberfläche, die quadratisch zunimmt, wächst das Volumen stets mit der dritten Potenz. Daraus ist schnell ersichtlich, dass kleine

Dimensionen die Oberfläche bevorzugen und große Reaktordimensionen das Volumen. In anderen Worten, in der Mikrodimension findet durch die hohe Austauschoberfläche ein unerreicht schneller Wärmetransport entlang der Reaktorwand statt. Dies gestattet es, im selben Reaktor auf kürzester Distanz schnelle Temperaturwechsel von mehreren 10 K mit steilen Temperaturgradienten bezogen auf die vorangehenden und nachfolgenden Temperaturzonen vorzunehmen.



<b>Temperatur</b>	einheitlich	Temperaturgradient bzw. Temperaturwechsel möglich
<b>Stofffluß</b>	keine Vorzugsrichtung	unidirektional
<b>Verweilzeit</b>	kurz	kurz

Abbildung 1: Gedankenexperiment zur Analogie von Lab-on-Chip-Reaktoren und ganzen Zellen. Die Vorteile des Scheckkartenlabors liegen im unidirektionalen Stofftransport und der Option auf kurzer Distanz wechselnde Temperaturregimes zu fahren.

## Mikroenzymreaktoren

Von eben diesen Eigenschaften machen Mikroenzymreaktoren Gebrauch. Durch ihre an der Reaktorwand immobilisierten Enzyme weisen sie Analogien mit membrangebundenen Enzymen auf, die für analytische Zwecke eingesetzt werden. Die Immobilisierung ist eine Grundvoraussetzung für Analytik mit Mikroreaktionssystemen, wobei die Wahl der Immobilisierungstechnik problemspezifisch erfolgt. Für die Zellanalytik werden auch lebende Zellen im Mikrokanal immobilisiert.

Je nach Reaktormaterial bedingt dies andere Methoden. Bei Glas und Silicon (PDMS) findet die Anbindung mit 3-Aminopropylsilan gefolgt von Glutaraldehyd statt. Auf Quarzoberflächen wird zunächst mit Avidin beschichtet, an welches das biotinylierte Enzym dann bindet. An PMMA-Copolymere wird über Vernetzung mit Glutaraldehyd oder Glycidol gebunden, an Edelstahl adsorptiv. Vorteilhaft sind die einfache Präparation und Handhabung, die Haltbarkeit sowie eine höhere Enzymstabilität unter denaturierenden Bedingungen. Als nachteilig haben sich die

aufwendige Avidin-Vernetzung erwiesen sowie, dass der Immobilisierungsgrad häufig unbekannt ist und die Reproduzierbarkeit eingeschränkt sein kann. Alternativ wird daher die Enzymimmobilisierung auf Trägermaterialien untersucht, deren einziger Vorteil allerdings die einfache Präparation ist. Nachteilig wirken sich insbesondere hohe Drücke aus, die hohe Scherkräfte bedingen und so zur Denaturierung des Biokatalysators führen können. Ferner kann der Mikrokanal verstopfen und das Enzym kann auswaschen (Leaching).

Ein Beispiel hierfür ist der Xanthinnachweis mittels einer mit Meerrettichperoxidase gekoppelten xanthinoxidasekatalysierten Oxidation, bei der die Quantifizierung hochempfindlich über die Chemolumineszenz von Luminol erfolgt (Abbildung 2). Das Verfahren ist durch seine hohe Empfindlichkeit gekennzeichnet.

