

Totalanalyse-systemer med biologiske anvendelser

Af Winnie E. Svendsen, MIC – Institut for Mikro- og Nanoteknologi, DTU, og Maria Dimaki, MIC – Institut for Mikro- og Nanoteknologi, DTU

Totalanalyse-systemer har modtaget stor opmærksomhed de seneste år. I denne artikel forsøger vi at illustrere potentialet for totalintegrerede systemer inden for biologiske analyser, med kromosomanalyse som eksempel. Artiklen gennemgår de overvejelser der er nødvendige for at integrere en biologisk analyse på en chip, herunder de faktorer som er nødvendige at undersøge inden design og fabrikation kan påbegyndes. Det er f.eks. forbehandling og kendskab til fundamentale fysiske egenskaber af det biologiske materiale, overfladebehandling af chippen, og endelig analysemetoden. Dette giver et interessant samspil på tværs af de forskellige naturvidenskabelige fagområder.

Indledning

Når vi får taget en blodprøve hos lægen, forestiller vi os, at prøven lander i hænderne på en laborant i hvid kittel, der skal håndtere en masse reagensglas, for til sidst at sætte nogle store maskiner i gang med at analysere de mange prøver. Vi ved, at svaret hverken kommer i dag eller i morgen, men måske først en gang i næste uge.

Det ville være rart for såvel patient som for behandler, hvis svaret af medicinske tests kunne falde inden for timer efter prøven er taget. Ved at kombinere mikro- og nanoteknologi med sundhedsvidenskabelig forskning og diagnostik, synes det at være muligt inden for en kort årrække. Vi beskriver her et tværfagligt projekt, hvor forskning inden for biologi, medicin, fysik og teknologi kombineres til en ny forbedret analyse af mutationer – og specifikt translokationer – i de humane kromosomer.

Konceptet er at lave et integreret totalanalyse-system, som er både effektivt, hurtigt, reproducerbart og brugervenligt. Analysen af det genetiske materiale skal helst kunne foretages uden den store tekniske viden, og det simpleste udgangspunkt er derfor at bruge en blodprøve fra patienten. Målet er billedligt, at man injicerer en bloddråbe i den ene ende og får svar ud i den anden ende af en mikrochip – kort sagt et laboratorium på en chip.

Kromosom totalanalyse system

Vores genetiske fingeraftryk eller DNA er gemt inde i vores celler i mikrostrukturer – kendt som kromosomer. Mange sygdomme er relateret til mutationer i kromosomerne, og det er derfor interessant på en effektiv måde at kunne kortlægge disse mutationer.

Når en celle deler sig, undergår det genetiske materiale, som er en del af hver celle i kroppen, en kopiering og deling. Resultater er to ens celler med en præcis kopi af det genetiske materiale. Under denne proces kan fejl – såkaldte mutationer – opstå, og selv om cellerne er gode til at opdage disse fejl og rette dem, vil nogle fejl overleve og blive nedarvet til dattercellerne.

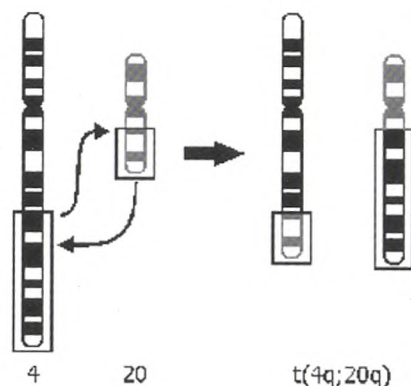
De fleste mutationer er harmløse. Gennemsnitlig har vi alle 50-100 harmløse mutationer. Det er disse

mutationer, der over tid fører til menneskets udvikling – eller evolution. Dette er altså menneskers og dyrs måde at overleve på. Desværre er nogen mutationer alvorlige og fører til fatale sygdomme. At kunne kortlægge disse mutationer, sammen med deres originale funktion kan hjælpe os til at forstå de sygdomme, de forårsager, samt hjælpe til at designe en medicinsk behandling. [1]

Translokationer er en speciel form for genetisk mutation, hvor genetisk materiale fra et kromosom sidder på et andet kromosom og vice versa (figur 1). Der kan herunder også forekomme stykker af DNA (eller kromosomstykker), der er helt slettet – “deletion”, eller tilføjet – “addition”.



