

Electrospray & biochips

De cellen waarvan je gemaakt bent, hebben een volume niet veel groter dan een picoliter. Ondanks die minieme grootte zit iedere cel op een uiterst ingewikkelde en dynamische manier in elkaar. Via feed-back en feed-forward systemen reguleert een cel zichzelf, past zich aan aan zijn omgeving en geeft signalen af aan andere cellen. Ziekten worden vaak veroorzaakt doordat een van die regelmechanismen niet helemaal goed meer werkt. De processen die zich binnen cellen afspelen zijn zo ingewikkeld, dat we er nog steeds niet erg veel van begrijpen en dagelijks worden er spectaculaire ontdekkingen op dit gebied gedaan. Steeds meer van dat soort ontdekkingen zouden onmogelijk zijn zonder de inzet van microtechniek.

• Prof. Dr. JP Abrahams • M. Kuil • J Marijnissen •

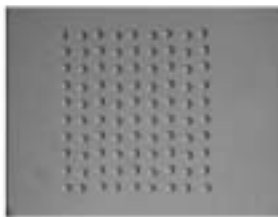
Begrip van de processen binnen een cel vereist kennis van het gedrag en de interacties van de componenten binnen die cel. Die componenten zijn moleculen die zich bij voorbeeld kunnen aggregeren tot goed gedefinieerde, lang-levende complexen. Echter, soms vormen ze een onderdeel van vloeibare membranen of gaan maar korte interacties aan met andere moleculen. Sommige moleculen kunnen chemische reacties katalyseren, andere kunnen krachten genereren, sommige zijn signaalmoleculen, andere hebben een structu-

rele rol. Veel van die moleculen zijn door de natuur ontworpen om elkaar te herkennen en elkaars activiteit en eigenschappen te beïnvloeden. Wanneer we hun natuurlijk gedrag willen begrijpen, moeten we die componenten in oplossing bestuderen. Immers, de inhoud van een cel is vloeibaar en de componenten van een cel zijn vaak op de een of andere manier opgelost – in een waterige omgeving of in de lipofiele omgeving van een membraan.

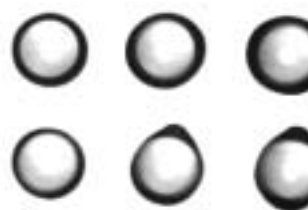
Nu is het vaak heel moeilijk om de componenten van een cel zuiver in handen te krijgen zodat we hun eigenschappen nader kunnen bestuderen. Vaak is het zelfs maanden werk om maar een milligram van een eiwit te isoleren! Daarom proberen onderzoekers analyses te doen met zo weinig mogelijk materiaal: het is goedkoper, je kunt meer proeven doen en het is vaak ook beter te automatiseren. Wij verwachten dat deze ontwikkelingen binnenkort ook in de dagelijkse praktijk steeds zichtbaarder zullen worden. Eerst zullen bij de ziekenhuizen, daarna bij de huisartsen en ten slotte zelfs bij de patiënten thuis allerlei diagnostische tests plaatsvinden, waarbij biochips gebruikt zullen worden.

Veel biochips zijn niet veel anders dan een miniatuur poffertjesplaat: een grote hoeveelheid druppeltjes die in een regelmatig patroon op een oppervlak zijn neergelegd. Ieder druppeltje heeft zijn eigen speciale samenstelling of bevat een uniek soort molecuul en de eigenschappen van de moleculen in zo'n druppeltje kunnen bestudeerd worden met gevoelige technieken zoals fluorescentie. Voor een diagnostische test wordt dan vervolgens aan elk druppeltje wat van de te analyseren stof toegevoegd. Een van de uitdagingen van de microtechniek is het fabriceren van zulk soort biochips op een goedkope, foutloze en precieze manier.

Voor het maken van biochips met een array van verschillende druppeltjes zijn er verschillende technieken, die allemaal op de een of andere manier hun oorsprong vinden in document-productie. We vinden equivalenten van de vulpen, van de stempel en ook van de inktjet printer. Ze hebben met elkaar gemeen dat een oplossing in een bijzonder kleine volume op een oppervlak aangebracht wordt. Ieder van die technieken heeft zo zijn voor- en nadelen, maar tot nu toe is geen enkele techniek ideaal.



Figuur 1. Array van 81 druppeltjes polyethyleen glycol met een molecuulmassa van 200 gr/mol. De druppelgrootte is ongeveer 100 micrometer



