

Mikrofluidisches Lab-on-a-Chip System zur Prozessierung von Immunoassays mit integrierter Probenvorbereitung

Microfluidic Lab-on-a-Chip System for processing immunoassay with integrated sample preparation

G. Roth^{1,2,3}, S. Lutz¹, G. Welte¹, D. Mark¹, R. Zengerle^{1,2,3}, F. von Stetten^{1,2}

¹ HSG-IMIT – Institut für Mikro- und Informationstechnik, 78052 Villingen-Schwenningen

² Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung, Institut für Mikrosystemtechnik - IMTEK, Universität Freiburg, Georges-Koehler-Allee 106, 79110 Freiburg

³ BIOS – Centre for Biological Signalling Studies, Universität Freiburg, Albertstrasse 19, 79104 Freiburg

Kontakt: guenter.roth@imtek.de

Kurzfassung

Es wird eine Plattform zur Prozessierung von kompetitiven und Sandwich-Immunoassays präsentiert. Die Plattform besteht aus einer spritzgegossenen mikrofluidischen Kartusche und einem Prozessierungs-Gerät mit Detektionseinheit. Die Kontrolle der Fluide erfolgt unter gezielter Kombination von Zentrifugal- und Kapillarkräften durch rein passive Elemente wie z.B. Siphons, sowie hydrophile und hydrophobe Beschichtungen. Die Kartusche ermöglicht die Separation von 4 µL Blutplasma aus 10 – 15 µL Vollblut, sowie Mischprozesse, Inkubations- und Waschschrte und verfügt über einen integrierten Flüssigabfallbehälter zur Vermeidung von Kontaminationen. Beispielhaft werden ein Sandwich-Immunoassay zur Analyse von IL8 und ein kompetitiver Immunoassay zur Analyse von Estradiol demonstriert. Die Detektion unter Rotation erfolgt mittels Chemilumineszenz.

Abstract

A platform for processing competitive as well as sandwich immunoassays is presented. The platform comprises an injection moulded cartridge and a processing device. Controlling the fluids on the cartridge is realized by a combination of centrifugal and capillary forces using only passive elements like siphons as well as local hydrophobic and hydrophilic surface modifications. The cartridge enables a separation of 4 µL blood plasma out of 10 – 15 µL whole blood, followed by mixing processes, incubation, washing and waste handling. Exemplary a sandwich immunoassay for IL8 and a competitive immunoassay for Estradiol are demonstrated. The detection is realized via chemiluminescent signals under rotation.

1 Einleitung

In der modernen Diagnostik stellen Lab-on-a-Chip Systeme eine neue Entwicklungsrichtung dar. Sie bieten Vorteile wie verkürzte Inkubationszeiten, reduzierten geringeren Reagenzienverbrauch sowie die Minimierung und teils Automatisierung manueller Arbeitsschritte. Dies ermöglicht sogenannte Point-of-Care Tests, mit denen man vor Ort eine patientennahe und schnelle Diagnostik durchführen kann. Die prominentesten Beispiele hierfür sind Schwangerschaftstests und Blutzuckermessung. Im folgenden wird eine Lab-on-a-Chip Plattform beschrieben, die es erlaubt komplexe Immunoassays durchzuführen. Die Plattform ist so flexibel gestaltet, dass sie sowohl die Durchführung eines kompetitiven als auch eines Sandwich-Immunoassays erlaubt und damit die beiden am häufigsten vorkommenden Immunoassays abdeckt. Die mikrofluidische Plattform nutzt hierbei gezielt eine Kombination aus Zentrifugal- und Kapillarkräfte um Fluide innerhalb der Kartusche zu steuern. Eine fluidische Einheit zur Separation von Blutplasma kann zusätzlich mo-

dular zugeschaltet werden. In einer Mischkammer wird die gewonnene Probe mit zugeführten Reagenzien gemischt und in eine Inkubationskammer überführt, die bereits mit Antikörpern beschichtet ist. Dort findet auch der Immunoassay statt. Antigene binden an immobilisierten Antikörper und erzeugen ein Chemilumineszenzsignal, dessen Intensität von der Konzentration der Antigene abhängt. Überschüssige Reagenzien die während das Assays anfallen bzw. ausgetauscht werden müssen, werden in einer Abfallkammer gesammelt, um keine Kontaminationen nach Außen treten zu lassen. Nach dem Test wird die Kartusche als Ganzes entsorgt.

