

# Lab-on-a-Chip Foundry Service: Schnelle kundenspezifische Implementierung miniaturisierter biochemischer Assays

T. Metz<sup>1</sup>, M. Karle<sup>1</sup>, T. Preis<sup>1</sup>, D. Mark<sup>1</sup>, G. Roth<sup>2</sup>, C. Müller<sup>1</sup>, R. Zengerle<sup>1,2</sup> und F. von Stetten<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> HSG-IMIT, Wilhelm-Schickard-Straße 10, 78052 Villingen-Schwenningen, Germany

<sup>2</sup> Universität Freiburg, Institut für Mikrosystemtechnik - IMTEK, Lehrstuhl Anwendungsentwicklung, 79110 Freiburg  
felix.von.stetten@hsg-imit.de

## Kurzfassung

Der Lab-on-a-Chip Foundry Service ist eine neue Dienstleistung des HSG-IMIT und umfasst die effiziente Miniaturisierung und Automatisierung biochemischer Assays durch mikrofluidische Integration auf Grundlage etablierter mikrofluidischer Plattformen [1], inklusive der Fertigung von Funktionsmustern. Eine mikrofluidische Plattform beinhaltet einen Satz fluidischer Grundoperationen welche einfach kombiniert und durch eine wohldefinierte Fertigungstechnologie hergestellt werden können. Durch die systematische Verknüpfung plattformspezifischer, validierter Grundoperationen können Anwendungsspezifische Assays schnell und mit geringem Entwicklungsrisiko implementiert werden. In einer Datenbank, dem Designhandbuch, werden alle relevante Informationen zu den Grundoperationen abgelegt: ein parametrisiertes mikrofluidisches Layout, ein Funktionsmodell, Fertigungsprozesse und Validierungsergebnisse. Anhand der Aliquotierstruktur wird der Aufbau des Designhandbuchs exemplarisch erläutert.

## Abstract

The Lab-on-a-Chip Foundry Service is a new service provided by the HSG-IMIT which covers efficient miniaturisation and automatisation of biochemical assays based on the established microfluidic platforms approach [1], including the production of prototypes. A microfluidic platform comprises a set of fluidic operations (so-called unit operations) which can be easily combined and fabricated using well-defined fabrication technologies. Thus, application-specific assays can be implemented quickly and with low development risks through systematic combination of unit operations validated on the selected platform. All relevant information about the unit operations such as parameterised microfluidic layouts, functional models, production processes and validation results are filled in one database – the design handbook. The organisation of the design handbook is explained using the aliquoting structure as an example.

## 1 Mikrofluidische Plattformen als Grundlage für die Lab-on-a-Chip Entwicklung

Während der letzten zehn Jahre fand ein Paradigmenwechsel bei der Entwicklung mikrofluidischer Systeme statt. Während sich frühe Entwicklungen an diskreten Lösungen für Problemstellungen aus Bereichen wie Drucktechnologie,

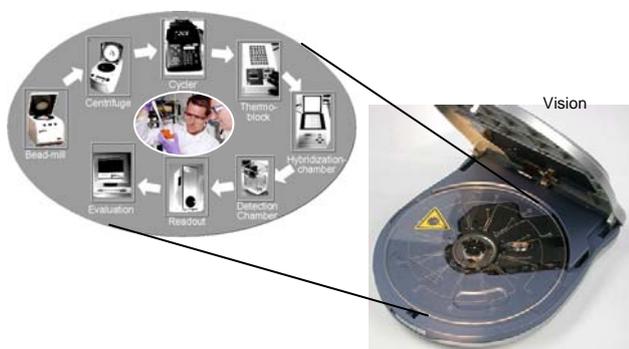
Mikropumpen und Mikroventile orientierten, erfordert die Entwicklung für das heute im Fokus stehende Anwendungsgebiet „Lab-on-a-Chip“ die komplexe Integration vieler mikrofluidischer Komponenten in ein System.

Aufgrund der Vielfalt mikrofluidischer Entwicklungen und Prozessketten verschiedener Anbieter ist die Generierung neuer Produkte durch einfache Kombination von Standardkomponenten derzeit kaum möglich. Das Fehlen von Standards stellt einen Engpass für die kommerzielle Verbreitung von mikrofluidischen Technologien dar.

