

# Assay-Automatisierung als Dienstleistung

## Mikrofluidische Integration von Laborprozessen durch den Lab-on-a-Chip Design- & Foundry-Service

*Daniel Mark\*, Günter Roth\*, \*\*, Dominique Kosse\*, Nils Paust\*,  
Roland Zengerle\*, \*\* und Felix von Stetten\*, \*\*)*

Lab-on-a-Chip-Systeme ermöglichen die Automatisierung, Miniaturisierung und Integration von biochemischen Assays. Dadurch werden beispielsweise dezentrale, patientennahe Diagnostik, Laborautomatisierung, oder sicherheitsrelevante Vor-Ort-Analysen ermöglicht. Diesem Trend zur mikrofluidischen Automatisierung entsprechend, bietet das HSG-IMIT ein neues Dienstleistungsangebot: die schnelle kundenspezifische Entwicklung von Lab-on-a-Chip-Prototypen auf Basis von standardisierten mikrofluidischen Einheitsoperationen und Fertigungsprozessen.



In der modernen klinischen Diagnostik, Laboranalytik und Sicherheitsforschung sind hochsensitive und -spezifische Nachweisverfahren wie Immunoassays und PCR-basierte Assays weit verbreitet. Solche Tests beinhalten eine Vielzahl von aufwendigen Prozessierungsschritten wie das präzise Abmessen, Mischen und Aliquotieren von Flüssigkeiten. Sie werden daher entweder durch hochqualifiziertes Personal in langwierigen Verfahren manuell durchgeführt oder zentral in Großlabors mit großem apparativem Aufwand automatisiert. Entsprechend lange sind die Antwortzeiten nach der Probenahme, da die Laborarbeit bzw. das Verschicken von Proben Stunden bis Tage in Anspruch nimmt. Eine schnelle und automatisierte

Vor-Ort-Analyse ist bisher nur für wenige Parameter mit proprietären Lösungen möglich (beispielsweise durch den i-STAT®, Abbott Point of Care Inc.). Für eine schnelle, patientennahe Diagnostik oder Sicherheitsanwendungen sind jedoch kompakte, automatisierte Geräte wünschenswert, die vor Ort mit geringem Schulungsaufwand eine Vielzahl von Parametern gleichzeitig analysieren können. Mikrofluidische Systeme sind dabei vielversprechende Kandidaten (Bild 1), entsprechende Entwicklungen sind jedoch meist langjährige und riskante Forschungsprojekte.

### Mikrofluidisches Plattformkonzept

Der Lab-on-a-Chip Design- und Foundry-Service ist eine neue Dienstleistung des HSG-IMIT, die eine effiziente Miniaturi-

\*) HSG-IMIT, Wilhelm-Schickard-Straße 10, D-78052 Villingen-Schwenningen.  
Kontakt: daniel.mark@hsg-imit.de.

\*\*) Universität Freiburg, Institut für Mikrosystemtechnik – IMTEK, Lehrstuhl  
Anwendungsentwicklung, Georges-Köhler-Allee 106, D-79110 Freiburg.

# MIKRO + NANO

## Lee Dosierventile für Mikro- oder Nanoliter



**Bild 1:** Lab-on-a-Chip Systeme ermöglichen die Automatisierung von biochemischen Assays in kompakten Geräten. In Zukunft könnten portable „Mini-Labore“ beispielsweise schnelle und genaue Vor-Ort-Diagnosen ermöglichen.

