

# LabTube – eine innovative Plattform zur Assay-Automatisierung in Laborzentrifugen

## LabTube – an innovative platform for assay automation in laboratory centrifuges

Dr. Ana R. Fiebach, HSG-IMIT, Freiburg, Deutschland, ana.fiebach@hsg-imit.de

Shuo Zhang, HSG-IMIT, Freiburg, Deutschland, shuo.zhang@hsg-imit.de

Dr. Lisa Drechsel, HSG-IMIT, Freiburg, Deutschland, lisa.drechsel@hsg-imit.de

Dr. Arne Kloke, HSG-IMIT, Freiburg, Deutschland, arne.kloke@hsg-imit.de

Nina Fritze, Eurofins GeneScan, Freiburg, Deutschland, NinaFritze@eurofins.de

Dr. Dörte Wulff, Eurofins GeneScan, Freiburg, Deutschland, DoerteWulff@eurofins.de

Dr. Jürgen Steigert, Robert Bosch GmbH, Gerlingen, Deutschland, Juergen.Steigert@de.bosch.com

Dr. Felix von Stetten, HSG-IMIT, Freiburg, Deutschland, vstetten@imtek.uni-freiburg.de

Prof. Roland Zengerle, HSG-IMIT, Freiburg, Deutschland, zengerle@imtek.uni-freiburg.de

Dr. Nils Paust, HSG-IMIT, Freiburg, Deutschland, nils.paust@hsg-imit.de

### Kurzfassung

Wir stellen hier die innovative LabTube Plattform vor: Ein voll automatisiertes, komfortables und kostengünstiges System, welches diverse Laborprozesse auf einer Standard-Laborzentrifuge automatisiert und dem Anwender somit eine wirtschaftliche Alternative zu bestehenden Lab-on-a-Chip Systemen bietet. Das LabTube hat das Format eines 50 ml Zentrifugen-Röhrchens und besteht aus einer gestapelten Anordnung von drei Revolvern, die mittels einer Kugelschreibermechanik zentrifugal gesteuert werden. Der oberste Revolver dient der Reagenzienvorlagerung, der mittlere Revolver integriert die Assay-spezifischen Einheitsoperationen und der unterste Revolver dient dem Auffangen und Separieren der prozessierten Reagenzien. Um die Funktionalität des LabTubes am Beispiel eines häufig verwendeten Assays zu demonstrieren, wurde eine DNA Extraktion vollautomatisch durchgeführt. Die Extraktion von DNA aus Rapssamen-Lysat im LabTube resultierte in einer DNA-Ausbeute von  $17,7 \pm 8,1 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  im Vergleich zu einer manuellen Referenz mit  $14,8 \pm 1,5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ . Durch das LabTube konnte somit die praktische Arbeitszeit pro Extraktion von 15 Minuten auf 1 Minute verringert werden, ohne dass ein spezifisches Training oder der Einsatz von Spezialgerät nötig ist. Aktuell wird die LabTube basierte Automatisierung ebenfalls für Anwendungen in der Proteinanalytik und in der Vor-Ort Sepsis-Diagnostik erprobt.

### Abstract

In this paper we present the innovative LabTube platform: A fully automated, easy to handle and cost-effective system that automatizes diverse assays on standard laboratory centrifuges and thus offers a reasonable alternative to existing lab-on-a-chip systems. The LabTube has the size of a 50 ml centrifuge tube and is composed of three stacked revolvers that are operated by a centrifuge-triggered ball-pen mechanism. The upper revolver provides the reagent pre-storage, the middle revolver comprises the assay-specific fluidic unit operations and the lower revolver functions as a unit for the collection and separation of the processed reagents. To demonstrate the functionality of the LabTube on the basis of a frequently used assay, a DNA extraction was performed. The fully automated DNA extraction from rapeseed lysate in the LabTube resulted in a DNA yield of  $17,7 \pm 8,1 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  in comparison to a manual reference with  $14,8 \pm 1,5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ . Thus, the hands-on time was reduced from 15 minutes to 1 minute by employing the LabTube, without the need for special training or special laboratory equipment. Currently, the LabTube is also under investigation for protein analysis and for point-of-care diagnostic.

