

Arbeitsgebiet: (4. Mikrofluidik)

Anwendungsbereich: (Analytik)

Poster bevorzugt

Automatisierte Vor-Ort-Detektion von Botulinum Toxin auf der LabDisk Plattform

T. van Oordt¹, G. Stevens², S. Vashist³, G. Urban², R. Zengerle^{1,3,4} und F. von Stetten^{1,3}

¹ HSG-IMIT – Institut für Mikro- und Informationstechnik,
Georges-Koehler-Allee 103, 79110 Freiburg

² Lehrstuhl für Sensoren, Institut für Mikrosystemtechnik - IMTEK, Universität Freiburg,
Georges-Koehler-Allee 103, 79110 Freiburg

³ Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung, Institut für Mikrosystemtechnik - IMTEK, Universität Freiburg, Georges-Koehler-Allee 103, 79110 Freiburg

⁴ BIOS Centre for Biological Signalling Studies, Universität Freiburg, Schaezlestr. 18, 79104 Freiburg

Zusammenfassung

Die LabDisk Plattform ist ein portables, universell einsetzbares System bestehend aus einem zentrifugalen Analysegerät und Einweg-Disks für die Detektion von diversen Pathogenen [1]. Erstmals konnte eine LabDisk zur vollautomatisierten Detektion von Botulinum Neurotoxin (BoNT) Typ A entwickelt und validiert werden. In einem Konzentrationsbereich von 8 – 2000 pM wurde sowohl die leichte Kette (LC) als auch das komplexe BoNT in Pufferlösung und Vollmilch nachgewiesen. Der Nachweis hat eine signifikante Bedeutung für schnelle Vor-Ort-Analysen im Falle eines terroristischen Anschlages.

Motivation

Aktuelle BoNT Tests beruhen entweder auf zeitintensiven und teuren Maus-Bioassays oder auf laborbasierten biochemischen Tests. Für die Überwachung von Prozessen in der Lebensmittelindustrie oder auch bei der Früherkennung von terroristischen Anschlägen ist eine schnelle Vor-Ort-Analyse des potenten Toxins unerlässlich. Mit einem funktionellen, enzymbasierten Assay ist es möglich, in kurzer Zeit BoNT im Labor nachzuweisen. Die LabDisk Plattform erlaubt die Integration des Tests in ein portables und vollautomatisiertes System.

LabDisk Plattform

Die Plattform besteht aus einem zentrifugalen Analysegerät, dem LabDisk Player, und mikrofluidischen Einweg-Disks, den LabDisks (Abbildung 1). Der LabDisk Player lässt sich mit einem definierten Temperatur- und Rotationsprotokoll programmieren. Die Analyse auf der LabDisk erfolgt nach Aufgabe der Probe vollautomatisiert und das Ergebnis wird mit einem integrierten Lumineszenz-Detektor ausgelesen. Die geringen Abmessungen und das niedrige Gewicht des LabDisk Players (178 x 283 x 150 mm³; 2 kg) begünstigen die Handhabbarkeit Vor-Ort. LabDisks wurden schon für diverse Tests, wie für die Nukleinsäureanalyse oder ELISA-Tests entwickelt [1], mit der BoNT LabDisk wird nun erstmals ein integrierter "Funktioneller Assay" präsentiert.

BoNT LabDisk

Der funktionelle Luciferase Reporter Assay, welcher die proteolytische Aktivität von BoNT über ein Lumineszenzsignal misst, wurde durch mikrofluidische Integration auf der LabDisk automatisiert. Die BoNT LabDisk beinhaltet Strukturen für 7 Tests, welche parallel prozessiert werden können (Abbildung 2a). Jeder Test besteht aus mikrofluidischen Strukturen für das Freisetzen von Flüssigreagenzien, das Mischen während der Inkubation, das Separieren von enzymbeschichteten Mikro-Beads und das Detektieren. Alle Abläufe werden automatisiert durch das Rotationsprotokoll des LabDisk Players in ca. 30 Minuten durchgeführt (Abbildung 2b-d). BoNT Typ A konnte als leichte Kette (LC) und als komplexes Toxin in Pufferlösung und Vollmilch im Bereich 8 – 2000 pM nachgewiesen werden (Abbildung 3). Die mittlere effektive Konzentration (EC50) in der LabDisk war 710 pM mit einer Nachweisgrenze von 8 pM (20 Minuten Inkubationszeit, n = 12). Manuell durchgeführte Vergleichstests in Mikrotiterplatten zeigten eine ähnliche Leistung (EC50: 948 pM, Nachweisgrenze: 1 pM). Der direkte Vergleich der Assay-Kurven der BoNT LabDisk in Abbildung 3 zeigt, dass auch eine komplexe Probenmatrix den enzymatischen Assay nicht signifikant beeinflusst.

