

EINZELZELLANALYTIK
IN
MIKROFLUIDIK-SYSTEMEN

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Wibke Hellmich

Fakultät für Physik

Universität Bielefeld

Juni 2006

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und dabei keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Bielefeld, den 12. Juni 2006

(Hellmich, Wibke)

Gutachter:

Prof. Dr. Dario Anselmetti

Prof. Dr. Markus Sauer

Abgabedatum der Arbeit: 12. Juni 2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretischer Hintergrund	5
2.1	Zellen	5
2.2	Proteine	6
2.3	Grundlagen der Mikrofluidik	8
2.3.1	Grenzflächenphänomene	8
2.3.2	Reynoldszahl und Laminarer Fluss	10
2.3.3	Hydrodynamischer Fluss	11
2.3.4	Elektroosmose	12
2.3.5	Elektrophorese	18
2.4	Mikrochip-Elektrophorese	19
2.4.1	Injektion	20
2.4.2	Effizienz von elektrokinetischen Trennungen	23
2.5	Fluoreszenzdetektion von Proteinen	24
2.6	Prinzip der Optischen Pinzette	29
3	Material und Methoden	33
3.1	Material	33
3.2	Präparation des Mikrofluidik-Chips	34
3.2.1	Herstellung des SU-8 Masterwafers	34
3.2.2	Fertigstellung des Mikrofluidik-Chips	35
3.2.3	Oberflächenbehandlung mittels Sauerstoffplasma	37
3.3	Experimenteller Aufbau	38
3.4	Mikrofluidik-Steuerung	40
3.5	Oberflächenbehandlung und -charakterisierung	42
3.5.1	Oberflächenbeschichtung	42

3.5.2	Kontaktwinkel	42
3.5.3	Rasterkraftmikroskopie	43
3.5.4	Elektroosmotischer Fluss	44
3.5.5	Proteinadsorption	44
3.6	Optische Pinzette	45
4	Ergebnisse und Diskussion	47
4.1	Funktionalisierung der PDMS Oberfläche	47
4.1.1	Oxidation der PDMS Oberfläche	47
4.1.2	Kovalente Bindung von Polyoxyethylenglykolen (POE)	51
4.1.3	Adsorption von Triblock-Copolymeren auf PDMS Oberflächen	54
4.1.4	Einfluss der POE Beschichtungen auf die Elektroosmose	57
4.1.5	Auswirkungen von F108 auf die Proteinadsorption	61
4.2	Native Fluoreszenzdetektion	64
4.2.1	Detektionssensitivität	64
4.2.2	Proteintrennung und -detektion	70
4.3	Einzelzellanalytik im Mikrofluidik-Chipformat	75
4.3.1	Selektion und Transport einzelner Zellen	76
4.3.2	Zell-Lyse	78
4.3.3	Einzelzelldetektion	80
5	Zusammenfassung & Ausblick	87
	Publikationsliste	89
	Literaturverzeichnis	91
	Danksagung	103

1 Einleitung

Seit der weitestgehenden Entschlüsselung des menschlichen Genoms nimmt die Systembiologie in den Biowissenschaften einen immer größeren Stellenwert ein. In diesem interdisziplinären Forschungsgebiet beschäftigen sich verschiedene Fachrichtungen von der Biologie, Chemie, Physik, Mathematik bishin zur Informatik damit, ein ganzheitliches Verständnis zellulärer Zusammenhänge zu erlangen [1–3]. Eine wesentliche Grundlage dafür bildet die Analyse des Proteoms¹, da die Proteine eine Vielzahl von Funktionen innerhalb der Zelle steuern. Die derzeitigen Untersuchungsmethoden auf diesem Gebiet basieren auf der Analyse von Ensembles aus typischerweise $10^5 - 10^6$ Zellen, so dass Zell-Zyklus abhängige und durch äußere Einflüsse verursachte Effekte, die Subpopulationen hervorbringen, aufgrund der Mittelung über das Ensemble nicht berücksichtigt werden können. Im Gegensatz dazu bietet die Einzelzellanalytik die Möglichkeit, u.a. die metabolische Zusammensetzung und biologische Aktivität einzelner Subpopulationen zu untersuchen.

Die System Nanobiologie [5] bildet mit den Methoden der Mikrofabrikation und der Nanotechnologie eine Erweiterung der Systembiologie, mit der neue Techniken für die Handhabung, Manipulation, Analyse und Detektion von einzelnen Molekülen und Zellen zur Verfügung gestellt werden. Mikrofluidik-Systemen kommt dabei eine besondere Bedeutung zu, da sie die Integration dieser vielfältigen Funktionen ermöglichen und Ansätze für die Realisierung miniaturisierter Labore bieten [5–10]. Das Konzept für solche Miniaturlabore (Lab-on-a-Chip bzw. micro total analysis systems μ -TAS) wurde von Manz et al. 1990 formuliert [11], mit deren Veröffentlichung zeitgleich die rasante Entwicklung auf diesem Gebiet einsetzte. Zu den Vorteilen dieser Systeme zählt zum einen die Reduktion der benötigten Probenmenge durch die Skalierung in den Mikrometerbereich. Für pharmazeutische und medizinische Anwendungen ist speziell dieser Aspekt von Bedeutung, da Substanzen oftmals teuer und nur in geringen Mengen verfügbar

¹Als Proteom bezeichnet man im Allgemeinen die Gesamtheit der von einer Zelle unter exakt definierten Bedingungen exprimierten Proteine [4].

sind. Ferner können Reaktionen und Analysen effizienter durchgeführt werden, da äußere Einflüsse wie thermische Effekte aufgrund des gesteigerten Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses besser kontrollierbar sind. Zusätzlich ermöglicht die gute Wärmeableitung die Verwendung hoher elektrischer Felder, was eine Verkürzung der Analysezeiten bedeutet. Der Einsatz günstiger Materialien wie z.B. biokompatibler Kunststoffe ermöglicht, Mikrofluidik-Chips in hoher Stückzahl zu einem geringen Preis zu produzieren. Insgesamt bieten mikrofluidische Systeme ein hohes Potenzial sowohl für die wissenschaftliche als auch für die industrielle Verwendung [12]. Mögliche Einsatzgebiete stellen die klinische Diagnostik, Pharmazie, Umwelttechnologie, Forensik, etc. dar [8]. Für das Marktpotenzial mikrofluidisch basierender Systeme wird laut der aktuellen Marktanalyse für MEMS und Mikrosystemtechnik III [13] eine Steigerung von \$620 Millionen im Jahr 2004 auf \$1.4 Milliarden in 2009 erwartet.

Die Proteinelektrophorese stellt eine der häufigsten Analysemethoden dar, welche in mikrofluidische Systeme integriert wurde [14–17]. Das Prinzip basiert auf der Auftrennung der Proteine in freier Lösung oder in Gelen aufgrund unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilitäten im elektrischen Feld. Für den Nachweis der Proteine wird häufig die Laser-Induzierte Fluoreszenz (LIF) verwendet, die eine sensitive Methode mit Detektionsgrenzen bis in den fM-Bereich darstellt [H3,18–21]. Neben dem zusätzlichen Präparationsschritt erweist sich diese Methode aufgrund der möglichen Existenz fluoreszenter Derivate als nachteilig, da die elektrophoretische Auftrennung und Identifizierung erschwert wird [15, 22]. Einen alternativen Ansatz stellt die Verwendung der nativen Fluoreszenz zum Nachweis der Proteine dar. Die Methode basiert auf der Detektion der im UV-Bereich anregbaren Aminosäuren Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr) und Tryptophan (Trp).

Erste Ansätze eines Protein-Fingerabdruckes einzelner Zellen sind von der Gruppe um N. Dovichi mittels Kapillargelelektrophorese im 1-D [23, 24] und 2-D Format [25] realisiert worden, wobei die LIF-Detektion der Proteine im Sichtbaren (VIS-LIF) erfolgte. In Mikrofluidik-Systemen ist bis dato nur die Auftrennung und Detektion von Farbstoffen [26, 27], eines kleinen Peptids [28] und eines Vitamins [29] aus einzelnen Zellen bekannt. Kürzlich konnte die Enzymaktivität einzelner Zellen ohne Cytolyse elektrochemisch nachgewiesen werden [30].

In dieser Arbeit wird ein Konzept zur Proteinanalytik einzelner Zellen in Mikrofluidik-Systemen vorgestellt, bei dem die verschiedenen Schritte von der Selektion und Navigation der Zelle über die Lyse bishin zur abschließenden elektrophoretischen Auftrennung und Detektion in einem Mikrofluidik-Kanalsystem durchgeführt werden. Dafür werden zunächst Strategien zur Prävention der Proteinadsorption an Oberflächen untersucht.

Im Speziellen werden Oxidationsverfahren sowie kovalente und durch Adsorption hervorgerufene Beschichtungen der Polydimethylsiloxan (PDMS) Oberfläche mit Polyoxyethylenglykolen (POE) charakterisiert (siehe Kap. 4.1). Ferner wird ein robustes Detektionssystem, basierend auf einem invertierten Epifluoreszenzmikroskop, zur UV-LIF von Aminosäuren und Proteinen in PDMS/Quarz Mikrofluidik-Kanälen vorgestellt (siehe Kap. 4.2). Abschließend werden die bis dato ersten Einzelzellektropherogramme von Proteinen mit VIS-LIF- und UV-LIF-Detektion demonstriert (siehe Kap. 4.3).

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Zellen

Alle lebenden Organismen sind aus Zellen aufgebaut, wobei diese die kleinste lebensfähige Einheit darstellen. Unter lebensfähig versteht man die Fähigkeit, sich selbst zu reproduzieren, einen Stoffwechsel zu besitzen und auf äußere Reize zu reagieren. Zellen entstehen durch Zellteilung aus anderen Zellen und werden durch eine Plasmamembran nach außen abgegrenzt. Es existieren zwei verschiedene Zellarten, die *prokaryontischen* und die *eukaryontischen* Zellen. Zu den Prokaryonten gehören die Bakterien wie Eu- und Archaeobakterien, während zu den Eukaryonten Pilze, Pflanzen, Tiere und Menschen zählen. Bei den Eukaryonten kommen neben den Einzellern auch Mehrzeller wie der Mensch mit $> 10^{13}$ Zellen vor [31]. Das wichtigste Unterscheidungsmerkmal der Eukaryonten gegenüber den Prokaryonten stellt der Besitz eines Zellkerns und weiterer Organellen (Mitochondrien, Lysosomen, etc.) dar [31, 32]. Aus diesem Grund weisen eukaryontische Zellen eine größere Spezialisierung und Komplexität von Strukturen und Funktionen auf, während prokaryontische eine relativ einfache Struktur besitzen. Die typische Größe einer prokaryontischen Zelle wie etwa ein Bakterium liegt bei ca. 1 - 5 μm , während eukaryontische Zelle 10 - 100 μm groß sind [33]. In Abbildung 2.1 ist der Zellaufbau einer prokaryontischen Zelle (Bakterium) und einer eukaryontischen Zelle am Beispiel einer tierischen Zelle gezeigt [31]. Beide Zellarten haben als wesentliche Bestandteile unter anderem die Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribosomen und das Cytoplasma gemein. Letzteres wird speziell bei Eukaryonten als der zentrale Reaktionsraum der Zelle bezeichnet, da dort wichtige Stoffwechselfvorgänge stattfinden. Die Masse einer lebenden eukaryontischen Zelle (tierische Zelle) wird größtenteils vom Wasser (ca. 70%) ausgemacht, so dass eine Zelle typischerweise eine Masse im ng-Bereich besitzt. Auf die Lipide entfallen ca. 5% der Masse, während die Proteine ca. 15% ausmachen [33]. Unter der Annahme einer mittleren molekularen Masse von 40 kDa entspricht letzteres einem typischen Proteinanteil von 75 pg (w/w) an der Gesamtzelle (0.5 ng) bzw. 2 fmol oder 10^8

Molekülen. Für ein selten vorkommendes Protein, welches in einer mikromolaren Konzentration in der Zelle vorliegt, ergibt sich ein attomolarer Anteil, was 10^5 Molekülen bzw. Kopien entspricht. Die erforderliche Detektionssensitivität für solche Proteine liegt bei einer Konzentration von ca. 100 nM, wenn man eine Zelle der Größe von $10 \mu\text{m}$ in einem $10^3 \mu\text{m}^3$ Würfel annimmt. Innerhalb der Zelle üben die Proteine vielfältige funktionelle und strukturelle Aufgaben wie beispielsweise die enzymatische Katalyse, die Regulation der Ionenkonzentrationen, etc. aus.

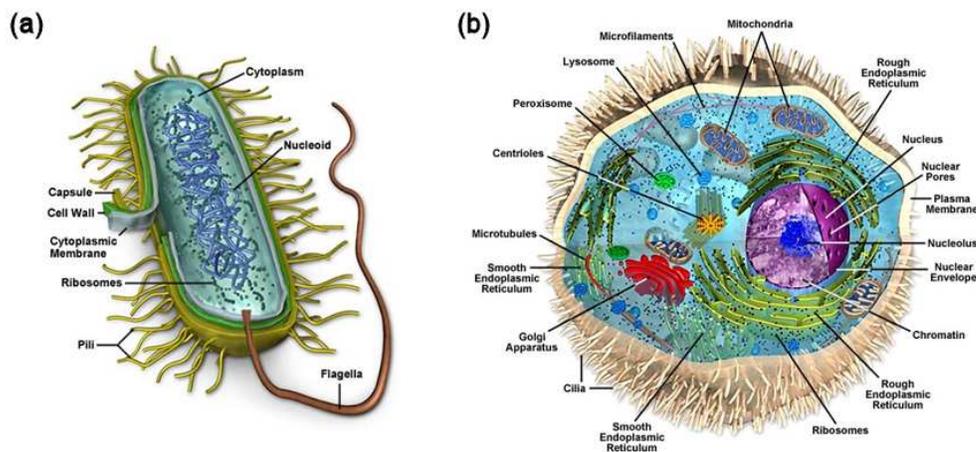


Abbildung 2.1: Aufbau einer (a) prokaryontischen und einer (b) eukaryontischen Zelle [31]

Als Beispiele für eine prokaryontische und eukaryontische Zelle sind ein Bakterium und eine tierische Zelle gezeigt. Das wichtigste Unterscheidungsmerkmal der Eukaryonten gegenüber den Prokaryonten stellt der Besitz eines Zellkerns und weiterer Organellen (Mitochondrien, Lysosomen, etc.) dar.

2.2 Proteine

Die Primärstruktur der Proteine besteht aus einer kovalent miteinander verknüpften Kette von Aminosäuren. Die Aminosäure setzt sich aus einer Carbonsäure, einer Aminogruppe und einem variablen Rest am α -C-Atom zusammen. Insgesamt existieren 22 natürliche Aminosäuren, welche sich in der Größe, Gestalt, Ladung und chemischen Reaktivität der Reste unterscheiden. In Lösung hängt die Ladung einer Aminosäure vom pH-Wert ab. Bei saurem pH-Wert liegt die Aminogruppe zumeist protoniert (NH_3^+) vor, während in einer alkalischen Lösung die Carboxylgruppe dissoziiert ist (COO^-). Im Fall

eines neutralen pH-Wertes sind beide Gruppen ionisiert, man bezeichnet eine Aminosäure dann als dipolares Ion oder Zwitterion (siehe Abb. 2.2). Des Weiteren besitzen bei

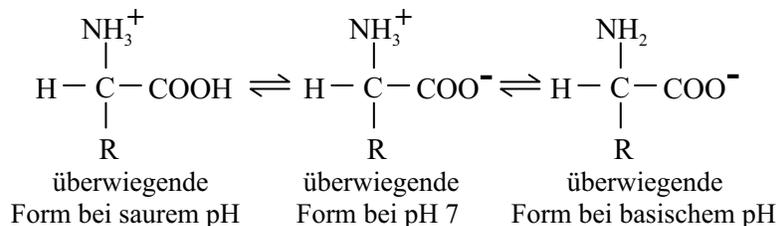


Abbildung 2.2: Ladungszustand einer Aminosäure in Abhängigkeit vom pH-Wert

einem bestimmten pH-Wert die Seitenketten Einfluss auf den Nettoladungszustand einer Aminosäure. Während Aminosäuren mit basischen Seitenketten wie Lysin und Arginin bei neutralem pH-Wert positive Ladung tragen, sind Asparaginsäure und Glutaminsäure (saure Seitenketten) negativ geladen.

Durch Kondensation der Aminogruppe einer Aminosäure mit der Carboxylgruppe einer anderen entsteht unter Wasserabspaltung eine Peptidbindung. Abhängig von der Anzahl K der über Peptidbindungen verknüpften Aminosäuren wird unterschieden zwischen einer Polypeptidkette ($K < 100$) oder einem Protein ($K \geq 100$). Dabei bilden einzelne Bereiche des Proteins durch Wasserstoffbrückenbindung stabilisierte Konformationen aus. Diese räumliche Anordnung wird als Sekundärstruktur des Proteins bezeichnet. Als regelmäßige Strukturen ergeben sich α -Helices, β -Faltblätter, *Turns* und Schleifen. Die übergeordnete dreidimensional gefaltete Konformation des Proteins wird durch die Tertiärstruktur beschrieben. Diese Anordnung ist für die biologische Funktion des Proteins grundlegend wichtig. Proteine, die aus mehr als einer Polypeptidkette bestehen, bilden durch nicht kovalente Wechselwirkungen symmetrische Komplexe. Diese Struktur bezeichnet man als Quartärstruktur, wobei jede beteiligte Polypeptidkette als Unter-einheit beschrieben wird.

Für den Nettoladungszustand eines Proteins müssen die Seitenketten der Aminosäuren sowie die endständigen α -Aminogruppen und -Carboxylgruppen berücksichtigt werden. Das amphotere Verhalten, d.h., die Abhängigkeit des Ionisationsverhaltens vom pH-Wert, stellt eine charakteristische Größe für ein Protein dar. Der pH-Wert, an dem sich positive und negative Ladungen eines Proteins kompensieren, wird als isoelektrischer Punkt (pI) bezeichnet. Unterschiedliche pI-Werte resultieren aus einer unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung. Abhängig vom pH-Wert der Lösung, in der sich die Pro-

teine befinden, kann so der Nettoladungszustand der Proteine gesteuert werden. Für pH-Werte kleiner als der pI-Wert liegen die Proteine mit positiver Nettoladung vor, während sie für größere Werte negativ geladen sind.

2.3 Grundlagen der Mikrofluidik

Mikrofluidik-Systeme bieten neben kurzen Analysezeiten und einem geringen Probenverbrauch den Vorteil, vielfältige Funktionen, wie Injektion, Manipulation, Auftrennung und Detektion integrieren zu können [14, 17, 34, 35]. Für die effiziente Analyse von biologischen Gemischen in solchen Systemen spielen die Kenntnisse über das Strömungsverhalten in den Kanälen eine entscheidende Rolle. Denn mit der Verringerung der Dimensionen treten neue physikalische Effekte in den Vordergrund, die makroskopisch nicht zum Tragen kommen. Im Folgenden wird auf diese Effekte eingegangen.

2.3.1 Grenzflächenphänomene

Die Oberflächenspannung γ beschreibt den an Grenzflächen vorkommenden Effekt des Bestrebens nach minimaler Oberfläche. Sie ist definiert als $\gamma = \Delta E / \Delta A$, wobei ΔE die Energie beschreibt, die bei konstantem Druck und konstanter Temperatur zur Vergrößerung der Flüssigkeitsoberfläche um ΔA erforderlich ist. Die Ursache des Bestrebens nach minimaler Oberfläche liegt in der attraktiven Wechselwirkung der Moleküle untereinander (Kohäsion). Abb. 2.3(a) zeigt die molekularen Wechselwirkungen für ein Molekül im Innern und an der Grenzfläche einer Flüssigkeit. Innerhalb der Flüssigkeit heben sich die auf die Moleküle wirkenden Anziehungskräfte untereinander auf, während die Moleküle an der Grenzfläche aufgrund fehlender Wechselwirkungspartner eine ins Innere zeigende Kraft erfahren. Die Flüssigkeit ist bestrebt, ihre Oberfläche zu minimieren. Ein anschauliches Beispiel dieses Prinzips stellt die Kugelgestalt eines schwebenden Flüssigkeitstropfens dar. Die gekrümmte Oberfläche des Tropfens wird durch einen inneren Druck Δp aufrechterhalten, der der Minimierung der Oberfläche bzw. spontanen Kontraktion entgegenwirkt. Dieser Druck wird für einen Tropfen durch die Young-Laplace Gleichung beschrieben [36]:

$$\Delta p = \frac{2\gamma}{R}, \quad (2.1)$$

wobei R den Krümmungsradius des Tropfens angibt.