## 1 Einleitung

Moderne bioanalytische Mikrosysteme haben sich in den letzten Jahren als Schlüsseltechnologie etabliert, um sowohl biochemische Analysen als auch patientennahe Diagnostik kostengünstig und automatisiert durchzuführen [1]. Lab-on-a-Chip Systeme bieten eine Alternative zu kostenintensiven Laborautomaten, die zum einen für Labore mit geringem Probenaufkommen nicht rentabel sind

und sich zum anderen nicht für die patientennahe Diagnostik eignen. Ein gemeinsamer Nachteil bestehender Lab-on-a-Chip Systeme ist aber die mangelnde Standardisierung und die Notwendigkeit, kostenintensive Spezialgeräte zur Durchführung und Detektion der Tests anzuschaffen.

Hier präsentieren wir eine innovative generische Plattform, welche die zuvor genannten Nachteile nicht aufweist: Das LabTube automatisiert diverse Laborprozesse

in einer Standard-Laborzentrifuge und ermöglicht somit dem Anwender eine einfache und kostengünstige Durchführung biochemischer Analysen. Darüber hinaus werden durch die Kompatibilität des LabTubes zu Standard-Laborgeräten und Standard-Laborprozessen die technologischen Markteintrittsbarrieren im Vergleich zu verfügbaren Lab-on-a-chip Systemen signifikant reduziert [2].

## 2 Technologie

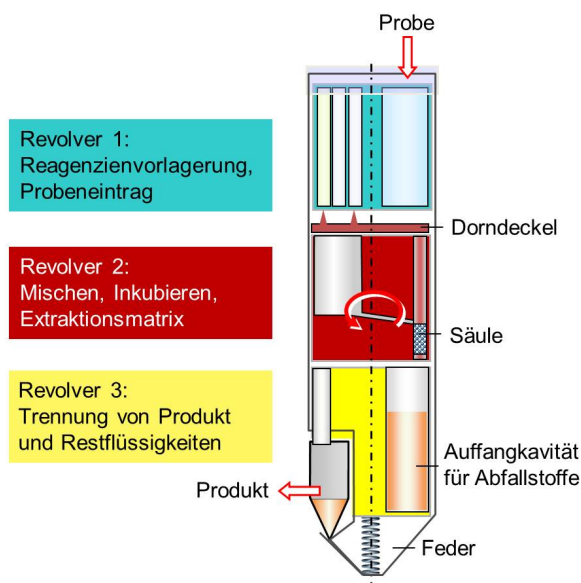
### 2.1 Aufbau der LabTube Kartusche

Kernstück der LabTube Technologie ist ein miniaturisiertes mikrofluidisches System in der Größe eines Standard 50 ml Zentrifugenröhrchens (**Bild 1**), das in Spritzguss gefertigt werden kann.



**Bild 1** Prototyp des LabTubes zur DNA Extraktion in einer Standard-Laborzentrifuge (Z326K, Hermle Labortechnik); Bild von Bernd Müller

Die LabTube Kartusche ist im Inneren mit drei Revolvern ausgestattet (**Bild 2**), die von einer zweiteiligen äußeren Hülse umschlossen werden.

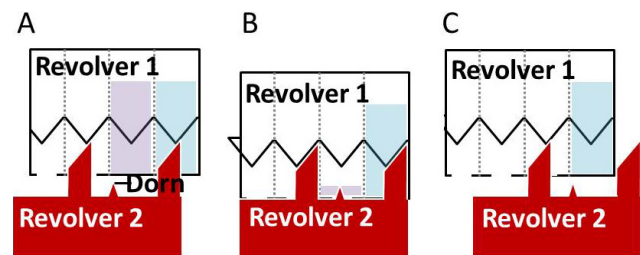


**Bild 2** Schematische Darstellung einer LabTube Kartusche zur DNA Extraktion.

Der oberste Revolver 1 dient der Reagenzienvorlagerung und beinhaltet eine Schnittstelle für den Probeneintrag. Die einzelnen Kavitäten sind von unten mit einer Aluminiumfolie versiegelt. Der zentrale Revolver 2 ermöglicht die Assay-spezifischen Einheitsoperationen, wie z.B. Mischen und Inkubieren oder die Integration einer Festphase zur Anbindung von Biomolekülen. Zusätzlich enthält Revolver 2 einen Dorndeckel, der benötigt wird, um die versiegelten Kavitäten von Revolver 1 zu öffnen. Der unterste Revolver 3 ist die Auffangvorrichtung für die Abfall- und Endprodukte des Tests und ermöglicht, sofern der Test das erfordert, das sequentielle Separieren verschiedener Flüssigkeiten. Der unterste Revolver ist außerdem auf einer Feder gelagert, die zur Realisierung der Drehmechanik essentiell ist.

