

1 Lab-on-a-Chip Design- und Foundry-Service: Implementierung und Miniaturisierung biochemischer Assays auf Grundlage einer Bibliothek validierter mikro- fluidischer Grundoperationen

T. Preis¹, D. Mark¹, N. Paust¹, C. Ziegler^{1,2},
G. Roth^{1,2}, R. Zengerle^{1,2} und F. v. Stetten^{1,2}

¹HSG-IMIT - Institut für Mikro- und Informationstechnik,
Wilhelm-Schickard-Strasse 10, 78052 Villingen-Schwenningen

²Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung, Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK),
Universität Freiburg, Georges-Köhler-Allee 106, 79110 Freiburg

1.1 Die Miniaturisierung und Automatisierung biochemischer Assays

Biochemische Assays finden heutzutage vielfach Anwendung, beispielsweise in der medizinischen Diagnostik, der pharmazeutischen Forschung oder der Umweltanalytik und werden weitgehend automatisiert in Zentral-labors ausgeführt. Das Standardlaborprotokoll umfasst eine Reihe von Analyse- und Auswerteabläufen, die sequenziell auf verschiedenen Analysesystemen ausgeführt werden, wobei die Probe während der Untersuchung von einem Analysemodul zum Nächsten transportiert werden muss. Diese Untersuchungsmethode ist sowohl zeit- als auch kostenaufwendig. Darüber hinaus ist es nicht möglich, Analysen direkt vor Ort auszuführen.

Das in Abbildung 1 veranschaulichte Technologiekonzept Lab-on-a-Chip stellt eine generische Plattform dar, um eine weitergehende Automatisierung sowie eine Miniaturisierung biochemischer Assays durch mikrofluidische Integration zu ermöglichen und auf diese Weise Analysezeit und -kosten zu sparen sowie Untersuchungen dezentralisiert auszuführen.

Sowohl die Neuentwicklung biochemischer Assays als auch die Umsetzung von in Zentrallabors etablierten Standardassays in Form von Lab-on-a-Chip Systemen ist derzeit mit erheblichen Risiken verbunden, da weder etablierte Entwicklungsprozesse in der Designphase des Lab-on-a-Chip Systems noch standardisierte mikrofluidische Technologieplattformen existieren.

Typische mikrofluidische Plattformen, die für einen plattformorientierten Entwicklungsansatz in Frage kommen, sind beispielsweise kapillare Test-

streifen („Lateral Flow Assays“), die mikrofluidische large scale integration (MLSI), die zentrifugale Mikrofluidik, die elektrokinetische Plattform sowie verschiedene druckgetriebene Systeme [1].

Das HSG-IMIT arbeitet seit sechs Jahren erfolgreich an der Erforschung und Entwicklung einer zentrifugal mikrofluidischen Technologieplattform sowie dem Aufbau eines Standardentwicklungsprozesses für die schnelle und kosteneffiziente Erstellung eines anwendungsspezifischen mikrofluidischen Designs.

1.2 Lab-on-a-Chip Design- und Foundry-Service

Der Lab-on-a-Chip Design- und Foundry-Service ist eine neue Dienstleistung des Instituts, die die effiziente Miniaturisierung und Automatisierung biochemischer Assays inklusive der Fertigung von Funktionsmustern umfasst. Ziel ist es, dem Kunden einen einfachen und schnellen Zugang zur Lab-on-a-Chip Technologie bei geringem eigenem Entwicklungsrisiko zu ermöglichen.

