

## **49 Integrierte Analytik und Diagnostik auf der zentrifugal-mikrofluidischen Bio-Disk Plattform**

D. Mark, S. Lutz, M. Focke, M. Müller, G. Roth,  
R. Zengerle, F. von Stetten

### **49.1 Einleitung**

In der modernen Medizin gewinnen hochspezifische und sensitive Verfahren wie Nukleinsäurediagnostik oder Immunoassays zunehmend an Bedeutung. Diese beinhalten eine Vielzahl von aufwendigen Prozessierungsschritten. Sie werden daher entweder durch hochqualifiziertes Personal in langwierigen Verfahren manuell durchgeführt oder in Großlabors mit großem apparativen Aufwand automatisiert. Entsprechend lange sind die Antwortzeiten nach der Probennahme, da die aufwendige Laborarbeit bzw. das Verschicken von Proben Stunden bis Tage in Anspruch nimmt. Für eine schnelle, patientennahe Diagnose sind daher kompakte, automatisierte Geräte wünschenswert, die vor Ort mit geringem Schulungsaufwand eingesetzt werden können. Mikrofluidische Systeme sind dabei vielversprechende Kandidaten [1].

Die zentrifugale Mikrofluidik ist eine solche Entwicklungsplattform zur Miniaturisierung, Integration und Automatisierung biochemischer Analyseprotokolle [2]. Sie beruht auf der kontrollierten Prozessierung kleinster Flüssigkeitsmengen in einem zentrifugalen Beschleunigungsfeld und kann so Analyseprotokolle automatisieren. Auf Grundlage der zentrifugal-mikrofluidischen Bio-Disk Plattform [2] zeigen wir die Integration grundlegender Laborprotokolle der Analytik und Diagnostik: Nukleinsäure-Aufreinigung, Nachweise basierend auf Polymerase-Kettenreaktion (PCR), sowie isotherme Amplifikationsverfahren und Immunoassays.

### **49.2 Experimentelle Ergebnisse**

#### **49.2.1 DNA Aufreinigung**

Eine typischer Prozessschritt in der molekularen Diagnostik ist die Extraktion von DNA aus einer Blutprobe. Einerseits sollte dieser Schritt in einem mikrofluidischen analytischen System integriert erfolgen, um aufwendige manuelle Probenvorbereitungsschritte zu vermeiden. Erst so kann eine wirklich automatisierte Vor-Ort Analyse erfolgen. Andererseits ist auch die Automatisierung der DNA Extraktion als Stand-alone Lösung interessant, da dieser Prozessschritt sehr häufig in DNA Analyselaboren durchge-

führt werden muss. Für die zentrifugal-mikrofluidische Plattform wurden verschiedene mikrofluidische Module zur DNA-Aufreinigung aus Vollblut entwickelt.

Ein mikrofluidisches Design zur DNA Aufreinigung zum Anschluss an nachgeschaltete PCR-Module ermöglichte es, aus 32  $\mu\text{L}$  lysiertem Blut 290 $\pm$ 80 ng DNA aufzureinigen und off-Disk inhibitionsfrei zu amplifizieren. Die extrahierte Menge entsprach dabei ca. 70% einer Referenzextraktion mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit [3]. Die Struktur basiert auf einer integrierten Silika-Membran und einem mikrofluidischen Schalter. Zunächst werden Probe und Waschpuffer durch die Silika-Membran gespült und durch den Schalter in ein Abfall-Reservoir geleitet. Anschließend wird die nun aufgereinigte DNA durch einen Elutionspuffer von der Silika-Membran gelöst und das Eluat durch den Schalter in eine separate Kammer zur weiteren Prozessierung (z. B. Weiterleitung in eine PCR Struktur) geleitet.



