

Mikrofluidikchip zur gel-freien Trennung von DNA nach Länge und Konformation

Jan Regtmeier

Experimentelle Biophysik & Angewandte Nanowissenschaften, Fakultät für Physik, Universität Bielefeld, Universitätsstr. 25, 33615 Bielefeld

Zusammenfassung

Ziel in der Analytik ist es, sehr geringe Probenvolumina innerhalb kürzester Zeit mit höchster Auflösung zu geringen Kosten zu analysieren. Was nach einem Wunschtraum klingt, könnte in absehbarer Zeit durch die Mikrofluidik Realität werden. Am Beispiel der Trennung von DNA nach Länge und Konformation, möchte ich zeigen, dass ein Probenvolumen von ca. 60 pL (10^{-15} L) genügt, um mit einer Analysezeit von weniger als 4 Minuten verlässliche Aussagen über die Probenzusammensetzung und deren räumliche Konformation zu treffen.

Als Plattform dient ein Kunststoffmikrofluidikchip, der mit einem Array von Pfosten mikrostrukturiert ist. Unter Anlegen einer elektrischen Spannung erzeugen diese nichtleitenden Pfosten ein inhomogenes elektrisches Feld. Gleichzeitig induziert das elektrische Feld einen Dipol im DNA Molekül, der mit dem inhomogenen Feld wechselwirkt, ein Effekt namens Dielektrophorese. Diese markierungsfreie, nicht-invasive und zerstörungsfreie Methode erlaubt das Fangen von DNA und das Trennen nach Länge und Konformation [1, 2].

1. Einleitung

Mikrofluidik ist die Wissenschaft und Technologie von Systemen, die kleinste Flüssigkeitsmengen prozessieren und manipulieren können (typischerweise nano- bis atto-Liter) [3]. Dazu werden auf einem Mikrochip integrierte Kanäle und Kanalsysteme mit Dimensionen von Mikro- und Nanometern genutzt. Insbesondere der Wunsch nach einer immer höheren Auflösung und Sensitivität gepaart mit dem Druck, Analysen schneller und kostengünstiger durchzuführen, haben die Mikrofluidik vorangetrieben [4, 5, 6, 7, 8, 9, 10]. Ein Thema seit Beginn der Mikrofluidik ist die schnelle Trennung von DNA. Die Standardmethode ist derzeit die Plattengel- bzw. Kapillargelelektrophorese [11, 12, 13]. Obwohl es sich bei letzterer bereits um eine miniaturisierte Variante der klassischen Plattengelelektrophorese handelt, dauert eine Trennung immer noch ca. 30 min und die Handhabung von DNA Fragmenten von mehr als 15000 bis 20000 Basenpaaren (Bp) ist schwierig. Für eine Probenanalyse wird ein Volumen von ca. 1 μ L benötigt. Ziel dieses Beitrags ist die Vorstellung eines Mikrofluidikchips, der DNA sowohl nach Länge als auch nach Konformation (linear und superspiralisiert) trennt und dieses innerhalb von weniger als 4 Minuten mit einem effektiv analysierten Volumen von 60 pL ($60 \cdot 10^{-15}$ L).

2. Idee

Die Idee des hier vorgestellten Mikrofluidikchips basiert auf der Nutzung der Dielektrophorese. Dabei ist die Erzeugung eines inhomogenen elektrischen Feldes von zentraler Bedeutung. Im Gegensatz zu konventionellen Verfahren, in denen dies mittels Mikroelektroden geschieht (Abbildung 1a), ist unser Ansatz elektrodenlos mittels nicht-leitender Hindernisse (Abbildung 1b). Der Name ist insoweit irreführend, als dass Elektroden benötigt werden, um ein elektrisches Feld anzulegen. Allerdings befinden sich bei der elektrodenlosen Variante die Elektroden nur an den Enden des Mikrofluidikchips und nicht im Analysebereich.

