

## Entwicklung von Technologien und Komponenten für ein Lab-on-Chip System mit elektronischer Detektion

### Abschlussbericht zum öffentlich geförderten Projekt CAJAL4EU

|   |                      |
|---|----------------------|
| <b>ZE:</b> Institut für Mikrotechnik Mainz  | <b>FKZ:</b> 16N10926 |
| <b>Vorhabenbezeichnung:</b> Chip Architectures by Joint Associated Labs for European Diagnostics (CAJAL4EU)   |                      |
| <b>Teilvorhaben:</b> Realisierung vollintegrierter, mikrofluidischer Schlüsseltechnologien für die automatisierte Probenzufuhr, Aufbereitung mit Hilfe von halbleiterbasierter Bio-Analytik |                      |
| <b>Laufzeit des Vorhabens:</b> 01.04.2010 – 30.09.2013  |                      |
| <b>Berichtszeitraum:</b> 01.04.2010 – 30.09.2013  |                      |
| <b>Verfasser:</b> Knut Welzel, Rainer Gransee   |                      |

## *Inhaltsverzeichnis*

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Kurzzusammenfassung</b> .....   | <b>4</b>  |
| <b>Abstract</b> .....  | <b>5</b>  |
| <b>1 Einleitung</b> .....  | <b>6</b>  |
| <b>2 Aufgabenstellung IMM</b> .....  | <b>7</b>  |
| <b>3 Voraussetzungen</b> .....   | <b>9</b>  |
| <b>4 Planung und Ablauf</b> .....  | <b>10</b> |
| <b>5 Stand der Technik</b> .....   | <b>12</b> |
| <b>6 Zusammenarbeit mit anderen Stellen</b> .....                                    | <b>13</b> |
| <b>7 Ergebnisse</b> .....  | <b>14</b> |
| 7.1 Sample loading and macro-to-micro interface (Task 4.1) .....                     | 14        |
| 7.1.1 Probenentnahme zum Nachweis von Pathogenen aus Blut.....                       | 14        |
| 7.2 Sample preparation (Task 4.2) .....  | 14        |
| 7.2.1 Aufreinigung der bakteriellen DNA .....  | 14        |
| 7.2.2 DNA-Amplifikation .....  | 15        |
| 7.2.3 Reagenzienlagerung .....   | 16        |
| 7.3 Biosensor integration (Task 4.3).....  | 16        |
| 7.3.1 Integration des CMOS-Biosensors .....  | 16        |
| 7.4 Disposable cartridge (Task 4.4).....   | 17        |
| 7.4.1 Entwicklung des integrierten mikrofluidischen Polymerchips<br>(Kartusche)..... | 17        |
| 7.5 Fluid actuation and control (Task 4.5) .....                                     | 22        |
| 7.5.1 Kontaktlose Flüssigkeitsdetektion .....  | 22        |
| 7.5.2 Elektronische Hardware für die Integration .....                               | 22        |
| 7.6 Integration of components towards the full system (Task 5.1).....                | 25        |
| <b>8 Fortschreibung des Verwertungsplans</b> .....                                   | <b>28</b> |
| <b>9 Projekterfolg und Schlussfolgerung</b> .....                                    | <b>29</b> |



---

## Kurzzusammenfassung

Der vorliegende Bericht stellt Arbeitsergebnisse vor, die im Rahmen des von der EU und dem BMBF geförderten Verbundprojekts „Chip Architectures by Joint Associated Labs for European Diagnostics“ (CAJAL4EU) im Zeitraum von April 2010 bis September 2013 vom Institut für Mikrotechnik Mainz (IMM) erzielt wurden.

Ziel des Projekts war die Entwicklung von integrierten, mikrofluidischen Systemen zur Detektion von DNA und Proteinen aus biologischen Proben mittels halbleiterbasierter Biosensoren. IMM entwickelte im Projekt eine modulare Elektronikplattform einerseits zur Ansteuerung von elektromechanischen Aktoren (Pumpen, Ventilen) und Heizermodulen und andererseits zum Auslesen der Temperatursensoren für die im fluidischen System benötigte Temperaturkontrolle. Zusammen mit der vom IMM ebenfalls im Projekt durchgeführten Adaption des Bioassays in eine mikrofluidische Kartusche erlaubten diese Arbeiten die Entwicklung eines Point-of-Care Systems zum Nachweis von Pathogenen aus einer Blutprobe. Außerdem verfolgte das IMM die Entwicklung von Gefriertrocknungstechnologien zur langzeitstabilen Reagenzienlagerung sowie die Entwicklung einer kontaktlosen, kapazitiven Detektionstechnologie für Flüssigkeiten in mikrofluidischen Kanälen.

## Abstract

The following report presents the results of the work done at the Institut fuer Mikrotechnik Mainz (IMM) during the publicly funded project „Chip Architectures by Joint Associated Labs for European Diagnostics“ (CAJAL4EU) in the period from March 2010 to September 2013.

CAJAL4EU aimed at developing integrated microfluidic systems for the detection of DNA and proteins in biological samples using semiconductor based sensors. During the project IMM developed a modular electronic platform for control of electromechanical actors as well as temperature. Together with work done for the adaption of the bioassay a microfluidic cartridge the development of a Point-of-Care System for the detection of pathogens from a blood sample could be shown.

Additionally, IMM worked in the field of freeze drying as a method for long term storage of reagents together with technology development using capacity based approach for detection of liquid plugs in microfluidic systems.

## 1 Einleitung

Im Rahmen dem von der ENIAC-Joint Technology Initiative (JTI) der EU und dem BMBF geförderten Verbundprojekt CAJAL4EU entwickelten die Partner eine Analyseplattform für die In-Vitro-Diagnostik unter Nutzung neuartiger biochemischer Sensoren. Zusammen mit dem Einsatz mikrofluidischer Lab-on-a-Chip (LoC)-Systemen zur Probennahme und -behandlung sowie der Integration der Sensoren in die LoC-Umgebung sollte die automatisierte Detektion von Krankheiten aus Patientenproben ermöglicht werden.

Durch den Einsatz von stark miniaturisierten Biosensoren sollte eine gegenüber konventionellen Detektionsprinzipien deutlich erhöhte Sensitivität realisiert werden. Damit sollte, in Kombination mit der automatisierten mikrofluidischen Probenvorbereitung, eine Verkürzung der Analysezeit erreicht werden. Im Projekt wurden von drei Projektgruppen parallel drei Sensorprinzipien entwickelt, welche mit einem passenden Applikationsfall getestet werden sollten. Diese Sensorprinzipien waren:

- ein Biosensor mit integrierter Schaltung (CMOS-Biosensor)
- ein elektrochemischer Sensor
- ein auf Nanoporen basierender Sensor

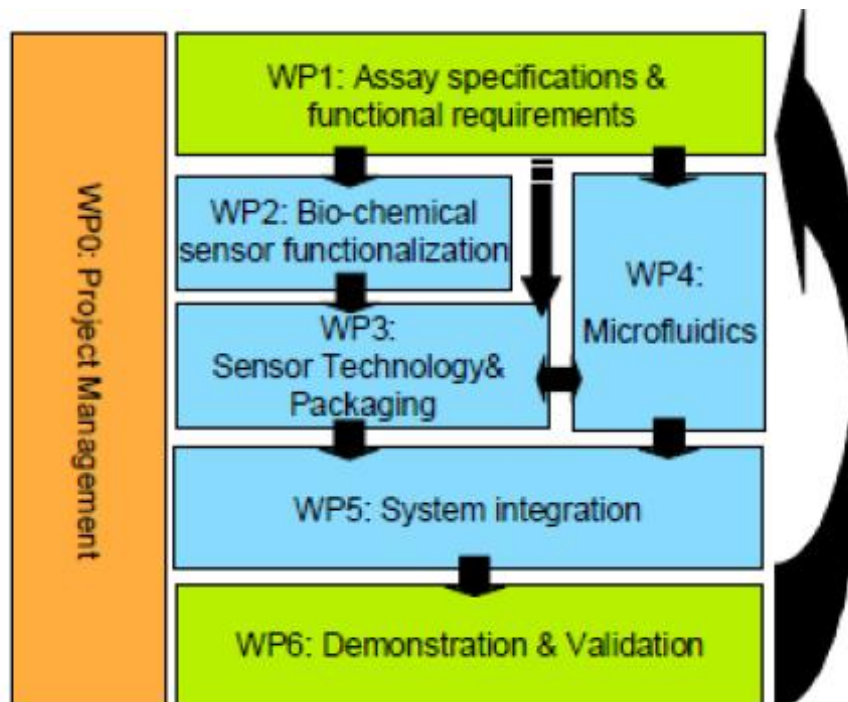
Die von den im Projekt teilnehmenden Diagnostikpartnern als relevant identifizierten Applikationsfelder waren zum einen

- ein Test auf Herz-Kreislauf-Krankheiten sowie
- ein Test für Infektionskrankheiten.

