

# Verfahren zur DNA Aufreinigung mit magnetischen Partikeln auf einer zentrifugal-mikrofluidischen Einweg-Foliendisk

O. Strohmeier<sup>1\*</sup>, G. Czilwik<sup>2</sup>, A. Emperle<sup>1</sup>, M. Focke<sup>1</sup>, G. Roth<sup>1,2,3</sup>, D. Mark<sup>2</sup>, R. Zengerle<sup>1,2,3</sup> und F. von Stetten<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung, Institut für Mikrosystemtechnik – IMTEK, Universität Freiburg

<sup>2</sup> HSG-IMIT – Institut für Mikro- und Informationstechnik, Villingen-Schwenningen

<sup>3</sup> BIOS Centre for biological signalling studies, Universität Freiburg

\* Kontakt: +49 761 / 203 – 7345; oliver.strohmeier@imtek.de

## Kurzfassung

Vorgestellt wird ein neues Verfahren zur integrierten DNA Aufreinigung mit Hilfe magnetischer Partikel auf einer zentrifugal-mikrofluidischen Foliendisk. Wesentliche Vorteile gegenüber dem Stand der Technik [1-4] sind kurze Prozesszeiten und Ausbeuten von annähernd 100% (verglichen mit der manuell durchgeführten Referenzextraktion), automatischer Betrieb bei niedrigen Rotationsfrequenzen (< 8 Hz) und ein modulares Design der mikrofluidischen Kammern. Der Transport der magnetischen Partikel zwischen den einzelnen Kavitäten erfolgt durch ein Zusammenspiel magnetischer und zentrifugaler Kräfte. Mit dem vorgestellten System konnte vollautomatisch DNA in PCR Qualität aus 3 Verdünnungen ( $1,5 \cdot 10^4$  Kolonie bildende Einheiten (KbE);  $1,5 \cdot 10^6$  KbE und  $1,5 \cdot 10^8$  KbE pro Probe) eines *Escherichia coli* Lysats in ~ 6 min extrahiert werden.

## Abstract

We present a novel method for the integrated magnetic bead based DNA purification on a centrifugal microfluidic foil disk. Advantages over existing solutions [1-4] include short processing times and yield close to 100% compared to manually conducted reference purification, automatic processing at low centrifugal frequencies (< 8 Hz) and modular design of the microfluidic structures. Herein, magnetic beads are moved between different fluidic chambers by an interplay of centrifugal and magnetic forces. With the presented system, PCR ready DNA from 3 different dilutions ( $1.5 \cdot 10^4$  colony forming units (CFU);  $1.5 \cdot 10^6$  CFU and  $1.5 \cdot 10^8$  CFU per sample) of an *Escherichia coli* lysate could be extracted within ~ 6 min without any manual interference.

## 1 Motivation

Die Aufreinigung von DNA ist ein essentieller Schritt in der nukleinsäurebasierten Analytik. Eine Automatisierung mittels mikrofluidischer Systeme gestaltet sich jedoch meist schwierig. Zentrifugal-mikrofluidische Ansätze machen im Gegensatz zu druckgetriebenen Fluidiken zwar eine externe Druckquelle zur Fluidaktuierung überflüssig, benötigen allerdings zur Durchführung einer DNA Extraktion meist hohe Rotationsfrequenzen und zusätzliche Hardware wie Laser und Servo-Motoren [1-4].

