

Immunoassay auf der LabDisk Plattform auf Basis einer Grundoperation zum Transfer magnetischer Partikel

G. Czilwik¹, J. Jin¹, G. Roth^{1,2}, S. Vashist¹, T. van Oordt¹, O. Strohmeier¹, F. von Stetten^{1,2}, R. Zengerle^{1,2,3}, und D. Mark¹

¹ HSG-IMIT – Institut für Mikro- und Informationstechnik, 79110 Freiburg

² Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung, Institut für Mikrosystemtechnik – IMTEK, Universität Freiburg

³ BIOS – Centre for Biological Signalling Studies, Universität Freiburg, 79110 Freiburg

* Kontakt: +49 761 / 203 – 73231; gregor.czilwik@hsg-imit.de

Kurzfassung

Präsentiert wird ein neues Verfahren zur automatisierten Prozessierung von Immunoassays auf der zentrifugal-mikrofluidischen LabDisk Plattform. Hierbei dienen magnetische Partikel als mobile Festphase. Sie werden durch ein Zusammenspiel von Magnet- und Zentrifugalkraft von Puffer zu Puffer transportiert. Wesentliche Vorteile gegenüber dem Stand der Technik sind kurze Prozesszeiten, automatisierter Betrieb in einem portablen Point-of-Care Gerät (LabDisk Player Prototyp), sowie ein modulares Mikrofluidikdesign. Demonstriert wurde ein Immunoassay zur Quantifizierung von humanem C-reaktivem Protein (h-CRP). Die Prozesszeit betrug durch eine neue 1-Schritt Reaktion der Immuno-Reagenzien und zwei anschließende Waschschriffe nur 20 Minuten. Der Test erfüllt damit die Anforderungen einer schnellen vor-Ort Diagnostik.

Abstract

We present a novel technology for automated processing of immunoassays on our centrifugal-microfluidic LabDisk platform. Here, magnetic beads acting as a mobile phase are subsequently transported through liquid buffers by interplay of magnetic- and centrifugal forces. Compared to state of the art technologies, the main advantage are short processing times, assay automation in a portable point-of-care player (LabDisk Player prototype) and a modular microfluidic design. For demonstration of the automated processing scheme, we chose a magnetic immunoassay for quantification of human c-reactive protein (h-CRP). Due to a 1-step kinetics reaction of all immunoassay reagents and by only applying two successive washing steps the process time was only 20 minutes. Therefore the test fulfills the requirements for rapid point-of-care diagnostics.

1 Motivation

Pro Jahr fallen die Begriffe „Enzyme Immunoassay“ oder „Enzyme-linked immunoassay“ in fast 10.000 Veröffentlichungen von wissenschaftlichen Studien [1]. Dies unterstreicht die Bedeutung von Immunoassays in den Lebenswissenschaften. Die Durchführung eines konventionellen Immunoassays auf der Mikrotiter Platte kann durch lange Inkubationszeiten und eine Vielzahl an Waschschriffen mehrere Stunden dauern. Außerdem ist geschultes Personal hierfür notwendig. Dies wird zwar durch Pipettier-Roboter zur automatischen Prozessierung umgangen, die Komplexität, Größe und Kosten der Geräte verhindern allerdings deren Einsatz im Point-of-Care Bereich. Hier zeigen wir einen Lösungsansatz für automatisiertes Prozessieren in einem kompakten Gerät, das für den vor-Ort Einsatz geeignet ist.

2 Materialien und Methoden

2.1 Herstellung der Disks durch Mikrothermoformen

Die mikrofluidische Strukturen wurden mittels 3D CAD Software designet und anschließend gefertigt: Im ersten Schritt werden die Strukturen mittels Mikrofräsen (KernEvo, Kern Mikrotech, Eschenlohe) in ein PMMA

Substrat (Maertin, Freiburg) übertragen. Die gefräste PMMA Scheibe wird mit PDMS (Elastosil RT 607, Wacker, München) abgeformt und dient dann in einer Heißpräße (Hex 01, Jenoptik, Jena) als Master-Werkzeug zur Herstellung der blasgeformten Disks aus COP Folie (COP ZF 14, Zeon Chemicals, USA). Dieses Thermoform-Verfahren ist im Detail in [2] beschrieben.

