

49 Nukleinsäurediagnostik auf der Bio-Disk Plattform

Daniel Mark¹, Maximilian Focke², Bernd Faltin², Günter Roth², Tobias Metz¹, Jens Ducreé¹, 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

49.1 Bio-Disk - Plattformorientierte Entwicklung für die zentrifugale Mikrofluidik

Komplexe Diagnoseaufgaben wie Nukleinsäurediagnostik oder Immunoassays benötigen eine Vielzahl von Prozessierungsschritten und werden daher in Großlabors mit großem apparativem Aufwand automatisiert. Entsprechend lange sind die Antwortzeiten nach der Probennahme, da das Verschicken von Proben Stunden bis Tage in Anspruch nimmt. Für eine schnelle, patientennahe Diagnose sind daher kompakte, automatisierte Geräte notwendig, die vor Ort mit geringem Schulungsaufwand eingesetzt werden können. Eine entsprechende Entwicklungsplattform, welche die Miniaturisierung, Integration und Automatisierung biochemischer Analyseprotokolle ermöglicht, ist die zentrifugale Mikrofluidik [1]. Sie beruht auf der automatisierten Handhabung kleinster Flüssigkeitsmengen unter Rotation und realisiert so die Prozessierungsschritte einer manuellen oder mit Robotern durchgeführten Diagnose. Durch den hohen Automatisierungsgrad und geringen Platzverbrauch ist diese Plattform ideal für patientennahe Point-of-Care-Anwendungen [2]. Sie erlaubt eine Analyse noch vor Ort und verkürzt so die Wartezeit zwischen Probennahme und Diagnose auf einige Minuten bis wenige Stunden.

Inzwischen gibt es eine Vielzahl kommerziell genutzter Assays. Angefangen von dem klassischen Immunoassay (Schwangerschaftstest, Bestimmung der Blutgruppe, Entzündungsmarker...) über DNA-Analyse (HIV-Test, HLA-Typisierung...) bis hin zur Spurenanalyse (Giftstoffe, Schwermetalle...). Ein Transfer von einem etablierten Labortest in eine Point-of-Care-Umgebung ist jedoch mit hohen Investitionen in Forschung und Infrastruktur verbunden, da es bisher keine einheitliche Lösung für die Miniaturisierung gibt. Die Vielseitigkeit der zentrifugalen Mikrofluidik erlaubt nun eine schnelle und flexible Anpassung an verschiedene Assays. Hierbei

werden typischen Laborschritte wie Mischen, Inkubieren, Zentrifugieren oder Aliquotieren einem parametrisierbaren mikrofluidischen Design zugeordnet. Damit kann ein Assay in seine Einzelschritte zerlegt, in mikrofluidische Einheitsoperationen „übersetzt“ und dann in einem mikrofluidischen Netzwerk abgebildet werden.

Zur Validierung der neuen Struktur ist ein angepasster Prototypisierungsprozess notwendig, der schnell und zuverlässig die Umsetzung des Designs ermöglicht. Zur schnellen Umsetzung von Weiterentwicklungen werden validierte Einheitsoperationen und mikrofluidische Strukturen in einem Design-Handbuch fixiert. Die validierten Einheitsoperationen lassen sich so schnell zu funktionellen fluidischen Netzwerken verknüpfen [3].

Aktuellen Arbeiten konzentrieren sich auf die Erweiterung unserer zentrifugalen Mikrofluidik-Plattform um fluidische Kernmodule der Nukleinsäureanalytik: Nukleinsäureextraktion, Probenaliquotierung und Nukleinsäureamplifikation. Hierdurch wird eine Lücke in den Einheitsoperationen geschlossen und es entsteht eine umfassende, flexible mikrofluidische Plattform, welche künftig die rasche anwendungsspezifische Implementierung einer großen Bandbreite biochemischer Tests auf einer miniaturisierten, integrierten und automatisierten Plattform ermöglicht.

