



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 102 60 071 A1 2004.07.08

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 102 60 071.6
(22) Anmeldetag: 19.12.2002
(43) Offenlegungstag: 08.07.2004

(51) Int Cl.7: **C12M 1/42**
C12M 1/26, C12M 1/34, G01N 21/63,
G01N 27/447, G01N 21/71

(71) Anmelder:
**GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH,
21502 Geesthacht, DE; Galab Technologies
GmbH, 21502 Geesthacht, DE**

(72) Erfinder:
**Schwenke, Heinrich, 21039 Escheburg, DE; Knoth,
Joachim, 21481 Lauenburg, DE; Beaven, Peter,
Dr., 21465 Reinbek, DE; Jantzen, Eckard, Dr.,
22303 Hamburg, DE**

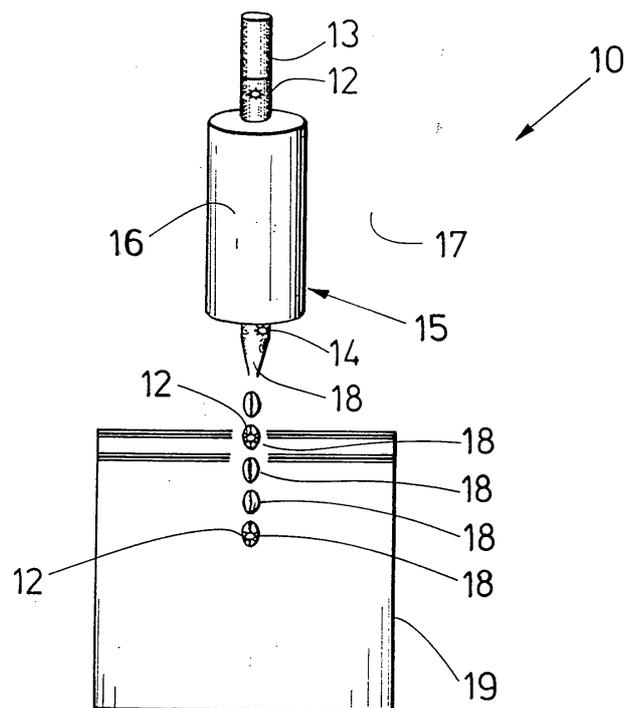
(74) Vertreter:
Niedmers & Seemann, 22767 Hamburg

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Vorrichtung zur Analyse von in einer Flüssigkeit enthaltenen biologischen Zellen**

(57) Zusammenfassung: Es wird eine Vorrichtung (10) zur Analyse von in einer Flüssigkeit (11) enthaltenen biologischen Zellen (12) vorgeschlagen. Durch eine Vorratseinrichtung (13), in der die die biologischen Zellen (12) enthaltende Flüssigkeit (11) aufgenommen wird, wird ein Behälter gebildet. Ein austrittsseitiges Ende (15) der Vorratseinrichtung (13) ist mit einem piezoelektrischen Element (16) derart versehen, daß es, sich unter dem Einfluß eines an das piezoelektrische Element angelegten Spannungsimpulses zusammenziehend, infolgedessen wenigstens einen Tropfen der die Zelle enthaltenden Flüssigkeit abgibt, der nachfolgend in eine Analyseeinrichtung gebbar ist.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Analyse von in einer Flüssigkeit enthaltenen biologischen Zellen.

[0002] In der DE-A-100 02 970 ist eine Vorrichtung zur Analyse von in Flüssigkeiten enthaltenen Elementen beschrieben. Die dort beschriebene Analyse kleinster Probenvolumina im Bereich von μl und weniger, wird dort derart betrieben, daß Laserlicht auf eine in einem Analyseraum tropfenförmig eingebbbare Flüssigkeit zur Erzeugung eines Plasmas der tröpfchenförmigen Flüssigkeitsprobe gegeben wird. Das vom Plasma emittierte Licht wird dann auf eine Analyseeinrichtung gegeben, wobei aus den von der Analyseeinrichtung ermittelten Parametern Aufschlüsse über die chemische Zusammensetzung der Probe gewonnen werden können.