2 Herstellung

Die Kartuschen sind aus Polystyrol spritzgegossen. Nach der Fertigstellung werden Bereich der Kartusche oberflächenmodifiziert, um fluidische Interaktionen zu erzeugen. Zunächst werden die Kartuschen mit Isopropanol gewaschen und umgehend mit DI-Wasser gespült.

Um die Kartusche für einen Immunoassay zu funktionalisieren, werden Antikörper auf der Oberfläche der Reaktionskammer immobilisiert. Für den Estradiol Assay wird 60 μL einer 1:40.000 Verdünnung eines Beschichtungsantikörpers (goat anti-rabbit Antikörper von DRG instruments zum Beschichten von Mikrotiterplatten [1]) verwendet. An diesen lassen sich dann 60 μL einer 1:10.000 Verdünnung eines anti-Estradiol Antikörpers (CLA-4664-Mikrotiter-platten, DRG instruments [1]) binden. Die für den Interleukin-8 Assay (BD Biosciences, human IL8 ELISA set, number: 555244), nötigen Beschichtungsantikörper (BD Biosciences, Cat. No. 554716) werden ebenfalls 60 μL in einer Konzentration von 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ verwendet. Die Anbindung des jeweils ersten Antikörpers in der Reaktionskammer der Kartusche findet über Nacht bei 4°C statt. Die Bindung an die Oberfläche erfolgt durch hydrophobe Wechselwirkungen. Anschließend werden noch ungebundene Antikörper 3 mal mit je 120 μL PBS (GIBCO, Cat.No. 18912-014) ausgewaschen. Um die Oberfläche der Kartusche vor unspezifischer Anlagerung des Antigens zu blocken, wird die gesamte Kartusche mit PBS-Lösung mit 5 % (w/v) BSA (Carl Roth GmbH, Deutschland, order number 0163.2) für mindestens 90 Minuten inkubiert und danach 3 mal mit je 120 μL PBS gewaschen. Zusätzlich sorgt BSA für eine weitere Hydrophilisierung der Kartuschenoberfläche.

Danach werden die Siphons mittels einer PEG-Beschichtung (PEG, SigmaAldrich P2263, Deutschland) hydrophilisiert, um durch die bessere Benetzbarkeit die kapillare Wirkung zu verstärken und die kapillare Befüllung der Siphons zu optimieren. Eine Teflon-Beschichtung kommt dort zum Einsatz, wo gezielt hydrophobe Bereiche benötigt werden, um für Flüssigkeiten [2] eine Barriere zu erzeugen, die nur unter hohen Drehzahlen durchbrochen werden kann.

Abschliessend wird die Kartusche mit einer selbstklebenden druck-sensitiven Klebefolie versiegelt (HJ Bioanalytic GmbH, order number: 900320).

3 Funktionsprinzip

3.1 Mischen und Inkubation

Auf einer Kartusche sind jeweils 4 identische Strukturen untergebracht, um parallel 4 immunologische Tests durchzuführen. Die schematische Darstellung einer Struktur ist in **Abbildung 1** dargestellt. Auf dem Rotor des Prozessiergeräts (**Abbildung 2**) finden 6 dieser Kartuschen Platz. Es können somit parallel 24 Tests abgearbeitet werden. Der Readout erfolgt mittels Chemilumineszenz, weshalb das Prozessiergerät üblicherweise mit einer lichtdichten Abdeckung verschlossen ist. Jede Struktur stellt neben zwei Einlässen für unterschiedliche Puffer und Chemikalien eine Kammer zum Mischen, eine Reaktionskammer und eine Abfallkammer zur Verfügung. Die Strukturen sind untereinander mittels Siphons verbunden. In der Mischkammer können Reagenzien, welche über Einlass 2 zugeführt werden, gemischt werden. Dies

ist insbesondere für einen kompetitiven Immunoassay von Wichtigkeit, da hier die Probe mit dem Kompetitor homogen durchgemischt werden sollte. Über einen Siphon gelangt das Gemisch in die Reaktionskammer, wo der eigentliche Immunoassay stattfindet. An die zuvor immobilisierten Antikörper können nun entsprechende Antigene aus der Probe binden. Ein hydrophober Bereich am Aufstieg des Auslass-Siphons der Reaktionskammer sorgt dafür, dass die Probe während des Inkubationsschrittes in der Reaktionskammer verweilt. Über Einlass 1 können dann sukzessive Waschpuffer bzw. final das Substrat für die Chemilumineszenzreaktion in die Reaktionskammer geschleudert werden.

