

Schlussbericht des BMBF-Projektes „POCDENTAL“ (Systemec GmbH)

Bekanntmachung vom 05.09.2005: "Integrierte Mikrosysteme für biotechnologische Anwendungen" (bioMST)

Autor des Berichtes:

Jens Heitmann

Berichtszeitraum:

01.02.2007 – 30.06.2010

Am Projekt im Wesentlichen beteiligte Personen:

Dipl. Ing. Tilmann Wolter

Klaus Gerd Schoeler

M.Sc. Jens Heitmann

Dipl. Ing. Christoffer Mai

Vorhabensbezeichnung:

Point-of-care-System für die molekularbiologische Diagnostik von oralen Infektionen ("POCDENTAL")

Anschrift:

Systemec GmbH

Nottulner Landweg 90

48161 Münster

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Problemstellung	3
1.1 Aufgabenstellung	3
1.2 Voraussetzungen für die Durchführung des Vorhabens	3
1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens	4
1.4 Stand der Wissenschaft und Technik	6
1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen	7
1.6 Erfolge und geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses.	7
2 Ergebnisse	8
2.1 „Proof of principle“ (AP 17)	8
2.2 Machbarkeitsstudie zur Verfahrenstechnik (AP 6)	9
2.3 Design, Fertigung und Optimierung der DNA-Isolationseinheit (AP 7/8)	10
Meilenstein 3 (Funktionierende DNA-Isolationseinheit)	11
2.4 Design, Fertigung und Optimierung der PCR-Einheit (AP 9/10)	12
2.5 Entwicklung stationäres Steuer und Entwicklungsgerät (AP 11)	14
2.6 Kombination der DNA-Isolationseinheit und PCR-Einheit (AP 12)	15
Meilenstein 4 (Erfolgreiche Kombination der DNA-Isolationseinheit und PCR-Einheit) .	15
2.7 Optik (AP 13/13b)	16
2.8 Elektronik und Software (AP 14)	16
3 Anwendungspotenziale und Nutzbarkeit der Ergebnisse für KMU	17
4 Literaturverzeichnis	18
5 Abbildungsverzeichnis	19
6 Tabellenverzeichnis	20

1 Einleitung und Problemstellung

1.1 Aufgabenstellung

Im Rahmen des Verbundprojekts "POCDENTAL" soll ein hoch innovatives Mikrosystem für die molekularmedizinische Diagnostik von Infektionen im Dentalbereich bis zum Prototyp entwickelt werden. Der Prototyp wird die Basis für ein zukünftiges point-of-care-System (Vor-Ort-System) darstellen, mit dem die verantwortlichen Erreger der Erkrankungen Parodontitis, Karies, Wurzelkanalinfektion, periimplantäre Infektionen (Periimplantitis) und Orale Mykose schnell, spezifisch, sensitiv und dabei kostengünstig identifiziert werden können.

Im Diagnosesystem werden DNA-diagnostische Verfahren so optimiert und miniaturisiert, dass der Erregernachweis von der Probenaufarbeitung bis zur Auswertung automatisiert ablaufen kann. Das Diagnosesystem wird dazu aus einem Auswertegerät sowie aus dem dazu passendem Einwegmaterial bestehen. Das Einwegmaterial besteht dabei vorzugsweise aus einer für alle Krankheitsbilder einheitlichen Kunststoffkartusche, die je nach gewünschter Diagnostik durch den Kunden mit den entsprechenden Reaktionsreagenzien versehen wird.

1.2 Voraussetzungen für die Durchführung des Vorhabens

Die 1996 gegründete Systec Elektronik & Software GmbH verfügt über fundierte Kenntnisse in der Geräteentwicklung und Fertigung. Als mechatronisches Systemhaus liegen die Kompetenzen in der Elektronik, Mechanik und Software sowie in der Integration der drei genannten Felder.

Mit erfahrenen und kreativen Mitarbeitern (u.a. aus den Bereichen Elektrotechnik, Mikrosystemtechnik und Biomedizinische Technik) versteht sich Systec als Systemintegrator und entwickelt seit Jahren im Auftrag, im Projektverbund und für das eigene Vertriebsprogramm Steuerungen, Software, komplette Geräte und Systeme unter Berücksichtigung der einschlägigen Normen und EU-Richtlinien. Produktion und Systemtest in eigenen Räumen runden das Leistungsspektrum ab.