Ein grundlegendes Problem ist darüber hinaus der Platzverbrauch, insbesondere in radiale Richtung, was die Integration weiterer Prozessschritte erschwert. Die mikrofluidischen Strukturen zur hier vorgestellte DNA Aufreinigungsmethode sind so auf der Disk angeordnet, dass die Nachschaltung einer Fluidik zur Echtzeit PCR [5,6] entsprechend möglich ist.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Herstellung der Disks durch $\mu$ TSL

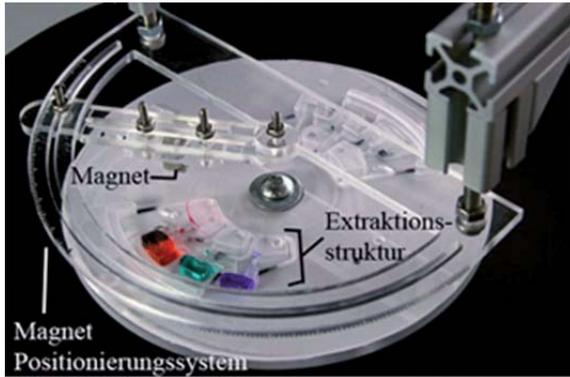
Mikrofluidische Strukturen werden mittels 2D CAD Software gezeichnet und anschließend durch Mikrofräsen (KernEvo, Kern Mikrotech, Eschenlohe) in PMMA Rohlinge (Maartin, Freiburg) mit einer Dicke von 4 mm

und einem Durchmesser von 130 mm übertragen. Die gefräste PMMA Disk wird anschließend mit PDMS (Elastosil RT 607, Wacker, München) abgeformt. Das so hergestellte PDMS Negativ dient dann in einer Heißpräge (Hex 01, Jenoptik, Jena) als Formeinsetzung zur Herstellung der blasgeformten Disks aus COP Folie (COP ZF 14, Zeon Chemicals, USA) mit einer Dicke von 188  $\mu$ m und einem Durchmesser von 130 mm. Dieses Softlithographische Replikationsverfahren,  $\mu$ TSL (microthermoforming by soft lithography) ist im Detail in [7] beschrieben

### 2.2 Aufbau und fluidisches Design

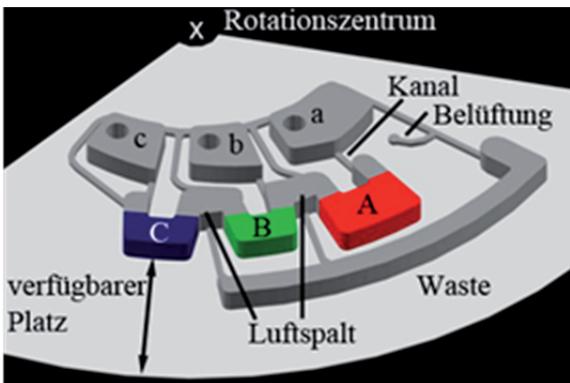
Der Standardlaborprozess zur DNA Aufreinigung mit magnetischen Silikapartikeln musste zunächst in ein mikrofluidisches Design übersetzt und anschließend auf der Foliendisk abgebildet werden. Entsprechend dem Standardprozess müssen hierfür die magnetischen Partikel (MagSusp G, Qiagen, Hilden) zunächst in Kontakt mit einer Mischung aus Probe und Bindepuffer (Puffer ML, Qiagen, Hilden) gebracht werden. Die DNA aus der Probe kann hierbei an die Oberfläche der Partikel binden. Anschließend werden die Partikel mit der angebondenen DNA in einen Waschpuffer (Puffer AW2, Qiagen, Hilden) überführt um sämtliche Stoffe abzureichern, die eine an-

schließende PCR inhibieren könnten. Die DNA bleibt hierbei an die Partikel gebunden. Schlussendlich werden die Partikel in einen Elutionspuffer (RNase freies Wasser) gegeben und die DNA löst sich von der Partikeloberfläche. Um den beschriebenen Ablauf mikrofluidisch abzubilden wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, magnetische Partikel auf der Disk zwischen einzelnen flüssigkeitsgefüllten Kammern über einen Luftspalt zu transportieren. Mit einem Permanentmagneten (W-07-N, Supermagnete.de, Stuttgart), der etwa 1 mm über der Disk ortsfest angebracht ist, wird ein Magnetfeldgradient erzeugt, der ausreichend stark ist, um die Partikel in der Flüssigphase zu manipulieren (Abb 1).