Figur 1a. Kromosom-diagram hvor kromosomerne i metafase er farvet og ordnet parvis [3].



Figur 1b. Translokation mellem kromosom 4q og kromosom 20q [3].

Translokationer kan nedarves, eller opstå under celledeling – enten i fosterstadiet, hvorved ændringen eksisterer i alle celler, men kan også forekomme under celledeling på et senere tidspunkt i livet, og findes her ikke i alle celler. Der er overordnet to typer af translokationer, de balancerede hvor der ikke er tab af genetisk materiale, og de ubalancerede hvor der opstår tab af genetisk materiale. Den sidste type har de største konsekvenser og fører oftest til abort i de medfødte tilfælde.

Kromosomale translokationer har vist sig at bidrage til omkring 70 % af kræftrelaterede genmutationer, og er hovedsageligt fundet i leukæmi, lymfekræft, prostatakraft og sarkomer, der udgør omkring 10 % af alle kræfttilfælde [2]. Ved disse sygdomme har påvisningen af en specifik translokation ofte en både diagnostisk og behandlingsmæssig værdi.

For at målrette udviklingen af et analysesystem direkte mod den endelige anvendelse, har vi etableret et samarbejde med en af de førende forskningsinstitutioner, Wilhelm Johannsen Centret for funktionel genomforskning, på Panum Institutet, Københavns Universitet (www.wjc.ku.dk), hvor professor Niels Tommerup og prof. Zeynep Turmer har specialiseret sig indenfor identifikation af genfunktion vha. storskala-identifikation af ukendte sygdomsgener.

Forbehandling af det integrerede system

Med udgangspunkt i en blodprøve fra patienten, skal systemet designes til at kunne modtage og forarbejde blodet. Det integrerede system skal kunne håndtere væskestrømninger, og hverken cellerne i blodet eller kromosomerne må binde uspecifikt til kanalerne. Dette er specielt en udfordring med hensyn til kromosomer, der binder stærkt til mange overflader. Dette er også grunden til at man hidtil primært har studeret fikserede kromosomer (figur 1a).

Til håndtering af kromosomer i væskekanaler er det overordentlig vigtigt, at kende overfladens egenskaber. En kendt metode til at undgå uspecifik binding af biologisk materiale til en overflade er at modificere overfladens energi ved at modificere overfladen med en "børste" af polyethylene glycol- (PEG) molekyler. Det er lykkedes ph.d.-studerende Jacob M. Lange at syntetisere og karakterisere et bibliotek af forskellige overflader på glas, og en ny kombinatorisk strategi har gjort det muligt, at fremstille adskillige overflader – populært kaldet "stealth", der vil kunne bruges i studierne af kromosomerne i en mere "naturlig" form f.eks. frit flydende i væske. Overfladerne karakteriseres vha. kontaktvinkel målinger, DNA-binding og X-ray photoelectron spectroscopy (XPS).

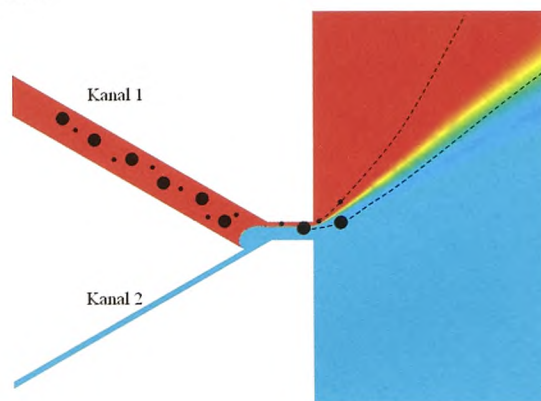
Separation af blodceller

Det første skridt i analysen er at frasortere alt det uønskede materiale fra blodprøven. Den information vi søger, befinder sig i de hvide blodceller, hvorfor vi ønsker at opsamle disse – og helst enkeltvis. Standardmetoden til separation af cellerne er centrifuger-