2.2 Experimenteller Aufbau

Die LabDisk (Abschnitt 2.3) wird auf der Rotationsachse des LabDisk Player-Prototyps (Abbildung 1) fixiert. Zwei Permanentmagnete (Ein Sammel-Magnet, ein Transport-Magnet, Abbildung 2) sind ca. 1 mm über der Disk stationär mittels eines Halters aus PMMA befestigt (siehe Abbildung 2). Der Sammelmagnet befindet sich auf einer radialen Position von 53.0 mm bezüglich des Rotationszentrums. Die radiale Position des Transportmagneten ist 47.0 mm bezüglich des Rotationszentrums.



Abb. 1: Point-of-care LabDisk Player (Prototyp)

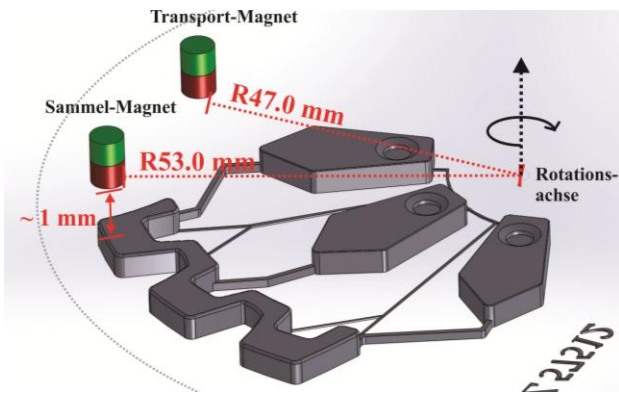


Abb. 2: Schematischer Aufbau mit der LabDisk auf der Rotationsachse des Players und den radialen Positionen des ortsfesten Transport- und Sammelmagneten. Aufgrund der Übersichtlichkeit ist der Magnethalter nicht skizziert.

2.3 Prinzip der Immunoassay-Automatisierung

Der vorgestellte, automatisierte Immunoassay basiert auf einer gleichzeitigen 1-Schritt Inkubation der Probe mit funktionalisierten magnetischen Partikeln (anti h-CRP Fängerantikörper) und einem Detektionsantikörper (anti h-CRP, biotinylierter Antikörper, gebunden an Meerettich-Peroxidase) für 15 Minuten. Anschließend werden ungebundene Moleküle durch zwei Waschschritte verdünnt. Der Test wird auf der LabDisk durch ein spezifisches Rotationsprotokoll automatisiert. Grundsätzlich hierfür ist ein mikrofluidisches Design zum Transport magnetischer Partikel durch Zentrifugal- und Magnetkraft [3]. Die Struktur besteht aus drei separaten Einfüllkammern für das Beladen der Immunoassay-Reagenzien. Jede dieser Kammern ist über einen Kanal mit einer Prozesskammer verbunden. Ein Luftspalt zwischen den Kammern sorgt für eine diffusionsfreie Trennung der Flüssigkeiten und ermöglicht gleichzeitig den Transport der Partikel. Der schematische Ablauf wird in Abbildung 3 beschrieben.

(1) Die Immunoassay-Reagenzien werden in die Einfüllöffnungen (I, II und III) pipettiert; Die Disk wird dann auf 20 Hz beschleunigt.