**Abb 1:** Foliendisk auf zentrifugalem Teststand. Über der Disk ist ein Permanentmagnet angebracht, der zu Entwicklungszwecken frei in radiale und azimuthale Richtung positionierbar ist, aber in definierten fixen Positionen verwendet wird.

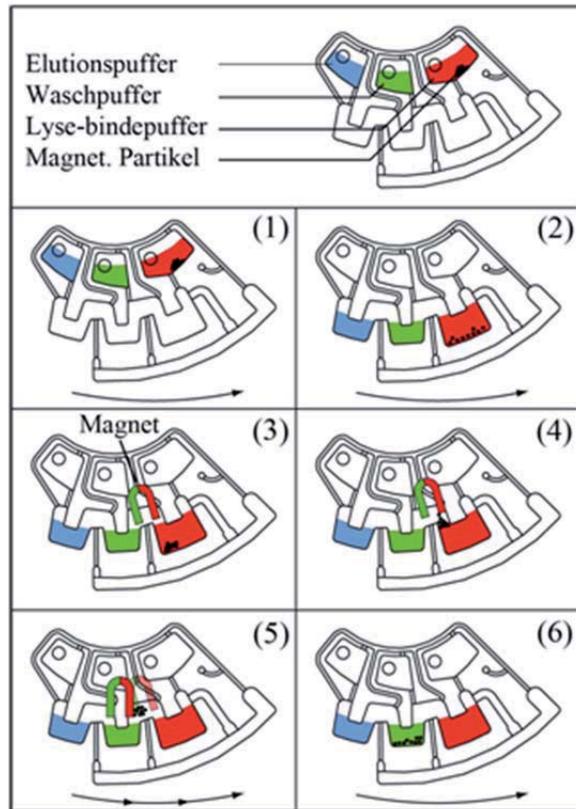
Die vorgestellte mikrofluidische Struktur beinhaltet drei separate Einfüllöffnungen zur Befüllung mit den entsprechenden Reagenzien. Alle Einfüllöffnungen sind mit über einen Kanal mit den Extraktionskammern verbunden. Durch Rotation der Disk werden zentrifugale Kräfte erzeugt, die die flüssigen Reagenzien von den Einfüllöffnungen (Abb. 2: a, b, c) in die einzelnen Kammern (Abb. 2: A, B, C) überführen. Diese Kammern sind über einen Luftspalt miteinander verbunden.



**Abb. 2:** DNA Aufreinigungsstruktur mit Einfüllöffnungen (a, b, c), die über einen Kanal (A) Lyse-, (B) Wasch- und (C) Elutionskammer verbunden sind.

### 2.3 Funktionsprinzip

Der sequentielle Ablauf der DNA Extraktion ist in Abb. 3 beschrieben. Zunächst müssen alle benötigten Reagenzien und magnetischen Partikel in die jeweiligen Einfüllöffnungen einpipettiert werden (1). Die Disk wird beschleunigt und die eingefüllten Reagenzien durch zentrifugale Kräfte in die jeweiligen Kammern überführt (2). Nachdem die DNA an die Partikeloberfläche angebinden ist wird die Disk so positioniert, das sich der Magnet über der Flüssig-Luft Grenzfläche der Lysekammer befindet (3). Partikel werden vom Magneten angezogen und über die Phasengrenze in den Luftspalt transportiert (4). Die Disk wird in 0,5° Inkrementen gedreht. Die Partikel verbleiben ortsfest unter dem Magneten (5). Sobald sich die Partikel im Luftspalt über der benachbarten Washkammer befinden wird die Disk beschleunigt um die Partikel in den Washpuffer zu überführen (6). Schritte (3) – (6) werden wiederholt um die Partikel von der Wasch- in die Elutionskammer zu überführen.



