

Technical University of Denmark



Fleksible mikrobioreaktorer med funktionelle, magnetiske partikler

Hebøll-Nielsen, A.; Hobbey, Timothy John; Krühne, Ulrich

Published in:
Dansk Kemi

Publication date:
2006

Document Version
Også kaldet Forlagets PDF

[Link back to DTU Orbit](#)

Citation (APA):

Hebøll-Nielsen, A., Hobbey, T. J., & Krühne, U. (2006). Fleksible mikrobioreaktorer med funktionelle, magnetiske partikler. Dansk Kemi, 12, 32-34.

DTU Library

Technical Information Center of Denmark

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Fleksible mikrobioreaktorer med funktionelle, magnetiske partikler

I den bioteknologiske forskning kan man anvende magnetiske adsorbentpartikler til at adskille ønskede komponenter i en væske fra uønskede

Af Anders Heeboll-Nielsen¹, Timothy J. Hobley², Ulrich Krühne¹

¹Center for Mikroteknologi og Overfladeanalyse, Teknologisk Institut, ²Center for Mikrobiel Bioteknologi, BioCentrum-DTU, DTU

Inden for bioteknologisk forskning benyttes magnetiske adsorbentpartikler som et effektivt værktøj til at adskille ønskede komponenter i en væske fra uønskede. Der findes et stort antal kommercielt tilgængelige partikler, som typisk er 0,5-5 µm diameter med en kerne af magnetisk jernoxid, på hvis overflade er hæftet ligandmolekyler, der selektivt kan binde til markører på celleoverflader [1]. Således kan man med magnetiske partikler lynhurtigt fjerne eksempelvis monocytter fra blod ved at iblande en blodprøve partikler med påhæftede antistoffer mod cellemarkøren CD14. Monocytterne vil straks binde sig til partiklerne, da CD14-molekyler på cellerne tiltrækkes af anti-CD14-antistoffer på partiklerne. Herefter kan man indsamle de magnetiske partikler på siden af reagensglasset med en magnet og fjerne det resterende blod, som kan erstattes med et vækstmedium, hvor man nu kun har de ønskede monocytter. Med magnetiske adsorbentpartikler opnår man et værktøj, hvor magnetiske kræfter tjener som et håndtag til at håndtere partiklerne, og hvor en passende ligand er et håndtag til at håndtere celler. Her vil vi demonstrere, hvordan man kan udnytte den dobbelte selektivitet, magnetiske adsorbentpartikler tilbyder, i fremstillingen af fleksible mikrobioreaktorer.

Det idémæssige udgangspunkt for vores arbejde med magnetisk baserede mikrobioreaktorer findes i de muligheder for at guide og kontrollere magnetiske kræfter, der kan opnås med principper fra såkaldt *high-gradient magnetic separation* (HGMS). Når en jerntråd anbringes i et magnetfelt, vil den blive magnetiseret, og magnetiseringen vil bevirke, at der skabes store feltgradienter. De skabte feltgradienter vil dernæst skabe meget store, magnetiske kræfter rettet mod jerntråden, som derfor kan bruges som bestanddel i et filter for magnetiske partikler. Dette separationsprincip betegnes HGMS og udnyttes blandt andet i industriel skala til at fjerne uønskede forureninger fra leropslemninger.

Desuden har der de seneste år været forsket målrettet i anvendelse af HGMS i nye bioprocess-initiativer [2,3]. Ved at overføre HGMS-principperne til et mikrofluidt system kan vi skabe fysisk afgrænsede områder med magnetiske kræfter i et omgivende område, hvor der ellers ikke er magnetiske kræfter. Når de afgrænsede områder med tiltrækkende kræfter benyttes som

