



Bilder: IMMS

IMMS mit seinen Projektpartnern ist es erstmals gelungen, mit einem PSA-Immunassay direkt auf einem opto-elektronischen CMOS-Biochip das prostataspezifische Antigen (PSA) durch Lichtabsorptionsmessungen quantitativ nachzuweisen.

PSA-Nachweis direkt am Point-of-Care

Um das prostataspezifische Antigen (PSA) ohne Umweg ins Labor genau messen zu können, hat das IMMS ein mobiles Lesegerät mit einem auswechselbaren opto-elektronischen CMOS-Biochip erarbeitet. Gemeinsam mit Senova ist es gelungen, mit einem PSA-Immunassay das Antigen direkt auf dem Chip nachzuweisen und die erforderlichen Vorgaben zu erfüllen.

Autoren: siehe Kasten

Zur Diagnostik von Prostatakrebs wird für die Früherkennung, für Abklärungsuntersuchungen, das Monitoring von Therapien und in der Nachsorge unter anderem die Konzentration des prostataspezifischen Antigens (PSA) bestimmt. Wenige Nanogramm pro Milliliter (ng/ml) PSA geben Hinweise darauf, ob und wie weitere Untersuchungen und Behandlungen erfolgen sollten. Erhöhte PSA-Werte kön-

nen auf Krebs beziehungsweise auf dessen erneutes Auftreten hindeuten. Für den Nachweis nimmt der Arzt Blut ab und schickt die Probe ins Labor. Meist liegt erst einige Tage später die PSA-Konzentration als Ergebnis vor. Um zeit- sowie kostenaufwendige Laboruntersuchungen mit großen und komplexen Geräten zu vermeiden und die häufig auch psychisch belastenden Wartezeiten für Patienten zu minimieren, wird nicht nur für PSA-Messungen an immer neuen kompakten

sowie preiswerten Point-of-Care-Lösungen (PoC) gearbeitet.

Diese basieren in vielen Fällen auf Streifen-Tests, mit denen Ärzte direkt in ihrer Praxis aus mehr oder weniger intensiven und durch biochemische Reaktionen hervorgerufenen Farbumschlägen Konzentrationen ableiten können. In den letzten Jahren haben sich für die Messung PoC-Geräte etabliert, die dafür zum Beispiel Helligkeitssensoren oder eine Kamera nutzen. Die Geräte haben allerdings noch den Nachteil, dass sie ungenau

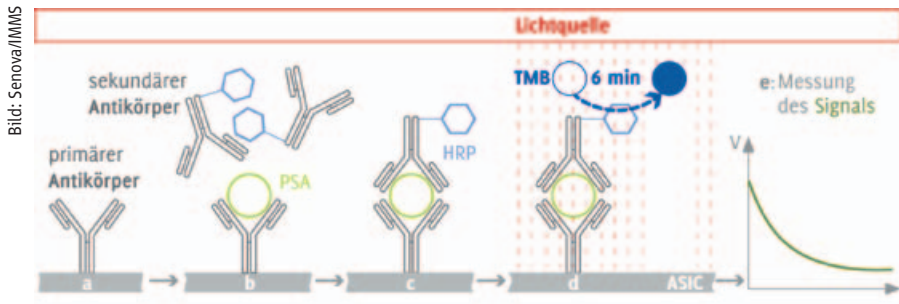


Bild 1. Grundprinzip für den quantitativen Nachweis des Analyten PSA mithilfe von immobilisierten primären Antikörpern, mit HRP markierten sekundären Antikörpern und Tetramethylbenzidin-Substrat-Lösung (TMB): Die HRP-TMB-Reaktion verändert durch einen Farbumschlag die Lichtintensität, die mit dem Chip gemessen wird.