**Abb. 3:** Ablauf der Extraktion. Reagenzien werden in die Einfüllöffnungen pipettiert (1); Disk wird beschleunigt. Durch Zentrifugalkräfte werden die Flüssigkeiten/Partikel in die jeweilige Kammer geleitet (2). Disk wird relativ zum Magneten positioniert (3). Magnet zieht Partikel an, diese überqueren die Flüssig / Luft Grenzfläche (4) Disk wird in 0,5° Inkrementen gedreht (5). Die Partikel folgen dem Magneten. (6) Disk wird beschleunigt um die Partikel in die nächste Kammer zu schleudern. Wiederholung der Schritte (3) – (6). Ein nicht dargestellter Magnet bedeutet, dass die Disk schnell rotiert und die Zentrifugalkraft über die Magnetkraft dominiert.

### 3 Experimentaltteil

#### 3.1 Herstellung des Bakterienlysats

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ Z1 Bakterien wurden in LB Medium bei 37 °C übernacht kultiviert und anschließend mit kommerziell erhältlichen Reagenzien (Puffer ML, Qiagen, Hilden) lysiert. Verbleibende Zellbestandteile wurden mit Proteinase K (Recombinant proteinase K, Roche Applied Sciences, Mannheim) verdaut. Von diesem Lysat mit einer Ausgangskonzentration von  $\sim 6.6 \cdot 10^8$  Kolonie bildenden Einheiten pro mL (KbE/mL) wurden 1:100 und 1:10.000 Verdünnungen angefertigt. Alle Lysate wurden anschließen bei -18 °C gelagert.

#### 3.2 DNA Extraktion

Für die Extraktionsexperimente wurde die Disk mit den folgenden Reagenzien beladen: Einfüllöffnung a: 230  $\mu$ L Probe (entspricht  $1,5 \cdot 10^8$  KbE für die unverdünnte Probe) und 10  $\mu$ L Partikelsuspension. b: 130  $\mu$ L Waschpuffer. c: 130  $\mu$ L Elutionspuffer. Das unter „Funktionsprinzip“ und in Abb. 3 beschriebenen Protokoll wurde gestartet. Nach erfolgreicher Extraktion wurde das Eluat für die weitere Analyse aus der Disk entnommen.

#### 3.3 Bestimmung der DNA Konzentration

Der DNA Gehalt wurde anhand der *E. coli* pal Gen Kopienzahl mittels quantitativer PCR bestimmt. Zur statistischen Absicherung wurde für jedes Eluat eine dreifache DNA Quantifizierung mittels PCR durchgeführt. Mit jeder PCR wurden Ziel-DNA-freie Negativkontrollen zur Detektion von Querkontaminationen mitgeführt.

### 4 Ergebnisse und Diskussion

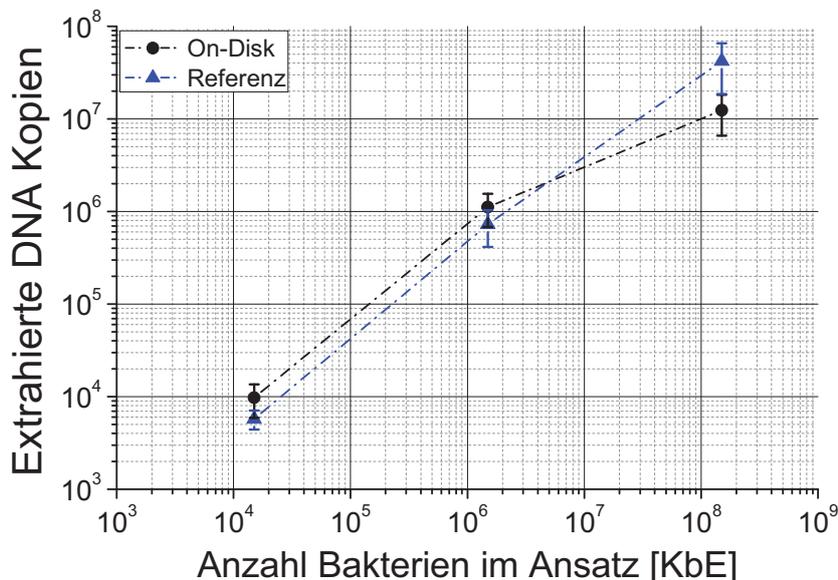
DNA Extraktionen wurde mit 230  $\mu$ L unverdünnter, 1:100 und 1:10.000 verdünnter Probe mit entsprechend  $1,5 \cdot 10^8$  KbE,  $1,5 \cdot 10^6$  KbE und  $1,5 \cdot 10^4$  KbE jeweils auf frisch hergestellten Disks ( $n = 5$  je Verdünnung) durchgeführt. Zur Bestimmung der Ausbeute wurden für jede Verdünnung manuelle Referenzextraktionen in laborüblichen 1,5 mL Reaktionsgefäßen ( $n = 3$  je Verdünnung) durchgeführt. Mit der automatischen Disk Extraktion konnten vergleichbare Ausbeuten wie bei der manuell durchgeführten Referenzextraktion erzielt werden (Abb. 4).