Zur schnellen mikrofluidischen Umsetzung kundenspezifischer Assays nutzt der Lab-on-a-Chip Design- und Foundry-Service das Technologiekonzept der zentrifugalen mikrofluidischen Plattformen. Eine mikrofluidische Plattform bezeichnet einen Satz von kombinierbaren mikrofluidischen Grundoperationen wie z.B. Schalten, Dosieren und Mischen, die zur Umsetzung von biochemischen Assays benötigt werden und für die die Möglichkeit besteht, sie in einer kosteneffizienten Fertigungstechnologie, bevorzugt monolithisch integriert, herzustellen. Das kundenspezifische Chipdesign eines Assays kann somit durch Kombination von mikrofluidischen Grundelementen einfach und schnell realisiert werden. Ein wichtiges Merkmal mikrofluidischer Plattformen ist die Skalierbarkeit und variable Platzierbarkeit der fluidischen Grundoperationen. Dadurch kann eine für eine spezielle Anwendung entwickelte Grundoperation leicht auf ähnliche Anwendungen übertragen werden. Im zentrifugalen Ansatz wird die Flüssigkeitssteuerung durch Rotation einer mikrostrukturierten Disk, die lediglich passive Kanalstrukturen enthält, realisiert. Dies hat den Vorteil vollständig auf Schlauchverbindungen zu Antriebsystemen verzichten zu können und somit eine entscheidende Vereinfachung in der Handhabung sowie in der Gerätetechnik zentrifugal operierender Analysesysteme zu erzielen.

Der in Abbildung 2 schematisch dargestellte Lab-on-a-Chip Design- und Foundry-Serviceprozess gliedert sich in eine Reihe aufeinanderfolgender Phasen:

- Zerlegung des Assays in eine Abfolge von mikrofluidischen Grundoperationen und Übersetzung des Fluidikprotokolls in ein integriertes mikrofluidisches Design.
- Optimierung des Designs durch numerische Simulation
- Erstellung eines Funktionsmusters durch Mikrofräsen oder Thermoformen in Folientechnologie [2,3] im Lab-on-a-Chip Prototyping Labor
- Fluidischer und biochemischer Funktionstest

Diese Phasen entsprechen einer Iteration des Foundry-Dienstleistungsprozesses, die im Bedarfsfalle zyklisch wiederholt werden können. Assays aus den Bereichen Immunologie [4] und DNA-Genotyping [5] sind bereits auf diese Weise erfolgreich integriert worden.

1.3 Mikrofluidische Grundoperationen

Mikrofluidische Grundoperationen, wie z.B. Transportieren, Mischen, Aliquotieren u.s.w. sollen durch einfache Aneinanderreihung verwendet werden, um anwendungsspezifische Lab-on-a-Chip Systeme auf zentrifugal mikrofluidischer Plattform schnell und kosteneffizient zu realisieren. Die Funktionalität der fluidischen Grundoperationen soll dabei lediglich durch die Kanalstrukturen sowie durch auf die Anwendung abgestimmte Drehzahlprotokolle des Rotationsmotors definiert werden.

Die einzelnen Komponenten einer mikrofluidischen Plattform liegen vor Beginn einer Implementierung bereits als validierte fluidische Grundoperationen als parametrisiertes Design vor. Eine gegenseitige Abstimmung und Verschaltung ist daher grundsätzlich sehr einfach möglich, so dass auch komplexe Assay-Protokolle schnell integriert und in ein mikrofluidisches Design, wie in Abbildung 3 an einem einfachen Beispielprotokoll veranschaulicht, 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.

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 Nachweissysteme (Assays) realisieren zu können. Im Lab-on-a-Chip Design- und Foundry-Service wird ein derartiger

systematischer Entwicklungsansatz verwirklicht: Um das Entwicklungsrisiko zu minimieren, werden die fluidischen Grundoperationen unter Berücksichtigung verschiedener Leit-Flüssigkeiten ausgelegt, parametrisiert und validiert. Leit-Flüssigkeiten repräsentieren in diesem Sinne die fluidischen Eigenschaften von Reagenzien und Proben die typischerweise in biochemischen Protokollen vorkommen.

1.4 Designhandbuch

Eine Bibliothek als Datenbank parametrisierter und validierter fluidischen Grundoperationen inkl. definierter Schnittstellen und Verkettungsregeln schafft die technologische Voraussetzung zur erfolgreichen Arbeit des Lab-on-a-Chip Design- und Foundry-Service. In den letzten Jahren wurden die zur Implementierung biochemischer Protokolle auf der zentrifugalen mikrofluidischen Plattform erforderlichen Grundoperationen sukzessive in einem sogenannten "Design-Handbuch" hinterlegt, welches auf einer MediaWiki-Softwareplattform basiert. Die hinterlegten Informationen umfassen das Funktionsprinzip der Mikrofluidikstruktur, deren Parametrisierung, ein Funktionsmodell, Hinweise zur Fertigungstechnologie sowie Validierungsergebnisse. Anhand der Aliquotierstruktur wird der Aufbau des Design-Handbuchs exemplarisch erläutert.

