

1 LabDisk: Zentrifugale Mikrofluidik zur vollintegrierten Automatisierung von Laborabläufen

O. Strohmeier, G. Czilwik, T. van Oordt, M. Keller, D. Mark,
R. Zengerle, F. von Stetten

1.1 Kurzfassung

Zentrifugale Mikrofluidik auf preiswerten, CD-ähnlichen Einweg-Testträgern, sog. „*LabDisks*“, kann erfolgreich zur vollintegrierten Automatisierung von Laborabläufen in einem portablen Analysegerät, dem „*LabDisk Player*“ eingesetzt werden. Das Potential der *LabDisk* wird anhand von zwei Anwendungen demonstriert: (1) dem integrierten Nachweis von Biokampfstoffen auf DNA Ebene und (2) dem Nachweis von Botulinum Neurotoxin.

1.2 Einleitung

Mikrofluidik ermöglicht potentiell die Miniaturisierung und Automatisierung einer Vielzahl von Laborabläufen. Hierdurch wird es möglich, komplexe, diagnostische Analysen in tragbaren Geräten am *Point-of-Need* durch ungeschultes Personal durchführen zu lassen. Im Gegensatz zu konventionellen, mikrofluidischen Ansätzen, bei denen eine Steuerung der Flüssigkeit durch externe Druckquellen, etwa Spritzenpumpen, erfolgt, bietet die zentrifugale Mikrofluidik auf der *LabDisk* die Möglichkeit zur Flüssigkeitssteuerung lediglich durch definierte Rotation des Testträgers [1]. Anschlüsse zu externen Druckquellen oder aktiv gesteuerte Ventile in der *LabDisk* sind nicht erforderlich wodurch Kosten bei der Herstellung eingespart werden können. Das Potential der *LabDisk* insb. für zeitkritische Anwendung im Feldeinsatz wird durch zwei Anwendungen verdeutlicht.

- (1) Vollautomatisierter Nachweis von bakteriellen Biokampfstoffen: *Bacillus anthracis* und *Francisella tularensis*. Der zentrifugal-mikrofluidisch automatisierte Prozess auf der *LabDisk* beinhaltet die Schritte (a) Zell-lyse (b) DNA Aufreinigung und (c) isotherme Multiplexamplifikation mittels Recombinaser Polymeraser Amplifikation (RPA) [2]
- (2) Vollautomatisierter Nachweis von Botulinum Neurotoxin (BoNT) Typ A (relevant bei terroristischen Angriffen und in der Lebensmittelanalytik) aus Puffer und Vollmilchproben mittels Luciferase-Reporter Assay. [3,4]

Beide Anwendungen wurden auf dem Prototyp eines tragbaren Analysegerätes, dem „LabDisk Player“ (entwickelt von QIAGEN lake constance GmbH; Gewicht ca 2 kg; Größe 18 x 28 x 15 cm³;) automatisiert (**Abb. 1**)

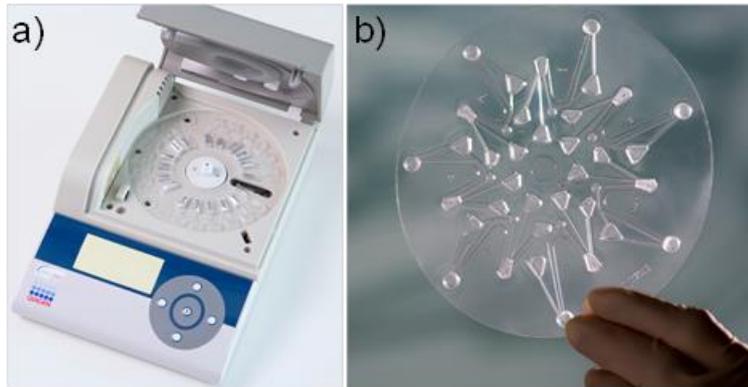


Abb 1: (a) *LabDisk Player* und (b) *LabDisk* (Beispieldisk für Botulinum Neurotoxin Nachweis)

1.3 Materialien und Methoden

1.3.1 Herstellung der *LabDisk* Einweg-Testträger

Alle verwendeten *LabDisks* wurden mittels Mikrothermoformen aus 188 µm dicken COP Folien (COP ZF 14, Zeon Chemicals, USA) [5] hergestellt. Für den Nachweis von Biokampfstoffen wurden anschließend spezifische Reagenzien in der *LabDisk* vorgelagert. Für den BoNT Nachweis war kein zusätzliches Einbringen von Reagenzien während der Herstellung erforderlich. Abschließend wurden die mikrothermogeformten Disks mit drucksensitiver Klebefolie (#900 320 HJ Bioanalytic, Deutschland) verschlossen.

