

# Zentrifugo-thermopneumatisches Aliquotieren auf der LabDisk und Anwendung zum DNA-basierten Nachweis verschiedener Bakterien

## Centrifugo-thermopneumatic aliquoting on LabDisk for DNA-based detection of different bacteria

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

<sup>1</sup> HSG-IMIT – Institut für Mikro- und Informationstechnik, Georges-Köhler-Allee 103, 79110 Freiburg

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

<sup>3</sup> BIOS – Centre for Biological Signaling Studies, Schaenzlestr. 18, Universität Freiburg, 79104 Freiburg

\* mark.keller@hsg-imit.de

### Kurzfassung

Wir präsentieren die Automatisierung eines Aliquotierprozesses in einem kommerziell erhältlichen, unmodifizierten real-time PCR Thermocycler (Rotor-Gene, QIAGEN) durch Integration einer zentrifugal-mikrofluidischen *LabDisk*. Mit Hilfe eines neuen zentrifugo-thermopneumatische Aktuierungsprinzips demonstrieren wir das Aufteilen einer DNA Probe in 8 mal 20 µl-Aliquote. In diesen finden jeweils unabhängige Bakteriennachweise mittels real-time PCR statt. Zur Demonstration wurden DNA der Bakterien *Corynebacterium glutamicum* und *Escherichia coli* mit, in den Reaktionskavitäten vorgelagerten, Primern und Sonden vollautomatisch nachgewiesen. Die vorgestellte Arbeit ist ein Beispiel dafür wie sogenannte *Microfluidic Apps* den Automatisierungsgrad von Standardlaborgeräten durch die mikrofluidische Integration von Arbeitsabläufen erhöhen können. Im Gegensatz zur klassischen Automatisierung durch Pipettierroboter fallen bei dieser Lösung keine Fixkosten an.

### Abstract

We present the automation of an aliquoting process in an unmodified commercially available real-time PCR thermocycler (Rotor-Gene, QIAGEN, Germany) by integration of a centrifugal microfluidic *LabDisk*. With the help of a new centrifugo-thermopneumatic actuation principle we demonstrate the splitting of a DNA sample into 8 times 20 µl aliquots. Each aliquot serves for separate bacteria detection by real-time PCR. For demonstration purposes, DNA of the bacteria *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli* are automatically detected using pre-stored primer and probes inside the reaction cavities. The presented work is an example of how so-called *Microfluidic Apps* can increase the degree of automation of standard laboratory instruments through the microfluidic integration of workflows. In contrast to conventional automation via pipetting robots *Microfluidic Apps* do not require fixed costs.

## 1 Motivation

Die real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird häufig als DNA basierte Nachweismethode für Bakterien eingesetzt. Hierzu ist ein Laborgerät erforderlich, das die Probe abwechselnd bei Temperaturen zwischen 50 und 95 °C inkubiert und das bei der real-time PCR entstehende Fluoreszenzsignal detektieren kann, ein sogenannter real-time Thermocycler. International Verbreitung gefunden hat u.a. ein zentrifugaler Thermocycler, der sog. „Rotor-Gene“ (QIAGEN GmbH). Die Temperierung der Proben erfolgt hier über einen Luftstrom, der ein rotierendes Probenrad abwechselnd mit heißer und kalter Luft umströmt. Um in einem Screening-Test eine DNA Probe auf unterschiedliche Erreger zu untersuchen müssen folgende Schritte durchgeführt werden: Erregerspezifische Primer und Sonden müssen in verschiedenen Reaktionskavitäten vorgelegt werden. Dann muss die DNA Probe auf die Kavitäten verteilt werden. Das kann entweder manuell ge-

schehen oder durch einen Pipettierroboter automatisiert werden. Hierzu ist Fachpersonal erforderlich und die Automatisierung ist mit hohen Fixkosten verbunden. Um diese zu senken und die Testdurchführung zu vereinfachen haben wir gezeigt, dass die Aliquotierschritte mit Hilfe der zentrifugal-mikrofluidischen Plattform *LabDisk* integriert und innerhalb des Gerätes automatisiert werden können [1, 2]. Hierfür waren bisher allerdings stets eine veränder- und kontrollierbare Rotationsgeschwindigkeit zur Steuerung der Zentrifugalkraft notwendig, weshalb ein Rotor-Gene Thermocycler mit nachträglich modifizierter Motoransteuerung eingesetzt wurde.