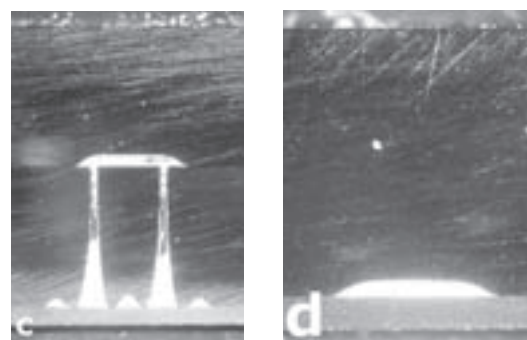
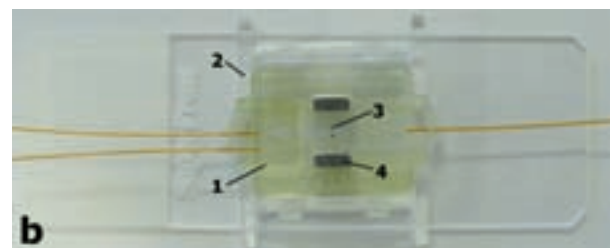
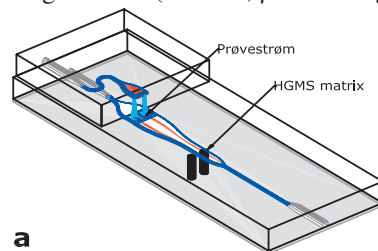
indsamlingspunkter for magnetiske adsorbentpartikler med funktionelle ligander, kan man via liganderne fastholde celler i systemet. Et fornuftigt design af kanaler i det mikrofluidt system gør det nu muligt at udsætte de fastholdte celler for nye betingelser, hvorefter man kan undersøge effekten på cellerne.

Designovervejelser i mikroskala

Når væsker flyder i gennem meget små kanaler (i denne sammenhæng definerer vi mikrokanaler som kanaler, hvis mindste dimension, D , er <1 mm), er der ét særligt fremtrædende træk, som er vigtigt, når man designer mikrosystemer. Ved at betragte væskestrømmens Reynoldstal

$$Re = \frac{v \cdot \rho \cdot D}{\eta}$$

ses, at i mikrokanaler vil Reynoldstallet altid være mindre end 1000, så strømmen vil være laminar. Denne betragtning gælder for væsker, der ligner vand (densitet, $\rho = 1000 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$, visko-



Figur 1 (a). Design af sheath flow mikrofluidt system, som viser to røde prøvestrømme mellem tre hvide bærestømme. (b) færdigt mikrofluidt HGMS-system (1) i en holder (2) med to HGMS-elementer (3) og to magneter (4), tværsnit af sheath flow mikrofluidt system som viser (c) kanaler til bærestømmene og (d) reaktionskammeret, hvor magnetiske partikler indfanges. Tværsnitsarealet af den midterste bærestrøm er $2,5 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2$ og de yderste $1,6 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2$. Dybden af reaktionskammeret er $100 \text{ }\mu\text{m}$.

4916 3388
CLAUS DAMM
 Udstyr til:
 * steril produktion
 * bioteknologi
 * forskning
 www.clausdamm.dk

sitet, $\eta = 0,001 \text{ Pa}\cdot\text{s}$), og selv ved høje, lineære strømnings-hastigheder (en typisk værdi er $v \sim 10 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$). Det medfører, at opblanding af adskilte strømme kun vil ske ved diffusion. Dette fænomen udnytter vi i et princip kendt som *sheath flow*, som vist i figur 1a. I dette design introduceres to prøvestrømme (vist i rød farve) mellem tre bærestømme (vist som hvide), der holder de to prøvestrømme adskilt samt væk fra kammerets vægge. Ved at kontrollere tværsnitsarealet af kanalerne for de tre bærestømme kan de to prøvestrømme dirigeres og placeres i reaktionskammeret, hvor de største, magnetiske kræfter findes, så indfangning af magnetiske partikler bliver mest effektiv. I det simple design i figur 1a er de to prøvestrømme (kemisk) ens. Men med blot små ændringer er det muligt at arbejde med to forskellige prøvestrømme, så parallelle forsøg kan udføres.

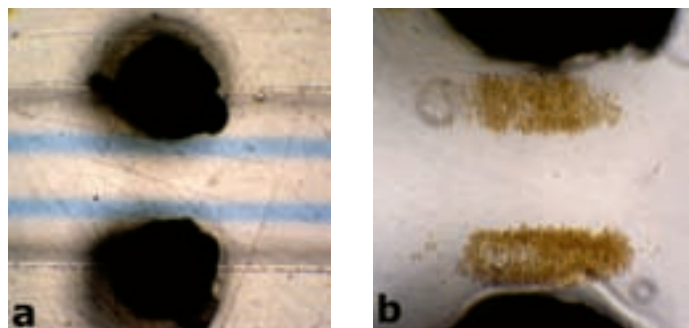
Fremstilling af mikrofluide systemer ved laserbearbejdning