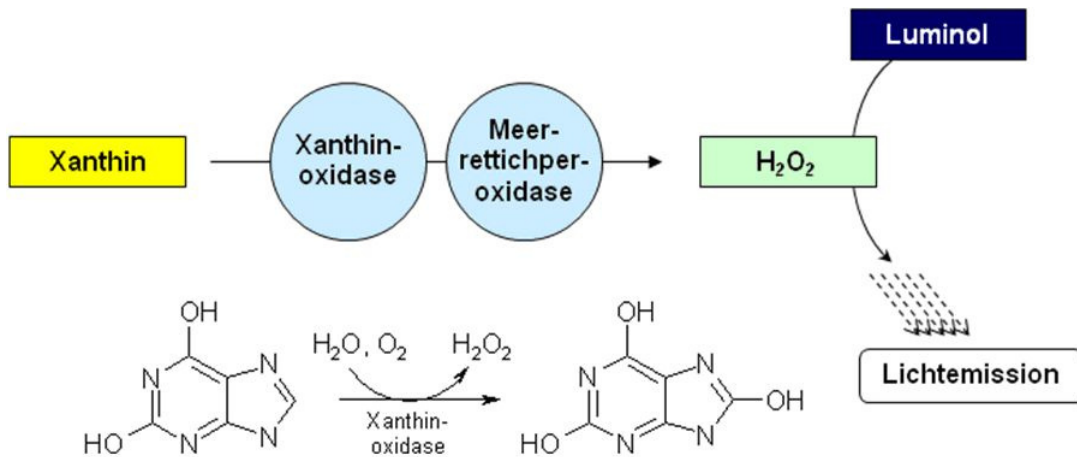


Abbildung 2: Gekoppelter enzymatischer Xanthinnachweis im Mikroenzymreaktor.

Die Vorteile dieses Analysensystems zeigen sich beispielsweise in der Peptidanalytik. Auf einem Chip lassen sich mehrere Analysensysteme unterbringen, die alle nach dem gleichen Funktionsprinzip arbeiten: Der Analyt (Edukt) wird über ein im Probenreservoir immobilisiertes Enzym geführt, bei dem es sich typischerweise um eine Protease wie Trypsin handelt. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die Spaltprodukte in den Kreuzinjektor, wo sie vom ebenfalls spannungsgetriebenen Trennstreckenpufferstrom erfaßt und nach ca. 3 Minuten dem Detektor zugeführt werden. Dieser kann ein UV/VIS-Spektrometer oder aber auch ein MALDI-TOF-Massenspektrometer oder ähnliches sein (Abbildung 3). An dieser Stelle wird auch deutlich, was ein „Lab-on-Chip“ zu leisten vermag, nämlich in der Regel die Probenvorbereitung. Die Analytik erfolgt zwangsläufig nicht miniaturisiert, so daß man nicht irrtümlicherweise davon ausgehen darf, ein Lab-on-Chip-System gestatte die gesamte Kette von Probenvorbereitung bis Analytik auf einem kleinen Objektträger. Dennoch liegen die Vorteile auf der Hand. Die Systeme arbeiten schnell, kommen mit geringsten Probemengen aus und lassen sich automatisiert einsetzen. Dadurch sind sie insbesondere für den Bereich der Hochdurchsatzanalytik attraktiv.

