



# Abschlussbericht

## Grundoperationen für Aufkonzentration und Aufschluss von Pathogenen aus komplexen Proben auf der zentrifugal-mikrofluidischen Plattform (KomPro)

AiF-Vorhaben-Nr: 16853 N  
Projektlaufzeit: 01.01.2011 – 31.12.2013

Projektleiter  
Marc Karle

Institut für Mikro- und Informationstechnik  
der Hahn-Schickard-Gesellschaft e.V.  
Wilhelm-Schickard-Str. 10  
D-78052 Villingen-Schwenningen

Tel.: +49 7721 / 943-0  
Fax: +49 7721 / 943-210  
Email: [info@hsg-imit.de](mailto:info@hsg-imit.de)  
Web: [www.hsg-imit.de](http://www.hsg-imit.de)



# 1. Inhaltsverzeichnis

<b>1. INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>- 2 -</b>
<b>2. FORSCHUNGSTHEMA.....</b>	<b>- 3 -</b>
<b>3. FORSCHUNGSZIEL .....</b>	<b>- 3 -</b>
<b>3.1. ANGESTREBTE FORSCHUNGSERGEBNISSE .....</b>	<b>- 3 -</b>
<b>3.2. INNOVATIVER BEITRAG DER ANGESTREBTEN FORSCHUNGSERGEBNISSE.....</b>	<b>- 3 -</b>
<b>4. ERZIELTE ERGEBNISSE .....</b>	<b>- 4 -</b>
<b>4.1. HOCHVISKOSE PROBEN .....</b>	<b>- 4 -</b>
<b>4.2. HOCHVOLUMIGE PROBEN .....</b>	<b>- 6 -</b>
<b>5. VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>- 8 -</b>
<b>6. FÖRDERHINWEIS .....</b>	<b>- 8 -</b>

## **2. Forschungsthema**

Lab-on-a-Chip Systeme versprechen die Miniaturisierung, Integration und Automatisierung von Diagnosen und Analysen in mikrofluidischen Plattformen. Dieses Versprechen scheitert jedoch häufig daran, dass im Laboralltag verwendete Proben wie hochviskoses Sputum oder große Volumina im Milliliter bis Literbereich nicht kompatibel zu mikrofluidischen Systemen sind. Um die Realisierung neuer Applikationen zu ermöglichen, sollten deswegen in diesem Projekt Grundoperationen für die Probenvorbereitung auf einer zentrifugal-mikrofluidischen Lab-on-a-Chip Plattform (LabDisk Plattform) geschaffen werden.

## **3. Forschungsziel**

Für die im Vorfeld durch Rücksprache mit Unternehmen als wichtig identifizierte Anwendungsfelder der Trinkwasseranalytik und des Nachweises von respiratorischen Krankheiten sollten Grundoperationen für die Probenvorbereitung implementiert werden. Das Probenmaterial war dabei zum einen Trinkwasser, das Mikroorganismen nur in extrem geringen Mengen enthalten darf. Hier musste die Probe also vor der weiteren Prozessierung zunächst physikalisch angereichert werden. Allein die zu analysierenden Volumina waren dabei eine Herausforderung. Zum anderen sollte die Homogenisierung und der Zellaufschluss für Sputum-Proben in mikrofluidischen Systemen erforscht werden. Hier waren das hochviskose Material sowie der Aufschluss von Bakterien die Themenstellung.

### **3.1. Angestrebte Forschungsergebnisse**

Das wissenschaftlich-technische Ziel der Forschungsarbeiten war die Integration der Probenvorbereitung für zwei hoch-anwendungsrelevante, aber bisher kaum mikrofluidisch handhabbare Proben. Die angestrebten Proben-Matrizen waren:

- Hochviskose Proben, insbesondere Sputum, sind für den Nachweis respiratorischer Krankheiten unverzichtbares Probenmaterial. Nach einer mikrofluidisch integrierten Aufreinigung kann gewonnene reine DNA/RNA dann nahtlos in existierende Strukturen zum Nachweis von Krankheitserregern mittels PCR überführt werden.
- Hochvolumige Proben mit geringer Konzentration an Mikroorganismen. Um sinnvoll die Versorgungswege mit Trinkwasser überwachen zu können oder auch Umweltproben zu nehmen, war es notwendig, die Aufkonzentration von Proben im Milliliter- bis Liter-Bereich zu integrieren.

