

Automatisierte Nukleinsäurediagnostik in der LabDisk mittels frequenzgesteuerter Freisetzung vorgelagerter Reagenzien

Automated sample-to-answer nucleic acid testing with frequency controlled reagent release from cartridge integrated stick-packs

F. Stumpf^{1*}, F. Schwemmer², T. Hutzenlaub¹, O. Strohmeier¹, F. von Stetten¹, R. Zengerle^{1,2,3} und D. Mark¹

¹ Hahn-Schickard, Georges-Köhler-Allee 103, 79110 Freiburg, (*fabian.stumpf@hahn-schickard.de)

² Universität Freiburg, IMTEK - Institut für Mikrosystemtechnik, Lehrstuhl Anwendungsentwicklung, Georges-Köhler-Allee 103, 79110 Freiburg

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

Kurzfassung

Wir präsentieren ein neues Verfahren zur automatisierten Sample-to-answer Point-of-Care Diagnostik auf der zentrifugal-mikrofluidischen LabDisk Plattform. Hochbenetzende und fluidisch schwer zu handelnde Flüssigreagenzien für die Nukleinsäure-Extraktion werden in Stick-packs vorgelagert und können drehfrequenzgesteuert freigesetzt werden. Magnetische Partikel, Primer und Fluoreszenzsonden werden durch Eintrocknung vorgelagert. Die LabDisk Plattform ermöglicht die Automatisierung aller erforderlichen Assayschritte der pathogen Detektion: RNA Extraktion und Aufreinigung, Aliquotieren der RNA sowie multiplex real-time RT-PCR. Ca. 15 PFU (plaque forming units) RNA-phage MS2 in einem 200 µL Probevolumen werden in weniger als 3 Stunden detektiert.

Abstract

For the first time we demonstrate an automated centrifugal Lab-on-a-Disk system for sample-to-answer point-of-care testing of multiple nucleic acid targets that features pre-storage of all required liquid reagents for nucleic acid extraction as well as primers and probes and magnetic beads. Highly wetting and thus hardly controllable liquid buffers were pre-stored in stick-packs with frequency controlled on-demand reagent release enabling automated addition of binding buffer after sample lysis. The self-contained Lab-on-a-Disk system automates all necessary assay steps for PCR-based pathogen detection: RNA extraction, aliquoting of the RNA and geometrically multiplexed real-time RT-PCR. As a proof-of-principle, we demonstrated detection of as little as 15 plaque forming units (pfu) of RNA bacteriophage MS2 in a 200 µL sample in 3 hours.

1 Motivation

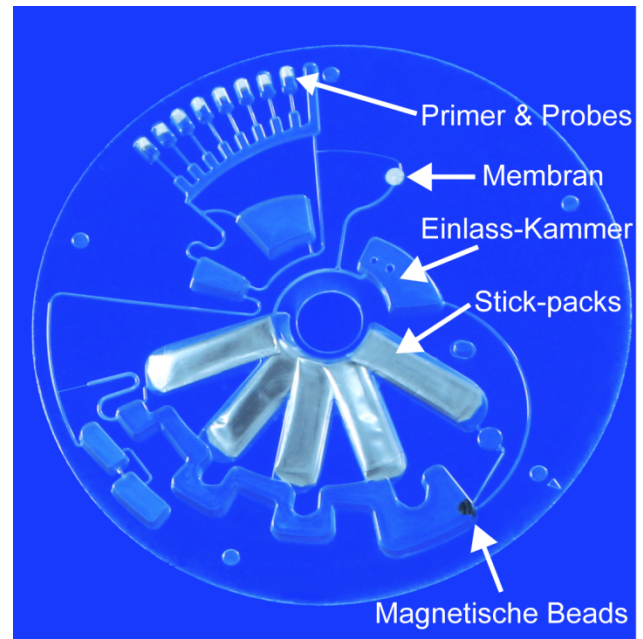
Aktuellste Analysemethoden in Zentrallaboren führen noch immer zu Durchlaufzeiten von einigen Tagen was die steigende Nachfrage nach schnellen, miniaturisierten und einfach handhabbaren Tests für die Vor-Ort-Diagnose von infektiösen Krankheiten erklärt. Die Entwicklungen im Gebiet Lab-on-a-Chip [1] fördern die Automatisierung und Integration neuer Assays und ermöglichen anwenderfreundliche Diagnostik in Laboren [2] als auch am Point-of-care [3]. Das voll automatisierte Lab-on-a-Disk System kombiniert Mobilität mit schnellen Durchlaufzeiten und ermöglicht mittels einfacher Handhabung selbst ungeübten Anwendern die Durchführung komplexer medizinischer Tests. Dies könnte die Dauer bis zur Diagnose in der medizinischen Praxis minimieren und dazu beitragen, pathogen-spezifische Antibiotika anzuwenden.