Um dieses Potential einem großen Kreis von Interessenten zugänglich zu machen wurde am HSG-IMIT der „Lab-on-a-Chip Foundry Service“ gegründet [4]. Dessen Dienstleistungen stehen sowohl Unternehmen der Biotechnologie als auch Forschungseinrichtungen zur Verfügung. Der „Lab-on-a-Chip Foundry Service“ wird diesem Nutzerkreis die zügige Verwirklichung eigener biochemischer Anwendungen als miniaturisiertes System bei überschaubarem Einsatz ermöglichen.

49.2 Mikrofluidische Einheitsoperationen für die Nukleinsäureanalytik

49.2.1 DNA Aufreinigung

Die Aufreinigung von DNA aus einer Blutprobe ist für viele molekular-diagnostische Tests ein essentieller Schritt in der Probenvorbereitung. Hierfür ist eine entsprechende Einheitsoperation auf der zentrifugal-mikrofluidischen Plattform notwendig. Um einen möglichst einfachen und robusten Fertigungsprozess zu gewährleisten, wurde die Aufreinigung mit Hilfe einer Silika-Membran durchgeführt. Diese ermöglicht eine automatisierbare, einfache und klebstofffreie Bestückung des Testträgers.

Nach dem Einbringen einer lysierten Blutprobe wird diese zuerst über eine Silicamembran geleitet, welche die DNA bindet. Mittels eines Waschpuffers werden Salze und Blutbestandteile entfernt. Abschliessend wird mit einem Elutionspuffer die DNA ausgespült. Durch einen mikrofluidischen Schalter, basierend auf der Coriolis-Kraft [5] und steuerbar durch die Drehrichtung, werden die Blutbestandteile und die Waschpuffer in eine fluidische Abfall Kammer auf der Disk überführt. Das Eluat mit der DNA wird bei umgekehrter Drehrichtung in eine separate Kammer überführt, aus der es entnommen werden kann oder in einem anschließenden mikrofluidischen Netzwerk weiter prozessiert wird. Mit diesem Verfahren konnten aus 32 μL einer lysierten Vollblutprobe durchschnittlich $0,29 \mu\text{g} \pm 0,08 \mu\text{g}$ DNA bei 500 g ($1 \text{ g} = 9,81 \text{ m s}^{-2}$) zentrifugaler Beschleunigung in 100 μL Elutionsvolumen extrahiert werden (Abbildung 1). Dies entspricht 70 % der Ausbeute eines kommerziellen Referenzextraktion-Kits (QIAamp DNA Blood Mini Kit), das bei 11.000 g in einer Laborzentrifuge prozessiert wurde. Die PCR-Tauglichkeit der extrahierten DNA wurde in einem Real-Time PCR Thermocycler nachgewiesen (Rotorgene 6000, Corbett Life Science, Australien) und lieferte nahezu identische Ergebnisse wie die Referenzextraktion bei gleicher Ausgangsmenge an DNA (Abbildung 2). Die Schwellenwertzyklen für beide Extraktionsverfahren sind praktisch identisch (Tabelle 1).