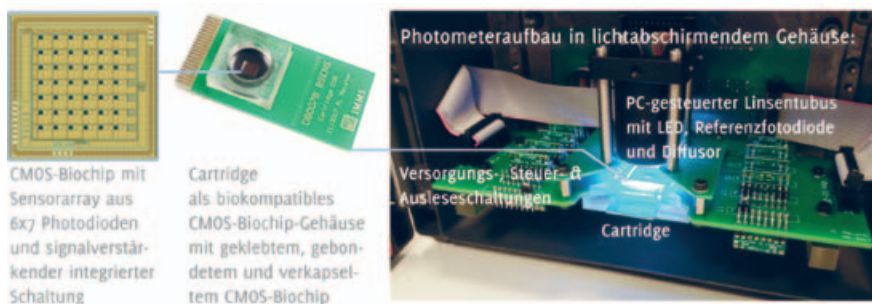


Bild 2. Der opto-elektronische CMOS-Biochip (links) lässt sich dank der Cartridge-Lösung (Mitte) auswechseln und im Photometraufbau (rechts) für Messungen nutzen.

im Vergleich zu Laboruntersuchungen sind. Im Fall von PSA-Messungen sehen die Vorgaben der »Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen – Rili-BÄK« neben einer Nachweisgrenze von 0,2 ng/ml auch einen Messbereich bis zu 50 ng/ml vor sowie für sichere Aussagen einen Variationskoeffizienten von maximal 15,5 Prozent.

Das IMMS hat im Projekt »INSPECT« (Akronym für Mikroelektronische Diagnostikplattformen für die personalisierte Krebsforschung und Mikro-Bioreaktoren) ein Photometer in Form eines mobilen Lesegeräts mit einem auswechselbaren opto-elektronischen CMOS-Biochip erarbeitet und als Demonstrator aufgebaut.

■ Mikroelektronik-basierter Demonstrator

Statt der bislang in einigen PoC-Geräten genutzten Teststreifen mit Kamera-basierter Auswertung wird eine Probe direkt auf den Mikroelektronik-Chip gegeben und die biochemische Reaktion ohne Abstände zwischen Probe und Lichtdetektor gemessen. Der Projektpartner Senova nahm die biochemische Funktionalisierung der Chip-Oberflächen mit immobilisierten Antikörpern für PSA vor und führte Messungen mit Proben unterschiedlicher PSA-Konzentra-

tionen mit dem Prototyp durch. Liegt PSA in der Probe vor, wird es mit biochemischen Reaktionen nachgewiesen, die je nach Konzentration die Probe unterschiedlich stark einfärben und als Helligkeitsunterschiede opto-elektronisch gemessen werden.

Senova und IMMS ist es damit erstmals gelungen, PSA auf einem CMOS-Biochip mit einer Detektionsgrenze von 0,1 ng/ml quantitativ nachzuweisen. Die Messungen erfüllen die für klinische PSA-Tests gemäß Rili-BÄK erforderlichen Vorgaben. Der Test mit dem CMOS-Biochip-System benötigt insgesamt 14 Minuten, die Ergebnisse werden digital bereitgestellt und können direkt über ein an das Gerät angeschlossenes PC weiterverarbeitet werden. Zum Vergleich: Mit Messungen an im Projekt für Referenzzwecke entwickelten PSA-Streifentests mit einem PoC-Lesegerät konnten die Rili-BÄK-Vorgaben nicht erreicht werden.

■ PSA-Immunoassay auf Mikroelektronik-Chip

Das biotechnologische Prinzip des neuen Testsystems ist vergleichbar mit dem von Lateral-Flow-Tests, also von gängigen Teststreifen. Mit einer Antikörper-Antigen-Wechselwirkung werden gezielt Analyten in einer Probe nachgewiesen. Das heißt, bei Prostatakrebs das PSA. Für

den Mikroelektronik-basierten Nachweis werden primäre Antikörper für PSA (anti-human PSA antibody), die sonst als Fängermoleküle auf Teststreifen aufgebracht werden, auf der Chip-Oberfläche aufrecht fixiert. Sie fangen PSA ein, sofern es in einer Probe enthalten ist. Für den Nachweis werden auch sekundäre Antikörper für PSA auf den Chip gegeben, die mit dem Meerrettich-Peroxidase-Enzym (HRP) markiert sind, und ebenfalls am PSA andocken. Dieses Sandwich aus primären Antikörpern, PSA, sekundären Antikörpern und HRP ist noch unsichtbar. Die markierten sekundären Antikörper, die nicht an die Oberfläche gebunden sind, werden mit einer Waschlösung weggespült. Im nächsten Schritt wird farblose Tetramethylbenzidin-Substrat-Lösung (TMB) hinzugefügt, die mit dem HRP reagiert und die unsichtbaren Antikörper-Antigen-Komplexe nach sechs Minuten durch einen blauen Farbumschlag sichtbar macht. Das verändert die optische Dichte, die mit dem Chip detektiert und ausgewertet wird. Hierfür wird zuerst die Lichtintensität vor der Reaktion gemessen und danach, wie stark das Licht durch die Farbmenge gedämpft wird. Der gesamte Prozess ist in Bild 1 dargestellt.