2 Material und Methoden

2.1 Fabrikation der LabDisk

Die mittels CAD Zeichnung (SolidWorks, Dassault Systèmes SolidWorks Corp., Frankreich) entworfenen mikrofluidischen Strukturen werden mit einer Hochpräzisions-Fräse (Kern EVO, KERN Microtechnik GmbH, Deutschland) in eine 6 mm dicke Polymethylmethacrylat (PMMA) Platte gefräst. Die gefrästen Strukturen werden in ein Polydimethylsiloxan (PDMS) (Elastosil RT-607, Wacker Chemie AG, Deutschland) Werkzeug abgeformt. Das PDMS Werkzeug wird anschließend in die Heißprägemaschine (HEX01, Jenoptik AG, Deutschland) gegeben, um mittels des Mikrothermoformprozess die LabDisks (Durchmesser: 130 mm) aus 188 µm dünnen Cyclo-Olefin-Polymer-Folien (COP, ZF14, TOPAS Advanced Polymers GmbH, Deutschland) zu strukturieren [4]. Die Vorlagerung der flüssigen Reagenzien für die Nukleinsäure-Extraktion erfolgt in Stick-packs [5] – zur Langzeitlagerung von Flüssigkeiten geeignete Aluminiumbeutel mit einer Berstnaht, die sich aufgrund des durch Zentrifugation entstehenden Flüssigkeitsdruck öffnet. Durch

Optimierung der Prozessparameter der Stick-pack Herstellung (Merz-Verpackungsmaschinen, Deutschland) soll die kontrollierte, frequenzabhängige Freisetzung des hochbenetzenden Bindepuffers (200 μl) nach dem Lyseprozess bei 70 Hz und für alle weiteren Flüssigreagenzien (Lysepuffer: 180 μl , Waschpuffer 1 & 2: 200 μl , Elutionspuffer: 120 μl) bereits bei 50 Hz stattfinden. Für die Freisetzung der Reagenzien werden in den Experimenten 80 Hz für den Bindepuffer sowie zuvor 55 Hz für die weiteren Reagenzien appliziert. Die magnetischen Beads (Agrobiogen GmbH, Deutschland) sowie Primer und Fluoreszenzsonden (RealAccurate Quadruplex Respiratory qPCR panels, PathoFinder B.V., Niederlande) werden mit dem Stabilisator Trehalose (Carl Roth, Deutschland) vermengt (Trehalose-Konzentrationen: 200 mM für die magnetischen Beads und 56 mM für die Primer und Fluoreszenzsonden) und in der LabDisk eingetrocknet. Abschließend wird die LabDisk mit einer Klebefolie gedeckelt (Polyolefin-Folie, HJ-Bioanalytik GmbH, Deutschland), die mit einem PTFE Membranfilter (0.2 μm Porengröße) (Merck Millipore KGaA, Deutschland) versehen ist.



2.2 LabDisk Player

Die Prozessierung der gedeckelten LabDisk erfolgt im in **Abbildung 1** gezeigten LabDisk Player (Prototyp, Qiagen, Deutschland), einem mobilen Analysegerät (2 kg) in dem PCR-Thermozyklen, Fluoreszenzdetektion und die mikrofluidischen Protokolle durchgeführt werden.



Abbildung 1: LabDisk Player für die automatisierte Prozessierung der LabDisks

2.3 Mikrofluidisches Layout

Das mikrofluidische Layout der LabDisk wird in **Abbildung 2** gezeigt. Die LabDisk besteht aus Einlass-Kammern für die Probe und den PCR Puffer, die durch Überlappung platzsparend angeordneten Stick-pack Kammern, der beadbasierten Nukleinsäure-Extraktions-Struktur, und der Aliquotierstruktur sowie den Reaktionskavitäten.

