

In Tropfen gemessen

Friedrich Schuler

Mit digitaler Amplifikation von DNA in Tropfen lassen sich einzelne DNA-Moleküle aufspüren und zählen. Die Tropfen der Probenflüssigkeit erzeugt ein rotierender Mikrofluidikchip im Format einer CD.

● Ein Tumor im Körper gibt kontinuierlich DNA in das Blut ab. Da die abgegebene DNA-Menge proportional zur Größe des Tumors ist, kann man durch Messungen der DNA-Menge die Tumorgöße genau bestimmen; die Untersuchung erfordert lediglich eine Blutprobe, aufwendige und mit Strahlenbelastung verbundene Untersuchungen wie Computertomographie entfallen. Daher benötigt die therapiebegleitende klinische Diagnostik Verfahren, die einzelne DNA-Moleküle zählen und auch große Mengen von DNA-Molekülen genau quantifizieren.

Die seit Jahrzehnten bewährte Methode der Polymerasekettenreaktion, PCR, weist DNA nach, indem sie die Moleküle exponentiell vervielfältigt und dabei ein Fluoreszenzsignal generiert. Quantitativ wird die Methode erst durch Standards mit bekannter Konzentration der gesuchten DNA-Moleküle (qPCR). Allerdings lässt sich die Zahl an DNA-Molekülen nur grob

schätzen, eine genaue Quantifizierung ist mit qPCR nicht möglich.

Digitale PCR

● Das Problem der genauen Quantifizierung löst die digitale PCR.^{1,2)} Dabei wird die zu untersuchende Probe zusammen mit den entsprechenden Bioreagenzien auf mehrere tausend Reaktionsgefäße aufgeteilt. Enthält eine Probe beispielsweise 500 DNA-Moleküle und die Probe wird auf 5000 Reaktionsgefäße aufgeteilt, so beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass ein Reaktionsgefäß ein DNA-Molekül enthält, zehn Prozent. Um die Reaktionsgefäße, die mindestens ein DNA-Molekül enthalten, von de-

nen zu unterscheiden, die leer sind, wird nun eine PCR durchgeführt. Sie erzeugt in den Reaktionsgefäßen mit DNA-Molekül ein Fluoreszenzsignal. Eine Fluoreszenzaufnahme der Reaktionsgefäße ermöglicht es, fluoreszierende, also positive von nichtfluoreszierenden, also negativen Reaktionsgefäßen zu unterscheiden (Abbildung 1). Die Zahl der positiven Reaktionsgefäße erlaubt den Rückschluss auf die Zahl der DNA-Moleküle in der Gesamtprobe.

Tausende Reagenzgläser

● Um Tausende von Polymerasekettenreaktionen mit vertretbarem Aufwand durchzuführen, sind die

● QUERGELESEN

- » Die Behandlung von Tumorerkrankungen oder Virusinfektionen erfordert eine Diagnostik, welche die genaue Zahl bestimmter DNA- oder RNA-Moleküle ermittelt.
- » Eine Methode, die Menge an DNA-Molekülen exakt zu bestimmen, ist die digitale PCR, die DNA in Tausenden winziger Tropfen nachweist.
- » Tropfen im Sub-Mikrolitermaßstab erzeugt ein mikrofluidisches System in einer rotierenden Scheibe.

