

Laborautomation

Die zentrifugal-mikrofluidische Plattform

DANIEL MARK¹, GÜNTER ROTH^{1, 2, 3}, ROLAND ZENGERLE^{1, 2, 3}, FELIX VON STETTEN^{1, 2}

¹INSTITUT FÜR MIKRO- UND INFORMATIONSTECHNIK DER HAHN-SCHICKARD-GESELLSCHAFT FÜR ANGEWANDTE FORSCHUNG E. V. (HSG-IMIT), VILLINGEN-SCHWENNINGEN

²INSTITUT FÜR MIKROSYSTEMTECHNIK - IMTEK, UNIVERSITÄT FREIBURG

³BIOSS - CENTRE FOR BIOLOGICAL SIGNALLING STUDIES, UNIVERSITÄT FREIBURG

Lösungen zur Laborautomatisierung und integrierte Diagnosesysteme benötigen häufig große und teure Automaten. Dagegen ermöglicht eine zentrifugal-mikrofluidische Plattform die Integration von z. B. Genotypisierungen und Immunoassays in kompakten Geräten.

Devices for laboratory automation and integrated, automated diagnostic systems are usually expensive and bulky. In contrast, a centrifugal microfluidic platform enables laboratory automation and integration of e. g. genotyping and immunoassays in compact instruments.

■ Durch den Trend zur personalisierten und evidenzbasierten Medizin entsteht ein großer Bedarf an kompakten Geräten für die *point-of-care*-Diagnostik. Insbesondere für kleine und mittlere Labors sowie für niedergelassene Ärzte wird dieser Bedarf nur selten gedeckt, da existierende Großgeräte vergleichsweise teuer sind und einen entsprechenden Platzbedarf aufweisen. Mikrofluidische *lab-on-a-chip*-Systeme bieten hier eine Alternative [1].

In der klinischen Diagnostik sind hochsensitive und -spezifische Verfahren wie Immunoassays und PCR-basierte Analysen

etablierte Methoden. Für diese Verfahren ist eine schnelle und automatisierte Vor-Ort-Analyse jedoch bisher kaum umgesetzt. Es existieren lediglich einige proprietäre Lösungen für Parameter der klinischen Chemie (z. B. i-STAT[®], Abbott Point of Care Inc.) und für einzelne molekulardiagnostische Tests (GeneXpert, Cepheid und LIAT, IQuum) [2]. Eine generische und offene Plattform für die Automatisierung von Laborabläufen und Diagnosen wäre jedoch wünschenswert, um Unternehmen und Universitäten einen einfachen Zugang zur *lab-on-a-chip*-Technologie zu ermöglichen. Aus diesem Grund bietet der

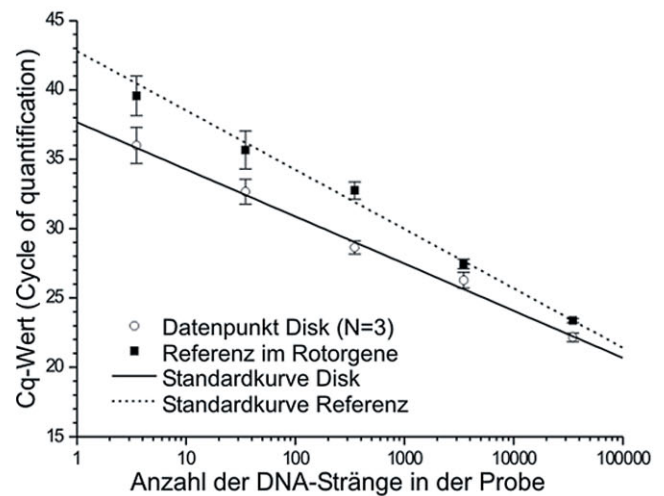
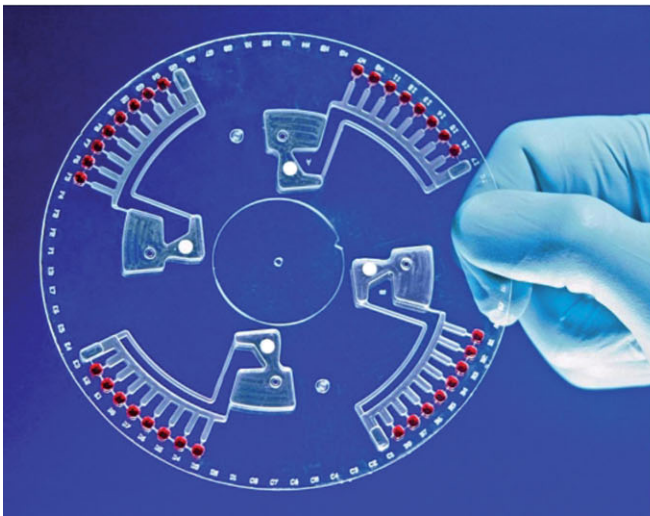
Lab-on-a-Chip Design- und Foundry-Service des Instituts für Mikro- und Informationstechnik der Hahn-Schickard-Gesellschaft für angewandte Forschung e. V. (HSG-IMIT) diagnostischen Unternehmen und Universitäten die Entwicklung von *lab-on-a-chip*-Systemen und die Herstellung von Kleinserien für Validierungen an. Damit können Test-Kit-Hersteller und universitäre Assay-Entwickler ihre biochemischen Analysen mikrofluidisch funktionell verpacken, um den Testablauf auf kompakten Prozessierungsgeräten zu automatisieren (Abb. 1).

