

Schlussbericht (zur Veröffentlichung)

zu IGF-Vorhaben Nr. 18412 N

Thema

Verpackungsplattform für die Automatisierung biochemischer Kits zur Nukleinsäureanalytik in Standard-Laborgeräten (AutoKit)

Berichtszeitraum

01.11.2014-31.12.2017

Forschungsvereinigung

Hahn-Schickard-Gesellschaft für angewandte Forschung e.V.

Forschungseinrichtung(en)

Hahn-Schickard-Gesellschaft für angewandte Forschung e.V. – Hahn-Schickard

13.07.2018

Stefan Burger

Ort, Datum

Name und Unterschrift aller Projektleiterinnen und Projektleiter der
Forschungseinrichtung(en)

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Energie

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

1. Durchgeführte Arbeiten und Ergebnisse

Übersicht über das Projekt

Zielsetzung

Ziel des Projektes war zu erforschen, ob eine kostengünstig herstellbare mikrofluidische Kartusche realisierbar ist, die es ermöglicht, ein vollständiges biochemisches Kit zur bead basierten DNA Extraktion unter Benutzung einer Standardlaborzentrifuge zu automatisieren. Dabei sollten alle benötigten Reagenzien in der Kartusche vorgelagert werden können und zusätzlich zur Extraktion der DNA auch die entsprechende Nachweisreaktion (qPCR) vollautomatisch angesetzt werden. Des Weiteren sollte auch sichergestellt werden, dass sich die entwickelte Kartusche prinzipiell eignet, um ohne oder mit nur geringfügigen Änderungen am Design Extraktionskits bzw. Nachweiskits verschiedener Hersteller zu automatisieren.

Darstellung der erzielten Ergebnisse

Auswahl des Zieles für die DNA Extraktion

Im Projektantrag waren die Pathogene „Legionellen aus Brauchwasser“ und „Zytomegalieviren aus Vollblut“ als mögliche Ziele für den biochemischen Nachweis angedacht. Früh im Projektverlauf wurde in der Diskussion mit dem projektbegleitenden Ausschuss aber klar, dass eine Fokussierung der Entwicklung auf ein einzelnes Ziel für die Analyse sinnvoll ist. Der Nachweis von Zytomegalieviren wurde dabei als weniger lohnend identifiziert. Dies liegt darin begründet, dass Zytomegalieviren in der Humandiagnostik relevant sind, was einen extrem stark regulierten Anwendungsbereich darstellt. Gleichzeitig ist der Markt für Humandiagnostik aufgrund seiner enormen Größe von extrem starkem Konkurrenz- und Preisdruck geprägt. Dies macht es schwer, mit einer neuen Technologie Fuß zu fassen. Der molekularbiologische Nachweis von Legionellen aus Brauchwasser ist andererseits ein kaum regulierter Bereich, in dem es darüber hinaus keine zufriedenstellende Lösung am Markt gibt. Der PA sah hier die Aussicht auf eine praxistaugliche Entwicklung mit einer Chance auf Markterfolg als deutlich höher an und hat deswegen empfohlen, diesen Nachweis im Projekt zu fokussieren, aber weiterhin ein generisches oder flexibel anpassbares Design der Kartusche anzustreben.

Arbeitsablauf und Grad der Automatisierung

Auf Anraten eines Mitglieds des PA wurde für die DNA Extraktion aus Brauchwasser das Kit *MagAttract PowerWater DNA/RNA Kit* verwendet (vor einer Akquisition durch Qiagen wurde dieses Kit von MO BIO unter dem Namen PowerMag Air & Water DNA/RNA Kit verkauft).

Dieses Kit ist speziell für die komplexe Brauchwassermatrix ausgelegt und beinhaltet einen speziellen Schritt zur Entfernung von Substanzen, die die Nachweisreaktion stören können (Inhibitoren).

Der Arbeitsablauf der gesamten Analytik unter Verwendung des Qiagen Kits kann in fünf Schritte unterteilt werden. Diese sind im Folgenden mit einer ungefähren Angabe der benötigten hands-on-time aufgeführt:

1. Probenahme von ca. 10 ml bis 1 l Flüssigkeit (5 min)
2. Lyse von gefilterten Mikroorganismen (5 – 10 min)
3. Vorbereitung des Lysats und DNA Extraktion (90 min)
4. Ansetzen der PCR (15 min)
5. Durchführung der PCR und Datenauswertung (15 min)

An dieser Stelle muss entschieden werden, welcher Grad der Automatisierung angestrebt wird. Die Filtration (1) von solch großen Flüssigkeitsmengen lässt sich nicht in einer mikrofluidischen Kartusche umsetzen, da der Platz in der Kartusche nicht dafür ausreicht. Die Lyse (2) der Mikroorganismen ist ebenfalls nicht integrierbar, da hierfür die mechanische Energiezufuhr durch einen Vortexer benötigt wird. Ebenfalls nicht in der Kartusche zu automatisieren ist die Durchführung der PCR da diese eine präzise Temperaturkontrolle und eine Fluoreszenzauslese benötigt, was mit der Verwendung einer Standardzentrifuge nicht vereinbar ist.