Als neuen Lösungsansatz, der es erlaubt mit einem nicht modifizierten, kommerziellen Rotor-Gene bei konstanter Drehfrequenz zu aliquotieren präsentieren wir hier das zentrifugo-thermopneumatische Aliquotieren. Grundlage hierzu sind temperaturinduzierte Volumenveränderungen geschlossener Gasvolumina, die Flüssigkeiten zentrifugal gerichtet verdrängen oder anziehen. Als Anwendung de-

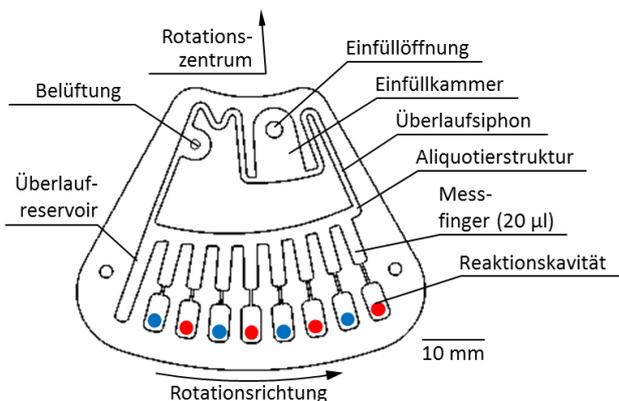
monstrieren wir eine sog. *Microfluidic App* [3] – eine *LabDisk* die in den Rotor-Gene eingesetzt werden kann um DNA der Bakterien *Corynebacterium glutamicum* und *Escherichia coli* nachzuweisen.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Funktionsprinzip

In der Umsetzung der Anwendung machen zwei Einheitsoperationen Gebrauch von dem zentrifugothermopneumatischen Effekt: Die erste Einheitsoperation verdrängt die eingefüllte Flüssigkeit zentrifugothermopneumatisch durch Aufheizen eines geschlossenen Gasvolumens aus der Einfüllkammer. In der zweiten Einheitsoperation wird die Flüssigkeit mit Hilfe fingerförmiger Strukturen, die entlang eines Kanals angeordnet sind, zentrifugal in Aliquote unterteilt und im Anschluss durch Abkühlen zentrifugothermopneumatisch in Reaktionskavitäten überführt. Der nahe bzw. direkte Kontakt der Gasvolumina mit Flüssigkeit gewährleistet die vorteilhafte Ausnutzung von Dampfdruck für den zentrifugothermopneumatischen Effekt [4].

Aus diesen beiden Einheitsoperationen wurde eine Mikrofluidik zum zentrifugothermopneumatischen Aliquotieren abgeleitet, die in **Bild 1** dargestellt ist. Bei der Umsetzung wurde die *LabDisk* in mehrere Segmente, sog. *GeneSlices*, aufgeteilt.

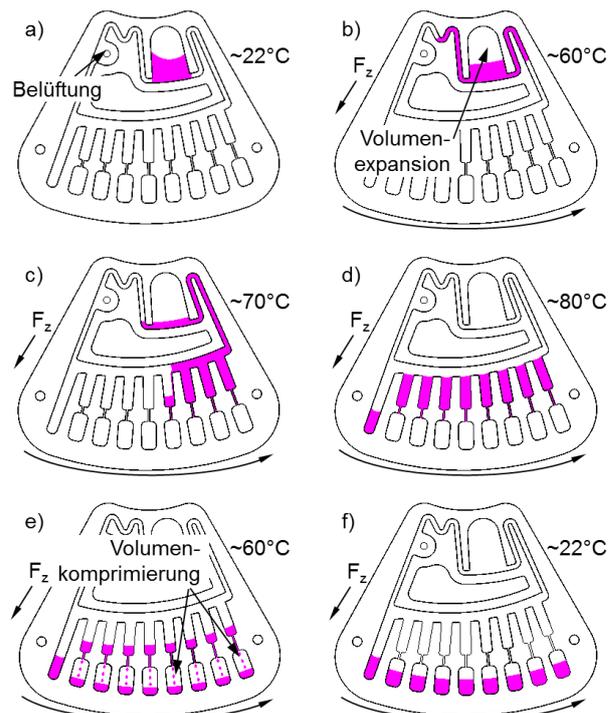


**Bild 1:** Schema des *GeneSlices* für das zentrifugothermopneumatische Aliquotieren einer anfänglichen DNA Probe in 8 mal 20 µl-Aliquote. Entsprechende Reaktionskavitäten umfassen vorgelagerte Primer und Sonden Paare (rot: *Escherichia coli*, blau: *Corynebacterium glutamicum*) für anschließende real-time PCR. (Mittlere Aussparung für Illustrationszwecke nicht dargestellt)