In Abbildung 2.3(b) ist ein Flüssigkeitstropfen auf einer ebenen Festkörperoberfläche gezeigt. In diesem Fall handelt es sich um ein Dreiphasensystem aus Oberfläche O ,

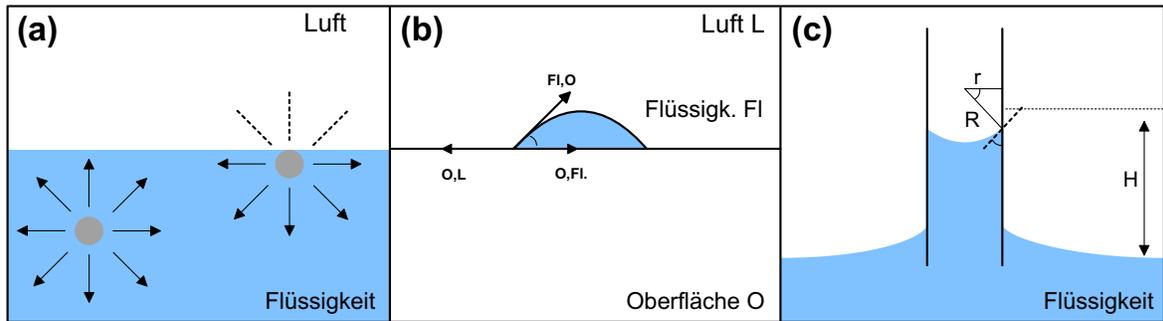


Abbildung 2.3: Grenzflächenphänomene

(a) Molekulare Wechselwirkung eines Moleküls im Innern und an der Oberfläche (b) Kontaktwinkel θ eines Tropfens auf einer Oberfläche (c) Flüssigkeitsanstieg in einer Kapillare (Kapillarität)

Flüssigkeit Fl und Luft L . Neben der Kohäsionskraft kommt in diesem Fall zusätzlich die Adhäsionskraft zum Tragen, die die Wechselwirkung der Flüssigkeitsmoleküle mit einer Oberfläche beschreibt. Dominiert die Adhäsions- gegenüber der Kohäsionskraft, so benetzt die Flüssigkeit die Oberfläche. Der Kontaktwinkel θ ist ein Maß für die relative Stärke der beiden Kräfte und gibt die Benetzungsfähigkeit einer Flüssigkeit an eine Oberfläche wieder. In Abbildung 2.3(b) ist der Kontaktwinkel θ für einen die Oberfläche benetzenden Flüssigkeitstropfen gezeigt. Die Young'sche Gleichung beschreibt den Zusammenhang zwischen dem Winkel und den Oberflächenspannungen γ der drei Grenzflächen [36]:

$$\cos\theta = \frac{\gamma_{O,L} - \gamma_{O,Fl}}{\gamma_{Fl,L}}. \quad (2.2)$$

Für Winkel $\theta < 90^\circ$ spricht man von einer hydrophilen (flüssigkeitsliebenden) Oberfläche, während Winkel $\theta > 90^\circ$ eine hydrophobe (flüssigkeitsabweisende) Oberfläche beschreiben [37]. Beispielsweise beträgt der Kontaktwinkel zwischen Wasser und Glas $\theta \approx 0 - 20^\circ$, was einer nahezu vollständigen Benetzung der Oberfläche entspricht [36].

Der gleiche Zusammenhang beschreibt das Verhalten einer Flüssigkeit in einer stehenden Kapillare. Für Winkel $\theta < 90^\circ$ steigt die Flüssigkeit an, da aufgrund der überwiegenden Adhäsion eine nach oben gerichtete Kraft bzw. ein Druck Δp entsteht. Dieser Druck wird durch $\Delta p = 2\gamma/R$ beschrieben (siehe Gl. (2.1)), wobei R den Radius des Meniskus angibt. Abb. 2.3(c) zeigt den als Kapillarität bezeichneten Vorgang [36]. Sobald der Schweredruck $p_S = \rho g H$ mit dem Druck Δp im Gleichgewicht steht, hat die Flüssigkeit

innerhalb der Kapillare die maximale Steighöhe H erreicht:

$$\frac{2\gamma}{R} = \rho g H, \quad (2.3)$$

wobei ρ die Dichte der Flüssigkeit und g die Erdbeschleunigung angibt. Berücksichtigt man den Zusammenhang $r = R \cos\theta$, so ergibt sich der folgende Ausdruck für die Steighöhe H (siehe Abb. 2.3(c)):

$$H = \frac{2\gamma}{\rho g r} \cos\theta. \quad (2.4)$$

Das Phänomen der Kapillarität tritt bei der Befüllung eines Mikrofluidik-Kanals mit Flüssigkeit ebenfalls auf. Im Gegensatz zur stehenden Kapillare existiert im horizontal gelagerten Kanal keine die Kapillarkraft ausgleichende Gravitationskraft, so dass sich der Kanal ohne externe Hilfen vollständig füllen lässt.

2.3.2 Reynoldszahl und Laminarer Fluss

Das Verhalten einer Strömung kann durch die dimensionslose Reynoldszahl Re charakterisiert werden. Die Definition lautet

$$Re = \frac{\rho v d}{\eta} \quad (2.5)$$

mit ρ die Dichte, v die mittlere Geschwindigkeit der Flüssigkeit, d der Durchmesser des flüssigkeitsführenden Systems und η die Viskosität. Bei kleinen Reynoldszahlen ($Re < 2300$) verhält sich eine Strömung laminar, so dass die Position eines Teilchens innerhalb der Strömung zeitlich determinierbar ist [38, 39]. Im Gegensatz dazu steht die turbulente Strömung mit $Re > 2300$, in der die Position als Funktion der Zeit aufgrund der Verwirbelungen nicht vorhersagbar ist [39]. In Mikrofluidik-Systemen wird zur Berechnung der Reynoldszahl der hydraulische Durchmesser D_h anstelle des Durchmessers d in Gl. (2.5) eingeführt:

$$D_h = \frac{4A_Q}{U_Q}. \quad (2.6)$$

Der Parameter U_Q beschreibt den Umfang, während A_Q die Querschnittsfläche des durchflossenen Systems angibt. Für einen rechteckigen Kanal der Breite b und Höhe h erhält man $2bh/(b+h)$ als hydraulischen Durchmesser, so dass die Reynoldszahl wie folgt lautet:

$$Re = \frac{2\rho v b h}{\eta b + \eta h}. \quad (2.7)$$

Setzt man eine hohe Geschwindigkeit von $v = 1000 \mu\text{ms}^{-1}$, sowie eine Dichte von $\rho = 0.998 \text{ g cm}^{-3}$ und eine Viskosität von $\eta = 0.01 \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für Wasser bei 20° C voraus, so errechnet sich für einen $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ Mikrofluidik-Kanal eine Reynoldszahl von $\text{Re} = 0.02$. Die Abschätzung zeigt, dass in mikrofluidischen Systemen dieser Größe stets eine laminare Strömung vorliegt. Das Mischen zweier Flüssigkeiten kann daher nur durch Diffusion erzielt werden. Dieses bietet unter anderem die Möglichkeit, definierte Konzentrationsgradienten wie pH- oder Salzgradienten für biologische Zwecke zu erzeugen [40].

2.3.3 Hydrodynamischer Fluss

Durch einen Druckgradienten kann innerhalb einer Kapillare oder eines Kanals eine laminare Strömung erzielt werden. Dieser druckgetriebene, stationäre Fluss wird als hydrodynamischer oder Hagen-Poiseuillescher Fluss bezeichnet und stellt eine Lösung der Navier-Stokes Gleichung unter Annahme der no-slip Bedingung dar. Die Randbedingung besagt, dass aufgrund der Haftung der Flüssigkeitsmoleküle die Geschwindigkeit an den Kanalwänden Null sein muss. Die Durchflussrate Q des hydrodynamischen Flusses durch einen Kanal der Breite b und Höhe h ($b \gg h$) ist gegeben durch [38, 41]:

$$Q = \frac{b h^3}{12 \eta L_K} \Delta p, \quad (2.8)$$

wobei η die Viskosität, L_K die Kanallänge und Δp den Druckunterschied beschreibt. Die Beziehung (2.8) wird auch als Hagen-Poiseuille-Gesetz bezeichnet. Für die Geschwindigkeit kann man aufgrund des hohen Aspektverhältnisses von Breite zur Höhe näherungsweise annehmen, dass der Fluss durch zwei parallele Platten begrenzt wird. Es ergibt sich dann folgender Ausdruck [38]:

$$v(z) = \frac{\Delta p}{2 \eta L_K} (h - z)z. \quad (2.9)$$

Abbildung 2.4 stellt das parabolische Geschwindigkeitsprofil des hydrodynamischen Flusses dar. Im Zentrum des Kanals fließt die Flüssigkeit mit maximaler Geschwindigkeit, während sie an den Wänden entsprechend der Randbedingung Null ist.

Für die Erzeugung hydrodynamischer Flüsse werden zumeist externe Pumpen verwendet, aber auch unterschiedliche Tropfengrößen auf den Reservoirs der Kanäle können nennenswerte Flussraten erzielen. Entsprechend Gleichung (2.1) besitzen Tropfen mit kleinerem Krümmungsradius R einen höheren Innendruck als Tropfen mit größerem. Zwei miteinander durch einen Kanal verbundene Tropfen unterschiedlicher Radien führen daher zu einem Fluss vom Tropfen mit kleinerem zum größeren Krümmungsradius.

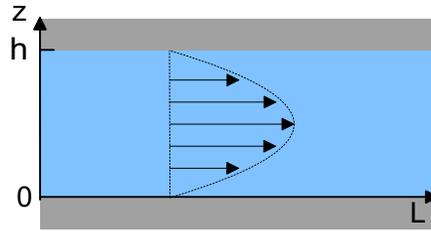


Abbildung 2.4: Geschwindigkeitsprofil des hydrodynamischen Flusses

Es lassen sich so Pumpraten von $1.25 \mu\text{L/s}$ erzeugen [42].

Neben den Krümmungsradien der Tropfen können druckgetriebene Flüsse auch durch unterschiedlich hoch gefüllte Reservoirs erreicht werden. Der aus den verschiedenen hohen Flüssigkeitssäulen resultierende Druckunterschied ergibt sich aus:

$$\Delta p = \rho g \Delta H, \quad (2.10)$$

wobei ρ die Dichte der Flüssigkeit, g die Erdbeschleunigung und ΔH die Differenz in der Füllhöhe der Reservoirs angibt. In Mikrofluidik-Systemen spielt der letztere Effekt weniger eine Rolle als die Veränderung des Krümmungsradiuses, wie das folgende Beispiel anschaulich zeigt. Ein Wassertropfen auf einem Reservoir mit einem Meniskusradius von 1 mm erzeugt unter Annahme der Oberflächenspannung von 72.8 mN/m für Wasser einen Druck von 146 Pa (Gl. (2.1)). Nach Gleichung (2.10) entspricht dieses einem Höhenunterschied von 15 mm . Bei Reservoirhöhen von wenigen Millimetern treten solche Höhenunterschiede nicht auf, während Unterschiede in den Meniskusradien von 1 mm entstehen können.

2.3.4 Elektroosmose

Neben hydrodynamischen Effekten kann in Mikrofluidik-Kanälen eine Bewegung der Flüssigkeit relativ zu einer geladenen Oberfläche auch durch elektrische Felder hervorgerufen werden. Den Fluss bezeichnet man als elektroosmotischen Fluss (EOF). Die Größe und Richtung des elektroosmotischen Flusses hängt neben der Zusammensetzung der Elektrolytlösung auch von der Oberflächenladung der Kanäle ab. Mikrofluidik-Chips werden häufig aus Glas oder Polydimethylsiloxan (PDMS) hergestellt. Diese Materialien weisen auf der Oberfläche Silanolgruppen auf, die bei Kontakt mit einer Elektrolytlösung ionisieren. Abhängig vom pH-Wert entstehen positiv geladene SiOH_2^+ , neutrale SiOH oder negativ geladene SiO^- -Gruppen an der Kanalinnenwand des Glas oder PDMS Mikrofluidik-Chips. Ab einem pH-Wert größer 2 liegt aufgrund des pK_a -Wertes

der Silanolgruppen eine negative Oberflächenladung vor, mit der die Ionen der Elektrolytlösung elektrostatisch wechselwirken. Die Ladungsdichte $\rho_e(x)$ im Abstand x von der Kanaloberfläche ergibt sich zu:

$$\rho_e(x) = \sum_i z_i e n_i(x), \quad (2.11)$$

wobei z_i die Valenz des Ions i , e die Elementarladung und $n_i(x)$ die Ionendichte des Typs i darstellen. Für die Bestimmung der Ionendichte $n_i(x)$ kann nach Debye und Hückel die Boltzmann Verteilung verwendet werden, da sich mit ihrer Hilfe der konkurrierende Zusammenhang zwischen elektrostatischer Wechselwirkung und Brownscher Molekularbewegung beschreiben lässt [43]:

$$\frac{n_i(x)}{n_{i0}} = \exp\left(\frac{-z_i e \Psi(x)}{kT}\right), \quad (2.12)$$

wobei n_{i0} , $\Psi(x)$ und kT die Ionendichte ohne Einfluss eines elektrischen Potentials, das elektrische Potenzial an der Stelle x und die thermische Energie angeben. Der Ausdruck (2.11) lässt sich damit umformen zu:

$$\rho_e(x) = \sum_i z_i e n_{i0} \exp\left(\frac{-z_i e \Psi(x)}{kT}\right). \quad (2.13)$$

Unter Berücksichtigung der Debye-Hückel Approximation ($z_i e \Psi(x) \leq kT$) und der Annahme der Ladungsneutralität ergibt sich aus Gleichung (2.13):

$$\rho_e(x) = - \sum_i \frac{z_i^2 e^2 n_{i0}}{kT} \Psi(x). \quad (2.14)$$

Einen Zusammenhang zwischen der Ladungsdichte $\rho_e(x)$ und dem elektrischen Potenzial $\Psi(x)$ stellt die Poisson-Gleichung her,

$$\frac{d^2 \Psi}{dx^2} = - \frac{\rho_e(x)}{\varepsilon} \quad \text{mit } \varepsilon = \text{Dielektrizitätskonstante}, \quad (2.15)$$

welche nach Substitution von $\rho_e(x)$ durch Ausdruck (2.14) die folgende Gleichung liefert:

$$\frac{d^2 \Psi}{dx^2} = \kappa^2 \Psi(x) \quad \text{mit } \kappa^2 = e^2 \sum_i \frac{z_i^2 n_{i0}}{\varepsilon kT}. \quad (2.16)$$

Durch zweifache Integration und Berücksichtigung der no-slip Randbedingung ($\Psi = \Psi_0$ für $x = 0$ (Grenze zwischen Kanalwand und Lösung) und $\Psi = 0$ für $x = \infty$) erhält man für das elektrische Potenzial $\Psi(x)$:

$$\Psi(x) = \Psi_0 \exp(-\kappa x). \quad (2.17)$$

Mit der Entfernung x von der Kanalwand nimmt das elektrische Potenzial $\Psi(x)$ exponentiell ab. Für die Ladungsdichte $\rho_e(x)$ ergibt sich damit folgende Gleichung:

$$\rho_e(x) = \varepsilon\kappa^2\Psi_0\exp(-\kappa x). \quad (2.18)$$

Eine Erweiterung der bisher entwickelten Modellvorstellung für das Verhalten an einer geladenen Oberfläche stellt das Stern-Modell dar. Demzufolge entsteht direkt angrenzend an die negativ geladene Oberfläche eine starre Schicht aus immobilen Gegenionen. Die Dicke dieser Schicht kann durch die Bjerrum-Länge l_B abgeschätzt werden [43] bzw. liegt in der Größenordnung der adsorbierenden positiven Ladungsträger. An die Stern-Schicht schließt sich die diffuse Schicht, auch Gouy-Chapman Schicht genannt, an. Innerhalb dieser Schicht können sich die Gegenionen thermisch bewegen, da sie nur schwach gebunden sind. Beide Schichten bilden die elektrochemische Doppelschicht. Der Potenzialverlauf bzw. die Ladungsverteilung im Bereich der Kanalinnenseite ist in Abbildung 2.5 gezeigt.

Innerhalb der starren Schicht fällt das Potenzial linear ab (Bereich (a) in Abb. 2.5), während es in der diffusen Schicht entsprechend Gl. (2.17) exponentiell verläuft (Bereich (b)). Die Dicke dieses Bereiches wird durch den Parameter κ^{-1} beschrieben und als Debye- bzw. Abschirmlänge bezeichnet. Abhängig vom Elektrolyten und dessen Konzentration lässt sich eine Breite der Doppelschicht von wenigen nm (z.B. 3 nm für eine 10 mM symmetrische Lösung [1Z⁺:1Z⁻]) [43] errechnen. Das Potenzial an der Grenzfläche zwischen starrer und diffuser Schicht bezeichnet man als ζ -Potenzial. Außerhalb der Doppelschicht (Bereich c) ist das Potenzial nahezu Null.

Eine Strömung der Flüssigkeit wird durch das Anlegen eines elektrischen Feldes parallel zur geladenen Oberfläche erzielt. Die schwach gebundenen Gegenionen innerhalb der diffusen Schicht werden entlang der elektrischen Feldlinien bewegt. Durch Impulsübertragungen in der laminar strömenden Flüssigkeit entsteht bei einer negativen Oberflächenladung der Kanalwand ein Fluss zur Kathode. Die Geschwindigkeit $v(x)$ ergibt sich aus der Summe der auf ein Volumenelement der Ladungsdichte $\rho_e(x)$ wirkenden Reibungskräfte und der durch ein elektrisches Feld hervorgerufenen elektrischen Kraft. Die Bewegungsgleichung der Flüssigkeit lautet daher:

$$\eta\frac{d^2v_z(x)}{dx^2} = E_z\rho_e(x), \quad (2.19)$$

wobei η die Viskosität der Lösung, E das elektrische Feld und v_z die Geschwindigkeit in Richtung des elektrischen Feldes (in z-Richtung) beschreibt. Zweifache Integration unter Berücksichtigung der no-slip Randbedingung ($dv/dx = 0$ bei $x = \infty$ und $v = 0$

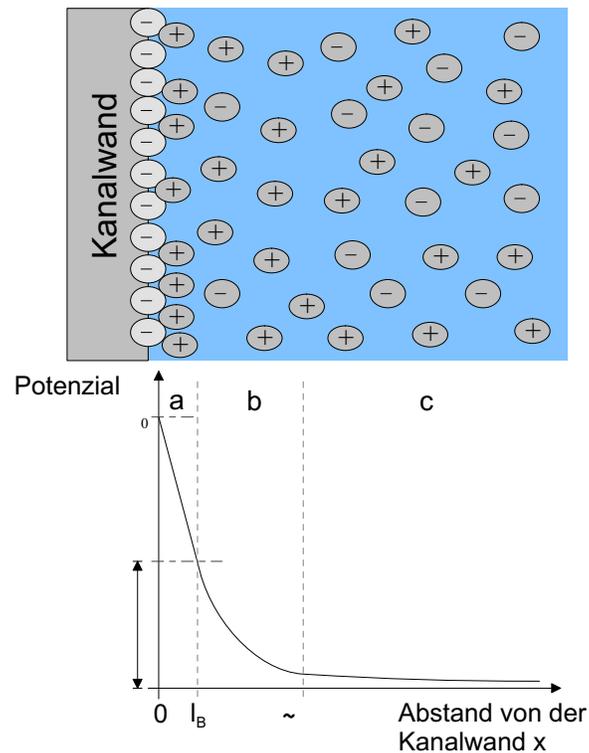


Abbildung 2.5: Stern-Modell der Doppelschicht an einer geladenen Grenzfläche
 Die durch Dissoziation der Silanolgruppen entstandenen negativen Oberflächenladungen an der Mikrofluidik-Chipwand bewirken das Ausbilden einer Doppelschicht, die sich in eine starre (a) und eine diffuse Schicht (b) unterteilt. In der starren Schicht ergibt sich ein linearer, in der diffusen ein exponentieller Potenzialabfall. Im Bereich (c) ist das Potenzial nahezu Null.

bei $x = x_1$) liefert:

$$v_z(x) = \frac{E_z \varepsilon \zeta}{\eta} (1 - \exp(-\kappa x)). \quad (2.20)$$

Die Stelle x_1 gibt den Beginn der diffusen Schicht an, so dass das elektrische Potenzial Ψ_0 dem ζ -Potential entspricht. Da die Dicke κ^{-1} im Bereich von wenigen Nanometern liegt, kann der Exponentialterm für große x vernachlässigt werden. Als Lösung erhält man die folgende Geschwindigkeitskomponente:

$$v_z(x) \approx v_\infty = \frac{E_z \varepsilon \zeta}{\eta}. \quad (2.21)$$

Normiert auf das elektrische Feld liefert diese den Ausdruck für die elektroosmotische Mobilität μ_{eof} :

$$\mu_{eof} = \frac{\varepsilon\zeta}{\eta}. \quad (2.22)$$

Die Mobilität hängt demnach von der Viskosität η der Lösung, dem ζ -Potenzial und der Dielektrizitätskonstante ε ab. Infolgedessen beeinflussen Veränderungen des pH-Wertes und der Ionenkonzentration der Lösung die elektroosmotische Mobilität, da sie sich auf das ζ -Potenzial auswirken. Beispielsweise verursacht eine Erhöhung des pH-Wertes einen Anstieg der dissoziierten Silanolgruppen auf der PDMS oder Glas Oberfläche, was zu einer Vergrößerung der Nettoladung und damit des ζ -Potenzials führt. Bei einer hohen Ionenkonzentration verringert sich das ζ -Potenzial, da eine größere Anzahl von Gegenionen zum Ausgleich der negativen Oberflächenladung zur Verfügung steht. Zudem sinkt die Mobilität mit zunehmender Viskosität.