1.5 Aliquotierstruktur

Eine wichtige Grundoperation der zentrifugalen Mikrofluidik ist das Aliquotieren einer Probe. Hierzu wurde eine Aliquotierstruktur entwickelt [6]. Als Basis der zweistufigen Grundelemente der Aliquotierstruktur dient ein sogenanntes Zentrifugo-Pneumatisches Ventil, das ein Aliquotieren ohne spätere Kreuzkontamination zwischen den Reaktionskammern erlaubt. Folgende Informationen und Daten wurden im Design-Handbuch zum Ventil dokumentiert.

1.5.1 Funktionsprinzip

Die zweistufigen, in Abbildung 4 schematisch dargestellten Grundelemente der Aliquotierstruktur werden 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 in Abbildung 5 dargestellte passive, luftdruck-unterstützte Struktur entwickelt, die Flüssigkeiten durch den Luft-Gegendruck in einer unbelüfteten Kammer stoppt. Erst bei Frequen-

zen oberhalb einer „Durchbruchfrequenz“ wird die Luft aus der Kammer verdrängt und ermöglicht so den Weiterfluss der Flüssigkeit.

1.5.2 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.

1.5.3 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 (σ) und dem Kontaktwinkel der Flüssigkeit (Θ). 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.

1.5.4 Validierung

Eine wesentliche Voraussetzung für ein zuverlässiges Lab-on-a-Chip Design ist die erfolgreiche Validierung der mikrofluidischen Komponenten. Die Strukturen werden dabei in einem bestimmten Parameterraum sowohl auf Basis einer in Abbildung 6 veranschaulichten numerischen Simulation als auch auf Grundlage von in Abbildung 7 gezeigten fluidischen Funktionstests geprüft sowie 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. Schließlich wird die einwandfreie biochemische Funktion des Analysesystems in seiner Anwendung überprüft. Abbildung 8 stellt die Ergebnisse eines derartigen Tests dar. Die entsprechenden Datensätze sowie das Funktionsmodell werden im Design-Handbuch abgelegt und erlauben später das schnelle Auslegen von Strukturen, maßgeschneidert auf eine zukünftige Applikation.

1.6 Zusammenfassung

Der Lab-on-a-Chip Design- 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.

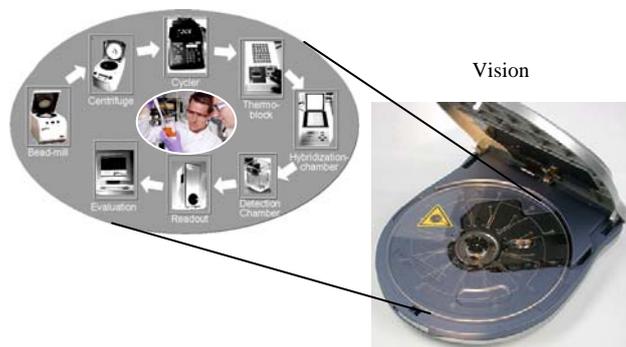
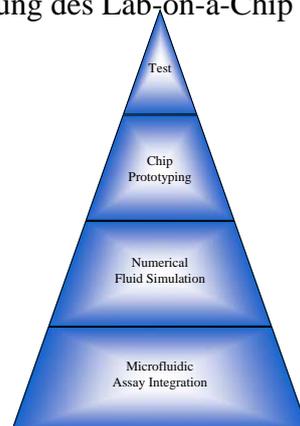


Abb. 1: Veranschaulichung der mikrofluidischen Integration eines komplexen biochemischen Laborprotokolls zur automatisierten medizinischen Vor-Ort Diagnostik.

Abb. 2: Schematische Darstellung des Lab-on-a-Chip Design- und Foundry-Serviceprozesses.