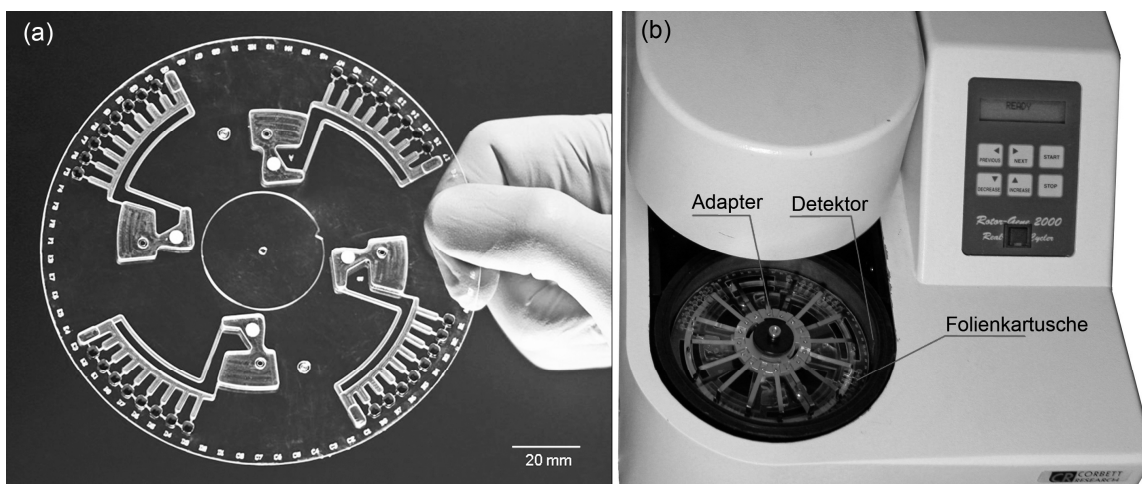
**Abb. 1:** Mikrofluidische Polymerdisk zur Automatisierung einer DNA-Aufreinigung aus lysiertem Blut. Die für die Aufreinigung benötigten Waschpuffer sind auf der Disk vorgelagert. Der Betrieb erfolgt in einer Standard-Laborzentrifuge. Die automatische Flüssigkeitssteuerung sorgt dabei für ein Abtrennen der aufgereinigten DNA von weiteren Probenbestandteilen und Waschpuffern.

Neben dieser Struktur wurde eine Stand-alone Lösung zur DNA Aufreinigung für den Betrieb in einer Standard-Laborzentrifuge entwickelt (Abb. 1). In einer Prinzipstudie wurden dabei ca. 53% Extraktionseffizienz im Vergleich zu der Referenzextraktion erreicht. Die Probe bestand ebenfalls

aus 32  $\mu\text{L}$  lysiertem Blut. Diese Mikrofluidikstruktur hat das Potential, ohne große initiale Investitionen die DNA Aufreinigung auf einem weit verbreiteten Standard-Laborgerät zu automatisieren.

#### 49.2.2 Real-time PCR basierte Genotypisierung von MRSA

Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) sind Bakterien, die für verschiedene schwer behandelbare Infektionskrankheiten verantwortlich sind. Besonders in Krankenhäusern ist die Verbreitung des Bakteriums kritisch, da hier Patienten mit bereits geschwächtem Immunsystem einem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt sind. Hier könnte ein integriertes, vor Ort einsetzbares Nachweissystem eine deutlich schnellere Behandlung ermöglichen. Eine Genotypisierung würde dabei den genauen Nachweis des Bakterienstamms und damit eine gezielte Behandlung ermöglichen.



**Abb. 2:** Lab-on-a-Chip System zur Genotypisierung von MRSA.

(a) Prototyp einer Folienkartusche zum Aliquotieren einer Probe in Kavitäten mit spezifischen Primern und Sonden.

(b) Leicht modifizierter zentrifugaler Thermocycler (Rotor-Gene 2000) mit Folienkartusche. Der Thermocycler führt die Temperierung für die PCR sowie das optische Auslesen des Ergebnisses durch [5] (Abbildung reproduziert mit Erlaubnis der Royal Society of Chemistry).

Die Durchführung einer molekulardiagnostischen Genotypisierung basierend auf real-time PCR ist eine anspruchsvolle Anwendung für Lab-on-a-Chip-Systeme. Problematische Größen sind dabei ein unzureichender Wärmeübergang durch den Testträger für die notwendigen schnellen Thermozyklen, sowie die Notwendigkeit einer sensitiven Fluoreszenzauslese. In unserer Gruppe wurde dafür ein Herstellungsverfahren basierend auf dem Thermoformen von Folien entwickelt [4] (Abb. 2(a)). Damit konnte in einer mikrofluidischen Struktur in einem kommerziellen zentrifugalen Thermocycler verschiedene Gene von MRSA amplifiziert und detektiert werden [5] (Abb. 2(b), Rotor-Gene 2000, Corbett Life Science,

jetzt QIAGEN GmbH). Die PCR lief darin mit vergleichbarer Effizienz wie in einem Referenzsystem mit Standard-Reaktionsgefäßen.