Aus Gleichung (2.21) folgt, dass mit Ausnahme der diffusen Schicht die elektroosmotische Geschwindigkeit v_{eof} über dem gesamten Mikrofluidik-Kanal konstant ist. Abbildung 2.6 zeigt schematisch das stempelförmige Flussprofil des EOFs im Vergleich zum parabelförmigen Profil des hydrodynamischen Flusses. Neben dem Flüssigkeitstransport liegt der Vorteil des elektroosmotischen Flusses also zusätzlich in dem stempelförmigen Geschwindigkeitsprofil, da sich eine geringere Dispersion der Probensubstanz ergibt [44–49].

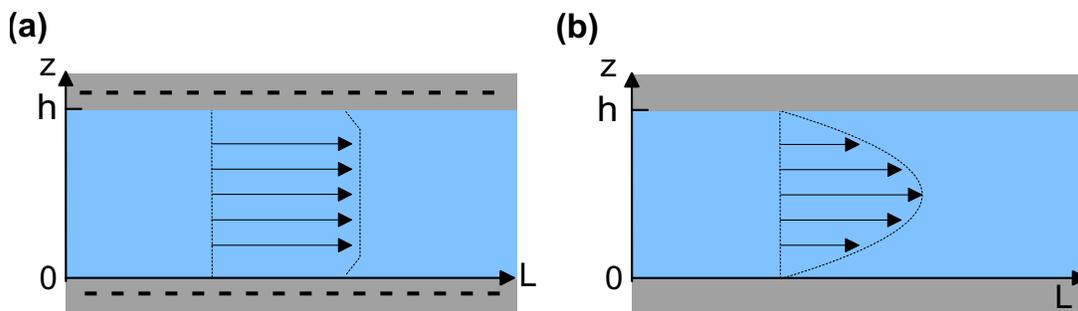


Abbildung 2.6: Vergleich von zwei verschiedenen Strömungsprofilen

(a) *Stempelförmiges Flussprofil des elektroosmotischen Flusses; (b) parabelförmiges Flussprofil des hydrodynamischen Flusses*

Bestimmung des elektroosmotischen Flusses

Aufgrund der essentiellen Rolle des elektroosmotischen Flusses sind verschiedene Methoden zur Messung entwickelt worden. Bei der Neutralmarker Methode wird die elektroosmotische Mobilität aus der Migrationszeit ungeladener Moleküle, die über Laser-Induzierte Fluoreszenz [50, 51] oder UV Adsorption nachgewiesen werden [52–54], bestimmt. Ein Problem dieser Methode liegt in der möglichen Adsorption des Neutralmarkers an die Kanalwände [50, 55]. Ferner lässt sich die elektroosmotische Mobilität anhand der durch den Fluss verursachten Flüssigkeitsmengenunterschiede in einem der Pufferreservoirs mit Hilfe einer Waage bestimmen [56]. Der Nachteil dieser Methode liegt in dem erforderlichen Aufwand für die technische Umsetzung. Im Gegensatz dazu lässt sich die in dieser Arbeit verwendete Methode von Huang et al. [52] einfach umsetzen, da das Prinzip nur auf der Aufnahme der Stromkennlinie beruht, während eine Pufferlösung mit anderer Konzentration elektroosmotisch durch einen Kanal gepumpt wird und so die ursprüngliche Lösung verdrängt.

Bei dieser Methode wird zunächst ein Mikrofluidik-Kanal per Kapillarkraft mit einer Pufferlösung der Konzentration c_0 gefüllt (Abb. 2.7). Im Anschluss daran wird eine Spannung an die Reservoirs angelegt und die Stromstärke aufgenommen, die aufgrund der gleichen Ionenkonzentration (c_0) im gesamten Kanal konstant bleibt. In Reservoir 1 wird nun die Pufferlösung mit der Konzentration c_0 gegen eine schwächer konzentrierte Lösung $c_1 = 0,9 \cdot c_0$ gewechselt. Aufgrund der negativen Oberflächenladung der Mikrofluidik-Kanalwände führt eine positive Spannung an Reservoir 1 zu einem elektroosmotischen Fluss Richtung Reservoir 2. Die schwächer konzentrierte Pufferlösung migriert daher unter Einfluss des elektrischen Feldes in den Kanal hinein und verdrängt die höher konzentrierte. Die Folge ist eine Änderung des Gesamtwiderstands des Kanals, was sich im zeitlichen Verlauf der Stromstärke als Abfall widerspiegelt (siehe Abb. 2.7). Ist der gesamte Kanal mit der Pufferlösung c_1 gefüllt, bleibt die Stromstärke konstant. Das Zeitintervall $\Delta t = t_1 - t_0$ gibt die Zeitspanne an, die benötigt wird, um den gesamten Kanal mit der Pufferlösung der Konzentration c_1 elektroosmotisch zu füllen. Da die Länge L_K des Kanals und die angelegte Spannung U feste Größen darstellen, ergibt sich mit Hilfe der Beziehungen $\mu_{eof} = v_{eof}/E$ und $v_{eof} = L_K/\Delta t$ folgender Ausdruck für die elektroosmotische Mobilität μ_{eof} :

$$\mu_{eof} = \frac{L_K^2}{U\Delta t} \quad \text{mit } E = \frac{U}{L_K}. \quad (2.23)$$

Ein Vergleich mit der Neutralmarker Methode zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Methoden [52]. Aufgrund der einfachen Umsetzbarkeit der

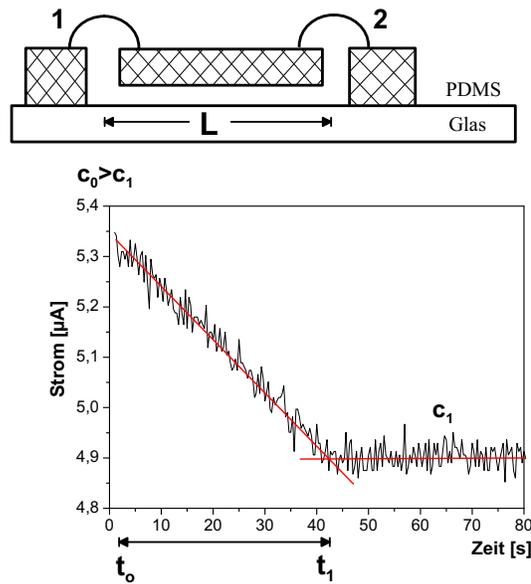


Abbildung 2.7: Schematisches Bild eines linearen Kanals mit erhaltener Stromkennlinie nach einer EOF-Messung

Bei gleicher Ionenkonzentration (c_0) der Pufferlösung im Kanal bleibt beim Anlegen einer Spannung die Stromstärke konstant. Tauscht man in Reservoir 1 die Ionenkonzentration gegen eine geringer konzentriertere c_1 aus, so nimmt die Stromstärke solange ab, bis die Pufferflüssigkeit elektroosmotisch Reservoir 2 erreicht hat. Die Stromstärke bleibt dann unverändert.

Stromkennlinien-Methode wird sie speziell in der Mikrochip-Elektrophorese von vielen Gruppen zur Bestimmung der elektroosmotischen Mobilität verwendet [57–59].

2.3.5 Elektrophorese

Unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes tritt neben dem elektroosmotischen Fluss eine Migration von Ionen einer Elektrolytlösung auf. Dieses Phänomen bezeichnet man als Elektrophorese. Die elektrophoretische Geschwindigkeit v der Teilchen mit Ladung q ergibt sich aus dem Gleichgewicht der vom elektrischen Feld E ausgeübten Kraft $F_e = -qE$ und der Reibungskraft $F = -fv$ zu

$$v = \frac{q}{f} E, \quad (2.24)$$

wobei f den Reibungskoeffizienten beschreibt. Der Proportionalitätsfaktor q/f zwischen Geschwindigkeit v und elektrischem Feld E wird als elektrophoretische Mobilität μ_{ep}

bezeichnet. Im Fall eines sphärischen Teilchens kann der Reibungskoeffizient f nach dem Stokeschen Gesetz durch $f = 6\pi\eta r_S$ ersetzt werden. Dabei geben die Parameter η und r_S die Viskosität und den Stokeschen Radius an. Die elektrophoretische Mobilität μ_{ep} lautet dann:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r_S}. \quad (2.25)$$

Für eine gegebene Elektrolytlösung ist die elektrophoretische Mobilität demnach eine charakteristische Größe für jedes betreffende Ion, da sie nur von der Ladung des Teilchens und der Größe abhängt. Die Elektrophorese ermöglicht so eine Auftrennung von Ionen unterschiedlicher Ladung und Radien bzw. Massen, wenn man den Zusammenhang $r_S \sim m^{1/3}$ zwischen Masse m und Stokeschem Radius r_S zugrundelegt. Mit der Wahl des Trennmediums (Viskosität, pH-Wert, Konzentration, etc.) kann zusätzlich Einfluss auf die Effizienz der Trennung genommen werden. Zum Beispiel bewirkt die Wahl des pH-Wertes bei Proteinen eine Änderung der Nettoladung des Teilchens (siehe Kapitel 2.2).

Es bleibt zu erwähnen, dass es sich bei der obigen Herleitung um die Beschreibung eines idealisierten Falles handelt. Tatsächlich wird ein geladenes Teilchen in einer Elektrolytlösung von einer Ionenhülle umgeben. Infolgedessen treten neben der Stokeschen Reibungskraft und der elektrischen Kraft noch zwei weitere Kräfte auf. Die Retardationskraft ergibt sich aus der elektrokinetischen Anziehung der Gegenionen innerhalb der diffusen Schicht (siehe 2.5), während die elektrische Relaxationskraft von der Deformation der Ionenhülle herrührt. Insgesamt wirken beide Kräfte der eigentlichen Bewegung des Ions entgegen und beeinflussen so die Mobilität.

2.4 Mikrochip-Elektrophorese

Das Trennverfahren der Mikrochip-Elektrophorese basiert auf den unterschiedlichen Mobilitäten der Analyten in einem elektrischen Feld. Die effektiven Geschwindigkeiten der Analyten ergeben sich aus der vektoriellen Summe der elektroosmotischen \mathbf{v}_{eof} und elektrophoretischen Geschwindigkeiten \mathbf{v}_{ep} . In Abhängigkeit von ihrer Ladung und Masse trennen sich die Analyten in unterschiedliche Migrationszonen auf:

$$\begin{aligned} \mathbf{v}_{ges} &= \mathbf{v}_{eof} + \mathbf{v}_{ep} \\ &= (\mu_{eof} + \mu_{ep})\mathbf{E}. \end{aligned} \quad (2.26)$$

Abbildung 2.8 zeigt schematisch das Prinzip der Mikrochip-Elektrophorese am Beispiel von PDMS und Glas Mikrofluidik-Chips, in denen ein elektroosmotischer Fluss aufgrund

der negativen Oberflächenladung für $\text{pH} > 2$ zur Kathode auftritt. Die höchste Geschwindigkeit weisen die Kationen auf, da der elektroosmotische Geschwindigkeitsvektor \mathbf{v}_{eof} und der elektrophoretische Geschwindigkeitsvektor \mathbf{v}_{ep} in die gleiche Richtung zeigen. Die ladungsneutralen Teilchen bewegen sich mit der elektroosmotischen Geschwindigkeit. Für die Anionen ergibt sich eine Migration zur Kathode, wenn die elektrophoretische Geschwindigkeit \mathbf{v}_{ep} vom Betrag kleiner als die elektroosmotische Geschwindigkeit \mathbf{v}_{eof} ist.

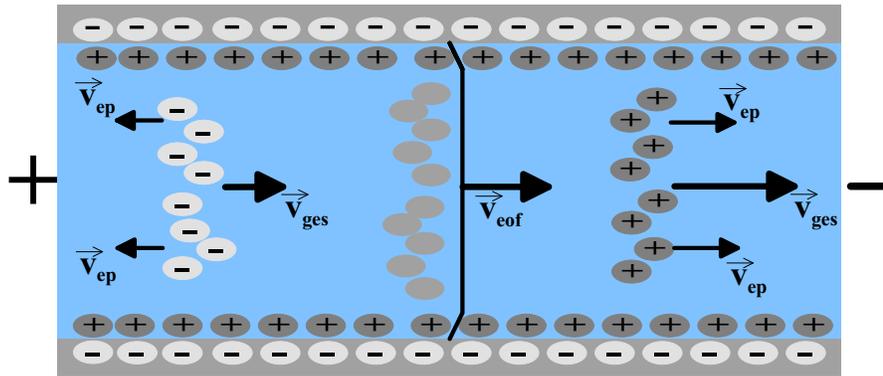


Abbildung 2.8: Auftrennung der Analyten in einzelne Migrationszonen

Bewegung der Ionen und Neutralteilchen im elektrischen Feld aufgrund der Elektrophorese und Elektroosmose

2.4.1 Injektion

Für die Anwendung der Mikrochip-Elektrophorese müssen neue Verfahren zur Injektion der Probensubstanz entwickelt werden, da sich die herkömmlichen Techniken der Kapillarelektrophorese nicht skalieren lassen. Für die Realisierung der Injektion wird im miniaturisierten Format ein Kreuzungs-Design verwendet. Insgesamt existieren drei verschiedene Injektionsmethoden. Bei der *floating* Methode wird die Probensubstanz durch eine am Probenreservoir angelegte Spannung in den Kreuzungsbereich gepumpt [60, 61]. Dieser Vorgang beschreibt die Injektionsphase. Nach kurzer Zeit wird das sich im Kreuzungsbereich ausgedehnte Probenvolumen durch eine Spannung an Reservoir 1 in den horizontalen Trennkanal injiziert (Trennphase). Die Potentiale an den Reservoirs 3 und 4 verhindern das Nachlaufen der Analytlösung aus den Kanälen 3 und 4 [58, 62]. Abb. 2.9(a) zeigt schematisch die Injektion nach diesem Prinzip. Im Vergleich

zu dieser Methode bietet die *pinched* Methode die Möglichkeit, ein definiertes Probenvolumen zur Analyse zu injizieren [61]. Das definierte Volumen wird durch zusätzliche Spannungen an den Reservoirs 1 und 2 im Injektionsvorgang erzielt (siehe Abb. 2.9(b)). Der Trennvorgang stimmt mit der anderen Methode überein.

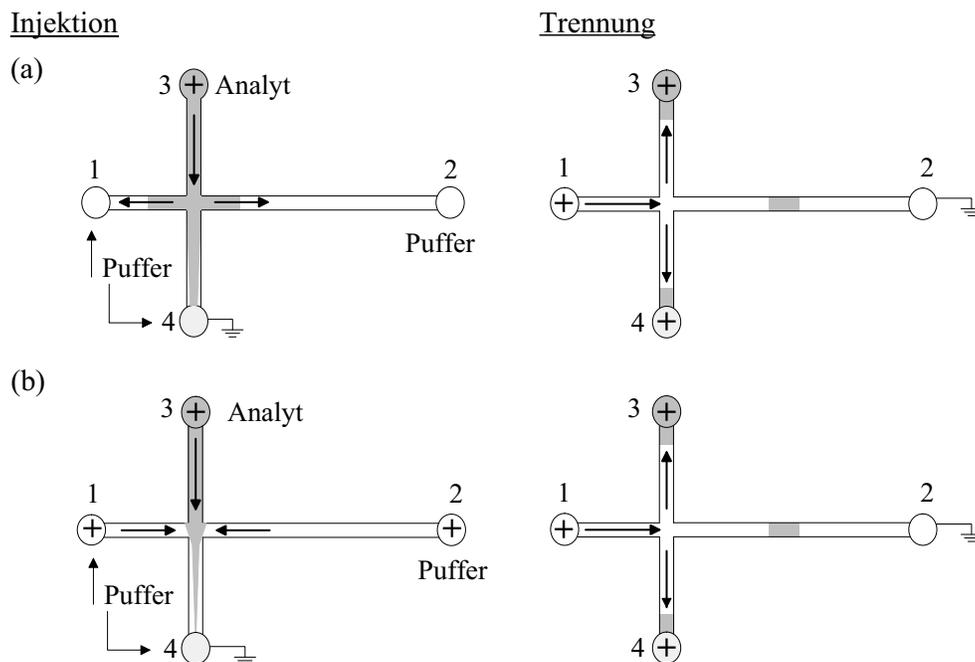


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der (a) *floating* und der (b) *pinched* Methode

Im Injektionsschritt wird durch die Spannung an Reservoir 3 die Probenflüssigkeit in den Kreuzungsbereich gepumpt. Im Fall von (a) breitet sich die Analytlösung ungehindert in die Kanäle 1 und 2 aus (*floating Methode*), während sie in (b) im Kreuzungsbereich durch zusätzliche Spannungen an 1 und 2 eingeeengt wird (*pinched Methode*). Der Trennvorgang ist in beiden Methoden identisch. Die Pfeile stellen die Flussrichtung dar.

Die *pinched* Methode bietet durch das definierte Probenvolumen im Kreuzungsbereich die Vorteile hoher Reproduzierbarkeit und Effizienz (Kapitel 2.4.2). Darüberhinaus ermöglicht sie aufgrund der variablen Injektionszeit die Analyse zweier Substanzen mit großem Mobilitätsunterschied. Als Nachteil erweist sich die dadurch entstehende Verlängerung der gesamten Analysezeit, bestehend aus der Injektions- und Trennzeit. Ferner ist das Fluoreszenzsignal aufgrund des eingeeengten Probenvolumens niedriger als im Fall der *floating* Methode. Das verbreiterte Injektionsvolumen der *floating* Methode führt je-

doch zu einer Verschlechterung der Effizienz. Als vorteilhaft erweist sich hier die kurze Analysezeit [60, 61].