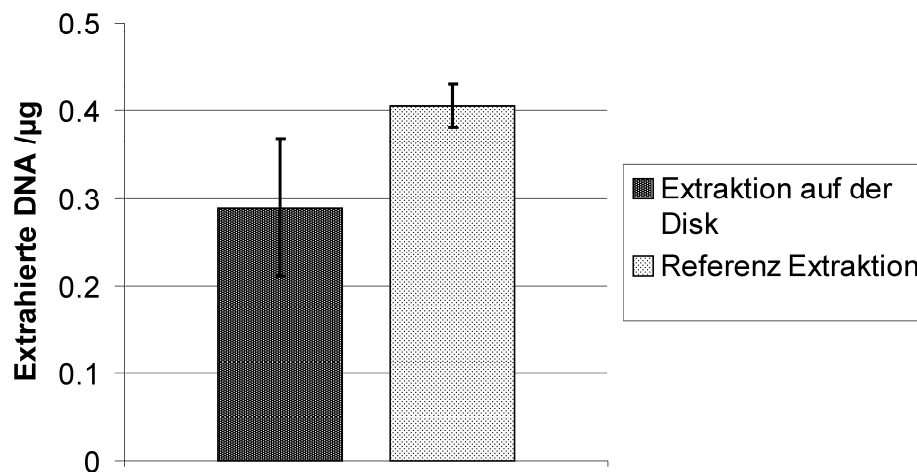


Abb. 1: Extrahierte Masse an DNA aus einer 32 μL Blutprobe, durchgeführt auf der zentrifugalen Plattform (7 Extraktionen, Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar). Im Vergleich hierzu ist eine Referenzextraktion (QIAamp DNA Blood Mini Kit; QIAGEN GmbH) dargestellt, die mittels einer Laborzentrifuge durchgeführt wurde (4 Extraktionen). Jeder Ansatz enthielt 680 Kopien eines vollständigen Genoms.

Tabelle 1: Schwellenwert-Zyklen einer PCR durchgeführt mit 680 Kopien

| Ansatz Nr. | Disk | Referenz |
|---------------------------|-------|----------|
| 1 | 25,01 | 24,55 |
| 2 | 24,92 | 24,82 |
| 3 | 24,89 | 24,72 |
| 4 | 24,87 | 24,87 |
| 5 | 24,82 | 24,44 |
| 6 | 25,13 | 24,29 |
| 7 | 24,15 | |
| 8 | 24,12 | |
| 9 | 24,09 | |
| 10 | 24,33 | |
| 11 | 24,17 | |
| 12 | 24,36 | |
| Mittelwert | 24,57 | 24,62 |
| Standardabweichung | 0,40 | 0,23 |

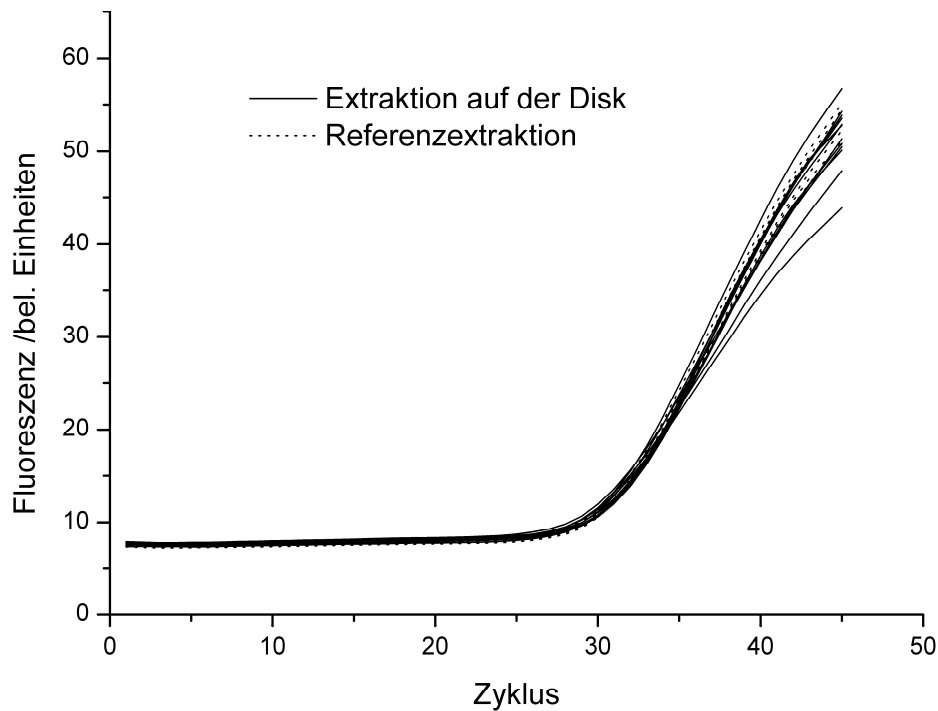


Abb. 2: Verlauf einer real-time PCR zum Nachweis des menschlichen Wachstumsfaktors (HGH). Der Vergleich zwischen der Referenzextraktion (QIAamp DNA Blood Mini Kit) und der Extraktion auf der Disk zeigt einen praktisch identischen PCR-Verlauf und damit keine Inhibition. Jeder Ansatz wurde als Triplikat durchgeführt. Insgesamt 4 Extraktionen auf der Disk und 2 Referenzextraktionen sind hier dargestellt.