sierung und Automatisierung biochemischer Assays inklusive der Fertigung von Funktionsmustern umfasst. Ziel ist es, dem Kunden einen einfachen und schnellen Zugang zur Lab-on-a-Chip Technologie bei geringem eigenem Entwicklungsrisiko zu ermöglichen. Dies wird durch die konsequente Verwendung von validierten mikrofluidischen „Bausteinen“ und etablierten Prototyping- und Produktionsverfahren erreicht [1]. Der Fokus liegt dabei auf der „LabDisk“-Plattform [2], die aus einem monolithischen Einweg-Testträger aus Kunststoff besteht. Die benötigten Reagenzien sind auf diesem Testträger vorgelagert und die Kontrolle des Prozessablaufs wird über Zentrifugation gesteuert, wodurch sich die LabDisk sehr einfach handhaben lässt. Es muss lediglich die Probe aufgegeben und der Testträger ähnlich einer CD in ein Prozessierungsgerät eingelegt werden. Weitere fluidische Anschlüsse sind nicht notwendig. Insgesamt erlaubt die Plattform also einen hohen Integrationsgrad durch die Vorlagerung von Reagenzien, einfache Bedienbarkeit durch den Verzicht auf externe Verbindungen, Parallelisierbarkeit durch rotationsymmetrische Anordnung mehrerer Reaktionskanäle, sowie sichere Handhabung durch den geschlossenen Einweg-Testträger, der nach der erfolgreichen Prozessierung einschließlich aller Proben- und Assay-Bestandteile entsorgt werden kann.

Die Prozessierung der Einweg-Testträger erfolgt durch Zentrifugationsprotokolle und kommt somit ohne komplexe Pipettierroboter aus. Dabei kann meist auf bereits etablierte, kommerzialisierte Laborgeräte wie Zentrifugen oder zentrifugale Thermocycler zurückgegriffen werden. Die „mikrofluidischen Kartuschen“ sind daher auch aus Sicht der Hersteller dieser Laborgeräte in-

teressant, da sie die Funktionalität der existierenden Geräte beträchtlich erweitern. So wird ein Real-Time-PCR-Cycler, dessen Funktion vorher auf die eigentliche PCR beschränkt war, zur leistungsfähigen integrierten Analysemaschine, die neben der PCR auch noch die vorgeschaltete Probenhandhabung automatisiert durchführen kann, wie das Mischen mit dem Mastermix und das Aliquotieren. Durch diese „mikrofluidischen Upgrades“, also Einweg-Testträger mit mikrofluidischen Strukturen, können komplexe Prozesse wie DNA-Aufreinigung oder Genotypisierungen realisiert werden [3]. Dadurch wird die kostspielige Entwicklung eines proprietären Prozessierungsgeräts vermieden. Der Vorteil für den Endnutzer liegt darin, dass mit bereits vorhandenen, vertrauten Geräten die Automatisierung von Laborprozessen erreicht werden kann. Die Kosten für die Automatisierungslösung beschränkt sich somit auf die Beschaffung der Einweg-Testträger – Investitionen sind dank des Rückgriffs auf bestehende Laborgeräte nicht notwendig. Für die Fertigung der Testträger in industriellem Maßstab wird durch externe Partner momentan ein Verfahren zur Herstellung durch Thermoformen von Polymer-Folien entwickelt.

### Automatisierungslösungen in Labs-on-a-Chip

Die folgenden Beispiele zeigen einige mikrofluidische Automatisierungslösungen für proprietäre Prozessierungsgeräte und für Standard-Laborgeräte. Die entsprechenden Kompetenzen wurden teilweise in geförderten Forschungsprojekten aufgebaut. Die Förder-Institution ist jeweils genannt.