1.3.2 Preparation der *LabDisk* für den Biokampfstoff-Nachweis

Die Oberfläche der kapillaren Siphons S₂ und S₃ wurde mit jeweils 0.2 µL 1:20 Vistex-Isopropanol (Vistex 111-50, Filmspecialities Inc., USA) hydrophilisiert. Der Bereich für die DNA Extraktion wurde durch eine Beschichtung mit 2 x 100 µL 0.5 gew.% Teflon AF (DuPont, USA) gelöst in Fluoroinert FC77 (3M, Belgien) hydrophobisiert (**Abb. 2**). Reverse- und Forward-Primer (jeweils 0,42 µL; 10 µM) und FAM markierte Sonde (0,12 µL; 10 µM) für die spezifische Amplifikation von *B. anthracis* wurde in die Amplifikationskammern #2 – #5 und für *F. tularensis* in die Amplifikationskammern #6 – #8 eingetrocknet. Ein lyophilisiertes Pellet aus Enzymen für die isothermale Amplifikation mittels RPA (Twist Amp Exo, Twist DX, UK) wurde vor der Deckelung in die Mischkammer der *LabDisk* eingelegt.

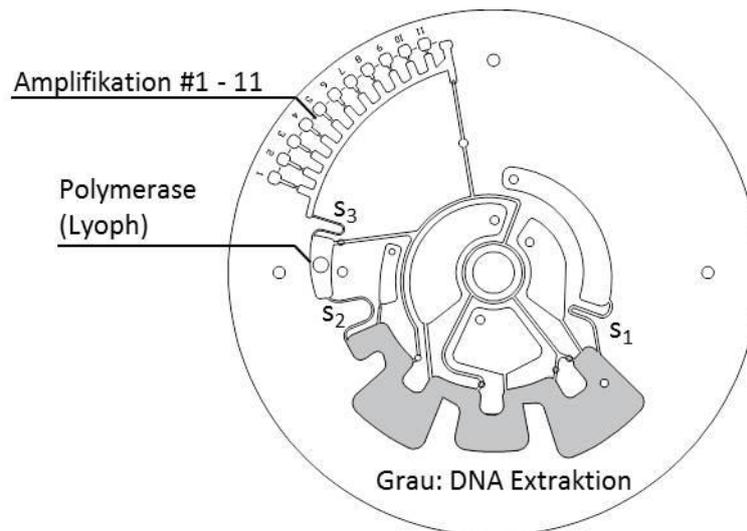


Abb 2: Layout der *LabDisk* für den Biokampfstoffnachweis. DNA Extraktionsbereich (grau schattiert) wurde mit Teflon AF hydrophobisiert. Kapillare Siphons S_2 und S_3 wurden mit einer Vistex Beschichtung hydrophilisiert. Spezifische Primer und Sonden wurden in den Amplifikationskammern vorgelegt.

1.3.3 Assaydesign und Probenmaterial für BoNT Nachweis

Für den Nachweis von Botulinum Neurotoxin wurde ein Luciferase Reporter Assay mit einer lumineszenz-basierten Detektion gekoppelt [3, 4]. Hierbei ist die Luciferase über einen Polypeptid-Linker an funktionalisierte Beads (45-165 μm Sepharose beads, G1914, Promega) gekoppelt (**Abb 3a**). Das enzymatisch aktive BoNT hydrolysiert eine definierte Spaltungsstelle im Polypeptid-Linker und setzt hierbei die Luciferase frei (**b – c**). Nach einer definierten Inkubationszeit wird mit Luciferin (Bright-Glo Luciferase System E2620, Promega) die in Lösung übergegangene Luciferase über ein Lumineszenzsignal gemessen (**d – e**).

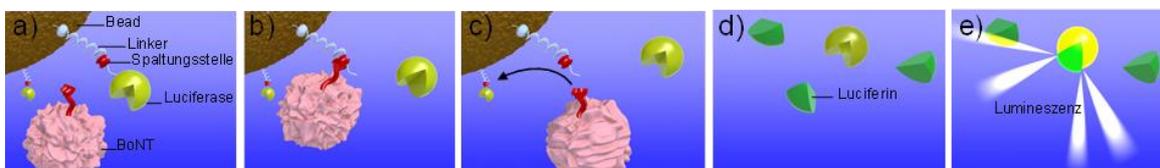


Abb 3: Schematischer Ablauf des Luciferase Reporter Assays; a) Luciferase ist über einen Linker an der festen Phase (Bead) gebunden; b) – c) BoNT hydrolysiert spezifisch den Peptidlinker und setzt die Luciferase frei; d) – e) Nach der Isolierung der flüssigen Phase reagiert Luciferin im Überschuss mit Luciferase und setzt ein Lumineszenzsignal frei.