[0003] Handelt es sich bei den Probenvolumina allerdings um Flüssigkeiten, in denen biologische Zellen vorhanden sind, versagt die vorerwähnte Methode, da durch die Überführung des Probenvolumens in ein Plasma die in der Flüssigkeit enthaltene biologische Zelle zerstört werden würde und Aufschlüsse über die Zusammensetzung und/oder den Aufbau der Zelle, die das eigentliche Analyseziel sind, nicht möglich wären.

[0004] Allgemein werden nach dem Stand der Technik die derzeit empfindlichsten Analysen an flüssigen Proben so durchgeführt, daß die Probe durch sogen. "Nebulizer" in eine Tröpfchenwolke überführt wird. Die Tröpfchen werden dann verschiedenen Prozeduren unterworfen, d.h. sie werden bspw. in einen Plasmazustand versetzt, siehe auch oben, oder sie werden durch ein elektrisches Feld aufgeladen und anschließend z.B. durch Verdampfung verkleinert, um elektrische Ladungen auf Molekülstrukturen zu übertragen. In einem zweiten Schritt werden die entsprechend konditionierten Tropfen bspw. in ein Massenspektrometer zur Analyse der Tropfen überführt. Auf diese Weise erhält man je nach Vorbehandlung der Tropfen entweder die Elementzusammensetzung, über den Plasmazustand, oder Aussagen über die molekularen Strukturen der Probe durch Aufladung von Molekülen oder Molekülbruchstücken.

[0005] Sind allerdings Analysen einzelner biologischer Zellen, die in einer Flüssigkeit enthalten sind, durchzuführen, d.h. will man Aufschluß über die biologische Struktur und die chemische Zusammensetzung intakter biologischer Zellen erhalten, versagt auch das vorbeschriebene sogen. "Nebulizer"-Verfahren.

[0006] Es ist somit Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Vorrichtung zu schaffen, bei der unter Beibehaltung an sich bekannter und bewährter Analysetechniken der chemischen Element- bzw. Molekülanalytik die Analyse einzelner, isolierter und intakter biologischer Zellen möglich ist, ohne daß im Zuge der Aufbereitung der Zellen bzw. der Flüssigkeit, in der die Zellen enthalten sind, d.h. gewissermaßen

"schwimmen" die Zellen in ihrer biologischen und chemischen Struktur beeinträchtigt werden.

[0007] Gelöst wird die Aufgabe gemäß der Erfindung durch eine Vorratseinrichtung, in der die biologischen Zellen enthaltende Flüssigkeit aufgenommen wird, wobei ein austrittsseitiges Ende der Vorratseinrichtung mit einem piezoelektrischen Element derart versehen ist, daß es, sich unter dem Einfluß eines an das piezoelektrische Element angelegten Spannungsimpulses zusammenziehend, infolgedessen wenigstens einen Tropfen der die Zellen enthaltenden Flüssigkeit abgibt, der nachfolgend in eine Analyseeinrichtung gebbar ist.

[0008] Der Vorteil der erfindungsgemäßen Lösung besteht darin, daß nicht Kollektive von Tröpfchen in einer Nebelwolke, wie bisher bei im Stand der Technik bekannten chemischen Element- bzw. Molekülanalyseverfahren, erzeugt werden, sondern einzelne Tröpfchen gewissermaßen als "Transportbehältnisse" für einzelne biologische Zellen erzeugt werden, die dann einer Analyse in einer Analyseeinrichtung unterzogen werden können, die an sich nach bekannten analytischen Prinzipien betrieben wird. Es ist also erfindungsgemäß tatsächlich möglich, wie aufgabengemäß angestrebt, einzelne isolierte biologische Zellen zu analysieren.

[0009] Ein weiterer wesentlicher Vorteil ist, daß das piezoelektrische Element bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung einen hochpräzise arbeitenden und hochpräzise steuerbaren Tröpfchengenerator darstellt. Das piezoelektrische Element zieht sich unter dem Einfluß eines Spannungsimpulses in Abhängigkeit der Länge des Spannungsimpulses ruckartig zusammen bzw. gibt bei elektrisch inversen Impulsen entsprechend der Länge des Spannungsimpulses ein entsprechendes Tropfenvolumen ab. Entsprechend einer vorbestimmbaren Wiederholungsrate der Spannungsimpulse kann eine Folge von Tropfen mit zeitlich vorwählbaren Abständen zwischen den Tropfen hergestellt werden, wodurch eine Analyse der Einzeltropfen und deren Auswertung möglich ist und nach entsprechender Speicherung der Analyseergebnisse ebenfalls eine statistische Bewertung der Analyseergebnisse möglich ist.