Mikrofluidisches Plattformkonzept

Mikrofluidische Plattformen ermöglichen durch die Verwendung von validierten mikrofluidischen „Bausteinen“ und etablierten Prototyping- und Produktionsverfahren eine flexible und schnelle Umsetzung von verschiedenen Laborabläufen [1]. Ein Beispiel dafür ist die zentrifugal-mikrofluidische Plattform, z. B. die „LabDisk“ [3, 4]. Diese besteht aus einem monolithischen, versiegelten Einweg-Testträger aus Kunststoff. Die benötigten Reagenzien sind auf diesem Testträger vorgelagert und die Kontrolle des Prozessablaufs wird über Zentrifugation gesteuert. Es muss lediglich die Probe aufgegeben und der Testträger ähnlich einer CD in ein Prozessierungsgerät eingelegt werden (Abb. 1). Insgesamt erlaubt die Plattform also einen hohen Integrationsgrad durch die Vorlagerung von



▲ **Abb. 1:** *Lab-on-a-chip*-Systeme ermöglichen die Automatisierung von biochemischen Assays in kompakten Geräten. Somit kann ein Assay durch mikrofluidische Integration „funktional verpackt“ werden. Das heißt, die Flüssigkeitshandhabung kann komplett in der Verpackung erfolgen und durch ein Prozessierungsgerät automatisiert werden. Als Prozessierungsgerät dient ein modifizierter zentrifugaler Thermocycler mit verbesserter Motorsteuerung (Rotor-Gene 2000, Qiagen).



▲ **Abb. 2:** Eine zentrifugal-mikrofluidische Plattform (Folien-LabDisk, links), hier als Auslegung für ein PCR-Genotyping gegen *Staphylococcus aureus* [5], ermöglicht ein automatisches Prozessieren, Aliquotieren und Mischen der Probe mit Primern und Sonden. Aufgrund des für die Plattform optimierten Temperaturprotokolls ist diese etwas sensitiver als eine identische Referenzprobe (original Rotorgen-Tubes, rechts).

Reagenzien, einfache Bedienung durch den Verzicht auf externe Verbindungen, Parallelisierbarkeit durch rotationssymmetrische Anordnung mehrerer Reaktionskanäle sowie sichere Handhabung durch den geschlossenen Einweg-Testträger, der nach erfolgter Prozessierung einschließlich aller Proben- und Assay-Bestandteile entsorgt werden kann. Im Folgenden werden nun zwei Beispiele für bestehende Labormuster von integrierten und automatisierten Assays dargestellt.