ing, men denne metode er ikke optimal i et mikrolaboratorium, derfor vil vi i stedet benytte os af én af naturens egne metoder. Postdoc. Maria Dimaki og ph.d.-studerende Casper Hyttel Clausen arbejder med simulering og fabrikation af mikrosystemer. Blandt andet undersøger de en metode kaldet "pinched flow", hvor f.eks. celler kan størrelse-sorteres ud fra deres bevægelser i væskestrømninger i kanaler med en snæver ("pinched") udgang [4]. Da hvide blodceller er lidt større end røde blodceller, kan denne metode med fordel benyttes.

Princippet bag pinched flow metoden er vist i figur 2, hvor man i to væskekanaler med forskellige dimensioner injicerer en celleblanding med både store og små celler (kanal 1) og en væske uden celler (kanal 2). Væskeerne mødes i et "pinched" segment, hvor væsken fra kanal 1 vil blive presset opad mod den øverste væg af kanalen, såfremt hastigheden af væsken i kanal 2 er større end den i kanal 1.

Ved at justere dimensionerne af de to væskekanaler og/eller strømningshastigheder, kan man designe et system, således at de store celler kun delvist er i deres oprindelige væske i det såkaldte "pinched" segment. Herved vil de ved udgangen af segmentet følge en anden væskestrømning end de mindre celler, hvorved isolering af de større celler (de hvide blodlegemer) fra de mindre celler (de røde blodlegemer) er mulig. Vi arbejder i øjeblikket med at optimere systemet til dette formål.



Figur 2. Princippet bag "pinched-flow"-systemet til separation af celler efter størrelse. Farverne indikerer koncentrationen af væsken, hvor blå er for nul koncentration og rød er maksimum koncentration. Figuren viser at de to væsker stort set vil forblive separeret i det "pinched" segment og danne en klar grænse, hvorved diffusionen ikke er et problem i systemet.

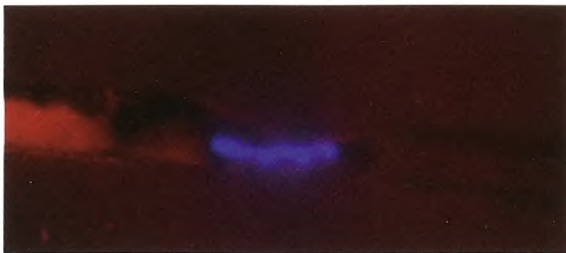
Udvinning af kromosomerne

Når de hvide blodceller er isoleret fra prøven, skal kromosomerne udvindes fra cellerne. Der eksisterer adskillige metoder til at åbne (lysere) cellerne, f.eks. vha. elektrisk puls, "nanoknive" (mekanisk) eller kemisk med hydroxid-ioner. I mikrosystemer er det vigtigt at benytte en metode, der er simpel at fabrikere, håndtere, og som giver reproducerbare resultater. Ved ekstraktion af kromosomerne har vi valgt at bruge en metode til at fange en enkelt celle og isolere kromosomerne fra denne celle.

Enkeltcelle-analyse er valgt, fordi størrelserne af kromosomerne varierer alt efter hvor i celleyklus cellen befinder sig, og derved fra celle til celle. Dette kan, som forklaret senere, få konsekvenser når kromosomerne skal sorteres. Gruppen arbejder med at simulere og fabrikere strukturer, der mekanisk kan fange en enkelt celle og herefter isolere kromosomerne. Disse strukturer designes som mekaniske obstruktioner i væskekanalsystemet, således at kun én celle fanges i denne obstruktion [5,6] og kromosomerne bliver udvundet af cellen, sorteret og analyseret. Analysen af flere celler kan herved foregå parallelt.

Kromosomsortering

Det humane genom består af 46 kromosomer 2 kopier af kromosom 1-22 og 2 sex kromosomer (X og Y – se figur 1a). Mutationer kan forekomme på hver enkelt kromosom, og for at gøre analysen mere simpel, er det fordelagtigt at kromosomer sorteres enkeltvis. Dette er ikke en simpel proces og specielt ikke i et integreret system, hvor standard makroskopiske metoder som “flow cytometri” [7] ikke er optimale. I gruppen forfølger vi to metoder, der er simple at fabrikere, den ene er sortering ved hjælp af elektriske felter og den anden er brugen af specielt arrangerede søjlesystemer.



