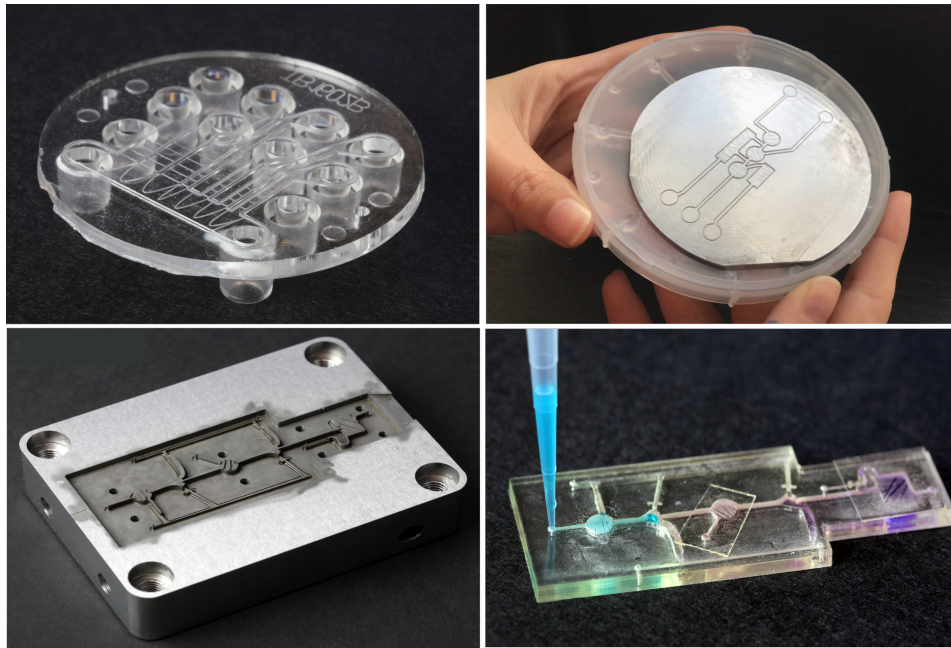




Ph.D. Thesis

Low-cost polymer chip for isothermal amplification assay

Francesca Garbarino



Supervisor: Mikkel Fougth Hansen, Associate Professor

Co-supervisor: Gabriel Khose Antonio Minero, PhD

Department of Micro and Nanotechnology
Technical University of Denmark

14 November 2018

Abstract

There is an increasing need to optimize diagnostics and health care and to develop methods to deliver the care closer to the patient's homes, in order to reduce the load on hospitals and clinics. In developing countries it is a challenge to obtain effective diagnosis and treatment for outbreaks of infectious diseases, such as influenza and tuberculosis, where the latter is causing more deaths than any other infectious disease. Point-of-care systems based on microfluidic devices have the potential to fulfill some of these needs and new technologies based on DNA amplification are continuously emerging and are under implementation on such devices.

For these technologies to be competitive, devices need to be fabricated through low-cost mass-production processes, e.g. by injection moulding. In academia, though, often the fabrication methods are not compatible with industrial mass-production and this can present a significant barrier to the commercialization of developed devices. It is therefore vital to seek a manufacturing process applying industry-level technologies for rapid prototyping of microfluidic devices.

The research presented in this thesis focused on three main topics: First, a microfluidic system was designed that used capillary structures to ensure controlled filling of separate, but connected, fluidic chambers. The filled liquids needed to remain stable under heating to the temperature required for the assay below.

Second, microfluidic chips were fabricated using either injection moulding with shims defined by micromilling combined with ultrasonic welding to seal the chips or by using laser ablation combined with adhesive bonding. The fabricated chips were characterized and the burst pressure of so-called phaseguide structures was studied systematically. At the end of the project, the design of functional prototype chips developed using laser ablation was transferred to a mass-production fabrication process by injection moulding.

Third, an integrated lab-on-a-chip system implementing isothermal rolling circle amplification of synthetic influenza and tuberculosis nucleic acid targets on the chip platform was developed and demonstrated. The assay was run in an automated setup in which magnetic microbeads were used to transport the target between the different assay steps and the amplification products were detected using an optomagnetic readout. Several assay strategies were investigated and quantitative dose-response curves were measured. The results demonstrated the feasibility of performing the complete three-step assay in a low-cost mass-producible multi-chamber device in an automated manner with results that were comparable to those obtained in comparable laboratory assays.

Resumé

Der er et voksende behov for at optimere diagnostik og sundhedspleje og for at udvikle metoder til at få behandling tættere patienters hjem så belastningen af hospitaler og klinikker reduceres. I udviklingslande er det en udfordring at få en effektiv diagnose og behandling ved udbrud af infektionssygdomme som influenza og tuberkulose, hvor tuberkulose forårsager flere dødsfald end nogen anden infektionssygdom. 'Point-of-care' apparater baseret på mikrovæske-systemer har potentialet til at opfylde nogle af disse behov og nye teknologier baseret på DNA amplificering udvikles hele tiden og implementeres i sådanne apparater.

For at disse teknologier er konkurrencedygtige, skal chips fremstilles ved brug af billige masseproduktionsmetoder, såsom sprøjttestøbning. I den akademiske verden, imidlertid, bruges ofte fabrikationsmetoder som er uegnede til masseproduktion og dette kan udgøre en betydelig barriere for kommercialiseringen af de udviklede apparater. Det er derfor vigtigt at søge processer til fremstilling af prototyper af mikrovæske-systemer, som kan omsættes til industriel produktion.

Arbejdet i denne afhandling fokuserede på tre hovedemner: For det første, så blev et mikrovæske-system designet, som brugte kapillær-strukturer til at sikre en kontrolleret fyldning af forbundne væskekamre med adskilte væsker. Væskerne i de enkelte kamre skulle være stabile ved opvarmning til de temperaturer, der var nødvendige for bioanalysen nedenfor.

For det andet, så blev mikrovæske-chips fremstillet ved brug af enten sprøjttestøbning med indsatser defineret med mikrofræsning kombineret med ultralydssvejsning til at forsegle chipsene. De fremstillede chips blev karakteriseret og gennembrudstrykket af såkaldte 'phaseguide' strukturer blev studeret systematisk. Ved afslutningen af projektet blev designet af en funktionel mikrovæske-chip prototype fremstillet ved brug af laserforstøvning overført til masseproduktion ved sprøjttestøbning.

For det tredje, så blev et integreret lab-on-a-chip system designet og demonstreret, som udførte isotherm amplificering af syntetisk DNA fra influenza og tuberkulose ved såkaldt 'rolling circle amplification'. Bioanalysen blev udført i en automatiseret opstilling i hvilken magnetiske mikropartikler blev brugt til at transportere analyten mellem de forskellige analysetrin, og reaktionsprodukterne blev detekteret ved en optomagnetisk udlæsnings-teknologi. Flere analysestrategier blev undersøgt og kvantitative målinger af signal vs. analytkoncentration blev udført. Resultaterne demonstrerede at det er muligt at udføre en komplet og automatiseret tre-trins bioanalyse i en billig masseproducerbar multi-kammer chip med resultater som er sammenlignelige med de, der kan opnås i tilsvarende laborato-

rieanalyser.