Dabei sollten einerseits aus einer Blutprobe Proteine detektiert werden, die bei einem Herzinfarkt als Indikatoren für einen akuten Anfall dienen können, andererseits Bakterien nachgewiesen werden, die bei einer Lungenentzündung auftreten können. Ziel des Projektes war die Entwicklung einer stark plattformorientierten Lösung, die sich mit geringem Aufwand auf andere Applikationen erweitern lässt.

## 2 Aufgabenstellung IMM

Der Beitrag des IMM zu dem Projekt konzentrierte sich auf die Teilaufgaben der Probenzuführung/-aufbereitung und der Reagenzienlagerung sowie auf die Entwicklung fluidischer Schlüsseltechnologien für die Prozesskontrolle (Aktorik, Heizung und Sensorik). Er war in den Arbeitspaketen 4 (Microfluidics) und Arbeitspaket 5 (System Integration) angesiedelt (siehe Abbildung 1), um wichtige Komponentenlösungen bereitzustellen und so einen Schlüsselbeitrag zur Konzeption des LoC-Systems zu leisten.



**Abbildung 1: Arbeitspakete in CAJAL4EU**

Wie in der Abbildung 1 ersichtlich, wurden die im Projekt zu entwickelnden Sensoren in drei Projektgruppen aufgeteilt und bearbeitet. Das IMM war dabei am Applikationsfall *Infektionsdiagnostik* in Kombination mit dem *CMOS-Biosensor* beteiligt. Dabei sollte eine geringe Anzahl von bakteriellen Erregern aus einer ████ Blutprobe isoliert werden, um anhand ihres genetischen Fingerabdruckes mittels Nukleinsäureamplifikation (PCR) Aussagen über das Vorhandensein der Krankheit treffen zu können.

Im Arbeitspaket 4 war das IMM hauptsächlich mit der Adaption und dem Test der biologischen Assays in dem mikrofluidischen System sowie mit

der Entwicklung geeigneter Technologien zum fluidischen Betrieb des Systems beschäftigt. Dies beinhaltet vor allem die Entwicklung von Gefriertrocknungsmethoden für Reagenzien sowie die ursprünglich nicht vorgesehene Anwendung der PCR aufgrund der nicht ausreichenden Sensitivität des CMOS-Biosensors. Zusätzlich entwickelte das IMM eine Methode zur Detektion von Flüssigkeiten in polymeren Kanälen basierend auf kontaktlosen Kapazitätsmessungen. Sie sollte eine Prozesskontrollmöglichkeit eröffnen, um an bestimmten Kanalstellen das Vorhandensein einer Flüssigkeitsprobe zu erkennen und somit weitere Assayschritte (wie den Weitertransport der Probe mittels Pumpe, das Schalten von Ventilen oder ein Heizen der Probe) automatisiert durchführen zu können. Die zum Betrieb des automatisierten Systems benötigte Elektronik wurde ebenfalls am IMM im Rahmen eines modularen Konzeptes entwickelt und mit einer auf LabView basierenden Softwaresteuerung programmiert. Dies ermöglichte die automatische Durchführung der zur Probenaufarbeitung benötigten Assayschritte, wobei das Chipdesign des mikrofluidischen Systems vom Projektpartner BOSCH entwickelt wurde und auf integrierten pneumatischen Ventilen beruhte.



---

## 3 Voraussetzungen

Das Projekt wurde beim IMM im o.g. Zeitraum in der Abteilung Mikrofluidik und Analytik (MuA) durchgeführt, welche sich hauptsächlich mit der Entwicklung von automatisierten, mikrofluidischen Systemen für industrielle Analysen bzw. Lebenswissenschaften beschäftigt. Es standen Wissenschaftler und Ingenieure mit der Expertise in den Bereichen Maschinenbau, Software- und Elektronikentwicklung, Molekularbiologie, Polymer-Bearbeitungstechnologie und Mikrofluidik zur Verfügung, die auf mehrere Testlabore (unter anderem ein Labor der biologischen Sicherheitsstufe S1) zurückgreifen konnten. Darin konnten biologische Versuche mit relevanten Testorganismen durchgeführt werden, bevor die finalen Demonstrationsversuche mit *S.pneumoniae* bei den relevanten Applikationspartnern durchgeführt wurden.

## 4 Planung und Ablauf

Die Arbeiten wurden im Projektantrag auf sechs Arbeitspakete verteilt, die, wie in Abbildung 1 dargestellt, die Assayentwicklung (AP1), die Oberflächenchemie (AP2), die Sensorentwicklung (AP3), die Entwicklung der Mikrofluidik (AP4), die Systemintegration (AP5) und die Demonstration (AP6) beinhalteten. Das IMM war schwerpunktmäßig in den Arbeitspaketen 4 und 5 aktiv. Wesentliche Schnittstellen waren:

- Umsetzung des Bioassays aus AP1 im LoC.
- Auslegung und Fertigung einer Elektronik und Software zur Ansteuerung eines Chip-Betreibergeräts, mit dem das Assay in einem mikrofluidischen System demonstriert werden kann.

Basierend auf der ursprünglichen Planung wurde laufend eine Anpassung der Planung gemäß den Anforderungen durchgeführt. Wesentliche Planungsänderungen waren:

- Im Projekt sollten, wie in Kapitel 1 und 2 beschrieben, drei Sensortechnologien mittels zweier medizinisch relevanter Applikationen getestet werden. Um die Umsetzung zu vereinfachen, wurden drei Projektgruppen gebildet, die sich jeweils auf einen Sensor und eine Applikation fokussierten. Das IMM konzentrierte sich auf den CMOS-Biosensor des Kooperationspartners NXP, da bei diesem zu Beginn der Arbeiten das größte Potential hinsichtlich industrieller Marktreife und die größten Möglichkeiten hinsichtlich Sensitivität und Multiplexing gesehen wurden. Für den CMOS-Biosensor wurde als Pilotapplikation die Detektion von *S.pneumoniae*-DNA aus Blut (zur Diagnose von bakteriellen Lungenentzündungen) von den im Projekt vorhandenen Applikationspartnern ausgesucht.
- Leider wurde die Entwicklung des CMOS-Biosensors durch NXP während der Projektlaufzeit eingestellt. Der CMOS-Biosensor konnte somit nicht in das finale System integriert werden. Um trotzdem die Funktionalität des mikrofluidischen Systems zu demonstrieren, wurde ersatzweise ein optisches Microarray für die Detektion integriert und verwendet.
- Wie bereits in den vorhergehenden Zwischenberichten kommuniziert, wurde das Bioassay durch die Projektpartner in Arbeitspaket 1 nicht wie ursprünglich geplant bereits in 2010 definiert, sondern befand sich fast bis zum Ende der Projektlaufzeit noch in der Entwicklung. Vor allem die komplette Neuentwicklung einer Duplex-PCR zur DNA-Amplifikation mit den dazu notwendigen Tests und der Optimierung der (PCR)-Temperaturen und Heizzeiten, sowie der Ersatz des

---

CMOS-Biosensor durch ein optisches Microarray sorgten für langwierige Verzögerungen. Hierdurch wurde die Entwicklung des mikrofluidischen Systems erschwert („Moving Target“), insbesondere konnte nicht wie geplant rechtzeitig vor Projektende ein Design-Freeze der mikrofluidischen Chips (Kartusche) durchgeführt werden. Auf die Herstellung von Kartuschen mittels Spritzguss wurde deshalb verzichtet. Die Kartuschen für die Demonstrationsversuche wurden bis zuletzt optimiert und mittels CNC-Fräsen schnell und flexibel hergestellt.

Es wurde eine kostenneutrale Verlängerung des Projekts um sechs Monate beantragt, um die in dieser Zeit stattfindenden Demonstrationsversuche noch zu unterstützen sowie an den abschließenden Review-Treffen teilnehmen zu können.

## 5 Stand der Technik

### Stand der Technik beim IMM

Das IMM arbeitet seit vielen Jahren an der Entwicklung mikrofluidischer polymerer Einwegsysteme, meist gefertigt mittels Rapid-Prototyping Technologien. Dabei arbeitet das IMM nicht nur an der Entwicklung mikrofluidischer Designs und Komponenten, sondern auch verstärkt an der Integration biologischer Laborassays in die Systeme (mit Fokus auf Probenvorbereitung und Nukleinsäureamplifikation). Gleichzeitig versucht das IMM einen Systemgedanken zu verfolgen, sodass nicht nur mikrofluidische Komponenten, sondern auch die zum Betrieb benötigten Ansteuereinheiten entwickelt und aufgebaut werden.

### Stand der Technik zu LoCs

Zu LoCs existiert ein außerordentlich umfangreicher Stand der Technik, auf den hier nicht vollständig eingegangen werden kann. Klare Defizite im Forschungsstand, die einer Kommerzialisierung von LoCs im Wege stehen, wurden in der Antragsphase dahingehend identifiziert, dass existierende LoC-Systeme die Probleme des Probeneintrags und der stabilen Lagerung der Reagenzien nur unzureichend lösen. Im Projekt war es deshalb ein Ziel, für diese Aspekte Lösungen zu entwickeln.