### **3.2. Innovativer Beitrag der angestrebten Forschungsergebnisse**

Für den Einsatz von Lab-on-a-Chip Systemen als „point-of-care“ Analysesystem muss die Bedienung auch außerhalb von Laboren und unabhängig von komplexen zusätzlichen Vorbereitungsschritten möglich sein. Dabei ist die hochsensitive und spezifische PCR-basierte DNA-Analytik für Lab-on-a-Chip ein wichtiges Feld, jedoch fehlten integrierte Probenvorbereitungsmodule hierfür meist noch. Der Stand der

Technik von Lab-on-a-Chip Systemen wurde durch die angestrebten Forschungs- und Entwicklungsarbeiten deutlich erweitert. Diese Erweiterung bietet ein hohes Anwendungspotential.

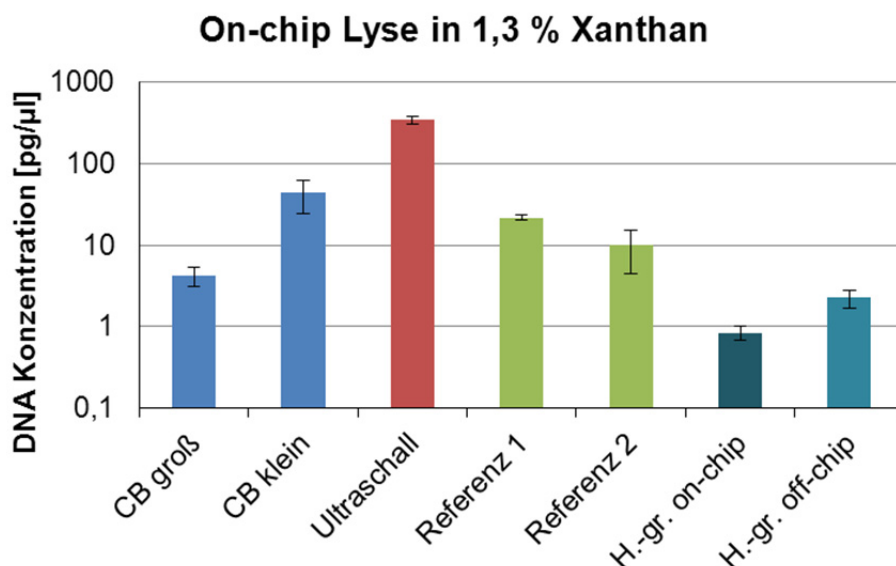
## 4. Erzielte Ergebnisse

Das Projekt war gemäß der angestrebten Forschungsergebnisse in zwei Forschungsschienen aufgeteilt. In der ersten Schiene wurden neue Einheitsoperationen hinsichtlich hochviskoser Proben erforscht. In der zweiten Schiene wurden parallel Einheitsoperationen zur Handhabung großvolumiger Proben untersucht. Der abschließende Funktionalitätsnachweis wurde direkt in den jeweiligen Arbeitspaketen nachgewiesen.

### 4.1. Hochviskose Proben

In einem ersten Schritt wurde eine hochviskose Referenzsubstanz gesucht, die reproduzierbare Bedingungen für Versuche zur Homogenisierung und Lyse von Keimen ermöglicht. Dabei wurde Xanthan identifiziert, ein Verdickungsmittel, das in der Lebensmittelindustrie beispielsweise bei Saucen eingesetzt wird. Bei geringen Scherraten weist Xanthan eine hohe Viskosität auf, die mit steigenden Scherraten sinkt. Je mehr Xanthan gelöst wird desto höher ist die Viskosität. Auf diese Weise lässt sich der gewünschte Viskositätsbereich durch den Anteil an Xanthan einstellen.