Für schnelle sich wiederholende Injektionen eignet sich die *gated* Methode [63–65]. Genau wie bei der *pinched* Methode liegt der Vorteil in der Injektion eines definierten Probenvolumens. Abbildung 2.10 zeigt schematisch den Ablauf des Injektionsvorganges. Bei dieser Methode befindet sich die Probe in Reservoir 1. Die Potenziale werden

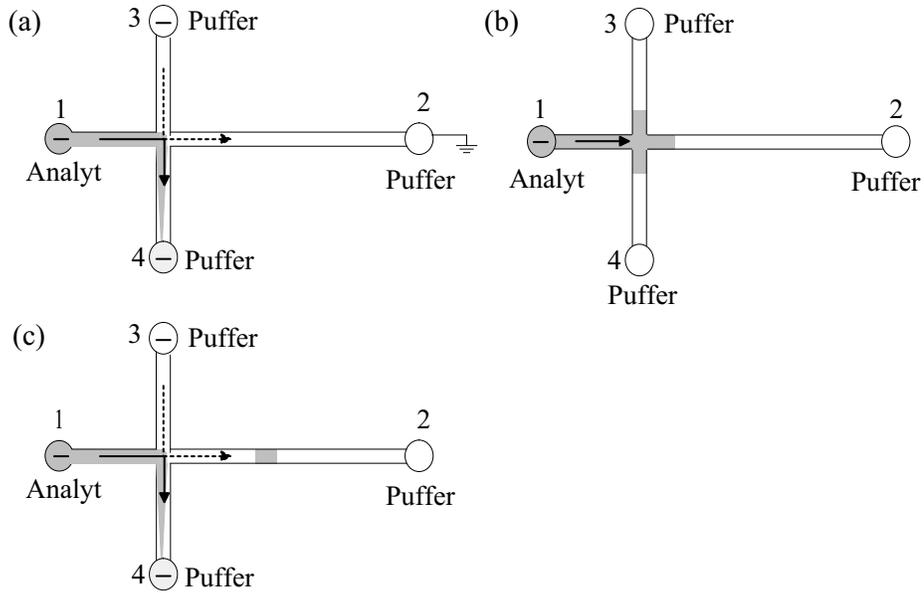


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der *gated* Methode

Bei der *gated* Methode wird durch die Wahl der Potenziale an den Reservoiren 1, 3 und 4 die Probenflüssigkeit in den Kanal 4 gepumpt, während eine Strömung der Pufferlösung Richtung Reservoir 2 existiert. Im Schritt (b) wird kurzzeitig nur eine Spannung an Reservoir 3 angelegt, die eine Ausdehnung der Probenflüssigkeit in Kanal 2 zulässt. Durch das Wiederherstellen der ursprünglichen Potenzialkonfiguration wird ein definiertes Probenvolumen injiziert (Schritt (c)). Die Pfeile stellen die Flussrichtung dar.

so angelegt, dass eine Strömung der Probenflüssigkeit nach Reservoir 4 erzielt wird bei gleichzeitigem Fluss der Pufferlösung nach Reservoir 2. Nach einer Stabilisierungsphase werden die Potenziale für kurze Zeit an den Reservoiren 3 und 4 ausgeschaltet, so dass sich die Probenflüssigkeit in den Trennkanaal (Kanal 2) ausdehnen kann. Durch die Wiederherstellung der ursprünglichen Parameter wird dann ein definiertes Probenvolu-

men in den Kanal injiziert. Auf diese Art und Weise können wiederholt Injektionen in kürzester Zeit unter den gleichen Bedingungen durchgeführt werden. Bedingt durch die Wiederherstellung der Potenzialverhältnisse in Schritt (a) ist die Höhe der Spannung für die Injektion des Probenvolumens begrenzt, was sich nachteilig auf die Breite der Signale auswirkt.

2.4.2 Effizienz von elektrokinetischen Trennungen

Neben der Verringerung des Probenvolumens und der Verkürzung der Analysezeiten führt die Miniaturisierung zu einer Verbesserung der Trenneffizienz. Für eine Quantifizierung dieser Aussage müssen Kriterien definiert werden, die diese Effizienz des Mikrochip-Elektrophorese Systems belegen und somit einen Vergleich mit anderen Systemen ermöglichen.

Ein Maß für die Effizienz des elektrophoretischen Systems gibt die theoretische Plattenzahl N an. Sie ist definiert als:

$$N = \frac{L_D^2}{\sigma^2}, \quad (2.27)$$

wobei L_D die Strecke vom Injektions- bis zum Detektionspunkt beschreibt. Faktoren, welche die Effizienz beeinflussen, spiegeln sich in der Breite der aufgenommenen Signale wider. Die räumliche Standardabweichung σ bzw. Varianz der Signale σ^2 wird daher in die Definition der theoretischen Plattenzahl N miteinbezogen. Die molekulare Diffusion ist einer dieser Effekte, der zu einer Verbreiterung der Standardabweichung führt. Die Einstein-Gleichung beschreibt den Zusammenhang zwischen der Varianz σ und dem Diffusionskoeffizienten D :

$$\sigma^2 = 2Dt. \quad (2.28)$$

Hierbei gibt die Zeit t die Zeitspanne von der Injektion bis zur Detektion an. Setzt man den obigen Ausdruck sowie $L_D = \mu Et$ in die Gleichung für die Plattenzahl N ein, so ergibt sich

$$N = \frac{\mu EL_D}{2D}, \quad (2.29)$$

wobei μ die elektroosmotische und die elektrophoretische Mobilität einschließt und $E = U/L_K$ die elektrische Feldstärke beschreibt. Für ein gegebenes System stellen die Mobilität und der Diffusionskoeffizient feste Größen dar, so dass eine Steigerung der Effizienz durch höhere elektrische Feldstärken E und längere Migrationsstrecken L_D erzielt werden kann. In Mikrofluidik-Systemen können höhere elektrische Feldstärken verwendet werden, da die zur Signalverbreiterung führende Joulesche Wärme aufgrund des hohen Oberflächen-zu-Volumen Verhältnisses verringert wird [19].

Zumeist erfolgt die Datenaufnahme der Signale in zeitlicher Abhängigkeit, so dass in Gl. (2.27) die Strecke L_D durch die Zeitspanne t und die räumliche Standardabweichung σ durch die zeitliche σ_t ersetzt werden müssen:

$$N = \frac{t^2}{\sigma_t^2}. \quad (2.30)$$

Berücksichtigt man den Zusammenhang $w = 4\sigma\sqrt{\ln 4}$ zwischen der Halbwertsbreite w des Signals und der Standardabweichung σ , so erhält man den folgenden Ausdruck [46, 66]:

$$N = 5.54 \left(\frac{t}{w} \right)^2. \quad (2.31)$$

Eine Angabe der theoretischen Plattenzahl N anhand experimenteller Daten kann daher schnell vorgenommen werden. Alternativ zur theoretischen Plattenzahl wird oftmals die Plattenhöhe H verwendet:

$$H = \frac{L_D}{N}. \quad (2.32)$$

Eine Aussage über die Qualität einer Trennung ermöglicht die Auflösung R . Sie liefert ein Kriterium dafür, inwieweit zwei sich ähnlich bewegende Analyten i und j voneinander trennbar sind, ohne eine Überschneidung der Signale zu erhalten:

$$R = \frac{x_i - x_j}{\frac{1}{2}(b_i + b_j)} \quad (2.33)$$

mit $x_{i,j}$ = Position der Signalmitten und $b_{i,j}$ = Breite des Signals an der Basislinie. Eine Umformung des Ausdruckes führt zu Gl. (2.34), welche die experimentell beeinflussbaren Parameter darlegt [43]:

$$R = \frac{1}{2} \left(\frac{\mu_i - \mu_j}{\mu_i + \mu_j} \cdot \sqrt{\frac{\mu_m}{2D_m}} \right) \sqrt{L_D E} \quad (2.34)$$

mit $\mu_m = (\mu_i + \mu_j)/2$ und dem D_m mittlerer Diffusionskoeffizient beider Spezies. Da die Mobilitäten μ_i , μ_j , μ_m und der Diffusionskoeffizient D_m für ein gegebenes System feste Größen darstellen, kann laut Gl. (2.34) eine verbesserte Auflösung durch eine höhere elektrische Feldstärke E sowie eine größere Entfernung L_D erzielt werden. Eine zu starke Erhöhung der Mobilität hingegen erweist sich als nachteilig, da die Zeit für eine räumliche Trennung der Analyten bei gegebener Trennstrecke zu kurz wird [43].

2.5 Fluoreszenzdetektion von Proteinen

Als Fluoreszenz bezeichnet man die Relaxation eines Systems aus einem Zustand höherer Energie in einen Zustand niedriger Energie unter Emission eines Photons. Abbildung 2.11 zeigt das Jablonski-Diagramm, in dem die Relaxationsprozesse aus einem

elektronisch angeregten Zustand veranschaulicht sind. Aus dem Schwingungsgrundzu-

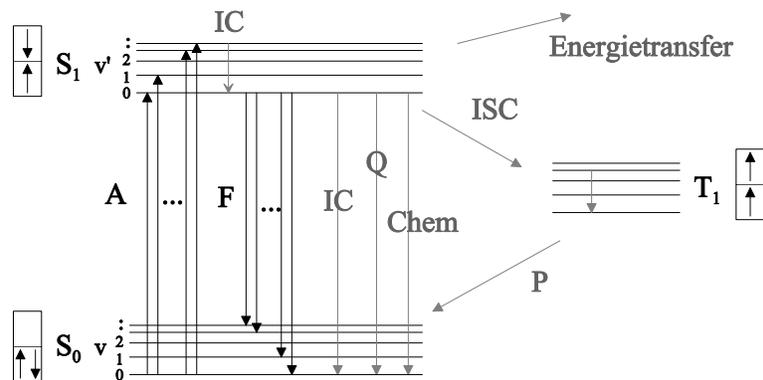


Abbildung 2.11: Darstellung des Jablonski-Diagramms

Im Diagramm sind die verschiedenen Relaxationsprozesse aus einem elektronischen angeregten Zustand gezeigt: A: Absorption, F: Fluoreszenz, P: Phosphoreszenz, IC: innere Umwandlung, Q: Quenchen, Chem: Chemische Reaktionen, ISC: Interkombination.

stand S_0 ($v=0$) wird das Molekül durch die Absorption eines Photons in einen der Schwingungszustände v' des ersten angeregten elektronischen Zustandes S_1 angehoben, wobei die Auswahl der Schwingungszustände dem Franck-Condon Prinzip folgt. Durch Stöße mit anderen Teilchen gelangt es innerhalb von Pikosekunden in das Schwingungsgrundniveau des ersten angeregten Zustandes S_1 (innere Umwandlung, engl. Internal Conversion), von wo es unter Emission eines Photons in die Schwingungsniveaus des elektronischen Grundzustandes S_0 relaxiert. Die Besetzung der Schwingungszustände ist dabei abhängig vom Franck-Condon Faktor unterschiedlich wahrscheinlich. Die emittierte Wellenlänge ist rotverschoben zu der eingestrahnten Wellenlänge des anregenden Photons (Stokes-Shift). Neben der Aussendung eines Photons existieren noch weitere Relaxationsprozesse wie die innere Umwandlung (IC), die Energieübertragung auf andere Moleküle durch Stöße (Quenchen), der strahlungslose Energietransfer zwischen Molekülen, Phosphoreszenz und chemische Reaktionen.

Die Markierung einzelner Proteine mit Fluorophoren (Fluoreszenzfarbstoffe oder fluoreszierende Proteine) spielt bei der Analyse wichtiger metabolischer Prozesse (z.B. Transport, Signalübertragung etc.) eine große Rolle. Zum einen besteht die Möglichkeit, mit Hilfe der Fluoreszenz die Expression und die Zielsteuerung markierter Proteine in einer Zelle mit hoher Orts- und Zeitauflösung zu verfolgen. Zum anderen können nach

der Lyse der Zelle und der anschließenden elektrokinetische Auftrennung des Zellinhalts quantitative Aussagen über das Proteom der Zelle unter definierten äußeren Bedingungen gemacht werden, indem der Expressionslevel eines markierten Proteins quantitativ erfasst wird.

Für die Markierung einzelner Proteine wird häufig das natürlich vorkommende grün fluoreszierende Protein (GFP) verwendet, da es als nicht toxisch gilt. Für die Biolumineszenz sind die Aminosäuren Serin (Ser), Tyrosin (Tyr) und Glycin (Gly) verantwortlich, die bei der Faltung des Proteins automatisch eine aromatische Ringstruktur bilden. Die Anregungsmaxima liegen bei den Wellenlängen 395 nm bzw. 475 nm, während die Emission bei 509 nm auftritt. Eine Veränderung der Primärstruktur ermöglicht es, fluoreszierende Proteine (GFP-Mutanten) anderer Wellenlängenbereiche wie z.B. das cyan fluoreszierende Protein (CFP), das gelb fluoreszierende Protein (YFP) und das enhancedGFP zu realisieren. Letzteres besitzt ein Anregungsmaximum bei 490 nm mit konstanter Emission bei 509 nm.

Als Methode für die Markierung einzelner Proteine mit GFP stehen die Elektroporation [67] und die Liposom-Transfektion bzw. Lipofektion [68] zur Verfügung. Die beiden Methoden unterscheiden sich im Verfahren, wie die DNA in die Zelle geschleust wird. Bei der Elektroporation führen elektrische Pulse zu einem permeablen Zustand der Zellmembran, währenddessen die DNA in das Zellinnere gelangen kann [67]. Die Liposom-Transfektion bedient sich der Eigenschaft von Liposomen, mit der Zellmembran zu fusionieren. Abb. 2.12 zeigt schematisch den Vorgang der Liposom-Transfektion [69].

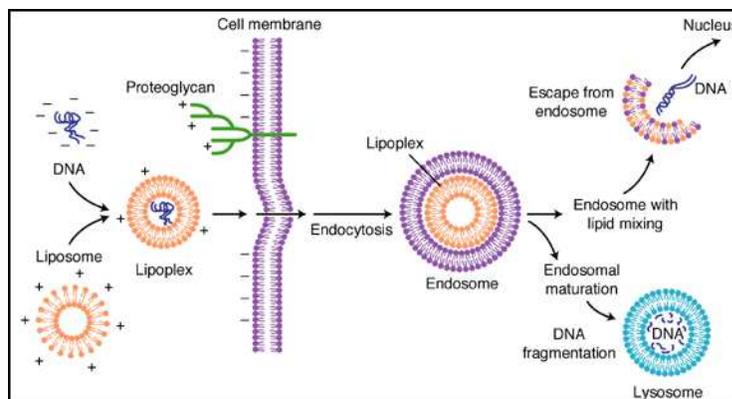


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der Liposom-Transfektion [69]

In diesem Fall wird die DNA durch Bildung von DNA-Liposom Komplexen (Lipoplexen) in die Zelle geschleust. Zur Fluoreszenzmarkierung wird die DNA des zu markierenden Proteins zunächst mit der GFP-DNA verknüpft, bevor die Transfektion durchgeführt

wird. Die modifizierte DNA gelangt dann mittels der Liposomen in die Zelle. Dort kann die Zelle das GFP-Fusionsprotein exprimieren, welches dann über Fluoreszenzdetektion innerhalb der Zelle lokalisiert werden kann.

Für die Detektion der Proteine kann alternativ zur Markierung mit Fluorophoren die native Fluoreszenz der Proteine verwendet werden. Für die native Fluoreszenz im UV-Bereich sind die drei Aminosäuren Tyrosin (Tyr), Tryptophan (Trp) und Phenylalanin (Phe) mit ihren aromatischen Ringstrukturen verantwortlich. Abbildung 2.13 zeigt die chemische Struktur der drei Aminosäuren.

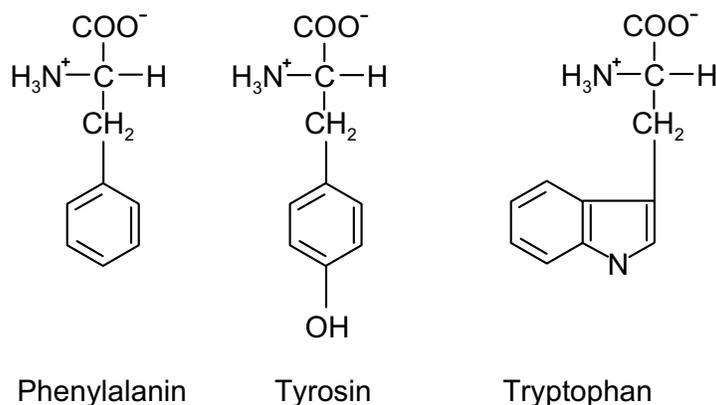


Abbildung 2.13: Strukturformel der Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan [70]

In Tabelle 2.1 sind die Fluoreszenzeigenschaften wie Absorption λ_{abs} , Emission λ_{em} , Lebensdauer τ und Quantenausbeute ϕ , der drei intrinsischen Fluorophore aufgeführt. Die Quantenausbeute ϕ gibt den Quotienten $\phi = I_E/I_A$ aus der Anzahl der emittierten I_E zu denen der absorbierten Photonen I_A an. In Wasser ergibt sich für ungebundenes Tyrosin und Tryptophan mit $\phi = 0.14$ bzw. $\phi = 0.13$ eine ähnliche Quantenausbeute, während Phenylalanin mit $\phi = 0.02$ eine sehr geringe Ausbeute zeigt. Die Fluoreszenzeigenschaften werden sehr deutlich von der Umgebung beeinflusst, was insbesondere beim Tryptophan auftritt [70]. Beispielsweise besitzt Tryptophan, welches in Proteinen gebunden ist, oft eine höhere Quantenausbeute als freies Tryptophan in Wasser (z.B. $\phi = 0.47$ in Rinderserumalbumin) [71]. Zusätzlich kann in nativen Proteinen ein Energietransfer (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)-Effekt) vom Tyrosin zum Tryptophan auftreten, wenn der Abstand zwischen den Aminosäuren dem Förster-Radius entspricht und das Emissionsspektrum vom Tyrosin einen spektralen Überlapp mit dem Anre-

Fluorophor	Absorption $\lambda_{abs,max}$	Emission $\lambda_{em,max}$	Lebensdauer τ	Ausbeute ϕ
Phenylalanin	260 nm	282 nm	6.8 ns	0.02
Tyrosin	275 nm	(304 ± 34) nm	3.6 ns	0.14
Tryptophan	295 nm	(353 ± 60) nm	3.1 ns	0.13

Tabelle 2.1: Fluoreszenzeigenschaften der drei ungebundenen Aminosäuren in H_2O bei Raumtemperatur [70]

gungsspektrum des Tryptophans zeigt (siehe Abb. 2.14). Dieses hat zur Folge, dass die Fluoreszenzausbeute des Tryptophans verstärkt wird [70, 71].

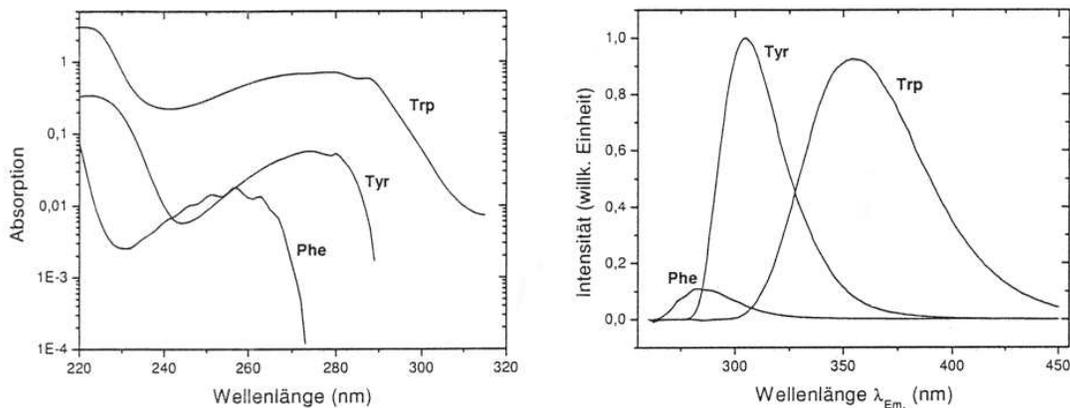


Abbildung 2.14: Anregungs- und Emissionsspektrum der drei Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan [70]

Die Anregung der Fluorophore sowie der Aminosäuren zur Fluoreszenz basiert auf der Existenz der aromatischen Ringstruktur. Durch Linearkombination der am Ringsystem beteiligten Atomorbitale ergeben sich die Molekülorbitale. Es resultieren σ - und π -Bindungen. Die σ -Bindungen bestehen aus sp^2 -Molekülorbitalbindungen, während die π -Bindungen eine Überlappung der p_z -Wellenfunktionen der C-Atome darstellen. Die elektronische Ladung der π -Orbitale konzentriert sich oberhalb und unterhalb der σ -Bindungsebene. Im Gegensatz zu den zwischen den Atomen lokalisierten σ -Elektronen besitzen die π -Elektronen eine hohe Beweglichkeit, die sich über das gesamte aroma-

tische Ringsystem erstreckt (Delokalisierung). Der geringe Energieabstand zwischen π -Grundzustand (HOMO) und dem ersten angeregten Zustand (LUMO) ermöglicht eine Anregung durch UV-Strahlung. Durch Bindungen weiterer Atom- und Molekülgruppen ändert sich die elektronische Struktur des Rings und damit auch das Absorptions- und Emissionsverhalten [70, 72].

2.6 Prinzip der Optischen Pinzette

Das Prinzip der optischen Pinzette basiert auf der Erzeugung eines dreidimensionalen optischen Fallenpotenzials durch einen stark fokussierten Laserstrahl [73, 74]. Mit dieser optischen Falle können transparente Objekte wie z.B. Zellen berührungslos und zerstörungsfrei gefangen und manipuliert werden. Die angelegten Kräfte liegen dabei im pN-Bereich.