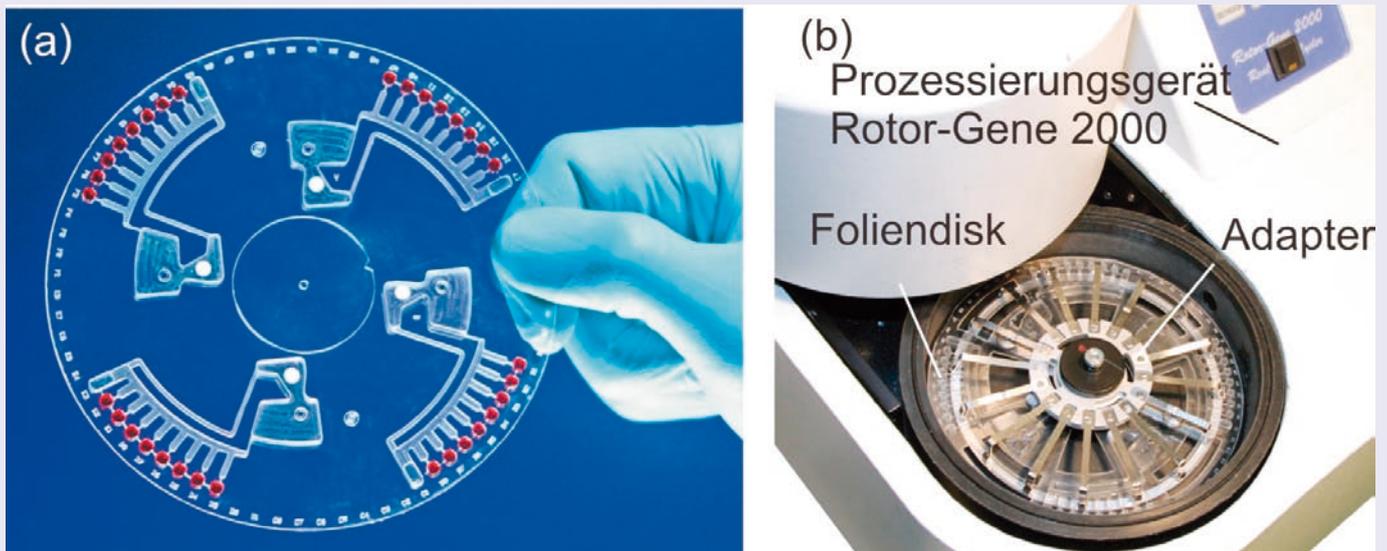


Innovation in Miniatur

LEE Hydraulische  
Miniaturkomponenten GmbH

Am Limespark 2 · 65843 Sulzbach  
Postfach 1180 · 65796 Bad Soden

Telefon 06196/77369-0  
E-Mail info@lee.de · www.lee.de



**Bild 2: Testträger für die automatische Genotypisierung. (a) LabDisk in Folie für ein automatisches Aliquotieren der Probe und Mischen mit Reaktionskomponenten. (b) Betrieb der LabDisk in einem Rotor-Gene, beispielsweise für den automatischen Nachweis von MRSA-Subtypen.**

## Real-time-PCR-basierte Genotypisierung von MRSA im Rotor-Gene

Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) sind Bakterien, die für verschiedene schwer behandelbare Infektionskrankheiten verantwortlich sind. Besonders in Krankenhäusern ist die Verbreitung dieser Bakterien kritisch, da hier Patienten mit bereits geschwächtem Immunsystem einem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt sind. Ein schnelles, vor Ort einsetzbares Nachweissystem könnte es ermöglichen, die MRSA-Ausbreitung einzuschränken, indem mit MRSA infizierte Patienten von nicht infizierten isoliert werden.

Für die effiziente Durchführung einer solchen Real-time-PCR-basierten Diagnose in einem mikrofluidischen Einweg-Testträger wurde ein Prototyping-Verfahren, basierend auf dem Thermoformen von Folien, entwickelt [4] (Bild 2(a)). Damit können mikrofluidische LabDisks zur MRSA-Analyse hergestellt werden. Ausgehend von 90 µl DNA können hiermit automatisch sieben Genotypen von MRSA sowie Positiv- und Negativkontrollen bestimmt werden (weitere Informationen und Ergebnisse sind aufgeführt unter [5]). Alle benötigten Primer und Sonden wurden in der LabDisk vorgelagert. Diese kann in einem kommerziellen zentrifugalen Thermocycler prozessiert werden (Bild 2(b), Rotor-Gene 2000 mit modifizierter Elektronik, Corbett Life Science, jetzt QIAGEN). Die PCR lief darin mit vergleichbarer Effizienz wie in einem Referenzsystem mit Standard-Reaktionsgefäßen und ermöglichte so den vollau-

tomatischen Nachweis von MRSA Subtypen.

Die Durchführung dieses Projekts wurde freundlicherweise durch Förderung der Europäischen Union ermöglicht (Projekt „MagRSA“, Fördernummer 037957).