Die Punkte (3) und (4) hingegen, die ca. 75% der benötigten hands-on-time ausmachen und alle anfallenden komplizierten Prozessschritte mit Flüssigkeiten umfassen, können vollständig in der mikrofluidischen Kartusche umgesetzt werden. Der angestrebte Arbeitsablauf und die daraus abgeleitete Grobkonzeptionierung der Kartusche ist in Abbildung 1 graphisch dargestellt. Die Funktion der dargestellten Kartuschenkomponenten wird im Folgenden zusammengefasst und die erzielten Ergebnisse mit den im Antrag definierten Zielen abgeglichen.

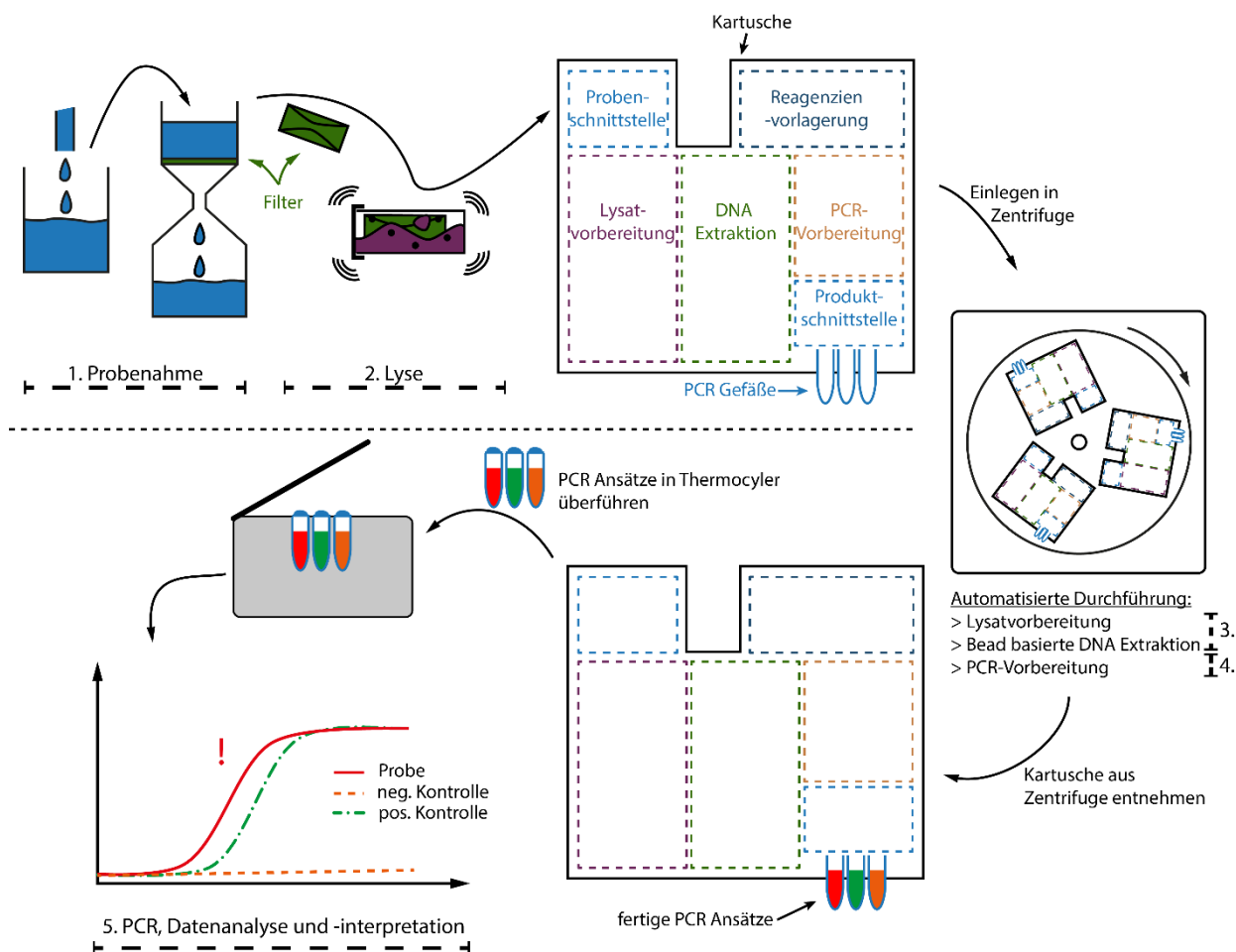


Abbildung 1: Arbeitsablauf beim Einsatz der AutoKit Kartusche zum Nachweis von DNA aus Brauchwasser. Die Probenahme (1) und die Lyse (2) werden manuell durchgeführt. Lysatvorbereitung, bead basierte DNA Extraktion (3) und PCR-Vorbereitung (4) geschehen vollautomatisch. Die fertigen PCR Ansätze können in einen Thermocycler überführt werden und aus den PCR Ergebnissen können Maßnahmen abgeleitet werden (5).