Mit Hilfe dieser Strukturen lassen sich daher sowohl kompetitive als auch Sandwich-Immunoassays durchführen. Die genaue Abfolge der einzelnen Schritte der jeweiligen Immunoassays sind **Abbildung 3** zu entnehmen.

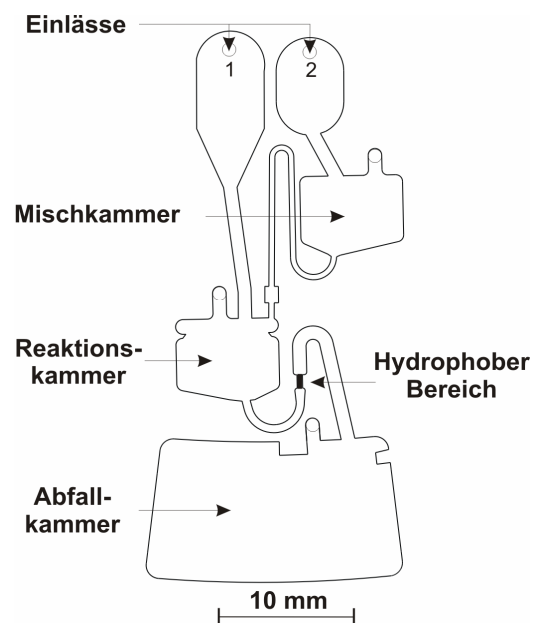


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Struktur zur Durchführung eines Immunoassays.

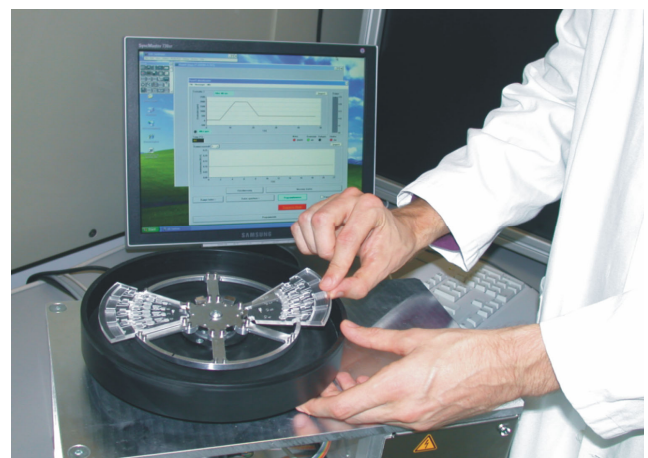


Abbildung 2: Auslesgerät der Firma ABBIS mit 2 eingesetzten Kartuschen und angeschlossenem Steuer-PC.