## Immunoassay für Estradiol-Nachweise

Die Integration von hochsensitiven Immunoassays in Lab-on-a-Chip-Systeme hat das Potential, aufwendige Tests für Hormon- und Proteinkonzentrationen stark zu vereinfachen oder komplett zu automatisieren. Für die zentrifugal-mikrofluidische Plattform wurden zwei Module für den kompletten Prozessablauf einer Diagnostik aus Vollblut gezeigt. Zunächst wurde eine Struktur für eine Blutplasma-Separation für ein 10 µl Blutprobe bereitgestellt, die aus der Probe 4 µl ( $\pm 6\%$ ) Plasma abtrennt. Eine weitere Struktur ermöglicht die Automatisierung der notwendigen Binde-, Wasch-, und Inkubationsschritte. Damit wurde ein kompetitiver Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) für Estradiol demonstriert (weitere Informationen und Ergebnisse siehe [6]). Die Prozessierungszeit wurde dabei von 180 min für den Laborprozess auf 40 min für den mikrofluidisch integrierten Prozess reduziert. Die Prozessierung erfolgte in einem speziell angefertigten Gerät, das ein Kooperationspartner zur Verfügung stellte (ABBIS, eine Abteilung der Vulkan Technic Maschinen-Konstruktions GmbH).

Die Durchführung dieses Projekts wurde freundlicherweise durch Förderung

des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) ermöglicht (Projekt „ZentriLab“, Fördernummer 16SV2347).

## Automatisierte DNA-Aufreinigung in Standard-Laborzentrifuge

Die Aufreinigung von DNA ist ein häufig benötigter Ablauf in Analyselaboren und in der molekularen Diagnostik. Häufig ist sie der erste Schritt für weiterführende Prozesse wie beispielsweise eine Analyse durch Real-time-PCR, da hierfür hochreine DNA benötigt wird. Für diese Applikation wurde von uns ein mikrofluidisches Funktionsmuster entwickelt, das als Einweg-Prozessträger aus Kunststoff in Standard-Laborzentrifugen betrieben werden kann [7] (siehe Bild 3). Dabei sind in dem Prozessträger die benötigten Waschpuffer und eine Silika-Festphase vorgelegt. Nachdem der mikrofluidische Prozessträger in die Zentrifuge eingelegt wird, kann eine lysierte Blutprobe und ein Elutionspuffer als Lösungsmittel für die aufgereinigte DNA aufgegeben werden und die vorgelagerten Reagenzien werden durch einen Fingerdruck freigesetzt. In drei ersten Tests zur Funktionskontrolle konnten dabei ca. 50 % der Effizienz der Referenzmethode erreicht werden (QIAamp DNA blood mini kit).

Die Durchführung dieses Projekts wurde freundlicherweise durch Förderung des Ministeriums für Wissenschaft, Forschung und Kunst, Baden-Württemberg ermöglicht (Fördernummer 31-655.056-1/161).

## Dienstleistungsangebot

Die gezeigten Beispiele für automatisierte und integrierte Genotypisierungen, Immunoassays und DNA-Aufreinigung zeigen das Potential der LabDisk-Plattform. Auf der Basis langjähriger Erfahrung mit mikrofluidischen Plattformen bietet der Lab-on-a-Chip Design- & Foundry-Service des HSG-IMIT eine vollständige Entwicklungsumgebung für die anwendungsspezifische Integration, Miniaturisierung und Automatisierung biochemischer Analysen. So können bestehende, im Labor etablierte Assays für den Kunden durch mikrofluidische Integration automatisiert werden. Dadurch wird eine deutliche Reduktion der Hands-on time für den Assay erreicht. Durch die weitgehende Automatisierung der Flüssigkeitssteuerung wird auch die Durchführung mit minimal geschultem Personal möglich.

