

Automated microinjection with integrated cell sorting, immobilization and collection

Doctoral Thesis

Author(s):

Graf, Siegfried F.

Publication date:

2011

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006682141>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH No. 19893

Automated Microinjection with Integrated Cell Sorting, Immobilization and Collection

DISSERTATION

Submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
DOCTOR OF SCIENCES

by
SIEGFRIED FEDERICO GRAF

Dipl. Ing. ETH Zurich, MAVT

born September 30, 1978

citizen of Schötz (LU), Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Andreas Stemmer, examiner
Prof. Dr. Bradley Nelson, co-examiner
Dr. Helmut F. Knapp, co-examiner

Alpnach, 2011

Abstract

One of the first steps in cell assay experiments is the cell preparation. One step of cell preparation often is the introduction of genetic material into cells. This process is called transfection, and causes cells to express proteins of other species. For example in drug discovery, to receive valuable results for human drugs, these cells are equipped with human membrane proteins by transfecting the cell with the coding messenger RNA. About two thirds of currently available drugs depend on such membrane proteins. Various transfection methods evolved over the past decades, spanning from biological methods like viral transfection to chemical methods like transfection by synthetic compounds over electrical methods known as electroporation to a mechanical method called microinjection, where a glass needle is used to transfer the genes into the cell. Advantages of microinjection over the competitive methods are its high yield and its highest flexibility of introducing even a combination of compounds into various different cell types. However, microinjection has a low throughput and the yield is highly user dependent. These two drawbacks call for automation. In the past, various systems were presented which focused solely on the microinjection process. Injection needles can automatically be detected, injection volumes can be calibrated, and forces applied to the cell during microinjection can be measured. Even do methods exist which are able to detect blocked or broken needles. These systems help to increase the throughput and minimize human error during microinjection. However, analyzing the complete cycle of cell preparation identifies another bottleneck. This is the identification of viable cells for later microinjection. In many laboratories this step is done manually because none or only highly expensive systems can perform such tasks. To rule out human errors on the final microinjected cell, not only the microinjection but also the upfront cell sorting has to be automated and put into one system.

Therefore, the scope of this thesis was widened from only automating microinjection to automated sorting and microinjecting. Finally, a system could be presented where the user only has to add a cell suspension and a prefilled injection needle. The sorting, microinjection and collection were then performed automatically by the system. Along this novel approach of combining sorting, injection and collection into one system, the sorting system uses a continuous sorting principle which moves cells in a circle continuously, so delivery of cells on demand is now for the first time possible. Furthermore, the microinjection system was equipped with a carousel stage, which now enables one to perform repetitive steps as cell immobilization, cell injection and cell

collection simultaneously for subsequent cells. The effectiveness and performance were tested. Results show that membrane proteins were expressed similar to the manual microinjection. The performance of the automated system is slightly faster and allows one to prepare for example batches of 400 oocytes in one day instead of the two days previously needed. The sorter was also used as a standalone version in connection with a well plate feeder. This allowed one to dispense zebrafish eggs out of a suspension into 96-well plates in a similar speed to the manual technique, but the same quality could be sustained over 24 hours while lab personal can only perform this task for about 3 hours before exhaustion.

The methods and systems developed in this thesis allow one to increase the quality but also the throughput compared to currently manually performed processes. Focus was on high qualitative sorting and transfecting results but also on operator friendliness of the systems. The techniques for the novel sorting principle and the carousel principle for microinjection were protected with patent applications. Furthermore, the system for sorting and microinjecting *Xenopus laevis* oocytes as well as the system for dispensing individual zebrafish eggs into single wells of a multi-well plate were published in the journal of the association for laboratory automation (JALA). The publication on the zebrafish egg sorting system additionally was selected as the cover story for the April 2011 issue of JALA, to highlight the novelty of replacing the exhausting manual large cell handling processes with a low cost automated system.