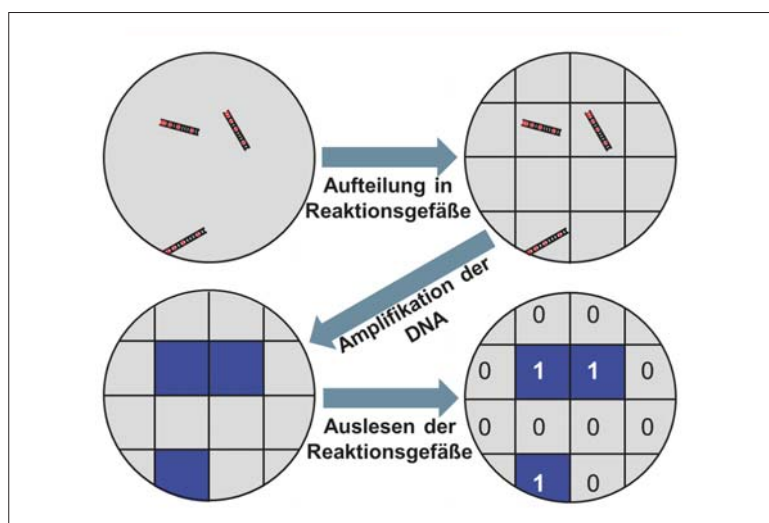


Abb. 1. Funktionsprinzip der digitalen PCR: Die DNA-haltige Probe (rot-schwarze Stäbchen als DNA-Moleküle) wird auf viele Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Reaktionsgefäße mit DNA erzeugen ein Fluoreszenzsignal (blau), wenn die DNA amplifiziert wird. Danach werden die Reaktionsgefäße ausgelesen, positive Reaktionsgefäße bekommen eine 1, negative eine 0 zugewiesen, daher die Bezeichnung „digital“.

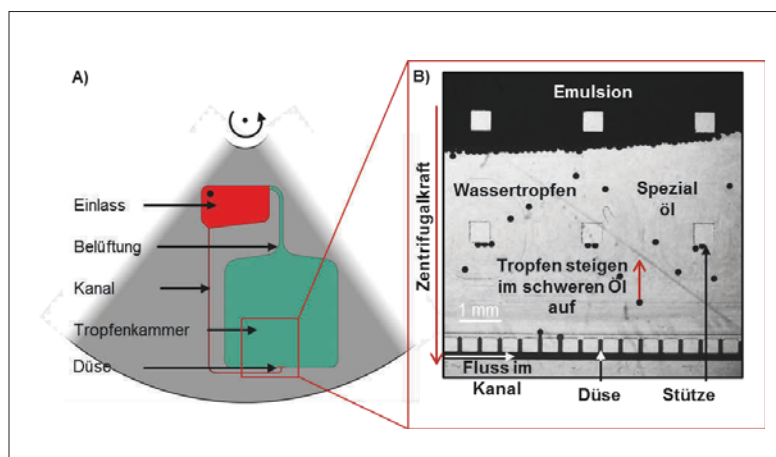


Abb. 2. A) Ausschnitt aus einer Labdisk-Scheibe. Die Probe wird in den roten Einlass pipetiert und durch Zentrifugalkräfte zu einer Düse geleitet, die zu einer mit Öl gefüllten Tropfenkammer führt. An der Düse entstehen Tropfen. B) Mikroskopbild der Tropfenerzeugung. Die mit Tinte gefärbten schwarzen Wassertropfen steigen im schweren Spezialöl zum Drehmittelpunkt auf.

Aufteilung der Probe und die Durchführung der Reaktion zu automatisieren. Da eine typische Probe zirka 20 μL enthält und auf 20000 Reaktionsgefäße aufgeteilt werden muss, sind mikrofluidische Methoden für diese Aufgabe ideal.

Grundsätzlich haben sich zwei Methoden etabliert, die Probe aufzuteilen. Die erste basiert auf Mikrokavitäten mit festen Wänden.³⁾ Die Probe wird in Tausende dieser Mikrokavitäten gefüllt, und die Kavitäten werden dann über Ventile voneinander getrennt. Das Reaktionsvolumen ist über die Größe der Kavität präzise definiert. Allerdings ist die Herstellung der Kartuschen mit den Mikrokavitäten aufwendig.

Die zweite Methode basiert darauf, die Probe auf viele kleine Tropfen zu verteilen, die in einem Spezialöl schwimmen. Die Kartusche, welche die Tropfen erzeugt, besteht zum Beispiel aus Kunststoffspritzguss und ist preiswert in der Herstellung. Die mikrofluidischen Systeme in diesen Kartuschen können ohne Probleme Tropfen von 1 nL Volumen erzeugen. Diese Tropfen enthalten wässrige Reaktionslösung und sind von Spezialölen mit stabilisierenden Detergenzien umgeben. Sie dienen quasi als Reagenzglas im Miniaturformat, in ihnen laufen alle benötigten Reaktionen bis zur Detektion ab.

Zentrifugale Stufenemulsifikation

Die Hahn-Schickard-Gesellschaft für angewandte Forschung und das Institut für Mikrosystemtechnik der Universität Freiburg haben gemeinsam ein einfaches Verfahren entwickelt, das tausende gleich große Tropfen erzeugt.⁴⁾ Dieses zentrifugale Stufenemulsifikation (Centrifugal Step Emulsification) genannte Verfahren verteilt ein Probenvolumen von 20 μL mit minimalem Aufwand auf tausende von Tropfen. Es basiert auf einer rotierenden Scheibe, die so groß wie eine DVD ist und Labdisk genannt wird. Diese Labdisk enthält kleine Kammern und winzige Kanäle, durch die Flüssigkeiten gelenkt werden können (Abbildung 2).