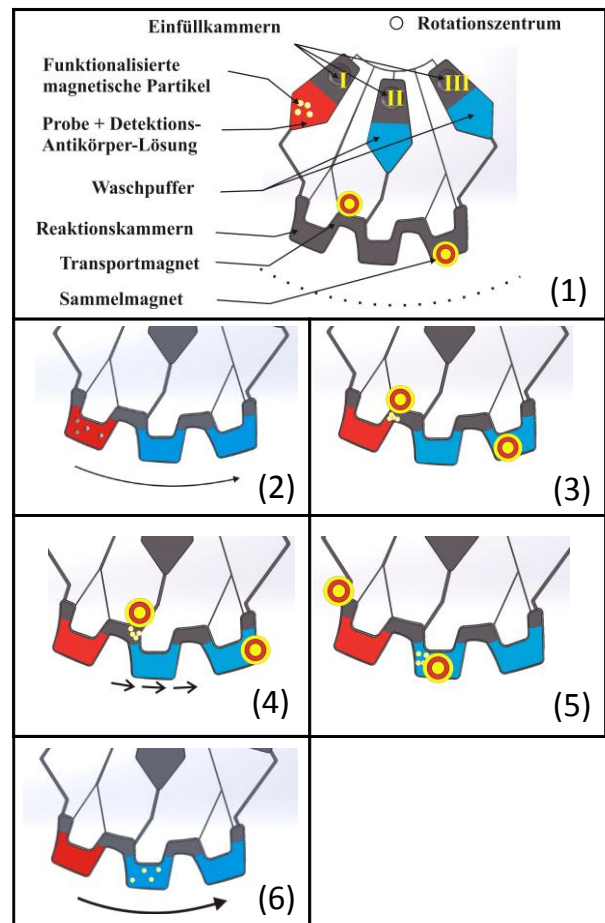


Abb. 3: Ablauf des Immunoassay auf Basis des Funktionsprinzips des sequentiellen Transports der funktionalisierten, magnetischen Partikel durch die Immunoassay-Reagenzien. Beschreibung siehe Text.

(2) Durch Zentrifugalkräfte werden die Flüssigkeiten/Partikel in die Prozesskammer geleitet. Es folgt eine 15-minütige Inkubation der Immunoreaktion durch ein Magnetpartikel unterstütztes Mischverfahren. Hierzu wird alternierend Beschleunigt mit 2 Hz/s auf 12 Hz (Dominanz der Partikelsedimentation) und Entschleunigt mit 2 Hz/s auf 5 Hz (Dominanz der entgegengesetzt wirkenden Magnetkräfte) [4].

(3) Die Disk wird bei einer definierten Position relativ zum Transportmagneten angehalten, sodass sich der Magnet über dem Luftspalt befindet. Durch die wirkende Magnetkraft überwinden die Partikel die Oberflächenspannung der Luft-Flüssigkeit Grenzfläche und werden nun in den Luftspalt gezogen.

(4) Die Disk wird mit inkrementellen Schritten von 0.5° gedreht, wobei die Partikel dem Transportmagneten in Richtung der nächsten Kammer folgen.

(5) Die Disk wird relativ zum Sammelmagnet positioniert und die Partikel in die nächste Kammer gezogen.

(6) Durch Alternieren der Frequenz zwischen 5 Hz und 12 Hz (Beschleunigung 2 Hz/s) werden die Partikel in der Flüssigkeit resuspendiert. Schritte (3) – (6) werden analog wiederholt um die beiden Waschschritte durchzuführen.

Hierbei unterscheiden sich nur die Positionierung der Disk relativ zum Transport- bzw. Sammelmagneten.

2.4 Durchführung des LabDisk Immunoassays

Als Probe wurde eine Verdünnungsreihe von h-CRP im physiologisch relevanten Bereich ($0.33\text{--}81\text{ ng mL}^{-1}$) in PBS Puffer angesetzt und in einer 3-fach Bestimmung pro Konzentration getestet. Die Einfüllöffnungen wurden mit den entsprechenden Puffern und der Probe beladen: Öffnung I: $40\text{ }\mu\text{L}$ Probe (h-CRP in PBS Puffer), $40\text{ }\mu\text{L}$ Detektionsantikörper (Konzentration $2\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ in PBS Puffer), $40\text{ }\mu\text{L}$ funktionalisierte Magnetpartikelsuspension (Partikelkonzentration 4 mg mL^{-1}). Öffnung II und III: Jeweils $120\text{ }\mu\text{L}$ Waschpuffer (0.05 % Tween 20 in PBS). Das Zentrifugations-Protokoll wurde anschließend auf dem Player gestartet und die magnetischen Partikel nach der Prozessierung manuell aus der LabDisk entnommen.