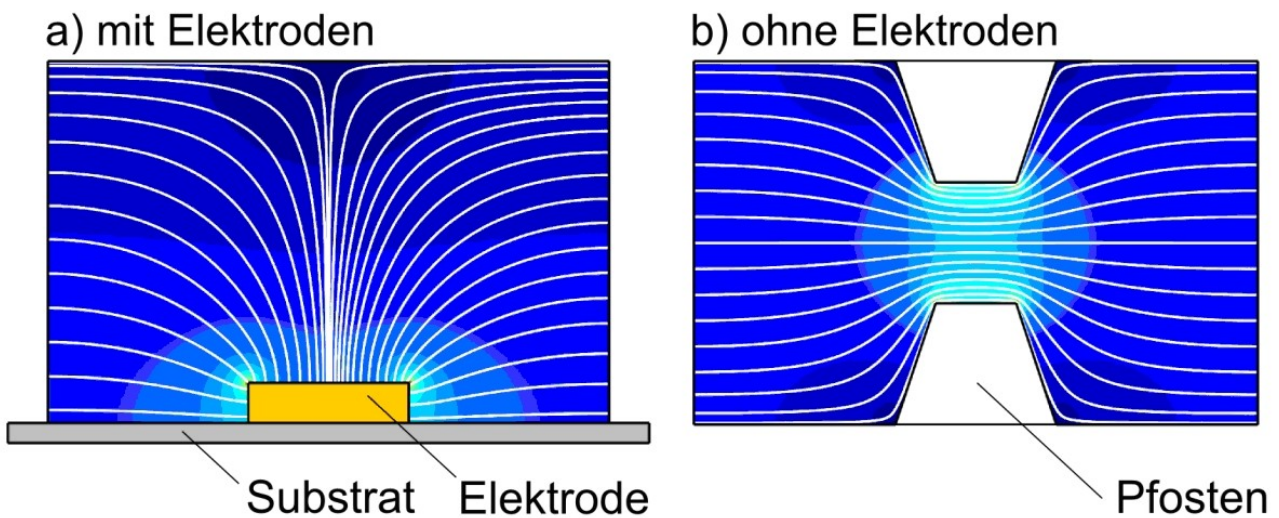


Abbildung 1: Erzeugung inhomogener elektrischer Felder mittels a) Mikroelektroden und b) nicht-leitender Pforten.

Die nicht-leitenden Pforten deformieren das elektrische Feld und erzeugen somit Gradienten. Gleichzeitig induziert das angelegte elektrische Feld einen Dipol im DNA Molekül. Der genaue Mechanismus ist leider bislang unverstanden [14, 15]. Eine derzeit diskutierte mögliche Vorstellung ist in Abbildung 2 gezeigt. Das DNA Rückgrat ist negativ geladen und akkumuliert entsprechend positive Gegenladungen in wässriger Lösung (Puffer). Diese Gegenionen werden nun durch das angelegte elektrische Feld verschoben und somit wird ein Dipol induziert [1, 14].

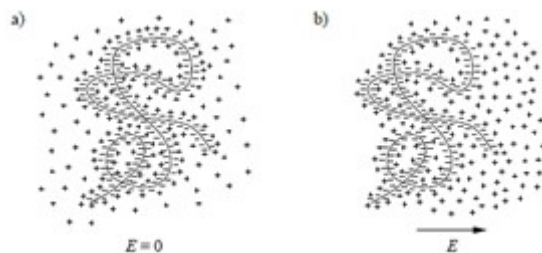


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Verhaltens der Ionenwolke eines DNA Fragments a) ohne elektrisches Feld und b) mit elektrischem Feld. In b) ist die Ionenwolke gegen das DNA Molekül verschoben und somit ein Dipol induziert.

Dieser Dipol wechselwirkt mit dem inhomogenen elektrischen Feld und wird dadurch einer dielektrophoretischen Kraft unterworfen:

$$\vec{F} = \alpha \nabla \vec{E}^2 \text{ (Gl. 1)}$$

Dabei ist α die Polarisierbarkeit, E das elektrische Feld und F die dielektrophoretische Kraft. Hieran sieht man deutlich, dass homogene elektrische Felder keine dielektrophoretische Kraft ausüben. Eine Möglichkeit zur Erzeugung dielektrophoretischer Kräfte ist in Abbildung 3 gezeigt. Unter Anlegen einer Wechselspannung (AC) ist es möglich, DNA in einem Array von nicht-leitenden Pfosten zu fangen.

