

Diss. ETH No. 21352

Manipulating cells and colloids with FluidFM

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

For the degree of Doctor of Sciences

(Dr. sc. ETH Zürich)

Presented by

Stefan Pablo Dörig MSc ETH

Born on June 19, 1984

Citizen of Switzerland

July 2013

Referee PD Dr. Tomaso Zambelli

Co-Referee Prof. Dr. Janos Vörös

Co-Referee Dr. Clemens Franz

Abstract

Pipettes and syringes are well-known tools in biomedicine, and so are their miniaturized versions, the glass micropipettes. These extremely fine pipettes have become renowned in the context of in-vitro fertilization and cloning. My thesis is based on an even smaller pipette- and syringe technology, the fluid force microscopy (FluidFM).

The FluidFM pipette is not only much smaller than micropipettes; it can also “feel” when it touches a surface. This is possible because FluidFM is the fusion of two recent technologies: atomic force microscopy (AFM) and microfluidics

Atomic force microscopy relies on a microscopic needle scanning a surface to “sense” the topography, like an old record player traces the music on the vinyl by touching it. While the record player needle has cm dimensions, the AFM needle has μm dimensions with a tip only a few atoms sharp. True to its name atomic force microscopy is so sensitive, that it can resolve single atoms.

Microfluidics is a branch of technology where fluids are confined in structures of micrometer dimensions, and the associated volumes can reach from μL down to fL.

By creating a hollow channel within the AFM needle the world of microfluidics can be combined with a force feedback. This is the principle of FluidFM.

Having the channel opening just next to the needle tip results in a syringe, in contrast to this an opening right on the apex leads to a pipette. FluidFM can dispense fL volumes with the precision of an AFM and therefore promises new applications in material science and microbiology.

In microbiology organisms are studied down to the single cell level, including bacteria and yeast but also mammalian cells spread on a petri dish. In the past decade it became clear, that even genetically identical cells can look and behave differently despite growing next to each other. To understand the mechanisms which lead to this distribution, there is a great interest to manipulate and investigate cells one-by-one.

FluidFM is a technology which can provide this single cell access. In my thesis I built a platform, the Skeleton, to explore such applications of FluidFM. Together with my colleagues I could then realize selected proof of principle experiments with single cells:

With the FluidFM pipette, and by using suction, we were able to pick up single bacteria, yeast and mammalian cells out of a petri dish and place them where we wanted. While picking up the cells we could also measure how strong the cells adhered to the surface. We could spot single units of a virus on single cells by gently touching their membrane and study the infection behavior. Using a FluidFM syringe instead, we could inject solutions with a controlled volume into the core of mammalian cells.

In material science one specific topic of interest is how colloids interact with their environment. Colloids are microscopic particles dispersed in a larger medium. They are everywhere in our daily life: In the shampoo we use for the morning shower, in the milk we drink afterwards, in the air when we travel to work, and in the ink of the newspaper we read meanwhile.

I could contribute to the colloid research by showing that FluidFM can be used reliably to study the interactions of single colloids with a substrate in liquid. The colloids could be attracted to the FluidFM tip by suction and were released again by a pressure pulse. This quick colloid probe exchange is unique to FluidFM and will enable the investigation of irreversible and long term colloid-substrate interactions.

Zusammenfassung

Pipetten und Spritzen sind weit verbreitete Instrumente in der Biomedizin, ebenso deren Miniaturisierungen, die sogenannten Glass Mikropipetten. Diese extrem feinen Glasnadeln sind aufgrund ihrer Anwendung in der künstlichen Befruchtung weitherum bekannt geworden. Meine Dissertation hat eine noch kleinere Spritzen oder Pipetten Technologie zur Grundlage, die fluid force microscopy (FluidFM).

Eine FluidFM Pipette ist nicht nur deutlich kleiner als eine übliche Mikropipette, sondern sie „fühlt“ auch wenn sie eine Oberfläche berührt. Dies ist möglich, da FluidFM ein Hybride zweier Technologien ist, Raster Kraft Mikroskopie (englisch atomic force microscopy AFM) und Mikrofluidik.