Etablierung des DNA-Extraktionsassays

Als erster Schritt in der Umsetzung einer Automatisierung des MagAttract PowerWater DNA/RNA Assays wurde der manuelle Arbeitsablauf im Labor etabliert und mit *E.coli* der Sicherheitsstufe S1 als Testorganismen biochemisch untersucht. Dies hat den Vorteil, dass die Arbeiten im normalen Laborbetrieb durchgeführt werden konnten während die Übertragbarkeit auf Legionellen aufgrund der prinzipiellen Ähnlichkeit der Bakterien gegeben ist. Grundsätzlich hat sich bei der Prozessierung gespikter Brauchwasserproben gezeigt, dass das Kit sich gut dazu eignet, DNA aus solcherlei Proben zu extrahieren. Die wichtigste Erkenntnis bezüglich des Assays war, dass die Dauer des bead beating für die Lyse einen entscheidenden Einfluss auf die DNA Ausbeute hat. Wird zu lange gevortext, so kommt es nach der Freisetzung der DNA zu einer starken Fragmentierung, was dazu führt, dass sie nicht mehr in der PCR nachgewiesen werden kann. Für den Fall von *E.coli*, wurde eine Zeit von 30 s als ideal für das bead beating befunden.

Übersicht über die Gesamtkartusche

Eine Konzeptionierungsphase zu Projektbeginn hatte zum Ergebnis, dass die ursprünglich angestrebten Außenmaße eines 50 ml Zentrifugenröhrchens (LabTube Konzept) für die Kartusche nicht umsetzbar waren. Dies ist darin bedingt, dass die benötigten fluidischen Operationen deutlich mehr Platz benötigen, als dieser Formfaktor bieten kann. Deswegen wurde ein neues Konzept entwickelt, bei dem mehr Platz für die Mikrofluidik geschaffen wurde. Die beiden Kartuschenkonzepte sind in Abbildung 2 vergleichend dargestellt. Ähnlich wie beim ursprünglichen LabTube Konzept wird die Reagenzienvorlagerung bei der AutoKit Kartusche in einem runden Revolver realisiert. Das Hauptteil der Kartusche ist azimuthal aufgeweitet und beinhaltet die Schnittstellen für die Probe und die PCR Gefäße sowie die mikrofluidischen Strukturen.

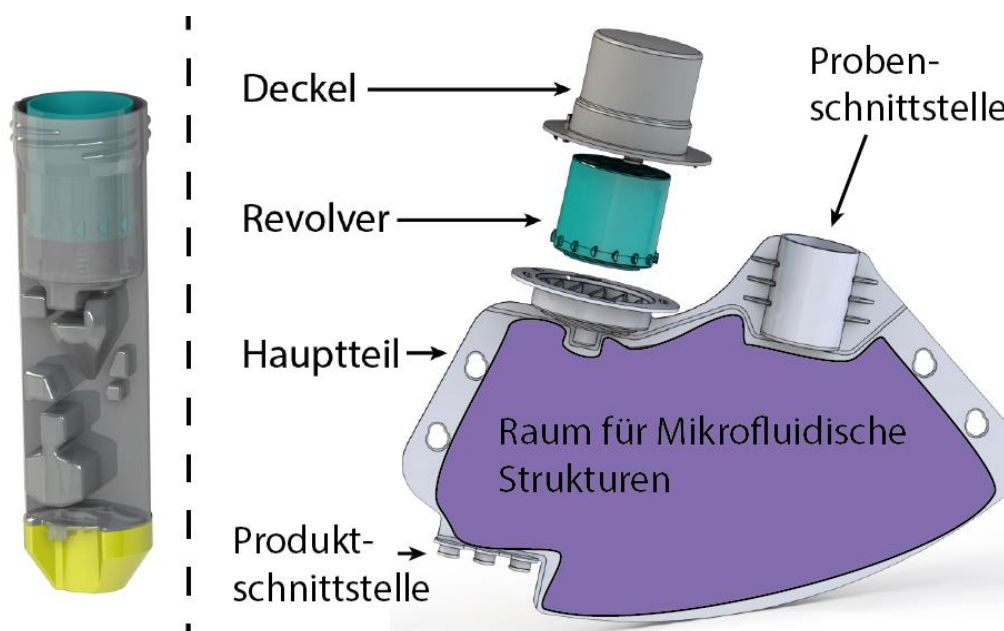


Abbildung 2:

Links: ursprünglich angedachtes Kartuschenkonzept im Format eines 50 ml Zentrifugenröhrchens (LabTube). Eine Integration des Assays war hier nicht möglich.