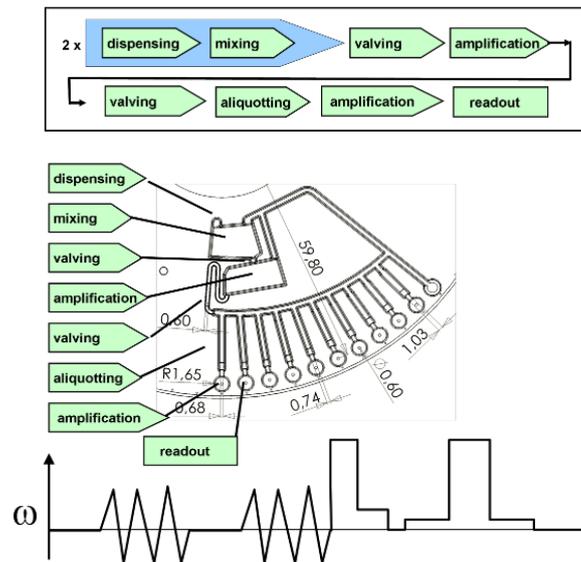


Abb 3: Zerlegung eines Laborprotokolls für eine PCR-Diagnostik in eine Abfolge von Grundoperationen (oben) sowie Übersetzung in ein Fluidikdesign zur Verwendung auf zentrifugaler mikrofluidischer Plattform (mitte). Unten ist das Frequenzprotokoll der Analyse dargestellt.

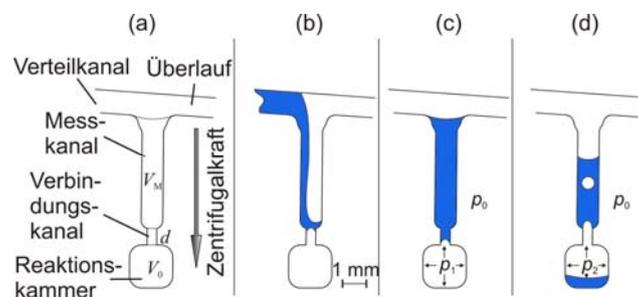


Abb. 4: Schematische Darstellung des Aufbaus und der Funktion des eines Grundelements der Aliquotierstruktur. (a) Design und Bezeichnungen. (b) Im ersten Schritt wird die Flüssigkeit durch den Verteilkanal zugeführt, die den Messkanal bis zum Verbindungskanal füllt und die Luft in der Reaktionskammer komprimiert. (c) Das Volumen V_M wird durch einen Überlauf definiert. (d) Im zweiten Schritt wird die Luft in der Reaktionskammer durch Erhöhen der Zentrifugalkraft verdrängt und entweicht. Durch Aneinanderreihung derartiger Grundelemente entsteht eine Aliquotierstruktur.

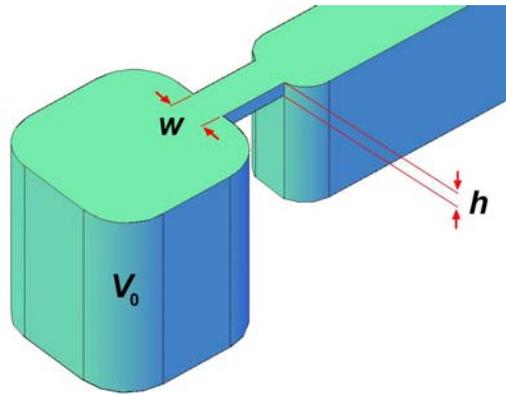


Abb. 5: Schematische Abbildung des parametrisierten Zentrifugo-Pneumatischen Ventils.

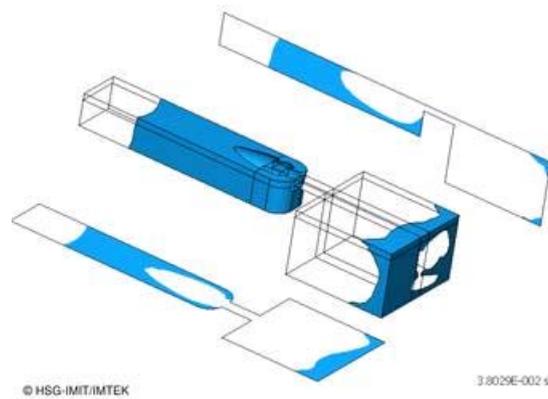


Abb. 6: Fluidmechanische Simulation des Zentrifugo-Pneumatischen Ventils.