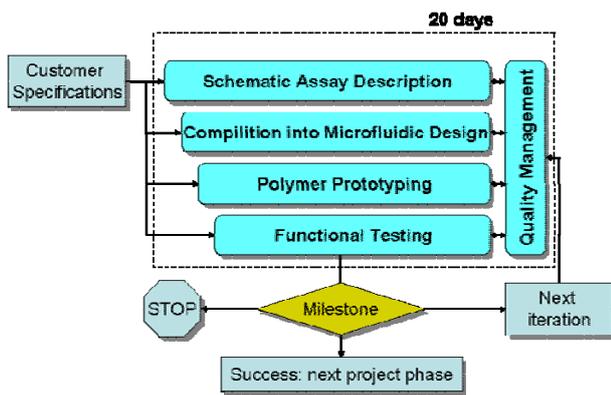
Diesen Engpass zu durchbrechen ist Ziel der Entwicklung von Lab-on-a-Chip Anwendungen auf Basis von etablierten mikrofluidischen Plattformen [1]. Eine mikrofluidische Plattform umfasst eine breite Auswahl von mikrofluidischen Grundoperationen wie Schalten, Dosieren und Mischen – in Verbindung mit einem wohldefinierten und kosteneffizienten Fertigungsprozess.

Bei der Entwicklung von Lab-on-a-Chip Systemen werden komplexe biochemischer Testabläufe, die normalerweise eine Vielzahl von Geräten und Transportschritten benötigen, in einem einzelnen Mikrosystem integriert und automatisiert. In Bild 1 ist das Schema einer Integration eines komplexen Laborprotokolls auf einem einzelnen Chip, der Bio-Disk [2] illustriert.

Die einzelnen Komponenten einer mikrofluidischen Plattform liegen vor Beginn einer Implementierung bereits als



**Bild 1** Integration eines komplexen Laborprotokolls auf einem mikrofluidik Chip (Bio-Disk [2])



**Bild 2** Abgebildet ist der systematische Arbeitsablauf des Lab-on-a-Chip Foundry Service. Ein Design Zyklus soll in 20 Arbeitstagen realisiert werden.

validierte fluidische Grundoperationen in Designform vor. Eine gegenseitige Abstimmung und Verschaltung ist daher grundsätzlich sehr einfach möglich, so dass auch komplexe Assay-Protokolle schnell integriert und umgesetzt werden können.

Ein Entwicklungsrisiko resultiert aus den individuellen Anforderungen unterschiedlicher Assay-Protokolle. So müssen die mikrofluidischen Komponenten mit verschiedensten biologischen Proben und Assay-Reagenzien funktionieren. Darunter können sich sowohl hochbenetzende und stark flüchtige Alkohole befinden wie auch hochviskose oder faserige Gewebsaufschlüsse, oft beladen mit einem großen Anteil an Feststoffpartikeln in Form von Zellen oder Mikroorganismen.

Um diesen unterschiedlichen Anforderungen gerecht werden zu können, ist ein systematischer Entwicklungsablauf erforderlich. Dieser muss einfach und kosteneffizient, aber auch ausreichend flexibel sein um eine große Anzahl biochemischer Testsysteme (Assays) realisieren zu können. Im Lab-on-a-Chip Foundry Service wird ein derartiger systematischer Entwicklungsansatz verwirklicht, in dem die fluidischen Grundoperationen unter Berücksichtigung verschiedener Leit-Flüssigkeiten ausgelegt und validiert werden. Leit-Flüssigkeiten repräsentieren in diesem Sinne Reagenzien und Proben die typischerweise in biochemischen Protokollen vorkommen.

**1.1 Merkmale mikrofluidischer Plattformen**

Typische mikrofluidische Plattformen die für einen plattform orientierten Entwicklungsansatz in Frage kommen sind beispielsweise kapillare Teststreifen („Lateral Flow Assays“), die mikrofluidische large scale integration (MLSI), die zentrifugale Mikrofluidik, die elektrokinetische Plattform sowie verschiedene druckgetriebene Systeme [1].

Ein wichtiges Merkmal mikrofluidischer Plattformen ist die Skalierbarkeit und variable Platzierbarkeit der fluidischen Grundoperationen (unit operations). Dadurch kann eine für eine spezielle Anwendung entwickelte Grundoperation leicht auf ähnliche Anwendungen übertragen werden. Zu den wichtigsten dieser Grundoperationen gehören