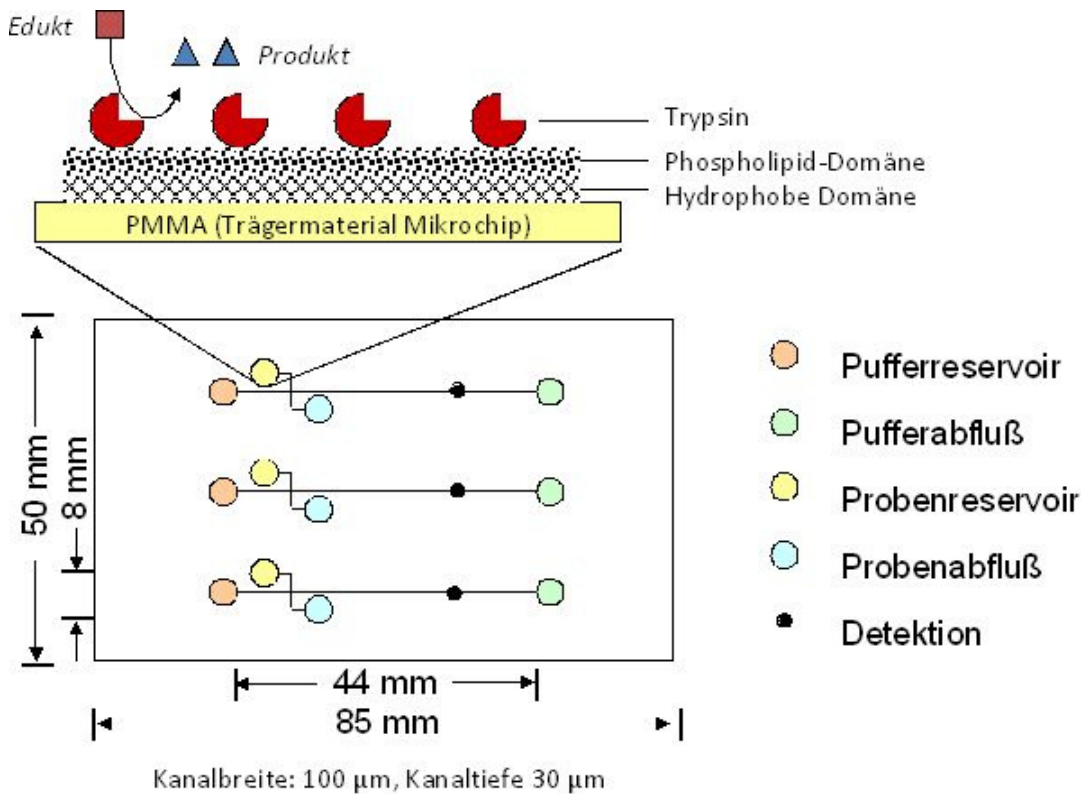


Abbildung 3: Lab-on-Chip zu Peptidanalytik.

### Mikrochipelektrophorese

Nach einem ähnlichen Prinzip wie Mikroenzymreaktoren arbeitet auch die Mikrochipelektrophorese (MCE). Der Aufbau des Chips ist ähnlich, mit dem Unterschied, dass hier der Trennkanal beschichtet sein kann, beispielsweise mit Cyclodextrinsulfat. Ziel ist in diesem Fall die Identifikation dansylierter Aminosäuren, wobei aus der Beschichtung mit dem chiralen Cyclodextrinsulfat der zusätzliche Vorteil erwächst, mit der Trennung der Dansylaminosäuren auch zeitgleich eine Trennung zwischen D- und L-Aminosäuren durchzuführen, was insbesondere zur Bestimmung des D-Aminosäureanteils in biologischen Proben oder pharmazeutischen Wirkstoffen von Interesse sein kann. Vorteile ergeben sich insbesondere aus den extrem kurzen Analysenzeiten von < 1s; selbst komplexe Gemische sind in < 3,5 s getrennt. Damit ergeben sich gerade für die Hochdurchsatzanalytik interessante Perspektiven gegenüber der HPLC (> 1 min.) oder der CE, bei der die Trennzeiten im Bereich 1...60 s liegen.

Besonders attraktiv werden MCE-Systeme durch die Option einer Kopplung mit einem MER wie in Abbildung 4 gezeigt. Der eigentlichen Trennung geht eine biokatalytische Synthese, hier eine exoxidhydrasevermittelte Ringspaltung zum chiralen Diol voraus, so dass dieses System in einem Zug nicht nur das Synthesepotential des gewählten Enzyms bestimmt, sondern auch die Enantiomerenreinheit im Produkt. Damit sind solche MER/MCE-Kopplungen gerade für Hochdurchsatzscreenings interessant.

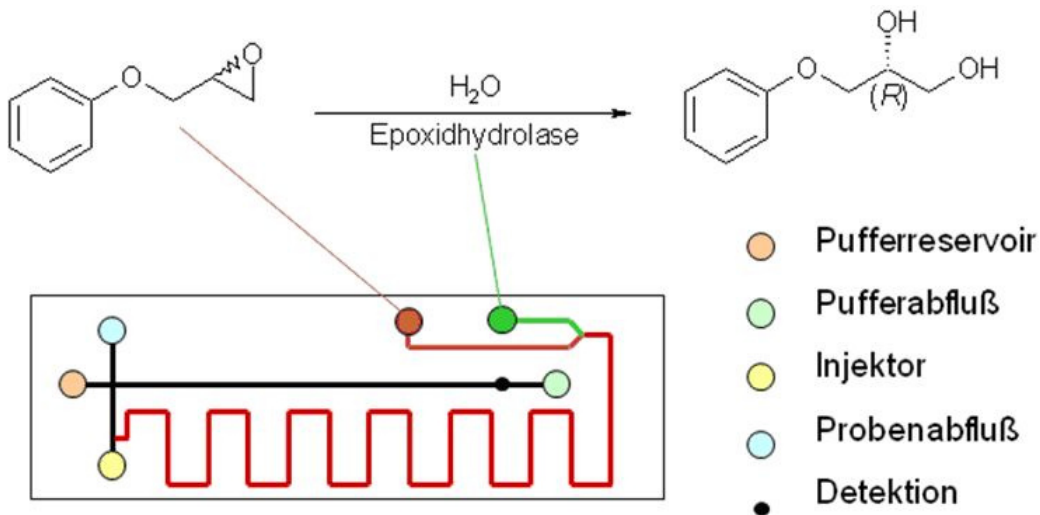


Abbildung 4: Kopplung von Biokatalyse und Analytik.

