



Mikrochips mod madforgiftning

Ny teknik baseret på såkaldt lab-on-a-chip-teknologi kan hjælpe med at finde skadelige bakterier i vores fødevarer både hurtigt og billigt.

Foto: Søren Petersen Fotografi

Forfatterne



James Hoyland er adjunkt
james@mci.sdu.dk



Casper Kunstmann-Olsen
er post.doc (nu Univ. of Liver-
pool, Dep. of Chemistry)
cko@liverpool.ac.uk



Stefan Johansen er
ph.d.-studerende,
johansen@mci.sdu.dk

Alle ved Mads Clausen
Institutet og NanoSYD,
Syddansk Universitet,
Sønderborg

Selv i vores moderne samfund lever vi med en konstant risiko for fødevarer, der er forurenet med skadelige bakterier. Heldigvis er der få mennesker i Danmark, der bliver alvorligt syge – eller ligefrem dør – af madforgiftning. Men milde tilfælde er stadig et forholdsvist almindeligt fænomen, som ofte får megen medieopmærksomhed. I mange tilfælde skyldes madforgiftning utilstrækkelig tilberedning eller forkert opbevaring af fødevarerne. Men i nogle tilfælde indeholder fødevarerne for store mængder af farlige bakterier allerede fra produktionen, og det er alle selvfølgelig meget interesseret i at undgå.

Typisk er det bakterier af typen salmonella, *E.coli* eller listeria, der er synderne i tilfælde af madforgiftning. Disse bakterier kan selv i meget små mængder (helt ned til nogle enkelte bakterier, afhængig af fødevaren) gøre folk syge.

Derfor er konstant analyse en nødvendighed i fødevarerproduktionen, og den er da også ofte standard hos større producenter. Konventionelle tests udføres ved at udtage stikprøver (nogle steder dagligt) og sende dem til professionelle laboratorier, som har det nødvendige udstyr og erfaring

til at undersøge dem. Standardmetoder i laboratoriet går som regel ud på at dyrke bakteriekulturen i en petriskål med et vækstmedie og derefter undersøge bakterierne. Det giver rigtig gode resultater men er tidskrævende. Oftest går der en til to dage, før man får svar på prøven, og det kan i nogle tilfælde betyde, at fødevaren allerede har forladt produktionen. Hvis prøven tester positiv for farlige bakterier må virksomheden tilbagekalde varen, hvilket både er dyrt og dårligt for deres omdømme. Tid kan altså være afgørende for de store producenter.