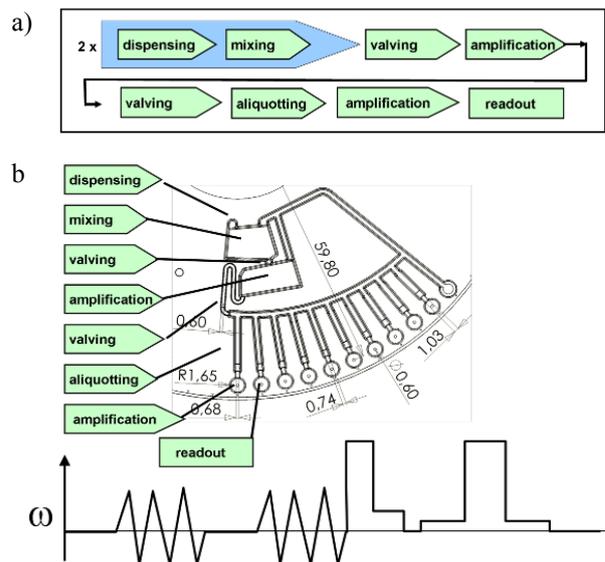
der Transport, das Abmessen, das Mischen und das Schalten von Fluiden sowie beispielsweise die Separation oder Aufkonzentration von Molekülen oder Partikeln.

Die Fertigung einer fluidischen Plattform ist an eine oder mehrere Herstellungstechniken gekoppelt. Obwohl es nicht zwingend notwendig ist, alle fluidischen Grundoperationen unter Verwendung einer einzigen Fertigungstechnologie herstellen zu können, so ist dies zur Realisierung einer kosteneffizienten Herstellung doch von besonderem Vorteil.

**1.2 Zentrifugale mikrofluidische Plattform**

Auf der zentrifugalen mikrofluidischen Plattform werden Flüssigkeitskompartimente durch das Wechselspiel von in rotierenden Systemen auftretenden Kräften wie der Zentrifugal-, der Euler-, oder der Corioliskraft sowie rücktreibenden Kräften wie der Kapillarkraft oder pneumatischen Kräften gesteuert. So kann beispielsweise durch eine entsprechende Erhöhung der Rotationsgeschwindigkeit erreicht werden, dass Flüssigkeiten durch die Zentrifugalkraft radial nach aussen bewegt werden während eine Reduktion der Rotationsgeschwindigkeit bewirkt, dass sie durch Kapillarkräfte wieder radial nach innen gezogen werden. Auf Grundlage derartiger Wechselspiele können sehr einfach passive fluidische Grundoperationen wie zum Beispiel Ventile auf Basis eines sich kapillar befüllenden und zentrifugal entleerenden Siphons realisiert werden.

Vom HSG-IMIT wurden verschiedene Assays aus den Bereichen klinische Chemie, Immun- und Nukleinsäurediagnostik bereits erfolgreich auf der zentrifugalfluidischen Plattform demonstriert und deren Grundoperationen charakterisiert.



**Bild 3** Ein biochemischer Assay wird in Grundoperationen (a) und diese dann in ein Layout (b) aus mikrofluidischen Grundoperationen für die zentrifugale mikrofluidische Plattform übersetzt. Ein mögliches Rotationsprotokoll ist in (c) gezeigt.



**Bild 4** Mikrofluidische Designs werden mit validierten Fertigungsprozessen, beispielsweise durch thermisches Umformen von Kunststofffolien, realisiert.

## 2 Iterationszyklus des Lab-on-a-Chip Foundry Prozesses

Der Fertigungsablauf des Lab-on-a-Chip Foundry Service gliedert sich in vier aufeinanderfolgende Phasen, die sich zyklisch wiederholen können. Diese in Bild 2 dargestellten Phasen werden im Folgenden erläutert.

- 1. Schematic Assay Description:** Das Protokoll des biochemischen Assays wird in Grundoperationen wie Reagenzienvorlagerung, Dispensieren, Mischen, Inkubieren und die dazwischenliegenden Transportschritte zerlegt (Bild 3a).
- 2. Compilation into Microfluidic Design:** Jede Grundoperation wird auf Basis eines in einem Designhandbuch hinterlegten, parametrisierten mikrofluidischen Layouts in ein konkretes Design übersetzt. Es entsteht somit sukzessive das Komplett-Layout des Lab-on-a-Chip Systems (Bild 3b), das mit einem Antriebsprotokoll verknüpft ist. Auf der zentrifugalen Plattform ist dies beispielsweise ein Frequenzprotokoll für die Steuerung des Rotors (Bild 3c).
- 3. Polymer Prototyping:** Funktionsmuster der mikrofluidischen Lab-on-a-Chip Kartusche werden unter Verwendung von Prozessschritten wie Fräsen, Heißprägen, Blasformen, Oberflächenfunktionalisierung, Reagenzienvorlagerung und Siegeln hergestellt. Als Beispiel für ein Funktionsmuster ist in Bild 4 eine blasgeformte Foliendisk zur Durchführung einer PCR-basierten Genotypisierung in einem zentrifugalen Thermocycler gezeigt [3].
- 4. Functional Testing:** Die Funktionalität des Funktionsmusters wird hinsichtlich der Fertigungsqualität, der fluidischen Eigenschaften sowie der Performance des Assays charakterisiert.