BoNT Typ A1 wurde als isolierte leichte Kette (LC) (toxogen GmbH, Hannover, Deutschland), aktives Toxin (BoNT) und aktives Toxin in Proteinkomplex (BoNT Komplex) (Metabolics Inc, Madison, Wisconsin, USA) eingesetzt. Weitere Subtypen (A2 – A5) wurden als LC A2 – A5 aus *E. coli* exprimiert (Strain M15pREP4, Qiagen, Hilden, Deutschland). Vollmilch (3,5 % Fettanteil) wurde auf 90 % mit toxinhaltigem Jones Buffer (50 mM HEPES, 20 μ M ZnCl₂, 0.5 % TWEEN 20, 5 mM DTT, pH 7.0) [6] verdünnt.

1.4 Experimentelle Durchführung

Biokampfstoff Nachweis

Zu Beginn des Experiments wurde eine 200 μ L Blutplasma Probe mit inaktivierten *B. anthracis* und *F. tularensis* gespiked, mit magnetischen Silika-beads und Proteinase K gemischt und in die Lysekammer der *LabDisk* pipettiert. Anschließend wurden 450 μ L Bindepuffer, 300 μ L Lysepuffer und zwei Waschpuffer mit je 500 μ L (Instant MP extraction Kit, Analytik Jena, Deutschland) in die entsprechenden Einfüllöffnungen der Disk pipettiert und das vordefinierte Rotationsprotokoll gestartet. Nach der Lyse erfolgt disk-integriert die DNA Aufreinigung mit Hilfe einer proprietären Methode zum Transport von magnetischen Partikeln [7]. Während einer definierten Pause im Rotationsprotokoll wird ein Elutionspuffer zugegeben um die aufgereinigte DNA von der Oberfläche der Partikel zu eluieren. Anschließend wird die DNA mit lyophilisierten RPA Reagenzien gemischt, in 10 separate Amplifikationskammern aliquotiert, und die dort trocken vorgelagerten Primer und Sonden gelöst. Überschüssige Flüssigkeit wird in Kammer #11 geleitet. Nach dem Lösen der Primer und Sonden startet die isothermale Amplifikation während der Anstieg der Fluoreszenzsignale kontinuierlich gemessen wird. (**Abb. 4**)

BoNT Nachweis

Eine *LabDisk* für den BoNT Nachweis beinhaltet Strukturen für die parallele Prozessierung von 7 BoNT Tests. Jeder Test besteht aus mikrofluidischen Strukturen für das Freisetzen einpipettierter Flüssig-reagenzien, das Mischen während der Inkubation, das Separieren von enzymbeschichteten Mikro-Beads und das Detektieren. Alle Abläufe werden automatisiert durch ein vordefiniertes Rotationsprotokoll im *LabDisk Player* durchgeführt (**Abb 5 a – d**)