### 2.2 Drehmechanik im LabTube

Um ein schrittweises Verdrehen der Revolver und somit den Transport der Flüssigkeiten im LabTube zu ermöglichen, wurde eine zentrifugal gesteuerte Drehmechanik implementiert. Diese Kugelschreibermechanik übersetzt das Zentrifugationsprotokoll in eine sukzessive Rotation von Revolver 2 (**Bild 3**) und beruht auf einer Wechselwirkung von Zentrifugalkraft und der Rückstellkraft der Feder.



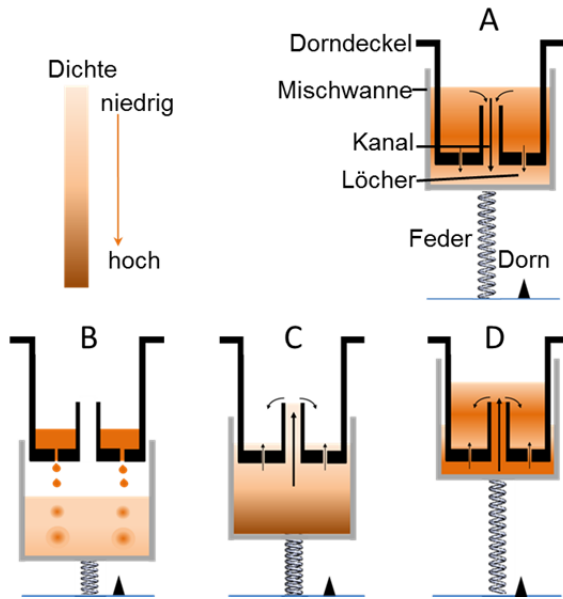
**Bild 3** Darstellung der Kugelschreibermechanik und der Reagenzienfreisetzung (Zwei Flüssigkeiten als gefärbte Säulen in Revolver 1). Beschreibung siehe Text.

Durch die Frequenzerhöhung der Zentrifuge bewegen sich alle Revolver entlang einer Führungsstruktur in der Hülse nach unten (**Bild 3 A**) und der Dorndeckel von Revolver 2 durchsticht die Deckelfolie von Revolver 1 (**Bild 3 B**). In dieser Position erfahren die Revolver die maximale Auslenkung nach unten, werden durch die Führungsstrukturen der Hülse aber am Rotieren gehindert. Wird nun die Frequenz der Zentrifuge verringert, drückt die Federkraft die Revolver wieder nach oben. Dabei wird Revolver 2 entlang einer weiteren Führungsstruktur in Revolver 1 horizontal verdreht (**Bild 3 C**). Am Ende eines solchen Schaltvorgangs befinden sich Revolver 1 und 2 relativ zueinander um einen 1/8-Kreis verdreht.

### 2.3 Mischvorgang im LabTube

Das Mischen von zwei Flüssigkeiten verschiedener Dichte in Revolver 2 wird ebenfalls mit Hilfe des Wechselspiels von Zentrifugalkraft und Federkraft erreicht. Die Mischeinheit besteht wie in **Bild 4** dargestellt aus der

Mischwanne, die auf einer Feder gelagert ist, und dem Dorndeckel, der unbeweglich ist.



**Bild 4** Dichteumlagerung zweier Flüssigkeiten in Dorndeckel und Mischwanne. Beschreibung siehe Text.

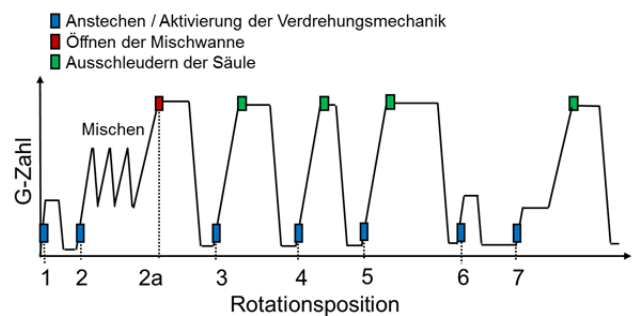
Während der Beschleunigung der Zentrifuge bewegt sich die Mischwanne nach unten und die Flüssigkeit mit niedriger Dichte fließt über den Überflusskanal in die Mischwanne (Bild 4 A). Die Flüssigkeit mit hoher Dichte verbleibt zunächst im Dorndeckel, da der fluidische Widerstand der Löcher sehr hoch ist (Bild 4 B). Bei anhaltender Zentrifugation fließt die Flüssigkeit mit hoher Dichte sukzessiv über die Löcher des Dorndeckels in die Mischwanne und sammelt sich am Boden der Mischwanne (Bild 4 C). Ein erster Schritt in der Dichteumlagerung ist damit erreicht. Während des Entschleunigens der Zentrifuge drückt die Feder die Mischwanne wieder nach oben und der Großteil der Flüssigkeiten fließt über den Überflusskanal zurück in den Dorndeckel (Bild 4 D). Zuerst erreicht die Flüssigkeit mit geringer Dichte den Dorndeckel, danach folgt die Flüssigkeit mit hoher Dichte. Dies ist der zweite Schritt der Dichteumlagerung in einem Mischvorgang. Je nach Protokoll wird dieser Mischvorgang mehrfach wiederholt. Anschließend wird bei maximaler Beschleunigung der Boden der Mischwanne mit Hilfe eines Dorns perforiert, um die Flüssigkeiten auf die stromabwärts gelegene Extraktionssäule zu übertragen.