Figur 3. Tre kromosomer fanget mellem to elektroder ved brug af dielektroforese. Kromosomerne er farvet blå, mens elektroderne ses med en mat rød-brun farve.

Den første metode, vi har afprøvet, og er ved at videreudvikle, er sortering ved hjælp af inhomogene vekselfelter. Bevægelsen som kromosomerne vil opnå kaldes dielektroforese og den skyldes inducerede ladninger på kromosomerne (polarisation). Kræfterne her er afhængige af kromosomernes størrelse, deres dielektriske egenskaber og feltets størrelse, som ses i ligning (1).

$$F_{\text{DEP}} = \frac{3}{4} V \cdot \epsilon_m \text{Re}\{f_{\text{cm}}\} \cdot \nabla |E|^2, \quad (1)$$

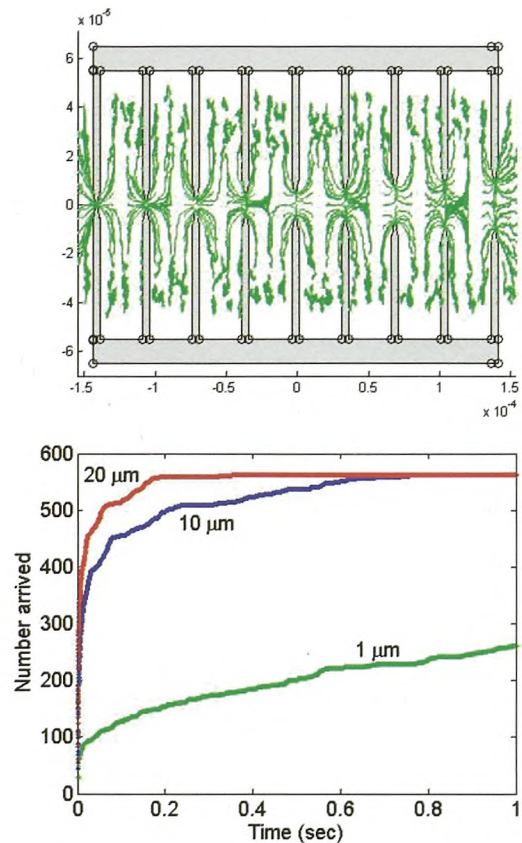
hvor V er kromosomernes volumen, E er det elektriske felt, ϵ_m er væskens permittivitet og f_{cm} er et kompleks tal som er afhængig af kromosomernes størrelser, form og dielektriske egenskaber og feltets frekvens, som ses i ligning (2).

$$f_{\text{cm}} = \frac{\tilde{\epsilon}_p - \tilde{\epsilon}_m}{3(A_n \cdot (\tilde{\epsilon}_p - \tilde{\epsilon}_m) + \tilde{\epsilon}_m)}, \quad (2)$$

Hvor A_n er i størrelsesordenen 10^{-2} , og afhænger af geometriske parametre såsom længde og radius;

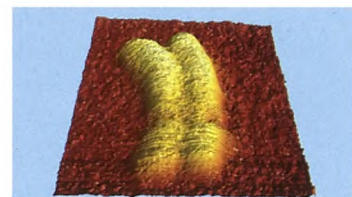
$\tilde{\epsilon} = \epsilon - j\frac{\sigma}{\omega}$ er den komplekse dielektriske konstant af medium (m) og kromosomerne (p) og σ er væskens ledsevne.

Det første forsøg på at fange kromosomer ved hjælp af dielektroforese viste sig succesfuldt (figur 3). Simuleringer i Comsol [8] har vist, at med mere komplicerede designs, er det muligt at separere kromosomerne ud fra størrelser som vist i figur 4. Disse designs er nu ved at blive fabrikeret.