Figuur 2. Detailopname van de polyethyleen druppeltjes uit figuur 1

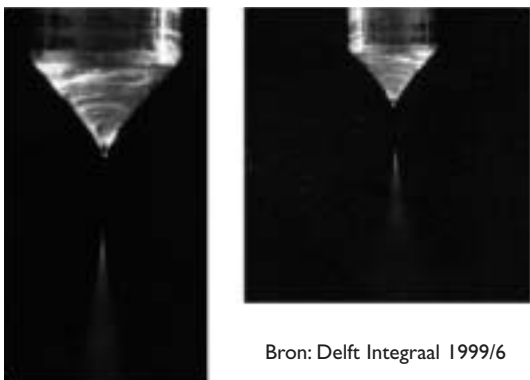
Wat zijn de voorwaarden waaraan een nano-doseer systeem zou moeten voldoen voor de productie van biochips? Uiteraard moeten de volumes zeer klein kunnen zijn, in de orde van pico-liters, en moeten de druppeltjes heel reproduceerbaar zijn, zowel wat betreft hun volume als plaats waar ze op het substraat worden neergelegd. Inktjet systemen voldoen aan deze eis, en dit principe wordt dan ook veel toegepast. Verder is het essentieel dat het doseersysteem biocompatibel is. Zo mag de temperatuur van de druppeltjes niet te hoog worden. Het bubblejet principe valt daarom af, omdat hierbij de oplossing aan de kook gebracht wordt. Systemen gebaseerd op piëzo dispensing zijn daarentegen juist wel geschikt.

De grootste nieuwe uitdagingen aan een nano-doseersysteem voor bio-applicaties zijn de volgende: het ideale systeem heeft veel verschillende kanalen, liefst duizenden, zonder dood volume, en het is goed in staat om ook visceuze oplossingen nauwkeurig te doseren. Wat betreft de laatste twee punten voldoet de huidige piëzo-techniek nog niet, en zeker het doseren van visceuze oplossingen zonder deze te verwarmen zal waarschijnlijk nooit lukken. Er bestaat echter wel een geheel andere technologie waarmee ook visceuze oplossingen verspoten kunnen worden, gebaseerd op het principe van de electrospray. In de biotech wordt electrospray nu vooral ingezet voor het maken van kleine druppeltjes waarvan de samenstelling vervolgens met massaspectrometrie geanalyseerd wordt.

In electro-spray wordt een potentiaalverschil aangebracht tussen een vloeistofdruppel en een tegenelectrode. Als gevolg van de krachten die hierdoor ontstaan, vervormt het oppervlak van de druppel. Wanneer het spanningsverschil tussen de druppel en de tegenelectrode hoog genoeg is, vervormt de druppel zich zelfs tot een kegelachtige structuur met een scherpe punt, de zogenaamde Taylor-cone. Vanaf het topje van die kegel worden dan kleine, geladen druppeltjes afgevuurd in de richting van de tegenelectrode. Tegelijkertijd wordt de vloeistof die vanaf de top van de Taylor-cone verspoten wordt, aangevuld (bij voorbeeld met een slangetje en een pompje). Van belang voor dit proces zijn vooral de

IOP NANO-DISPENSING

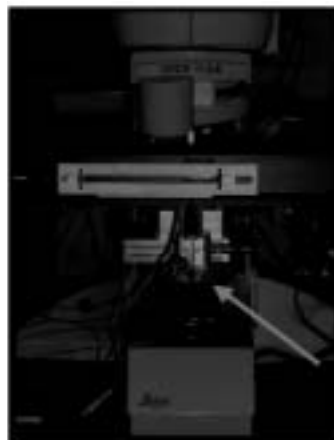
geleidbaarheid van de oplossing en het potentiaalverschil, de geometrie van de druppel en de tegenelectrode, en de snelheid waarmee de Taylor-cone aangevuld wordt. Echter, de viscositeit van de oplossing is maar van secundair belang en zelfs heel stroperige oplossingen kunnen met electrospray zonder veel problemen verspoten worden in druppeltjes met volumes veel kleiner dan een picoliter. Vandaar dat wij, in een project gefinancierd door Senter, onderzochten of wellicht electro-spray principe ingezet zou kunnen worden voor nauwkeurige nano-dosering van biologische oplossingen.



Bron: Delft Integraal 1999/6

Figuur 3. Foto van een sproeiende electrospray. De Taylor cone is het vloeistof lichaam dat aan de metalen hangt. Een fijne nevel van verspoten druppeltjes vormt zich tussen de Taylor cone en een geladen oppervlak (Niet zichtbaar in deze afbeelding).

Al vrij snel hadden we een opstelling gebouwd waarmee we arrays van kleine druppeltjes konden maken op een glasplaatje. Pas toen begon het echte onderzoek. Een grote uitdaging is de calibratie van het systeem. Anders dan in piëzo- of bubblejet technieken, is electrospray geen zogenaamde 'drop-on-demand' technologie. We moesten dus uitvinden hoe kort een hoogspanningspuls moest zijn om de electrojet aan te schakelen, en hoeveel volume er dan op het glasoppervlak gedeponeerd wordt. Met een programmeerbare hoogspanningsgenerator en een omgebouwde microscoop wisten we ten slotte een systeem te ontwikkelen waarmee we nauwkeurig konden meten wanneer en hoeveel oplossing door een gegeven spanningsverschil op een oppervlak wordt ge-'sprayed'. Hiertoe monteerden wij een zelfgebouwde electrospray module onder een fluorescentiemicroscoop, waarbij het nodig was dat de electrospray naar boven, in het gezichtsveld van de microscoop spoot. Door een minieme hoeveelheid fluorescerend materiaal toe te voegen aan de te verspuiten vloeistof, konden wij, na meting van de totale fluorescentie van de gedeponeerde druppeltjes, hun volumes nauwkeurig bepalen