### Enzym-Membran-Mikroreaktor/Mikromembranchromatographie

Eine Weiterentwicklung der Trenntechnik auf der Lab-on-Chip-Ebene stellt die gekoppelte Enzym-Membran-Mikroreaktor/Mikromembranchromatographie ( $\mu$ EMR/ $\mu$ MC) dar. Sie vereint die enzymatische Peptidspaltung mit einer chromatographischen Auftrennung der Peptidfragmente. Der  $\mu$ EMR entspricht in seiner Funktionsweise einem klassischen Enzym-Membran-Reaktor (EMR) und hat mit diesem die Retention des Enzyms durch eine Teflonmembran gemein. Im Unterschied dazu ist jedoch kein Röhren erforderlich. Die Vorteile ergeben sich aus der schnellen Reaktion und der ausbleibenden mechanischen Beanspruchung des Biokatalysators (Abbildung 5).

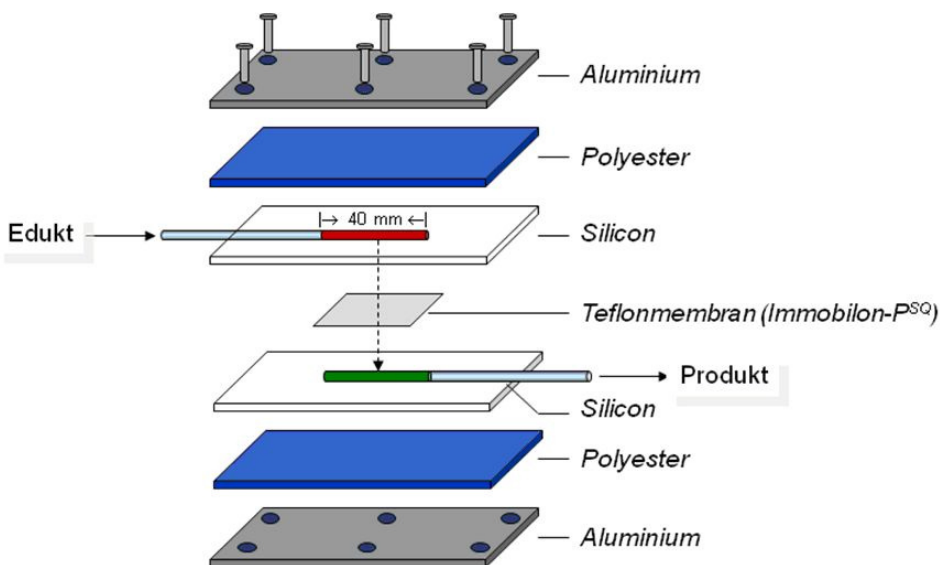


Abbildung 5: Enzym-Membran-Mikroreaktor ( $\mu$ EMR).

Eine Sammelkapillare führt das Reaktionsgemisch schließlich ab und führt es dem  $\mu$ -Membranchromatographen ( $\mu$ MC) zu, bei dem eine doppelte Teflonmembran als stationäre Phase dient und

als mobile Phase ein Elutionsgradient aus Reaktionsmedium und Cosolvens (Abbildung 6).

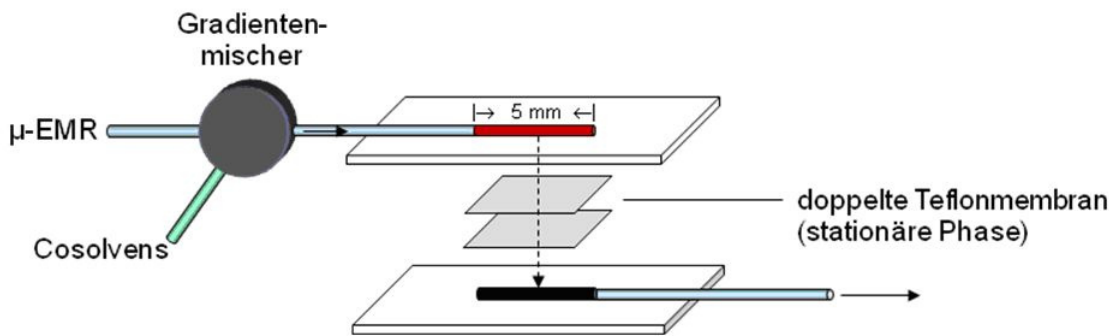


Abbildung 6:  $\mu$ -Membranchromatograph ( $\mu$ MC).