[0010] Mittels einer statistischen Auswertung der Signale einer ausreichend großen Zahl von Tropfen können vereinzelte Zellen immer dann und nur dann mit ausreichender Sicherheit bzw. mit einem angemessenen kleinen Fehler analysiert werden, wenn die Zahl der Zellen in Tropfen klein ist, d.h. daß vorzuzugweise der Tropfen keine oder eine ganzzahlige Zahl von Zellen enthält, wobei vorzugsweise die Zahl der Zellen pro Tropfen < 5 ist.

[0011] Durch das Anlegen eines geeignet polarisierten Spannungsimpulses kann das piezoelektrische Element auch gewissermaßen als Pumpe betrieben werden, indem es sich nämlich unter dem Einfluß des Spannungsimpulses ruckartig zusammenzieht, so daß sowohl eine Pumpe als auch ein Tropfengenerator geschaffen wird. Bei dieser Betriebsweise ist so-

mit die Vorratseinrichtung durch Unterdruck mit der Flüssigkeit, in der die Zellen enthalten sind, befüllbar, es ist aber auch möglich, die Vorratseinrichtung bspw. als Kapillare auszubilden, so daß diese mit der die Zellen enthaltenden Flüssigkeit befüllt wird. Die Vorratseinrichtung ist in diesem Fall vorzugsweise ein kapillares Gefäß.

[0012] Als Analyseeinrichtung können alle geeigneten Analyseeinrichtungen, wie sie für die Ausführung bekannter Analysemethoden im Stand der Technik bekannt sind und verwendet werden, herangezogen werden. Vorzugsweise ist die mit der Erfindung zusammenwirkende Analyseeinrichtung jedoch ein Massenspektrometer.

[0013] Für bestimmte Analyseschritte kann es notwendig sein, in dem gem. der Vorrichtung erzeugten Tropfen, der die Zelle enthält, bestimmte Reaktionen durchzuführen, bspw. das gezielte Platzen der Zellwände zu induzieren. Dazu eignet sich eine weitere Ausgestaltung der Vorrichtung auf ganz besonders vorteilhafte Weise, indem nämlich wenigstens zwei Vorratseinrichtungen vorgesehen sind, an denen an deren jeweiligen austrittsseitigen Enden das piezoelektrische Element derart angeordnet ist, daß es, sich unter dem Einfluß eines jeweils an die piezoelektrischen Elemente angelegten Spannungsimpulses zusammenziehend, infolgedessen bei einer Vorratseinrichtung einen Tropfen der die Zelle enthaltenden Flüssigkeit und bei der anderen Vorratseinrichtung einen Tropfen einer vorbestimmten Flüssigkeitszusammensetzung abgibt, wobei der die Zelle enthaltende Tropfen und der Tropfen aus der vorbestimmten Flüssigkeitszusammensetzung vor Eintritt in die Analyseeinrichtung zu einem Tropfen vereinigt werden.

[0014] Bei dieser vorteilhaften Weiterbildung der Vorrichtung wird der die Zelle enthaltende Tropfen mit einem weiteren Tropfen quasi beschossen, wobei der zweite Tropfen vorbestimmte Stoffe enthalten kann bzw. Ladungen transportieren kann, die in dem die Zelle enthaltenden Tropfen, wie angestrebt, eine geeignete, gewünschte Reaktion, wie bspw. das Platzen der Zellwände usw., auslösen.