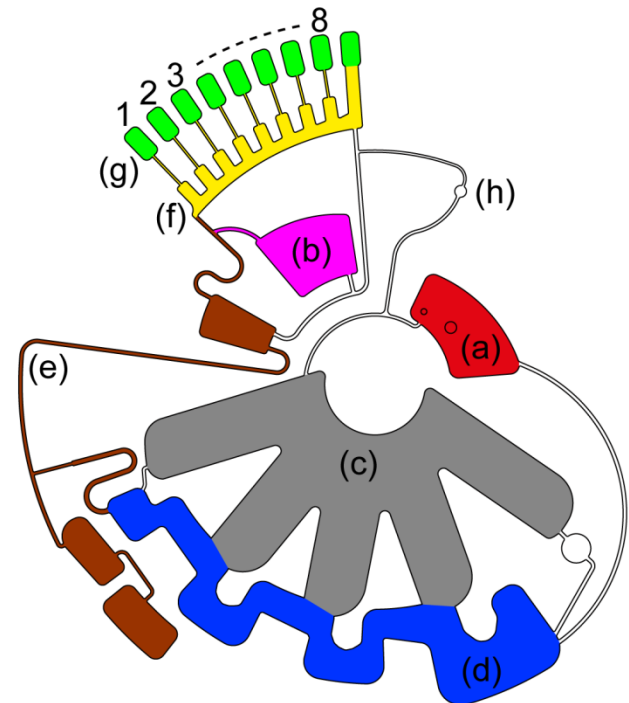


Abbildung 2: Foto der LabDisk mit vorgelagerten Reagenzien (oben) und CAD Zeichnung (unten) der mikrofluidischen Strukturen für die Sample-to-answer Detektion, bestehend aus der Einlass-Kammer für die 200 μl Probe (a) und 100 μl RT-PCR-Puffer (b). Flüssige Reagenzien werden in Stick-packs vorgelagert und in den Stick-pack Kammern (c) platziert, die mit der Nukleinsäure-Extraktions-Struktur (d) verbunden sind. Darin werden die magnetischen Beads durch die Extraktionspuffer transferiert [6]. Die Kanäle und Druckkammern der Sektion (e) werden zum Einwärtspumpen des Eluates [7] benötigt. Das Eluat gelang anschließend in die Aliquotierstruktur (f) und die damit verbundenen Reaktionskavitäten (g). Das Belüftungssystem (h) ist mit einer Membran versehen um die Geschlossenheit der LabDisk zu garantieren und Aerosolausbreitung zu verhindern.

2.4 Mikrofluidischer Ablauf

Das mikrofluidische Layout der LabDisk wird in **Abbildung 3** aufgezeigt und detailliert beschrieben.