Der Ablauf des zentrifugothermopneumatischen Aliquotierens ist in **Bild 2** dargestellt. Das *GeneSlice* umfasst eine Einfüllkammer, deren Einfüllöffnung nach dem Einpipettieren der DNA Lösung durch einen Klebestreifen verschlossen wird. Nun beginnt das *GeneSlice* bei 400 UpM zu rotieren. Die DNA Lösung verschließt die aufsteigenden Äste der beiden stromabwärts gelegenen Kanäle (**Bild 2, a**). Nun wird das in der Einfüllkammer ein-

geschlossene Gasvolumen durch Aufheizen auf 80 °C expandiert und die DNA Lösung wird über den Scheitelpunkt des Überlaufsiphons verdrängt (**Bild 2, b**). Im Anschluss entleert sich die Einfüllkammer durch zentrifugale Aktuation über den Siphon in die stromabwärtsgelegene Aliquotierstruktur (**Bild 2, c**).

Die Aliquotierstruktur besteht aus einem leicht geneigten, umlaufenden Zuführkanal mit radial angeschlossenen Messfingern, die das zugeführte Volumen an DNA Lösung zentrifugal in definierte Teilvolumina unterteilen. Überschüssige DNA Lösung wird in ein Überlaufreservoir geleitet (**Bild 2, d**). Die abgemessene DNA Lösung verweilt in den Messfingern bis die erhöhte Temperatur wieder abgesenkt wird. Durch die Abkühlung auf Raumtemperatur (~22 °C) zieht sich das Gasvolumen in den Reaktionskavitäten, die an die Messfinger über einen dünnen Kanal angeschlossenen sind, zusammen. Durch die Volumenkomprimierung und entsprechendes Ansaugen erfolgt der Transfer der Flüssigkeitsvolumina in jeweils eine Reaktionskavität mit spezifisch vorgelagerten Primer und Sonden Paaren (**Bild 2, e-f**). Als Ergebnis liegen fluidisch vollständig separierte Einzelreaktionen vor, in denen eine kreuzkontaminationsfreie real-time PCR erfolgen kann, die sich nun unmittelbar anschließt.



**Bild 2:** Mikrofluidischer Ablauf des zentrifugothermopneumatischen Aliquotierens. (Beschreibung siehe Text)

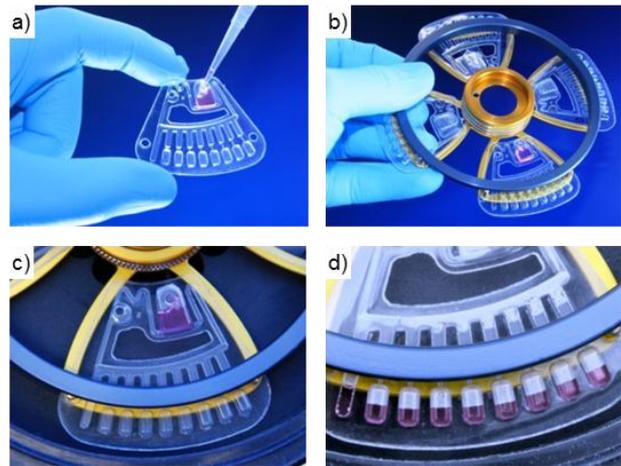
### 2.2 Herstellung

Ein Design entsprechend **Bild 1** wurde mittels SolidWorks (Dassault Systèmes SolidWorks Corp., MA, USA) als CAD generiert und vom HSG-IMIT Lab-on-a-Chip Design- & Foundry-Service ([www.loac-hsg-imit.de/design-foundry-service](http://www.loac-hsg-imit.de/design-foundry-service)) gefertigt. Mit einer CNC