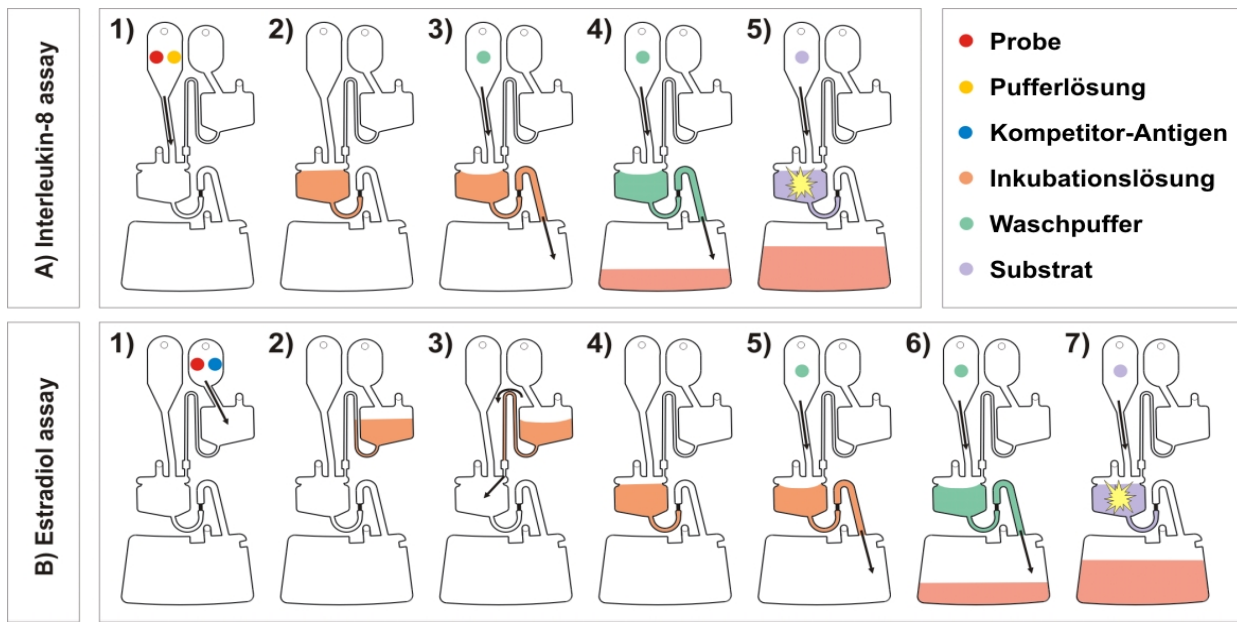


Abbildung 3: Schematische der jeweiligen Fluidikprotokolle:

A) Beim **Sandwich-Immunoassay** wird die Probe mit einer Pufferlösung in Inlet 1 (Zuordnung der Inlets siehe Abb. 1) eingegeben (1). Die Mischung wird dann bei 8 Hz in die Reaktionskammer überführt zur Inkubation. (2). Durch Erhöhen der Rotationsfrequenz auf 12 Hz wird die hydrophobe Barriere im Siphon gebrochen und unter Stillstand kann sich der Siphon befüllen. Dann wird Waschpuffer in Inlet 1 gegeben (3). Durch erneute Rotation auf 20 Hz wird die Antigenlösung von der Waschlösung verdrängt (4). Dieses Waschen wird insgesamt 3 Mal wiederholt, dann die Waschlösung in den Abfall überführt und die Reaktionskammer trocken geschleudert. Dann wird eine Substratlösung (Luminol und H₂O₂), in Inlet 1 gegeben und bei 8 Hz in die Reaktionskammer überführt (5). Das entstehende Chemilumineszenzsignal wird unter Rotation ausgelesen.

B) Beim **kompetitiven Immunoassay** wird die Probe mit dem Kompetitor-Antigen über Inlet 2 zugegeben und bei 12 Hz Rotation in die Mischkammer überführt (1). Für spätere Applikationen ist ein Vorlagern des Kompetitor-Antigens in der Mischkammer vorgesehen [3]. Mittels eines unidirektionalen Shakemodes [4] wird die Probe und der Kompetitor homogen durchmischt (2). Nach einem kurzen Stopp zur kapillaren Befüllung des Siphons überführt eine Beschleunigung auf 8 Hz die Flüssigkeit in die Reaktionskammer (3). Von hier ab sind die folgenden Schritte (4) bis (7) identisch zum Sandwich-Immunoassay von (2) bis (5). Jedoch wird zur Reduzierung des Hintergrundsignals der Waschschrift (6) insgesamt 5 Mal durchgeführt.

3.2 Blutplasmaseparation

Die Kartusche soll in ihrer finalen Applikation als Sample-in Answer-out System ausgelegt sein. Hierzu wird eine voll integrierte Struktur zur Blutplasma-Separation realisiert, die dem Immunoassay vorgeschaltet wird, um so Blutplasma als Probe verwenden zu können. **Abbildung 4** zeigt die zugeschaltete Struktur der Einheit. 10 -15 µL Vollblut werden bei 12 Hz in die Kammer geschleudert und durch einen Überlauf wird das Blut auf ein definiertes Volumen eingestellt. Bei 50 Hz sedimentieren die Blutzellen innerhalb von 2 min und das Plasma kann mittels eines kapillaren Siphons in die Mischkammer überführt und damit dem Immunoassay zugeführt werden.