## 2.4 Frequenzprotokoll einer LabTube DNA Extraktion

Die zuvor beschriebenen Operationen wie Reagenzienfreisetzung oder Mischen werden alle durch Beschleunigungswechsel in der Zentrifuge aktiviert und aktuiert. Beispielsweise löst eine Beschleunigung über in etwa 200 g durch den in Bild 3 dargestellten Mechanismus die Reagenzienfreisetzung aus. Gleichzeitig initiiert diese Beschleunigung eine Verdrehung von Revolver 2 gegenüber

Revolver 1 und 3. Diese Verdrehung (Rotation um einen 1/8-Kreis) wird später durch eine Entschleunigung auf unter 100 g abgeschlossen. Bild 5 zeigt, am Beispiel einer DNA-Aufreinigung aus Lebensmittellysaten, wie sich die einzelnen Operationen durch ein Frequenzprotokoll für eine automatisierte Assaydurchführung zusammensetzen lassen.

In Rotationsposition 1 wird die erste Kavität von Revolver 1 von unten mittels des Dorndeckels geöffnet und der Bindepuffer in die Mischeinheit von Revolver 2 überführt. Anschließend wird in Rotationsposition 2 die Probe (Lebensmittellysat) in die Mischeinheit geschleudert und in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten gemischt. Durch eine Erhöhung der Frequenz wird die Mischwanne anschliessend geöffnet (2a) und das Bindegemisch auf die Extraktionssäule gespült. Nachdem die Flüssigkeiten die Säule passiert haben, werden sie in Revolver 3 in einer Auffangkavität als „Restflüssigkeiten“ gesammelt. In den folgenden Rotationspositionen 3 bis 5 werden jeweils Waschpuffer freigesetzt, über die Säule geleitet und die Säule trocken geschleudert. Nach einem Leerschritt (6) wird final der Elutionspuffer freigesetzt (7) und nach einer kurzen Haltezeit bei geringer Beschleunigung über die Säule geleitet. Das Produkt, welches somit die extrahierte DNA enthält, wird in Revolver 3 separat gesammelt.

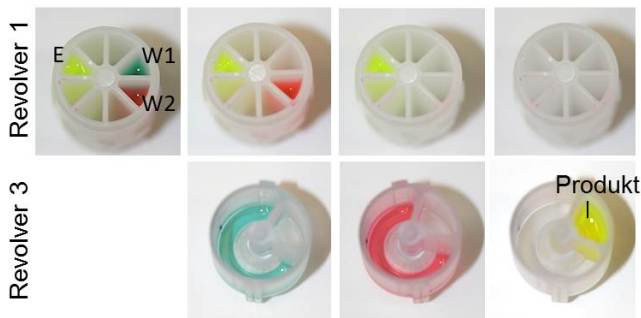


**Bild 5** Frequenzprotokoll für eine automatisierten DNA Extraktion aus Lebensmittellysaten im LabTube.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Demonstration der LabTube Mechanik und Fluidik

In einem ersten Testlauf wurde überprüft ob die Mechanik des LabTubes zuverlässig schaltet und den kontaminationsfreien Transfer der Flüssigkeiten in Revolver 3 ermöglicht. Dazu wurden in drei Kavitäten von Revolver 1 eingefärbte Flüssigkeiten vorgelagert und das Frequenzprotokoll aus Bild 5 soweit angepasst, dass die drei Flüssigkeiten sequenziell freigelassen werden.