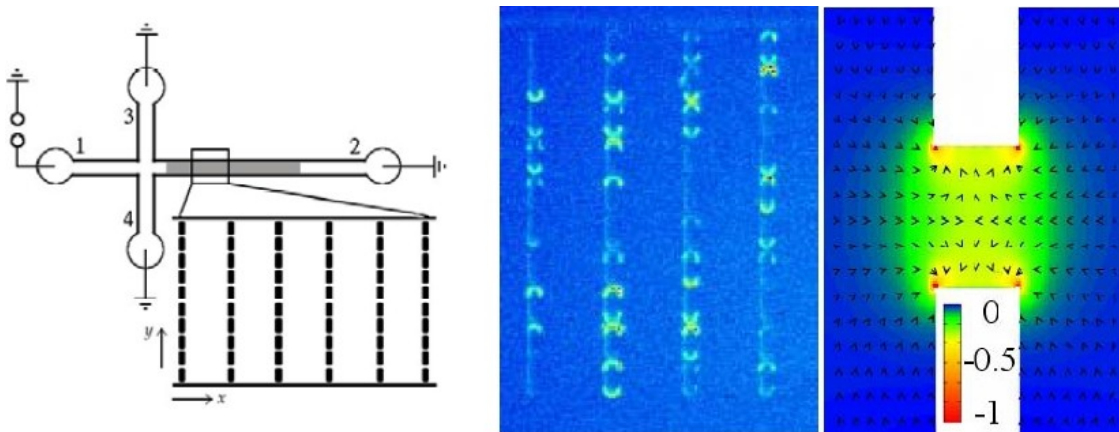


Abbildung 3: Layout des Mikrofluidikchips. Die eingenommene Grundfläche beträgt 12 mal 8 mm². Der grau schattierte Bereich zeigt den mikrostrukturierten Bereich an. Wie in der Vergrößerung zu sehen, befinden sich dort periodisch angeordnete Reihen von Pfosten (insgesamt 180 Reihen; Pfostengröße 7 mal 2 µm²; Abstand zwischen den Pfosten 2 µm, Periodizität der Reihen 19 µm, Kanalhöhe 6 µm). Im mittleren Bild ist eine Fluoreszenzaufnahme im Bereich des Pfostenarrays gezeigt (da die Pfosten nicht fluoreszieren, sind diese kaum zu erkennen). Die gelb/grünlichen Halbkreise bzw. X-förmigen Strukturen sind einzelne respektive zwei DNA Moleküle (164 kbp), die zwischen zwei Pfosten gefangen sind. Die angelegte Wechselspannung (AC) beträgt 300 V bei 60 Hz. Rechts ist die numerische Simulation des dielektrophoretischen Potentials (farbkodiert) und die Richtung der dielektrophoretischen Kraft gezeigt (Pfeile). Die weißen Flächen repräsentieren die nicht-leitenden Pfosten.

Allerdings führt dieses Fangen allein noch nicht zu einer Trennung. Es sind zwei weitere wesentliche Elemente notwendig. Erstens gilt es noch zu zeigen, dass verschiedene DNA Moleküle unterschiedliche Polarisierbarkeiten (α) aufweisen, da ansonsten kein Selektionskriterium zur Verfügung steht. Zum zweiten ist für die selektive Trennung noch ein Transport der DNA durch das Pfostenarray notwendig. Dazu muss der anlegten AC Spannung, die das Fangen der DNA kontrolliert, eine Gleichspannung (DC) überlagert werden.