Rechts: Design der AutoKit Kartusche mit den Einzelkomponenten *Hauptteil*, *Revolver* und *Deckel*.

Da der neue Formfaktor nicht mehr mit einem Standardrotor für 50 ml Rörchen kompatibel ist, wurde in Zusammenarbeit mit einem Zentrifugenhersteller ein Spezialrotor spezifiziert und gefertigt. Dieser kann drei Kartuschen gleichzeitig aufnehmen. Dazu werden sie mit Haltelöchern auf entsprechende Aufnahmen gesteckt und etwas nach außen geschoben. Dadurch, dass die Aufnahmen einen pilzförmigen Querschnitt haben, werden die Kartuschen gegen ein Abheben unter Zentrifugation gesichert und sind zuverlässig mit dem Rotor verbunden.

Fertigung

Die Fertigung der drei Kartuschenbestandteile *Hauptteil*, *Revolver* und *Deckel* erfolgte mittels Spritzguss. Der Revolver wurde dabei von einem Rapid Tooling Dienstleister in Polypropylen (PP) gefertigt, da sich dieser Werkstoff in den vorangegangenen Projekten zur LabTube Technologie als geeignet erwiesen hat, um eine dauerhafte Siegelung mittels Heißsiegeln zu erreichen.

Der Deckel wurden von dem Hahn-Schickard Institut in Stuttgart gefertigt. Hierfür wurde Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymer (ABS) als Material gewählt, da sich dieses hervorragend für den Spritzguss eignet und ein kostengünstiges Polymer darstellt. Da der Deckel nicht in Berührung mit den Assayreagenzien kommt, waren biochemische Kompatibilität und die chemische Stabilität des Materials nicht relevant.

Das Hauptteil wurde ebenfalls von dem Hahn-Schickard Institut in Stuttgart gefertigt und in Cycloolefin-Copolymer (COC) ausgeführt. COC ist ein in der Mikrofluidik häufig verwendetes Polymer, das sich unter anderem durch die hervorragende Spritzgießbarkeit sowie die sehr gute Assayverträglichkeit und Chemikalienbeständigkeit auszeichnet.

Alle drei Kartuschenkomponenten konnten erfolgreich und in sehr hoher Qualität mittels Spritzguss hergestellt werden. Dies zeigt, dass das im Projekt entwickelte neuartige Kartuschenkonzept dazu geeignet ist, in einem Fertigungsverfahren für hohe Stückzahlen hergestellt zu werden, was für eine künftige Kommerzialisierung von hoher Bedeutung ist.

Erschließung von Brauchwasser als Probenmatrix

Industrielles Brauchwasser stellt für die Mikrofluidik vor allem aus zwei Gründen eine ungewöhnlich komplexe Probenmatrix dar:

1. Es werden große Probenmengen (mehrere zehn bis hundert Milliliter) benötigt um eine verlässliche Aussage über die Kontamination zu treffen.
2. Die enthaltenen Schwebstoffe können Kanäle verstopfen

Diese Umstände müssen entsprechend im Arbeitsablauf und in der Kartuschenkonstruktion berücksichtigt werden, um eine erfolgreiche Erschließung dieser neuen Probenmatrix zu erreichen. Das hohe Probenvolumen erfordert zwangsläufig eine Aufkonzentration der Zielorganismen, da es ausgeschlossen ist, eine zentrifugalmikrofluidische Kartusche umzusetzen, die 100 ml Probenvolumen intern verarbeiten kann. Im Projektantrag war hierfür eine zentrifugale Lösung vorgesehen, die die Zielorganismen sowie Schwebstoffe in einem Behältnis absedimentiert hätte und anschließend den manuellen Transfer eines kleineren Volumens in die Kartusche ermöglicht hätte. Dies hat sich jedoch im Projektverlauf als impraktikabel erwiesen, da eine entsprechende Vorrichtung und Schnittstelle einen erheblichen Aufwand dargestellt hätte. Gleichzeitig liegt mit dem Einsatz des Qiagen Kits eine etablierte Methode zur Vorkonzentration vor, bei der kommerziell erhältliche Filter genutzt werden, durch die mittels einer Pumpe Flüssigkeit gesaugt wird. Der anfallende Filterkuchen enthält die

Schwebteilchen und Zielorganismen und wird mitsamt dem Filter in einem dem Kit beiliegenden Gefäß (bead beating Röhrchen) in 1 ml Lysepuffer aufgenommen. Dies ermöglicht eine einfache Aufkonzentration der Zielorganismen und stellt bereits ein Gefäß bereit, das für den Probeneintrag in die Kartusche genutzt werden kann.