Mikroteknologiske metoder har været anvendt i årtier til at frembringe siliciumbaserede, integrerede kredsløb til brug i computere, og fremgangsmåderne, som anvendes til fremstilling af mikrochips, kan benyttes til at udarbejde kanalstrukturer i mikrofluide systemer. Metoderne er dog omstændige og stiller omfattende krav til produktionsfaciliteter. I modsætning hertil kan mikrokanaler fremstilles i polymere substrater under anvendelse af en række teknologier, f.eks. ved udskæring af kanalerne med lasere. På Center for Mikroteknologi og Overfladeanalyse har vi netop valgt at fokusere på laserbearbejdning som en mere fleksibel metode til fremstilling af mikrostrukturer. Vi råder nu over en instrumentpark med adskillige lasertyper, der hver især er egnet til forskellige opgavetyper. Vores simpleste laser er en CO_2 -laser, som er skabt til at indgrave forskellige materialer (fra plast til metal, www.synrad.com). Med en opløsning på 1000 dpi og en strålestørrelse på 290 μm minder laserens ydelse om en almindelig printers, og disse karakteristika er tilstrækkelige til at udskære kanaler med en bredde på ned til 200 μm . Laseren arbejder med infrarødt lys af en bølglængde på 10,6 μm , som er særlig velegnet til at bearbejde polymethylmethacrylat (PMMA, også kendt som plexiglas), da dette materiale ved tilstrækkelig opvarmning først smelter og siden dekomponerer som monomerer [4]. Med denne egenskab vil materiale fra udskårne strukturer således synes at forsvinde ved bearbejdningen. CO_2 -laseren kan læse forskellige vektorgrafikformater, hvorfor design af mikrofluide systemer simpelt kan udføres i CAD- eller andre, avancerede tegneprogrammer. Kombinationen af at anvende standardiserede værktøjer til design og laserens høje bearbejdningshastighed bevirker, at tiden fra idé til mikrofluidt system ofte er kortere end én dag.

Den store udfordring, det er at hæfte et låg på et substrat med mikrokanaler, tackles ved at svejse låget på med infrarødt laserlys af en lavere bølglængde (808 nm), end den CO_2 -laseren bruger, og som hverken absorberes af substratet eller lågets materiale. Ved forud for bearbejdning med CO_2 -laseren at påføre PMMA-substratet et farvestof, ClearWeld (Gentex Corp., Carbondale, PA, USA), som absorberer laserlyset, vil belysning med svejse-laseren gennem det gennemsigtige substrat medføre, at både PMMA og låg smelter og blandes, hvorefter afkøling vil medføre en stærk sammenføjning [5]. Med en diodelaser (Fisba Optik AG, St. Gallen, Schweiz) sikrer man sig en meget hurtig opvarmning via det absorberende farvestof, så de to materialer kun smelter i en meget begrænset dybde fra overfladen, som netop er tilstrækkelig til sammenføjning. Herved undgår man, at kanalerne bliver blokeret, hvilket utvivlsomt ville finde sted, hvis lim blev benyttet.

Karakterisering af det mikrofluide system

Det mikrofluide *sheath flow*-design fra figur 1a blev realiseret med CO_2 -laserbearbejdning af 1,5 mm plader af PMMA og la-



Figur 2. *Sheath flow* mikrofluidt system, som viser de sorte HGMS-elementer efter (a) injektion af methylenblåt og (b) indfangning af magnetiske partikler (der ses som brune områder).

sersvejsning med en 200 μm film af polypropylen, og resultatet er afbildet i figur 1b med tværsnit af systemet i figur 1c og 1d, der viser henholdsvis bærestømmenes kanaler og stedet, hvor magnetiske partikler indfanges. Til brug som mikro-HGMS-system blev desuden fremstillet en holder til systemet, der omfatter to HGMS-matrixelementer bestående af 0,5 mm pinde af en legering af nikkel, jern og molybdæn og to magneter ($5 \times 5 \times 2 \text{ mm}^3$ af neodym-jern-bor). Systemet i figur 1b er vist indsat i holderen, der er tilpasset en almindelig mikroskopi-slide.