Systecs Kernkompetenz ist die Bewegungstechnik in allen technischen Ausprägungen inkl. der Steuerungs- und Messtechnik. So sind bei Systec Bewegungssysteme entstanden, die im Mikrometer-Bereich positionieren oder Konturen fahren. Gerade für die optische Messtechnik werden diese Systeme häufig eingesetzt. Systec hat zahlreiche Kunden, die Bewegungssysteme in medizinische bzw. biochemische Analyse-Systeme integriert haben. Im Rahmen der Zusammenarbeit bzw. Unterstützung bei der Integration dieser Systeme haben sich vielfältige mess- und verfahrenstechnische Kenntnisse angesammelt.

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Projekt sollte in der Zeit zwischen dem 01.02.2007 und dem 31.12.2009 stattfinden. Es wurde in Absprache mit dem Projektträger verlängert bis zum 30.6.2010.

Zuerst wurde eine Machbarkeitsstudie zur Verfahrenstechnik durchgeführt. Es wurden Recherchen zum Stand der Technik bzgl. Fertigungsverfahren und geeigneten Werkstoffe gemacht. Hier ging es insbesondere darum, die Möglichkeiten der Verbindungstechnik, verschiedenartige Stoffe und deren Verhalten bei Temperaturunterschieden zu bewerten. Des Weiteren erfolgte eine Untersuchung zur verfahrenstechnische Kopplung von Probenaufbereitung und PCR. Im Bereich der Probenaufbereitung sollen mit bis zu 100 µl relativ große Flüssigkeitsmenge bewegt werden, wobei Anforderungen an die gleichmäßige Durchmischung mit der Probe durch den biologischen Prozess gefordert waren. Im Bereich der PCR hingegen handelt es sich wieder um kleinste Flüssigkeitsmengen von 10 bis 20 µl, die aber wegen der Analyse exakt abgetrennt werden sollten.

Die Ergebnisse der Machbarkeitsstudie flossen in die Entwicklung der Kartusche ein und erste Testkartuschen zum Probenaufschluss und zur DNA-Isolation wurden gefertigt. Die Entwicklung von gut steuerbaren Mikroventilen stand dabei an zentraler Stelle. Die Mikrosystemtechnik im stationären Gerät sollte die Ventile und andere Funktionseinheiten prozessieren können. Die Steuerung der Ventile sollte berührungsfrei von den Substanzen bzw. der Probe in der Kartusche erfolgen.

Es wurden Untersuchungen zur magnetischen Separation bzw. Fixierung von "magnetic beads" durchgeführt. Hier bestand das Problem, eine Verklumpung zu verhindern, damit sich die Probe anlagern kann. Weiter mussten die "magnetic beads" sicher fixiert werden können ohne dabei die Mikrofluidik zu stören. Im nächsten Schritt wurde ein Verfahren entwickelt, um die aufgearbeiteten Proben homogen mit den verschiedenartigen Flüssigkeiten zu vermengen. Auf Grund der Sterilität muss die Vermischung von einer außerhalb des Kartuschengehäuses befindlichen Kinematik erfolgen.

Entwicklung einer sehr schnellen und extrem genauen Peltierelement-Temperaturregelung. Um möglichst in extrem kurzen Zeiten eine Erhitzung und Abkühlung zu erreichen, mussten Versuche zur Form der Temperierungselemente in Abhängigkeit der Kartusche durchgeführt werden. Wichtig war hierbei der Wärmeübergang von außen (Temperierungselemente im stationären Gerät) über die Kartusche auf die DNA.

Die Ergebnisse der Machbarkeitsstudie flossen ebenfalls in die Entwicklung der PCR-Kartusche ein und auch hier wurden erste Testkartuschen gefertigt. Zur Temperierung der Kartusche wurde das Prinzip der konstanten Wärmezonen verfolgt und in einem Prototyp umgesetzt. Eine Lösung für eine hochgenaue und schnelle PCR bot sich in der Realisierung von zwei oder drei Feldern mit verschiedenen Temperaturen an, auf die die Kartusche mit den Reaktionskavitäten geführt werden, um Geschwindigkeitsvorteile in den PCR-Zyklen zu erzielen. Hier galt es, das Problem der thermischen Ankopplung sowie der notwendigen Bewegungstechnik auf kleinstem Raum sicher zu lösen. Die Felder mussten hierzu sehr genau temperiert werden, die thermische Isolation der verschiedenen Temperaturzonen auf kleinstem Raum von einander musste sichergestellt werden.