Figur 4. Simulering af kromosomsortering ved dielektroforese. Øverst: Bevægelsen af kromosomer i dielektroforese hvor kromosomerne bliver fanget mellem elektroderne. Nederst: Store kromosomer bevæger sig hurtigere mod elektroderne, så i designet er tiden udnyttet ved sortering.

Simuleringerne er lavet med antagelser om kromosomernes størrelse og form (modelleret som ellipser), og antagelser om kromosomernes dielektriske værdier, da der ikke eksisterer præcis information om dette. Derfor er gruppen i gang med målinger af kromosomernes fysiske og elektriske egenskaber, hvilket udføres ved brug af forskellige skanning probe mikroskopi (SPM) metoder. Værdien af den dielektriske konstant er blevet målt til 4 ud fra SPM-målinger som vist i figur 5.



Figur 5. Atomic Force Microscopy (AFM) billede af et fikseret kromosom hvorudfra dimensioner og topografiske forskelle kan måles. Se også forsiden af bladet.

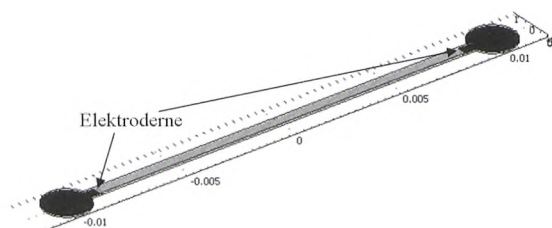
Dette er et foreløbigt resultat fra seks målinger på fikserede kromosomer med en usikkerhed på 15 %. I opløsningen forventes denne værdi at være større. Den dielektriske konstant siger noget om, hvor godt et materiale bliver polariseret af et elektrisk felt. Til sammenligning har vand en meget høj dielektrisk konstant på 80 og polariseres let. Den relativt lave værdi for kromosomer betyder, at det kan være svært at styre kromosomerne ved hjælp af den dielektriske effekt – men ikke umuligt.

Da kromosomerne er opbygget af DNA, som har en negativ ladning, vil de bevæge sig mod den positive elektrode i et elektrisk felt. Så ved hjælp af et homogent elektrisk felt kan vi også skaffe informationer om kromosomerne og muligvis sortere dem. I figur 6 er vist et mikrosystem designet til at måle kromosomernes ladning og til at undersøge om denne ladning kan bruges til sortering. Ved at sætte en DC-spænding over elektroderne bliver et elektrisk felt dannet inde i væsken, da selve væsken er svagt ledende. Feltet er homogent over den største del af kanalen, så det forventes at kromosomerne vil opnå en konstant hastighed som er proportional med deres ladning (ligning 3).

$$v = \frac{qE}{f} + u, \quad (3)$$

hvor v er den målte hastighed, E er det elektriske felt, u er væskens hastighed og f er friktionskoefficienten, som er afhængig af kromosomernes form og størrelse.

Det kunne betyde, at kromosomer med forskellige størrelser opnår forskellig hastighed og kan sorteres på den måde. Størrelsesforskellen vil betyde forskellig friktionskoefficient og spørgsmålet er om disse opvejer hinanden, hvilket vil blive undersøgt eksperimentelt.

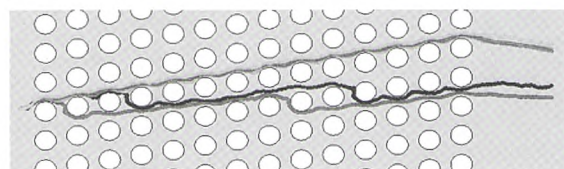


Figur 6. Design til måling af kromosomernes ladning. Farverne viser feltet i kanalen når en spænding sættes over elektroderne. Feltet er homogent i mindst en centimeter i midten af kanalen.

Et elektrisk felt i en ledende væske vil desværre have nogle ulemper. For det første vil væskens temperatur blive øget. Ved hjælp af Ohms lov kan man beregne effekten til $2,5 \mu W$ ud fra dimensionerne af kanalen (l,h,b er 2 cm, $100 \mu m$ og $500 \mu m$) hvor spændingen er på 5 Volt og væskens konduktivitet σ er $0,01 S/m$. Denne effekt er ikke særlig høj men kan alligevel forårsage et par graders opvarmning af væsken og derved kromosomerne. I designet sørger vi for at varmen bliver transporteret væk fra kanalen ved at anvende de rigtige materialer og ved at have en konstant pumpning af væske.