Für die Beschreibung der Funktionsweise der optischen Pinzette wird zunächst der Fall betrachtet, in dem das Teilchen einen Radius r wesentlich kleiner als die Wellenlänge des einfallenden Lichtes besitzt ($r < 0.1 \lambda$). Die optischen Eigenschaften des Teilchens fallen dann in den Bereich der Rayleigh-Streuung. Im Fokus des Laserstrahles mit einer Intensität I_0 erfährt das Teilchen eine Streukraft \mathbf{F}_{Streu} in Richtung des einfallenden Lichtes, welche gegeben ist durch

$$\mathbf{F}_{Streu} = \frac{128 \pi^5 r^6 I_0}{3 \lambda c} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 n_{Medium}. \quad (2.35)$$

Dabei gibt c die Lichtgeschwindigkeit, n_{Medium} den Brechungsindex des umgebenen Mediums und $m = n_{Teilchen}/n_{Medium}$ den effektiven Brechungsindex ($n_T :=$ Brechungsindex des Teilchens) an. Neben der Streukraft \mathbf{F}_{Streu} wirkt eine weitere Kraft, die Gradientenkraft \mathbf{F}_{Grad} , auf das Teilchen. Diese Kraft rührt von der Wechselwirkung zwischen den durch das elektrische Feld des Lasers induzierten Dipolmomenten und dem elektrischen Feld des Lasers her:

$$\begin{aligned} \mathbf{F}_{Grad} &= -\frac{n_{Medium}}{2} \alpha \nabla \mathbf{E}^2 \\ &= -\frac{n_{Medium}^3 r^3}{2} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \nabla \mathbf{E}^2. \end{aligned} \quad (2.36)$$

Der Parameter α beschreibt die Polarisierbarkeit des gefangenen Teilchens und \mathbf{E} das elektrische Feld der einfallenden Strahlung. Damit das Teilchen stabil in der optischen Falle gehalten wird, muss die Gradientenkraft \mathbf{F}_{Grad} der Streukraft \mathbf{F}_{Streu} entgegengesetzt sowie betragsmäßig größer sein ($F_{Grad}/F_{Streu} \geq 1$).

Für das Fangen größerer Teilchen, wie z.B. Mikrokugeln, Zellen, etc., kann die geometrische Optik zur Beschreibung der Kräfte herangezogen werden, da für den Radius der Teilchen $2r \gg \lambda$ (Mie-Bereich) gilt. Abbildung 2.15 zeigt an den Lichtstrahlen a und b die auf ein Teilchen wirkenden Kräfte \mathbf{F}_{Grad} und \mathbf{F}_{Streu} .

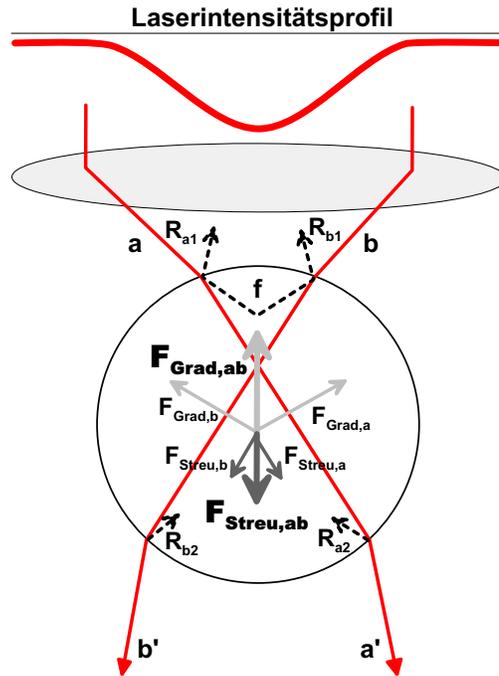


Abbildung 2.15: Darstellung der auf das Teilchen wirkenden Gradienten- \mathbf{F}_{Grad} und Streukräfte \mathbf{F}_{Streu} in einer optischen Falle

Beim Ein- und Austritt aus dem Teilchen werden die beiden konvergierenden Strahlen a und b an der Grenzfläche zwischen Teilchen und Medium gebrochen ($n_{Teilchen} > n_{Medium}$). Die austretenden Strahlen a' und b' zeigen im Vergleich zu den Strahlen a und b in eine andere Richtung, was zu einem Impulsübertrag auf das Teilchen und der Erzeugung der Gradientenkräfte $\mathbf{F}_{Grad,a}$ und $\mathbf{F}_{Grad,b}$ führt. Die resultierende Kraft $\mathbf{F}_{Grad,ab}$ ist zum geometrischen Fokus f des Objektivs gerichtet. Ihr entgegen wirkt die Netto-Streukraft $\mathbf{F}_{Streu,ab}$, welche sich aus den Reflexionen (dargestellt als die Strahlen \mathbf{R}_{a1} , \mathbf{R}_{b1} , \mathbf{R}_{a2} und \mathbf{R}_{b2}) an der Oberfläche des Teilchens beim Ein- und Austritt ergibt. Ein stabiler Gleichgewichtszustand stellt sich ein, sobald die Gradientenkraft $\mathbf{F}_{Grad,ab}$ der entgegengerichteten Streukraft $\mathbf{F}_{Streu,ab}$ entspricht. Im Fokus wird das vom Teilchen vorwärts gestreute Licht im Zentrum einer Vierquadrantendiode detektiert. Erfährt das Teilchen eine äußere Kraft, so wird die Auslenkung als eine Verschiebung des vorwärtsgestreuten Lichtkegels auf dem Detektor registriert. Die optische Pinzette wird kalibriert, indem

die Verschiebung einer definierten Kraft zugeordnet wird.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Aminosäuren Tyrosin (Tyr) und Tryptophan (Trp) sowie die Proteine Avidin, Lysozym C und Trypsinogen wurden von Sigma (Deutschland) bezogen. Rinderserumalbumin (BSA-FITC) stammte von Fluka (Deutschland). Zur Herstellung des TRIS-Puffers und Phosphatpuffers wurden Tris(hydroxymethyl)aminomethan und Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat von Fluka sowie Salzsäure von Novartis (Schweiz) verwendet. Für die elektrophoretischen Messungen wurden als Ausgangslösungen 10 mM Aminosäurelösungen (Tyr und Trp) im jeweiligen Puffersystem (10 mM Phosphatpuffer pH 8.3 oder 10 mM TRIS-Puffer pH 8.2) hergestellt. Bei dem verwendeten Wasser handelte es sich um Reinst-Wasser von Milli-Q (Millipore, USA). Für die Herstellung des SU-8 Masterwafers wurden negativer Photolack SU-8(50), Verdüner γ -butyrol Aceton und Entwickler Propylenglykoldimethyläther von Microresist (USA) verwendet. Der Siliziumwafer (P-Typ 100 dotiert mit Bor) stammte von Crystec (Deutschland). Isopropanol p.A., Schwefelsäure p.A. und Wasserstoffperoxid p.A. von Merck (Deutschland) wurden zur Reinigung des Wafers verwendet. Für die Silanisierung wurde Tridecafluor-1,1,2,2-tetrahydrooctyl-1-trichlorsilan (TDTS) von ABCR (Deutschland) benutzt. Die Mikrofluidik-Chips bestanden aus PDMS (Sylgard 184, Dow Corning, USA) und diversen Substraten als Deckplatte: Deckgläser mit einer Dicke von 0.2 mm aus Glas (Menzel, Deutschland) und Quarz (Suprasil 1, Aachener Quarzglas Heinrich GmbH, Deutschland) sowie Objektträger aus Glas (1 mm, Menzel) und Quarz (0.5 mm, Suprasil 1, Heraeus, Deutschland). Die Kohlenstoffpigmente *Black Pigment* wurden von ABCR bezogen. Das zur Reinigung benutzte Ethanol stammte von Roth (Deutschland), das Aceton von Riedel-de-Haen (Deutschland).

Die für die Funktionalisierung der PDMS Oberflächen und Mikrofluidik-Systeme verwendeten Silane 2-[Methoxy(polyoxyethylen)-propyl]trimethoxysilan $Si - POE_{(8)}$, Poly(oxyethylen)di(triethoxy)-silan $Si - POE_{(70)} - Si$ und Methoxy(poly(oxyethylen)trie-

thoxysilan *Si-POE*₍₁₀₉₎ wurden von Nektar (USA) bezogen. Die Polyoxyethylen (POE)-Polyoxypropylen (POP)-POE Triblock-Copolymere F108 (MM = 14600 Da) und L101 (MM = 3800 Da) stammten von BASF (Deutschland). Für die Protein- und Aminosäureanalyse wurden die Kanäle mit einer 3 μ M F108-Lösung beschichtet, während für die Zellexperimente eine 500 μ M F108-Lösung in 10 mM Phosphatpuffer pH 8.2 verwendet wurde.

Die Sf9-Insektenzellen, die Transfektionsvektoren pIEx4 sowie das Zellmedium (BacVector) wurden von Novagen (USA) bezogen. Für die Einzelzellexperimente mit einfacher Transfektion exprimierten die Sf9-Zellen eine GFP markierte ‘loss of function’ Mutante des cytoplasmischen G-Proteins ArF1 der *Medicago truncatula* (T31N-GFP, MM = 49.5 kDa). Im Fall der zweifachen Transfektion wurden die Proteine Pep12-YFP (MM = 50 kDa) und γ -PKC-GFP (MM = 105 kDa) von den Zellen exprimiert. Natriumdodecylsulphat (SDS), 2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure (CHES) wurden von Fluka, Pullulan von Sigma und Performance-Optimized-Polymer-6% (POP-6) von Applied Biosystems (USA) erstanden. Vor den Untersuchungen wurden 200 μ L Zellen im Zellmedium abgenommen und mittels Zentrifuge mit PBS Puffer (10 mM Phosphat, 137 mM Natriumchlorid, 2.7 Kaliumchlorid pH 6.4) gewaschen.

3.2 Präparation des Mikrofluidik-Chips

Für die Herstellung eines Mikrofluidik-Systems nach der Soft Lithographie Methode [75] wird zunächst ein so genannter SU-8 Masterwafer mit den invertierten Strukturen (Kap. 3.2.1) angefertigt, der dann als Plattform für wiederholte PDMS Abformungen dient. Letztere bilden die Basis für die Anfertigung eines PDMS/Glas Mikrofluidik-Chips (Kap. 3.2.2).

3.2.1 Herstellung des SU-8 Masterwafers

Für die Herstellung des Masterwafers wird ein 5” Siliziumwafer als Substrat verwendet, der zu Beginn in Caro’scher Säure für 20 min gereinigt wird. Anschließend wird der Wafer gründlich mit Wasser gespült sowie zusätzlich in zwei Wasserbädern für je 3 min gegeben, um etwaige Säurereste zu entfernen. Nach dieser intensiven Reinigung wird der Wafer in einer Trockenschleuder (Delta 10, Ble-Laboratory Equipment GmbH, Deutschland) bei 3000 Umdrehungen pro Minute (rpm) trocken geschleudert. Die restliche Feuchtigkeit wird ihm auf der Heizplatte bei 200° C für 20 min entzogen. Ist der Siliziumwafer abgekühlt, wird er in der Mitte des manuellen Belackers (Modell 1001/ST147,

Convac) abgelegt und durch Vakuum fixiert. Der negative Photolack SU-8(25) wird mittig auf den Wafer gegeben und mit 750 rpm homogen verteilt. Für 30 s wird der Lack dann bei 2250 rpm auf die Dicke von $24\ \mu\text{m}$ geschleudert. Für die Zellexperimente werden die Umdrehungen auf 1250 rpm für 30 s verringert, um eine Lackdicke von $27\ \mu\text{m}$ zu erzielen. Der beschichtete Wafer wird nun für 3 min auf 65°C und dann für 5 min auf 95°C vorgebacken. Nach der Abkühlung wird im darauffolgenden Schritt die Maske mit den gewünschten Strukturen mit der Chromseite auf den beschichteten Wafer gelegt und gleichmäßig angedrückt. Die Belichtung erfolgt mit der i-Linie der Quecksilberdampflampe eines Parallelbelichters (Model 8011, Oriol Corporation, USA). Für die Proteinanalysestrukturen wird eine Belichtungszeit von 36 s gewählt, während für die Strukturen für die Zellexperimente 46.5 s verwendet werden. Hiernach werden die belichteten Bereiche des Photolackes durch das Backen bei 65°C zunächst für 3 min und dann für 20 min bei 95°C vernetzt. Nach der Aushärtung werden die unbelichteten Stellen auf dem Wafer in einem SU-8 Entwicklerbad innerhalb von 2 min entfernt, so dass die gewünschten Strukturen als Stege zurückbleiben. Die Entwicklerreste werden mit Aceton und Isopropanol vorsichtig abgespült. Nach dem Trockenblasen mit Stickstoff folgt das abschließende Aushärten bei 200°C für 20 min. Zuguterletzt wird der fertige Masterwafer im Exsikkator mit TDTS silanisiert, um wiederholte Abformungen mit PDMS zu ermöglichen.

3.2.2 Fertigstellung des Mikrofluidik-Chips

Die einzelnen Prozessschritte für die Herstellung der PDMS Mikrofluidik-Chips sind in Abbildung 3.1 zu sehen. Zunächst wird PDMS mit dem Vernetzter im Verhältnis 10:1 gemischt. Die Mischung wird über den Silizium-Masterwafer mit den gewünschten Strukturen gegossen und für 4.5 h im Backofen bei 85°C ausgehärtet. Zur Vermeidung von Verschmutzungen wird das PDMS im Reinraum vom Siliziumwafer abgezogen und anschließend entsprechend zurecht geschnitten. Am Ende eines jeden Kanals werden Reservoirlöcher mit einem 3 mm Stanzer von der unstrukturierten Seite durch das PDMS gestanzt. Über die Reservoirlöcher erfolgt die Flüssigkeitszufuhr zu den Kanälen sowie die elektrische Kontaktierung. Die zugeschnittene PDMS Mikrostruktur wird mit Ethanol und Wasser kurz abgespült und mit Stickstoff vorsichtig trocken geblasen. Die für die Zellexperimente verwendeten PDMS Strukturen werden ohne eine zusätzliche Reinigung genutzt, da ansonsten die Pfosten wegen des hohen Aspektverhältnisses kollabieren. Die als Deckplatte dienenden Deckgläser bzw. Objektträger oder PDMS werden im Ultraschallbad für je 3 min in Aceton, Ethanol und Wasser gewaschen und mit Stickstoff

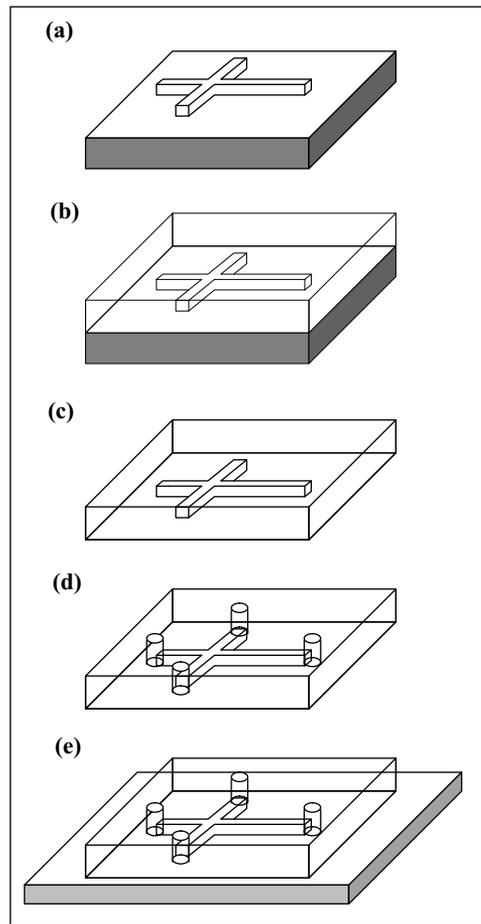


Abbildung 3.1: Herstellung der PDMS/Glas Mikrofluidik-Systeme

(a) Silizium-Wafer mit dem invertierten Relief; (b) mit PDMS überzogene Mikrofluidik-Kanalvorlage; (c) vom Master abgeformte PDMS Mikrofluidik-Kanalstruktur; (d) PDMS Mikrofluidik-Kanalsystem mit den gestanzten Reservoirlöchern; (e) PDMS Mikrochip, bestehend aus dem PDMS Mikrofluidik-Kanal und dem Glasobjektträger

abgeblasen. Im Anschluss an die Reinigungsprozedur werden die Oberflächen vom PDMS und den Deckgläsern mit reaktivem Sauerstoff behandelt. Die Oberflächenoxidation wird mit UV-Licht in einem UV-Ozon-Reiniger (Modell 42-220, Jelight Company Inc., Kanada) für 3 min bzw. 60 min oder für 30 s mit einem Sauerstoffplasma in der selbstgebauten Anlage (siehe Kap. 3.2.3) vorgenommen. Fügt man beide Substrate zusammen, so ergibt sich eine irreversible Verbindung. Die Befüllung der Kanäle mit Puffer erfolgt im Fall der UV-Ozon oxidierten Proben sofort nach der Behandlung. Die im Sauerstoffplasma

behandelten Proben werden erst nach zwei Stunden per Kapillarkraft oder Vakuum befüllt, da ansonsten die Flüssigkeit aufgrund der hydrophilen Oberfläche zwischen die Substrate gezogen wird und eine Verbindung unmöglich macht.

3.2.3 Oberflächenbehandlung mittels Sauerstoffplasma

Abbildung 3.2 zeigt die im Rahmen dieser Arbeit aufgebaute Plasmaanlage zur Oberflächenbehandlung und Reinigung von PDMS- und Glasoberflächen in Anlehnung an Aebi et al. [76]. Im Folgenden wird die Handhabung der Sauerstoffplasmaanlage de-

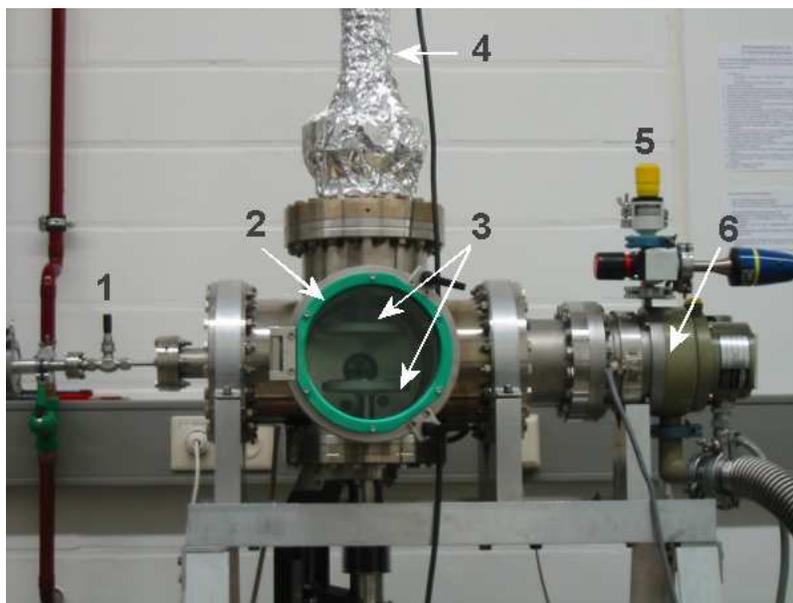


Abbildung 3.2: Selbstgebaute Sauerstoffplasmaanlage

Kurzbeschreibung der einzelnen Bestandteile: (1) Sauerstoffzufuhr, (2) Kammer, (3) Tellerelektroden, (4) Teslaspule, (5) Stickstoffzufuhr, (6) Turbomolekularpumpe

tailliert beschrieben. Zunächst werden das PDMS Stück und das Deckglas separat auf eine Aluminiumplatte gelegt und unter ausströmendem Stickstoff in die Plasmakammer geschleust. Die untere, gerdete Elektrode dient dabei als Ablage. Mit Verschluss der Kammer wird die Stickstoffzufuhr gestoppt und die Kammer mittels einer Vorpumpe (Alcatel, Frankreich) und einer Turbomolekularpumpe (TPV-170, Pfeiffer Vakuumtechnik, Deutschland) auf einen Wert von 10^{-6} mbar evakuiert. Ist dieser Wert erreicht, wird die Turbomolekularpumpe abgeschaltet und Sauerstoff über ein Nadelventil zugeführt, bis ein Druck von $1 \cdot 10^{-1}$ mbar in der Kammer herrscht. Das Sauerstoffplasma wird durch

das hochfrequente Wechselfeld (50 kV bei 500 kHz) einer Tesla-Spule (Model BD-10ASV, Electro Technic Products, USA) zwischen zwei Tellerelektroden im Abstand von 6.2 cm erzeugt. Durch das Sichtfenster der Kammer kann die Zündung des Plasmas beobachtet werden. Nach einer Behandlungsdauer von 30 s wird das Sauerstoffventil geschlossen und die Vorpumpe abgeschaltet. Gleichzeitig wird Stickstoff eingelassen, bis sich die Kammer bei erzieltm Druckausgleich öffnet und die Proben entnommen werden können.

