

Lab-on-a-Chip Cartridge zur Durchführung von Immunoassays mit integrierter Probenaufbereitung

S. Lutz¹, D. Mark¹, R. Zengerle^{1,2} and F. von Stetten^{1,2}

¹ HSG-IMIT, Lab-on-a-Chip, Georges-Köhler-Allee 103, 79110 Freiburg

² Universität Freiburg – IMTEK, Institut für Mikrosystemtechnik, Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung, Georges-Köhler-Allee 103, 79110 Freiburg

Kurzfassung

Wir stellen eine neue Lab-on-a-Chip Cartridge vor, die unter Ausnutzung von Zentrifugalkräften eine integrierte Prozessierung von Immunoassays mit kompletter Probenaufbereitung ermöglicht. Unsere Lab-on-a-Chip Cartridge erlaubt die Separation von Blutzellen und Blutplasma, die Dosierung eines definierten Plasmavolumens, die Durchführung von Inkubations-, Misch- und Waschschritten und enthält darüber hinaus ein integriertes Abfallreservoir. Aus einem Blutvolumen von 10 μL extrahieren wir durch Sedimentation 4 μL Blutplasma mit einem CV von 6 %. Das Schalten der Fluide in der Cartridge wird mittels kapillarer und volumengesteuerter Siphonventile durchgeführt. Die Verlässlichkeit des fluidischen Systems wird erhöht durch eine Hydrophilisierung der Oberfläche mit BSA. Die Reaktionskammer ermöglicht effiziente Misch- und Waschprozesse und erlaubt die Vorlagerung von Trockenreagenzien. Zur Demonstration der Funktionalität zeigen wir eine quantitative Bestimmung des Hormons Estradiol in Konzentrationen von 25 pg/mL bis 1 ng/mL mittels eines Chemolumineszenz-basierten kompetitiven Immunoassays [1].

1 Einleitung

Die Miniaturisierung biologischer und diagnostischer Tests durch Lab-on-a-Chip Systeme stellt einen wichtigen Trend im Bereich der Lebenswissenschaften dar. Durch verkürzte Inkubationszeiten, verminderten Reagenzienverbrauch und die Minimierung manueller Handlungsschritte erlauben solche Systeme eine Reduzierung der Kosten der durchgeführten Tests. Zudem erlauben Lab-on-a-Chip Plattformen die Durchführung diagnostischer Tests durch ungeschultes Personal. Somit ermöglichen diese Technologien neue Anwendungen im Bereich der Vor-Ort-Diagnostik. In diesem Paper beschreiben wir eine Lab-on-a-Chip Plattform zur Durchführung eines Immunoassays. Unsere Plattform arbeitet unter Ausnutzung von Zentrifugal- und Kapillarkräften, um den Transport der benötigten Fluide zu steuern. Dieser Ansatz erlaubt es auf aktive Ventile und Pumpen zu verzichten, was den Preis des Einwegartikels senkt. Die Cartridge verfügt über eine integrierte Blutplasmaseparationsstruktur und eine Mischkammer um vorgelagerte Trockenreagenzien zu lösen und mit der Probe zu vermischen. Außerdem beinhaltet der fluidische Chip eine Reaktionskammer, in der spezifische Antikörper immobilisiert werden können, sowie eine Abfallkammer in der die bereits gebrauchten Fluide aufgefangen und gelagert werden (Bild1). Um die Funktionsfähigkeit der Plattform zu beweisen, wird ein kompetitiver Estradiol-Immunoassay in diese implementiert.

2 Funktionsprinzip

Unser modularer Aufbau basiert auf einer mikrostrukturierten Polystyrol-Cartridge (Bild. 2), die auf einem programmierbaren Rotor fixiert wird. Jede Cartridge enthält 4

identische fluidische Strukturen für die parallele Prozessierung von Immunoassays. Der Rotor kann bis zu 6 solcher Cartridges aufnehmen, um 24 Assays gleichzeitig durchzuführen. Eine Vorbehandlung des Chips mit Blockpuffer (PBS, 2 % BSA) vermindert einerseits die unspezifische Adsorption der am Assay beteiligten Moleküle an die Cartridgeoberfläche und führt zu einer Hydrophilisierung dieser. Die Hydrophilisierung der Cartridge ist insbesondere wichtig für das Schalten der Siphonventile. Diese können unter Ausnutzung von Kapillarkräften Fluide in Kammern halten oder in stromabwärts gelegene Kammern weiterleiten.