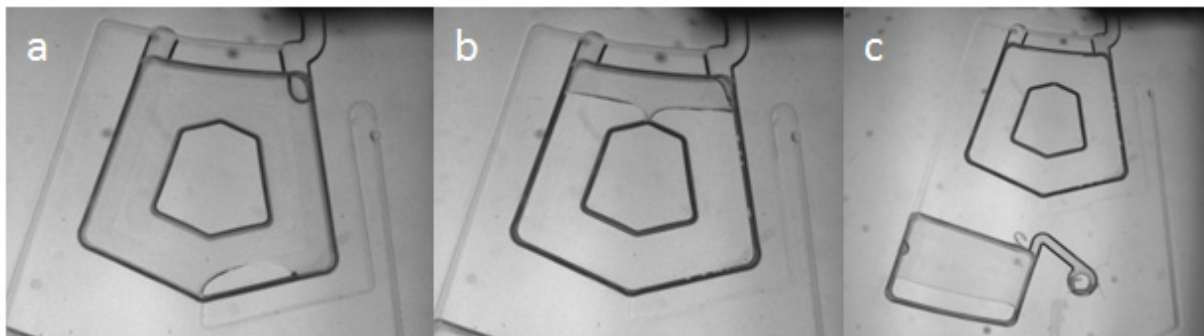
Als Lyse-Methoden wurden die „Cannon-Ball-Disk“, Ultraschall und ein chemischer Lyse-Puffer als Referenz verwendet. Die Cannon-Ball-Disk wurde im Projekt „Amplidisk“, gefördert durch die Baden-Württemberg Stiftung, entwickelt.



**Abbildung 1** Vergleich unterschiedlicher Lyse-Methoden auf der zentrifugalmikrofluidischen Plattform. Auf der „Cannon-Ball-Disk“ (CB) wurden sowohl große Silika-Partikel als auch kleine Partikel zur Zell-Lyse untersucht. Als Referenz wurde die Probe auf dem Chip mit Lysepuffer aufgeschlossen. Für den Hintergrund wurde die freie DNA ohne Lyse-Schritt aus den Proben isoliert.

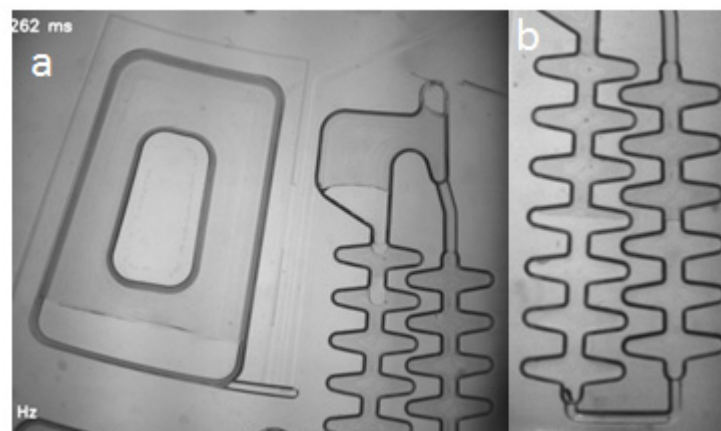
Die höchste Ausbeute an DNA konnte in dieser Versuchsreihe mit der Ultraschall-Lyse erzielt werden. Der Nachteil dieses Ansatzes ist, dass die Lyse nicht unter Rotation durchgeführt werden kann und dass eine Sonotrode in das Basisgerät integriert werden muss. Die Rotation der zentrifugalmikrofluidischen Plattform muss kurz angehalten und die Sonotrode auf die Lysekammer gepresst werden, um die Probe zu homogenisieren und aufzuschließen.

Da Sputum ein sehr breites Spektrum an Viskositäten abdeckt, stellte sich die Frage nach der Bestimmung der Viskosität der Probe. Daher wurde eine mikrofluidische Struktur zur Messung der Viskosität entworfen. Um mit einem bekannten Probenvolumen zu arbeiten wurde vor der Viskositätsmessung eine Metering-Struktur integriert (s. Abbildung 2).



**Abbildung 2** Blasenfreies Abmessen von 30  $\mu\text{l}$  Probe (Wasser) in der Meteringkammer: a) Initiales Befüllen der Meteringkammer, b) Meteringkammer beinahe komplett befüllt, c) Meteringkammer komplett gefüllt, überschüssiges Volumen wurde in die Überlaufkammer 1 transferiert.