2.5 Optische Signalauswertung in einem Mikrotiterplatten-Reader

Die Absorption (Wellenlänge 450 nm) des enzymatischen Produkts einer 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) Substrat Reaktion wurde in einem Mikrotiterplatten-Reader (VICTOR2™, Perkin-Elmer) bestimmt. Dies erfolgte mit der entnommenen Partikelsuspension durch Zugabe der TMB Lösung in einer Mikrotiterplatte.

3 Ergebnisse

Das Ergebnis der Absorptionsmessung ist in Abbildung 4 dargestellt. Für den Referenz-Assay wurde das Immunoassay Protokoll auf der Mikrotiterplatte durchgeführt. Im Vergleich zum Referenz-Assay (Sensitivität: 0.36 ng mL^{-1}) auf der Mikrotiterplatte wird auf der LabDisk eine Sensitivität von 2.1 ng mL^{-1} . Die Signalstärke der Mikrotiterplatte wird von der LabDisk nicht erreicht.

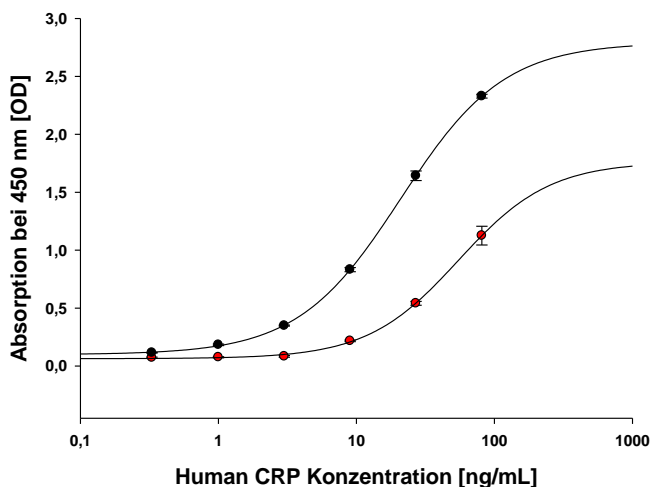


Abb. 4: LabDisk Assaykurve des h-CRP Tests (rot) und des Referenz-Assays (schwarz). Der Graph zeigt die Optische Dichte bei 450 nm Wellenlänge gegen die h-CRP Konzentration.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Mit einer neuen modularen Grundoperation zum Transport magnetischer Partikel und einer neuen 1-schritt Chemie wurde auf der LabDisk Plattform ein h-CRP Immunoassay im physiologischen relevanten Konzentrationsbereich demonstriert. Mit dem hier vorgestellten, schnellen und automatisierten Verfahren konnte der Immunoassay in **20 Minuten** prozessiert werden und ist damit für die vor-Ort Diagnostik tauglich. Das Detektionssignal auf der Mikrotiterplatte wird von dem LabDisk Assay nicht erreicht. Eine Optimierung der Inkubationsschritte in der LabDisk sollte allerdings zu einem erhöhten Signal führen. Die Integration der Absorptionsmessung in den LabDisk Player ist in Vorbereitung.

5 Danksagung

Wir danken der EU-Förderung im Rahmen des Projektes ASCMicroPlat (FP7, Grant Agreement Nummer: 258759)

6 Literatur

- [1] Leguin RM: Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Clin Chem 51(12), 2415–2418, 2005
- [2] Focke M: Microthermoforming of microfluidic substrates by soft lithography (μTSL): optimization using design of experiments, J. Micromech. Microeng. 21, 115002 (11 pp.), 2011
- [3] Strohmeier O: Verfahren zur DNA Aufreinigung mit magnetischen Partikeln auf einer zentrifugal-mikrofluidischen Einweg-Foliendisk, Mikrosystemtechnik-Kongress, Darmstadt, Deutschland, October 10-12, Seiten: 66 – 69
- [4] S. Lutz: Unidirectional shake-mode for mixing of highly wetting fluids on centrifugal platforms, Proceedings of the 12th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, San Diego, 2008