Der radial innen liegende Bereich der Cartridge enthält die Blutplasmaseparationsstruktur, in der durch Sedimentation Blutplasma gewonnen wird. In diese Struktur können 10 – 15 μL Vollblut dispensiert werden. Eine Meteringstruktur reduziert das zugegebene Volumen auf 10 μL . Das Plasma wird unter Zentrifugation von zellulären Blutbestandteilen abgetrennt und ein definiertes Volumen des Plasmas wird mittels einer Kapillare extrahiert und in eine Mischkammer überführt. In dieser wird das Plasma innerhalb von 30 s mit Kompetitorantigenen des kompetitiven Immunoassays und einem Puffer mittels eines unidirektionalen Shakemod-Protokolls vermischt [2,3]. Die resultierenden 50 μL Fluid gelangen über einen kapillaren Siphon in die Reaktionskammer, in der anti-Estradiol Antikörper immobilisiert sind. Nach einer 15 minütigen Inkubationszeit, wird die Kammer dreimal gewaschen, um ungebundene Moleküle zu entfernen. Anschliessend erfolgt die Lumineszenzdetektion.

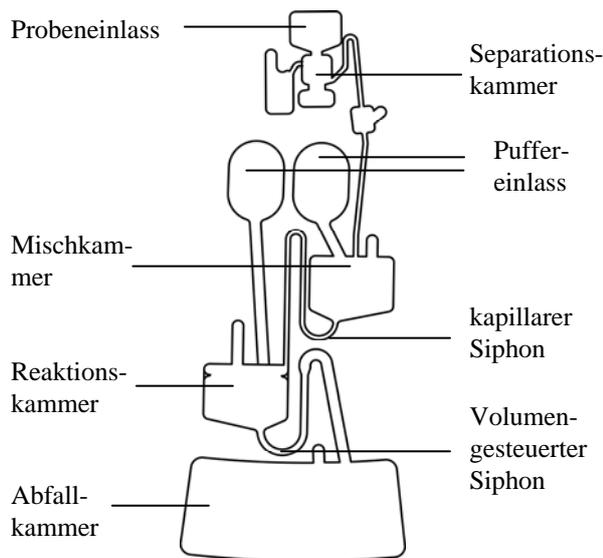


Bild 1 Schematische Darstellung der fluidischen Struktur der Immunoassay Plattform. Der radial Innen liegende Teil enthält die Blutplasmaseparationsstruktur. Zudem verfügt die Fluidik über zwei Einlässe für Reaktions- und Waschpuffer. Das Schalten der Fluide wird durch Siphonventile ermöglicht. Ein Abfallkammer nimmt alle bei der Durchführung des Assays verbrauchten Flüssigkeiten auf.



Bild 2 Das Photo zeigt eine spritzgegossene mikrostrukturierte Immunoassay-Cartridge mit 4 parallelen fluidischen Strukturen.

- Vollblutprobe
- Blutplasma
- Waschpuffer
- Substratlösung

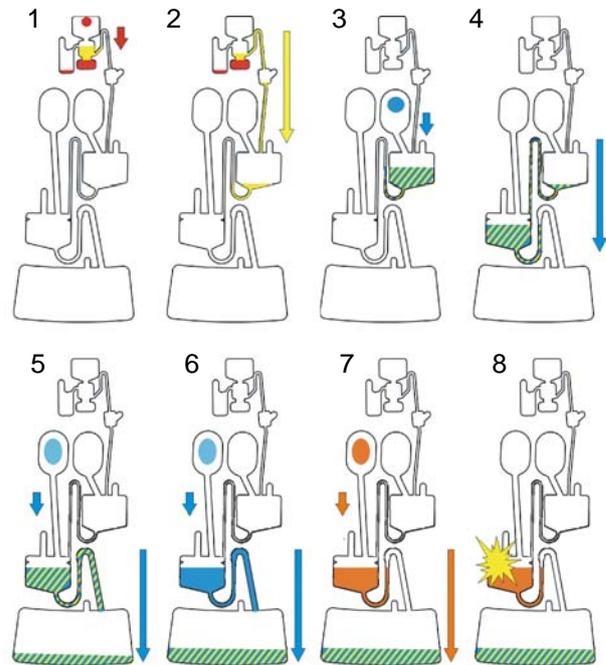


Bild 3 1: Eine Blutprobe wird in die Cartridge pipettiert und die zellulären Bestandteile werden durch Sedimentation abgetrennt. 2: Das Blutplasma wird in eine Mischkammer überführt und mit den Kompetitorantigenen vermischt (3). 4: Das resultierende Fluid gelangt zur Inkubation in die Reaktionskammer, die die immobilisierten Antikörper enthält. 5/6: In mehreren Waschschriffe werden ungebundene Moleküle entfernt. 7: Die Substratlösung gelangt in die Reaktionskammer. 8: Detektion des Lumineszenzsignals.

3 Ergebnisse und Diskussion

Zunächst wurde die fluidische Struktur zur Extraktion von Blutplasma getestet. Hierzu wurden 10 – 15 µL humanes Vollblut in das Inlet der Separationsstruktur pipettiert. Die Fluidik misst mittels eines Überlaufs 10 µL Blut ab. Dieser Prozess wird bei einer Frequenz von 20 Hz durchgeführt. Die Abtrennung der zellulären Blutbestandteile findet bei einer Drehfrequenz von 50 Hz innerhalb von 2 min statt. In einer Versuchsreihe wurden durchschnittlich 4 µL Plasma mit einem kleinen CV von 6 % extrahiert. Der Blutzellanteil im Plasma beträgt weniger

als 0.5 %. Das extrahierte Blutplasma gelangt über einen kapillaren Siphon in die Reagenzienvorlagerungskammer.