Real-Time-PCR-basierte Genotypisierung von *Staphylococcus aureus*

Der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) ist für verschiedene schwer behandelbare Infektionskrankheiten insbesondere in Krankenhäusern verantwortlich. Ein schnelles, vor Ort einsetzbares Nachweissystem könnte dabei helfen, die MRSA-Ausbreitung durch gezielte Quarantäne- und Hygienemaßnahmen einzuschränken.

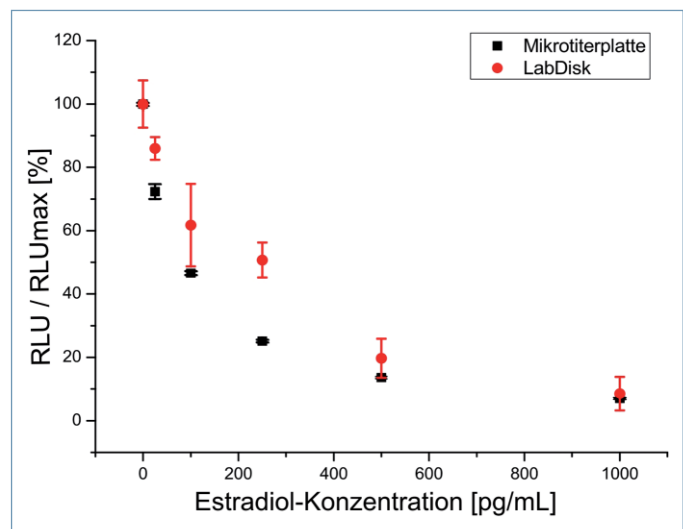
Für die effiziente Durchführung einer Real-Time-PCR-basierten Diagnose wurde eine mikrofluidische LabDisk zur MRSA-Analyse entwickelt. Ausgehend von 90 Mikroliter aufgereinigter DNA-Probe können hiermit automatisch sieben Genotypen von MRSA sowie Positiv- und Negativkontrollen bestimmt werden [5]. Alle benötigten Primer und Sonden wurden in der LabDisk vorgelagert. Diese kann in einem kommerziellen zentrifugalen Thermocycler prozessiert werden (**Abb. 1**). Die PCR lief darin mit vergleichbarer Effizienz (**Abb. 2**) wie in einem Referenzsystem mit Standard-Reaktionsgefäßen und ermög-

lichte so die vollautomatische Genotypisierung von unterschiedlichen MRSA-Resistenz-Subtypen aus klinischen Proben.

Immunoassay für Östradiol-Nachweise

Die Integration von hochsensitiven Immunoassays in *lab-on-a-chip*-Systeme [6, 7] hat das Potenzial, aufwendige Hormon- und Proteinnachweise stark zu vereinfachen oder komplett zu automatisieren. Für die zentrifugal-mikrofluidische Plattform wurden zwei Module für den

kompletten Prozessablauf einer Diagnostik aus Vollblut erzeugt. Zunächst wurde eine Struktur für die Blutplasma-Separation einer Zehn-Mikroliter-Blutprobe bereitgestellt, die daraus vier Mikroliter (\pm sechs Prozent) Plasma abtrennt. Eine weitere Struktur ermöglicht die Automatisierung der notwendigen Binde-, Wasch- und Inkubationsschritte. Damit wurde ein kompetitiver *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) für Östradiol demonstriert. Für einen ersten Funktions-



▲ **Abb. 3:** Messwerte des kompetitiven Östradiol-Immunoassays. Die Signale sind auf den Maximalwert normiert und stellen daher relative Signale dar. Aufgrund der Signalgenerierung mittels Lumineszenz spricht man hierbei von relativen Lumineszenzeinheiten (*relative luminescence units*, RLU). Es wurden sechs verschiedene Östradiol-Konzentrationen auf der zentrifugal-mikrofluidischen Plattform (LabDisk) sowie einer Referenzmessung in einer Mikrotiterplatte vermessen und verglichen.