Die Probenschnittstelle der Kartusche verfügt über ein passendes Innengewinde, sodass der Nutzer nach erfolgter Lyse das bead beating Röhrchen direkt an die Kartusche anschrauben kann und somit die Probe in die Kartusche überführt, ohne die Flüssigkeit manuell handhaben zu müssen. Ein direkt an die Schnittstelle angeschlossener mikrofluidischer Filter ermöglicht unter Zentrifugation die Trennung von Lysat und Schwebstoffen. Durch die Porengröße des Filters werden Partikel mit einer Größe über 100 µm zurückgehalten, sodass ein weitgehend geklärtes Lysat in die Kartusche transferiert wird. Die möglicherweise noch enthaltenen kleineren Schwebstoffe liegen unter der Größe der angrenzenden mikrofluidischen Kanäle, sodass ein Verstopfen dieser Kanäle verhindert wird. Die Funktionalität dieses Filters konnte erfolgreich mit verschiedenen von einem Mitglied des PA bereitgestellten Brauchwasserproben gezeigt werden.

Lysataufbereitung

Ein notwendiger Schritt für die DNA Extraktion aus Brauchwasser mit dem Qiagen MagAttract PowerWater Kit ist die Vorbehandlung des Lysats zur Entfernung von Störstoffen, die die Nachweisreaktion inhibieren können. Es wurde eine mikrofluidische Struktur ausgelegt, die diese Prozesskette vollständig automatisiert. Dies umfasst die folgenden Prozessschritte: Transfer des geklärten Lysats in eine Mischkammer, Mischen des Lysats mit einer Pufferlösung zur Entfernung von Inhibitoren, Absedimentieren von Schwebstoffen, Transfer des gereinigten Überstandes in eine zweite Kammer, erneutes Absedimentieren von verbleibenden Schwebstoffen und Transfer von 450 µl Flüssigkeit in das nächste fluidische Modul.

Die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass die mikrofluidischen Schalt- und Pumpschritte zuverlässig funktionieren, auch wenn die Drehfrequenz und die Beschleunigungswerte verändert werden.

Die biochemische Leistung dieses Moduls wurde untersucht, indem Proben mit *E.coli* gespiked wurde und der Schritt der Lysatvorbereitung automatisiert auf entsprechenden Teststrukturen durchgeführt wurde. Anschließend wurde die DNA aus dem Lysat manuell extrahiert und die Ausbeute mit einer vollständig manuell durchgeführten Extraktion verglichen. Es zeigte sich hierbei kein signifikanter Unterschied in der Menge an extrahierter DNA.

Beadbasierte DNA Extraktion

Ein wichtiges Ziel des Projektes war die Umsetzung eines bead basierten DNA Extraktionsassays in einer LabTube Kartusche. Der Hintergrund ist, dass bei den zuvor verwendeten säulchenbasierten Aufreinigungen die durch die verwendete Standardzentrifuge limitierte Drehzahl dazu führt, dass die Flüssigkeiten nicht vollständig durch die Säulchen gepresst werden und die Zuverlässigkeit der Extraktion leidet. Bei einem bead basierten Assay sind kleinere Drehzahlen ausreichend, da lediglich die relativ dichten Mikropartikel mittels Sedimentation von der umgebenden Flüssigkeit getrennt werden müssen.

Die mikrofluidische Struktur für die Automatisierung der bead basierten DNA Extraktion besteht im Wesentlichen aus einer Mischkammer in der die Beads mit den Pufferlösungen mittels eines

Gasblasenmischers gemischt werden können. Nach Ausschalten des Mischers können die Beads durch Zentrifugation von dem Puffer getrennt werden und der Überstand kann durch einen mikrofluidischen Schalter gezielt in eine Kammer für Abfallflüssigkeiten oder, im Fall des Eluats, in die PCR Vorbereitungsstruktur geleitet werden. Durch automatische Zugabe der Puffer nach erfolgtem Transfer des Überstandes kann so schrittweise die gesamte DNA Extraktion durchgeführt werden.

Die fluidische Funktionalität dieser Struktur wurde im Detail untersucht um die Robustheit gegenüber Schwankungen im Flüssigkeitsvolumen, der Viskosität und der Drehfrequenz zu analysieren. Es stellte sich heraus, dass der mikrofluidische Schalter für den Transfer der Abfallflüssigkeiten mindestens im Viskositätsbereich von 4-8 mPas und im Volumenbereich von 400-1000 µl funktional ist. Des Weiteren sind Frequenzschwankungen um einige Hz unkritisch für die Funktionsfähigkeit, was im zu erwartenden Genauigkeitsbereich einer Laborzentrifuge liegt. Dies ist eine wichtige Erkenntnis im Hinblick auf das im Projektantrag angestrebte Ziel eine universelle Plattform für die DNA Aufreinigung zu schaffen. Die genannten Werte für Viskosität und Volumen sind im typischerweise zu erwartenden Bereich für kommerzielle DNA Extraktionskits, sodass die hier entwickelte Struktur prinzipiell ohne Veränderung auch für die Prozessierung anderer bead basierter DNA Extraktionskits einsetzbar ist.

Im Falle des Elutionspuffers ist die Funktionalität mindestens bis hinab zu einer Viskosität von 1 mPas und einem Volumen von 100 µl gegeben. Dies ist ebenfalls mit typischen kommerziellen Extraktionskits kompatibel, da diese als Elutionspuffer in der Regel Wasser einsetzen (das eine Viskosität von 1 mPas aufweist) und das Volumen typischerweise bei circa 100 µl liegt.

Automatisierte PCR Vorbereitung

Ein Ziel des Projektes war, das Ansetzen der Nachweisreaktion für die extrahierte DNA in der Kartusche durchzuführen, sodass der Nutzer lediglich die befüllten PCR Rörchen abnehmen und in einen Thermocycler überführen muss. Diese Aufgabe lässt sich in zwei Teilaufgaben gliedern: Die Entwicklung einer Schnittstelle, die das reversible Befestigen der PCR Rörchen an der Kartusche ermöglicht und das Auslegen einer mikrofluidische Struktur, die das Aliquotieren der Flüssigkeiten durchführt.

Die PCR Rörchen werden mittels einer Presspassung an die Kartusche angesteckt und sind über die entwickelte Schnittstelle mit dem fluidischen Netzwerk gekoppelt. Die Rörchen können mit gefriergetrockneten PCR Reagenzien vorbefüllt werden, sodass nur noch ein flüssiger Mastermix oder Wasser hinzugegeben werden muss um die PCR vorzubereiten. Zu einem der Rörchen wird noch zusätzlich ein Teil des extrahierten Eluats zugegeben. Das Aliquotieren dieser Flüssigkeiten erfolgt vollautomatisch mittels geeigneter mikrofluidischer Strukturen. Die aliquotierten Flüssigkeitsmengen liegen in der aktuellen Auslegung innerhalb von 10% der Sollwerte, was laut Einschätzung eines Herstellers von qPCR Kits ausreichend für das korrekte Funktionieren der Nachweisreaktion ist.

Durch die Möglichkeit, die in den Rörchen vorgelagerten PCR Reagenzien frei zu wählen, ist eine Anpassung der Kartusche an einen anderen PCR Assay sehr einfach. Zu beachten ist dabei, dass die mittels Meteringfingern abgemessenen Flüssigkeitsmengen nicht durch Prozessparameter anpassbar sind. Man ist also mit einem Design der Kartusche auf das Volumen des PCR Ansatzes festgelegt. Typische PCR Kits benutzen aber ohnehin in der Regel eine standardisierte Größe des Ansatzes (hier: 20 µl) sodass dies nur eine geringfügige Einschränkung darstellt.

Die Stabilität der Verbindung der PCR-Röhrchen und der Kartusche wurde experimentell untersucht, indem die Röhrchen mit 200 µl Flüssigkeit befüllt, an die Kartusche angesteckt und zentrifugiert wurden. Getestet wurde bis zu einem Wert der Zentrifugalkraft der 30% über der zu erwartenden Maximalbelastung liegt. Hierbei wurde keine Ablösung eines der Röhrchen festgestellt.

Reagenzienvorlagerung und -freisetzung

Reagenzienvorlagerung und -freisetzung ist generell eines der herausforderndsten Probleme der Mikrofluidik. Für die LabTube-Kartusche und die daraus abgeleitete AutoKit-Kartusche konnte es durch den Einsatz der LabTube Mechanik gelöst werden. Diese ermöglicht, eine Vielzahl von Flüssigreagenzien in einem Revolver aus Kunststoff vorzulagern, der mit einer durchstechbaren Aluminiumfolie gedeckelt ist. Der Revolver ist auf einer Feder gelagert und kann durch Änderungen der Zentrifugalkraft gezielt bewegt werden. Durch ein geeignetes Frequenzprotokoll und ein Zusammenspiel mehrerer Komponenten der Mechanik kann so eine programmierte Freisetzung der Reagenzien erreicht werden. Im Rahmen des Projektes AutoKit wurde die klassische LabTube Mechanik dahingehend weiterentwickelt, dass lediglich ein bewegliches Teil (der Revolver) benötigt wird um diese Funktionalität zu erreichen. Dies vereinfacht die Herstellung und den Zusammenbau im Vergleich zu klassischen LabTube Mechanik, die mindestens zwei bewegliche Teile erfordert.

Die überarbeitete LabTube Mechanik ermöglicht in der vorliegenden Auslegung Vorlagerung und Freisetzung von 14 Flüssigreagenzien auf 5 verschiedenen fluidischen Pfaden, was für eine vollintegrierte mikrofluidische Kartusche einen sehr hohen Wert darstellt. Aufgrund der Flexibilität dieses Ansatzes kann das Vorlagerungsmodul leicht an andere Flüssigkeitsmengen und eine andere Anzahl an Pufferlösungen angepasst werden.