Für die optische Anregung und die Auswertung der Signale des Mikroelektronik-Chips hat das IMMS ein mobiles, lichtdicht verschlossenes Lesegerät entwickelt, das per USB-Kabel an einen PC angeschlossen ist. Dort lässt sich mit der am IMMS realisierten Software der Test steuern, die Daten werden angezeigt und weiterverarbeitet. Die Probe wird in die Reaktionskammer direkt auf den Chip gegeben, der auf einer kleinen Platine als Steckmodul (Cartridge) aufgebaut ist. Die Cartridge wird in das Gerät unter die Beleuchtungseinheit eingesteckt. Eine LED erzeugt in einem festen Abstand zum Chip homogenes Licht, das mit konstanter Intensität während der Reaktion die Probe ausleuchtet.

Das Lesegerät wurde zunächst mit einem bereits vorliegenden Chip betrieben, um Anforderungen und Randbedingungen für das Gesamtsystem und eine neu zu entwickelnde applikationsspezifische integrierte Schaltung (ASIC) abzuleiten. Der vorliegende Chip war ursprünglich für den Nachweis von Infektionskrankheiten und damit für andere Anwendungen entwickelt worden. Er beinhaltet eine Matrix aus 6 x 7 Photodioden (Bild 2, links) und ist damit für Forschungszwecke relativ groß gehalten.

ten. Er war einst realisiert worden, um parallel verschiedene Krankheitserreger durch die Messung von Lichtunterschieden zu detektieren.

■ Untersuchungen zur Optimierung

Das IMMS hat für die Entwicklung des Photometers mehrere Messaufbauten und Testsysteme mit dem Chip realisiert, um die Lichtabsorption von Proben sowie Linearität, Empfindlichkeit und Auflösungsgrenze des Photometers zu bestimmen und Einflussfaktoren wie die Erwärmung von Elektronik und Lichtquelle, konstante Beleuchtungsbedingungen, Verdunstungseffekte und Streulicht zu untersuchen. Auf dieser Basis integrierte das IMMS beispielsweise eine Lichtregelung in das Lesegerät. Dadurch konnte die Einschwingzeit des Gesamtsystems von mehr als 15 Minuten auf unter eine Minute erheblich verkürzt werden (Bild 3). Damit lassen sich systematische Messfehler verringern und die biochemischen Reaktionen sicherer nachweisen. Ursachen für die systematischen Messfehler liegen zum Beispiel in der Erwärmung der Elektronik und der LED sowie in der Verdunstung von Flüssigkeiten bei sehr hohen Lichtintensitäten. Die LED lässt sich vom Rechner mit der grafischen Nutzeroberfläche (GUI) einstellen, genauso wie die ASIC-Verstärkung, die Auswahl von Sensoren, Mittelwertbildung, Messwertpro-Zeiteinheit und Messdatenspeicherung. Über die GUI werden verschiedene Graphen bereitgestellt zur Auswertung der Regelung und der Messergebnisse (Bild 4).

Das optimierte Photometer wurde mit Cartridge-Aufbauten (Bild 2) an Senova übergeben, um das Messsystem mit dem prostataspezifischen Antigen (PSA) zu validieren. Senova hat die biochemische Funktionalisierung der Chip-Oberflächen mit immobilisierten Antikörpern für PSA vorgenommen, den PSA-Assay optimiert und Messungen mit Proben unterschiedlicher PSA-Konzentrationen durchgeführt. Wie in Bild 5 dargestellt, führt die stei-