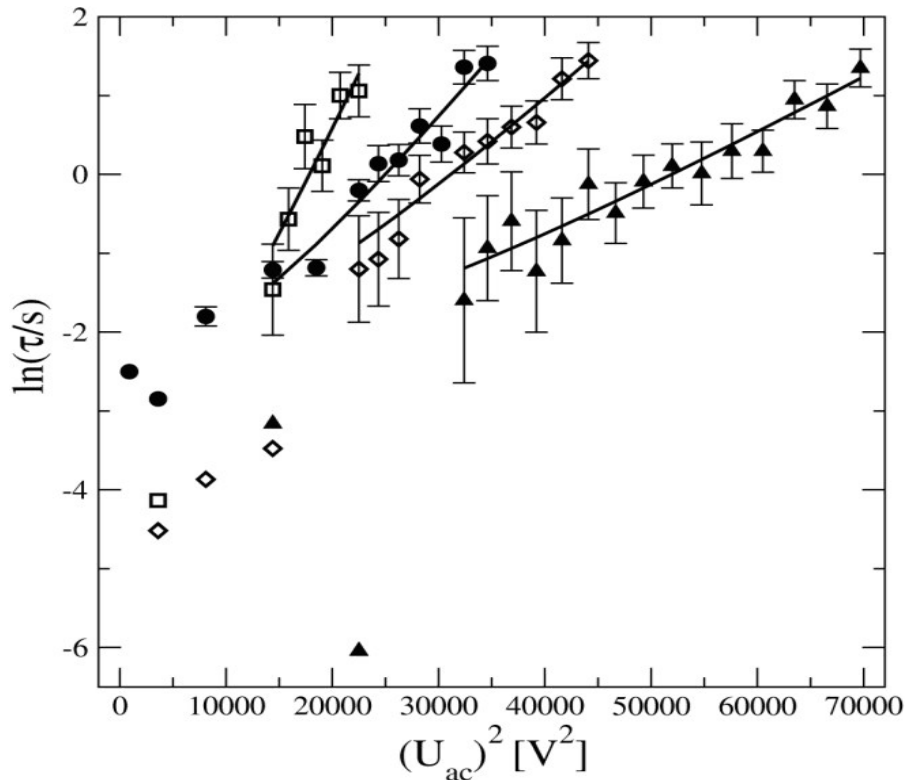


Abbildung 4: Mittlere Entweichzeit der DNA Moleküle aus der dielektrophoretischen Falle für verschiedene AC Spannungen. Aus der Steigung der Graphen kann die Polarisierbarkeit berechnet werden (von links nach rechts 164 kbp, 48,5 kbp, 12 kbp und 6 kbp) [1].

Lineare DNA (kbp)	α (10^{-29} Fm ²)	ccc DNA (kbp)	α (10^{-29} Fm ²)
6	1.5 ± 0.1	7	0.5 ± 0.1
12	2.5 ± 0.2	10.3	1.7 ± 0.2
12.2	2.8 ± 0.6	12.2	2.3 ± 0.7
48.5	3.3 ± 0.3	15.5	2.8 ± 0.1
164	5.8 ± 0.5	21	2.9 ± 0.2

Tabelle 1: Experimentell bestimmte Polarisierbarkeiten für lineare und superspiralisierte DNA [2].

Da die wissenschaftliche Literatur zum Teil widersprüchliche Werte bezüglich der Polarisierbarkeit von DNA liefert, haben wir zuerst die Polarisierbarkeiten verschiedener DNA Fragmente mittels einer eigens entwickelten Methode quantitativ bestimmt [1, 2]. Da dieses Verfahren dem Trennverfahren sehr ähnlich ist, lassen sich die Erkenntnisse sehr gut übertragen. Zur Bestimmung der Polarisierbarkeit wird die Zeit gemessen, die einzelne DNA Moleküle in einer dielektrophoretischen Falle für verschiedene AC Spannungen verbringen, bevor sie mittels Diffusion entkommen (siehe Abbildung 4). Aus den Steigungen dieser Darstellung kann man die Polarisierbarkeit bestimmen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Es ist deutlich zu erkennen, dass größere

lineare DNA Fragmente eine höhere Polarisierbarkeit aufweisen als kleinere. Dies lässt sich nun wie folgt für die Trennung nutzen: Es wird eine konstante DC Spannung an das Pfostenarray angelegt, so dass die DNA Mischung, bestehend aus zwei verschiedenen langen DNA Fragmenten, durch das Array mittels Elektrophorese transportiert wird. Dieser DC Spannung wird nun eine AC Spannung überlagert und zwar so, dass für die eine DNA Spezies die dielektrophoretische Kraft stärker ist als die elektrophoretische Kraft, das heißt, die DNA wird gefangen. Gleichzeitig muss aber gewährleistet sein, dass für die zweite DNA Spezies die Elektrophorese überwiegt, so dass die DNA durch das Array transportiert wird.