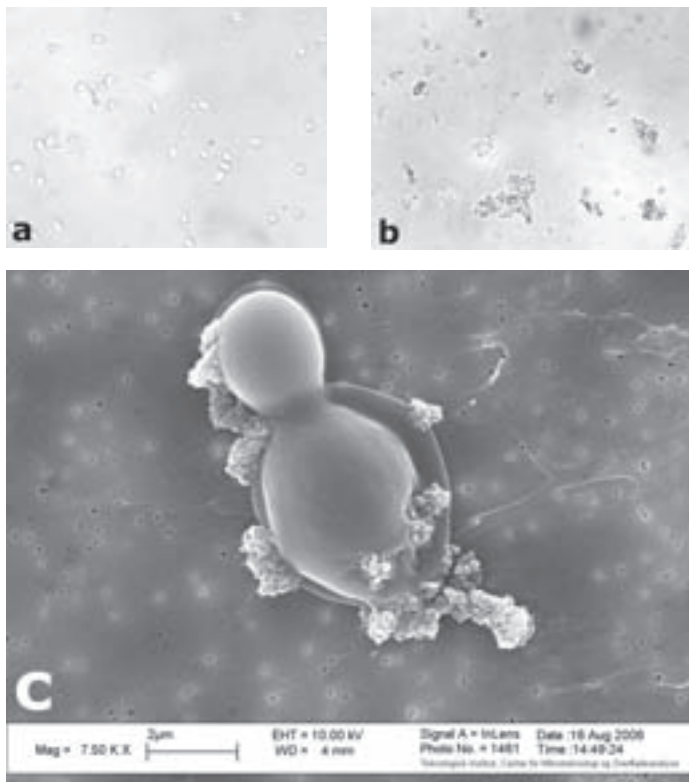
Det mikrofluide *sheath flow*-HGMS-system blev forbundet til en mikrotandhjulspumpe med teflonslanger (indre diameter 0,25 mm), og en injektionsventil med en 10 μL prøveløkke sættes til systemets prøveindgang. For at visualisere prøvestrømmene i reaktionskammeret blev en opløsning af methylenblåt (0,5 g/L) injiceret i systemet via prøveløkken. I figur 2a vises, hvor de to, ►



Annoncering? Ring 70 10 36 36

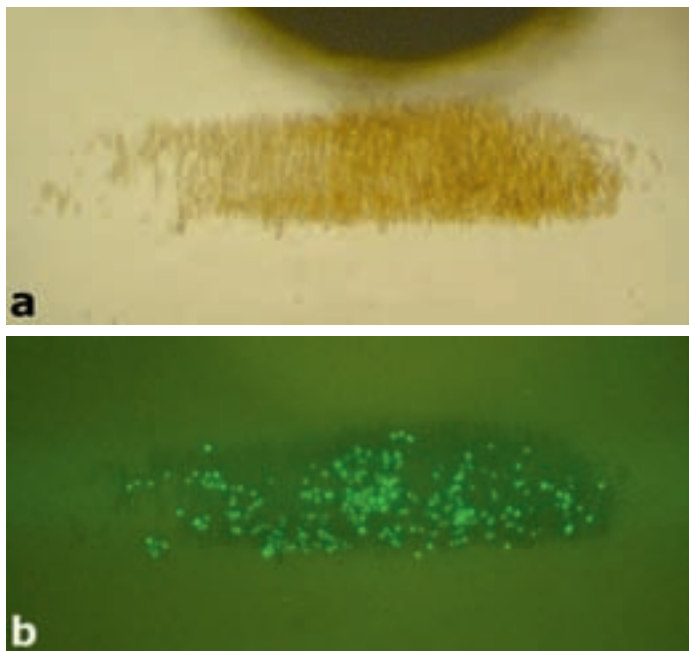
DE
GULE
SIDER

findes det
findes det her



Figur 3. (a) Gærceller, (b) gærceller bundet til magnetiske partikler med konkanavalin A og (c) SEM af konkanavalin A-funktionelle partikler bundet til gærceller.

blå strømme er placeret i forhold til de to HGMS-matrix-elementer. Disse placeringer svarer til områderne, hvor de stærkeste, magnetiske kræfter findes i kammeret. Strømmenes bredde er $\sim 100 \mu\text{m}$. Opsamling af partikler er demonstreret i figur 2b, hvor $0,5\text{--}1 \mu\text{m}$ magnetiske kationbytter-partikler, beskrevet i [6] er injiceret i systemet. I alt $0,2 \mu\text{g}$ partikler (i PBS-buffert) blev indsprøjtet ved $v = 10 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$, og man ser, hvordan de magnetiske kræfter i reaktionskammeret fastholder partiklerne, hvilket demonstrerer HGMS-princippernes anvendelighed i mikroskala.



Figur 4. Komplex af gærceller og konkanavalin A-funktionelle magnetiske partikler (a) indfanget i mikrofluidt HGMS-system og (b) indfanget i mikrofluidt HGMS-system og farvet med carboxyfluoresceindiacetat.