49.2.2 Probenaliquotierung

Das Aliquotieren einer Probe (z. B. der aufgereinigten DNA) in mehrere Untervolumina ist elementar für die parallele Bestimmung mehrerer Probenparameter bzw. genetischer Merkmale. Dabei darf zwischen den aliquotierten Proben nach der Separation keine fluidische Verbindung mehr bestehen. Nur so ist eine kreuzkontaminationsfreie Bestimmung verschiedener Parameter in den einzelnen Probenaliquoten gewährleistet. Ein Beispiel für eine solche Anwendung ist die genetische Isotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit verschiedenen „genetischer Markern“ (Primern).

Die kreuzkontaminationsfreie Separation beruht auf einem passiven zentrifugo-pneumatischen Ventil [6]. Dieses Ventil bleibt bei niedrigen Drehfrequenzen durch den Gegendruck eingeschlossener Luft geschlossen und öffnet sich bei hohen Drehfrequenzen durch Verdrängung der Luft durch die Probenflüssigkeit. Die Aliquotierstruktur wurde im gezeigten Fall für die Aufteilung einer 100 µl großen Probe in 16 Aliquots ausgelegt. Der Variationskoeffizienten der Untervolumina betrug weniger als 3,0 % (Abbildung 3). Ein zusätzlicher Vorteil dieser Struktur ist, dass sie ohne lokale Beschichtungen produziert werden kann.

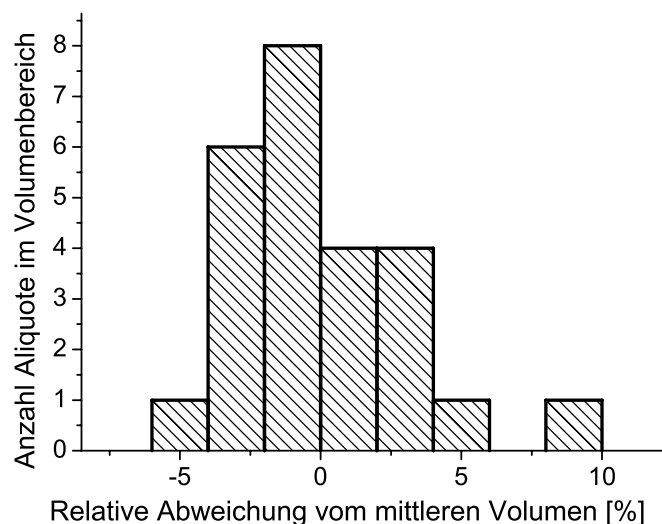


Abb. 3: Präzision der Aliquotierstruktur in Bezug auf die Untervolumina. Der Variationskoeffizient der Untervolumina liegt bei 3,0 %

49.2.3 Real-Time PCR

Abschliessend wird in den Kavitäten, die die aliquotierte Probe enthalten, eine Real-Time PCR durchgeführt. Um möglichst schnelle Temperaturwechsel zu ermöglichen, wird die Real-Time PCR in einer dünnen thermogeformten folienbasierten Disk durchgeführt (COP Zeonex ZF-14, Zeon Europe GmbH). Um sicherzustellen, dass durch das Thermoformen und das Folienmaterial keine Inhibition der PCR stattfindet, wurde eine Kalibrierung mit bekannten Kopienanzahlen des Exfoliatin-A-Gens (*Staphylococcus aureus*) vorgenommen. Als Referenz wurden parallel eine PCR in Standard-Polypropylen (PP) PCR-Tubes durchgeführt. Als Thermocycler wurde bei beiden Ansätzen das zentrifugale Rotorgene-System (Rotorgene 6000, Corbett Life Science, Australien) verwendet.