Auf der Basis von etablierten Kompletstrukturen können erste Funktionsnachweise nach einigen Wochen bis wenigen Monaten erfolgen. Auch bei der Neuentwicklung mikrofluidischer Kartuschen kann durch das mikrofluidische

Plattformkonzept und den Zugriff auf eine Vielzahl von validierten mikrofluidischen Einheitsoperationen eine deutliche Reduzierung der Entwicklungszeit und des Entwicklungsrisikos erreicht werden. Dabei bietet die LabDisk-Plattform einen hohen Grad an Integration und eine einfache Handhabung. Zudem bieten sich eine Reihe von etablierten Laborgeräten als Basis für die Laborautomatisierung mit mikrofluidischen „Upgrades“ in Form von Einweg-Testträgern an, was die Einstiegschürden für den Marktzugang deutlich verringern kann. Für die Produktion der LabDisk im industriellen Maßstab stehen wir in engem Kontakt mit Unternehmen auf dem Gebiet „Thermoformen“.

## Zusammenfassung

Das HSG-IMIT bietet als neues Dienstleistungsangebot die schnelle, kundenspezifische Entwicklung von Lab-on-a-Chip-Prototypen auf Basis von standardisierten mikrofluidischen Einheitsoperationen und Fertigungsprozessen. Erste Applikationsbeispiele umfassen die mikrofluidische

Integration und Automatisierung von Genotypisierungen, Immunoassays sowie von Protokollen zur DNA-Aufreinigung. Unser Konzept der „LabDisk“ erlaubt es dabei nicht nur, mikrofluidische Automatisierung in Spezialgeräten durchzuführen, sondern ermöglicht auch, Laborabläufe auf etablierten Plattformen zu automatisieren, beispielsweise in Laborzentrifugen oder zentrifugalen Thermocyclern. Dabei werden die normalen Reaktionsgefäße durch die Mikrofluidik-Kartuschen des HSG-IMIT ersetzt.

## Literatur

- [1] D. Mark, S. Haeberle, G. Roth, F. von Stetten, 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, R. Zengerle, The centrifugal microfluidic Bio-Disk platform, J. Micromech. Microeng., vol. 17, pp. S103-S115, 2007.
- [3] D. Mark, M. Focke, S. Lutz, J. Burger, M. Müller, L. Riegger, M. Rombach, J. Hoffmann, G. Roth, O. Piepenburg, Y. Park, R. Zengerle, F. von Stetten, Lab-on-a-Chip Solutions Designed for Being Operated on Standard Laboratory Instruments, Proceedings EuroSensors XXIV, 2010.
- [4] M. Focke, D. Kosse, C. Müller, H. Reinecke, R. Zengerle, F. von Stetten, Lab-on-a-Foil: microfluidics on thin and flexible films, Lab Chip, vol. 10, pp. 1365-1386, 2010.
- [5] M. Focke, F. Stumpf, B. Faltin, P. Reith, D. Bamarini, S. Wadle, C. Müller, H. Reinecke, J. Schrenzel, P. Francois, D. Mark, G. Roth, R. Zengerle, F. von Stetten, Microstructuring of polymer films for highly sensitive genotyping by real-time PCR on a centrifugal microfluidic platform, Lab Chip, vol. 10, pp. 2519-2526, 2010.
- [6] S. Lutz, P. Lang, I. Malki, D. Mark, J. Ducrée, R. Zengerle, F. von Stetten, Lab-on-a-Chip Cartridge for Processing of Immunoassays With Integrated Sample Preparation, Proceedings of the 12th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS), San Diego, 2008, pp. 1759-1761.
- [7] M. Müller, D. Mark, M. Rombach, G. Roth, J. Hoffmann, R. Zengerle, F. von Stetten, On The Way to a Fully Integrated DNA-Purification System on a Standard Laboratory Centrifuge, Proceedings of 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS), 2010, pp. 405-407.



**Bild 3:** Mikrofluidischer Testträger für die automatische DNA-Aufreinigung in einer Standard-Laborzentrifuge.

### Lab-on-a-chip Design- & Foundry-Service

» 18

HSG-IMIT, Villingen-Schwenningen,  
Tel. 07721/943-0, Fax 943-210,  
[www.hsg-imit.de](http://www.hsg-imit.de)