Forsøg med immobiliserede gærceller i mikro-HGMS-systemet

For at demonstrere anvendeligheden af det mikrofluidt HGMS-system til at immobilisere celler fremstillede vi gær-bindende partikler ved at hæfte konkanavalin A på overfladen af polymer-coatede partikler af jernoxid. Denne mannose-bindende lectin er tidligere anvendt til at binde mikrobielle celler som bagegær (*Saccharomyces cerevisiae*, se figur 3a) via sukkerstoffer på cellernes overflade [1], og i figur 3b ses, hvordan gærceller krydsbindes med partiklerne efter bare fem minutter i et prøverør. Ved scanning-elektronmikroskopi (figur 3c) bemærkes, hvordan de meget mindre, magnetiske partikler klistrer til de noget større gærceller. Størrelsesforholdet har betydning for indfangning af celle-partikel-komplekset, da de store, ikke-magnetiske celler bevirker, at strømningshastigheden må sænkes for effektiv indfangning.

Celler og partikler blev blandet (i forholdet 2 g celler pr. gram partikler) i et prøverør og injiceret i mikro-HGMS-systemet, og ved $v = 4 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ blev celle-partikel-komplekset fanget i reaktionskammeret (figur 4a). Ved nærmere observation er gærcellerne synlige på billedet, men for at bekræfte tilstedeværelsen og yderligere vise, at cellerne er levende, blev de udsat for carboxyfluoresceindiacetat. Dette stof diffunderer ind i cellerne, hvor det hydrolyseres af levende cellers esterasezymer til carboxyfluorescein, som er fluorescerende [7]. I figur 4b ses, hvordan farvningen får cellerne til at fluorescere, når de betragtes under betingelser for observation af GFP (green fluorescent protein).

Forsøgene demonstrerer, hvordan celler kan immobiliseres med magnetiske partikler i et mikrofluidt system under anvendelse af HGMS-principper, og hvordan der kan udføres kemiske forsøg med de fastholdte celler. Udbuddet af magnetiske partikler taget i betragtning kan vores systemer benyttes som fleksible mikrobioreaktorer til at immobilisere celler, blot der findes partikler, som kan binde cellerne. Eksempelvis undersøger vi princippet kombineret med fluorescence *in situ* hybridisation assays til identifikation af mikroorganismer samt som et hjælpeværktøj med immunceller i arbejdet med udvikling af vacciner.

Projektet er støttet af midler fra Forskningsrådet for Teknologi og Produktion.

E-mail-adresse

Ulrich Krühne: ulrich.krühne@teknologisk.dk

1. Referencer
2. Šafarařík, M. Šafaraříkova, 1999, Use of magnetic techniques for the isolation of cells, *Journal of Chromatography B*, **722**: 33-53
3. T.J. Hobley, A. Heebøll-Nielsen, O.R.T. Thomas, 2003, Magnetic fishing: Et attraktivt prospekt for bioprocesser, *Dansk Kemi*, **84**: 12-14
4. M. Franzreb, N. Ebner, M. Siemann-Herzberg, T.J. Hobley, O.R.T. Thomas, 2006, Product recovery by high-gradient magnetic fishing (HGMF). In *Process Scale Bioprocesses for the Biopharmaceutical Industry*, Etzel, M., Shukla, A. and Gadam, S. (Eds), CRC Press LLC, Chapter 3, pp 83-123. ISBN 1574445170
5. H. Klank, J.P. Kutter, O. Geschke, 2002, CO₂-laser micromachining and back-end processing for rapid production of PMMA-based microfluidic systems, *Lab on a Chip*, **2**: 242-246
6. F.G. Bachmann, U.A. Russek, 2003, Laser welding of polymers using high power diode lasers, *Proc. SPIE*, **5121**: 385-398
7. Heebøll-Nielsen, S.F.L. Justesen, T.J. Hobley, O.R.T. Thomas, 2004, Superparamagnetic Cation-Exchange Adsorbents for Bioproduct Recovery from Crude Process Liquors by High-Gradient Magnetic Fishing, *Separation Science and Technology*, **39**: 2891-2914
8. P. Breuwer, J.-L. Drocourt, N. Bunschoten, M.H. Zwietering, F.M. Rombouts, T. Abee, 1995, Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product, *Applied and Environmental Microbiology*, **61**: 1614-1619