In einer Serie von 10 Experimenten wurde das gewünschte Plasmavolumina von 4 µL mit einem CV von 6% erzielt. Im Falle einer Blutplasmaseparation ersetzt diese die bisher in Abbildung 2 eingegebene Probe. Eine Verknüpfung wurde aktuell noch nicht realisiert.

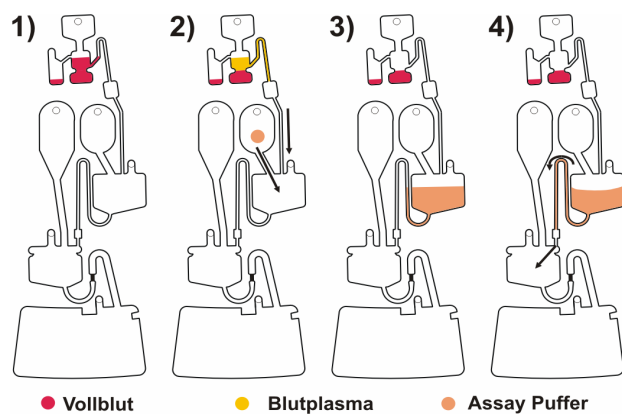


Abbildung 4: Fluidischer Ablauf der Blutplasma-Separation: Das Blut wird abgemessen (1) und sedimentiert (2). Je nach Immunoassay wird der Assaypuffer oder der Kompetitor zugegeben und zu 4 µL Plasma in die Mischkammer überführt (3) und gemischt (4). Danach kann wie in Abbildung 2 weiter verfahren werden.

3.3 Prozessierungsgerät

Das Prozessierungsgerät (Abbildung 2) wurde in Zusammenarbeit mit der Firma ABBIS entwickelt und besteht aus einem Drehmotor, einem Rotor zur Kartuschenfixierung, und einem Lumineszenz-Detektor. Der Rotor kann bis zu 6 Kartuschen aufnehmen. Der Motor und die Detektionseinheit werden über eine RS232 Schnittstelle durch einen PC gesteuert. Die Lumineszenz-Detektion wurde mittels eines Photonencounters (H7467) der Firma Hamamatsu und einem Lichtwellenleiter (Lumatec, Deutschland) realisiert. Insgesamt kann das Gerät 25200 Messwerte erfassen, was bei einer Anzahl von 6 Kartuschen 1050 Messwerte pro Assay bedeutet.

4 Ergebnisse

Auf der Kartusche wurde als erste Demonstration sowohl ein kompetitiver Assay zum Nachweis von Estradiol als auch ein Sandwich-Immunoassay zum Nachweis von Interleukin-8 implementiert.

Im Falle von Estradiol (Abbildung 5), wurde je Konzentration eine Doppelbestimmung in der Kartusche und in einer Mikrotiterplatte (MTP) vorgenommen. Es konnte der typische Kurvenverlauf eines kompetitiven Immunoassays erzeugt werden. Die Nachweisgrenze betrug im Falle der Mikrotiterplatte ~ 8 pg/mL, im Falle der Kartusche ~ 120 pg/mL. Zudem war die Streubreite der Ergebnisse bei der Kartusche ca. 5-fach höher als in der Mikrotiterplatte.