AFM nutzt mikroskopische Nadeln um eine Oberfläche ab zu rastern, ganz ähnlich wie ein Plattenspieler eine Schallplatte mit einer Nadel abtastet. Während ein Plattenspieler jedoch eine Nadel benutzt welche mehrere Zentimeter lang ist, ist die AFM Nadel nur einige Mikrometer gross. Getreu ihrem englischen Namen, ist ein AFM so empfindlich, dass es einzelne Atome auflösen kann.

Die Mikrofluidik ist ein Zweig moderner Technik, welcher mit Flüssigkeiten in Mikrometer grossen Gefässen arbeitet, die entsprechenden Volumen reichen dadurch von μL bis hin zu fL.

Wenn man nun einen Mikro-Kanal in die AFM Nadel integriert, so kann man die Mikrofluidik mit der extremen Kraft-Empfindlichkeit eines AFM's kombinieren. Dies ist die grundlegende Idee von FluidFM.

Mündet der Kanal gleich neben der Nadel-Spitze, so resultiert dies in einer Spritze. Endet der Kanal jedoch ganz auf dem Spitz, so erhält man eine Pipette. FluidFM kann somit fL Volumen mit der Präzision eines AFM's kontrollieren und verspricht dadurch neue Anwendungen im Bereich der Materialwissenschaften und der Mikrobiologie.

Die Mikrobiologie studiert Organismen auf Zellniveau, dabei kann es sich um Einzeller wie Bakterien oder Hefen handeln, aber auch um einzelne Zellen von Säugetieren. Im letzten Jahrzehnt wurde klar, dass sogar genetisch identische Zellen verschieden aussehen und sich unterschiedlich verhalten können, dies obwohl sie zum Teil direkt nebeneinander wachsen. Um diesen Mechanismus zu verstehen, möchten Wissenschaftler einzelne Zellen untersuchen und manipulieren können.

FluidFM hat grosses Potential hier Hand zu bieten. Während meiner Doktorarbeit konnte ich eine Plattform entwickeln, das Skeleton, welche dafür gemacht wurde solch neue FluidFM Anwendungen zu erforschen. Zusammen mit meinen Kollegen der Mikrobiologie konnte ich dann verschiedene Machbarkeitsstudien mit einzelnen Zellen realisieren:

Mit der FluidFM Pipette, und mittels Unterdruck, konnten wir einzelne Bakterien, Hefen und Säugetierzellen aufheben und an einem gewünschten Ort platzieren. Beim Aufheben der Zellen konnten wir auch quantifizieren wie stark sie am Substrat haften. Wir platzierten gezielt einzelne Viren auf der Membran von einzelnen Zellen und beobachteten den jeweiligen Infektionsverlauf. Mittels einer FluidFM Spritze konnten wir zudem direkt in den Zellkern injizieren und das injizierte Volumen kontrollieren.

In den Materialwissenschaften sind Kolloide und wie sie mit ihrer Umwelt interagieren ein spannendes Thema. Kolloide sind mikroskopische Partikel, welche in einem grösseren Medium fein verteilt sind. Sie sind überall in unserem Alltag anzutreffen: In der Haarspülung unter der Morgen-Dusche, in der Milch beim Frühstück, in der Luft auf dem Weg zur Arbeit und in der Tinte der Zeitung welche wir auf dem Weg dahin lesen.

Ich konnte zur Kolloid Forschung beitragen, indem ich zeigen konnte, dass FluidFM zuverlässig dazu benutzt werden kann die Kraft zwischen einzelnen Kolloiden und einer Oberfläche in Flüssigkeit zu messen. Die Kolloide konnten hierbei mittels Unterdruck an der FluidFM Spitze befestigt werden und nach der Messung mit einem kurzen Druckpuls wieder freigelassen werden. Dieser schnelle Austausch der einzelnen Kolloid-Sonden ist einzigartig für FluidFM und wird die Erforschung von irreversiblen Interaktionen und Langzeiteffekten ermöglichen.