Die Struktur wurde gefertigt und mit zwei Flüssigkeiten unterschiedlicher aber bekannter Viskosität fluidisch getestet. Die erste Flüssigkeit, Wasser, wies eine Viskosität von 1 mPas auf. Als zweite Flüssigkeit wurde eine Pufferlösung mit einer Viskosität von 1,6 mPas verwendet. Simulationen der Struktur mit diesen Flüssigkeiten ergaben ein transferiertes Volumen von 12,1  $\mu\text{l}$  für Wasser und 9,2  $\mu\text{l}$  für den Puffer.



**Abbildung 3** Transfer der Probe (Wasser) aus der Druckkammer in das Endreservoir mit Skala. a) während der Prozessierung, b) Füllstand im Endreservoir nach abgeschlossener Messung.

Experimentell konnten in drei Messungen  $6,8 \pm 0,4 \mu\text{l}$  Wasser transferiert werden. Erwartungsgemäß lag der Durchschnittliche Transfer des Puffers etwas niedriger bei  $5,7 \pm 0,3 \mu\text{l}$  (ebenfalls drei Experimente). Die experimentellen Ergebnisse weichen zwar von den Werten der Simulation ab liegen aber in der gleichen Größenordnung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Funktionstests erfolgreich durchgeführt werden konnten und die Funktionalität der neuen Struktur zeigen. Da sich die Struktur auch auf kleinere Probevolumina auslegen lässt, beispielsweise ein Probenvolumen von  $10 \mu\text{l}$  oder sogar nur  $5 \mu\text{l}$ , eröffnet sich hierdurch eine komplett neue Methode zur Bestimmung von Viskositäten in kleinen und sehr kleinen Volumina. Bisher wurden beim Stand der Technik meist mindestens  $1 \text{ ml}$  Probe benötigt. Einige sehr wenige kommerziell erhältliche Geräte arbeiten mit geringeren Probenvolumina, wobei die Untergrenze momentan bei  $100 \mu\text{l}$  liegt. Die erforderliche Probenmenge der neuen mikrofluidischen Struktur zur Viskositätsbestimmung liegt eine Größenordnung darunter und ermöglicht daher vor allem Messungen sehr kostbarer Proben, von denen meist nur wenige Mikroliter verfügbar sind.

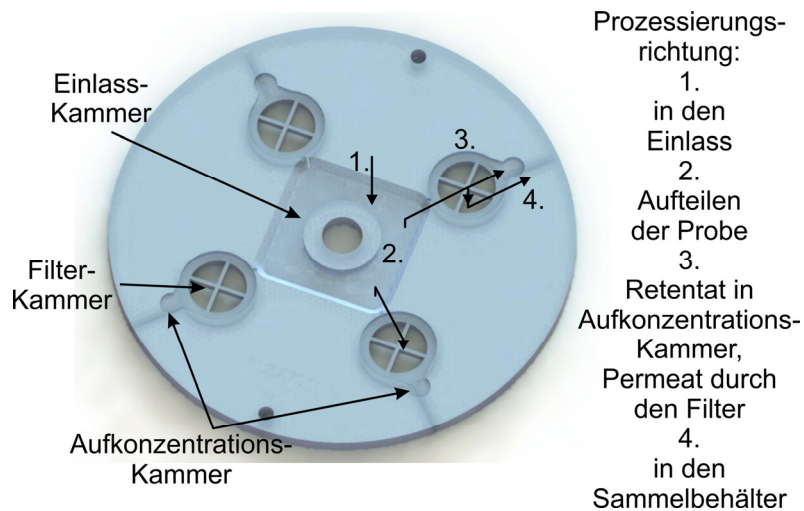
## 4.2. Hochvolumige Proben

Um großvolumige Proben auf der zentrifugal mikrofluidischen Plattform handhabbar zu machen, wurden Konzepte erarbeitet, die einen kontinuierlichen Probenauftrag ermöglichen. Die einfachste Variante der Implementierung ist eine mitrotierende Ring- oder Auffangstruktur, in die die Probe kontinuierlich eingetropft werden kann. Zusammen mit einem kontinuierlichen Probenauftrag musste auch eine kontinuierliche Entsorgung der auf dem Chip prozessierten Probe entwickelt werden, da Probenvolumina größer als ca.  $5 \text{ ml}$  nicht mehr sinnvoll in Kammern auf der zentrifugal mikrofluidischen Plattform aufgefangen werden können.