Mikrofräse (Micro MMP 2522, KERN Microtechnik GmbH) wurde in 6 mm starkes PMMA (Evonik Industries AG) gefräst. Der entstehende Negativ-Master wurde mit PDMS (ELASTOSIL RT 607, Wacker Chemie AG) abgegossen, um einen flexiblen Positiv-Master zu erzeugen. Mit Hilfe des PDMS Master wurde die Struktur analog zu [1] in einem  $\mu$ TSL-Prozess (microthermoforming by soft lithography) in 188  $\mu$ m Cyclo-Olefin-Polymer-Folie (ZEONOR COP ZF 14, Zeon Chemicals L.P., KY, USA) repliziert. Im Anschluss wurden in der *LabDisk* spezifische Primer und Sonden Paare eindispensiert und durch Eintrocknen haltbar gemacht. Die Sonden für *E. coli* und *C. glutamicum* wurden mit den Fluorophoren JOE bzw. FAM markiert (Bild 1) und alternierend in den Reaktionskavitäten vorgelagert. Abschließend wurde die *LabDisk* durch drucksensitive Folie (#900 320, HJ-Bioanalytik GmbH) gedeckelt und in einem Laserprozess in *GeneSlices* (*LabDisk*-Segmente) vereinzelt.

### 3 Experimentaltteil

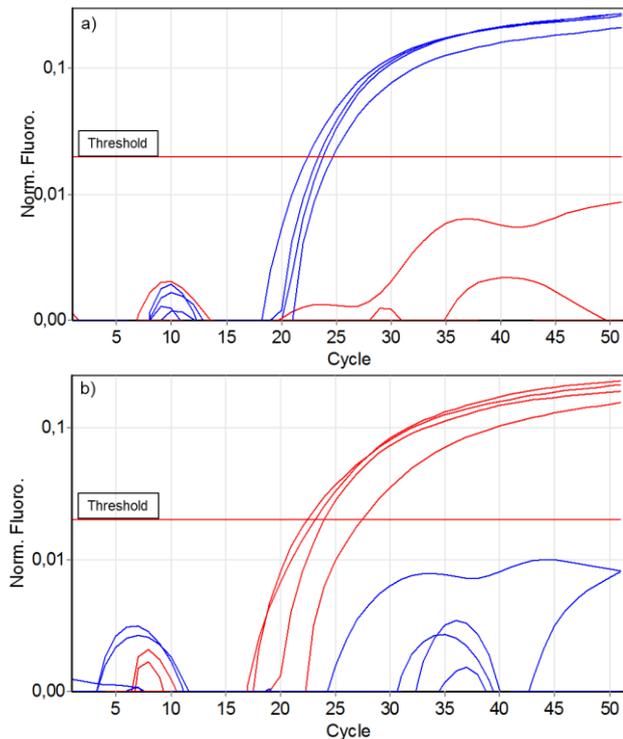
165  $\mu$ l DNA Lösung zweier Bakterien (*E. coli*, *C. glutamicum*) werden mit PCR Master Mix (QuantiFast Probe, QIAGEN GmbH) gemischt. Das *GeneSlice* wird mit dieser Mischung befüllt (Bild 3, a). Dafür wird die ausgedünnte Folie der Einfüllöffnung mit einer Pipettenspitze durchstoßen und anschließend mit selbstklebender Folie (#95.1994, Sarstedt AG & Co.) luftdicht verschlossen. Ein Rotorhalter erlaubt die Arretierung von bis zu vier *GeneSlices* im Kreismuster (Bild 3, b). Dieser wird in den Rotor-Genes alternativ zum Standardhalter für PCR Reaktionsgefäße eingesetzt (Bild 3, c). Nach dem Start des Ablaufprotokolls der Standardsoftware des Rotor-Genes wird das *GeneSlice* in konstante Rotation von 400 UpM versetzt. Das Ablaufprotokoll beinhaltet einen ersten Aufheizschritt (von Raumtemperatur) auf 80 °C mit einer Haltezeit von 3 min für das initiale Schalten der DNA Lösung in die Aliquotierstruktur und das Befüllen der Messfinger. Im Anschluss wird auf 30 °C abgekühlt und für 3 min für den finalen Transfer der Aliquote in die Reaktionskavitäten gehalten. Direkt im Anschluss wird das für die real-time PCR benötigte Temperaturprofil automatisch durch die Software ausgeführt. Das aliquotierte Nominalvolumen beträgt 20  $\mu$ l pro Reaktionskavität (Bild 3, d). Der Rotorhalter gewährleistet, dass die Reaktionskavitäten an den gleichen Stellen wie die PCR Reaktionsgefäße in einem Standardhalter und somit zu dem Detektor ausgerichtet werden. Die dünne Folientechnologie zur Herstellung der *GeneSlices* erlaubt die Verwendung eines Standard real-time PCR Temperaturprofils analog zu real-time PCR in Standard Reaktionsgefäßen.