Neben der Temperierung im Prototyp spielte die Integration der verschiedenartigen Subsysteme auf kleinsten Raum eine entscheidende Rolle. Die Subsysteme wie Temperierung, motorische Bewe-

gungstechnik, die Magnetfelderzeugung und die Optik mussten so gewählt werden, dass sie sich nicht gegenseitig störend beeinflussen. Die Mikrokontroller-Plattform musste entsprechend den Anforderungen gewählt werden, die Interface-Elektronik für die Subsysteme musste entwickelt werden, eine Software, die alles miteinander verknüpft, steuert und regelt wurde geschrieben. Die Kartusche musste zusammen mit den Aktoren und Sensoren des stationären Gerätes so konstruiert werden, dass die Kartusche sicher einzulegen ist und das stationäre Gerät mit seiner Steuerungs- und Regeltechnik die Verfahrens- bzw. Analysevorgänge in der Kartusche sicher durchführen kann. Wichtig dabei war die Robustheit gegen Verschmutzung, bedingt durch mögliche unsachgemäße Bedienung (Einsetzen der Kartuschen, Einbringen der Probe)

Die Kartusche musste konstruiert werden, Prototypen mussten zur Validierung gebaut und getestet werden. Erste Spritzgussformen wurden hergestellt, um die verschiedenen Aspekte wie Dichtigkeit und Schaltsicherheit von Ventilen zu überprüfen.

Die Entwicklung der Mensch-Maschine-Schnittstelle führte zur Programmierung einer intuitiv bedienbaren Software. Die mechanischen Schnittstellen (Öffnung zum Einführen der Kartusche, Verriegelung und Adaption der Kartusche an die Subsysteme des Gerätes) wurden hinsichtlich Präzision und Funktionssicherheit entwickelt.

Weiter wurde ein Fluidiksystem zur DNA-Isolation und PCR entwickelt. Die DNA musste isoliert werden und in exakt gleiche Fraktionen aufgeteilt werden und auf die PCR-Kavitäten verteilt werden. Da die PCR-Kavität erheblichen Temperaturschwankungen unterliegt, müssen thermisch bedingte Druck- und Volumenschwankungen bauartbedingt abgefangen werden.

Die Entwicklung der Optik musste auf das verwendete Markermolekül und dessen optischen Eigenschaften abgestimmt werden. Abhängig von der thermischen Kopplung der Reaktionskavitäten kam eine Auflichtmethode zur Anwendung. Alle Reaktionskavitäten mussten homogen beleuchtet werden. Hier galt es ein Optimum in der thermischen Kopplung für die PCR als auch der eindeutigen Farb- bzw. Intensitätsprüfung zu erzielen. In Abhängigkeit von der Menge des „PCR-Mastermix“ war die Flüssigkeitsmenge in den Reaktionskavitäten für die visuelle Analyse recht gering. Daher wurden umfangreiche Versuche mit verschiedenen Anordnungen und Ausführungen notwendig.

Arbeiten, die ohne endgültigen Erfolg abgeschlossen wurden, betreffen folgende Aspekte:

- Analyseergebnisse, die mit den bestehenden Labormustern generiert werden, entsprechen in Präzision, Zuverlässigkeit und Sensitivität noch nicht den gewünschten Anforderungen für eine erfolgreiche Vermarktung.
- Das angewendete Fertigungsverfahren ist für die zuverlässige Herstellung der Kartusche nicht geeignet, da es die angestrebte Beständigkeit nicht gewährleistet.
- Obwohl die Kartusche als integrierte DNA-Isolationseinheit und PCR-Einheit entworfen wurde, konnten die kombinierten Prozesse noch keine Messergebnisse liefern. Die fluidische Machbarkeit konnte jedoch bereits gezeigt werden
- Verifizierung und Validierung des Systems