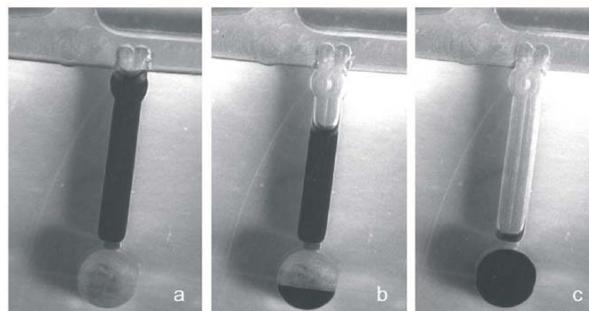


Abb. 7: Fluidische Validierung der Aliquotierstruktur. (a) Gefärbte Flüssigkeit wird vom Ventil zurückgehalten, (b) Durchbruch des Ventils, (c) gefüllte Reaktionskammer.

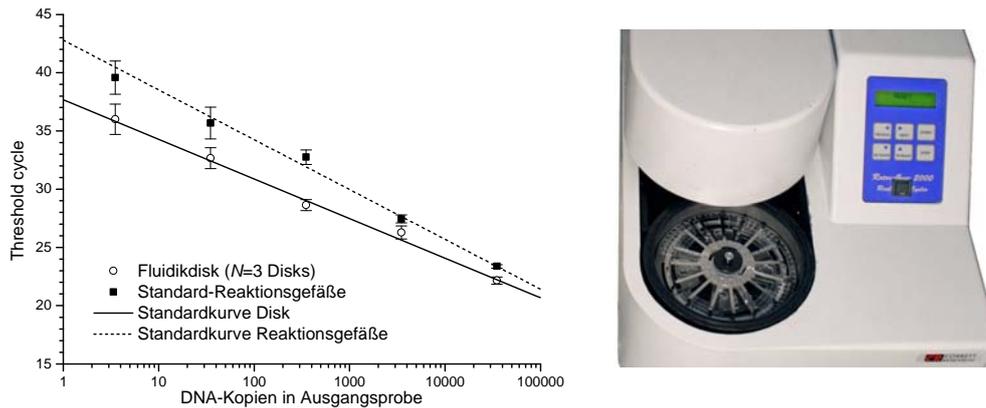


Abb. 8: Ergebnis eines biochemischen Funktionstests (links) durchgeführt auf dem kommerziell erhältlichen Thermocycler Rotorgene 2000 (rechts).

Literatur:

- [1] Mark, D. et al. Microfluidic Platforms: Requirements, Characteristics and Applications, Chemical Society Reviews (10.1039/B820557B) 392010, pp. 1153-1182
- [2] Focke, M. et al. Blow molding of polymer foils for rapid prototyping of microfluidic cartridges, Proc. microTAS 2008, San Diego, USA; pp. 988-990
- [3] Focke, M. et al. Fab-on-a-Foil: Microfluidics on thin and flexible films, Lab Chip (in press), DOI:10.1039/C001195A
- [4] Lutz, S. et al. Lab-on-a-Chip Cartridge for Processing of Immunoassays with Integrated Sample Preparation, Proc. microTAS, 2008, San Diego, USA, pp.1759-1761
- [5] Focke, M. et al., Microstructuring of polymer films for highly sensitive genotyping by real-time PCR on a centrifugal microfluidic platform, Lab Chip 2010 DOI: 10.1039/C004954A
- [6] Mark, D. et al. Aliquoting structure for centrifugal microfluidics based on a new pneumatic valve. Proc. MEMS, 2008, 611-614

Autoren:

Thorsten Preis¹, Daniel Mark¹, Nils Paust¹, Christoph Ziegler^{1,2}, Günter Roth^{1,2}, Roland Zengerle^{1,2} und Felix von Stetten^{1,2}

¹HSG-IMIT - Institut für Mikro- und Informationstechnik, Wilhelm-Schickard-Strasse 10, 78052 Villingen-Schwenningen

²Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung, Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK), Universität Freiburg, Georges-Köhler-Allee 106, 79110 Freiburg