### 5 Zusammenfassung und Ausblick

Es wurde ein modular aufgebautes, zentrifugal mikrofluidisches System zur automatischen DNA Extraktion bei geringen Rotationsfrequenzen demonstriert. Die fluidischen Strukturen sind hierbei so angeordnet daß eine Integration etwa einer nachgeschalteten Fluidik zur quantitativen PCR möglich ist [5]. Es konnten vergleichbare DNA Ausbeuten zur manuellen Referenzextraktion demonstriert werden. Die vorgestellte Methode zum Transport magnetischer Partikel könnte darüber hinaus etwa für Partikel basierte Immunoassays verwendet werden und bildet so die Grundlage für weitere Anwendungen.

### 6 Danksagung

Wir bedanken uns für die finanzielle Unterstützung des Projektes durch die Baden-Württemberg Stiftung (MST II 17). Für die Reagenzien und Partikel bedanken wir uns bei der Firma QIAGEN, Hilden.



**Abb. 4:** Ergebnis der DNA Extraktion. Anzahl extrahierter Kopien aus der unverdünnten, 1:100 verdünnten und 1:10.000 verdünnten Probe. Blau: Ergebnis der Disk Extraktion; Schwarz: Referenzextraktion

## 7 Literatur

- [1] D. Mark, M. Rombach, S. Lutz, R. Zengerle und F. von Stetten, **Proceedings of  $\mu$ TAS 2009**, pp. 110-112
- [2] D. Mark, S. Haerberle, S. Lutz, R. Zengerle und F. von Stetten, **Proceedings of Transducers 2009**, pp. 1230-1233
- [3] S. Haerberle, S. Pausch, R. Burger, S. Lutz, F. von Stetten, R. Zengerle und J. Ducrée, **Proceedings of  $\mu$ TAS 2007**, pp. 1231-1233.
- [4] Y. K. Cho, J. G. Lee, J. M. Park, B. S. Lee, Y. Lee, und C. Ko, *Lab Chip*, **2007**, 7:565-573
- [5] M. Focke, F. Stumpf, B. Faltin, P. Reith, D. Bamarni, S. Wadle, C. Mueller, H. Reinecke, J. Schrenzel, P. Francois, D. Mark, G. Roth, R. Zengerle und F. von Stetten, *Lab Chip*, **2010**, 10: 2519–2526
- [6] M. Focke, F. Stumpf, G. Roth, R. Zengerle und F. von Stetten, *Lab Chip*, **2010**, 10:3210–3212
- [7] M. Focke, B. Faltin, T. Hösel, C. Müller, J. Ducrée, R. Zengerle und F. von Stetten, **Proceedings of  $\mu$ TAS 2008**, pp. 988-990