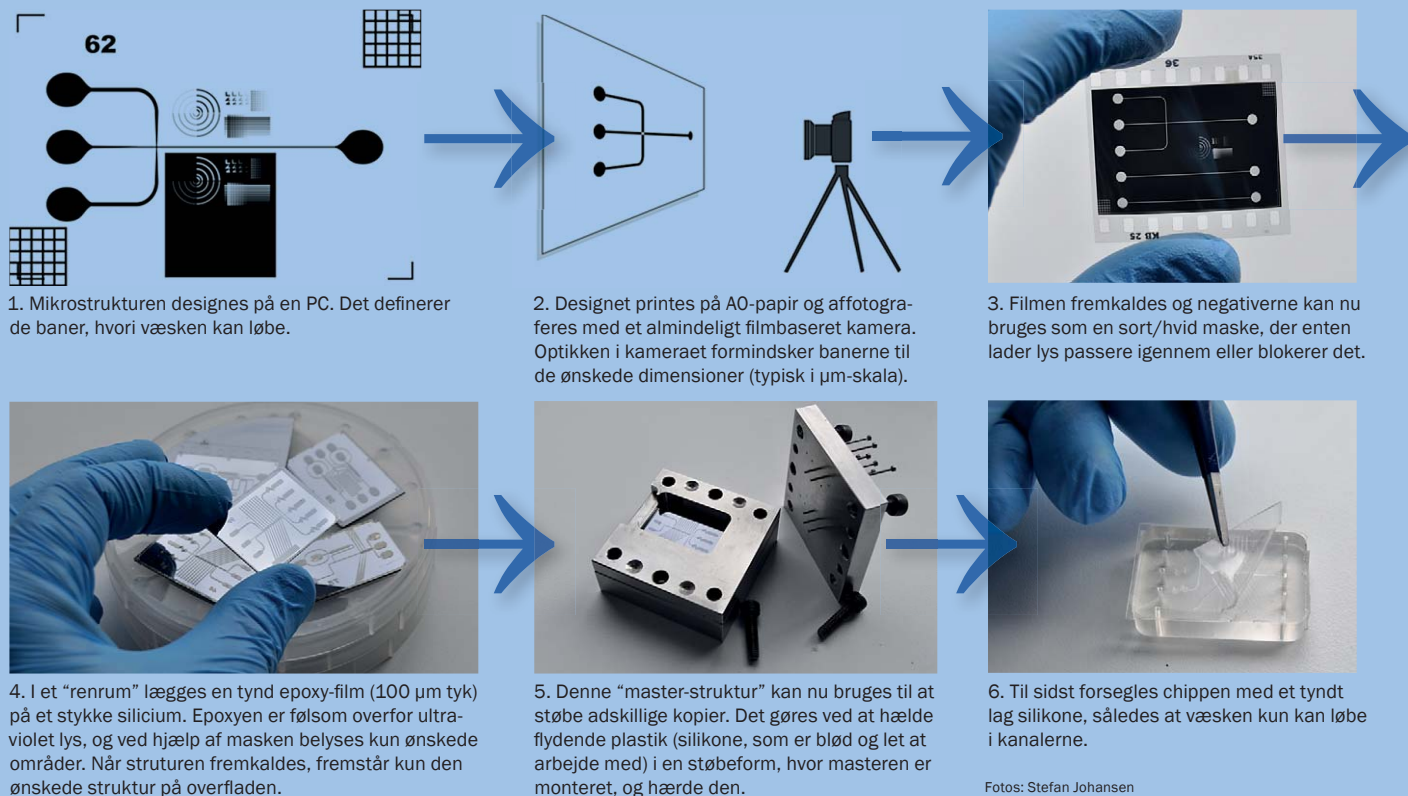
Hos små, lokale fødevarerproducenter kan det i højere grad være økonomien, der er problemet, da de ikke har ressourcer til omfattende analyseprogrammer.

For både store og små producenter kan nye “lab-on-a-chip-teknologier” (LOC-teknologi) blive et vigtigt våben i kampen mod de skadelige bakterier. Med disse nye metoder kan man hurtigere og billigere end med traditionelle biologiske analysemetoder opdage de skadelige bakterier i produktionen, inden de når ud til butikkerne og i sidste ende til forbrugerne.

Fremstilling af prototyper på lab-on-a-chip-systemer

Figuren viser de forskellige trin i den metode, vi på SDU bruger til nemt og billigt at fremstille prototyper på lab-on-a-chip-systemer. Denne fremstillingsmetode af chips kan bruges til alle 2D-strukturer ned til en størrelse på

omkring 20 μm og er således meget fleksibel. Chipsene støbes med huller i bagsiden, sådan at hver chip let kan tilkobles enten sprøjter, slanger eller andre chips i mere avancerede netværk.



Et laboratorium på en chip

Ideen bag nye lab-on-a-chip-teknologier er meget enkel og går ud på at minimere forskellige processer fra traditionelle laboratorier og integrere dem på en mikrofluidik-chip. I stedet for almindelige elektroniske mikrochips (som bruges i mobiltelefoner, computere osv.) leder mikrofluidik-chips væsker rundt i et lukket kredsløb af inputs, outputs og forskellige funktioner. Disse kan både være simple aktiviteter som prøveforberedelse (opvarmning, blanding af reagenter, koncentrationsrækker osv.), men også mere avancerede måleteknikker som spektroskopi eller andre optiske og elektriske metoder.