---

## 6 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Es bestand eine enge Zusammenarbeit zwischen dem IMM und folgenden Partnern:

- **Bosch:**
  - Enge Kooperation bei der Entwicklung der mikrofluidischen Systeme
  - Fluidische und biologische Tests der Polymerchips (Kartuschen)
  - Diskussion und Bewertung der Ergebnisse
  - Enge Zusammenarbeit bei Planung des Demonstrators
- **NXP:**
  - Nutzung des CMOS-Biosensors zur Detektion im mikrofluidischen System
- **RUNMC, Tibotec Virco (umbenannt zu Janssen Diagnostics):**
  - Gemeinsame Abstimmung und Bewertung der Entwicklung sowie Optimierung des biologischen Assays
  - Zusammenarbeit beim Transfer des Assays von „State-of-the-art“ Methoden auf den mikrofluidischen Polymerchip
  - Gemeinsame Durchführung der Demonstrationsversuche
- **ASIP:**
  - Lieferung eines Testaufbaus zur automatischen Verteilung von unterschiedlichen Reagenzien

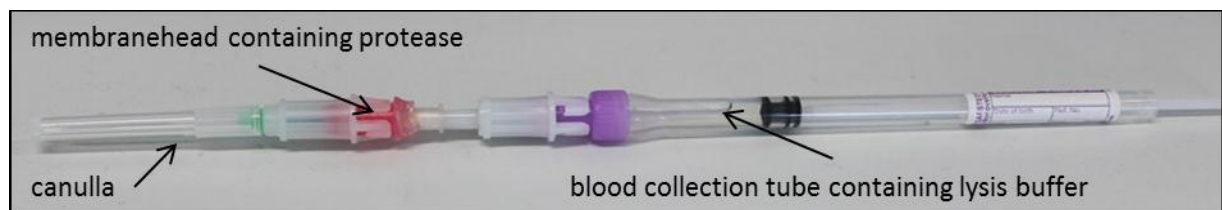
## 7 Ergebnisse

### 7.1 Sample loading and macro-to-micro interface (Task 4.1)

#### 7.1.1 Probenentnahme zum Nachweis von Pathogenen aus Blut

In der für den CMOS-Biosensor im Projekt ausgewählten Testapplikation soll der bakterielle Krankheitserreger (*Streptococcus pneumoniae*) direkt aus einer Blutprobe nachgewiesen werden. Die Blutprobe sollte mittels eines modifizierten Blutentnahmerohrs der Firma Sarstedt entnommen werden. Dieses Blut sowie die darin enthaltenen Erreger sollten sofort durch einen bereits in dem Blutentnahmerohr vorgelagerten Lysepuffer sowie ebenfalls vorgelagerter Protease K unmittelbar lysiert werden (siehe Abbildung 2), sodass die Erreger-DNA zugänglich wird. Dafür soll ein Probenvolumen von ■■■■ verarbeitet werden, aus dem wenige Erreger detektiert werden sollen.

Nach der Lyse kann die Probe direkt mit der mikrofluidischen Kartusche verbunden und in diese injiziert werden.

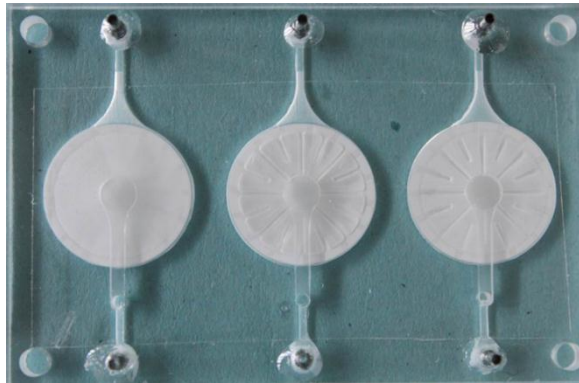


**Abbildung 2: Probennahme-Konzept unter Nutzung von Standardkomponenten (Aufbewahrung von Protease K und Lysepuffer in geeigneten, adaptierten Lagerkomponenten)**

### 7.2 Sample preparation (Task 4.2)

#### 7.2.1 Aufreinigung der bakteriellen DNA

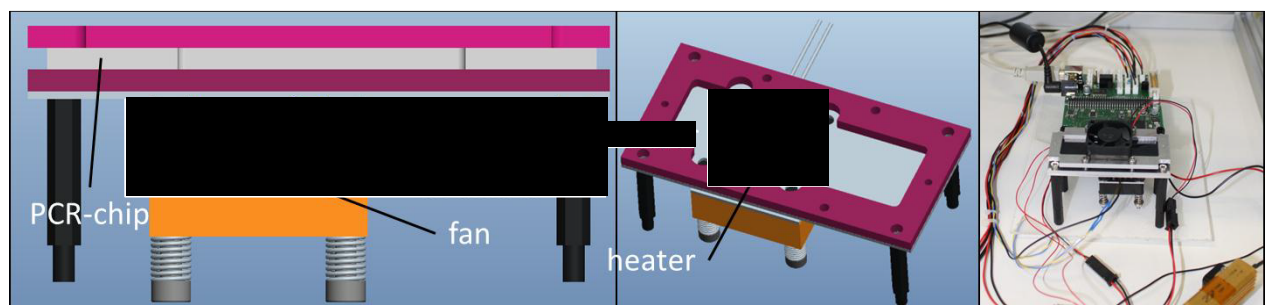
Die Erreger-DNA muss nach der Lyse isoliert und gereinigt werden. Nach Tests verschiedener Lyse- und DNA-Isolierungsansätze hat sich ein Ansatz der Firma Fujifilm als geeignet erwiesen, um bakterielle DNA aus Vollblutproben zu isolieren und sensitiv nachzuweisen. Dieser Laborassay (Quickgene whole blood Kit L von Fujifilm) wurde in mikrofluidischen Testchips umgesetzt (siehe Abbildung 3). Es konnten im mikrofluidischen Polymerchip Resultate vergleichbar zum adaptierten ■■■■-Laborassay erzielt werden (analysiert mittels externer Real-Time-Polymerasekettenreaktion (PCR)).



**Abbildung 3: Testchip mit unterschiedlichen Kammerdesigns und eingeschweißter Membran zur Solid-Phase-Extraktion von DNA**

### 7.2.2 DNA-Amplifikation

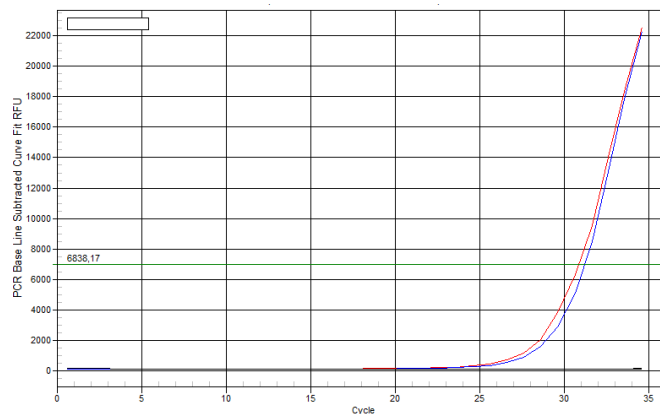
In enger Kooperation mit den Projektpartnern Tibotec Virco (TV) und Radboud University Medical Center (RUNMC) (biologische/medizinische Expertise) sowie mit BOSCH (mikrofluidisches Design), konnte das IMM ein mikrofluidisches PCR-Modul entwickeln. Da bei diesem Amplifikationsverfahren mehrere Temperaturzonen (■°C, ■°C, ■°C) für maximal ■ Zyklen durchlaufen werden müssen, wurde am IMM ein integriertes Heizsystem mit Peltierkühler und der dazu benötigten Ansteuerung entwickelt, auf dem eine PCR für ■■■■■ Probe erfolgreich evaluiert werden konnte (siehe Abbildung 4). Dabei wurden ein Widerstandsheizler zum Erhitzen der Probe sowie ein Peltierelement zum Kühlen der Probe in den Aufbau integriert. Die aktuelle Temperaturmessung wurde mittels eines ebenfalls eingebauten Pt 100 Sensors überwacht und das Ganze über eine ebenfalls entwickelte integrierte Steuerplatine angesteuert. Die vorgegebenen Heizwerte sowie die Heiz- und Kühlzeiten konnten durch ein LabView-Programm auf einem Rechner angepasst, geändert und an die integrierte Steuerung übergeben werden.