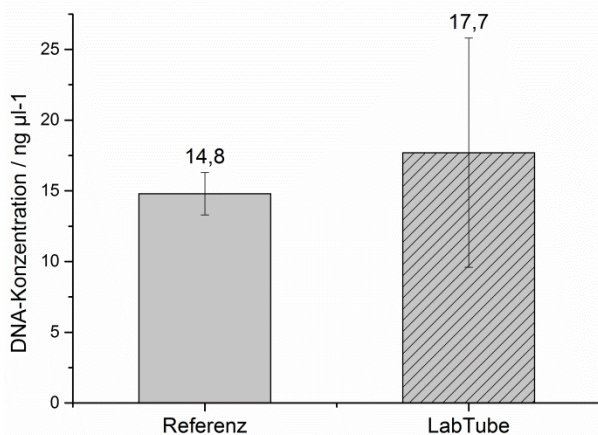
**Bild 6** Sequentielle Fluidführung von Revolver 1 zu Revolver 3. (W1 und W2 = Waschpuffer 1 und 2, E = Elutionspuffer).

### 3.2 Automatisierte DNA Extraktion

Zur Demonstration der Funktionalität der LabTube Kartusche wurde eine DNA-Extraktion aus Rapssamen-Lysat durchgeführt. Alle benötigten Reagenzien eines DNA-Extraktionskits für Lebensmittelproben (Kit: GeneSpin, Eurofins GeneScan) wurden in Revolver 1 vorgelagert. Zur gezielten Bindung von DNA-Molekülen wurde in Revolver 2 eine Extraktionssäule integriert.

Die automatisierte DNA-Aufreinigung aus 200  $\mu\text{l}$  Rapssamen-Lysat wurde in einer Laborzentrifuge mit Ausschwingrotor (Z326K Hermle Labortechnik) durchgeführt. Im Anschluss daran wurde die Konzentration der extrahierten DNA mittels einer Fluoreszenz-basierten Detektionsmethode (Quanti-IT PicoGreen dsDNA Assay kit, Invitrogen) bestimmt.

Die manuell durchgeführte DNA-Aufreinigung resultierte in einer durchschnittlichen DNA-Ausbeute von  $14,8 \pm 1,5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  (5 Wiederholungen), während mit dem LabTube  $17,7 \pm 8,1 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  (4 Wiederholungen) DNA extrahiert werden konnte (**Bild 7**).



**Bild 7** DNA-Ausbeuten von vier LabTube DNA-Aufreinigungen aus Rapssamen-Lysat im Vergleich zu fünf manuell durchgeführten Referenzaufreinigungen.

## 4 Zusammenfassung

Das LabTube ist eine generische Plattform zur Automatisierung von Laborprozessen in Standard-Laborzentrifugen. Sie erlaubt dem Anwender eine einfache Handhabung, da weder ein Spezialgerät noch ein gesondertes Training zur Durchführung der Prozesse notwendig ist.

Durch das LabTube werden die manuellen Schritte auf ein Minimum reduziert, da alle benötigten Reagenzien im LabTube vorgelagert sind und nur der Probeneintrag manuell erfolgen muss. Kernstück der Technologie ist eine Kugelschreiber-Drehmechanik, die einen sequentiellen Flüssigkeitstransfer innerhalb des LabTubes ermöglicht. Basierend auf dieser Drehmechanik werden die Assay-spezifischen Einheitsoperationen in ein Frequenzprotokoll für die Standard-Laborzentrifuge übersetzt.

Anhand der DNA-Extraktion aus Rapssamen-Lysat konnten wir die Funktionalität des LabTubes erfolgreich am Beispiel einer gängigen Anwendung demonstrieren. Durch die Automatisierung dieser Extraktion im LabTube wurde die praktische Arbeitszeit von 15 Minuten auf 1 Minute verringert, während die DNA-Ausbeute vergleichbar zur Referenz war.

Zukünftig wird das LabTube auch für weitere biochemische Prozesse weiterentwickelt und seine Anwendung in der Nukleinsäure-Analytik, in der Protein-Analytik und in der vor-Ort-Diagnostik finden.

## 5 Literatur

- [1] D. Mark, S. Haeberle, G. Roth, F. von Stetten, R. Zengerle; Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications; Chem-SocRev; vol. 39; pp. 1153-1182, 2010
- [2] R. Zengerle et al; Microfluidic Apps on standard lab instruments; MicroTAS 2012, Okinawa, Japan