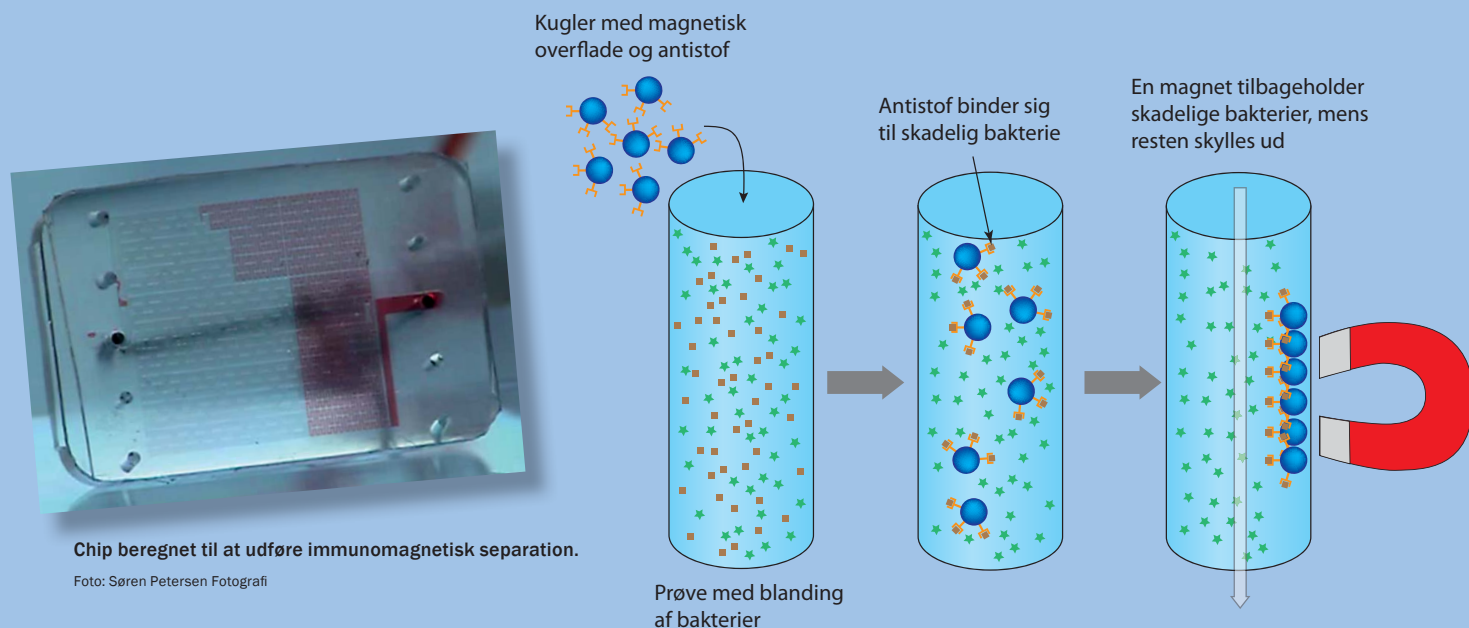
Fordelen er åbenlys i forhold til besparelse af både tid (mindre prøvemængder) og penge (chipsene kan masseproduceres i fx plastik). Ydermere åbner brugen af LOC-teknologi for mere mobile apparater, som kan benyttes direkte i fødevarerproduktionen, men også i mange andre sammenhænge. Ved at udvikle små simple chips, der hver især er i stand til at udføre forskellige bioteknologiske funktioner, er det muligt at opbygge et katalog af chips, der kan samles som LEGO-klodser, tilpasset efter behovet. Det giver stor fleksibilitet i forhold til prøveforberedelsen, hvilket er afgørende, da fødevarer kan være

meget forskellige. Nogle prøver vil måske behøve filtrering for at frasortere større partikler, andre skal have tid til at reagere med forskellige biomarkører, varmes op eller omrøres. Rent praktisk bruges mikroteknologi og metoder fra mikrochipindustrien til at fremstille de forskellige komponenter. I vores laboratorier på SDU fremstiller vi mikrofluidik-chips i en række simple skridt baseret på såkaldt fotolitografi, hvor en ønsket struktur kan minimeres optisk og kopieres i fx et plastikmateriale.