nachweis wurden auf der LabDisk sechs verschiedene Östradiol-Konzentrationen an zwei unterschiedlichen Tagen vermessen. Jeder Datenpunkt entspricht vier Replikaten jeder Konzentration in der LabDisk. Qualitativ entspricht der erzielte Signalverlauf der Referenzmessung in der Mikrotiterplatte (CLA-4664, DRG Instruments GmbH) (**Abb. 3**). Basierend auf Vorgaben der Food and Drug Administration (FDA) für Immunoassays konnte nur eine Nachweisgrenze (*limit of*

detection) von ca. 120 Pikogramm erreicht werden. Dies konnte insbesondere auf die noch sehr inhomogene Beschichtung der LabDisk mit Fänger-Antikörpern zurückgeführt werden. Jedoch ist bereits diese Nachweisgrenze ein akzeptabler Wert für einen Funktionsnachweis, für klinische Anwendungen muss das Beschichtungsprotokoll allerdings optimiert werden.

Zusammenfassung und Ausblick

Die gezeigten Beispiele für automatisierte und integrierte Genotypisierungen sowie Immunoassays zeigen das Potenzial des LabDisk-Konzepts. Dabei kann durch etablierte Komplettstrukturen bei bestimmten Assays ein erster Funktionsnachweis nach einigen Wochen bis wenigen Monaten erfolgen. Auch bei der Neuentwicklung mikrofluidischer Kartuschen für neue Anwendungen 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. Dies wird mittlerweile von einigen Unternehmen und Instituten auf verschiedenen Plattformen angeboten, wobei der Schwerpunkt des HSG-IMIT auf der LabDisk liegt. Diese bietet einen hohen Grad an Integration und eine einfache Handhabung. Zudem bieten sich eine Reihe von etablierten Laborgeräten (z. B. die Rotor-Gene Plattform) als Basis für die Laborautomatisierung mit mikrofluidischen „Upgrades“ in Form von Einweg-Testträgern an. So können Assay-Kit-Hersteller davon profitieren, dass biochemische Tests „funktional verpackt“ werden und die Verpa-

ckung zusammen mit einem Prozessierungsgerät gleich die Testdurchführung automatisiert. Universitäten erhalten ebenfalls einen einfachen Zugang zur *lab-on-a-chip*-Technologie und können neuartige Nachweisverfahren zusammen mit dem HSG-IMIT in ein *lab-on-a-chip*-Format überführen. ■

Danksagung

Die Autoren danken den folgenden Förderinstitutionen für die Förderung der vorgestellten Projekte: Der Europäischen Union mit dem 6. Forschungsrahmenprogramm (Fördernummer 037957) und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) (Fördernummer 16SV2347).

Literatur

- [1] Mark D, Haeberle S, Roth G et al. (2010) Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. *Chem Soc Rev* 39:1153–1182
- [2] Niemz A, Ferguson TM, Boyle DS (2011) Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases. *Trends Biotechnol* 29:240–250
- [3] Ducree J, Haeberle S, Lutz S et al. (2007) The centrifugal microfluidic bio-disk platform. *J Micromech Microeng* 17:103–115
- [4] Gorkin R, Park J, Siegrist J et al. (2010) Centrifugal microfluidics for biomedical applications. *Lab Chip* 10:1758–1773
- [5] Focke M, Stumpf F, Faltin B et al. (2010) Microstructuring of polymer films for highly sensitive genotyping by real-time PCR on a centrifugal microfluidic platform. *Lab Chip* 10:2519–2526
- [6] Lai S, Wang S, Luo J et al. (2004) Design of a compact disk-like microfluidic platform for enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal Chem* 76:1832–1837
- [7] Lee BS, Yang UL, Kim H-S et al. (2011) Fully integrated lab-on-a-disc for simultaneous analysis of biochemistry and immunoassay from whole blood. *Lab Chip* 11:70–78



Daniel Mark, Günter Roth, Roland Zengerle und Felix von Stetten (v. l. n. r.)

Korrespondenzadresse:

Daniel Mark
 Institut für Mikro- und Informationstechnik der Hahn-Schickard-Gesellschaft
 für angewandte Forschung e. V. (HSG-IMIT)
 Wilhelm-Schickard-Straße 10
 D-78052 Villingen-Schwenningen
 Tel.: 0761-203-7538
 Fax: 0761-203-7539
 daniel.mark@hsg-imit.de
 www.ioac-hsg-imit.de