**Bild 3:** Prozessablauf. (a) Befüllung des *GeneSlices* mit 165  $\mu$ l einer DNA Lösung (hier gefärbtes Wasser). (b) Rotorhalter mit vier eingelegten *GeneSlices*. (c) Rotorhalter im Rotor-Genes. *GeneSlice* mit eingeschlossenem Gasvolumen in Einfüllkammer. (d) Zentrifugo-thermopneumatisch aliquotierte DNA Lösung in acht Reaktionskavitäten à 20  $\mu$ l plus überschüssige Flüssigkeit in einem Überlaufreservoir.

### 4 Ergebnisse und Diskussion

Amplifikationsergebnisse können analog zu real-time PCR Ergebnissen in Standard Reaktionsgefäßen in der Standardsoftware des Rotor-Genes analysiert werden. Eine hintergrundbereinigte, logarithmische Darstellung des Fluoreszenzsignals ist in Bild 4 dargestellt. Bild 4, a zeigt, dass auf dem FAM-Kanal alle vier Reaktionskavitäten mit vorgelagerten Primer und Sonden Paaren für *C. glutamicum* ein Amplifikationssignal liefern, das über den gesetzten Schwellenwert steigt und alle restlichen Reaktionskavitäten kein entsprechendes Signal liefern. Analog zeigt Bild 4, b den umgekehrten Fall des JOE-Kanals. Somit konnte gezeigt werden, dass alle vorgelagerten Reagenzien vollständig rehydriert und die DNA Proben in ihren entsprechenden Reaktionskavitäten korrekt amplifiziert wurden. Zusätzlich kam es zu keiner Kontamination in benachbarte Reaktionskavitäten. Die erfolgreiche real-time PCR nach dem zentrifugo-thermopneumatischen Aliquotieren demonstriert die Machbarkeit des neuartigen Aktuierungsprinzip für diese weit verbreitete Nukleinsäure-Analysemethode.



**Bild 4:** Amplifikationsergebnis eines Bakteriennachweises – durchgeführt in *GeneSlices*. Die Probe enthält ein Gemisch aus DNA von *C. glutamicum* und *E. coli* (~30.000 Kopien/Reaktionskavität), die mit unterschiedlichen Fluoreszenzsonden nachgewiesen wurden (a: FAM bzw. b: JOE). Die Amplifikationskurven zeigen die korrekte und kreuzkontaminationsfreie Amplifikation der Proben in ihren entsprechenden Reaktionskavitäten im Anschluss an das zentrifugo-thermopneumatische Aliquotieren.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Durch den zentrifugo-thermopneumatischen Effekt wird das *GeneSlice* in dem unmodifizierten Standardlaborgerät Rotor-Gene für das Aliquotieren einer DNA Probe anwendbar. So kann erfolgreich eine real-time PCR durchgeführt und in einer Probe enthaltene Erreger spezifisch nachgewiesen werden. *Microfluidic Apps* automatisieren Laborroutinen durch mikrofluidische Integration in Standardlaborgeräte. Sie ermöglichen einen erhöhten Automatisierungsgrad bei der Durchführung komplexer Screening Assays und halten die Investitionskosten niedrig.

## 6 Danksagung

Wir bedanken uns bei Ralf Himmelreich und Markus Jeziorski von QIAGEN GmbH für die Bereitstellung von Reagenzien.

## 7 Literatur

- [1] M. Focke, F. Stumpf, B. Faltin, P. Reith, D. Bamarni, S. Wadle, C. Müller, H. Reinecke, J. Schrenzel, P. Francois, D. Mark, G. Roth, R. Zengerle und F. von Stetten, „Microstructuring of polymer films for sensitive genotyping by real-time PCR on a centrifugal microfluidic platform“, *Lab Chip*, vol. 10, pp. 2519-2526, (2010)
- [2] D. Mark, P. Weber, S. Lutz, M. Focke, R. Zengerle und F. von Stetten, „Aliquoting on the centrifugal microfluidic platform based on centrifugo-pneumatic valves“, *Microfluid Nanofluid*, vol. 10, pp. 1279-1288, (2011)
- [3] D. Mark, F. von Stetten und R. Zengerle, „Microfluidic Apps for off-the-shelf instruments“, *Lab Chip*, vol. 12, pp. 2464-2468, (2012)
- [4] K. Abi-Samra, L. Clime, L. Kong, R. Gorkin, T.-H. Kim, Y.-K. Cho und M. Madou, „Thermopneumatic pumping in centrifugal microfluidic platforms“, *Microfluid Nanofluid*, vol. 11, pp. 643-652, (2011)