Schlussfolgerung

Ein funktioneller Assay, welcher die proteolytische Aktivität von BoNT misst konnte erfolgreich in eine LabDisk integriert werden. Der Test kann noch um weitere BoNT Serotypen erweitert werden und ist dazu gedacht zur schnellen Vor-Ort-Analytik von Lebensmitteln eingesetzt zu werden. In der Wirkstoff-Produktion kann der Assay dazu beitragen, Tierversuche für die Produktfreigabe zu vermeiden.



Abbildung 1: LabDisk Plattform für die Vor-Ort-Analyse.

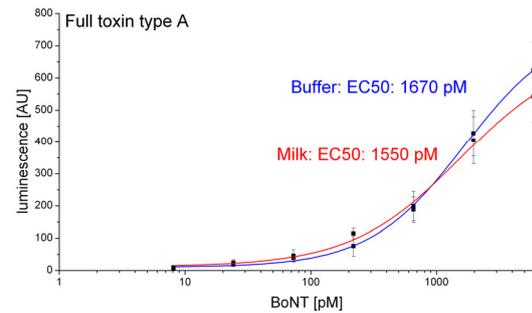
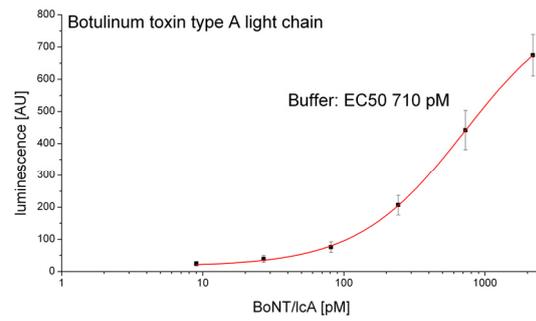


Abbildung 3: Kalibrierkurven des BoNT Tests in der LabDisk; Oben: Nachweis von BoNT LC in Pufferlösung; Unten: Nachweis des komplexen Toxins in Puffer und Vollmilch.

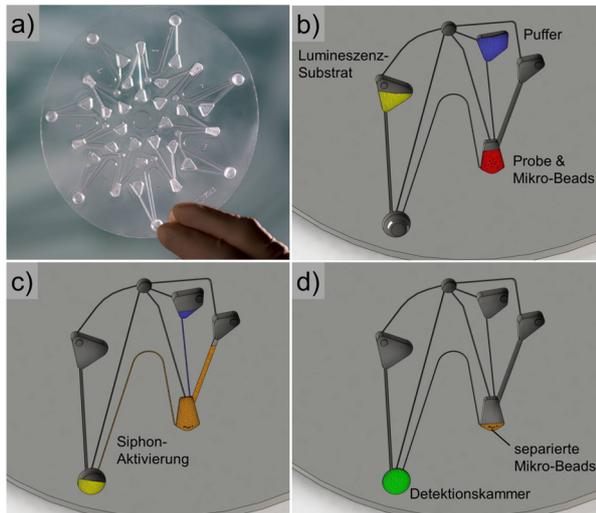


Abbildung 2: BoNT LabDisk und fluidischer Ablauf; a) LabDisk mit 7 integrierten Teststrukturen; b) Bei 10 Hz werden 12 μ l Probe mit funktionalisierten Mikro-Beads in eine Inkubationskammer zentrifugiert. Während der Inkubation löst BoNT enzymatisch das Lumineszenz-Enzym von den Mikro-Beads; c) Nach der Inkubation wird bei 40 Hz das Lumineszenz-Substrat in die Detektionskammer zentrifugiert. Gleichzeitig bricht über ein geometrisches Ventil Pufferlösung in die Inkubationskammer und aktiviert einen Siphon; d) Freigesetztes Enzym mischt sich mit dem Substrat und erzeugt ein Lumineszenzsignal. Noch an Mikro-Beads gebundenes Enzym bleibt in der Inkubationskammer zurück.

Literatur

- [1] van Oordt, T, Strohmeier, O, Mark, D, Zengerle, R, Eberhard, M, Drexler, J, Patel, P, Weidmann, M, Zgaga-Griesz, A, Bessler, W, and von Stetten, *A Fully Automated Centrifugal Lab-on-a-Chip System for the Detection of Biological Threats*, 7th Security Research Conference, Future Security 2012, p. 220-223