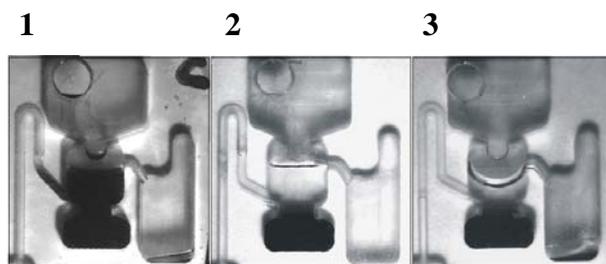


Bild 4 1: Humanes Vollblut wird in die Separationskammer zentrifugiert. 2: Blutzellen werden bei einer Drehfrequenz von 50 Hz sedimentiert. 3: Extraktion und Abmessung des Blutplasmas über einen kapillaren Siphon.

Die Prozessierung eines kompletten Immunoassays benötigt 30 Minuten. Die getesteten Probenkonzentrationen liegen zwischen 25 pg/mL und 1 ng/mL und decken somit den diagnostisch relevanten Bereich ab. Die Detektion des Lumineszenzsignals kann zur Zeit noch nicht unter Rotation erfolgen, da sich das entsprechende Detektionssystem noch im Aufbau befindet. Die Signaldetektion im Stillstand führt bei einigen Reaktionskammern zu einer vorzeitigen Entleerung der Substratlösungen und somit zu Variationen in der Chemolumineszenz, die die Größe der Fehlerbalken in Bild 5 beeinflusst. Dennoch ist eine Korrelation zwischen Antigenkonzentration und gemessener Lumineszenzintensität zu erkennen.

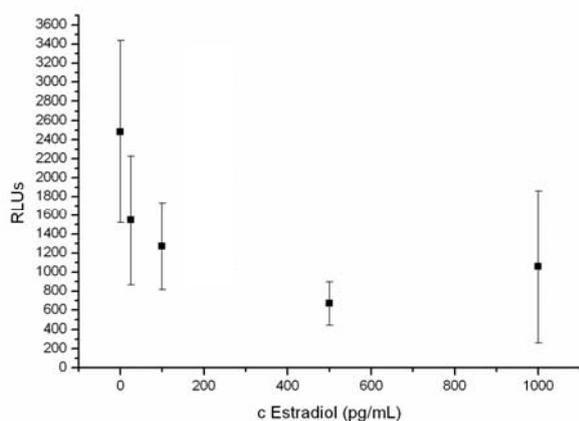


Bild 5 Resultate eines kompetitiven Estradiol-Immunoassays im Lab-on-a-Chip System. Die Auswertung erfolgte in einem MTP-Reader mittels eines Adapters, der die Immunoassay-Cartridge aufnehmen kann. Da der Readout unter Stillstand durchgeführt wurde, entleerten sich einige Kammern durch Kapillarkräfte. Ein Gerät das eine Detektion der Lumineszenzsignale unter Rotation ermöglicht, wird gerade entwickelt. Der diagnostisch relevante Bereich für Estradiol liegt zwischen 0 und 220 pg/mL.

4 Schlussfolgerung

Eine integrierte fluidische Cartridge zur Prozessierung von Immunoassays unter Ausnutzung von Zentrifugalkräften wird vorgestellt. Unser Lab-on-a-Chip System beinhaltet die Probenaufbereitung von humanem Vollblut, und kann Misch- Inkubations- und Waschschriffe durchführen. Das Schalten der Fluide erfolgt sehr zuverlässig auf Basis passiver Ventile. Um die Funktionalität der Cartridge aufzuzeigen, wird ein Immunoassay zur Quantifizierung des Hormones Estradiol demonstriert. Aktuell wird ein Gerät, das eine Chemolumineszenzdetektion unter Rotation erlaubt, sowie Dispenser enthält, entwickelt, um das System vollständig zu automatisieren. Dieses soll eine präzisere Detektion des Lumineszenzsignals ermöglichen. Hierdurch sollen die hohen Standardabweichungen bei den in dieser Veröffentlichung gezeigten Messungen eliminiert werden.

5 Literatur

- [1] DRG Instruments GmbH, Germany, www.drg-diagnostics.de (accessed 2009).
- [2] S. Lutz et al., in Proceedings of the μ TAS conference 2007, Paris, France, pp. 1516-1518.
- [3] M. Grumann et al., in Proceedings of the μ TAS conference, Malmö, Sweden, 2004, pp. 593-595.