Diese Systeme eignen sich insbesondere zur Peptidanalytik und werden zum Beispiel mit MALDI-TOF-MS gekoppelt.

### Micro-Total-Analysis-Systeme

Auch die Nucleinsäureanalytik profitiert von der Lab-on-Chip-Technologie, und gerade hier wird der in Abbildung 1 dargestellte Vorteil der unidirektionalen Reaktionsführung in unterschiedlich temperierten Reaktionszonen manifest. So sind die für die Nucleinsäureanalytik wichtige Eigenschaften des ‚Scheckkartenlabors‘, die Durchführung aller Teilschritte in einem einzigen Reaktionskanal, das Aufteilen des Reaktionskanals in mehrere Reaktionszonen bei unterschiedlicher Temperatur. Die Analysen werden in sogenannten Micro-Total-Analysis-Systemen ( $\mu$ TAS) durchgeführt und profitieren von der sehr schnellen Wärmeübertragung auf der Mikroskala, die es erlaubt, unterschiedliche Reaktionen sequentiell in einem einzigen Reaktor durchzuführen.

Ein wichtiges Anwendungsfeld in der miniaturisierten Bioanalytik ist die Nucleinsäureanalytik mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Hilfe von  $\mu$ TAS. Im klassischen Ansatz wird die PCR automatisiert in Thermocyclern durchgeführt, in denen 40 Zyklen ca. 90 Minuten benötigen. Kürzere Zeiten lassen sich schlecht realisieren, da die Methode zur Aufspaltung, Anlagerung und Vervielfältigung der DNA Heiz- und Kühlzyklen benötigt. Denn bei allen Teilschritten ist die definierte Reaktionstemperatur entscheidend.

Um schnellere Zykluszeiten zu ermöglichen, müssen Wärmekapazitäten und Volumina so klein wie möglich gehalten werden, und genau dies ist der Ansatz bei  $\mu$ TAS, in denen die einzelnen Reaktionsschritte in einem einzigen Reaktionskanal kontinuierlich bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt werden können. Hier können aufgrund der günstigen Oberflächen/Volumen-Verhältnisse Temperaturänderungen in  $<10$  ms erreicht werden, so dass 40 Zyklen statt bisher 90 Minuten nur noch ca. 5 Minuten benötigen. Realisiert wird dies mittels zweier Strategien, der Continuous-flow-PCR (A) und der Sample-shunting-PCR (B).

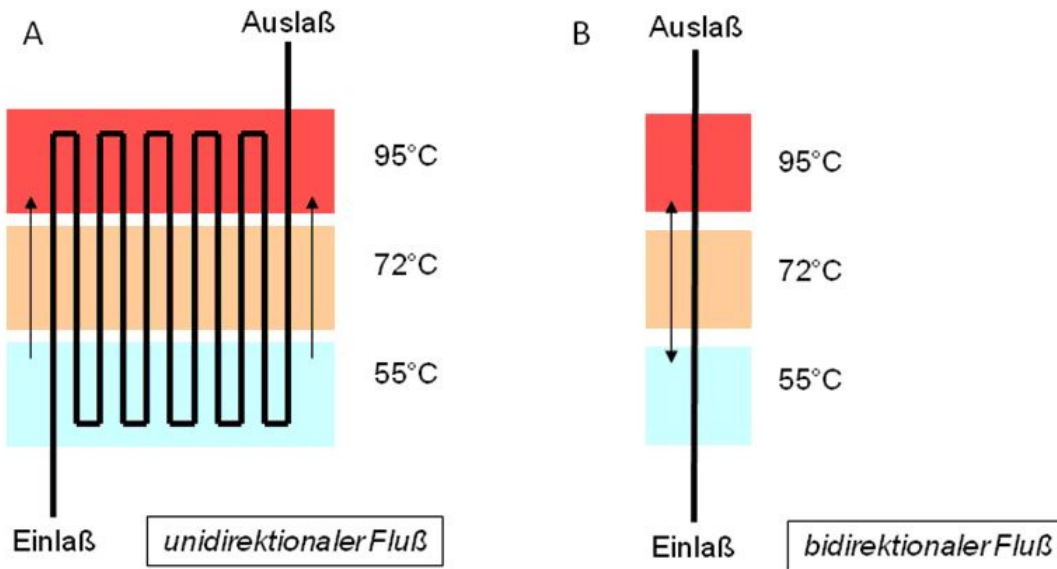


Abbildung 7: Nucleinsäureanalytik in Micro-Total-Analysis-Systemen (µTAS), A: Continuous-flow-PCR, B: Sample-shunting-PCR.