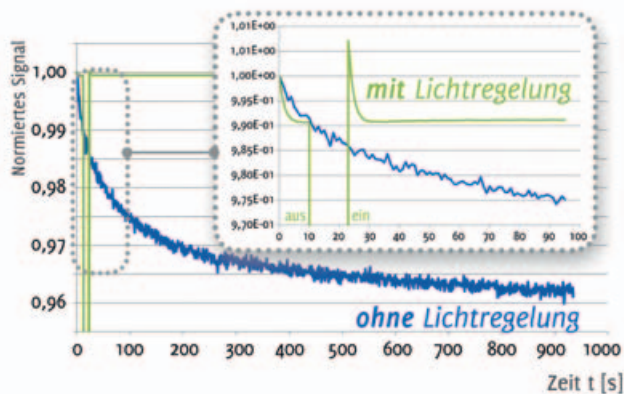


Bild 3. Vergleich des Systemverhaltens anhand des normierten Photostroms über 15 Minuten ohne (blau) und mit (grün) Lichtregelung über eine Referenz-Photodiode im Linsentubus über 100 Sekunden: Wenige Sekunden nach dem Ab-/Anschalten ist die Lichtquelle stabilisiert.

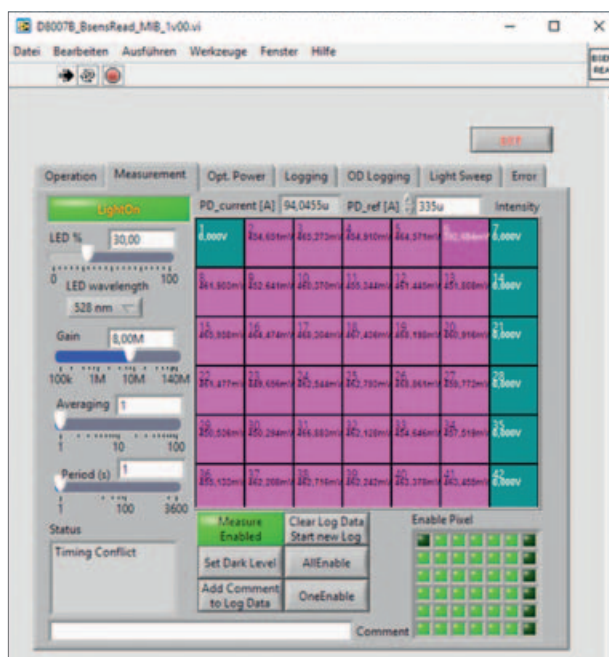


Bild 4. Grafische Nutzeroberfläche für die Regelung und Messung am Photometer, das per USB-Kabel an einen Rechner oder Laptop angeschlossen wird. Der Screenshot zeigt die Messwerte von Sensoren im Matrixformat.

gende PSA-Konzentration in der Probe zu abnehmenden Signalen bei optischen Messungen mit dem CMOS-Biochip. Die Experimente wurden fünfmal mit verschiedenen CMOS-Biochip-Cartridges mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. PSA ließ sich dabei mit einer Detektionsgrenze von 0,1 ng/ml nachweisen. Es wurden Variationskoeffizienten über die Experimente von 8,8 Prozent, 3,2 Prozent und 8,9 Prozent für 0,5 ng/ml, 5 ng/ml und 50 ng/ml PSA erreicht. Das Nachweissystem erfüllt damit die Vorgaben für die klinische Prüfung gemäß Rili-BÄK.

■ Opto-elektronischer CMOS-Biochip

Das IMMS hat auf der Basis von Untersuchungen mit dem Testsystem den speziell auf die Anwendung ausgerichteten ASIC D4021A entwickelt. Dieser Chip ist kleiner und kostengünstiger als jener für die Voruntersuchungen und hat eine Architektur, mit der genauere und rauschärmere Messungen möglich sind. Der D4021A enthält zudem einen Digitalteil zur Vorverarbeitung der analog erfassten Werte. Das vereinfacht die nachfolgende Signalverarbeitung und standardisierte Anbindung zu Informationsverarbeitungssystemen. Die digitalisierten Messsignale sind darüber hinaus robuster gegen äußere Störeinflüsse.

Der CMOS-Biochip besteht aus einer Sensormatrix aus 5×5 Photodioden (Bild 6). Einfallendes Licht wird durch die Photodiode in einen definierten Photostrom (IPD) umgewandelt und in einem

ÜBER DAS PROJEKT

Das diesen Ergebnissen zugrundeliegende Vorhaben »INSPECT« wurde vom Freistaat Thüringen unter der Nummer 2015 FE 9159 gefördert und durch Mittel der Europäischen Union im Rahmen des Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) kofinanziert. Projektpartner des IMMS Institut für Mikroelektronik- und Mechatronik-Systeme gemeinnützige GmbH (IMMS GmbH) sind die Senova Gesellschaft für Biowissenschaft und Technik mbH, die CDA GmbH, das Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V. und die X-FAB Semiconductor Foundries GmbH.