[0015] Die Erfindung wird nachfolgend unter Bezugnahme auf die beigefügten schematischen Zeichnungen anhand eines Ausführungsbeispiels und anhand eines modifizierten Ausführungsbeispiels im einzelnen beschrieben. Darin zeigen:

[0016] **Fig. 1** den Grundaufbau der Vorrichtung beim Beladen der Vorrichtung mit einer biologische Zellen enthaltenden Flüssigkeit,

[0017] **Fig. 2** die Vorrichtung gem. **Fig. 1** im Zustand der Beladung mit einer biologische Zellen enthaltenden Flüssigkeit,

[0018] **Fig. 3** die Vorrichtung bei der Abgabe von zu analysierenden Tropfen und

[0019] **Fig. 4** eine Vorrichtung, bei der zwei Vorratseinrichtungen vorgesehen sind, wobei die eine Vorratseinrichtung Zellen enthaltende Tropfen aus Flüssigkeiten abgibt und die andere Vorratseinrichtung

Tropfen aus Flüssigkeiten bzw. Flüssigkeitsgemischen vorbestimmter Art bzw. vorbestimmter Zusammensetzung abgibt, wobei vor Eintritt in die Analyseeinrichtung beide unterschiedlichen Arten von Tropfen zusammengeführt und im zusammengeführten Zustand auf die Analyseeinrichtung gegeben werden.

[0020] Die Erfindung wird nun zunächst unter Bezugnahme auf die **Fig. 1** und **2** beschrieben.

[0021] Die Vorrichtung **10** umfaßt eine Vorratseinrichtung **13**, die bspw. als kapillares Gefäß ausgebildet sein kann. Die Vorratseinrichtung **13** weist eine als Auslaß und Einlaß wirkende Öffnung **14** auf, über die Flüssigkeit **11**, in der zu untersuchende bzw. zu analysierende biologische Zellen **12** gewissermaßen schwimmend aufgenommen sind. Um ein austrittsseitiges Ende **15** der Vorratseinrichtung **13** ist ein piezoelektrisches Element **16** angeordnet, das seine Struktur in Abhängigkeit einer angelegten Spannung ändert. Das piezoelektrische Element **16** kann somit gezielt kontrahieren bzw. sich erweitern. Dadurch ist es möglich, daß bei Anlage eines geeignet polarisierten Spannungsimpulses **17** über die Einlaß- bzw. Auslaßöffnung **14** aus einem Flüssigkeitsvorrat **20** Flüssigkeit **11** einschl. der in der Flüssigkeit **11** schwimmenden biologischen Zellen **12** in die Vorratseinrichtung **13** gepumpt wird. Die mit Flüssigkeit **11** und Zellen **12**, die hier durch eine Sternchen-Darstellung symbolisiert sind, gefüllte Vorratseinrichtung **13** ist in **Fig. 2** dargestellt. Im Flüssigkeitsvorrat **20** befindet sich dann keine Flüssigkeit mehr.

[0022] Es sei noch darauf hingewiesen, daß ein Flüssigkeitsvorrat **20** in Form eines abgeschlossenen Behältnisses, wie es in den **Fig. 1** und **2** schematisch dargestellt wird, zur Befüllung der Vorratseinrichtung **13** nicht zwingend erforderlich ist. Mittels der Vorrichtung **10** kann auch die die biologischen Zellen **12** enthaltende Flüssigkeit von einer beliebigen Flüssigkeitsoberfläche abgenommen werden, die mit der zu analysierenden Flüssigkeit behaftet ist.

[0023] In **Fig. 3** ist die Vorrichtung **10** in kompletter Form dargestellt, d.h. im Zusammenwirken der mit einer der die Zellen **12** enthaltenden Flüssigkeit **11** gefüllten Vorratseinrichtung **13**.

[0024] Durch Anlegen eines geeignet langen und eines geeignet polarisierten Spannungsimpulses **17** kann das piezoelektrische Element **16** einen Tropfen **18** ausstoßen, der in die Analyseeinrichtung **19**, bspw. durch Schwerkraft getrieben, eingeführt wird. Die Anzahl der Tropfen **18** pro Zeit, die mittels der Vorrichtung **10** erzeugt wird, ist eine Funktion der Folge der Spannungsimpulse **17**, die an das piezoelektrische Element **16** angelegt werden. Die Zellen **12** verteilen sich nach den Regeln der Statistik auf die einzelnen Tropfen **18**, was in **Fig. 3** dadurch symbolisiert ist, daß einzelne Tropfen **18** eine Zelle **12** enthalten und einzelne Tropfen **18** nicht. Die Tropfen **18** werden einzeln in der Analyseeinrichtung **19** analysiert, die bspw. ein Massenspektrometer ist, d.h. die Tropfen werden mit der bekannten massenspektro-

metrischen Methode analysiert.