Um Tropfen zu erzeugen, pipetiert der Nutzer lediglich das Öl sowie die Reaktionsmischung samt Probe in dafür vorgesehene Öffnungen auf der Disk. Im nächsten Schritt legt der Nutzer die Labdisk in ein Prozessiergerät, den Labdisk-Player. Dieses schuhschachtelgroße Gerät lässt die Labdisk nun mit einer voreingestellten Frequenz rotieren. Dadurch entstehende Zentrifugalkräfte drücken die Reaktionsmischung auf der Scheibe durch winzige Kanäle nach außen. Erreicht

HELMUT MAIER

Chemiker im Dritten Reich

Die Deutsche Chemische Gesellschaft und der Verein Deutscher Chemiker im NS-Herrschaftsapparat



ISBN: 978-3-527-33846-7
März 2015 736 S. mit 51 Abb
und 117 Tab. Gebunden.
Ca. € 99,-

Die im 19. Jahrhundert gegründeten Vorgängerorganisationen der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), die Deutsche Chemische Gesellschaft (DChG) und der Verein Deutscher Chemiker (VDCh), wirkten als die Motoren der so erfolgreichen Chemie in Deutschland und sind der positive Teil des Erbes der GDCh. Dessen dunkle Seite in den Zeiten des Nationalsozialismus begann man jedoch erst ab 2001 zu erforschen.

Der Wissenschaftshistoriker Helmut Maier legt nun die erste umfassende Studie über das Verhalten der DChG und des VDCh im Verlauf der NS-Diktatur von 1933 bis 1945 vor. Detailliert wird der Weg bekannter Chemiker aus Forschung, Industrie und dem deutschen chemischen Literaturwesen beschrieben sowie Einzelschicksale systematisch aufgespürt und beleuchtet. Damit existiert nun ein Gesamtbild über die Chemiker und ihre Rolle im „Dritten Reich“ und eine mahnende Erinnerung für alle Nachfolgenerationen.

Wiley-VCH
Postfach 10 11 61 • D-69451 Weinheim
Fax: +49 (0)6201 606 184
E-Mail: service@wiley-vch.de
www.wiley-vch.de
Irtum und Preisänderungen vorbehalten.
Stand der Daten: Dezember 2014

WILEY-VCH

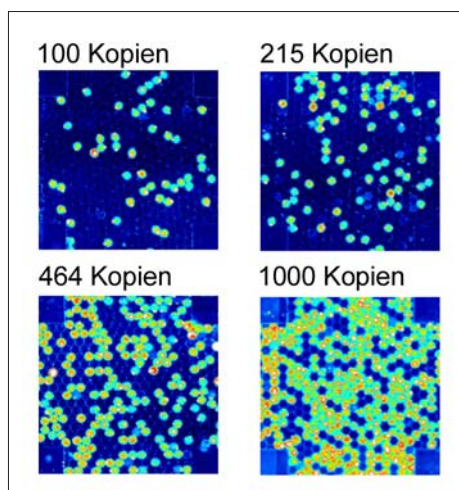


Abb. 3. Falschfarbenfluoreszenzaufnahme der Tropfen nach der RPA-Reaktion. Grün und rot leuchtende Tropfen sind positiv und enthalten DNA, blaue sind leer. Je mehr DNA-Kopien der Reaktion zugegeben werden, desto mehr Tropfen leuchten.

die Reaktionsmischung eine speziell geformte Düse, so bilden sich automatisch Tropfen, die im Öl schwimmen. Detergenzien verhindern, dass sich Tropfen wieder verbinden oder Flüssigkeit austauschen.

Die Tropfen haben alle einen Durchmesser von 160 µm, da die Größe des Tropfens ausschließlich von der Größe des Kanals und der Oberflächenspannung zwischen Reaktionsmischung und Öl abhängt. Beide Größen bleiben wäh-

rend eines Durchlaufs unverändert. Tausende von homogenen Tropfen sammeln sich in einer Kammer, die so konstruiert ist, dass nur eine Lage von Tropfen Platz findet und die Tropfen nicht übereinander liegen. So lässt sich später eine Fluoreszenzaufnahme von oben machen und bei jedem einzelnen Tropfen feststellen, ob er fluoresziert oder nicht.