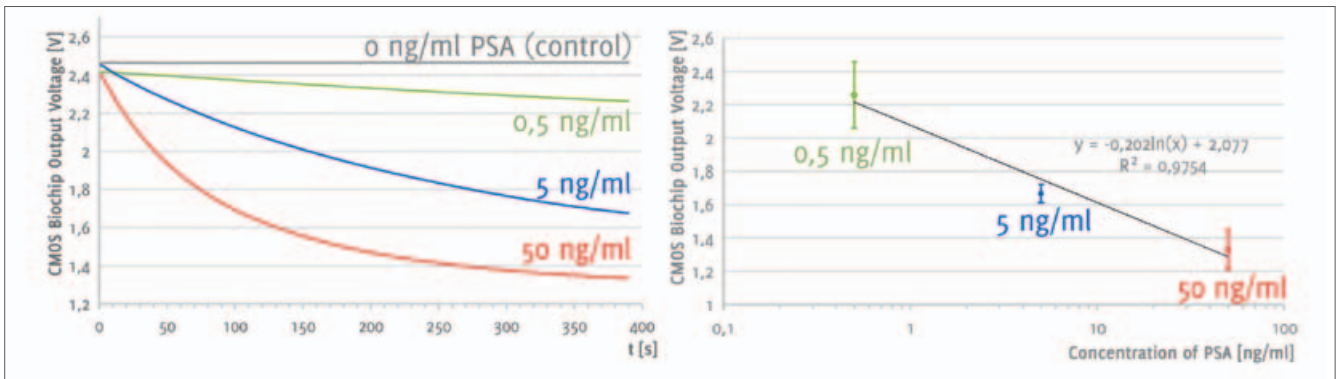


Bild 5. Abnehmende und gemittelte Ausgangssignale (V) von fünf CMOS-Biochips pro PSA-Konzentration während der Messungen, die nach der Zugabe von Substrat zum Immunassay beginnen. Rechts: Logarithmisch angepasste Kalibrierungskurve des PSA-Immunassays mit verschiedenen PSA-Konzentrationen, die nach sechs Minuten gemessen wurden.

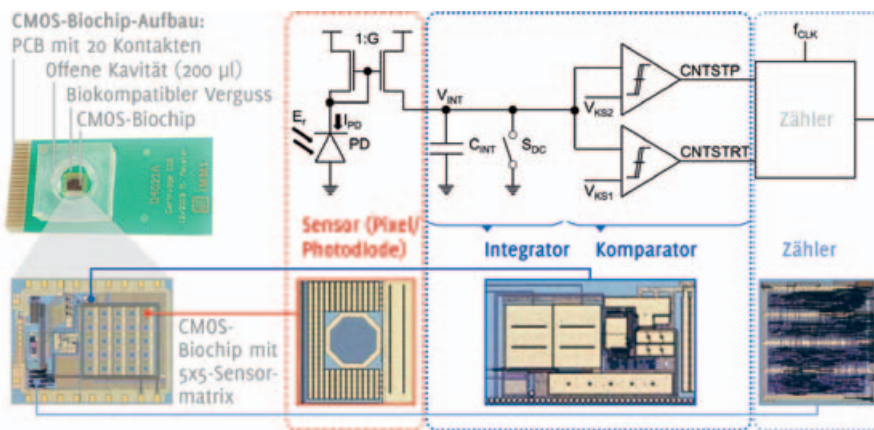


Bild 6. CMOS-Biochip-Aufbau, Chipfoto und Blockschaltbild des CMOS-Biochips D4021A.

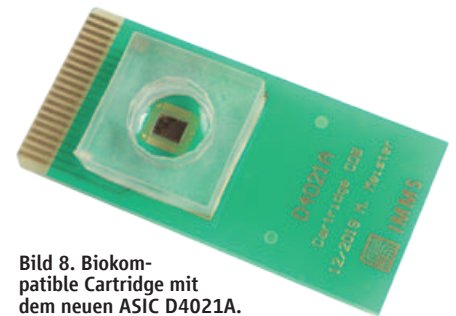


Bild 8. Biokompatible Cartridge mit dem neuen ASIC D4021A.

es möglich, vom eintreffenden Licht generierte Photoströme über einen großen Signal- beziehungsweise Dynamikbereich rauscharm zu verarbeiten und ein sehr gutes Signal-zu-Rauschverhältnis zu erhalten.