[0025] Hervorzuheben ist, daß die die Zellen **12** enthaltende Flüssigkeit **11** mittels der Vorrichtung **10** bei ihrem bestimmungsgemäßen Betrieb quantitativ und verlustfrei in eine Reihe von Tropfen **18** überführt wird. Durch geeignet eingestellte Länge des Spannungsimpulses **17** kann das Volumen der Tropfen **18** so bemessen werden, daß nur eine sehr kleine Zahl von Zellen **12** in einen Tropfen **18** aufgenommen wird. Es ist mittels der Vorrichtung **10** möglich, Tropfen **18** zu generieren, bei der lediglich eine Zelle **12** pro Tropfen **18** enthalten sind.

[0026] **Fig. 4** zeigt eine Vorrichtung **10**, bei der zwei Vorratseinrichtungen **13**, **130** vorgesehen sind. Die Vorrichtungen **13**, **130** weisen einen identischen Aufbau auf, wie er vorangehend beschrieben worden ist, was gleichermaßen für den Befüllvorgang mit Flüssigkeiten **11** gilt und den Mechanismus der Abgabe der Tropfen **18** bzw. **180**. Der Unterschied gegenüber der in den **Fig. 1 bis 3** dargestellten Vorrichtung **10** ist jedoch der, daß in der einen Vorratseinrichtung **13** die Flüssigkeit **11** gespeichert ist, die die biologischen Zellen **12** enthält, während in der anderen Vorratseinrichtung **130** eine Flüssigkeit **110** enthalten ist, die bspw. zellenfrei ist, die allerdings so in Bezug auf ihre Art und Zusammensetzung gewählt werden kann, daß sie bspw. mit der die biologischen Zellen **12** enthaltenden Flüssigkeit **11** reagieren kann oder lediglich mit den Zellen **12**, wenn diese in den Tropfen **18** quantifiziert aus dem Auslaß **14** bzw. dem Auslaß **140** austreten und vor Eintritt in die Analyseeinrichtung **19** zu einem neuen Tropfen **21** vereinigt werden. Es können somit am Vereinigungspunkt der Tropfen **18** und **180** nicht nur geeignete Reaktionen im Tropfen **18** bzw. an den bzw. in den biologischen Zellen **12** ablaufen, vielmehr können auch für bestimmte Untersuchungsziele Reagenzien zugeführt werden, die in dem Tropfen **12** am Vereinigungspunkt geeignete Reaktionen wie z.B. das Platzen der Zellwände der Zellen **12** auslösen.

[0027] Die von der Analyseeinrichtung gelieferten Analyseergebnisse, was sowohl für die Vorrichtung **10** gemäß den **Fig. 1 bis 3** gilt als auch für die Vorrichtung **10** gem. **4**, werden ausgewertet und gespeichert. Die Reihe der Analyseergebnisse kann dann einer statistischen Bewertung unterworfen werden. Dabei werden verschiedene, in einer Flüssigkeitsprobe vorhandene Arten von Zellen **12** unterschieden. Die Zahl der Zellen **12** pro Tropfen **18** wird ermittelt. Tropfen **18**, die keine Zellen **12** transportieren, werden erkannt. Die Prozedur wird dadurch vereinfacht, daß die Zahl der Zellen **12**, die in einem Tropfen **18** enthalten sind, bei geeigneter Einstellung des Volumens der Tropfen **18** lediglich zwischen null und einer sehr kleinen Zahl variieren kann.

[0028] Im Falle einer Reihe gleichartiger Zellen **12** werden die Signale von Tropfen **18**, in denen Zellen **12** transportiert werden, normiert und zur Erhöhung der Genauigkeit gemittelt. Signale von Tropfen **18**, die keine Zelle **12** enthalten, werden in jedem Falle

gemittelt und zur Bestimmung eines Untergrundsignals herangezogen.