Die Continuous-flow-PCR zeichnet sich durch drei Heizelemente und drei Reaktionszonen aus, die bei jeweils definierter Temperatur im unidirektionalen Fluß betrieben wird. Die Sample-shunting-PCR besitzt ebenfalls drei Heizelemente und drei Reaktionszonen, die jedoch bis zum Reaktionsende bidirektional gefahren werden, bis die gewünschte Amplifizierung erreicht ist.

### Mikro-Immobilised-Enzyme-Reactor

Der Mikro-Immobilised-Enzyme-Reactor (IMER) kann als Weiterentwicklung der MCE aufgefaßt werden. Der IMER arbeitet mit einem im Mikrokanal immobilisierten Enzym und gestattet die Bestimmung von Enzyminhibitoreigenschaften wie  $IC_{50}$  oder  $K_i$ . Hierfür wird der Enzyminhibitor in unterschiedlichen Konzentrationen durch Mikrokanäle geleitet, in denen auch der eigentliche Enzymtest stattfindet. Die Detektion der Reaktionsprodukte erfolgt über UV oder Lab-on-Chip. Damit ersetzt der IMER zeitaufwendige photometrische Bestimmungen (Abbildung 8).

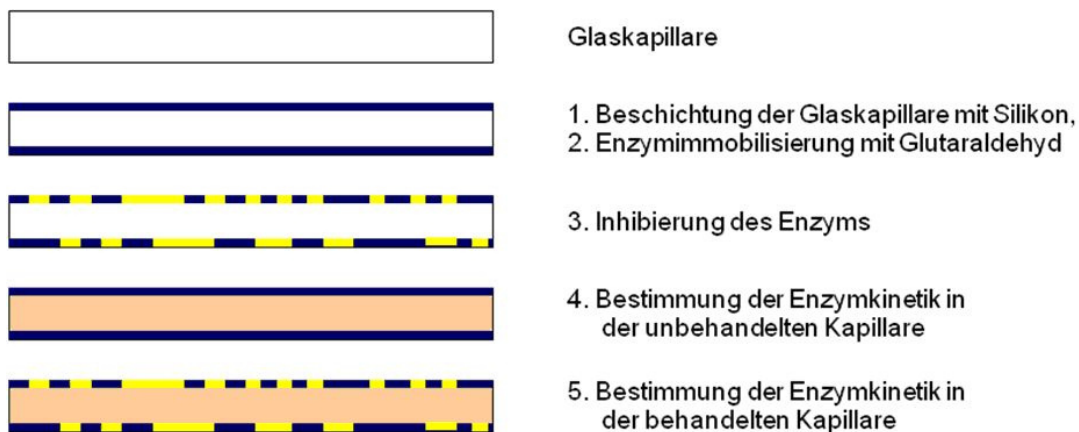


Abbildung 8: Funktionsprinzip des Mikro-Immobilised-Enzyme-Reactors (IMER).

Das IMER-Prinzip lässt sich auch auf die Zellanalytik erweitern, indem statt eines Enzyms die zu untersuchenden Zellen im Mikrokanal immobilisiert werden. Der Assay verläuft vergleichbar, indem über einen definierten Zeitraum eine definierte Menge einer Substanz durch den Mikrokanal geleitet wird und die Zellvitalität über das Entfärben eines Farbstoffes durch vitale Zellen bestimmt wird. Zur Auswertung dienen photometrische Messungen der Farbintensität. Der Vorteil dieses Konzeptes in der Zellanalytik ist, dass durch die Mikroabmessungen (diffusiver Stofftransport) alle Zellen derselben Menge Testsubstanz/Farbstoff exponiert werden.

### Mikrokalorimetrie

Die Mikrokalorimetrie eignet sich für die Analytik von Kleinstvolumina  $\leq 20 \mu\text{L}$  und ist interessant für Thermochemie von Mikrometaboliten. Mit ihren geringen Probevolumina eignet sie sich ideal zur Kopplung mit Lab-on-Chip-Systemen. Ihre untere Detektionsgrenze beträgt  $50 \text{ nW}$ , bei lebenden Zellen beträgt sie  $10 \text{ pW/Zelle}$ . Das Anwendungsspektrum reicht von der Aufklärung biochemischer Stoffwechselwege in Mikroorganismen, enzymkatalysierter Reaktionen oder Prozessen in Biofilmen. Von diesen Anwendungen ist die Enzymchemie für die Kopplung mit Lab-on-Chip-Systemen sicherlich die interessanteste (Abbildung 9).