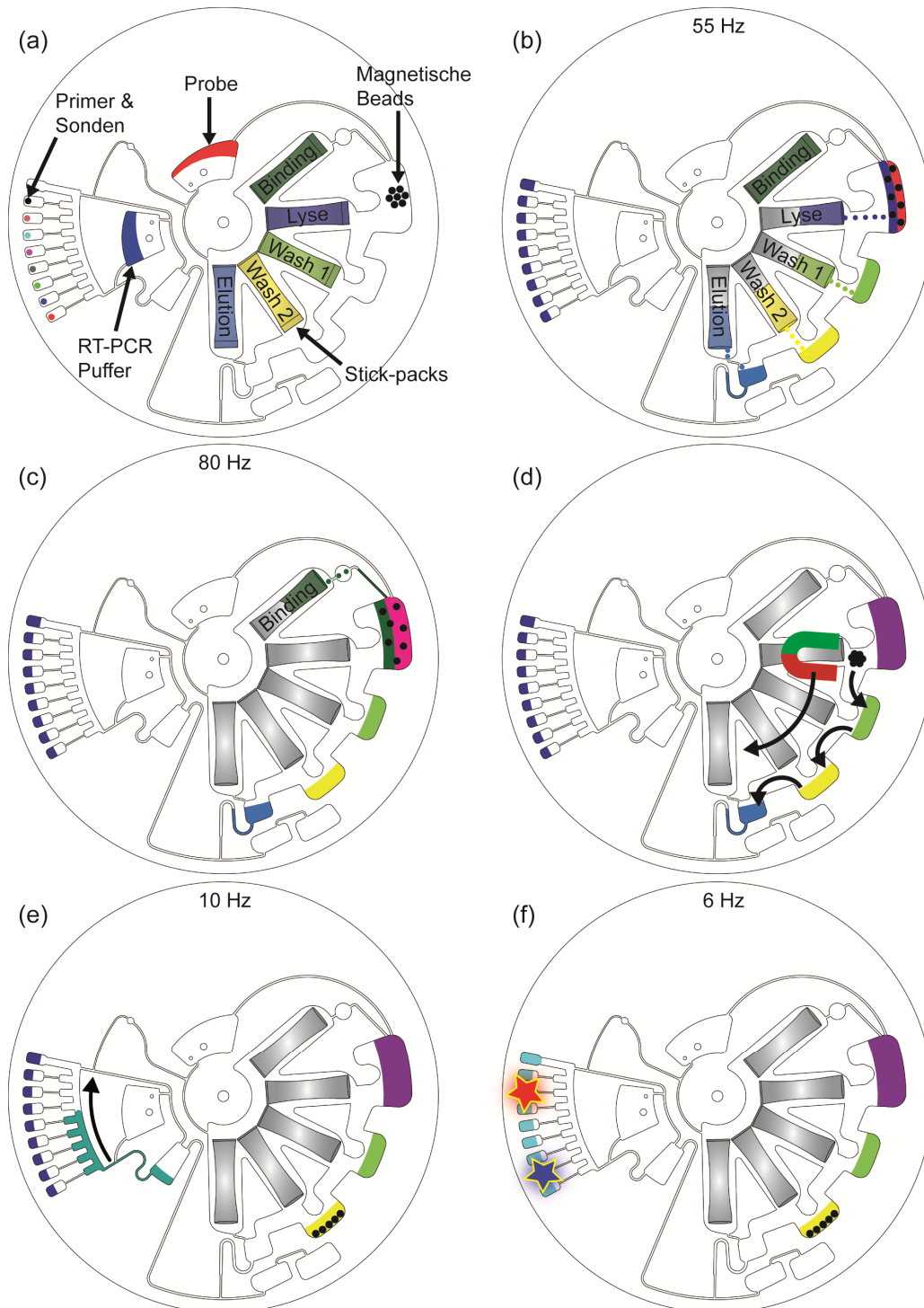


Abbildung 3: Mikrofluidischer Ablauf: (a) Die Probe und der RT-PCR Puffer werden vor dem Start des automatisierten Protokolls in die LabDisk pipettiert. (b) Bei einer Drehfrequenz von 55 Hz werden die Extraktionspuffer (außer dem Bindepuffer) aus den Stick-packs freigesetzt. Die magnetischen Beads werden rehydriert und die Lyse der Probe findet unterstützt durch Mischen aufgrund von Drehfrequenzvariation statt. Zeitgleich wird der RT-PCR Puffer zu je 10 μ l in die Reaktionskavitäten aliquotiert

und darin die vorgelagerten Primer und Fluoreszenzsonden rehydriert. (c) Bei 80 Hz wird der Bindepuffer der lysierten Probe zugeführt wodurch die freigesetzte RNA an die magnetischen Beads bindet. (d) Die magnetischen Beads werden durch die Waschpuffer in die Kammer des Elutionspuffers transferiert [6]. (e) 120 μ l des RNA Eluats werden zu je 10 μ l auf die Reaktionskavitäten verteilt was in einem finalen Reaktionsvolumen von 20 μ l resultiert. Anschließend findet die RT-PCR mit Echtzeit-Fluoreszenzdetektion statt.

3 Experimententeil

200 µl der Probe (RNA-phage MS2, 75 pfu/ml) und 100 µl qScript One-Step RT-qPCR Puffer (Quanta BioSciences, USA) werden in die LabDisk pipettiert und die Einlass-Kammern anschließend mit Klebefolie verschlossen. Nach dem mikrofluidischen Ablauf beginnt die RT-PCR mit der reversen Transkription (10 min @ 50 °C) und der anschließenden Initialdenaturierung für 1 min bei 95 °C. Daraufhin folgen 45 Thermozyklen bestehend aus Denaturierung für 20 sec bei 95 °C und Primerhybridisierung und Elongation für 60 sec bei 60 °C mit Echtzeit Fluoreszenz Detektion. Für die Experimente und den Machbarkeitsnachweis wurden in allen Reaktionskavitäten die Primer und Fluoreszenzsonden des Influenza Kits PF0960-R RealAccurate Quadruplex Influenza (PathoFinder B.V., Niederlande) vorgelagert. Die RNA-phage MS2 dient als Template für die interne Kontrolle des Kits und somit ist ein positiver Signalanstieg in allen Reaktionskavitäten zu erwarten.