Bezugszeichenliste

10	Vorrichtung
11	Flüssigkeit
110	Flüssigkeit
12	biologische Zellen
13	Vorratseinrichtung
130	Vorratseinrichtung
14	Auslaß/Einlaß
140	Auslaß/Einlaß
15	austrittsseitiges Ende
150	austrittsseitiges Ende
16	piezoelektrisches Element
160	piezoelektrisches Element
17	Spannungsimpuls
170	Spannungsimpuls
18	Tropfen
180	Tropfen
19	Analyseeinrichtung
20	Flüssigkeitsvorrat
21	Tropfen (verschmolzener)

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Analyse von in einer Flüssigkeit enthaltenen biologischen Zellen, gekennzeichnet durch eine Vorratseinrichtung (**13**), in der die die biologischen Zellen (**12**) enthaltende Flüssigkeit (**11**) aufgenommen wird, wobei ein austrittsseitiges Ende (**15**) der Vorratseinrichtung (**13**) mit einem piezoelektrischen Element (**16**) derart versehen ist, daß es, sich unter dem Einfluß eines an das piezoelektrische Element (**16**) angelegten Spannungsimpulses (**17**) zusammenziehend, in folgedessen wenigstens einen Tropfen (**18**) der die Zelle (**12**) enthaltenden Flüssigkeit (**11**) abgibt, der nachfolgend in eine Analyseeinrichtung (**19**) gebbar ist.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Tropfen (**18**) keine oder eine ganzzahlige Zahl von Zellen (**12**) enthält.

3. Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Zahl der Zellen (**12**) pro Tropfen (**18**) < 5 ist.

4. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorratseinrichtung (**13**) durch Kapillarkraft und/oder Unterdruck mit der Flüssigkeit (**11**) befüllbar ist.

5. Vorrichtung nach einem oder beiden der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorratseinrichtung (**13**) ein kapillares Gefäß ist.

6. Vorrichtung nach einem oder mehreren der

Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Analyseeinrichtung (19) ein Massenspektrometer ist.

7. Vorrichtung nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens zwei Vorratseinrichtungen (13, 130) vorgesehen sind, an denen an deren jeweiligen austrittsseitigen Enden (15, 150) das piezoelektrische Element (16, 160) derart angeordnet ist, daß es, sich unter dem Einfluß jeweils eines an die piezoelektrischen Elemente (16, 160) angelegten Spannungsimpulses (17, 170) zusammenziehend, infolgedessen bei einer Vorratseinrichtung (13) einen Tropfen (18), der die Zelle (17) enthaltenden Flüssigkeit (11) und bei der anderen Vorratseinrichtung (130) einen Tropfen (180) einer vorbestimmten Flüssigkeitszusammensetzung abgibt, wobei der die Zelle (12) enthaltende Tropfen (18) und der Tropfen (180) aus der vorbestimmten Flüssigkeitszusammensetzung vor Eintritt in die Analyseeinrichtung (19) zu einem Tropfen (21) vereinigt werden.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Fig. 1