At måle bakterierne én ad gangen

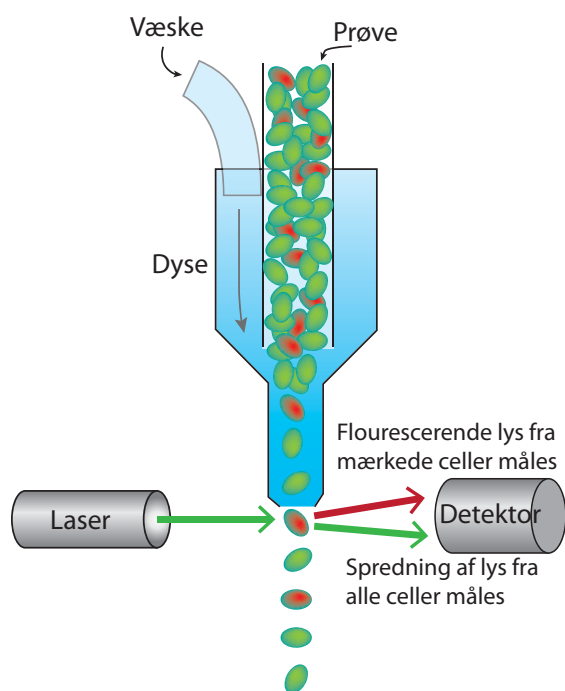
Som nævnt kan mange forskellige funktioner bygges ind i en chip. En af de metoder, vi arbejder med, er såkaldt *flow cytometri*, hvor man ved hjælp af laserlys kan "tælle" det biologiske materiale i en prøve. Ud fra bestemte bakteriers unikke lys kan man identificere eventuelle syndere i madvareprøver.

Første skridt er at farve prøven med farvestoffer, som enten genkender bestemte DNA-sekvenser eller antistoffer fra en bestemt bakterie (fx salmonella, listeria eller *E.Coli*). Alternativt kan nogle farvestoffer skelne mellem levende og døde celler (døde bakterier gør jo ingen skade). Under normale omstændigheder lyser disse stoffer ikke, men når de binder



Princippet i immunomagnetisk separation, som er en metode, der kan integreres i en chip. Når man har "tilbageholdt" de bakterier, man er interesseret i at tælle, kan man efterfølgende lede de tilbageholdte bakterier over i en anden chip og måle antallet ved hjælp af flow cytometri.

kemisk med deres specifikke mål og udsættes for laserlys, vil de lyse (fluorescere).



Figuren viser princippet i flow cytometri, hvor man kan tælle, hvor mange af en given type bakterier der er i en prøve. De bakterier, man vil tælle, mærkes med et fluorescerende stof, der udsender lys, når det passerer forbi en lyskilde. Ved at sammenligne de målte lyssignaler kan man vurdere, hvor stor en andel de skadelige bakterier udgør.

Efter tilsætning af farvestoffet føres fødevarerprøven forbi en laser på en sådan måde, at kun en enkelt celle belyses ad gangen. Det gøres ved at fokusere væskestrømmen, noget som kun er muligt, når dimensionerne er tilpas små. Flere tusind celler passerer foran laseren hvert sekund. Alt, der passerer laseren, spreder lyset, men kun de celler, der har det korrekte farvestof, fluorescerer.

Man måler således på hver enkelt celle i prøven, én ad gangen. Ved at sammenligne de forskellige lyssignaler kan forskellige populationer af celler i prøven identificeres, og man kan således med meget stor sikkerhed sige, hvor stor en del af en bestemt type bakterie der er i en given prøve. Helt ned til kun 1.000 bakterier af en given type kan identificeres i en prøve på 1 ml, som indeholder flere hundredtusinde bakterier og andre mikroskopiske partikler.

Denne teknik kan implementeres i en chip ved at bruge optiske lysledere, der guider laserlyset direkte hen til den kanal, hvor prøven løber. Direkte overfor lyskilden sidder en anden lysleder, som opsamler både det spredte laserlys og fluorescensen. Ved at bruge lysledere sikrer man, at systemet altid er korrekt opsat, og man sparer mange dyre optiske elementer væk. Ydermere kan man holde omkostningerne nede ved at bruge billige diode-lasere (som kendes fra fx BluRay-afspillere). Det opsamlede lys kan måles med forholdsvis simple dioder, og en PC kan bruges til at analysere resultaterne direkte.