### **49.2.3 Isotherme DNA Amplifikation**

In Zukunft könnten hocheffiziente, isotherme Amplifikations- und Detektionssysteme für DNA eine treibende Rolle in der molekularen Vor-Ort-Diagnostik spielen, da sie schnell und energieeffizient durchführbar sind. Die gute Eignung für Lab-on-a-Chip Anwendungen eines isothermalen Amplifikationsverfahrens wurde bereits für ein folienbasiertes mikrofluidisches System demonstriert. Als Amplifikationssystem kam die Rekombinase Polymerase Amplifikation (RPA, Vertrieb durch TwistDX Ltd., UK) zum Einsatz. Dabei wurde nach Zugabe einer Probe und Versiegelung des Testträgers ein automatischer Test mit vorgelagerten Flüssig- und Festreagenzien durchgeführt. Hierbei konnten 20 Kopien des *mecA* Gens von *Staphylococcus aureus* in 5 von 5 Fällen in einem kommerziellen zentrifugalen Thermocycler detektiert werden. Die Reaktionszeit betrug dabei bei konstanten 37 °C Inkubationstemperatur nur ca. 15 Minuten.

### **49.2.4 Immunoassays**

Die Integration von hochsensitiven Immunoassays in Lab-on-a-Chip-Systeme hat das Potential, aufwändige Tests für Hormon- und Proteinkonzentrationen stark zu vereinfachen oder komplett zu automatisieren. Für die zentrifugal-mikrofluidische Plattform wurden Module für den kompletten Prozessablauf einer Diagnostik aus Vollblut gezeigt (bisher noch unabhängig voneinander betrieben). Zunächst wurde eine Struktur für eine Blutplasma-Separation für ein 10 µL Blutprobe bereitgestellt, die aus der Probe 4 µL Plasma abtrennte und weiter leitete ( $\pm 6\%$ ). Eine weitere Struktur ermöglichte die Automatisierung der notwendigen Binde-, Wasch-, und Inkubationsschritte. Damit wurde ein kompetitiver Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) für Estradiol demonstriert [6].

## **49.3 Zusammenfassung**

Es wurde eine Reihe von Prinzipstudien zur Automatisierung von molekular-diagnostischen Nukleinsäure- und Proteinnachweisen auf der zentrifugal-mikrofluidischen Plattform gezeigt. Die Automatisierung von Analysen hat das Potential, als Vor-Ort-Test in kritischen Situationen schnelle Diagnosen zu ermöglichen. Die zentrifugal-mikrofluidische Plattform ermöglicht dabei durch den Verzicht auf Spritzenpumpen und sonstige externe Verbindungen eine einfache Handhabbarkeit, Kontaminationsfreiheit

sowie die Verwendung eines robusten Prozessierungsgerät mit einem Rotationsmotor als Antriebseinheit.

#### **49.4 Literaturverzeichnis**

- [1] D. Mark, S. Haeberle, G. Roth, F. von Stetten und R. Zengerle, "Microfluidic Lab-on-a-Chip Platforms: Requirements, Characteristics and Applications", *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, pp. 1153-1182, 2010.
- [2] J. Ducrée, S. Haeberle, S. Lutz, S. Pausch, F. von Stetten und R. Zengerle, "The centrifugal microfluidic Bio-Disk platform", *J. Microchem. Microeng.*, vol. 17, no. 7, p. S103-S115, 2007.
- [3] D. Mark, S. Haeberle, S. Lutz, R. Zengerle und F. von Stetten, "Vacuum supported liquid waste handling for DNA extraction on centrifugally operated Lab-on-a-chip systems", in *Proceedings of the 15th IEEE International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems 2009*, pp. 1230-1233.
- [4] M. Focke, D. Kosse, C. Müller, H. Reinecke, R. Zengerle und F. von Stetten, "Lab-on-a-Foil: microfluidics on thin and flexible films", *Lab Chip*, vol. 10, no. 11, pp. 1365-1386, 2010.
- [5] 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 highly sensitive genotyping by real-time PCR on a centrifugal microfluidic platform", *Lab Chip* (in press), DOI:10.1039/C004954A, 2010.
- [6] S. Lutz, P. Lang, I. Malki, D. Mark, J. Ducrée, R. Zengerle und F. von Stetten, "Lab-on-a-Chip Cartridge for Processing of Immunoassays with Integrated Sample Preparation", in *Proceedings of the 12th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences 2008*, pp. 1759-1761.