Ziel des Lab-on-a-Chip Foundry Service ist die vier Phasen eines Iterationszyklus innerhalb von 20 Arbeitstagen zu durchlaufen (Bild 2). Im Erfolgsfall liegen nach dieser Zeit erste charakterisierte Funktionsmuster vor, die in einem zweiten Iterationsschritt weiter verbessert werden können.

## 3 Designhandbuch - Datenbank mikrofluidischer Grundoperationen

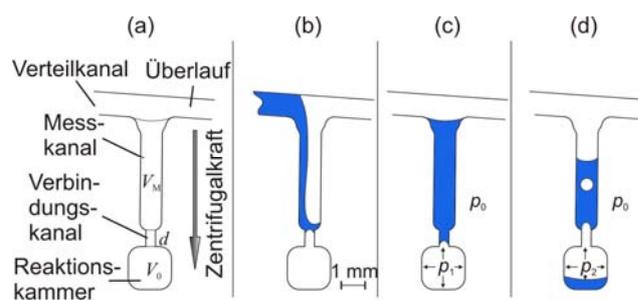
Derzeit werden die zur Implementierung biochemischer Protokolle auf der zentrifugalf Fluidischen Plattform erforderlichen Grundoperationen sukzessive in einem sogenannten "Designhandbuch" hinterlegt, welches auf einer MediaWiki basiert. Die hinterlegten Schlüsselinformationen umfassen das Funktionsprinzip der Mikrofluidikstruktur, deren Parametrisierung, ein Funktionsmodell, Hinweise zur Fertigungstechnologie sowie Validierungsergebnisse.

### 3.1 Beispiel Aliquotierstruktur

Eine wichtige Grundoperation der zentrifugalen Mikrofluidik ist das Aliquotieren einer Probe. Hierzu wurde eine Aliquotierstruktur entwickelt, die in Bild 3 schematisch dargestellt ist. Als Basis dieser zweistufigen Aliquotierstruktur dient ein sogenanntes Zentrifugo-Pneumatisches Ventil, das ein Aliquotieren ohne spätere Kreuzkontamination zwischen den Reaktionskammern erlaubt.

#### Funktionsprinzip

Die zweistufige Aliquotierstruktur wird durch ein Ventil realisiert, das Flüssigkeiten während des Verteilens und Abmessens vor einer Reaktionskammer stoppt und erst beim Erhöhen der Rotationsfrequenz in die Reaktionskammer weiterleitet. So werden alle Reaktionen parallel und physikalisch getrennt gestartet. Als Ventil wurde eine passive, Luftdruck-unterstützte Struktur entwickelt, die Flüssigkeiten durch den Luft-Gegendruck in einer unbelüf-



**Bild 5** Schematische Darstellung des Aufbaus und der Funktion des Grundmoduls einer Aliquotierstruktur. (a) Design und Bezeichnungen. (b) Durch den Verteilkanal wird Flüssigkeit zugeführt, die den Messkanal bis zum Verbindungs-kanal füllt und die Luft in der Reaktionskammer komprimiert. (c) Durch einen Überlauf wird ein Volumen  $V_M$  definiert. (d) Durch Erhöhen der Zentrifugalkraft wird die Luft in der Reaktionskammer verdrängt und entweicht. Durch eine Reihenschaltung dieser Struktur entsteht eine Aliquotierstruktur. [4]

teten Kammer stoppt. Erst bei Frequenzen oberhalb einer „Durchbruchfrequenz“ wird die Luft aus der Kammer verdrängt und ermöglicht so den Weiterfluss (Bild 5). [4]

### Parametrisierung

Bei der Implementierung von biologischen Assays müssen verschiedene Parameter, die das Design der Aliquotierstruktur beeinflussen, berücksichtigt werden. Im Falle einer Aliquotierstruktur sind dies zum Beispiel die Oberflächenspannung der Probenflüssigkeit, der Kontaktwinkel zum Substrat sowie das Proben- und Aliquotvolumen. Einstellbare Parameter sind dagegen das Volumen des Messkanals  $V_M$  sowie die Größe der Reaktionskammer  $V_0$ . Darüber hinaus kann die Breite  $w$  und Tiefe  $d$  des Verbindungskanals variiert werden, um die Durchbruchfrequenz der Probenflüssigkeit einzustellen.