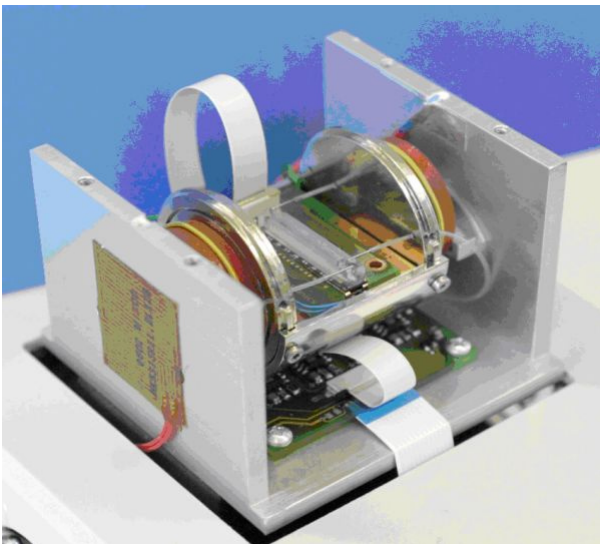


Abbildung 9: Mikrokolorimetrieinheit mit Hochpräzisionsthermostat. Die Temperaturabweichungen betragen  $< 100 \mu\text{K}$  bei einer Temporaturauflösung von  $6 \mu\text{K}$  und Flußraten von  $5\text{...}30 \mu\text{L/min}$ .

Die Präzision der mikrokolorimetrischen Messungen lässt sich leicht an folgenden Beispielen ablesen: Für die Oxidation von Glucose mit Glucoseoxidase wurde mit dem Mikrokolorimeter ein  $\Delta_R H = -209 \text{ KJ/mol}$  gefunden, der Literaturwert beträgt  $-225 \text{ KJ/mol}$ . Ähnlich die Oxidation von Ascorbinsäure mit Ascorbatoxidase, bei der einem gemessenen  $\Delta_R H = -115 \text{ KJ/mol}$  berichtete  $-150 \text{ KJ/mol}$  gegenüberstehen. Die beste Übereinstimmung zeigt die Hydrolyse von Penicillin G, für die

ein  $\Delta_R H = -76 \text{ KJ/mol}$  vs.  $-78 \text{ KJ/mol}$  (Lit.) gefunden wurde.

Auch das Zellwachstum lässt sich untersuchen. Für aerobe Experimente mit *Escherichia coli* DH5a DSM 6897 sowie anaerobe Studien mit *Halomonas halodenitrificans* CCM 286T wurden Abweichungen  $<1\%$  bezogen auf konventionelle Kalorimeter gefunden. Als vorteilhaft erweist sich hier die Möglichkeit, unterschiedliche Wachstumsphasen anhand der Wärmetönung zu differenzieren, was von Bedeutung für Anwendungen in der Biotechnologie (z.B. Diauxie) ist.

### Kombinatorische Chemie

Ein Glanzstück miniaturisierter Analysetechnik, das die vielfältigen Optionen der Lab-on-Chip-Systeme verdeutlicht, ist die Kopplung von kombinatorischer Chemie und Lab-on-the-Chip-Analytik in der automatisierten Hochdurchsatzanalytik. Sie bringt den Vorteil hoher Ausbeuten und Produktreinheiten bei extrem kurzen Durchsatzzeiten.