**Abbildung 4: Peltier-Kühler mit integriertem Widerstandsheizler für die On-Chip PCR**

### 7.2.3 Reagenzienlagerung

Um die für das Assay benötigten Reagenzien in dem zu entwickelnden Polymerchip (Kartusche) zu lagern, wurden am IMM Versuche zur Trockenlagerung durchgeführt. Da sich im weiteren Projektverlauf herausgestellt hat, dass anstelle des CMOS-Biosensors eine Nukleinsäure-Amplifikation verwendet werden soll, wurden am IMM Versuche zur Gefriertrocknung von PCR-Reagenzien durchgeführt. Ein Vorteil der Trockenlagerung ist die Lagerbeständigkeit von Enzymen bei Raumtemperatur. Bisher wurden die Reagenzien in Reaktionsgefäßen lyophilisiert und anschließend mittels Real Time PCR gezeigt, dass ihre Funktionalität vergleichbar zu frisch angesetzten PCR Reaktionen ist (siehe Abbildung 5). Hierbei zeigte sich, dass die Stabilisierung der Polymerase mittels [REDACTED] als Kryoprotektor am besten funktioniert hat. Bei anschließenden Langzeittests bei Raumtemperatur, 30°C bzw. 47°C konnte auch nach 2 Monaten eine enzymatische Aktivität mittels Real Time-PCR gezeigt werden.



**Abbildung 5: Vergleich der Amplifikationen von lyophilisierten (rot) und frischen (blau) Ansätzen (bei  $1,25 \times 10^4$  eingesetzten Genomen).**

## 7.3 Biosensor integration (Task 4.3)

### 7.3.1 Integration des CMOS-Biosensors

In diesem Task sollte der von NXP entwickelte CMOS-Biosensor in den mikrofluidischen Polymerchip (Kartusche) eingebaut werden. Da es hierbei leider zu unvorhergesehen Schwierigkeiten bei Messungen mit den gekapselten CMOS-Biosensoren gab, wurden als Alternative dazu fluoreszenzbasierte Detektionsmethoden implementiert. Dieser Arbeitspunkt wurde nicht vom IMM,



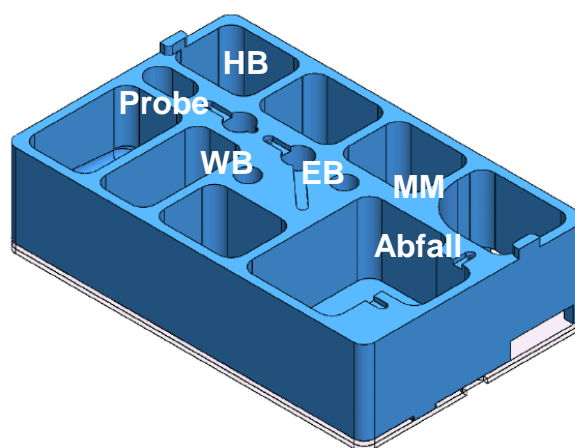
sondern vom Partner IMEC in Arbeitspaket 2 (Biochemical sensor functionalization) durchgeführt, wobei BOSCH die benötigten mikrofluidischen Designs konzipierte.

## 7.4 Disposable cartridge (Task 4.4)

### 7.4.1 Entwicklung des integrierten mikrofluidischen Polymerchips (Kartusche)

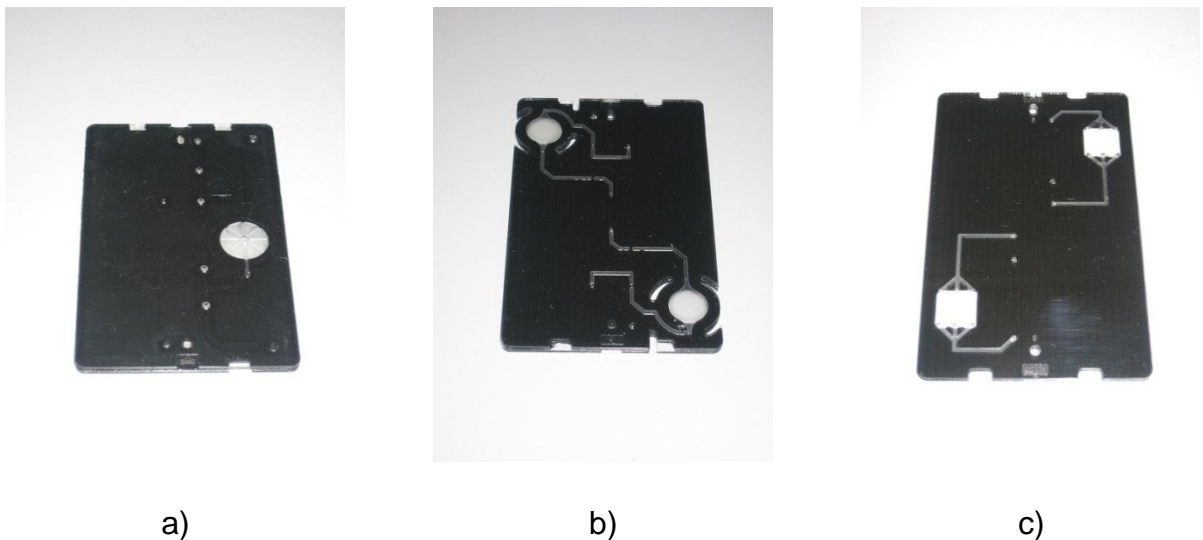
Die zuvor getesteten Entwicklungen und Module zur Probenpräparation wurden in integrierte Konzepte umgesetzt, die der Projektpartner BOSCH konzipierte und die in Zusammenarbeit mit dem IMM gefertigt und getestet wurden. Zum automatisierten Betrieb der Kartuschen wurde eine sogenannte Peripheral Control Unit (PCU) entwickelt, die aus einer Kartuschenhalterung sowie den benötigten Aktuatoren, Pumpen, Ventilen sowie Heizern und den zur Ansteuerung benötigten Elektronikplatinen bestand. Der Ablauf der eigentlich durchzuführenden Assayschritte (Pumpen der Probe und der weiteren Flüssigkeiten, Heizen während der PCR, ...) wurden durch eine vom IMM entwickelte, LabView-basierte Software auf einem verbundenen Steuerrechner realisiert (mehr dazu in Arbeitspaket 5).

Die gelagerten Flüssigreagenzien wurden in einer separaten Kartusche (dem sogenannten Reservoirblock) gelagert, der gleichzeitig auch als Abfallreservoir und als Einlass für die Probe diente (siehe Abbildung 6). Um die Versuche zu vereinfachen, wurde der PCR-Mastermix nicht in getrockneter, sondern ebenfalls in flüssiger Form gelagert.



**Abbildung 6: Reservoirblock mit unterschiedlichen Reservoiren: WB – Waschpuffer, EB – Elutionspuffer, MM – PCR-Mastermix, HB – Hybridisationspuffer.**

Der Reservoirblock ist über Einlass- und Auslassöffnungen mit der darunterliegenden mikrofluidischen Kartusche verbunden und wird über eine Klemmung auf diesen gedrückt und abgedichtet. Die von Bosch entwickelten Kartuschen basieren auf einem mehrlagigen Sandwichaufbau, bei dem ein schwarzer Polymerchip mittels Laserschweißprozess mit einem transparenten Chip sowie einer dünnen Folie verbunden wird. Durch diese Folie lassen sich bei Anlegen eines extern gesteuerten Unterdrucks die in der Kartusche integrierten Membranventile steuern. In Kombination mit einem Anschluss zur Erzeugung von Unterdruck an der Auslassöffnung des Chips lassen sich somit die zum Ablauf des biologischen Assays benötigten Flüssigkeiten automatisiert und kontrolliert durch die Kartusche bewegen. Abbildung 7 zeigt unterschiedliche integrierte Designs.



**Abbildung 7: Kartuschen zum Test der unterschiedlichen Bioassayschritte. a) Kartusche zur DNA-Aufreinigung, b) Kartusche für DNA Amplifikation, c) Kartusche zum Test der Hybridisierung zur späteren Fluoreszenzdetektion.**

Die mit den Kartuschen durchgeführten Experimente zeigten, dass es möglich ist, mit der PCU die Probenpräparation erfolgreich durchzuführen. Um dies zu demonstrieren, wurde am IMM mit Bakterien (*E.coli*) versetztes Blut lysiert und anschließend in einer Kartusche mittels der PCU automatisiert aufgereinigt. Abbildung 8 zeigt die automatisiert durchgeführten Schritte.

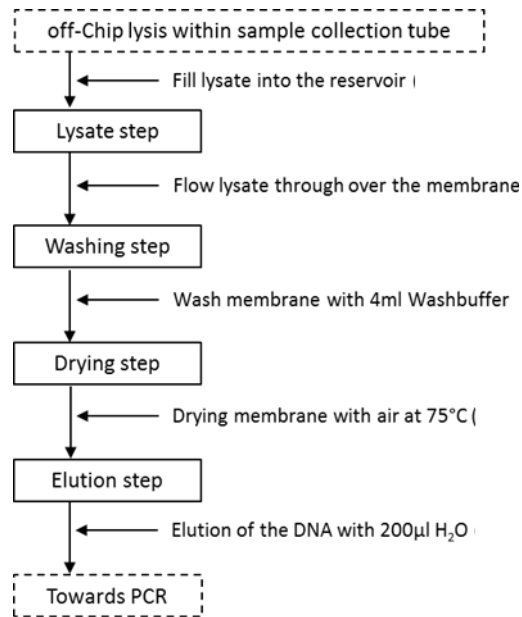


Abbildung 8: Ablaufplan für die Probenpräparation mittels PCU

Abbildung 9 zeigt Ergebnisse der Probenpräparation, die mit der PCU im mikrofluidischen Polymerchip durchgeführt worden sind. Dabei wurden jeweils  $10^6$  *E.coli*-Bakterien zu  $2 \mu\text{l}$  Blut zugegeben, lysiert und anschließend die DNA automatisiert aufgereinigt. Die Bakterien-DNA konnte ohne Probleme mit einer anschließenden Labor-PCR nachgewiesen werden.

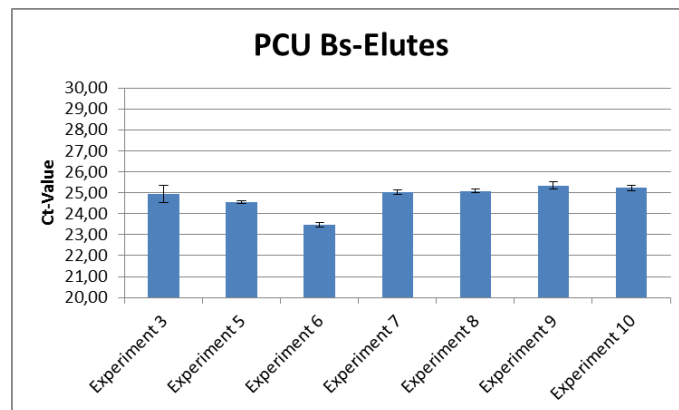






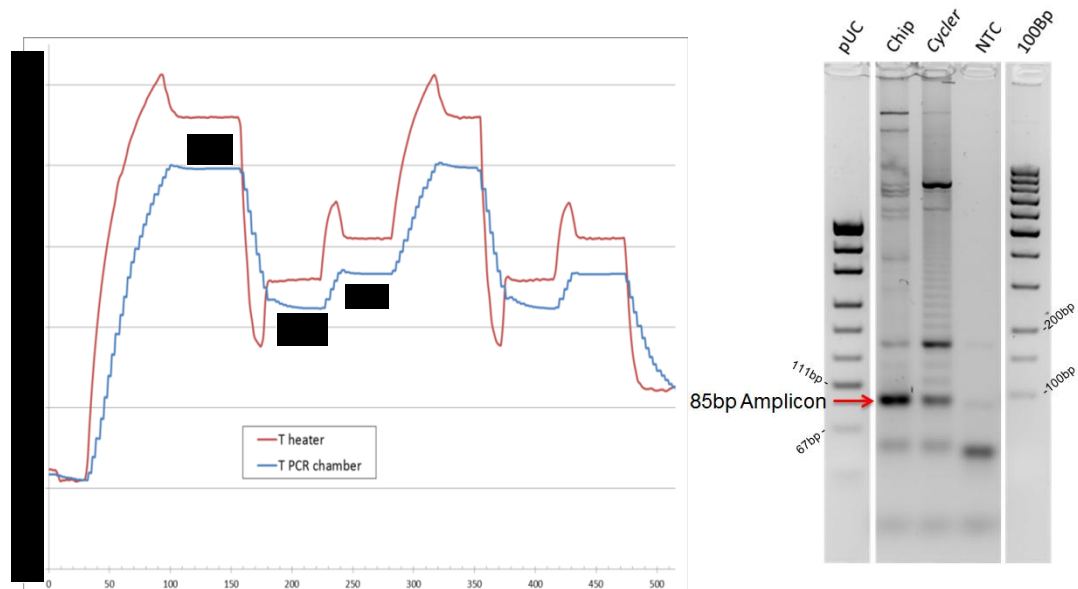


Abbildung 9: *cT*-Werte für eine nach der Probenpräparation mittels Laborgerät durchgeführte real time-PCR ( $10^6$  *Subtilis* Bakterien in  $2 \mu\text{l}$  Blut,  $2 \mu\text{l}$  Reaktionsvolumen sowie  $2 \mu\text{l}$  Template für die real time-PCR)

Parallel zu den mittels Labor-PCR gewonnenen Ergebnissen wurden Aliquots des Eluats anschließend mit PCR-Mastermix versetzt und die DNA der Probe ebenfalls in der PCU automatisiert amplifiziert. Dazu wurden die zur

Amplifikation benötigten Temperaturprofile       
 vierzig Mal nacheinander durchgefahen (siehe Abbildung 10). Dabei konnte die im mikrofluidischen Polymerchip erzeugte Bakterien-DNA erfolgreich vervielfältigt und anschließend mittels Laborverfahren nachgewiesen werden.

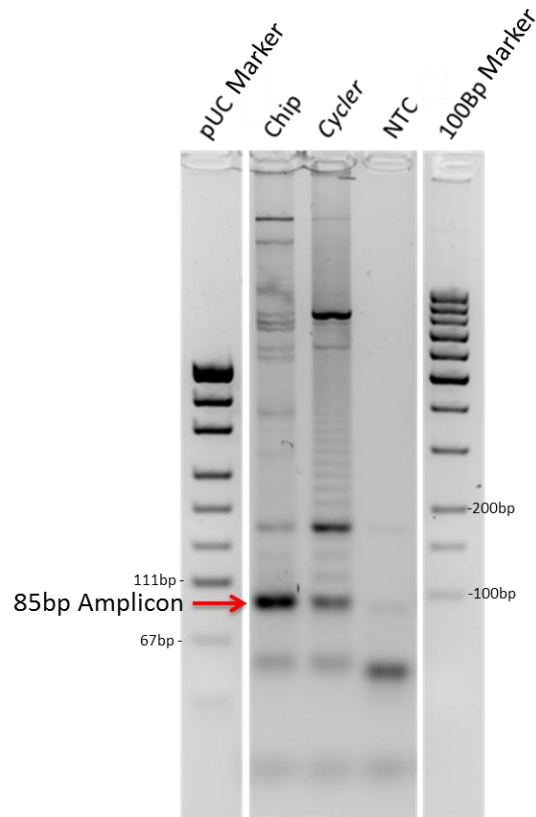


**Abbildung 10: Eingesetztes sowie gemessenes Temperaturprofil bei einer PCR (links), Ergebnis einer Gelelektrophorese der bei der PCR erfolgreich amplifizierten bakteriellen DNA im Vergleich zur Standard PCR im Laborgerät (Cyclus, rechts).**

Das Bioassay, die NA-Präparation sowie die on-Chip PCR wurden in enger Kooperation mit den Projektpartnern Tibotec Virco (TV), Radboud University Medical Center (RUNMC) (biologische/medizinische Expertise) und mit BOSCH (mikrofluidisches Design) entwickelt.

Zur Demonstration des Komplettsystems wurden gespikete Blutproben mit den einzelnen modularen mikrofluidischen Polymerchips prozessiert. Diese Experimente wurden zusammen mit den Projektpartnern RUNMC, NXP, JD und Bosch durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Detektion der internen Kontrolle *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (Konzentrationen von  $10^{\text{redacted}}$  Bakterien/ml) und des Targets *Streptococcus pneumoniae* in krankheitsrelevanten Konzentrationen von  $10^{\text{redacted}}$  Bakterien/ml Blut möglich ist.

Dabei wurde ein PCR-Volumen von  verwendet (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11: Vergleich der PCU Chip Duplex-PCR vs. Standardcycler Versuche**

Da es im Verlauf des Projekts zu Verzögerungen durch die Umsetzung des biologischen Assays kam, wurde im Dezember 2012 von den Partnern in Arbeitspaket 4 entschieden, eine Umsetzung des finalen Designs in eine mittels Spritzguss hergestellte mikrofluidische Kartusche nicht mehr durchzuführen, da die für die Übertragung in den Spritzguss verbliebene Zeitspanne bis Projektende zu kurz war. Eine Fertigung mittels Spritzguss hätte mindestens drei Monate in Anspruch genommen. Somit wurden die benötigten Kartuschen weiterhin mittels Frästechnik hergestellt, was gleichzeitig den Vorteil von größtmöglicher Flexibilität erhielt. Gleichwohl wurde beim Design der Kartusche auf ein spritzgussähnliches Layout geachtet, sodass eine Realisierung mittels Spritzguss nur mit leichten Adaptionen der Kartuschen- und Kanalgeometrien (Einfügen von Abformschrägen und Auswerferpositionen, Entfernung von unnötigen Materialanhäufungen,...) möglich sein sollte. Eine größtmögliche Kompatibilität mit diesem Massenherstellungsverfahren sollte also ohne Probleme gegeben sein.

## 7.5 Fluid actuation and control (Task 4.5)

### 7.5.1 Kontaktlose Flüssigkeitsdetektion

Um einen automatisierten Ablauf im mikrofluidischen System zu gewährleisten und mögliche Prozessschwankungen auszugleichen, arbeitete das IMM an einer kontaktlosen Methode zur Flüssigkeitsdetektion in Polymerkanälen als Alternative zu den bereits am IMM verwendeten fluidischen Lichtschranken. Geeignetes Mess-Equipment wurde beschafft und erste Elektrodendesigns wurden entworfen, gefertigt und getestet. Da die ersten Versuche vielversprechend ausfallen, wurde damit begonnen, Schaltungen aufzubauen, die eine schnelle und hochsensitive Messung ermöglichen sollen (siehe Abbildung 12). Leider ist es bis zum momentanen Zeitpunkt noch nicht gelungen, eine einfache, integrierte Schaltung aufzubauen, die ohne kostspieliges Messgerät auskommt. Dies liegt vor allem daran, dass die Messsignale sehr klein und die Abtastfrequenzen relativ hoch sind.

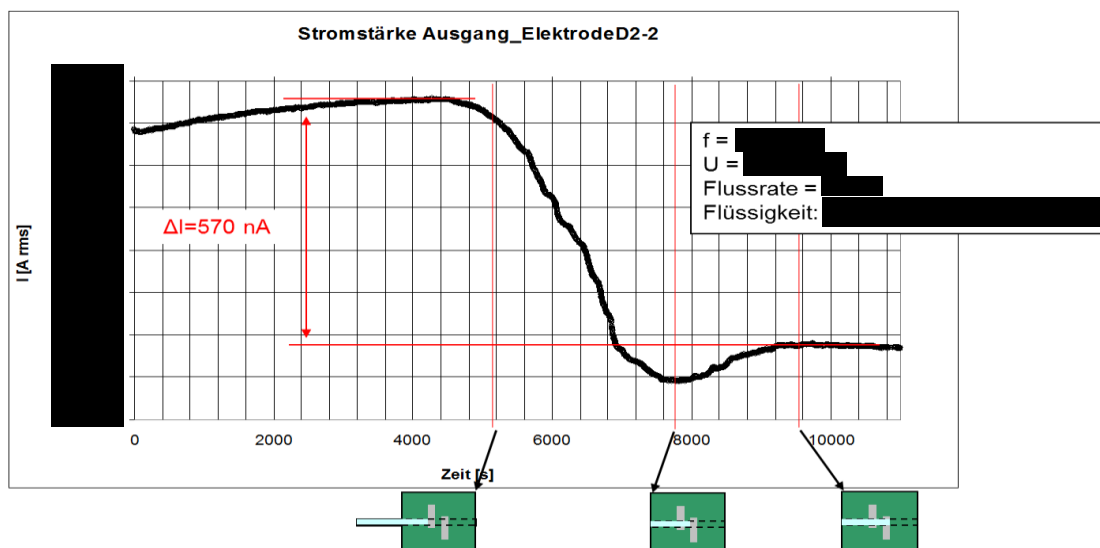


Abbildung 12: Messergebnisse mittel kontaktloser Kapazitätsmessung

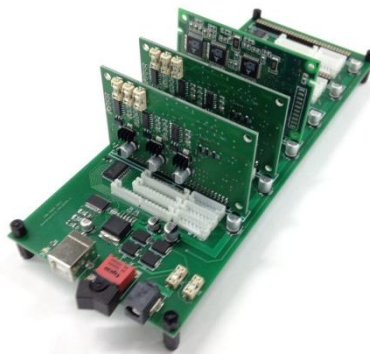
### 7.5.2 Elektronische Hardware für die Integration

Das IMM hat im Rahmen des Projekts mikrofluidische Komponenten und Platinen aufgebaut, welche mittels LabView-Software programmiert werden können.

Es können damit folgende Komponenten angesteuert werden und somit alle zum automatisierten Ablauf benötigten Funktionen abgedeckt werden:

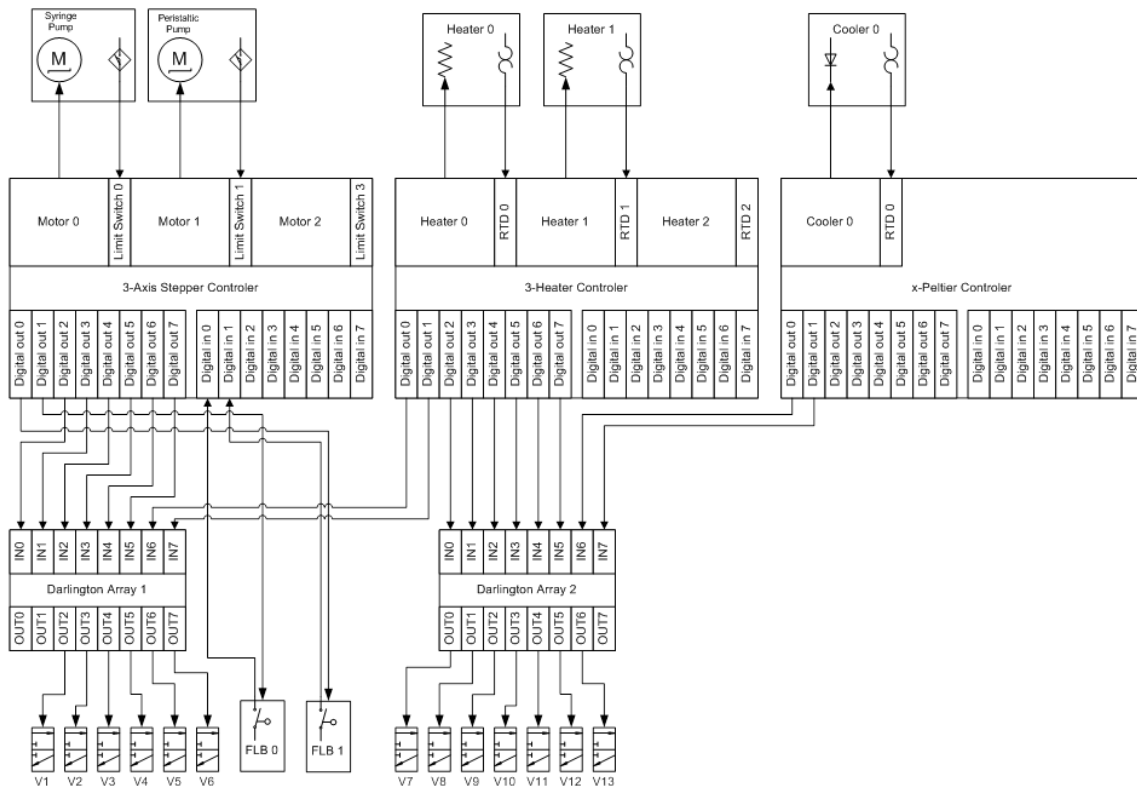
- Dreizehn 2/3-Wegeventile (24VDC/1,5W)
- Eine Spritzen- oder Peristaltikpumpe mit Schrittmotor
- Zwei Widerstandsheizter
- Ein Peltierelement als Kühler
- Zwei fluidische Lichtschranken – inklusive Signalausgabe and Teaching Option
- Mehrere I/O für die Prozesskontrolle
- Optional mehrere Einwegventile

Die modulare Struktur der Plattform ermöglicht eine einfache Erweiterbarkeit des Systems. Das Elektronik-Mainboard besitzt sechs Slots, eines für die Schrittmotor-Karte, eines für die Heizungs-Karte, eines für die Peltier-Karte sowie drei Reserveslots (siehe Abbildung 13). Diese Plattform wird zur Steuerung der PCU verwendet (mehr dazu in Arbeitspaket 5).



**Abbildung 13: Elektronik-Mainboard mit den drei im Projekt entwickelten, modularen Steuerungskarten.**

Abbildung 14 zeigt ein Schema der entwickelnden Steuerungsplattform. Die eigentliche Ansteuerung wird mittels PC über eine USB-Schnittstelle durchgeführt.



**Abbildung 14: Schema der Steuerungsplattform**

Überblick über Interfaces:

1. Schrittmotor-Karte:
  - Für drei Achsen
  - Je zwei Endschalter
  - Acht digitale Ausgänge zum Ansteuern von
    - i. 2/3-Wegeventilen mittels Darlington Array
    - ii. fluidischen Lichtschranken mittels Darlington Array
    - iii. mehreren Einwegventilen
    - iv. LEDs
  - Acht digitale Eingänge
    - i. zur Abfrage, z.B. von Mikroschaltern, Lichtschranken, etc.



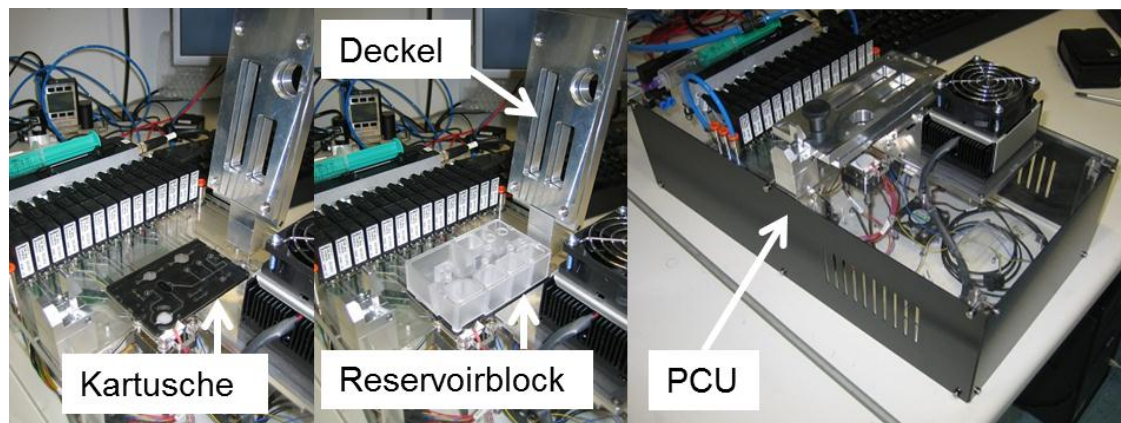
2. Heizungs-Karte:
  - Steuert drei Widerstandsheizer und
  - Erfasst drei Temperatursensoren (RTD)
  - Acht digitale Ausgänge zur Ansteuerung von
    - i. 2/3-Wegeventilen mittels Darlington Array
    - ii. fluidischen Lichtschranken mittels Darlington Array
    - iii. mehreren Einwegventile
    - iv. LEDs
  - Acht digitale Eingänge
    - i. zur Abfrage , z.B. von Mikroschaltern, Lichtschranken, etc.
3. Peltier-Karte:
  - zur Kontrolle von mindestens einem Thermoelektrischen Kühler (zyklisch)
  - zum Auslesen von mindestens einem RTD Temperatursensor und einem NTC Sensor
  - Acht digitale Ausgänge zur Ansteuerung von
    - i. 2/3-Wegeventilen mittels Darlington Array
    - ii. fluidischen Lichtschranken mittels Darlington Array
    - iii. mehreren Einwegventile
    - iv. LEDs
  - Acht digitale Eingänge
    - i. zur Abfrage , z.B. von Mikroschaltern, Lichtschranken, etc.

## 7.6 Integration of components towards the full system (Task 5.1)

In diesem Task wurden die zuvor in Arbeitspaket 4 entwickelten Komponenten und Module zu einem Gesamtsystem (PCU) integriert, das es erlaubt, das in der mikrofluidischen Kartusche ablaufende Assay automatisiert abzuarbeiten. Die PCU enthält

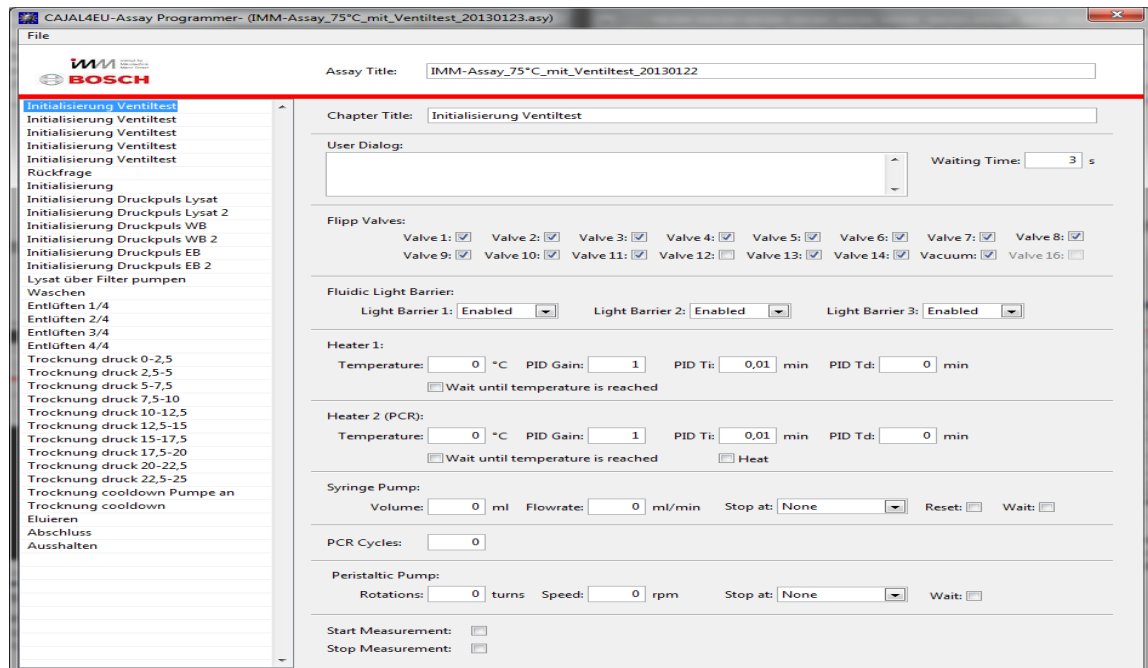
- die Kontrollelektronik zur Ansteuerung der externen 3/2-Wegeventile zur pneumatischen Kontrolle der im Chip vorhandenen Membranventile,
- die zum Druck- (bzw. Unterdruckaufbau) benötigten Pumpen,
- die Temperaturkontrolle zur Heizung während der Trocknung des Probenaufbereitungsfilters,
- die Kontrolle des Temperaturverlaufes während der PCR sowie der Temperierung des Sensors,
- die optische Ausleseeinheit der im System zur Prozesskontrolle vorhandenen fluidischen Lichtschranken,
- die elektrische Ausleseeinheit des im System ursprünglich vorgesehenen CMOS-Biosensorboards von NXP.

Sowohl die mikrofluidische Kartusche als auch der über ihr liegende Reservoirblock werden in die PCU eingelegt und durch Klemmung mittels eines Deckels befestigt.



**Abbildung 15: PCU (rechts), sowie die in die PCU eingelegte Kartusche sowie der Reservoirblock (links, sowie mittig)**

Die Steuerelektronik der PCU ist mittels USB-Anschlusses mit dem Steuerungsrechner verbunden. Auf diesem läuft die vom IMM mittels LabView geschriebene Steuerungssoftware (siehe Abbildung 16). In dieser können sequenzweise die unterschiedlichen Komponenten (Pumpen, Ventile, Heizer,...) angesteuert, für bestimmte Zeiten an oder ausgeschaltet werden und mittels Bedingungen untereinander verknüpft werden. Somit lassen sich sehr einfach Schleifen für Assayabläufe auch von Laien ohne Programmierkenntnisse schreiben



**Abbildung 16: Oberfläche der vom IMM geschriebenen sequentiellen Steuerungssoftware für die im Projekt entwickelte Steuerungselektronik**

---

## 8 Fortschreibung des Verwertungsplans

Gegenüber dem letzten Zwischenbericht haben sich keine Änderungen ergeben. Siehe auch beigefügte „Kurzfassung zum aktuellen Verwertungsplan“.

## 9 Projekterfolg und Schlussfolgerung

In der für den CMOS-Biosensor ausgewählten Testapplikation sollte der bakterielle Krankheitserreger (*Streptococcus pneumoniae*) direkt aus einer Blutprobe nachgewiesen werden. Im Projekt konnte dieses Ziel leider nicht erreicht werden, da die Sensorentwicklung durch NXP eingestellt wurde.

Zusammenfassend lässt sich dennoch sagen, dass die im Projekt vom IMM bearbeiteten Arbeitspakete erfolgreich abgeschlossen werden konnten. So wurden biologisch funktionelle mikrofluidische Kartuschen entwickelt, realisiert und experimentell validiert, sowie die zum automatisierten Betrieb benötigte Steuereinheit aufgebaut und programmiert. Mit diesem System war es möglich, bakterielle DNA in mit Bakterien versetzten Blutproben erfolgreich nachzuweisen. Es wurde ein Probenvolumen von [REDACTED] verarbeitet, aus dem wenige Erreger in krankheitsrelevanter Konzentration detektiert wurden. Dies geht weit über den üblichen Ansatz in der Mikrofluidik hinaus, bei dem meistens nur wenige Mikrolitern Probe prozessiert werden können, was bei der geringen im Projekt zu detektierenden Bakterienanzahl nicht möglich gewesen wäre. Die dabei zu lösenden Probleme der Probenlagerung (großvolumige flüssige Proben sowie gefriergetrocknete Substanzen wie PCR-Reagenzien oder Lysepuffer) konnten erfolgreich vom IMM gelöst werden. Die kontaktlose Detektion funktioniert sehr reproduzierbar, allerdings müssen noch weitere Schritte zur Integration der Elektronikkomponenten im Rahmen einer momentan laufenden Doktorarbeit über das Projektende von CAJAL4EU hinaus untersucht und getestet werden. Die Entwicklung des Elektronik-Mainboards sowie der modularen Platinen, welche mittels LabView-Software programmiert werden können, ermöglichen in Zukunft für das IMM eine einfache Umsetzung für automatisierte Demonstratoren.