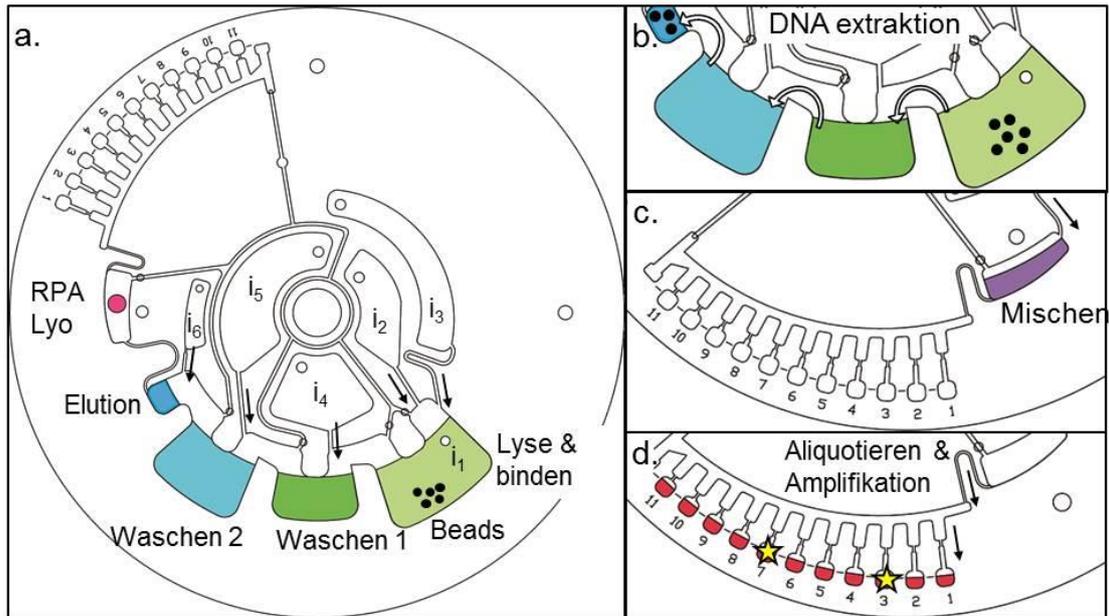


Abb 4: Mikrofluidischer Ablauf: (a) Probe mit magnetischen Beads, Lyse-, Binde und zwei Waschpuffern wird in die Inlets $i_1 - i_5$ gegeben. Durch Rotation werden die Reagenzien radial nach außen geleitet. (b) Im Anschluss an die Lyse bindet die freigesetzte DNA an die magnetischen Beads und wird durch die Waschpuffer in einen Elutionspuffer überführt. (c) Das Eluat wird mit einem vorgelagerten RPA Lyophilisat gemischt und (d) in die Amplifikationskammern aliquotiert. Die Amplifikation beginnt unmittelbar mit dem Auflösen der trocken vorgelagerten Primer und Sonden.

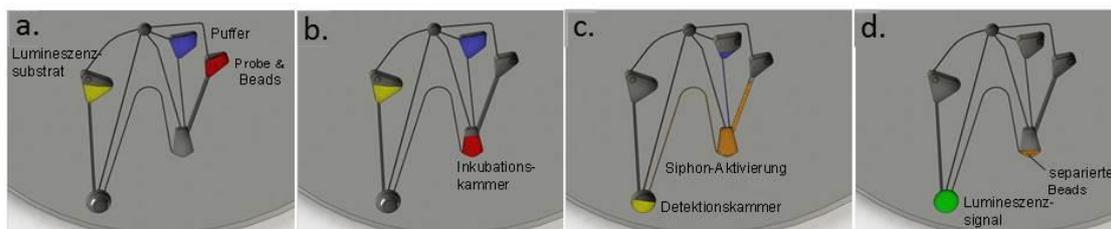


Abb 5: Fluidischer Ablauf zum BoNT Nachweis. (a) Alle Flüssigreagenzien werden mit der Probe und den funktionalisierten Beads in die *LabDisk* pipettiert. (b) Bei 10 Hz Drehfrequenz werden Probe und Beads in die Inkubationskammer geschleudert und für 20 Minuten inkubiert. (c) Nach der Inkubation wird bei 40 Hz die Flüssigphase zusammen mit dem Lumineszenz-substrat in die Detektionskammer geschleudert (d) Die freigesetzte Luciferase generiert in der Detektionskammer ein Signal während noch an die Beads gebundene Luciferase in der Inkubationskammer zurück bleibt.

1.5 Ergebnisse und Diskussion

1.5.1 Nachweis von Biokampfstoffen

Mit der entwickelten *LabDisk* konnte erfolgreich der automatisierte Nachweis von 6×10^4 Genomäquivalenten *B. Anthracis* und 6×10^6 Genomäquivalenten *F. tularensis* in weniger als 45 Minuten (~ 35 min Lyse und DNA Extraktion; ~ 10 min Amplifikation) gezeigt werden. (**Abb 6**).

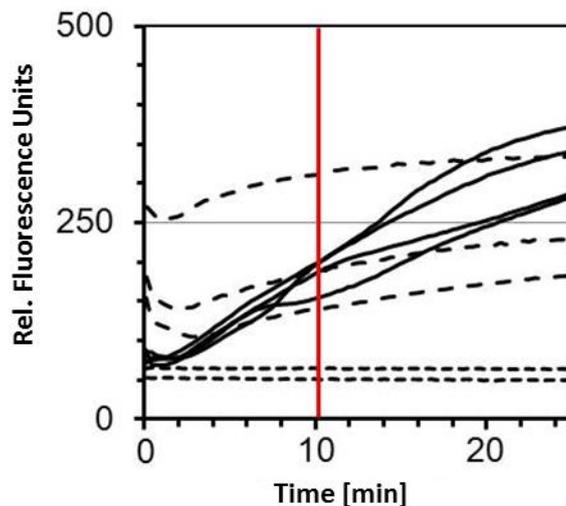


Abb 6: Erfolgreiche Amplifikation von *B. anthracis* in den Amplifikationskammern #2 - #5 (durchgezogene Linie) und *F. tularensis* in den Kammern #6 – 8 (gestrichelte Linie) in < 10 Minuten (rote Linie). Kammern ohne vorgelagerte Primer und Sonden (#1, #9 und #10) zeigen keinen Signalanstieg (gepunktete Linie)