**Abbildung 4** Auffanggefäß zur kontinuierlichen Entsorgung der prozessierten Probe von der zentrifugal mikrofluidischen Plattform. Zusätzlich bietet das Auffanggefäß einen Abfluss (im Bild nicht gezeigt), um größere Volumina abzuleiten und kontrolliert zu Entsorgen. Zur Veranschaulichung wurde eine LabDisk inkl. Filter in das Auffanggefäß und den Messplatz eingebaut.

Der Stand der Technik zur Aufkonzentrierung von Keimen ist einerseits die Festphasenextraktion und andererseits die Filtration. Durch Einbringen eines Filters in eine mikrofluidische Kammer oder einen mikrofluidischen Kanal lässt sich der Ansatz der Filtration leicht umsetzen. Dabei ist darauf zu achten, dass der Filter dicht eingebracht werden kann, sodass die Probe durch den Filter und nicht durch eine undichte Stelle am Filter vorbei geleitet wird.



**Abbildung 5** Schema der Struktur zur kontinuierlichen Aufkonzentrierung. In eine um die Rotationsachse angeordnete Einlasskammer wird die Probe kontinuierlich aufgetropft und durch die quadratische Struktur der Einlasskammer auf die vier nachfolgenden Filterstrukturen aufgeteilt. Filterunterstützungen in den Filterkammern schützen die Filter bei hohen Belastungen längerer Prozessierungsdauern. Aufkonzentrierte und gefilterte Partikel und Bakterien werden vom Filter nach außen in die Aufkonzentrationskammern zentrifugiert, um die Filter frei zu halten und ein Verstopfen der Filter zu verhindern.

Als Filter wird eine Polykarbonat Track Etch Membran in die Struktur eingesetzt, da diese Membran durch ihre glatte Oberfläche die beste Ablösbarkeit der Keime für nachfolgende Prozessschritte verspricht. Die mikrofluidische Struktur weist als Besonderheit eine beidseitige Strukturierung auf. Die Probe wird unter Rotation der Disk von der Oberseite durch den Filter auf die Unterseite geschleudert.

Experimentell konnten 5 l Pufferlösung mit *E. coli* beimpft und kontinuierlich auf die LabDisk aufgegeben und prozessiert werden. Dabei konnten die Bakterien erfolgreich aufkonzentriert werden. Die Prozessierungsdauer für die großvolumige Probe von 5 l betrug 70 min. Nach der Prozessierung können die aufkonzentrierten Bakterien entweder auf der Aufkonzentrationskammer entnommen und außerhalb der LabDisk weiterverarbeitet werden oder sie können direkt auf der LabDisk in nachfolgende Strukturen übergeben werden.

## 5. Veröffentlichungen

Das Projekt und die Projektergebnisse wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

- Projektbeschreibung auf der Homepage des HSG-IMIT ([www.ioac-hsg-imit.de](http://www.ioac-hsg-imit.de))
- Präsentation des Projekts auf dem IGF-Tag 2011 am HSG-IMIT
- Patentanmeldung zur zentrifugalen Filtration 2012
- Präsentation der Module zur integrierten Probenvorbereitung auf der Medica 2012 in Düsseldorf
- Vorstellung des Projekts am Stand des HSG-IMIT auf der Analytika 2012 in München
- Darstellung des Projektfortschritts auf der Transducers 2013
- Patentanmeldung zur Viskositätsmessung auf der LabDisk 2013
- Vorstellung des Projekts am Stand des HSG-IMIT auf der Biotechnica 2013 in Hannover
- Präsentation des Projekts im Rahmen der Roadshow des HSG-IMIT auf der Biotechnica 2013 in Hannover
- Präsentation des Projekts im Rahmen der Roadshow des HSG-IMIT auf der  $\mu$ TAS 2013 in Freiburg

Nach der Projektlaufzeit:

- Vorstellung des Projekts am Stand des HSG-IMIT auf der Analytika 2014 in München
- Präsentation des Projekts im Rahmen der Roadshow des HSG-IMIT auf der Analytika 2014 in München

## 6. Förderhinweis

Das IGF-Vorhaben 16853 N der Forschungsvereinigung HSG-IMIT wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung und –entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Gefördert durch:



Bundesministerium  
für Wirtschaft  
und Energie

aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages