

Integration, Automatisierung, und Parallelisierung von Silika-basierten Nukleinsäure-Extraktionen mit dem virtuellen Coriolis-Schalter

Dipl.-Ing. Stefan Haeberle¹, Dipl.-Ing. Sarah Pausch¹, Robert Burger¹, Dipl.-Biol. Sascha Lutz¹, Dr. Felix von Stetten², Prof. Dr. Roland Zengerle^{1,2}, PD Dr. Jens Ducreé¹

¹Institut für Mikro- und Informationstechnik der Hahn-Schickard-Gesellschaft (HSG-IMIT), Wilhelm-Schickard-Straße 10, 78052 Villingen-Schwenningen

²Universität Freiburg, Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK), Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung, Georges-Koehler-Allee 106, 79110 Freiburg

Kurzfassung

In dieser Arbeit wird ein mikrofluidisch integriertes und automatisiertes Protokoll zur Extraktion von Nukleinsäuren präsentiert. Die Flüssigkeiten werden mittels der Zentrifugalkraft durch rotierende Mikrokanäle transportiert. Die zentrale Einheitsoperation für eine saubere räumliche Trennung von biologischer Probe und der aufgereinigten DNA-Lösung ist ein fluidischer Schalter, der eine Querkontamination ausschließt. Dieser Schalter basiert auf der von der Coriolis-Scheinkraft bewirkten Ablenkung von Flüssigkeitstropfen, während sie frei durch eine luftgefüllte Kammer fliegen. Aufbauend auf dem Coriolis-Schalter wird ein komplettes Extraktionsprotokoll vorgestellt, welches auf der reversiblen Anlagerung von DNA-Molekülen an eine Silika-Festphase basiert. Auf 11 mg Silika-Partikeln, welche in die Mikrokanäle integriert werden, können bis zu 0.7 µg aufgereinigter DNA mit einer Ausbeute von 16 % extrahiert werden. Die aufgereinigte DNA kann entweder in ein Reservoir auf der Fluidik-Cartridge, oder in Standard Eppendorf-Tube auf einem Ausschwingrotor gesammelt werden.

1 Einleitung

Die molekulare Diagnostik ist ein stark wachsender Teilbereich der in-vitro Diagnostik und birgt ein großes Potential für die Zukunft. Um Nukleinsäuren zu analysieren müssen diese allerdings zunächst aus ihrem biologischen Umfeld (z.B. den Zellen des Blutes) extrahiert werden.

Die Qualität der Aufreinigung und Aufkonzentration von Nukleinsäuren aus biologischen Proben hat einen entscheidenden Einfluss auf alle nachgeschalteten genetischen Testverfahren. Etablierte Verfahren basieren zumeist auf der durch spezielle Puffer regulierbaren Adsorption und Desorption von Nukleinsäuren an Silika Oberflächen [1].

Nach einem chemischen Zellaufschluss werden die freigesetzten Nukleinsäure-Moleküle selektiv an dieser stationären Phase gebunden, gewaschen und in ein Reaktionssäulchen eluiert. Die Automatisierung und Parallelisierung der herkömmlichen Methode erfordert einen vergleichsweise hohen apparativen Aufwand.

In der vorgestellten Arbeit wird ein neuer Ansatz zur Automatisierung anhand eines integrierten Flüssigkeitsschalters vorgestellt und experimentell verifiziert. Das auf Zentrifugalkräften beruhende Lab-on-a-Chip System kommt dabei ohne bewegliche Mikroteile oder aufwendige fluidische Schnittstellen aus.

2 Funktionsprinzip

Die zentrifugale Mikrofluidik-Struktur für die DNA-Extraktion ist in **Bild 1** dargestellt. Silika-Partikel werden am radialen Ende einer mikrofluidischen Extraktionskammer mittels einer geometrischen Stufe aufgestaut.

Hinter der Festphase werden die Flüssigkeiten an einer hydrophob beschichteten Düse vertropft und „fallen“ anschließend unter dem Einfluss der künstlichen Gravitation unter Rotation in eine luftgefüllte Kammer. Darin werden die Tropfen im Freiflug von der Coriolis-Scheinkraft entgegen der jeweiligen Drehrichtung abgelenkt.

In einer ersten Drehrichtung lassen sich somit die ersten beiden Liquida (Probe und Waschpuffer) räumlich von der anschließend bei entgegengerichtetem Drehsinn fließenden Eluat trennen. Somit wird eine Querkontamination verhindert und eine hohe Reinheit der aufgereinigten Lösung gewährleistet.

Das Eluat kann entweder (wie in **Bild 1**, rechts dargestellt) zur Weiterverarbeitung in ein Reservoir auf der rotierenden Cartridge überführt, oder über einen radial nach außen führenden Kanal in ein auf einem speziellen Rotor freischwingendes Eppendorf-Tube ausgestoßen werden.

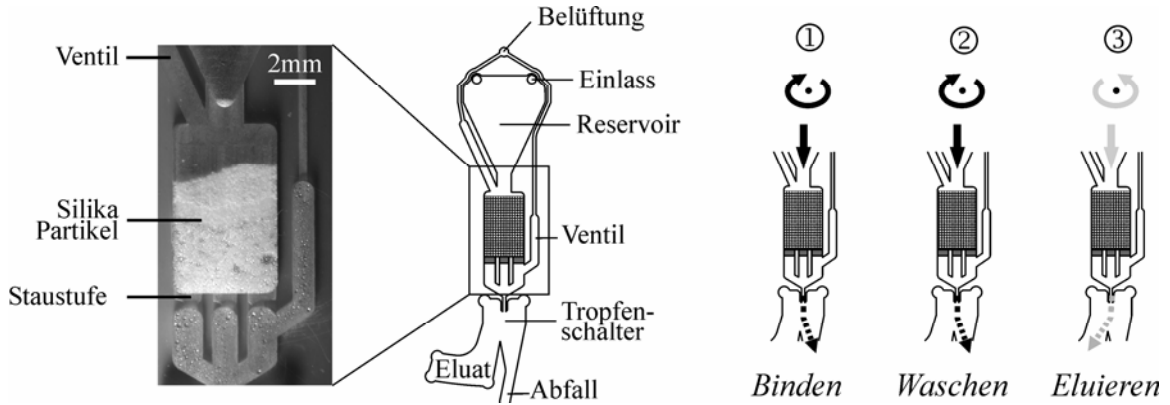


Bild 1. Layout der mikrofluidischen Struktur für die zentrifugale DNA-Extraktion. Silika-Partikel werden an einer geometrischen Staustufe am radial außen liegenden Ende einer Extraktionskammer aufgestaut. Von dort wird die Flüssigkeit zum Tropfen-Schalter geleitet, an dessen hydrophober Düse sich einzelne Tropfen bilden. Diese Tropfen „fallen“ aufgrund der künstlichen Gravitation unter Rotation in eine gasgefüllte Kammer und werden in Abhängigkeit vom Drehsinn abgelenkt. Das komplette Protokoll zur Nukleinsäure-Extraktion besteht - wie in der schematischen Skizze rechts dargestellt- aus dem Binde-, Wasch- und Eluier-Schritt.

3 Der Coriolis-Schalter

Die prinzipielle Möglichkeit, zentrifugal geförderte Flüssigkeitsströme anhand der Corioliskraft zwischen zwei Reservoiren zu schalten, wurde bereits früher gezeigt [2]. Dieses Prinzip wurde nun auf kleinere Flussraten erweitert, indem der kontinuierliche Strom an einer hydrophoben Düse in einzelne Tropfen zerteilt, und anschließend in einer luftgefüllten Kammer aufgrund der Coriolis-Scheinkraft abgelenkt wird [3].

Das Funktionsprinzip dieses „Tropfen-Schalters“ ist in **Bild 2, A** dargestellt. Die Flugbahn der Tropfen ist durch eine Überlagerung mehrerer stroboskopischer Aufnahmen visualisiert. In Abhängigkeit der Drehrichtung werden die Tropfen aufgrund der Coriolis-Kraft (f_c) entweder nach rechts (Rotation im Uhrzeigersinn) oder links (Rotation gegen den Uhrzeigersinn) abgelenkt.

Dieses Prinzip wird zum 100%-igen (also binären) Schalten zwischen zwei nachgelagerten Reservoiren genutzt (siehe **Bild 2, B**).

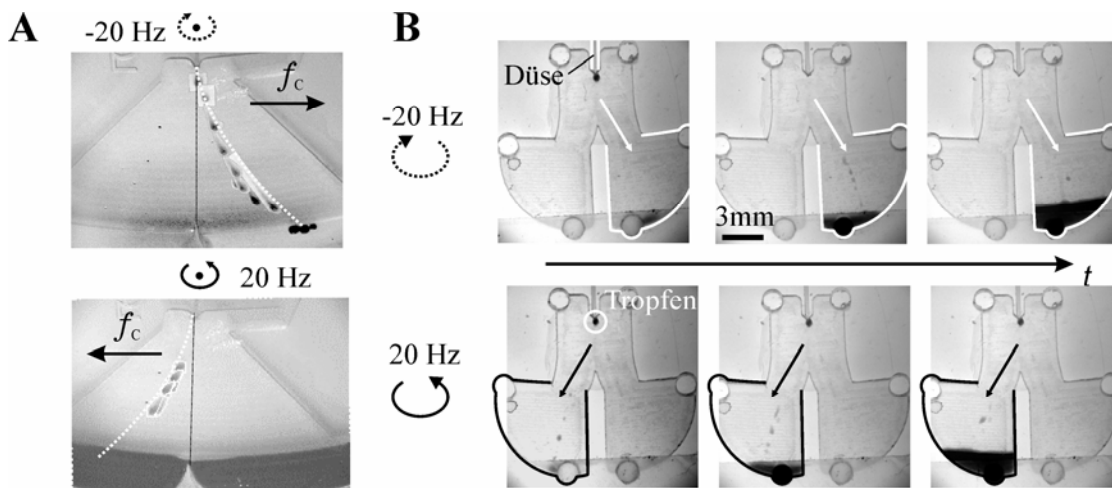


Bild 2. Funktionsprinzip des Coriolis Tropfen-Schalters. **A:** visualisierte Flugbahn der Tropfen mittels überlagerter Stroboskopbilder. Am radial äußeren Rand der luftgefüllten Kammer, fallen die Tropfen in eine Öl-Phase um den Auftreffpunkt zu ermitteln. **B:** 100% verlässliches Schalten der Flüssigkeit in das rechte (Rotation im Uhrzeigersinn, oben) oder linke (Rotation gegen den Uhrzeigersinn, unten) Reservoir über die Zeit t .

4 Kontrolle der Flussraten

Kontrollierte Flussbedingungen durch die aufgestauten Silika-Partikel (Durchmesser ca. 110 μm) sind Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Extraktion. Insbesondere während des Binde- und Eluierstrettes (siehe **Bild 1**) muss die Aufenthaltszeit der Flüssigkeit innerhalb der Extraktionskammer an die Anlagerung bzw. Ablösung der DNA Moleküle an die Silika-Oberfläche angepasst werden.

Die Flussrate bei unterschiedlichen Drehfrequenzen wurde über die Beobachtung der zeitlichen Entleerung des Reservoirs gemessen. Die in **Bild 3** dargestellten Ergebnisse zeigen den typischen parabolischen Verlauf zentrifugal getriebener Flüsse bis zu einer Flussrate von ca. 13 $\mu\text{L/s}$ bei 40 Hz. Diese hohen Flussraten sind für die Waschschrirte während der Extraktion interessant, da sie einen schnellen, kompletten Austausch der Puffer innerhalb der Partikelaggregation ermöglichen. Darüber hinaus kann aufgrund der hohen Zentrifugalkräfte eine effektive „Trocknung“ der Silika-Partikel und somit eine hohe Reinheit des Eluats erreicht werden.

Für Rotationsfrequenzen unterhalb von ca. 15 Hz können Flussraten $< 2 \mu\text{L/s}$ reproduzierbar eingestellt werden. Dies ist zum Einen für den Transport der Probe als auch des Elutionspuffers durch die Silika-Partikel wichtig. Bei diesen Schritten binden die DNA Moleküle an die Silika Oberfläche bzw. gehen von dort wieder in Lösung. Da diese Prozesse eine räumliche Nähe des DNA Moleküls zur Festphase voraussetzen, sollte die Aufenthaltszeit der Moleküle in der Festphasenschüttung die nötige Diffusionszeit zur Oberfläche übersteigen.

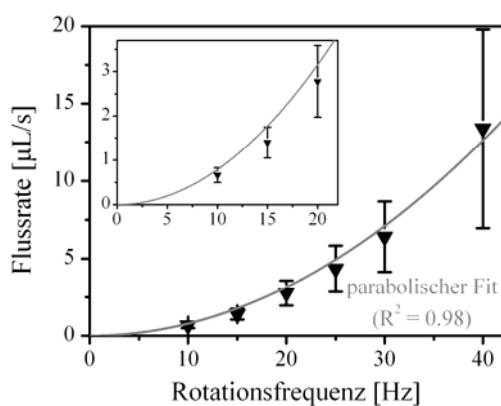


Bild 3. Flussraten durch die Silika Partikel-schüttung über die Rotationsfrequenz. Das parabolische Verhalten des zentrifugal getriebenen Flusses ermöglicht eine Einstellung der Flussrate zwischen 0.5 und 13 $\mu\text{L/s}$.

5 Extraktionsergebnisse

Das vorgestellte zentrifugale Konzept zur mikrofluidischen DNA Aufreinigung wurde mit einer DNA-Lösung [4], sowie den Silika Partikeln und Extraktionspuffern eines kommerziellen Extraktions-Kits [5] getestet.

Die Ergebnisse sind in **Bild 4** dargestellt. Die komplette Extraktion wurde für unterschiedliche Ausgangsmengen DNA in der Probe durchgeführt, und die extrahierte Menge DNA im Eluat anschließend fluorometrisch [6] vermessen. Die Menge extrahierter DNA steigt erwartungsgemäß mit der Menge DNA in der Probe. Der sigmoidale Kurvenverlauf geht in eine Sättigung von ca. 0.7 μg . Dies repräsentiert die maximale Kapazität der in der Extraktionskammer befindlichen Silika Partikel, bzw. deren Oberfläche.

Unterhalb von ca. 0.5 μg DNA in der Probe wird keine messbare Menge DNA extrahiert. Oberhalb einer Eingangsmenge von ca. 4 μg geht das System in Sättigung. Dazwischen befindet sich der dynamische Bereich der Extraktionsmethode, welche eine Ausbeute von 16 % aufweist (Steigung der Fit-Kurve im dynamischen Bereich).

Um den Verbleib der restlichen DNA zu untersuchen, wurden die DNA Moleküle mit einem fluoreszenten Farbstoff markiert und nach jedem Extraktions-Schritt lokalisiert. Dafür wurde nach jedem Schritt sowohl von der mikrofluidischen Struktur, als auch von der Flüssigkeit, welche die Silika Festphase passiert hat, eine Fluoreszenz-Aufnahme gemacht (siehe **Bild 5**).

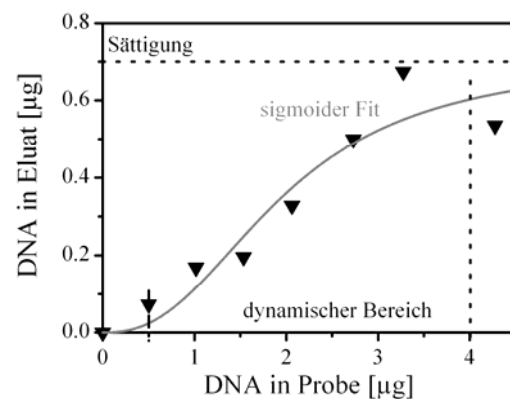


Bild 4. Ergebnisse der zentrifugalen DNA-Extraktion. Die Menge DNA im Eluat steigt über die Menge DNA in der Probe an. Der sigmoidale Kurvenverlauf zeigt eine Sättigung des Extraktionssystems von 0.7 μg und eine Ausbeute von 16 % im dynamischen Bereich.

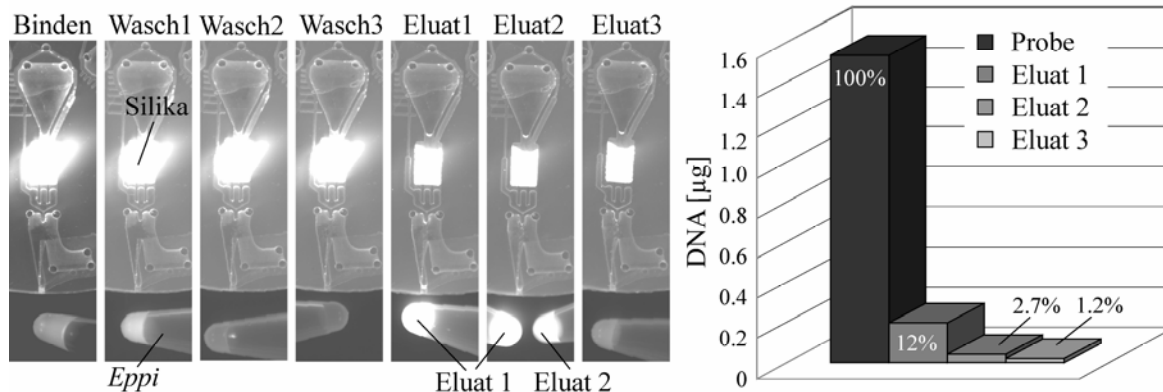


Bild 5. Charakterisierung des Extraktionsverlaufs. Links: die DNA in der Probe wurde mit einem fluoreszenten Farbstoff markiert, um sie während der Extraktion lokalisieren zu können. Nach jedem Schritt der Extraktion wird eine Fluoreszenz-Aufnahme von der mikrofluidischen Struktur, sowie dem erhaltenen Durchfluss (im *Eppi* an unterem Bildrand) gemacht. Rechts: die quantitativ gemessenen Mengen DNA in der Probe und die Ausbeute der insgesamt drei Eluier-Schritten.

Die Ergebnisse der Extraktion mit der markierten DNA zeigen, dass sich die DNA nach dem Bindschritt auf den Silika-Partikeln befindet und ein Teil der DNA während des ersten Wasch-Schrittes von dort heruntergelöst wird und sich im *Eppi* befindet (zweite Aufnahme in **Bild 5**). Das deutet darauf hin, dass diese DNA-Moleküle entweder nicht fest genug an der Silika-Oberfläche, oder auch unspezifisch an anderen Oberflächen, z.B. den Kanalwänden angelagert waren.

Im zweiten und dritten Wasch-Schritt löst sich kaum mehr zusätzliche DNA von den Partikeln bzw. den Kanalwänden. Erst im ersten Eluier-Schritt lösen sich die Moleküle von den Oberflächen. Allerdings befindet sich noch ein messbarer Anteil der Moleküle nach dem zweiten, und selbst nach dem dritten Eluier-Schritt auf den Silika-Oberfläche.

6 Zusammenfassung

Mittels der hier vorgestellten zentrifugal-mikrofluidischen Implementierung des Extraktionsverfahrens lässt sich erstmals der komplette Nucleinsäuren-Extraktionsprozess allein durch die Kontrolle der Drehfrequenz und Drehrichtung auf einer einfachen Zentrifuge zuverlässig und kostengünstig automatisieren, integrieren und parallelisieren. Mit zwei handelsüblichen Dispensern auf der Eingangs- und den Eppendorf-Tubes auf der Ausgangsseite fügt sich das Verfahren zudem nahtlos in existierende Laborumgebungen ein.

Zukünftige Arbeiten konzentrieren sich auf eine Verbesserung der Extraktionsperformance sowie eine Integration weiterer vor- und nachgelagerter Prozesse (Zell-Lyse, PCR). Dies würde eine komplette Integration aller nötigen Prozesse für die Nucleinsäureanalytik ermöglichen und somit interessante Anwendungen in der in-vitro Diagnostik eröffnen.

Literatur

- [1] R. Boom, C. J. A. Sol, M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheim van Dillen, J. van der Noordaa, "Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids", *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 495-503, 1990.
- [2] T. Brenner, T. Glatzel, R. Zengerle, and J. Duce, "Frequency-dependent transversal flow control in centrifugal microfluidics", *Lab on a Chip*, **5**, 146–150, 2005.
- [3] S. Haerberle, L. Naegel, R. Zengerle, and J. Duce, "A digital centrifugal droplet-switch for routing of liquids", Proc. of μ TAS 2006, November 5-9, Tokyo, Japan, 570-572, 2006
- [4] *Calf Thymus DNA*, product no. D-1501, *Sigma Aldrich Co.*, Germany, www.sigmaaldrich.com, accessed 2007.
- [5] *NucleoBond® CB 500 blood kit*, *Macherey-Nagel GmbH & Co KG*, Germany, www.macherey-nagel.com, accessed 2007.
- [6] *Quant-iT*, *Invitrogen Cop.*, USA, www.invitrogen.com, accessed 2007.