1.5.2 Nachweis von Botulinum Toxin

Botulinum Neurotoxin vom Typ A konnte in allen Toxinformen (LC, BoNT, BoNT Komplex) vollautomatisiert in 30 Minuten aus 6 µL Proben nachgewiesen werden [3,4]. Die Konzentrationsbereiche lagen hierbei bei 9 pM – 2 nM für LC in Pufferlösung (**Abb. 6**) und bei 8 pM – 6 nM für BoNT in Pufferlösung und BoNT Komplex in Vollmilch. Der Assay reagiert spezifisch auf BoNT, was in diversen Kontrollversuche bestätigt werden konnte [3,4]. Der automatisierte Assay korreliert sehr gut mit den manuell durchgeführten, laborbasierten Tests (Pearson-Korrelation 0,99; Daten nicht gezeigt [3, 4]). Die Intra-Disk-, Intra-Tages- und Inter-Tagesvariabilitäten des Assays betragen 1 – 13 %, 1 – 7 % und 10 – 13 %.

Darüber hinaus konnte in separaten Experimenten gezeigt werden, dass auch eine komplexe Probenmatrix wie Vollmilch den enzymatischen Assay nicht signifikant beeinflusst [3,4]

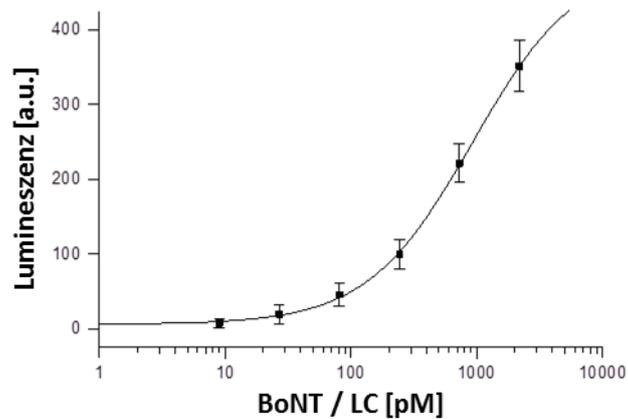


Abb 6: Assaykurve von BoNT/LC in Puffer (20 Min Inkubationszeit)

1.6 Zusammenfassung und Ausblick

Anhand zweier Anwendungen, dem (1) Nachweis der bakteriellen Biokampfstoffe *B. anthracis* und *F. tularensis* und (2) dem Nachweis von Botulinum Neurotoxin konnte erfolgreich die Eignung der *LabDisk* für die Automatisierung komplexer, diagnostischer Abläufe auf einem tragbaren Gerät, dem *LabDisk Player*, gezeigt werden. Zukünftig ergibt sich hierdurch eine Vielzahl potentieller Applikationen für zeitkritische Fragestellungen am Point-of-Need.

1.7 Danksagung

Wir bedanken uns beim Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die Förderung der Arbeiten im Rahmen des Projektes S.O.N.D.E (13N10116)

1.8 Referenzen

- [1] D. Mark et al. "Microfluidic lab-on-a-chip platforms: Requirements, characteristics and applications", Chem. Soc. Rev, **2010**, 39:1153-1182
- [2] O. Strohmeier et al., "DNA based sample to answer detection of bacterial pathogens on a centrifugal microfluidic foil cartridge", Proc. of μ TAS, **2012**, p. 779 – 781
- [3] T. van Oordt et al., "Automatisierte Vor-Ort Detektion von Botulinum Neurotoxin auf der LabDisk Plattform", MST Kongress, **2013**, p. 376-379
- [4] T. van Oordt et al., "Rapid and highly sensitive luciferase reporter assay for the automated detection of botulinum neurotoxin in the centrifugal microfluidic LabDisk platform", RSC Adv., **2013**, 3: 22046-22052
- [5] M. Focke et al., "Microthermoforming of microfluidic substrates by soft lithography (μ TSL): optimization using design of experiments", JMM, **2011**, 21:11502
- [6] R. G. A. Jones et al., "Development of improved SNAP25 endopeptidase immuno-assays for botulinum type A and E toxins asdf", Journal of Immunological Methods, **2008**, 329:92-101
- [7] O. Strohmeier et al., "Centrifugal gas-phase transition magnetophoresis (GTM) – a generic method for automation of magnetic bead based assays on the centrifugal microfluidic platform and application to DNA purification", Lab on a Chip, **2013**, 13:146-155