3.3 Experimenteller Aufbau

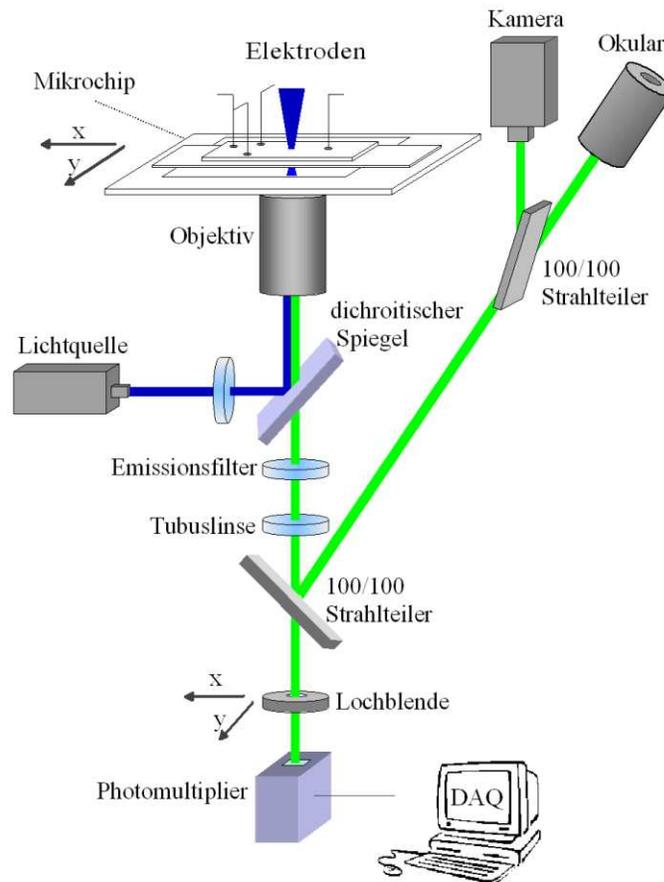


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau des Anregungs- und Detektionssystems
Das Anregungslicht gelangt über den dichroitischen Spiegel und das Objektiv in den PDMS Mikrochip. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt mittels eines Photomultipliers (Details siehe Text).

In Abbildung 3.3 ist im Detail der experimentelle Aufbau des Anregungs- und LIF-Detektionssystems zu sehen. Die Basis bildet ein invertiertes Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Deutschland). Als Anregungsquelle wird im ultravioletten Bereich ein frequenzvervierfacher Nd:YAG Laser (266 nm, 5 mW, Nanolaser, Frankreich) verwendet. Bevor das Laserlicht unter einem Winkel von 45° auf den dichroitischen Spiegel (HR 266 nm, HT > 300 nm, Laseroptik, Deutschland) trifft, wird die Leistung durch einen Transmissionsfilter (AHF Analysentechnik, Deutschland) auf 10% abgeschwächt. Optional können weitere Filter (3%, 50% von AHF und 50%, 30% von Mellios Griot, France) zur Abschwächung verwendet werden. Das vom Dichroit reflektierte Anregungslicht wird vom Objektiv (40x, Optics For Research, USA) auf den Mikrofluidik-Kanal fokussiert. Neben dem OFR-Objektiv kann im UV-Bereich ebenso ein reflektives Objektiv (52x, Ealing, USA) genutzt werden, wobei die Intensität des Lasers in dem Fall nicht um 90% reduziert wird. Eine motorisierter x/y-Tisch (Märzhäuser GmbH, Deutschland) ermöglicht die manuelle Auswahl eines beliebigen Punktes als Detektionsfenster. Die emittierte Fluoreszenz wird vom Objektiv gesammelt und vom dichroitischen Spiegel transmittiert. Ein zusätzlicher Interferenzfilter (AHF) begrenzt das Fluoreszenzlicht auf dem Wellenlängenbereich (360 ± 25) nm. Die Tubuslinse fokussiert das Fluoreszenzlicht auf die Detektorfläche des Photomultipliers (H6240, Hamamatsu, Japan), welcher sich für eine optimale Ausbeute mittels x/y-Verstellschrauben ausrichten lässt. Eine davor eingefügte Lochblende ermöglicht die Detektion aus einem definierten Volumen in x-, y- und z-Richtung, was zu einer Verringerung des Streulichtanteils am Hintergrundsignal führt. Lochblenden mit Durchmessern von $50 \mu\text{m}$ bis $1000 \mu\text{m}$ finden als räumliche Filter Einsatz. Die Erfassung der Daten erfolgt mittels eines Labview Programmes (National Instruments, USA), welches die vom Photomultiplier generierten TTL-Signale während eines variablen Zeitfensters aufzeichnet. Anstelle des Photomultipliers kann über einen Spiegel (Modell 5103, New Focus, USA) die emittierte Fluoreszenz vom Spektrometer (Triax 190, Jobin Yvon, Frankreich) registriert und spektral aufgelöst werden. Der Strahlteiler vor dem Okular bietet die Möglichkeit der Beobachtung und der Kontrolle der Vorgänge mit einer Kamera (CCD-DMK 3002-IR, The Imaging Source oder Imager3, LaVision, Deutschland) oder dem Auge.

Für die Anregung im sichtbaren Bereich werden ein Argonionenlaser (488 nm, 2 mW, 161C-010, Spectra Physics, Deutschland) als Anregungsquelle sowie das Objektiv LD Achroplan 20x Korr. von Zeiss verwendet. Die spektralen Filter werden entsprechend angepasst: Bandpassfilter (BP 450-490 nm, Zeiss), dichroitischer Spiegel (FT 510 nm, Zeiss) und Emissionsfilter (LP 520 nm, Zeiss).

Abbildung 3.4 zeigt den experimentellen Aufbau des gesamten Messsystems. Die Fluo-

reszenzdetektionseinheit und die Anregungsquellen (Nd:YAG Laser und Argonionenlaser) befinden sich auf dem passiv gedämpften Tisch. Ein Wechsel zwischen den beiden Quellen bzw. Wellenlängenbereichen wird durch einen Kippspiegel (Modell 5103, New Focus) ermöglicht. Über zwei weitere Spiegel (Modell 5108, New Focus) wird das Anregungslicht rückwärtig in das Epifluoreszenzmikroskop eingekoppelt. Auf der rechten Seite sind die Mikrofluidik-Steuerung und die Datenerfassung zu sehen.

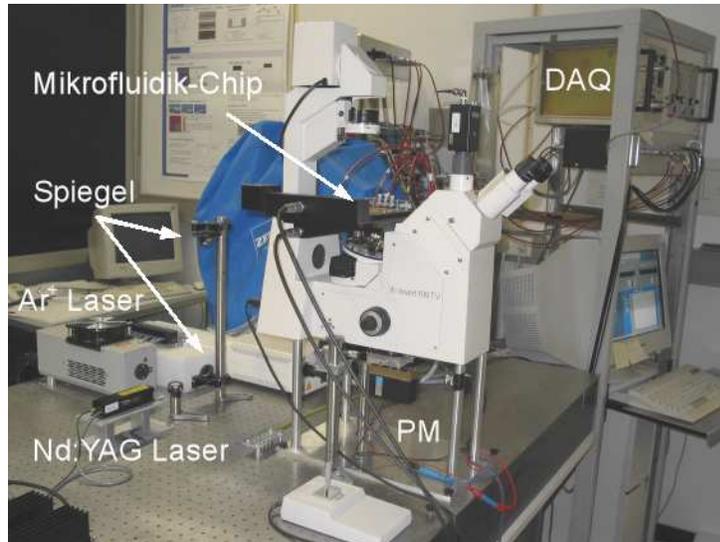


Abbildung 3.4: Experimenteller Gesamtaufbau

Die Fluoreszenzdetektionseinheit sowie die über die Spiegel eingekoppelten Anregungsquellen befinden sich auf dem passiv gedämpften Tisch. Die Mikrofluidik-Steuerung und die Datenerfassung sind auf der rechten Seite gezeigt.

3.4 Mikrofluidik-Steuerung

Die elektrische Kontaktierung des Mikrofluidik-Systems erfolgt über die in die Reservoirs eingetauchten Platinelektroden, wobei die Spannung im Bereich von 0-12.5 kV von den Hochspannungsverstärkern (HCN 14-12500 und HCN 7E-12500, FUG, Deutschland) geliefert wird. Die Regelung dieser Versorgung ermöglicht eine angefertigte Relaisschaltung (Relais 3392-5272-6, Günther GmbH, Deutschland), welche mittels eines Labview Programmes gesteuert wird. Das Programm unterteilt sich entsprechend der zwei Vorgänge (Injektion und Trennung) in zwei Prozesse: *load* und *dispose*. Des Weiteren ist

das Labview Programm zur Datenaufnahme des Photomultipliersignals mit in das Steuerungsprogramm integriert.

Die Injektion der Analytlösungen erfolgt gemäß der in Kap. 2.4.1 vorgestellten *floating* und *pinched* Methode. Typischerweise werden elektrische Feldstärken von 300-600 V/cm zum Transport der Lösungen aus Reservoir 3 in den Kreuzungsbereich verwendet (siehe Abb. 3.5 für die Reservoirbezeichnung). Der Vorgang dauert im Fall der *floating* Methode 8-20 s. Für die *pinched* Methode liegen die elektrischen Feldstärken für 60-140 s an, während durch Spannungen von ~ 500 V/cm an den Reservoirs 1 und 2 gleichzeitig ein definiertes Probenvolumen im Kreuzungsbereich erzielt wird. Im Trennvorgang werden in beiden Fällen elektrische Feldstärken im Bereich von 400-800 V/cm an Reservoir 1 angelegt, um das Kreuzungsvolumen in den Trennkanal (Kanal 2) zu injizieren.

Im Fall der Einzelzelleexperimente werden für die Injektion des Zell-Lysats elektrische Feldstärken im Bereich von 240-850 V/cm verwendet. Die elektrische Lyse erfolgt mit Feldstärken von ~ 1200 V/cm über einen Zeitraum von 50 ms.

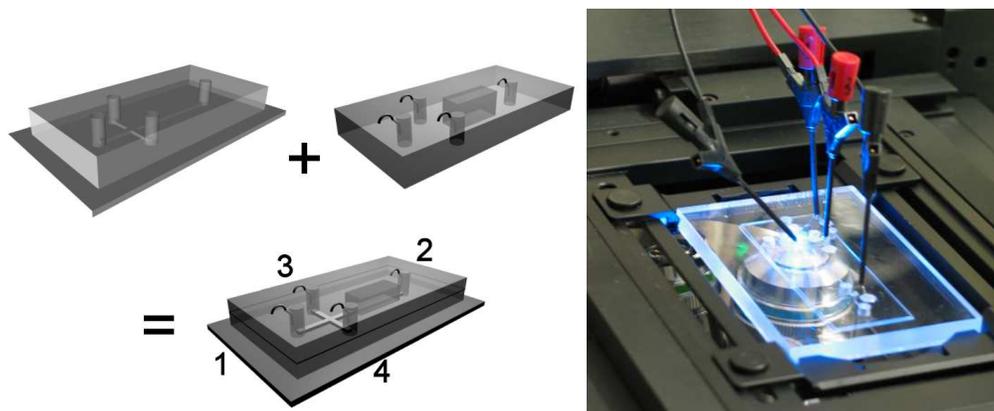


Abbildung 3.5: Vergrößerung der Reservoirvolumen und elektrische Kontaktierung

Mit Hilfe eines Plexiglasblockes werden die Reservoirs vergrößert sowie eine elektrische Kontaktierung über die eingefassten Platinelektroden erzielt. Das rechte Bild zeigt die experimentelle Realisierung und die Kontaktierung mit MicroKleps.

Zur Vermeidung von hydrostatischen Effekten werden die Reservoirvolumen durch den Aufsatz eines Plexiglasblockes (Dicke 1 cm) vergrößert (siehe Abb. 3.5). Die Reservoirs fassen so ein Volumen von $34 \mu\text{L}$. In die Reservoirs werden zusätzlich die Platinelektroden ($d=0.4$ mm, VWR, Deutschland) eingefasst, die über Miniaturklemmen (Micro-

Kleps, Conrads, Deutschland) mit der Spannungsversorgung verbunden sind. Aufgrund der guten Adhäsionseigenschaften von PDMS lässt sich der Mikrofluidik-Chip reversibel an den Plexiglasblock anbringen, so dass eine erneute Verwendung des Plexiglasblocks ermöglicht wird. Im Bereich der LIF-Detektion ist im Plexiglasblock ein Durchgang eingefräst, um störende Reflexionen zu vermeiden.

3.5 Oberflächenbehandlung und -charakterisierung

3.5.1 Oberflächenbeschichtung

Für die Untersuchung der funktionalisierten Oberflächen werden die Goniometrie und die Rasterkraftmikroskopie (AFM) verwendet. Als Proben werden flache PDMS Stücke genutzt, die von einem unstrukturierten silanisierten Siliziumwafer abgeformt und zurecht geschnitten werden. Nach einer dreiminütigen Reinigung im Ultraschallbad mit Ethanol und Wasser werden die Proben mit Stickstoff trocken geblasen, bevor sie für 3 min bzw. 60 min im UV-Ozon Reiniger oder für 30 s im Sauerstoffplasma oxidiert werden. Direkt danach werden die unbehandelten sowie die oxidierten Proben mit den drei Silanen unterschiedlicher POE-Länge in einer 3 mM Lösung in Wasser mit 0.8 mL konzentrierter HCl pro Liter für 2 h beschichtet. Die Adsorption der Triblock-Copolymere auf die PDMS Oberflächen erfolgt für 20 h in einer 3 μ M Lösung in 10 mM Phosphatpuffer (pH 8.2). Nach der Einwirkzeit werden die Proben gründlich mit Wasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen.

3.5.2 Kontaktwinkel

Als Maßstab für die Benetzungsfähigkeit von unbehandeltem und funktionalisiertem PDMS wird der Kontaktwinkel eines Wassertropfens auf der Oberfläche bestimmt. Für die dynamische Kontaktwinkelmessung wird das Goniometer vom Typ G10 (Krüss Systeme, Deutschland), welches in Abbildung 3.6(a) zu sehen ist, verwendet. Bei dieser Methode wird einem Tropfen aus destilliertem Wasser mittels einer Spritzenadel solange Flüssigkeit hinzugegeben, bis sich der Tropfen ohne weitere Benetzung der PDMS Probenoberfläche maximal ausgedehnt hat. Der dann am Kontaktpunkt Flüssigkeit, Oberfläche und Luft eingeschlossene Winkel θ wird als Fortschreitewinkel bezeichnet und mit einer beweglichen Tangente im Okular bestimmt. Eine weitere Flüssigkeitszufuhr führt zunächst zu einer Vergrößerung der benetzten Fläche und dann zu einer Zunahme des Tropfenvolumens. Ist das Maximalvolumen erreicht, dehnt sich der Tropfen

fen auf der Oberfläche weiter aus. Der sich wiederholende Vorgang ist schematisch in Abbildung 3.6(b) zu sehen. Der Rückzugswinkel wird beim Einziehen des Tropfens von der Oberfläche nach dem gleichen Prinzip bestimmt.

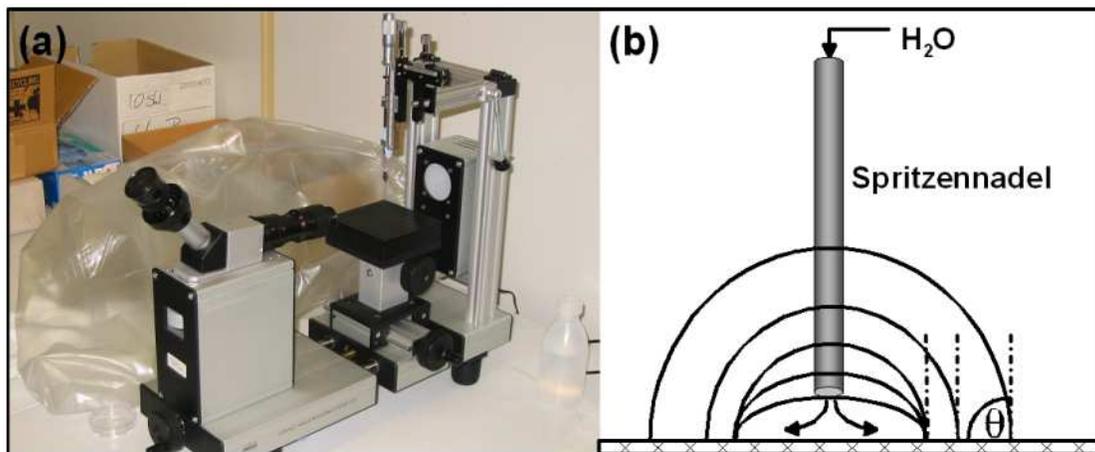


Abbildung 3.6: (a) Krüss Goniometer G10 (b) Schematisches Bild des Messvorganges bei der dynamischen Kontaktwinkelbestimmung. Der Winkel θ gibt den Fortschreitewinkel an.

3.5.3 Rasterkraftmikroskopie

Für die Abbildung der behandelten PDMS Proben wird ein Rasterkraftmikroskop (engl. **A**tomic **F**orce **M**icroscope AFM) vom Typ Bioscope (Nanoscope IIIa, Veeco, USA) im Tapping-Modus verwendet. Als Sensoren für die Aufnahmen unter Laborbedingungen werden Siliziumspitzen (Nanoprobe, Wetzlar, Deutschland) genutzt.

Die Untersuchung des Adsorptionsmechanismus von F108 auf den PDMS Oberflächen findet in Lösung (10 mM Phosphatpuffer, pH 8.2) statt. Dafür wird ein quadratisches Dünnstegnetzchen (AGAR-G2780N, Plano, Deutschland) auf eine unbehandelte PDMS Oberfläche gelegt. Die PDMS Probe inklusive des Gitters wird dann für 30 s in einem Sauerstoffplasma behandelt. Anschließend wird das Gitter entfernt und die PDMS Probe in einer $3 \mu\text{M}$ F108-Lösung in 10 mM Phosphatpuffer (pH 8.2) inkubiert. Nach einer Einwirkzeit von 20 h erfolgt eine Spülung mit 10 mM Phosphatpuffer (pH 8.2). Als Spitzen für die Messungen werden in Lösung Siliziumnitridspitzen (Olympus, Japan) verwendet.

3.5.4 Elektroosmotischer Fluss

Für die Messung des elektroosmotischen Flusses in den aus PDMS/Glas oder PDMS bestehenden Mikrofluidik-Chips wird die Stromkennlinien-Methode von Huang et al. [52] verwendet. Dabei wird zunächst ein linearer Mikrofluidik-Kanal der Länge L per Kapillarkraft mit einer $c_0 = 20$ mM Phosphatlösung (pH 8.2) gefüllt und eine Spannung von $U = 1000$ V an das Reservoir angelegt. Nach einer kurzen Stabilisierungsphase des Stroms werden die Pufferlösungen beider Reservoirs gegen frische Lösungen ausgetauscht. Dabei wird das eine Reservoir erneut mit einer 20 mM Lösung befüllt, während das andere Reservoir eine 18 mM Phosphatlösung (pH 8.2) erhält. Über einen Zeitraum von 80 s wird dann an das mit 18 mM Puffer gefüllte Reservoir eine Spannung von $U = 1000$ V angelegt, was eine elektroosmotische Migration der niedriger konzentrierteren Pufferlösung entlang des Kanals zur Folge hat. Anschließend wird der Kanal mehrfach mit der 20 mM Lösung gespült. Die Daten werden mittels eines Labview Programmes aufgenommen. Aus den Stromkennlinien wird dann die elektroosmotische Mobilität μ_{eof} der 18 mM Lösung anhand von Gleichung (2.23) berechnet,

$$\mu_{eof} = \frac{L^2}{U\Delta t},$$

wobei die Kanallänge $L = 2$ cm und die Spannung $U = 1000$ V betragen. Die Zeitdifferenz $\Delta t = t_1 - t_0$ beschreibt die Zeitspanne vom Start der Messung bei t_0 bis zur Stabilisierung bei t_1 . Der Zeitpunkt t_1 ergibt sich aus dem Schnittpunkt zweier an die Daten gefitteten Geraden. Es werden jeweils mindestens drei elektroosmotische Flussmessungen pro Chip mit 18 mM/20 mM Phosphatpuffer (pH 8.2) durchgeführt, wobei während der Messungen mehrfache Spülschritte erfolgen.

Für die Untersuchungen mit den POE-Lösungen werden vor der Beschichtung Referenzmessungen mit dem Phosphatpuffer durchgeführt. Die Konzentrationen und Einwirkzeiten für die POE-Lösungen sind dieselben wie bei den Kontaktwinkel- und AFM-Messungen. Nach der Beschichtungszeit werden die Lösungen gegen den 20 mM Phosphatpuffer ausgetauscht und die Messungen begonnen.

3.5.5 Proteinadsorption

Für die qualitative Untersuchung der F108-Beschichtung in Bezug auf die Proteinadsorption wird das Protein Rinderserumalbumin (BSA) verwendet, welches zur Visualisierung mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert ist. Die PDMS Proben stammen von einem unstrukturierten silanisierten Si-Wafer. Vor der Sauerstoffplasmabehandlung werden die Proben in Ethanol und Wasser für je 3 min im Ultraschallbad gereinigt und

im Anschluss mit Stickstoff abgeblasen. Während des Oxidationsprozesses von 30 s werden die PDMS Proben halbseitig mit einer PET-Folie abgedeckt. Nach der Behandlung wird die Folie entfernt und die Probe ohne Beschichtung sofort in die Proteinlösung (10 μM BSA/FITC Lösung in 10 mM Phosphatpuffer pH 8.4) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 h werden die Proben mit Wasser abgespült. Für die mit F108 behandelten PDMS Proben wird nach der Oxidation ein Beschichtungsschritt mit 500 μM F108-Lösung in 5 mM Phosphatpuffer (pH 8.3) für 2 h durchgeführt. Vor der Inkubation der Proteinlösung sowie im Anschluss werden die Proben mit Wasser gespült. Für die Fluoreszenzaufnahmen wird eine sensitive CCD-Kamera (Imager3LS, LaVision) verwendet.

3.6 Optische Pinzette

Mit der optischen Pinzette kann eine Insektenzelle gezielt aus einem Ensemble von Zellen im Reservoir des Mikrochips ausgewählt und kontrolliert bewegt werden. Die Navigation der gefangenen Zelle ermöglicht ein x/y-Tisch mit einem Verstellweg von 25 mm und einer Präzision von 1-2 μm . Bei Kanallängen von mehreren Zentimetern wird die Zelle streckenweise durch unterschiedliche Tropfengrößen auf den Reservoirs hydrodynamisch im Kanal bewegt. Für eine gezielte Positionierung wird die Zelle erneut mit der optischen Pinzette eingefangen und kontrolliert zum Punkt, wo die Lyse stattfindet, navigiert.

Bei der verwendeten optischen Pinzette handelt es sich um einen in der Arbeitsgruppe *Experimentelle Biophysik* erstellten experimentellen Aufbau [77, 78]. Die Basis bildet dabei ein inverses Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss). Für die Realisierung der optischen Falle wird ein Infrarotlaser (1064 nm Nd:YAG, LCS-DTL-322, Laser 2000, Deutschland) von der Rückseite des Mikroskops eingekoppelt und mittels eines Wasserimmersionsobjektivs (UPL-APO60W/IR, Olympus, Japan) fokussiert. Die Kalibration der Kraft erfolgt über den Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit des steuerbaren Piezotisches und der Auslenkung aus der Falle, welche über einen Vierquadrantendetektor registriert wird. Mittels der Stokesschen Reibungskraft kann von der Geschwindigkeit auf die Kraft geschlossen werden.

Für die Auswahl fluoreszenter Insektenzellen wird zusätzlich das Licht einer Quecksilberdampfampe (Zeiss) seitlich in das Mikroskop eingekoppelt, wobei ein Anregungsfilter selektiv den Wellenlängenbereich von 450 bis 490 nm des Breitbandspektrums der Lampe transmittiert. Als Tiefpaß-Filter dient ein dichroitischer Spiegel mit einer Kante bei 505 nm, während ein Emissionsfilter den Bereich von 515 bis 565 nm (Filtersatz

XF-22, Omegaoptics, Deutschland) durchlässt. In der Fokusebene leuchtet die Quecksilberdampflampe einen Bereich von ca. $100\ \mu\text{m}$ um die optische Falle aus.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Funktionalisierung der PDMS Oberfläche

Aufgrund seiner einfachen Handhabung und niedrigen Materialkosten findet Polydimethylsiloxan (PDMS) weit verbreiteten Einsatz bei der Herstellung von Mikrofluidik-Systemen. Vor allem die Gaspermeabilität und die Biokompatibilität stellen sich dabei für bioanalytische Anwendungen als vorteilhaft heraus [49, 79, 80]. Die Effizienz der Analysensysteme wird maßgeblich durch die Oberflächeneigenschaften der PDMS Mikrofluidik-Kanäle bestimmt, die speziell in der Protein- und Zellanalytik durch die unspezifische Adsorption an die PDMS Oberflächen beeinflusst werden können [58,81–83]. Es sind daher Strategien zur Kontrolle der Oberflächeneigenschaften von PDMS erforderlich.

Im Folgenden werden die Oxidation sowie verschiedene Beschichtungen mit Polyoxyethylenglykolen (POE) zur PDMS Oberflächenfunktionalisierung vorgestellt und mit diversen Methoden wie der Goniometrie, der Rasterkraftmikroskopie und der elektroosmotischen Flussmessung charakterisiert.

4.1.1 Oxidation der PDMS Oberfläche

Als Methoden für die Oxidation von PDMS, das aus sich wiederholenden $-\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$ Einheiten besteht, sind in dieser Arbeit die UV-Ozon- sowie die Sauerstoffplasmabehandlung verwendet worden. Bei der UV-Ozonbehandlung wird durch kurzweilige UV-Strahlung aus molekularem Sauerstoff und Ozon atomarer Sauerstoff erzeugt, der mit der Oberfläche wechselwirkt [84, 85]. Im Fall des Sauerstoffplasmas wird die Oberfläche einer großen Anzahl an hochenergetischen Elektronen, hochreaktiven Ionen und freien Sauerstoffradikalarten ausgesetzt [82, 85].

In Tabelle 4.1 sind die Kontaktwinkel für die PDMS Oberflächen nach den entsprechenden Behandlungen gezeigt.

Kanal-system	Art der PDMS Oberflächen-behandlung	Kontaktwinkel auf PDMS θ	$\mu_{eof} \times 10^{-4}$ [cm^2/Vs]
PDMS/Glas	unbehandelt	117°	2.3 ± 0.04
	UV (3 min)	115°	2.6 ± 0.1
	UV (60 min)	25°	-
	Plasma (15 s)	54°	-
	Plasma (30 s)	< 20°	3.1 ± 0.5
	Plasma (60 s)	< 20°	-
PDMS/PDMS	unbehandelt		1.7 ± 0.1
	UV (3 min)		3.1 ± 0.3
	Plasma (30 s)		3.4 ± 0.3

Tabelle 4.1: Fortschreitekontaktwinkel für PDMS Oberflächen und μ_{eof} für PDMS Mikrofluidik-Kanäle vor und nach der Oxidation. Für die Kontaktwinkelmessungen wird ein Fehler von $\pm 2^\circ$ angenommen.

Für unbehandeltes PDMS ergibt sich ein Kontaktwinkel von 117° , der nach einer UV-Ozon Behandlung von 3 min auf 115° abnimmt. Der hydrophobe Charakter der PDMS Oberfläche bleibt somit nach der Behandlung weitestgehend bestehen. Erst nach 60 min Behandlung ergeben sich signifikante Reduzierungen des Kontaktwinkels auf 25° , was sehr gut mit Hillborg et al. [86] übereinstimmt. Für Behandlungsdauern unter 30 min erhielten sie auch nahezu unveränderte Fortschreitewinkel, die sie auf eine nur teilweise erfolgreiche Oxidation der Oberflächen zurückführen.

Bei längeren Behandlungszeiten treten Risse in der Oberfläche des PDMS auf, die vermutlich durch die Bildung einer dünnen und spröden SiO_x -Schicht entstehen. Efimenko et al. [84] stellten fest, dass nach einer UV-Ozon Behandlung (> 20 min) die oberste Schicht (~ 5 nm) zu 50% aus SiO_x besteht.

Betrachtet man die Kontaktwinkel für Sauerstoffplasma oxidierte Oberflächen, so treten signifikante Veränderungen schon nach wenigen Sekunden auf. Bereits eine Oxidation von 15 s ergibt Kontaktwinkel von 54° , während doppelt solange Behandlungen Winkel unterhalb von 20° liefern. Längere Behandlungsdauern (60 s) führen zu keiner messbaren Veränderung des Kontaktwinkels dieser äußerst hydrophilen Oberfläche, sondern lassen nur Risse auf der Oberfläche entstehen (siehe Abb. 4.1). Die Ursache der Risse liegt auch hier in der Entstehung einer spröden SiO_x -Schicht [86–90].

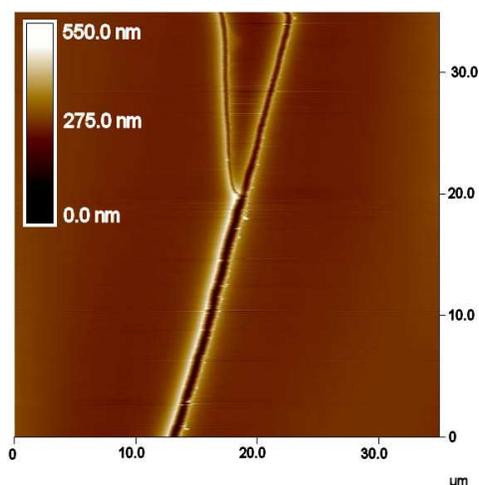


Abbildung 4.1: AFM-Aufnahme der spröden und rissigen PDMS Oberfläche nach einer Sauerstoffplasma-Behandlung von 60 s

Die optimierten Prozessparameter der selbst aufgebauten Plasmaanlage sind im Rahmen einer Facharbeit ermittelt worden [91]. Dabei sind zum einen der Elektrodenabstand von 1.2 cm bis 6.2 cm und zum anderen der Sauerstoffdruck innerhalb der Kammer im Bereich von 0.05 mbar und 0.5 mbar variiert worden. Es stellt sich heraus, dass beim Maximalabstand der Elektroden von 6.2 cm für Oxidationszeiten von 30 s hydrophile Oberflächen ($< 20^\circ$) ohne Risse erzielt werden. Dagegen weisen kleinere Abstände (2.4 cm) bei ähnlichen Kontaktwinkeln Risse in der Oberfläche auf. Eine Variation des Drucks beim Abstand von 6.2 cm ergibt für 0.1 mbar die hydrophilste Oberfläche, während für niedrigere und höhere Drücke der Kontaktwinkel ansteigt. Entsprechend der Resultate zu den Behandlungsdauern werden die Sauerstoffplasmaoxidationen für die folgenden Messungen bei einem Druck von 0.1 mbar und einem Elektrodenabstand von 6.2 cm für 30 s durchgeführt. Abbildung 4.2 zeigt eine Aufnahme des gezündeten Sauerstoffplasmas unter diesen Bedingungen.

Des Weiteren ist die zeitliche Entwicklung des Kontaktwinkels nach der Oxidation im Sauerstoffplasma untersucht worden. Es zeigt sich, dass der Winkel bis zu zwei Stunden nach der Behandlung nahezu unverändert bleibt und dann nach 24 Stunden den doppelten Wert erreicht. Acht Tage danach ist der Kontaktwinkel um das 3-fache gestiegen [91]. Dieser Alterungseffekt der PDMS Oberfläche ist ebenso von anderen Gruppen [8, 54, 92, 93] beobachtet worden, wenn die Proben an der Raumluft gelagert werden. Die Ursache für die Rückkehr zu einer hydrophoben Oberfläche (*hydrophobic recovery*) ist noch nicht eindeutig geklärt. Zum einen werden Reorientierungen polarer Gruppen

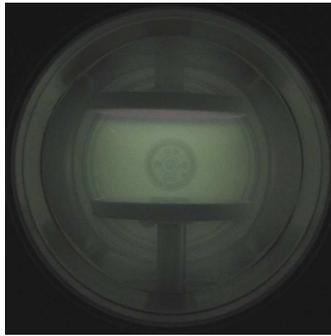


Abbildung 4.2: Gezündetes Sauerstoffplasma in der eigens aufgebauten Anlage

von der Oberfläche ins Elastomer hinein vermutet, zum anderen die Diffusion von gering molekulargewichtigem PDMS an die Oberfläche [89, 94]. Durch die Lagerung der Proben in Wasser kann der Prozessverlauf verzögert werden [94–96].

Ein ähnliches Verhalten wie bei den Kontaktwinkelmessungen spiegelt sich auch bei den elektroosmotischen Mobilitäten μ_{eof} wider (Tab. 4.1). Die Mobilitäten werden nach der Stromkennlinienmethode von Huang et al. [52] in PDMS/Glas und PDMS/PDMS Mikrofluidik-Systemen bestimmt. Es zeigt sich, dass die Werte vom unbehandelten PDMS über das mit UV-Ozon bis zu den mit Sauerstoffplasma behandelten PDMS ansteigen. Dieser Trend zeichnet sich sowohl bei den PDMS/Glas als auch bei den vollständig aus PDMS hergestellten Kanalsystemen ab.

Für unbehandeltes PDMS ergeben sich Mobilitätswerte von $2.3 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ für PDMS/Glas und $1.7 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ für PDMS/PDMS Mikrochips. Für PDMS/Glas Systeme sind von Ren et al. [93] vergleichbare Mobilitäten erzielt worden. Die Ursache des elektroosmotischen Flusses (EOF) in unbehandelten Mikrofluidik-Kanälen ist bisher noch nicht vollständig geklärt [58, 82, 92, 93, 97], da entsprechend der chemischen Struktur von PDMS (sich wiederholende $-\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{O}$ -Einheiten) kaum Oberflächenladungen zu erwarten sind. Es wird vermutet, dass der EOF durch die Adsorption geladener Gruppen aus der Lösung [97] oder durch chemische Veränderungen der Oberfläche [93] verursacht wird.

Im Vergleich mit unbehandelten Mikrofluidik-Kanälen weisen UV-Ozon sowie Sauerstoffplasma behandelte Kanäle aus PDMS/Glas und PDMS/PDMS höhere elektroosmotische Mobilitäten auf (Tab. 4.1). Hervorgerufen wird der stärkere kathodische EOF durch die im Oxidationsprozess entstandenen Silanolgruppen an der Oberfläche, die bei Kontakt mit dem Phosphatpuffer deprotonieren und zu einer negativen Oberflä-

chenladung führen (siehe Kap. 2.3.4). Die Bildung der Si(OH)-Gruppen während des Oxidationsprozesses ist auf PDMS Oberflächen durch infrarot- [93] und röntgenphotoelektronenspektroskopische (XPS) [89] Messungen bestätigt worden.

Vergleicht man die beiden Oxidationsprozesse, so ergeben sich in beiden Fällen, PDMS/Glas und PDMS/PDMS Kanäle, geringere Mobilitäten für die UV-Ozon behandelten Systeme. Dieses wurde von Wang et al. [54] ebenso beobachtet. Im Gegensatz zu Sauerstoffplasma oxidierten PDMS Oberflächen bleiben auf UV-Ozon behandelten Oberflächen auch noch bei längeren Behandlungsdauern (>6 h) Methylgruppen (CH₃-Gruppen) bestehen [85]. Hillborg et al. [86] konnten zeigen, dass der prozentuale Sauerstoffanteil an der Oberfläche erst nach 30 minütiger Oxidation im UV-Ozon Reiniger signifikant ansteigt. Demnach reichen Behandlungsdauern von 3 min für eine entsprechende Entstehung von Silanolgruppen an der Oberfläche durch die Oxidation mit UV-Ozon nicht aus. Bereits die Kontaktwinkelmessungen zeigten, dass erst bei längeren Behandlungszeiten polare Gruppen auf der Oberfläche entstanden. Diese führen jedoch zu Rissen und einer spröden Oberfläche, die für die Herstellung von mikrofluidischen Kanalsystemen nicht geeignet ist.

Für Sauerstoffplasma oxidierte Kanäle werden Mobilitäten von $(3.1 \pm 0.5) \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ für PDMS/Glas und $(3.4 \pm 0.3) \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ für PDMS/PDMS erhalten, die gut mit den entsprechenden Werten von $(3.6 \pm 0.2) \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ und $(3.8 \pm 0.5) \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ aus der Gruppe um N. Allbritton übereinstimmen [93]. Die minimalen Abweichungen ergeben sich aus den unterschiedlichen Puffer- und Plasmabedingungen und einem höheren PDMS zu Glas Verhältnis von 3 gegenüber 1.5 [93]. Betrachtet man die Standardabweichungen der Mobilitäten, so liegen die Abweichungen in diesen Fällen unterhalb der von Ren et al. [93] angegebenen 30%. Innerhalb eines Kanalsystems ermittelte Daten weichen sogar weniger als 10% voneinander ab.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass sowohl PDMS/Glas als auch PDMS/PDMS Mikrofluidik-Kanäle elektroosmotischen Fluss aufweisen, wobei die höchsten Mobilitäten für Sauerstoffplasma behandelte Kanäle erzielt werden.

4.1.2 Kovalente Bindung von Polyoxyethylenglykolen (POE)

Anhand von Kontaktwinkel- und Topographiemessungen ist die kovalente Bindung von POE auf oxidierten PDMS Oberflächen untersucht worden. Die kovalente Bindung entsteht durch die Reaktion des Silans mit der Silanolgruppe der PDMS Oberfläche unter Abspaltung von Methanol [98–101]. In Tabelle 4.2 sind die Kontaktwinkel nach der Funktionalisierung mit den POE-Silanen auf unbehandeltem, UV-Ozon und Sauerstoff-

plasma behandeltem PDMS zu sehen.

	Zahl der POE Einheiten	un- behandelt	UV-Ozon	Sauerstoff- plasma
Si-POE ₍₈₎ ^a	6-9	116°	113°	23°
Si-POE ₍₇₀₎ -Si ^b	70	111°	108°	47°
Si-POE ₍₁₀₉₎ ^a	109	113°	112°	46°
F108	132 ^c	112°	112°	53°
L101	9 ^c	114°	111°	31°

Tabelle 4.2: Fortschreitekontaktwinkel von PDMS Oberflächen nach der POE Beschichtung mit unterschiedlichen Vorbehandlungen
^aMonofunktionales, terminales Silan; ^bBifunktionales, terminales Silan;
^cZwei Ketten pro Molekül

Für UV-Ozon oxidiertes PDMS ergeben sich nach der Beschichtung nur minimale Abnahmen des Kontaktwinkels im Vergleich zu unbeschichteten Oberflächen, so dass Bindungen der POE-Silane an die Oberfläche nur in geringen Maßen stattgefunden haben können. Die Ursache liegt in der geringen Anzahl an Silanolgruppen auf der Oberfläche nach der 3 min Behandlung im UV-Ozon Reiniger. Die nahezu unveränderten Kontaktwinkel nach der Beschichtung für unoxidiertes PDMS bestätigen, dass für die Silanisierung mit den POE-Silanen Silanolgruppen auf der Oberfläche vorhanden sein müssen. Im Gegensatz dazu sollte auf Sauerstoffplasma behandelten Oberflächen mit einer Vielzahl an Silanolgruppen eine kovalente Bindung der POE möglich sein. Der Vergleich zeigt, dass nach der Silanbeschichtung der Sauerstoffplasma behandelten Oberflächen signifikante Unterschiede im Kontaktwinkel auftreten. Der Fortschreitewinkel steigt von $< 20^\circ$ auf $\sim 50^\circ$ für die Beschichtungen mit den Silanen Si-POE₍₇₀₎-Si und Si-POE₍₁₀₉₎ (siehe Tab. 4.2), was in guter Übereinstimmung mit den von Papra et al. [100] ermittelten Werten von $\sim 55^\circ$ steht. Bei dem Si-POE₍₈₎-Silan fällt die Abweichung des Kontaktwinkels zum unbehandelten Sauerstoffplasma oxidierten PDMS aufgrund der kurzen Kettenlänge geringer aus. In diesem Fall bleibt die Oberfläche stark hydrophil. Die Resultate zeigen, dass für die Sauerstoffplasma behandelten PDMS Oberflächen eine Silanisierung mit den POE-Silanen möglich ist. Im Folgenden werden daher im Bezug auf POE-Silanen nur Plasma behandelte PDMS Oberflächen betrachtet.