Derudover vil et elektroosmotisk flow eksistere på grund af elektroderne, som også medregnes. Selve væsken vil komme i bevægelse på grund af spændingsfaldet, og den bevægelse vil trække kromosomerne med sig. Væskens hastighed vil være større tæt på væggene, men kan beregnes og/eller måles og trækkes fra den målte kromosomhastighed.

Da elektroderne inde i væsken kan give mange problemer og da et mere autonomt system er bedre til "point-of-care"-applikationer, overvejer vi en anden metode til sortering. Det drejer sig om en kombination af væskehåndtering og søjler. Dette er en interessant struktur som kan sortere partikler af forskellige størrelser kun ved brug af geometri. Ved at sætte hindringer ind i en kanal, som det kan ses i en simpel simulering (figur 7) ændres strømningsmønstret og partikler større end en bestemt størrelse følger forskellige baner afhængig af deres størrelse. Metoden undersøges af ph.d.-studerende Pranjul Shah og er tidligere blevet brugt til at sortere stykker af DNA samt blodceller [9].



Figur 7. Et søjlesystem hvor kugleformede partikler bliver sorteret. Partikler med forskellige størrelser kommer ind i kanalen fra venstre side og bevæger sig mod højre side. De store partikler bliver afbøjet og bevæger sig opad i figuren mens mindre partikler bevæger sig "igennem" søjlestrukturen uden at blive afbøjet. Ved at justere størrelsen og tætheden af søjlerne kan man bestemme størrelsen af partiklerne som bliver sorteret.

Kromosomanalyse

Kortlægning og molekylær karakterisering af kromosomale translokationer er med de eksisterende metoder langvarig og dyr. Først og fremmest identificeres de involverede kromosomer, ved en farvning i metafasen, (som vist i figur 1a) og selve processen med at opnå kromosomer i denne fase er langvarig. Ved denne båndfarvning af metafasekromosomerne kan forskellige karakteristika, såsom størrelse og båndmønster på kromosomerne hjælpe det træned øje til at identificere området for translokationen. For nærmere at bestemme brudpunktets beliggenhed anvendes "Fluorescens In Situ Hybridisering" (FISH), hvor fluorescerende markører placeret omkring brudpunktet, kan fortælle, om bruddet ligger på den ene eller anden side af markøren. Også her kræves kromosomer i metafasen. Denne analyse foretages på nuværende tidspunkt ved visuel inspektion med fluorescens-mikroskop.

Forskningsassistent Linda Boye Jensen arbejder i samarbejde med Panum Institutet på at undersøge, hvordan man bedst muligt kan integrere FISH-analysemetoden, eller alternativt finde en anden integrerbar analysemetode. Her ønsker vi ved at kombinere mikroteknologi med biokemi og molekylær genetik at muliggøre kromosomanalysen på en chip. Det vil have stor fremtidig værdi for diagnosticering og behandling

af genetiske sygdomme, hvis man forholdsvis let, hurtigt og på en billig måde kan analysere kromosomale translokationer ved hjælp af det her omtalte system.

Konklusion

Et integreret totalanalyse-system for kromosom translokationer har potentiale for at revolutionere opdagelsen af sygdomsforårsagende gener ved at have "high throughput" i forhold til eksisterende kortlægnings-metoder. Samtidig har det en potentiel fremtidig diagnostisk anvendelse, såfremt prisen kan holdes nede, så en analyse eventuelt vil kunne foregå hos den praktiserende læge ud fra en enkelt dråbe blod. Yderligere er der potentiale for at medvirke til udviklingen af skræddersyet medicin ved forøget viden om omfang og type af genetiske ændringer i diverse sygdomme. Projektet er i opstartsfasen og mange muligheder bliver undersøgt på nuværende tidspunkt. Målet er over en to års periode at have fundet de optimale metoder til sortering og analyse og derefter starte udviklingen af en prototype på et total integreret system som kan bruges i laboratoriet, og muligvis på et senere tidspunkt have kommerciel anvendelse.