Es konnte gezeigt werden, dass keine Inhibition erfolgte und die Folien-PCR vergleichbare Werte zum Standard lieferte (Abbildung 4). Aufgrund des experimentellen Status streuen die Messwerte der Folien-PCR noch etwas stärker, was teilweise auch durch die Geometrie der Disk bedingt ist. Eine Fixierung der Disk in einer Halterung und genauere Anpassung auf den Thermocycler dürfte zu vergleichbaren Standardabweichungen führen.

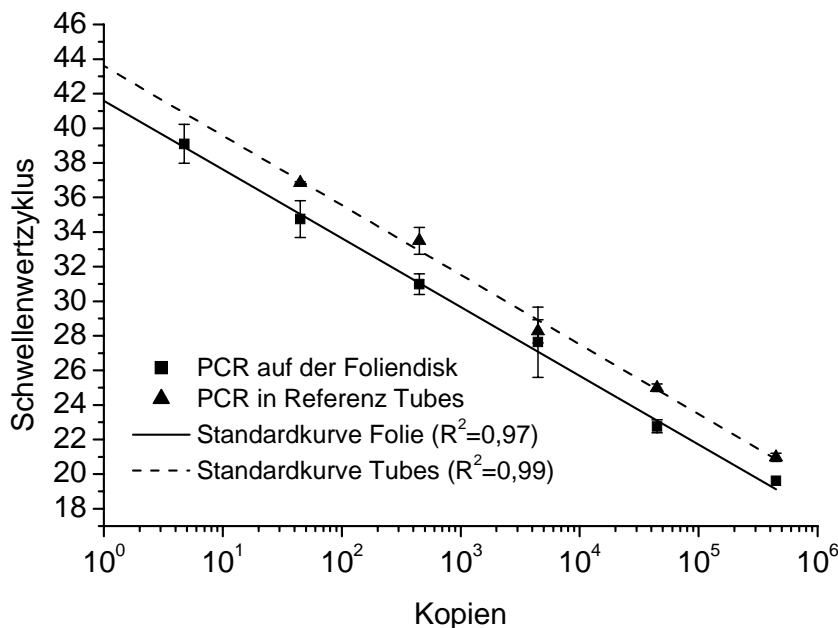


Abb. 4: Vergleich des Real-Time-PCR-Ergebnisses einer DNA-Probe humanen Ursprungs in einer tiefgezogenen COP-Folie und handelsüblichen PP Gefäßen.

49.3 Zusammenfassung und Ausblick

Durch die Erweiterung der Einheitsoperationen für die DNA-Aufreinigung und Probenaliquotierung wurde der diagnostisch wichtige Bereich der PCR für die Bio-Disk Plattform erschlossen. Erstmals konnte eine Real-Time-PCR auf der neuartigen Foliendisk erfolgreich realisiert werden. Hierdurch ist sichergestellt, dass ein molekulardiagnostischer DNA-basierter Assay komplett auf der Bio-Disk Plattform implementiert und durchgeführt werden kann. Anwendungsbeispiele für solche Assays sind die Genotypisierung von Methicillin-resistenten Staphylokokken, die bei im Krankenhaus erworbenen Infektionen eine zunehmende Rolle spielen oder die Blutgruppenbestimmung in der Transfusionsmedizin. Bei Gewebeuntersuchung in der Transplantationsmedizin während einer OP oder bei der Pathogendetektion in Lebensmitteln werden ebenfalls Real-Time-PCR basierte Assays verwendet. Bei diesen Anwendungen ist ein schnelles Ergebnis besonders wichtig, das durch ein Einsenden der Probe in ein Zentrallabor nicht gegeben ist.

Die neuen Einheitsoperationen lassen sich nahtlos in neue fluidische Netzwerke integrieren. Die Realisierung günstiger, automatisierter molekulardiagnostischer Assays mit vergleichsweise einfachen zentrifugalen Basisgeräten ist durch die vorgestellten Erweiterungen nun möglich.

49.4 Danksagungen

Das Forschungsvorhaben 15423N der Forschungsvereinigung Hahn-Schickard Gesellschaft e.V. wurde im Programm zur Förderung der "industriellen Gemeinschaftsvorschung (IGF)" vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie über die AIF finanziert.