Figuur 4. Microscoop met gemonteerde electrospray unit

De belangrijkste conclusie van ons onderzoek was dat electrospray slechts onder bepaalde voorwaarden een geduchte concurrent van piëzotechnieken zou kunnen vormen. Een belangrijke zwakte van electrospray bleek de traagheid van de opbouw van de Taylor-cone te zijn. Dit stelt een ondergrens aan de schakelsnelheid van de spray. Op veel manieren probeerden we hier iets aan te doen. Zo hielden wij bijvoorbeeld het spanningsverschil continu hoog, zodat de vloeistof bijna een Taylor-cone vormde, maar nog net niet begon te sprayen. Voor dosering hoefde de potentiaal dan maar een beetje verhoogd te worden. Verder bleek ook dat de geleidbaarheid van de oplossing de dynamiek van de electrospray op belangrijke wijze beïnvloedde. Iedere oplossing vereist zijn eigen spannings-schakelprotocol en een kleine verandering in bijvoorbeeld de zoutsterkte vereist een nieuwe calibratie.

Helaas vereiste onze applicatie dat de fysisch-chemische eigenschappen van elk van de doseren vloeistoffen verschilt van de anderen. In elk van de nano-druppeltjes wilden wij tot zo'n acht verschillende oplossingen mengen in een hele reeks van onderlinge verhoudingen. De calibratie werd hierdoor nog extra bemoeilijkt, doordat ook de geleidbaarheid van het druppeltje dat al gedeponeerd was op de tegenelectrode een effect heeft op het electrospray proces. Al met al lukte het ons niet om een robuust systeem te bouwen dat reproduceerbaar en nauwkeurig genoeg was. Dat betekent echter in geen geval dat electrospray geen nuttige applicaties zou kunnen hebben in de fabricage van biochips! Er zijn immers nog voldoende andere applicaties.



Figuur 5. Ontwerp van de electro-spray unit (operationele toestand)



Figuur 6. Ontwerp electro-sprayunit (inspectie positie)

Ondanks dat veel van de problemen opgelost kunnen worden, bleef – zoals gezegd – de schakelsnelheid een onverkomelijke probleem van electro-spray als doseringssysteem. In sommige applicaties valt daar gelukkig mee te leven, want het systeem leent zich in principe uitstekend voor multiplexing. Stel je een printkop voor met aan de bovenkant heel veel reservoirtjes die aan de onderkant uitmonden in minime kanaaltjes. Eén enkele spanningpuls is dan voldoende zijn om uit elk reservoirtje een gedefinieerd volume naar de tegenelectrode te trekken. Wanneer we er dan voor zorgen dat alle oplossingen een vergelijkbare geleidbaarheid hebben, zullen alle gedeponeerde druppeltjes een vergelijkbaar (klein) nano-volume hebben. Op die manier zou het bij voorbeeld goed mogelijk moeten zijn om DNA chips met hoge snelheid en nauwkeurigheid te maken. Immer bij dergelijke chips verschillen de gedeponeerde nanodruppletjes alleen maar doordat er in elk druppeltje DNA moleculen met een andere chemische samenstelling opgelost zitten. De elektrische geleidbaarheid van alle druppeltjes, en ook de andere fysisch-chemische karakteristieken zijn gelijk. Kortom, de niche van de electro-spray in de productie van biochips lijkt vooral te liggen in het snel genereren van veel identieke exemplaren.

Step Up To OptoSigma

Custom Optical Coatings.

Precision Optics.
OptoSigma Corporation is a global manufacturer of precision optics, opto-mechanics and custom thin film coatings. Difficult coating specifications are designed to meet the industry's most demanding specifications.

Fiber Optic Coatings.
OptoSigma thin film engineers customize the spectral performance to meet the customer needs. Through implementation of optimization algorithms and ion assisted deposition, performances are accurately obtained. Low temperature ($T < 90^{\circ}\text{C}$) durable coatings are designed to facilitate connectorized fiber of all types.

Substrates & Optic Holders.
With accurate control of temperature and Ion Assisted Deposition (IAD), OptoSigma can deposit dielectric and all-oxide coatings on cemented achromats, connectorized fibers, or other materials which require $< 90^{\circ}\text{C} - 230^{\circ}\text{C}$ temperature coatings with repeatable results and full yields. Precision optic holders are manufactured for accurate alignment for both fiber and precision optics in various sizes.

Thin Film Coatings.
Impressive, high performance thin film coatings are manufactured in computer controlled Ion Assisted Deposition (IAD) chambers. Our highly talented Optical Engineers are able to design difficult coating specifications for telecom and laser applications with requirements ranging from 193 nm to 2500 nm and low temperature optical coatings on fiber optic endfaces and achromats with a repeatable, precision process.

molenaar optics

tel.: 030-6951038, fax: 030-6961348
e-mail: info@molenaar-optics.nl
website: www.molenaar-optics.nl

Optics • Opto-Mechanics • Motorized Products
a Sigma Koki Company