3. Methoden

Die Herstellung der Kunststoffchips basiert auf der Softlithographie [16]. Dabei wird ein strukturierter Siliziumwafer mittels eines Kunststoffes, zumeist wie auch hier Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) abgeformt, das heißt der flüssige Kunststoff wird über den Wafer gegossen und ausgehärtet (siehe Abbildung 5). Dann wird das PDMS abgezogen, zugeschnitten und mit der strukturierten Seite nach unten auf ein Deckglas aufgelegt. Der Vorteil liegt darin, dass neue Prototypen kostengünstig und schnell hergestellt werden können und nur für die Herstellung des Masterwafers ein Reinraum notwendig ist. PDMS ist ein günstiges Elastomer, das transparent und biokompatibel ist. Da es allerdings hydrophob ist, wird es zumeist durch Sauerstoffplasma hydrophilisiert.

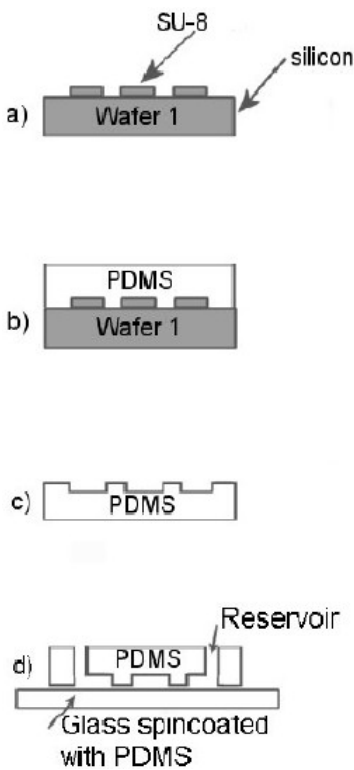


Abbildung 5: Verfahren zur Herstellung der Poly(dimethylsiloxan) Mikrofluidikchips. a) Mikrostrukturierung eines Siliziumwafers mittels des Photolacks SU8 und Kontaktphotolithographie. b) Ausgießen und Aushärten des Wafers mit PDMS. c) Abziehen und Zuschneiden des PDMS. d) Aufbringen des PDMS auf einen Glasobjektträger.

Abbildung 3 zeigt das Layout des Mikrofluidikchips. Die gekreuzten Kanäle dienen allein der gezielten und kontrollierten Injektion von definierten Probenvolumina mittels pinched injection. Um die DNA visuell verfolgen zu können, ist diese mit dem Farbstoff YOYO-1 markiert. Dieser interkaliert zwischen die einzelnen Basenpaare und erhöht dabei seine Quanteneffizienz um ca. 3 Größenordnungen, das heißt, freies YOYO-1 ist kaum sichtbar. Diese Fluoreszenzmarkierung ist einzig für die visuelle Kontrolle notwendig und nicht für die eigentliche dielektrophoretische Trennung.

4. Ergebnisse & Diskussion

Ziel dieser Forschungs- und Entwicklungsarbeit ist der proof-of-concept, dass sich Dielektrophorese eignet, um DNA schnell und effizient auf einem Mikrofluidikchip zu trennen. Wie in Abschnitt 2 beschrieben, basiert die Idee auf der geeigneten Kombination von AC und DC Spannungen, so dass eine DNA Sorte selektiv gefangen und die andere weiter transportiert wird. Dass dies prinzipiell möglich ist, demonstriert Abbildung 6a. Dort ist die Trennung von sehr langen DNA Fragmenten (48.5 kbp und 164 kbp) innerhalb von weniger als 4 min gezeigt. Die 164 kbp DNA ist direkt nach der Injektion in das Pfostenarray gefangen worden. Die 48.5 kbp DNA dagegen ist bis zum Ende des Arrays weitergewandert. Interessant ist ein Vergleich der erzielten Trennzeit zur Standardtechnik der gepulsten Gelelektrophorese, die zur Trennung solch langer Fragmente notwendig ist: diese hat 24 h gedauert.