### Funktionsmodell

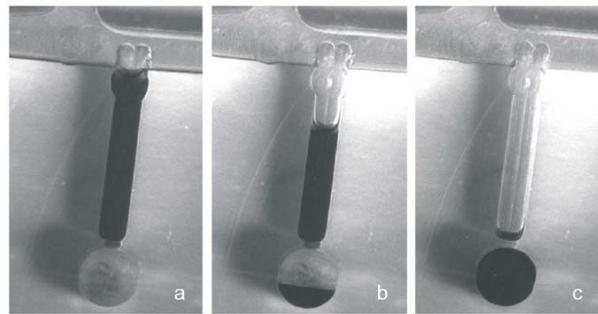
Um später einen neuen Assay schnell in Design und Struktur umsetzen zu können, werden alle oben genannte Parameter in einem Funktionsmodell hinterlegt. Dazu muss nach der Anpassung des Aliquot-Volumens  $V_M$  und  $V_0$  im Beispiel der Aliquotierstruktur noch die zentrifugale Durchbruchfrequenz  $f$  durch Variation der Verbindungskanal-Tiefe und -Breite eingestellt werden. Folgendes Funktionsmodell wurde hierzu vorgeschlagen:

$$p_{\text{burst}}(f) = C \cdot p_{\text{cap}}(d, w, \sigma, \Theta) + B + \Delta p_{\text{air}}(V_0)$$

Es verknüpft die Durchbruchfrequenz  $f$  mit den anderen Einflussgrößen wie der Geometrie des Verbindungskanals ( $w$ ,  $d$ ) sowie der Oberflächenspannung ( $\sigma$ ) und dem Kontaktwinkel der Flüssigkeit ( $\Theta$ ). Zur besseren Übersicht sind hier einige Ausdrücke in den Funktionen  $p(x)$  zusammengefasst. Unbekannte Größen wie die Konstanten  $B$  und  $C$  werden während einer Validierung ermittelt.

### Validierung:

Eine wesentliche Voraussetzung für ein zuverlässiges Lab-on-a-Chip Design ist die erfolgreiche Validierung der mikrofluidischen Komponenten. Strukturen werden dabei, ausgehend von einem festgelegten Produktionsprozess, in einem bestimmten Parameterraum getestet und mit dem Funktionsmodell abgeglichen. Im Fall der Aliquotierstruktur wurden beispielsweise Wasser und wässrige Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen von Detergenzien und Ethanol sowie Reaktionskammern mit einem Volumen zwischen  $1 \mu\text{L}$  und  $36 \mu\text{L}$  untersucht. Dieser Datensatz und das Funktionsmodell werden in dem Designhandbuch abgelegt und erlauben später das schnelle Auslegen von Strukturen, maßgeschneidert auf eine zukünftige Applikation.



**Bild 6** Fluidische Validierung der Aliquotierstruktur. (a) Gefärbte Flüssigkeit wird vom Ventil zurückgehalten, (b) Durchbruch des Ventils, (c) gefüllte Reaktionskammer. [4]

## 4 Schlussfolgerung

Der Lab-on-a-Chip Foundry Service des HSG-IMIT beruht auf einer vollständigen Entwicklungsumgebung für die anwendungsspezifische Integration, Miniaturisierung und Automatisierung biochemischer Assays auf Basis definierter, mikrofluidischer Plattformen. Der Service ermöglicht Nutzern den einfachen Zugang zu Lab-on-a-Chip Applikationen mit schnellen Entwicklungszyklen und geringem Entwicklungsrisiko.

## 5 Literatur

- [1] S. Haerberle und R. Zengerle; Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications, Lab Chip, 2007, 1094 – 1110.
- [2] J. Ducreé, *et al.*; The centrifugal microfluidic Bio-Disk platform J. Micromech. Microeng. 17, 2007, 103–115.
- [3] M. Focke *et al.*; Blow molding of polymer foils for rapid prototyping of microfluidic cartridges, Proc.  $\mu\text{TAS}$ , 2008, 988-990.
- [4] D. Mark, *et al.*; Aliquoting structure for centrifugal microfluidics based on a new pneumatic valve. Proc. MEMS, 2008, 611-614.