Digitale Rekombinase Polymerase Amplifikation

● Allerdings dient zum Nachweis der DNA-Moleküle nicht PCR, sondern ein isothermales Amplifikationsverfahren, die Rekombinase-Polymerase-Amplifikation (RPA).⁵⁾ Diese weist DNA bei einer konstanten Temperatur von zirka 39 °C nach. Außerdem braucht eine RPA weniger als 30 Minuten und ist damit wesentlich schneller als eine PCR, die etwa zwei Stunden benötigt. Auch hier unterscheidet am Ende Fluoreszenz zwischen positiven und negativen Proben (Abbildung 3).

Ausblick: Nukleinsäurenachweisverfahren für die Routine

● Mit digitaler RPA auf der Labdisk kann der Nutzer mit geringem manuellem Aufwand schnell und präzise DNA-Moleküle zählen. Das Verfahren eignet sich damit für viele Anwendungen besser als die qPCR, ist aber genauso einfach zu bedienen.

Aktuell setzt die klinische Routinediagnostik noch keine digitalen DNA-Nachweisverfahren ein, sie sind noch ausschließlich Forschung und Entwicklung vorbehalten. Mit der Einführung einfach zu bedienender, kostengünstiger und schneller Geräte wird sich das ändern. Damit können Kliniken zum Beispiel therapiebegleitende Tumordiagnostik betreiben, wie eingangs erwähnt. Ein Patient kann während der Therapie mehrfach untersucht werden, und ohne große Eingriffe oder Strahlenbelastung steht das Untersuchungsergebnis

noch am selben Tag zu Verfügung, um den weiteren Verlauf der Therapie planen zu können.

Auch andere Anwendungsbereiche sind denkbar. So ist es für HIV-infizierte Patienten wichtig, die Zahl der Viren in ihrem Blut zu kennen, damit die eingestellte Medikation die Virenmenge im Blut zuverlässig unter einem kritischen Wert hält. Diese Untersuchung ist mit digitalen Nukleinsäurenachweisverfahren bedeutend einfacher.

Mit fortschreitender Miniaturisierung und Automatisierung könnte ein tragbares Gerät entwickelt werden, mit dem Patienten DNA-Moleküle zählen können und das sie im Alltag begleitet wie ein Blutzuckermessgerät.

Friedrich Schuler, Jahrgang 1989, studierte Chemie an der ETH Zürich und promoviert seit dem Jahr 2013 in der Gruppe von Roland Zengerle an der Universität Freiburg. In seiner Forschung beschäftigt er sich mit digitalen Nukleinsäurenachweisverfahren.

Literatur

- 1) P. J. Sykes, S. H. Neoh, M. H. Brisco, E. Hughes, J. Condon, A. A. Morley, *Biotechniques* 1992, 13, 444–449.
- 2) B. Vogelstein, K. W. Kinzler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 9236–9241.
- 3) M. Baker, *Nat. Meth.* 2012, 9, 541–544.
- 4) F. Schuler, F. Schwemmer, M. Trotter et al., *Lab Chip* 2015, 15, 2759–2766.
- 5) O. Piepenburg, C. H. Williams, D. L. Stemple, N. A. Armes, *PLoS Biol.* 2006, 4, e204.

Kurz notiert

Omics-Plattform in Berlin

● Auf dem Campus Berlin-Buch hat das Berliner Institut für Gesundheitsforschung ein Labor für Genomik, Metabolomik und Proteomik eingerichtet. Diese Omics-Technologieplattform verfügt über Sequenziergeräte und hochauflösende Massenspektrometer im Wert von etwa sieben Mio. Euro. Dazu kommt eine roboterbasierte Probenvorbereitungspipeline.

www.bihealth.org

GDCh-Kurs
 Grundlagen der Allgemeinen und Anorganischen Chemie für Mitarbeiter aus Produktion und Technik (948/16)
 16. - 19. Februar 2016, Bad Dürkheim
 Leitung: Dr. Andreas M. Schneider

Highlights:
 Verständnis für chemische Zusammenhänge
 Eindrucksvolle Experimente
 Großtechnische Produktionsverfahren Chemie und Umwelt
 Ohne größere chemische Vorkenntnisse

Anmeldung/Information:
 Tel.: 069/7917-291
 E-Mail: fb@gdch.de
www.gdch.de/fortbildung