Etablierung eines PCR Assays und Vorlagerung der benötigten Reagenzien

Im Projektverlauf wurde ein PCR Assays für den Nachweis von Legionellen im Labor von Hahn-Schickard etabliert und Methoden zur Vorlagerung der Reagenzien untersucht.

Hierbei wurde zum einen das PCR System Diarella PanLeionella von Gerbion und zum anderen ein 5s PCR System aus der Literatur eingesetzt. Beide PCRs haben mit einem flüssigen Mastermix (Bioline SensiFAST Probe no-ROX) unter Einsatz von quantifizierter Standard DNA eine sehr hohe Sensitivität von bis zu 0,5 DNA Kopien pro Reaktion gezeigt. Der Bioline Mastermix kann prinzipiell im Revolver vorgelagert, ist aber generell bei -20°C zu lagern, was mit den restlichen Assayreagenzien unvereinbar ist. Deswegen wurde die Stabilität des Mastermixes bei Raumtemperatur untersucht und im Zeitraum von 3 Monaten keine Verschlechterung der Sensitivität festgestellt. Um die benötigten Primer und Probes ebenfalls in der Kartusche vorzulagern, wurde das Eintrocknen dieser Oligonukleotide mit PVA und Trehalose getestet. Dies hatte ebenfalls keinen merklichen Einfluss auf die Sensitivität des Assays unter Einsatz des flüssigen Mastermix.

Generell ist die Vorlagerung des Mastermixes in Form eines Lyophilisates der Vorlagerung im flüssigen Zustand vorzuziehen, da dies die stabile Lagerung bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von einem Jahr ermöglicht. Deshalb wurden verschiedene lyophilisierte Mastermixe

zusammen mit den zwei PCR-Systemen getestet. Hierbei hat sich herausgestellt, dass die Lyophilisate von GeneOn, Jenabioscience und GE Healthcare für die verwendeten PCR Systeme ungeeignet sind, da die Performance der PCR sichtbar verschlechtert wurde. Die Lyophilisate von Fluorogenics hingegen haben gute Ergebnisse gezeigt. Im Fall der PCR von Gerbion wurde die Sensitivität im Vergleich zum flüssigen Mastermix nur unwesentlich verschlechtert. Die 5s PCR wurde stärker negativ beeinflusst, sodass ein Nachweis von DNA nur noch ab mindestens 50 Kopien pro Reaktion möglich war.

Die Kombination aus lyophilisiertem Mastermix und getrockneten Primern und Probe hat jedoch auch im Fall der PCR von Gerbion zu einer deutlichen Verschlechterung der Performance geführt, sodass in diesem Fall nur DNA Mengen von mehr als 50 Kopien pro Reaktion nachgewiesen werden konnten.

Um dieses Problem möglicherweise zu lösen, wurden bei Fluorogenics speziell hergestellte Lyophilisate beschafft, die schon die benötigten Primer und Probe beinhalten. Die Tests ergaben jedoch, dass auch diese Lösung keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefert und die PCR deutlich schlechter läuft als mit flüssigem Mastermix. Abschließend kann festgestellt werden, dass nach aktuellem Stand die Kombination von flüssigem Mastermix und getrockneten Primern und Probe am sinnvollsten ist.

Biochemische Funktionalität der Kartusche

Die biochemische Funktionalität der Kartusche wurde getestet, indem drei von einem Mitglied des PA bereitgestellte und sterilisierte Brauchwasserproben mit 10^5 *E.coli* pro 50 ml versetzt wurden. Aus diesen Proben wurde dann in dreifacher Durchführung DNA vollautomatisch mit der Kartusche extrahiert. Parallel wurde aus identisch vorbereiteten Proben manuell DNA extrahiert. Es zeigt sich, dass die DNA Extraktion in allen Fällen funktioniert und die unterschiedlichen Brauchwasserproben keinen Einfluss auf das Ergebnis haben. Die Ausbeute bei vollautomatischer Prozessierung in der Kartusche beträgt im Mittel $(2,3 \pm 1,3)$ pg/ μ l während die manuelle Prozessierung im Mittel eine Ausbeute von $(5,4 \pm 1,2)$ pg/ μ l erreicht. Die relativ hohen Standardabweichungen zeigen aber, dass die Messergebnisse auch für die manuelle Prozessierung relativ stark schwanken, was alleine schon durch die fehlerbehaftete Quantifizierung der Mikroorganismen bedingt ist. Nichtsdestotrotz zeigt sich im Trend, dass die Kartusche weniger DNA Ausbeute bietet als die manuelle Aufreinigung.