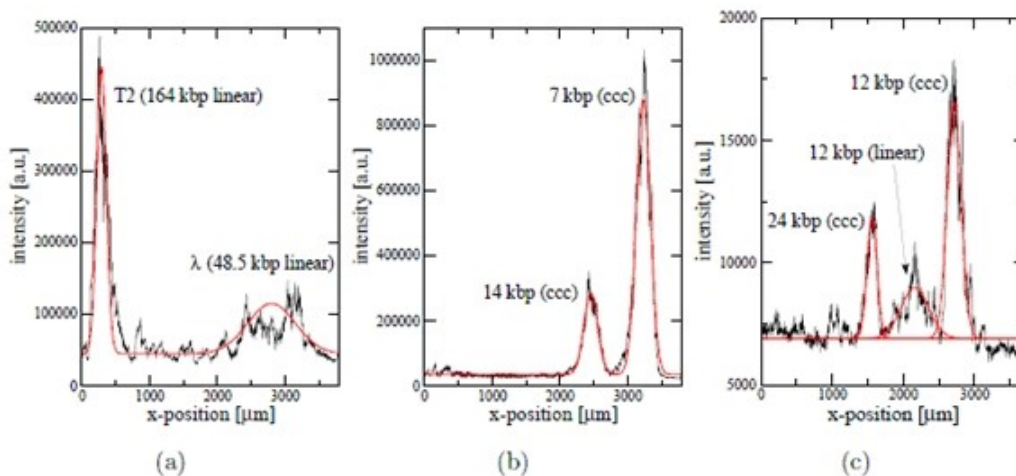


Abbildung 6: Ergebnisse der DNA Trennung. Gezeigt ist jeweils ein Fluoreszenzscan entlang des mikrostrukturierten Kanalbereichs (x-Achse). Alle Trennungen dauerten weniger als 4 Minuten bei AC Spannungen von bis zu 360 V AC bei 60 Hz überlagert mit einer 12 V DC Spannung. Die DNA Konzentrationen betragen ca. 20 pM. a) Trennung linearer DNA. b) Trennung superspiralisierter (ccc, covalently closed circular) DNA. c) Trennung von 12 kbp linearer DNA von 12 kbp superspiralisierter DNA (und dem 24 kbp ccc Dimer der 12 kbp ccc DNA) [1, 2].

Dass sich mit der vorgestellten Methode auch kürzere DNA Fragmente schnell trennen lassen, demonstriert Abbildung 6b. Dort ist die Trennung superspiralisierter DNA (7 und 14 kbp) gezeigt. Superspiralisierte DNA kommt sehr oft in Bakterien vor und ähnelt einem verdrehten Telefonkabel. Die DNA ist in sich verwunden und zu einem geschlossenen Kreis verknüpft. Diese Trennung benötigt ebenfalls weniger als 4 min, eine deutliche Verbesserung im Vergleich zur Kapillargelelektrophoreses mit 30 min. Da unsere Methode sowohl lineare als auch superspiralisierte DNA zu trennen vermag, kam die Frage auf, ob sich auch DNA Fragmente mit identischer Anzahl an Basenpaaren aber unterschiedlicher Konformation (linear gegenüber superspiralisiert) mit dieser neuen Methode trennen lassen. Der proof-of-principle ist in Abbildung 6c gezeigt. Dort ist lineare 12 kbp DNA von 12 kbp superspiralisierten DNA getrennt. Die gezeigten Trennungen sind alle in sehr guter Übereinstimmung mit den zuvor bestimmten Polarisierbarkeiten (Tabelle 1).