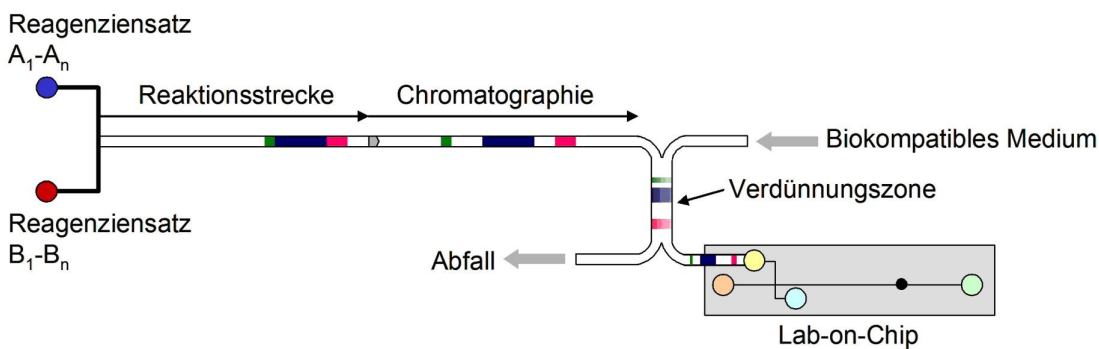


Abbildung 10: Kopplung von kombinatorischer Chemie und Lab-on-the-Chip-Analytik in der automatisierten Hochdurchsatzanalytik.

In diesem Ansatz werden Mikroenzymreaktor (Reaktion), Mikrochipelektrophorese (Chromatographie) und Lab-on-Chip-Analytik vereint, wobei letztere eines der oben beschriebenen Systeme darstellen kann oder einfach zur Probenvorbereitung für die nachfolgende Analytik genutzt werden kann.

### Zusammenfassung

Lab-on-Chip-Systeme weisen reizvolle Perspektiven zur Analytik von Biomolekülen und Zellen auf. Insbesondere durch die Möglichkeit zur Kopplung mit der Mikrokalorimetrie werden diese Systeme zunehmend interessant für Synthese und Analytik, denn sie zeichnen sich durch hohe Selektivitäten, hohe Ausbeuten und kurze Reaktionszeiten aus. Diese Technologie wird die zukünftige Analytik, aber auch Synthese von Biomolekülen erheblich vorantreiben und zeigt ihre Stärken insbesondere in der Kopplung mit Hochdurchsatzsystemen in der kombinatorischen Synthese.

## Literatur

- [1] Auroux, P.-A., Koc, Y., de Mello, A., Manz, A., Day, P.J.R. (2004) Miniaturised nucleic acid analysis. *Lab Chip* **4**, 534-546.
- [2] Auroux, P.-A., Iossifidis, D., Reyes, D.R., Manz, A. (2002) Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications, *Anal. Chem.* **74**, 2637-2652.
- [3] Belder, D., Ludwig, M., Wang, L.-W., Reetz, M.T. (2006) Enantioselektive Katalyse und Analyse auf einem Mikrochip. *Angew. Chem.* **118**, 1-5.
- [4] Belder, D. (2006) Integrating chemical synthesis and analysis on a chip. *Anal. Bioanal. Chem.* **385**, 416-418.
- [5] Bertau, M. (2009) Das Labor in Scheckkartengröße: Synthese, Analyse und Trennung von Biomolekülen. In: Präparative Chemie in Mikroreaktoren. GDCh-Fortbildung 024/09, 07.-08.10.2009, Dresden und darin zitierte Literatur.
- [6] Jiang, Y., Lee, C.S. (2001) On-line coupling of micro-enzyme reactor with micro-membrane chromatography for protein digestion, peptide separation, and protein identification using electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatography A* **924**, 315-322.
- [7] Lerchner, J., Maskow, T., Wolf, G. (2007) Chip calorimetry and its use for biochemical and cell biological investigations. *Chem. Eng. Proc.* **46**, in Druck; DOI: 10.1016/j.cep.02.014
- [8] Lerchner, J., Wolf, A., Wolf, G., Baier, V., Kessler, E., Nietzsche, M., Krügel, M. (2006) A new micro-fluid chip calorimeter for biochemical applications. *Thermochim. Acta* **445**, 144-150.
- [9] Richter, T., Shultz-Lockyear, L.L., Oleschuk, R.D., Bilitewski, U., Harrison, D.J. (2002) Bi-enzymatic and electrocapillary analysis of non-fluorescent compounds in microfluidic devices. Determination of xanthine. *Sens. Act. B* **81**, 369-376.
- [10] Sakai-Kato, K., Kato, M., Ishihara, K., Toyooka, T. (2004) An enzyme-immobilization method for integration of bifunctions on a microchip using a water-soluble amphiphilic phospholipid polymer having a reacting group. *Lab Chip* **4**, 4-6.
- [11] Tmej, F., Limbergova, Z., Hasal, P. (2005) Modelling and optimisation of enzymatic separating micro-reactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **28**, 123-130.