Der genaue Grund für dieses Verhalten konnte im Verlauf des Projektes nicht abschließend geklärt werden, da es eine Vielzahl von möglichen Einflussfaktoren gibt, die sich aber nur schwer experimentell fassen lassen, da die Kartusche unter Rotation in der Standardzentrifuge nicht beobachtet werden kann.

Für eine Prozessierung von Legionellen wird ein prinzipiell ähnliches Verhalten erwartet, da es sich dabei ebenfalls um gram negative Bakterien handelt, die nicht deutlich schwerer als *E.coli* lysiert werden können sollten. Aufgrund der deutlich anspruchsvolleren Kultivierung und der höheren nötigen Sicherheitsvorkehrungen wurde an dieser Stelle deswegen auf einen Test mit Legionellen verzichtet.

Fazit

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die im Antrag definierten Ziele weitgehend erreicht wurden. Es wurde eine mikrofluidische Kartusche entwickelt, hergestellt und getestet, die die folgenden innovativen Merkmale aufweist:

- Vollständige Automatisierung einer bead basierten DNA Extraktion in einer Standardzentrifuge
- Integration benutzerfreundlicher Schnittstellen für Probenzugabe und Produktentnahme
- Verzicht auf manuelle Pipettierschritte
- Vollständige Vorlagerung und programmierte Freisetzung aller benötigten Assayreagenzien
- Flexibles Design, das es ermöglicht, prinzipiell auch andere Assaykits zu integrieren

Die DNA Ausbeute des automatisierten Prozesses liegt bei ca. 40% im Vergleich zur manuellen Ausbeute. Die genauen Gründe für diese Diskrepanz konnten im Projektverlauf nicht bestimmt werden. Da beim Nachweis von Legionellen eine semi-quantitative Bestimmung der Keimzahl ausreichend ist, könnte aber auch die aktuelle Kartusche schon einen wertvollen Beitrag zur Detektion liefern. Nichtsdestotrotz sollte perspektivisch weiter an der Thematik geforscht werden, um die Ausbeute auf das Niveau der manuellen Prozessierung anzuheben.

2. Wissenschaftlich-technischer und wirtschaftlicher Nutzen der Ergebnisse sowie Innovativer Beitrag und industrielle Anwendungsmöglichkeiten der Ergebnisse

Der wissenschaftlich-technische Nutzen der erzielten Ergebnisse ist als hoch einzustufen. Es wurden eine Vielzahl von technischen Innovationen im Bereich der zentrifugalen Mikrofluidik entwickelt, die das Forschungsfeld bereichern können. Hierzu zählen die fertigungsoptimierte Vorlagerung und gezielte Freisetzung einer Vielzahl von Flüssigreagenzien, die Umsetzung eines bead basierten Assays auf einer Standardlaborzentrifuge sowie die weitere Etablierung des gasblasenbasierten Mischens als eine vielseitige Mischmethode für die zentrifugale Mikrofluidik. Des Weiteren wurde mit industriellem Brauchwasser eine bisher weitgehend unerschlossene Probenmatrix für die zentrifugale Mikrofluidik zugänglich gemacht. Die hierfür entwickelten Konzepte wie die Schnittstelle zu Standardprobegefäßen und der integrierte mikrofluidische Filter können als Ausgangspunkt benutzt werden für die Entwicklung künftiger Kartuschen für andere komplexe Proben wie Gewebe- oder Bodenproben.

Ein wirtschaftlicher Nutzen insbesondere für KMU liegt darin, dass die entwickelte Kartusche ohne größeren Aufwand als generische Plattform für bead-basierte DNA Aufreinigungen und Erzeugen eines PCR Ansatzes gestaltet werden kann. Dies ermöglicht es KMU aus dem Bereich der Assayentwicklung ihren Assay kostengünstig zu automatisieren, ohne die vollständige Entwicklung einer mikrofluidischen Kartusche zu finanzieren.

Kann die konkret entwickelte Kartusche für das Prozessieren von Brauchwasserproben erfolgreich am Markt platziert werden, eröffnet dies neue Anwendungsmöglichkeiten für die molekularbiologische Überwachung von Brauchwassersystemen. Dienstleister, die eine Überwachung und Dekontamination anbieten, sind so nicht mehr darauf angewiesen beim Kunden Proben zu nehmen, diese in ihr Labor zu schaffen, dort zu verarbeiten und zu einem späteren Zeitpunkt die ggf. nötige Dekontamination durchzuführen. Stattdessen kann der Mitarbeiter, der die Probe nimmt, ohne größere Kenntnisse von molekularbiologischen Arbeitsabläufen die vollständige Analytik vor Ort mit begrenzter Ausstattung durchführen und sofort auf die Ergebnisse reagieren. Dies spart Kosten und ermöglicht eine engmaschigere und schnellere Kontrolle von Brauchwassersystemen um möglicherweise tödlich verlaufende Krankheitsausbrüche aktiv vorzubeugen.