Bei einigen Punkten kam es zu unerwarteten Verzögerungen (beispielsweise bei der Implementierung der nicht vorgesehen DNA-Amplifikation sowie Schwierigkeiten bei den CMOS-Biosensoren von NXP). Deswegen konnten einige Deliverables sowie Milestones nicht pünktlich erreicht werden. Dies führte letztendlich dazu, dass eine Umsetzung des finalen mikrofluidischen Designs in ein spritzgussfähiges Layout nicht mehr sinnvoll erschien, sowie eine vollständige Prozesskette von der Probenpräparation bis hin zum Auslesen mittels CMOS-Biosensor nicht mehr möglich wurde. Um die prinzipielle Funktionsfähigkeit der im Arbeitspaket 4 und 5 entwickelten Komponenten und Systeme bis hin zur Detektion zu zeigen, wurde deswegen als Backup-Plan die Integration einer Fluoreszenzmethode vollzogen.

Vergleicht man die im Projekt definierten Vorgaben, kann man sehen, dass die entwickelte Lösung die meisten Voraussetzungen bezüglich des prozessierbaren Probenvolumens, des minimalen Multiplexings sowie der geforderten Nachweisgrenze erfüllt. Nur bei der Assayzeit liegt man über der gewünschten Dauer von einer Stunde, da die Lyse [REDACTED], die DNA-Extraktion [REDACTED], DNA-Amplifikation [REDACTED] sowie die eigentliche Detektionszeit [REDACTED] deutlich mehr Zeit benötigen. Allerdings wurde das im Projekt entwickelte System auf Robustheit und nicht auf Schnelligkeit hin optimiert, sodass hierbei noch Potential für Verbesserungen gesehen wird.

|                          | Acceptable requirement                        | Conventional | Modules |
|--------------------------|---|--------------|---------|
| Sample type              | Whole blood                                   | +            | +       |
| Analyte                  | Pathogen nucleic acid (DNA)                   | +            | +       |
| Sample volume            | [REDACTED] (amplification step needed)        | +            | +       |
| Assay time               | [REDACTED]                                    | -            | -       |
| Multiplex                | No (single pathogens+ controls: n=3?)         | +            | +       |
| Lower Limit of Detection | [REDACTED]                                    | +            | +/-     |
| Quantitative/qualitative | Qualitative, any bacterial pathogen detection | +            | +       |

Abbildung 17: In CAJAL4EU definierte Vorgaben zur Detektion von Infektionserregern

## Berichtsblatt

|  |   |
|--|---|
| 1. ISBN oder ISSN  | 2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung)<br>Schlussbericht |
| 3. Titel<br>Abschlussbericht des Instituts für Mikrotechnik Mainz im Projekt - Chip Architectures by Joint Associated Labs for European Diagnostics (CAJAL4EU) mit dem Teilvorhaben: Technologien für die heterogene Integration und Massenfertigung von Lab-on-a-Chip-Systemen für die In-Vitro-Diagnostik  |   |
| 4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)]<br>Weizel, Knut<br>Althaus, Wolfgang<br>Gransee, Rainer   | 5. Abschlussdatum des Vorhabens<br>30.09.13                             |
|  | 6. Veröffentlichungsdatum<br>geplant                                    |
|  | 7. Form der Publikation<br>Noch offen                                   |
| 8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse)<br>Institut für Mikrotechnik Mainz GmbH - IMM<br>Carl-Zeiss-Straße 18-20<br>55129 Mainz   | 9. Ber. Nr. Durchführende Institution<br>P09096                         |
|  | 10. Förderkennzeichen<br>13N10926                                       |
|  | 11. Seitenzahl<br>29  |
| 12. Fördernde Institution (Name, Adresse)<br><br>Bundesministerium für<br>Bildung und Forschung (BMBF)<br>53170 Bonn   | 13. Literaturangaben<br>0   |
|  | 14. Tabellen<br>0   |
|  | 15. Abbildungen<br>17   |
| 16. Zusätzliche Angaben  |   |
| 17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)<br>Vorlage bei IBT folgt   |   |
| 18. Kurzfassung<br>Es werden Arbeitsergebnisse vorgestellt, die im Rahmen des von der EU und dem BMBF geförderten Verbundprojekts „Chip Architectures by Joint Associated Labs for European Diagnostics“ (CAJAL4EU) im Zeitraum von April 2010 bis September 2013 vom Institut für Mikrotechnik Mainz (IMM) erzielt wurden.<br>Ziel des Projekts war die Entwicklung von integrierten mikrofluidischen Systemen zur Detektion von DNA und Proteinen aus biologischen Proben mittels elektronischer Biosensoren. IMM entwickelte im Projekt eine modulare Elektronikplattform zur Ansteuerung von elektromechanischen Aktoren (Pumpen, Ventilen) sowie zur Kontrolle von Modulen zur Temperaturkontrolle der zum Auslesen benötigten Temperatursensoren. Zusammen mit den vom IMM ebenfalls im Projekt durchgeführten Adaptionen des Bioassays in eine mikrofluidische Kartusche erlaubten diese Arbeiten die Entwicklung eines Point-of-Care Systems zum Nachweis von Pathogenen aus einer Blutprobe. Außerdem verfolgte das IMM die Entwicklung von Gefriertrocknungstechnologien zur langzeitstabilen Reagenzienlagerung sowie die Entwicklung einer kontaktlosen kapazitiven Detektionstechnologie für Flüssigkeiten in mikrofluidischen Kanälen. |   |
| 19. Schlagwörter<br>Mikrofluidik, automatisierte Betreiberplattform, Blut, Infektionskrankheiten, CMOS-Biosensoren, Reagenzienlagerung , Lyse, Amplifikation, modulare Elektronik  |   |
| 20. Verlag   | 21. Preis   |

## Document Control Sheet

|  |  |
|--|--|
| 1. ISBN or ISSN  | 2. type of document (e.g. report, publication)<br>Report |
| 3. title<br>Final report for the project „ Chip Architectures by Joint Associated Labs for European Diagnostics (CAJAL4EU)” – with regard to the sub-tasks “Technologies for the heterogeneous integration and mass production of lab-on-a-chip systems for in-vitro diagnostics”  |  |
| 4. author(s) (family name, first name(s))<br>Welzel, Knut<br>Althaus, Wolfgang<br>Gransee, Rainer  | 5. end of project<br>30.09.13                            |
|  | 6. publication date                                      |
|  | 7. form of publication<br>Report                         |
| 8. performing organization(s) (name, address)<br>Institut für Mikrotechnik Mainz GmbH - IMM<br>Carl-Zeiss-Straße 18-20<br>55129 Mainz  | 9. originator's report no.<br>P09096                     |
|  | 10. reference no.<br>13N10926                            |
|  | 11. no. of pages<br>29                                   |
| 12. sponsoring agency (name, address)<br><br>Bundesministerium für<br>Bildung und Forschung (BMBF)<br>53170 Bonn   | 13. no. of references<br>0                               |
|  | 14. no. of tables<br>0                                   |
|  | 15. no. of figures<br>17                                 |
| 16. supplementary notes  |  |
| 17. presented at (title, place, date)<br>To be presented at IBT  |  |
| 18. abstract<br>The Institute of Microtechnology Mainz (IMM ) present results obtained in the framework of the EU- and BMBF-funded project "Chip Architectures by joint Associated Labs for European Diagnostics" ( CAJAL4EU ) in the period from April 2010 to September 2013. The aim of the project was the development of integrated microfluidic systems for the detection of DNA and proteins from biological samples using electronic biosensors. IMM developed in the project a modular electronics platform for the control of electromechanical actuators (pumps, valves,... ) and modules for temperature control, required for reading temperature sensors. Also, IMM carried out adaptations of laboratory bioassays into a microfluidic cartridge which allowed the development of a point-of-care system for the detection of pathogens from a blood sample. In addition, the IMM followed the development of freeze-drying technologies for long-term stable storage of reagents and the development of non-contact capacitive sensor technology for liquids in microfluidic channels. |  |
| 19. keywords<br>Microfluidics, automated platform, blood, infectious diseases, CMOS biosensors, reagents storage, lysis, amplification, modular electronics  |  |
| 20. publisher  | 21. price  |