Litteratur

- [1] J.D. Rowley (2001), Nature Rev. Cancer, **1**, 245-250.
- [2] P.A. Futreal et al. (2004), Nature Rev. Cancer, **4**, 177-183.
- [3] Sjældne kromosomafvigelser, informationshæfte, <http://www.uniquedanmark.dk/genetik/-OmKromosomafvigelser.pdf>
- [4] J. Takagi et al. (2005), Lab Chip, **5**, 778-784.

- [5] D. Di Carlo, L. Y. Wu, and L. P. Lee (2006), Lab Chip, **6**, 1445-9.
- [6] M. Deutsch, A. Deutsch, O. Shirihai, I. Hurevich, E. Afrimzon, Y. Shafran, and N. Zurgil (2006), Lab Chip, **6**, 995-1000.
- [7] http://biology.berkeley.edu/crl/flow_cytometry_basic.html
- [8] www.comsol.dk
- [9] S. Zheng et al. (2005), Proceedings of the 2005 IEEE Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference, p.1024-1027.
- [10] D.F.C.M. Smeets (2004), Clinical Biochemistry, **37**, 439-446.



Winnie Svendsen blev kandidat i 1993 fra University College Dublin, Irland, her modtog hun EOLAS udnævnelsen for fremragende forskning. I 1996 blev hun ph.d. fra Københavns Universitet og Forskningscenter RISØ. I 2000 blev hun lektor ved Danmarks Tekniske Universitet, hvor hun er ansat på MIC – Institut for Mikro- og Nanoteknologi.



Maria Dimaki blev kandidat i 2001 ved Imperial College of London, Department of Biotechnology, England. I 2004 blev hun ph.d. fra Danmarks Tekniske Universitet, ved MIC – Institut for Mikro- og Nanoteknologi, hvor hun er ansat som postdoc i dag.

Nyt fra Dansk Geofysisk Forening

Foredrag i foråret 2007

Foredragsrækkerne i Astronomisk Selskab og Selskabet for Naturlærers Udbredelse er i gang (se Foredragskalenderen i sidste nummer). Dansk Geofysisk Forening afholder desuden foredraget:

Udsigten til den næste istid af *Peter Ditlevsen* tirsdag den 6. marts kl. 19.00. Foredraget afholdes i Auditoriet, Juliane Maries Vej 30, 2100 København Ø.

DGFs Rejselegat

Ansøgningsfrist 1. april 2007.

Målgruppe: 2.-dels geofysikstuderende ved KU og AU, som ønsker dækning af registreringsgebyr og rejseudgifter ved deltagelse i konferencer, møder, feltarbejde, udlandsophold eller lignende.

Støtte: Op til 10.000 kr. årligt, der deles ud i flere portioner.

Ansøgning: Skal indeholde beskrivelse af formål, forventet budget, en kopi af bachelorbevis/karakterudskrift samt udtalelse fra vejleder eller lignende. Der skal efterfølgende afleveres en kort redegørelse.

Geofysikdag 2007 -arrangement for studerende

Fredag den 13. april 2007 arrangerer Dansk Geofysisk Forening og Geofysisk Studenterforening for femte gang *Geofysikdag* for alle studerende med interesse i geofysik. Der vil være studenterpræsentationer, virksomhedsmesse samt et festforedrag. Vi er i øjeblikket ved at sammensætte programmet. Tilmelding sker via hjemmesiden: www.dgf.gfy.ku.dk

Vigtige datoer: 28. marts – Deadline for indsendelse af abstract. Den 13. april – Geofysikdag.

Geofysikdag giver dig muligheder...

- Hør om spændende muligheder for at arbejde med geofysik
- Få inspiration til en kommende opgave
- Præsenter dit projekt for andre og øv dig i at formidle
- Lær studerende med samme interesser som dig at kende.

Adressen er: Rockefeller Komplekset, Juliane Maries Vej 30, 2100 København Ø.