Kurzfassung

Einer der ersten Schritte von zellbasierten Untersuchungen ist die Präparation der Zellen. Meist beinhaltet dieser Schritt die Zellen mit Genen zu modifizieren, so dass Proteine von anderen Zellarten exprimiert werden. In der Medikamentenforschung zum Beispiel, werden relativ einfach zu handhabende nicht-humane Zellen mit menschlichen Membranproteinen ausgestattet. Dies geschieht über die Transfektion der Zelle mit Boten-RNA. Zwei Drittel der kommerziell erhältlichen Medikamente wirken nur dank dieser Membranproteine. In den vergangenen Jahrzehnten wurden etliche Transfektionsmethoden entwickelt, vom biologischen Ansatz mittels Virus, dem chemischen Ansatz mit synthetischen Substanzen, dem elektrischen Ansatz genannt Elektroporation bis zum mechanischen Ansatz genannt Mikroinjektion, wo eine Glasnadel den zu injizierenden Stoff in die Zelle transportiert. Vorteil der Mikroinjektion ist die hohe Überlebensrate wie auch die grosse Flexibilität, Kombinationen von unterschiedlichsten Stoffen in unterschiedlichste Zelltypen zu injizieren. Wesentliche Nachteile der Mikroinjektion sind aber der geringe Durchsatz wie auch der grosse Einfluss des Benutzers. Diese zwei Punkte rufen förmlich nach Automation. Unterschiedlichste automatisierte Lösungen für die Mikroinjektion wurden schon präsentiert. Unter anderem können Injektionsnadeln automatisch detektiert, Injektionsvolumen automatisch kalibriert und wirkende Kräfte auf Zellen gemessen werden. Sogar die Fähigkeit gebrochene oder verstopfte Kapillaren zu detektieren wurde gezeigt. Diese Systeme ermöglichen die Injektionsqualität erheblich zu verbessern und auch den Durchsatz zu erhöhen. Doch beim Analysieren des gesamten Präparationprozesses zeigt sich, dass ein weiterer Flaschenhals beim Sortieren existiert. Dieser Schritt ist in vielen Labors noch immer manuell da kein oder nur sehr kostspielige Systeme erhältlich sind. Um also menschliche Fehler zu minimieren und den Durchsatz zu erhöhen, sollte nicht nur die Mikroinjektion sondern auch der vorhergehende Schritt, die Zellsortierung, automatisiert und mit der Mikroinjektion kombiniert werden.

Das Ziel dieser Dissertation war deshalb, nebst der Mikroinjektion auch das automatische Sortieren in einem Gerät zu ermöglichen. Das Resultat dieser Arbeit ist ein System, welches voll automatisch Zellen sortiert, mikroinjiziert und schlussendlich in einem Behälter sammelt. Nebst diesem neuartigen Ansatz der Kombination von Sortieren, Mikroinjizieren und Sammeln arbeitet das System mit einem kontinuierlichen Sortierprinzip, welches zum ersten Mal erlaubt, Zellen kontinuierlich

kreisen zu lassen und auf Abruf geeignete Zellen zu liefern. Zudem ist das Injektionssystem mit einem Karussellapparat ausgerüstet. So kann man die seriellen Prozesse von der Zellimmobilisation, Zellinjektion und Sammeln parallel für aufeinanderfolgende Zellen durchführen. Die Effektivität und Durchsatz wurden im Labor getestet. Die Resultate zeigen, dass die Membranproteine ähnlich zum manuellen Vergleichsversuch exprimiert werden konnten. Dank des Systems konnte eine typische Liefermenge von 400 *Xenopus laevis* Oozyten in einem statt in zwei Tagen realisiert werden. Der Sortierer wurde auch als eigenständiges Gerät verwendet, um Eier des Zebrafisches in Suspension in 96er Mikrotiterplatten zu dispensieren. Die Durchsatzzeit war vergleichbar mit dem manuellen Prozess doch kann das System eine konstante Qualität über 24 Stunden liefern, wo ein Laborant nach 3 Stunden erschöpft ist.

Die in dieser Dissertation erarbeiteten Methoden und Systeme, erlauben die Qualität wie auch den Durchsatz im Vergleich zum manuellen Prozess zu erhöhen. Der Fokus dieser Dissertation wurde aber nicht nur auf die hohe Qualität des Sortierens und Mikroinjizierens gelegt, sondern auch auf die Benutzerfreundlichkeit. Die Methoden für das neuartige Sortierprinzip wie auch das durchsatz erhöhende Karussellsystem sind mit Patentanmeldungen geschützt. Zusätzlich wurde das System zum automatischen Sortieren und Mikroinjizieren für *Xenopus laevis* Oozyten wie auch das System zum Vereinzeln von Zebrafischeiern in Mikrotiterplatten im Journal für Laborautomation (JALA) veröffentlicht. Letztere Publikation wurde ausserdem in der April 2011 Ausgabe von JALA als Titelgeschichte ausgewählt, welche die neuartige Möglichkeit aufzeigt, den ermüdenden manuellen Prozess der Zelldispension durch ein kostengünstiges automatisches System zu ersetzen.