↑ En situation, vi gerne vil undgå: Bakterien *Salmonella typhimurium* (rød) i færd med at invadere celler fra menneskeligt væv. Billedet er optaget med scanningselektronmikroskop og kunstigt farvet.

Credit: Rocky Mountain Laboratories, NIAID.

← Casper Kunstmann-Olsen og Stefan Johansen i laboratoriet.

Foto: Søren Petersen Fotografi

Alt i alt er metoden enkel, præcis og hurtig, og ved at implementere den i en chip opnår man et simpelt transportabelt analysesystem.

Sortering af bakterier

Når man ønsker at finde skadelige bakterier i en fødevarerprøve, drejer det sig ofte om meget små mængder. Det er bogstaveligt talt som at lede efter en nål i en høstak. Med en metode kaldet immunomagnetisk separation kan man frasortere de fleste uønskede celler i en fødevarerprøve.

Det gøres ved at tilføje små (få mikrometer store) magnetiske plastikkugler direkte i prøven. Udover at være magnetiske er disse kugler overfladebehandlet med antistoffer, som er specifikke for den type bakterie, man leder efter. Når kuglerne blandes i prøven, sætter de sig således kun på de skadelige bakterier, og man kan efterfølgende skylle resten af prøven væk, mens kuglerne fastholdes med en stærk magnet. Når dette er gjort har man således en "ren" prøve, som kun indeholder buffer og de bakterier, man leder efter. Næste skridt er at tilsætte farvestof og måle bakterierne ved hjælp af flow cytometri (FCM) som beskrevet ovenfor.

Immunomagnetisk separation kan også implementeres på en mikrofluid-chip. Chippen består simpelthen af en lang og snørklet kanal, hvor prøven og kugler kan blandes godt. Først fyldes chippen med en opløsning af magnetiske kugler, som efterfølgende fastholdes med en permanent magnet, således at bunden af kanalen er dækket. Prøven skylles efterfølgende gennem den lange kanal,

og de ønskede bakterier opfanges vha. antistofferne. Når hele fødevarerprøven har været skyllet igennem, åbnes en ventil og den nu oprensede prøve ledes over i en flow cytometri-chip, hvor bakterierne kan måles. På SDU udvikler vi denne metode i samarbejde med Flensburg University of Applied Science i et grænseoverskridende projekt med fokus på udvikling af teknologi til gavn for lokale virksomheder.

På vej mod et varslingsystem

Vi er nu nået så langt med lab-on-a-chip-projektet på SDU, at vi har udviklet en platform til hurtigt at producere prototyper på mikrofluid-systemer, så det er let at teste en kendt analysemetode på mikrofluid-niveau. Sideløbende har vi udviklet en prototype på en flow cytometri-chip, og vi arbejder nu på at teste denne i et samarbejde med en eller flere fødevarerproducerende virksomheder, så det bliver muligt at produktionsmodne teknologien og endelig få udviklet et færdigt apparat, der kan tilbydes til fødevarerproducenter. Tanken bag projektet er at lave et såkaldt "early warning" system som supplement til de eksisterende analyser – man kan fx forestille sig en rød lampe, som blinker straks der opdaget salmonella i produktionen. På denne måde kan operatørerne reagere hurtigt, indkredse smitekilden og træffe de nødvendige forholdsregler, så man undgår at sende varer ud, som gør folk syge.

Prototype-plattformen er også udviklet, så den kan indgå i en bredere produktion af lab-on-a-chip systemer og kan derfor tænkes at komme til at spille en rolle i en lang række projekter indenfor forskning i cellebiologi, medicin mv. ■

Yderligere læsning
tinyurl.com/mikroFCM

Lab-on-a-chip-projektet
 på SDU var indtil udgangen af 2013 finansieret gennem Interreg4a-programmet