Zehn Wafer mit jeweils circa 600 D4021A-Schaltungen sind im Wafertest auf Grundfunktionen wie Kontaktierbarkeit, Betriebsstrom, Testspannungen, Signalverarbeitung und spezielle Funktionen überprüft worden. Darüber hinaus wurden Muster für biokompatible Cartridges mit dem neuen ASIC entwickelt und aufgebaut (Bild 8). Der aufgebaute ASIC erreichte bei ersten Charakterisierungsmessungen mit rotem Licht der Wellenlänge von 617 nm einen Dynamikbereich von 114 dB. Er erlaubt damit eine um 2,5 Größenordnungen höhere Signalbereichsabdeckung optischer Dichten von 2,8 bis 0,0004 als der bislang für die Voruntersuchungen verwendete Chip. Die Detektionsgrenze ist damit um den Faktor 25 besser. Einstellungsmöglichkeiten am neuen ASIC sowie am optischen System bieten diesbezüglich zudem noch weiteres Optimierungspotential.

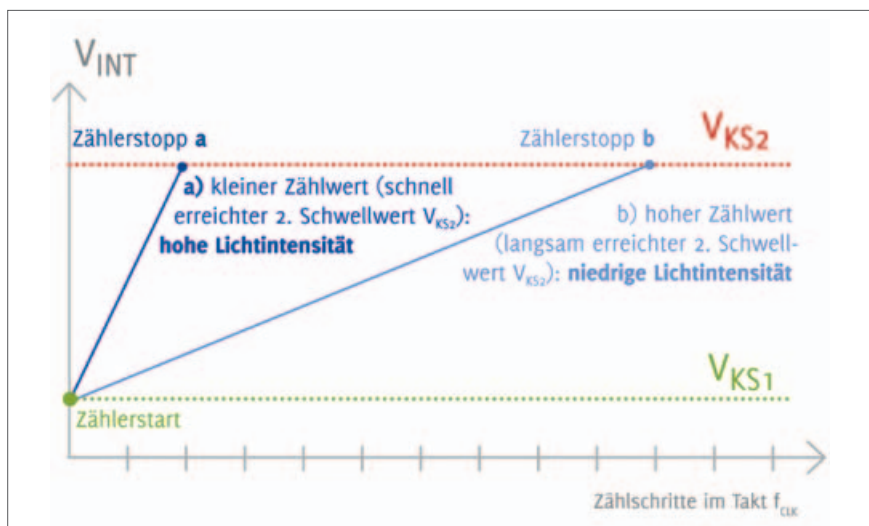


Bild 7. Illustration des Zählerprinzips am Beispiel hoher (a) und niedriger (b) Lichtintensitäten: In einem Takt der festgelegten Frequenz f_{CLK} wird so lange gezählt, bis die Integrationsspannung den zweiten Schwellwert erreicht hat und der Zähler somit gestoppt wird.

Stromspiegel verstärkt. Dieser wird auf der Kapazität (CINT) integriert, wodurch die Integrationsspannung (V_{INT}) ansteigt. Zwei Komparatoren und ein Zähler digitalisieren dann das Signal. Zwei festgelegte Schwellreferenzspannungen (V_{KS1} und V_{KS2}) sorgen dafür, dass die Komparatoren den Zähler starten beziehungsweise stoppen, sobald

die Integrationsspannung den jeweiligen Schwellwert erreicht hat (Bild 7). Der Zählwert ist umgekehrt proportional zu der vom Sensor empfangenen Lichtintensität. Werden wenige Taktzyklen gezählt, also der zweite Schwellwert schnell erreicht, liegt eine entsprechend hohe Lichtintensität vor. Mit diesem Signalverarbeitungskonzept ist

DIE AUTOREN

Alexander Hofmann*, Michael Meister*, Alexander Rolapp*, Peggy Reich*, Friedrich Scholz**, Eric Schäfer* (* IMMS, ** Senova)