5. Zusammenfassung & Ausblick

Die Mikrofluidik erlaubt die Analyse kleinster Volumina innerhalb sehr kurzer Zeit. Beispielhaft wurde hier die Trennung von DNA in einem mikrostrukturierten Pfostenarray nach Länge und Konformation innerhalb von weniger als 4 Minuten gezeigt. Dabei wurde ein 60 pL Volumen mit einer DNA Konzentration von 20 pM analysiert, das heißt, es handelt sich um eine echte Einzelmolekültechnik. Für die Zukunft sehen wir sogenannte kontinuierliche Trennverfahren als sehr vielversprechend. Dabei wird nicht wie bislang ein definiertes Volumen injiziert und analysiert, sondern die Probe kontinuierlich zugeführt. Dies erlaubt deutliche Fortschritte für die präparative Analytik und ermöglicht die Einstellung und Optimierung von Parametern in Echtzeit während des laufenden Experiments. Zudem könnte die weitere Verkleinerung der Chips dazu führen, dass auch Proteine mittels Dielektrophorese getrennt und analysiert werden könnten.

Danksagung

Die diesem Beitrag zugrunde liegenden Forschungsarbeiten wurden im Rahmen einer sehr erfolgreichen Kooperation im Rahmen des Sonderforschungsbereich 613 (finanziert durch die DFG) erzielt. Daher danke ich Prof. Anselmetti für seine langjährige Unterstützung und Förderung, Herrn Bogunovic und Herrn Duong für die sehr gute Zusammenarbeit, Alexandra Ros für ihr Mitwirken und Prof. Eichhorn für die langjährige erfolgreiche Kooperation.

Literatur

- [1] J. Regtmeier, T. T. Duong, R. Eichhorn, D. Anselmetti, A. Ros, *Anal. Chem.* 2007, **79**, 3925–3932.
- [2] J. Regtmeier, R. Eichhorn, L. Bogunovic, A. Ros, D. Anselmetti, *Anal. Chem.* 2010, **82**, 7141–7149.
- [3] G. M. Whitesides, *Nature* 2006, **442**(7101), 368–373, doi: 10.1038/nature05058.
- [4] D. Reyes, D. Iossifidis, P. Aurox, A. Manz, *Anal. Chem.* 2002, **74**, 2623–2636.
- [5] P. Aurox, D. Iossifidis, D. Reyes, A. Manz, *Anal. Chem.* 2002, **74**, 2637–2652.
- [6] T. Vilkner, D. Janasek, A. Manz, *Anal. Chem.* 2004, **76**, 3373–3386.
- [7] P. Dittrich, K. Tachikawa, A. Manz, *Anal. Chem.* 2006, **78**, 3887–3908, doi: 10.1021/ac0605602.
- [8] J. West, M. Becker, S. Tombrink, A. Manz, *Anal. Chem.* 2008, **80**(12), 4403–4419, doi: 10.1021/ac800680j.
- [9] A. Arora, G. Simone, G. B. Salieb-Beugelaar, J. T. Kim, A. Manz, *Anal. Chem.* 2010, **82**(12), 4830–4847, doi: 10.1021/ac100969k.
- [10] L. Y. Yeo, H.-C. Chang, P. P. Y. Chan, J. R. Friend, *Small* 2010, doi: 10.1002/smll.201000946.
- [11] J. Tegenfeldt, C. Prinz, H. Cao, R. Huang, R. Austin, S. Chou, E. Cox, J. Sturm, *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, **378**, 1678.
- [12] S. Kuhn, *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*, Springer, 1993.
- [13] J. Viovy, *Rev. Mod. Phys.* 2000, **72**, 813–872.
- [14] D. Porschke, *J. Biophys. Chem.* 1997, **66**, 241–257.
- [15] R. Hölzel, *IET Nanobiotechnol.* 2009, **3**, 28–45.
- [16] Y. Xia, G. Whitesides, *Annu. Rev. Mater. Sci.* 1998, **28**, 153–184.
- [17] H. Pohl, *Dielectrophoresis: The Behavior of Neutral Matter in Nonuniform Electric Fields*, Cambridge University Press, 1978.