Fig. 2

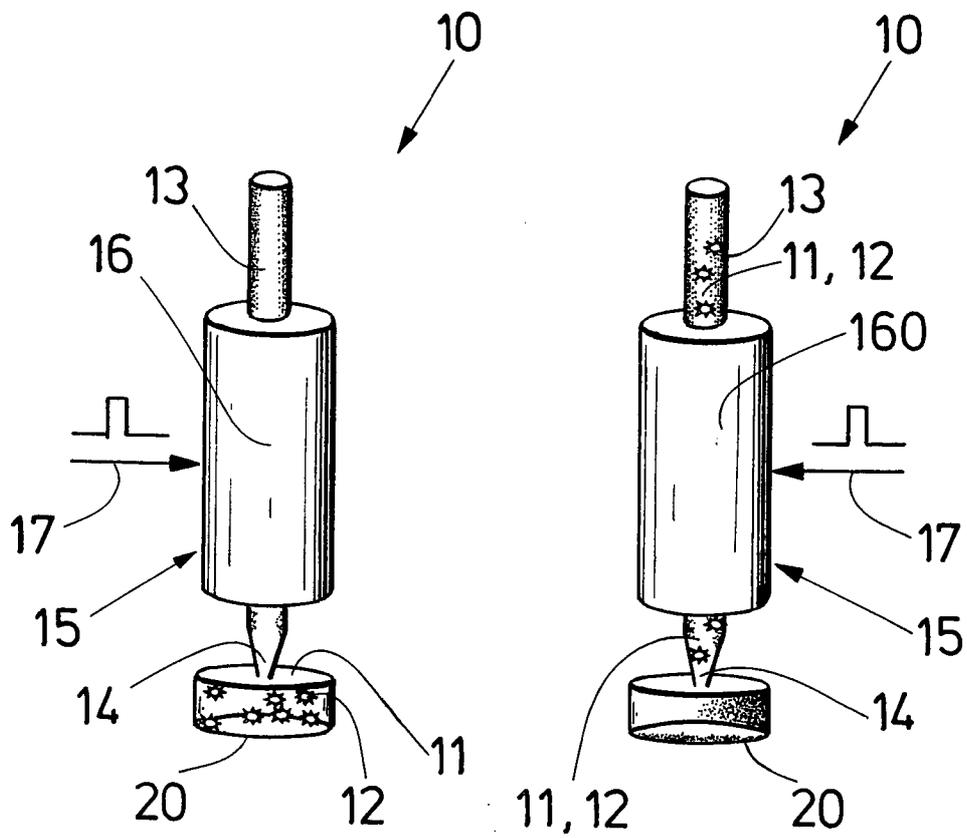


Fig. 3

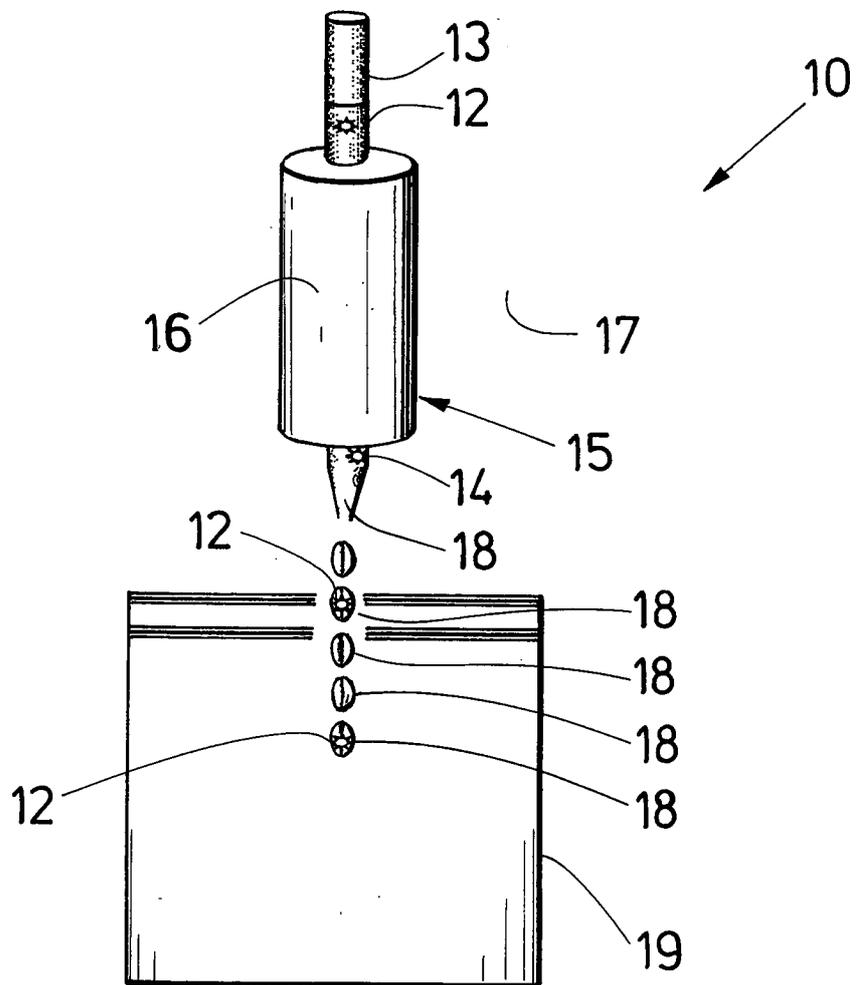


Fig. 4