4 Ergebnisse

Der mikrofluidische Ablauf wurde in 5 unabhängigen Experimenten erfolgreich durchgeführt. Die Öffnungsfrequenzen von 100 Stick-packs (n = 20 pro Puffer) wurden an einem Stroboskop-Messplatz ermittelt (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: Ermittelte Freisetzungsfrequenzen der vorgelagerten Puffer für die Nukleinsäure-Extraktion

	Freisetzungsfrequenz
Bindepuffer	70,5 Hz ± 1,2 Hz
Lysepuffer	51,7 Hz ± 0,7 Hz
Waschpuffer 1	49,8 Hz ± 1,0 Hz
Waschpuffer 2	49,7 Hz ± 0,8 Hz
Elutionspuffer	48,8 Hz ± 0,8 Hz

Mittels des automatisierten Sample-to-answer Ablaufs konnten in ca. 3 Stunden 15 pfu der RNA-phage MS2 aus einer 200 µl Probe erfolgreich detektiert werden. **Abbildung 4** zeigt das Fluoreszenzsignals eines Experiments.

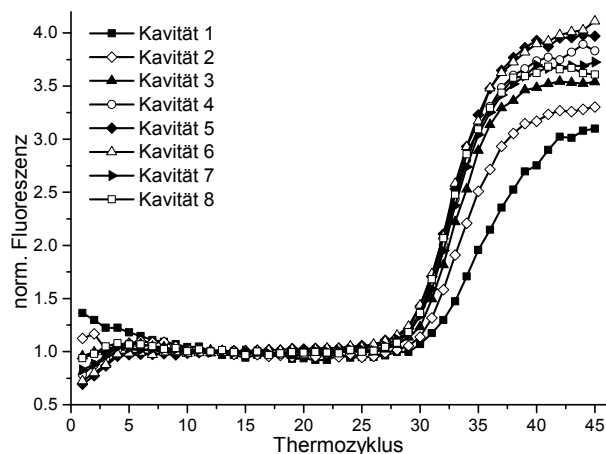


Abbildung 4: Fluoreszenzsignal der parallel in den Reaktionskavitäten stattfindenden RT-PCR.

Die positiven Fluoreszenz-Signalanstiege in den Reaktionskavitäten wurden in fünf unabhängigen LabDisk Experimenten detektiert und demonstrieren den erfolgreichen Ablauf der Experimente.

5 Schlussfolgerung

Eine erfolgreiche RNA basierte Sample-to-answer Detektion von RNA-phage MS2 wurde gezeigt. Der mobile LabDisk Player und die LabDisk erfüllen mit dem hohen Grad an Automatisierung die Anforderungen an eine zuverlässige Vor-Ort-Diagnostik. Zukünftig werden weitere Primer und Fluoreszenzsonden in den Reaktionskavitäten vorgelagert, um bis zu 22 Nukleinsäure Targets z.B. respiratorische Pathogene nachzuweisen. Durch Verlagerung von lyophilisiertem PCR-Mix verbleibt mit der Zugabe der Probe nur ein manueller Arbeitsschritt.

6 Literatur

- [1] A. G. Crevillen, M. Hervas, M. A. Lopez, M. C. Gonzalez and A. Escarpa, "Real sample analysis on microfluidic devices", *Talanta*, 74(3), (2007), pp. 342–357.
- [2] T. A. Franke and A. Wixforth, "Microfluidics for Miniaturized Laboratories on a Chip", *ChemPhysChem*, 9(15), (2008), pp. 2140–2156.
- [3] J. Kling, "Microfluidics closes in on point-of-care assays", *Nat. Biotechnol.*, 24(8), (2006), pp. 891–893.
- [4] M. Focke, F. Stumpf, B. Faltin, P. Reith, D. Bamarni, S. Wadle, C. Mueller, H. Reinecke, J. Schrenzel, P. Francois, D. Mark, G. Roth, R. Zengerle and F. von Stetten, "Microstructuring of polymer films for sensitive genotyping by real-time PCR on a centrifugal microfluidic platform", *LabChip*, 19, (2010), pp. 2519–2526.
- [5] T. van Oordt, Y. Barb, J. Smetana, R. Zengerle and F. von Stetten, "Miniature stick-packaging - an industrial technology for pre-storage and release of reagents in lab-on-a-chip systems", *LabChip*, 15, (2013), pp. 2888–2892.
- [6] O. Strohmeier, A. Emperle, G. Roth, D. Mark, R. Zengerle and F. von Stetten, "Centrifugal gas-phase transition magnetophoresis (GTM) – a generic method for automation of magnetic bead based assays on the centrifugal microfluidic platform and application to DNA purification", *LabChip*, 1, (2013), pp. 146–155.
- [7] S. Zehnle, F. Schwemmer, G. Roth, F. von Stetten, R. Zengerle and N. Paust, "Centrifugo-dynamic inward pumping of liquids on a centrifugal microfluidic platform" *LabChip*, 24, (2012), pp. 5142–5145.