Wir bedanken uns bei dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die finanzielle Förderung des Projekts Zentrilab (Förderkennzeichen 16SV2347) und bei der EU für die Förderung des Projekts MagRSA (Antragsnummer 037957).

49.5 Literatur

- [1] S. Haeberle, R. Zengerle; "*Microfluidic Platforms For Lab-On-A-Chip Applications*"; Lab Chip, 2007, 7, 1094–1110; DOI:10.1039/b706364b
- [2] M. Madou, J. Zoval, G. Y. Jia, H. Kido, J. Kim, and N. Kim, "*Lab on a CD*," Annual Review of Biomedical Engineering, vol. 8, pp. 601-628, 2006.

- [3] J. Ducree, S. Haeberle, S. Lutz, S. Pausch, F. von Stetten, and R. Zengerle, "*The centrifugal microfluidic Bio-Disk platform*," J. Micromech. Microeng., vol. 17, p. S103-S115, 2007.
- [4] J. Böning, D. Mark, S. Lutz, B. Faltin, M. Focke, M. Karle, J. Ducree, S. Messner, R. Zengerle, F. von Stetten, "*Lab-on-a-Chip Foundry Service*": A Systematic Approach to the Development of Centrifugal Microfluidic Technologies. Actuator 08: International Conference and Exhibition on New Actuators and Drive Systems, 2008; pp 814-817.
- [5] S. Haeberle, S. Pausch, R. Burger, S. Lutz, F. von Stetten, R. Zengerle and J. Ducree, "*Automation of nucleid acid extraction by a coriolis-force actuated droplet router*", Proceedings of the 11th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2007), Paris, 2007; pp. 1231-1233.
- [6] D. Mark, S. Haeberle, T. Metz, S. Lutz, J. Ducree, R. Zengerle, and F. von Stetten, "*Aliquoting structure for centrifugal microfluidics based on a new pneumatic valve*," Proceedings of the 21st IEEE MEMS 2008, Tucson, pp. 611-614, 2008.

Korrespondenz bitte an:

Dr. Felix von Stetten, Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung, Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK), Universität Freiburg, Georges-Köhler-Allee 106, 79110 Freiburg.
Tel.: +49-761-203-7393, Fax: -7539, e-mail: vstetten@imtek.de

Autoren:

Daniel Mark, HSG-IMIT - Institut für Mikro- und Informationstechnik,
Wilhelm-Schickard-Strasse 10, 78052 Villingen-Schwenningen,
Tel: +49-761-203-7358, e-mail: daniel.mark@hsg-imit.de

Maximilian Focke, Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung, Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK), Universität Freiburg, Georges-Köhler-Allee 103, 79110 Freiburg,
Tel: +49-761-203-7329, e-mail: focke@imtek.de

Bernd Faltin, Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung, Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK), Universität Freiburg, Georges-Köhler-Allee 103, 79110 Freiburg,
Tel: +49-761-203-7321, e-mail: bernd.faltin@imtek.de

Dr. Günter Roth, Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung, Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK), Universität Freiburg, Georges-Köhler-Allee 103, 79110 Freiburg,
Tel: +49-761-203-7459, e-mail: guenter.roth@imtek.de

Tobias Metz, HSG-IMIT - Institut für Mikro- und Informationstechnik,
Wilhelm-Schickard-Strasse 10, 78052 Villingen-Schwenningen,
Tel: +49-761-203-7344, e-mail: tmetz@imtek.de @hsg-imit.de

Prof. Dr. Jens Ducreé, HSG-IMIT - Institut für Mikro- und Informationstechnik
Autor erreichbar unter: Biomedical Diagnostics Institute, Dublin City University, Glasnevin, Dublin 9, Irland, Tel: Tel: +353-1-700- 5377, e-mail: jens.ducree@dcu.ie

Prof. Dr. Roland Zengerle, Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung, Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK), Universität Freiburg, Georges-Köhler-Allee 106, 79110 Freiburg, Tel: +49-761-203-7476, e-mail: zengerle@imtek.de