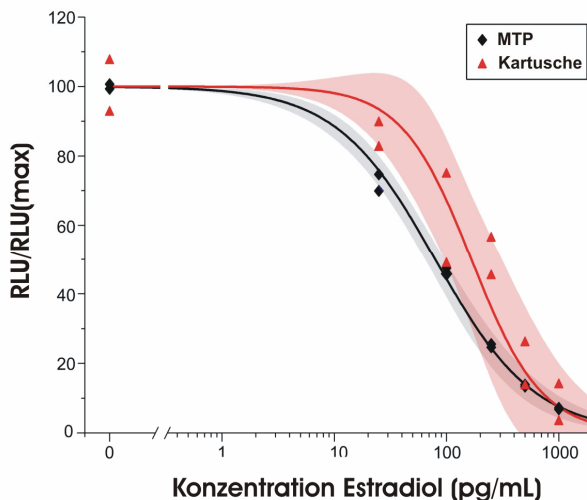


Abbildung 5: Vergleich des kompetitiven Estradiol-Assays in Mikrotiterplatte und Kartusche. Es wurde nach FDA-Vorgabe [5] gefittet. Dabei wurde der Wert für 0 pg/mL auf 100 (± 0) % festgehalten. Die schattierten Bereiche stellen das jeweilige 95 % Konfidenzintervall dar.

Im Falle von Interleukin-8 war die Streubreite der Werte ca. 6-fach höher als in der MTP und die Nachweisgrenze mit ~ 200 pg/mL etwa 70-fach über der MTP mit ~ 3 pg/mL (nicht dargestellt). Für den Interleukin-8 Assay wurde die Variation zwischen 3 Versuchstagen (Abbil-

dung 6) beobachtet, um die Wiederholbarkeit zu untersuchen. Es zeigte sich ein deutlicher Drift zwischen den einzelnen Tagen. Somit sollte in einer zukünftigen Anwendung eine interne Kalibrierung gegen einen Standard in die Kartusche implementiert werden. Neuere Untersuchungen deuten der Kartuschen-Oberfläche darauf hin, dass ein Großteil der Schwankungen durch Inhomogenitäten der Antikörperbeschichtung erzeugt wird.

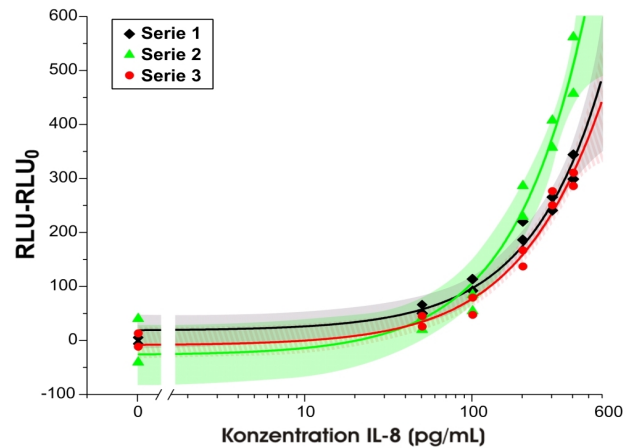


Abbildung 6: Serienvariation des IL-8 Assays. An 3 Tagen wurde eine Konzentrationsreihe vermessen und entsprechend FDA Vorgabe [5] gefittet. Dabei wurde der Wert für 0 pg/mL als Hintergrundsignal angenommen und auf 0 gesetzt. Die schattierten Bereiche stellen das jeweilige 95 % Konfidenzintervall dar.

5 Schlussfolgerung

Das präsentierte zentrifugale Lab-on-a-Chip System erlaubt eine parallele Prozessierung von bis zu 24 Immunoassays und einen Readout mittels Chemilumineszenz. Die flexible Fluidik ermöglicht die Implementierung von sowohl kompetitiven als auch Sandwich-Immunoassays. Dies wurde am Beispiel eines kompetitiven Estradiol Assays und eines IL-8 Sandwich-Assays demonstriert. Die Nachweisgrenzen und Streubreite der Messungen sind einer Mikrotiterplatte noch unterlegen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass verbesserte Antikörperimmobilisierung und optimierte Waschprotokolle dies deutlich verbessern können. Die zusätzliche Implementierung einer Blutplasma-Separation zeigt bereits auf, dass damit ein vollautomatisches Sample-in answer-out System entwickelt werden kann.

6 Literatur

- [1] DRG Instruments GmbH, Germany, www.drg-diagnostics.de (last accessed 07/2011).
- [2] L. Riegger et al., *JMM*, 2010, 20
- [3] S. Lutz et al., *Proc. microTAS*, 2007, 1516-1518.
- [4] S. Lutz et al., *Proc. microTAS*, 2008, 748-750.
- [5] US Food and Drug Administration, FDA: Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation; 2001.