Für die Untersuchungen der Oberflächentopographie nach der Silanbeschichtungen ist die Rasterkraftmikroskopie (AFM) eingesetzt worden. In Abbildung 4.3 sind die AFM-

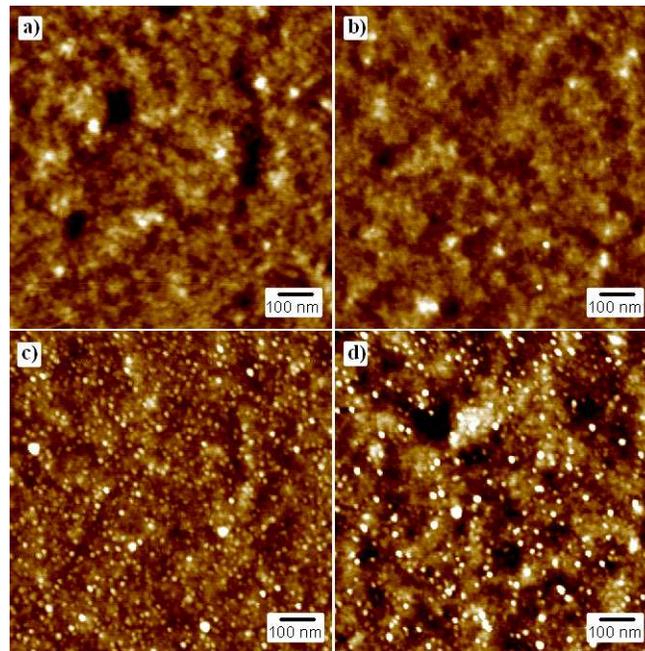


Abbildung 4.3: AFM Bilder silanisierter PDMS Oberflächen

(a) Sauerstoffplasma behandelte PDMS Oberflächen mit (b) Si- $\text{POE}_{(8)}$, (c) Si- $\text{POE}_{(70)}$ -Si, (d) Si- $\text{POE}_{(109)}$. Die Rauigkeitswerte liegen bei (a) 0.55 nm, (b) 0.45 nm, (c) 0.67 nm und (d) 0.98 nm. Die z-Skala geht von 0 bis 5 nm.

Bilder der silanierten PDMS Oberflächen zu sehen. Im Fall des kurzen POE-Silans Si- $\text{POE}_{(8)}$ ist eine Veränderung der Oberflächentopographie nur anhand der Rauigkeit¹ der Oberfläche, ausgedrückt durch den RMS-Wert, nachzuweisen. Von einem RMS-Wert von 0.55 nm für Sauerstoffplasma behandeltes PDMS nimmt die Rauigkeit auf einen Wert von 0.45 nm für PDMS mit Si- $\text{POE}_{(8)}$ ab. Die glattere Oberfläche ergibt sich durch das Füllen der topographischen Unebenheiten mit dem kurzen POE-Silan. Von Diaz-Quijada et al. [102] ist ebenso eine Rauigkeitsabnahme für oxidiertes PDMS nach der Silanbeschichtung beobachtet worden. Für die längeren Silane zeigt sich eine deutliche Veränderung der Topographie (siehe Abb. 4.3(c) und (d)), was mit einer Erhöhung des RMS-Wertes einhergeht. Im Vergleich zu oxidiertem PDMS mit 0.55 nm werden für Si- $\text{POE}_{(70)}$ -Si RMS-Werte von 0.67 nm und für Si- $\text{POE}_{(109)}$ von 0.98 nm erhalten.

¹Der RMS-Wert (root-mean-square) gibt die Standardabweichung des Höhenprofils an.

4.1.3 Adsorption von Triblock-Copolymeren auf PDMS Oberflächen

Für die Untersuchung der Adsorption von POE auf PDMS Oberflächen sind die Triblock-Copolymere F108 und L101 verwendet worden. Das Triblock-Copolymer F108 besteht in der Mitte aus 52 Polyoxypropylen (POP) Einheiten, an die sich zwei POE Ketten mit 132 Einheiten anschließen. Im Vergleich zum L101 reduziert sich die Anzahl der Einheiten für die POE Ketten von 132 auf 9 Einheiten, während der hydrophobe POP-Teil mit 52 Einheiten identisch bleibt.

In Tab. 4.2 sind die Kontaktwinkel der mit F108 und L101 funktionalisierten PDMS Oberflächen gezeigt. Im Fall von Sauerstoffplasma oxidierten Oberflächen führt die Adsorption von F108 mit 53° zu ähnlichen Kontaktwinkeln wie bei den längeren Silanen. Ein Vergleich der POE Einheiten von Si-POE₍₇₀₎-Si mit 70, Si-POE₍₁₀₉₎ mit 109 und F108 mit 132 Einheiten zeigt, dass die POE-Seitenketten ungefähr im selben Längenbereich liegen. Das Triblock-Copolymer L101 weist entsprechend seiner kürzeren POE-Länge einen niedrigeren Kontaktwinkel und damit eine hydrophilere Oberfläche auf.

Zwischen unbehandelten und UV-Ozon oxidierten Oberflächen ist nach der Adsorption kaum ein Unterschied im Kontaktwinkel zu sehen (Tab. 4.2). Im Vergleich mit den Werten für unbeschichtete Proben ergeben sich Abnahmen von maximal 6° , was auf eine Adsorption der Triblock-Copolymere hinweist. Im Gegensatz zu den Sauerstoffplasma oxidierten Proben erzielt die Beschichtung auf unbehandelten hydrophoben Oberflächen eine Verringerung des Kontaktwinkels, was auf ein anderes Verhalten in der Adsorption von Triblock-Copolymeren auf verschiedentlich vorbehandelten Oberflächen schließen lässt.

Anhand von AFM-Aufnahmen ist der unterschiedliche Adsorptionsmechanismus auf hydrophoben und hydrophilen PDMS Oberflächen untersucht worden. Dafür ist während des Sauerstoffplasmaprozesses ein Gitter auf die PDMS Oberfläche gelegt worden, um gleichzeitig auf einer Probe hydrophobe und hydrophile Bereiche erzeugen zu können. Abbildung 4.4(a) zeigt eine Topographiaufnahme der PDMS Oberfläche nach der Sauerstoffplasmabehandlung. Deutlich ist das Muster des Gitters und damit ein Unterschied zwischen den beiden Bereichen zu erkennen. Bei den Stegen handelt es sich um die hydrophoben Bereiche, die während der Plasmabehandlung abgedeckt wurden. Die quadratischen Flächen hingegen sind oxidiert worden und damit hydrophil. Unterhalb der AFM-Aufnahme ist ein Querschnittsprofil durch beide Bereiche zu sehen. Es zeigt sich, dass die dem Sauerstoffplasma ausgesetzten Flächen gegenüber den unbehandelten um (10 ± 2) nm vorstehen. Dieser Höhenunterschied ergibt sich aus der Entstehung

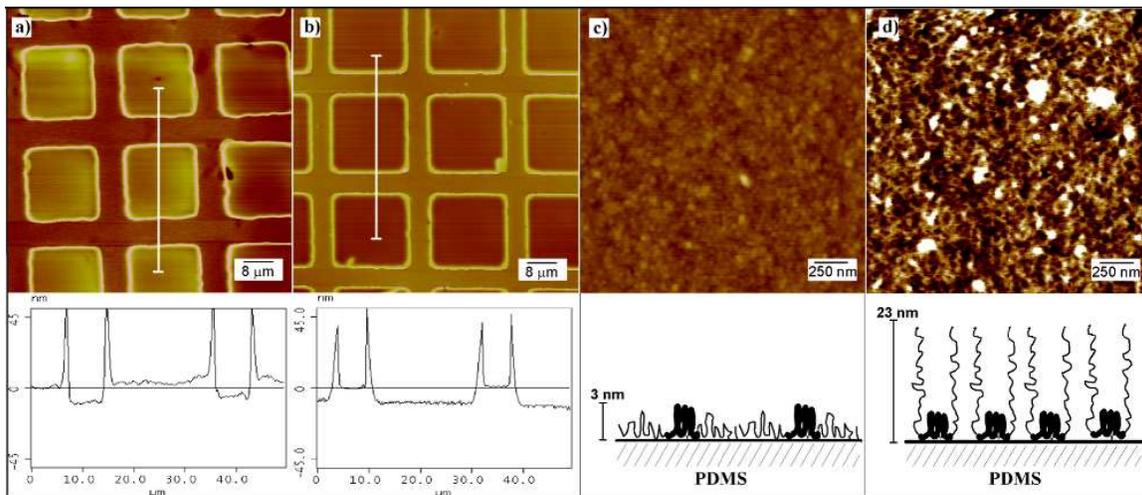


Abbildung 4.4: AFM Bilder der mit F108 beschichteten PDMS Oberfläche
 AFM Bilder in Phosphatpuffer von (a) einer teilweise oxidierten PDMS Oberfläche. Während des Oxidationsprozesses ist die Oberfläche mit einem Gitter bedeckt worden. Die Stege stellen die unbehandelten Regionen dar, während die quadratischen Flächen oxidiert worden sind. In (b) ist eine AFM Aufnahme der Oberfläche nach der anschließenden Adsorption von F108 zu sehen. Die weißen Balken geben die Position der Querschnittsprofile an, welche unterhalb der Bilder gezeigt sind. Die z-Skala für die beiden Bilder ist 100 nm. In (c) ist ein Zoom in die oxidierte hydrophile Region der Probe nach der Adsorption gezeigt, während in (d) ein Zoom in den unbehandelten hydrophoben Steg-Bereich nach der Beschichtung zu sehen ist. Die schematischen Bilder zeigen die molekulare Konformation von F108 auf hydrophiler und hydrophober Oberfläche. Die z-Skala geht von 0 bis 5 nm.

einer SiO_x -Schicht während des Plasmaprozesses. Owen et al. [89] ermittelten in guter Übereinstimmung mit den hier erhaltenen Werten eine Schichtdicke von 10 nm für die SiO_x -Schicht.

Nach der Adsorption von F108 invertiert der Höhenunterschied zwischen den unbehandelten und oxidierten PDMS Bereichen (siehe Abb. 4.4(b)). Die zuvor hydrophobe Oberfläche liegt nun mit F108-Beschichtung um (10 ± 1) nm höher als die hydrophile (Plasma-behandelte) Oberfläche mit adsorbiertem F108. Die detaillierteren AFM-Aufnahmen beider Bereiche (Abb. 4.4(c)+(d)) zeigen deutlich Unterschiede in der Topographie. Ein Vergleich der RMS-Werte ergibt für den hydrophoben Bereich mit F108 einen Wert von $\text{RMS} = 2.50$ nm und für den hydrophilen Bereich 0.39 nm. Demzufolge resultiert die Ad-

sorption von F108 auf hydrophilen Oberflächen in einer glatteren Oberfläche. Diese Ergebnisse bestätigen die von Barnes et al. [103] kürzlich veröffentlichten Adsorptionsmechanismen auf hydrophoben und hydrophilen SiO_x -Oberflächen. Im Fall von hydrophoben Oberflächen führen hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem POP-Teil des F108 und der hydrophoben Oberfläche zu einer Adsorption, während die hydrophilen POE-Seitenketten dabei in die Lösung ragen. Auf hydrophilen Oberflächen adsorbiert F108 im Gegensatz zu hydrophoben Oberflächen in einer flachen Konformation mit einer Schichtdicke von 3 nm [103, 104]. Dieses resultiert aus der Wechselwirkung der POE-Ketten mit der oxidierten Oberfläche, die auf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Sauerstoffatomen der POE mit denen der oxidierten PDMS Oberfläche beruht. Die unterschiedliche Konformation des F108 auf der unbehandelten (hydrophoben) und oxidierten (hydrophilen) PDMS Oberfläche spiegelt sich in der beobachteten Inversion des Oberflächenprofils wider. In Abb. 4.4 und 4.5 sind beide Adsorptionsmechanismen schematisch gezeigt.

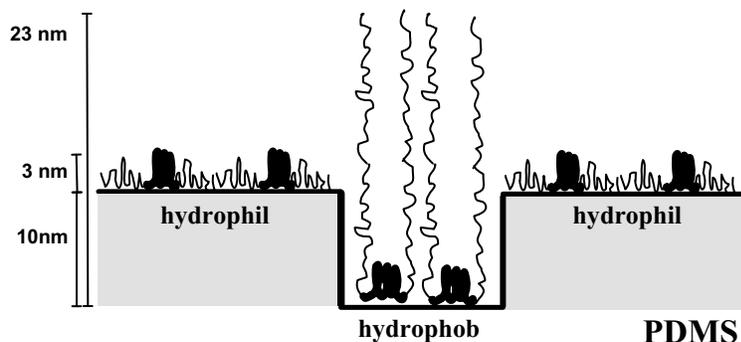


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung der Adsorption von F108 auf hydrophoben und hydrophilen Oberflächen

Die Länge der in die Lösung ragenden POE-Seitenketten auf der hydrophoben PDMS Oberfläche lässt sich aus den Querschnittsprofilen vor und nach der Adsorption bestimmen. Berücksichtigt man den Höhenunterschied von 10 nm zwischen der unbehandelten und oxidierten Schicht, die Schichtdicke des absorbierenden F108 in der flachen Konformation mit 3 nm [103, 104] sowie die Differenz von 10 nm nach der Adsorption, so errechnet sich eine POE-Kettenlänge von 23 nm für F108 auf hydrophoben Oberflächen (Abb. 4.5). Dieses stimmt gut mit dem von Barnes et al. [103] ermittelten Wert für die POE-Kettenlänge von 20 nm überein. Der hier dargestellte Adsorptionsmechanismus von F108 ist in ähnlicher Weise auch auf hydrophilen SiO_2 -Oberflächen und auf hydrophoben mit Dimethylchlorsilan derivatisierten Oberflächen beobachtet worden [105].

4.1.4 Einfluss der POE Beschichtungen auf die Elektroosmose

Aufgrund der bedeutenden Rolle der elektroosmotischen Mobilität in der Mikrochip-Elektrophorese sind die Einflüsse der Beschichtung mit Silanen und Triblock-Copolymeren auf diese Größe analysiert worden. Tabelle 4.3 zeigt die absoluten und relativen Werte für die elektroosmotische Mobilität μ_{eof} in PDMS/Glaskanälen.

	μ_{eof} vor der Behandlung $\times 10^{-4} [cm^2/Vs]$	μ_{eof} nach der Behandlung $\times 10^{-4} [cm^2/Vs]$	% EOF Reduktion nach der Beschichtung
Si-POE ₍₈₎	2.5 ± 0.4	2.1 ± 0.7	26
Si-POE ₍₇₀₎ -Si	2.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1	75
Si-POE ₍₁₀₉₎	3.1 ± 0.02	1.6 ± 0.1	48
F108 (unbehandelt)	2.1 ± 0.1	0.3 ± 0.03	86
F108 (plasma)	3.0 ± 0.2	1.5 ± 0.3	50
L101 (unbehandelt)	1.9 ± 0.3	1.25 ± 0.1	33
L101 (plasma)	2.8 ± 0.1	1.9 ± 0.2	30

Tabelle 4.3: Elektroosmotische Mobilität μ_{eof} für PDMS/Glas Mikrofluidik-Kanäle nach unterschiedlicher Oberflächenbehandlung

Für das POE-Silan Si-POE₍₈₎ ergibt sich eine Verringerung von μ_{eof} um 26% nach der Silanisierung der oxidierten Oberflächen. Im Vergleich zu den anderen Beschichtungen stellt dieses die geringste Abnahme dar, was auf die Länge der POE-Seitenkette von nur 8 Einheiten zurückzuführen ist. Für die beiden längeren POE-Silane Si-POE₍₇₀₎-Si und Si-POE₍₁₀₉₎ ergeben sich Reduzierungen von 75% und 48%, wobei erstaunlicherweise das kürzere dieser beiden die höhere EOF Reduktion aufweist. Die Ursache dafür liegt vermutlich in einer stärkeren Bindung an die Oberfläche durch die zwei Silanenden des Si-POE₍₇₀₎-Si verbunden mit einer verbesserten Vernetzung.

Die höchste Verringerung der elektroosmotischen Mobilität weisen Mikrofluidik-Kanäle auf, deren hydrophoben Oberflächen mit F108 beschichtet worden sind. Nach der Adsorption werden Werte von $0.3 \cdot 10^{-4} cm^2/Vs$ erzielt, was einer Reduktion von 86% entspricht. Vergleichbare μ_{eof} Werte sind von Hu et al. [106] für silanisierte PDMS Mikrofluidik-Kanäle erreicht worden. Die hohe Abnahme von μ_{eof} in den mit F108 beschichteten PDMS/Glas Mikrofluidik-Kanälen wird vermutlich dadurch verursacht, dass die POE-Seitenketten des F108 mit einer Länge von 23 nm (siehe Kap. 4.1.3) durch die typi-

scherweise ~ 10 nm dicke Doppelschicht in die Lösung hinausragen und so die Viskosität beeinflussen. Des Weiteren haben hydrophobe gegenüber hydrophilen Oberflächen eine niedrigere Nettoladung bzw. niedrigeres ζ -Potenzial, was zu einer geringeren elektroosmotischen Mobilität führt (siehe Gleichung 2.22). Für hydrophile Mikrofluidik-Kanäle ergibt sich nach der Adsorption eine Reduktion von μ_{eof} um 50% auf $1.5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ (Tab. 4.3). Die geringere Abnahme im Vergleich zu den 86% für die hydrophoben Kanäle nach der Beschichtung rühren von der flachen Konformation des F108 auf den oxidierten Oberflächen her. Das POE-Silan Si-POE₍₁₀₉₎ mit vergleichbarer Kettenlänge weist ähnliche Mobilitäten nach der Silanisierung der oxidierten Oberflächen auf.

Im Fall von L101 ist für μ_{eof} der gleiche Trend wie beim F108 zu erkennen. Nach der Adsorption weisen die zuvor unbehandelten Kanäle eine höhere Reduzierung des EOFs im Vergleich zu den oxidierten Kanälen auf. Für die hydrophoben Kanäle ergibt sich nach der Beschichtung eine Abnahme der Mobilität um 33%, während μ_{eof} für die hydrophilen Kanäle um 30% sinkt. Die minimale Differenz in der Reduktion zwischen den hydrophoben (33%) und hydrophilen Kanälen (30%) wird dadurch verursacht, dass sich der Unterschied im Adsorptionsverhalten zwischen den unbehandelten und behandelten Oberflächen aufgrund der kürzeren POE-Seitenkette (9 Einheiten) nicht so signifikant wie beim F108 (132 Einheiten) auswirkt. Des Weiteren beruht die geringere Mobilitätsabnahme im Vergleich zum F108 auf der kürzeren Kettenlänge des L101.

Für die Verwendung der Beschichtungen in elektrophoretischen Anwendungen ist die Langzeitstabilität von Si-POE₍₇₀₎-Si, F108 und L101 anhand der elektroosmotischen Mobilitäten über eine Zeitspanne von bis zu elf Tagen untersucht worden.

Das POE-Silan Si-POE₍₇₀₎-Si ist aufgrund seiner guten Bindung und Vernetzung mit der Oberfläche ausgewählt worden. Abb. 4.6 zeigt die Mobilitäten für oxidierte PDMS/Glas Mikrofluidik-Systeme nach der Silanisierung mit Si-POE₍₇₀₎-Si. Zum direkten Vergleich ist die μ_{eof} Referenzmessung in den oxidierten Kanälen ebenfalls dargestellt. Nach der signifikanten Abnahme von 75% direkt nach der Silanisierung steigt die Mobilität innerhalb der ersten zwei Tage nur geringfügig an. Erst eine Woche danach tritt eine markante Veränderung von μ_{eof} auf, von $0.72 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ direkt nach der Beschichtung steigt der Wert auf $1.53 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$. Bei anschließenden Messungen bleibt die Mobilität weitestgehend konstant. Der signifikante Anstieg des EOFs nach einer Woche deutet auf ein Ablösen schwach gebundener POE-Silanmoleküle hin.

Im Fall von F108 (siehe Abb. 4.7(a)) sind die elektroosmotischen Mobilitäten nach der Adsorption in unbehandelten (hydrophoben) und Sauerstoffplasma oxidierten (hydrophilen) Mikrofluidik-Kanälen untersucht worden. Für unbehandelte Kanäle ist nach

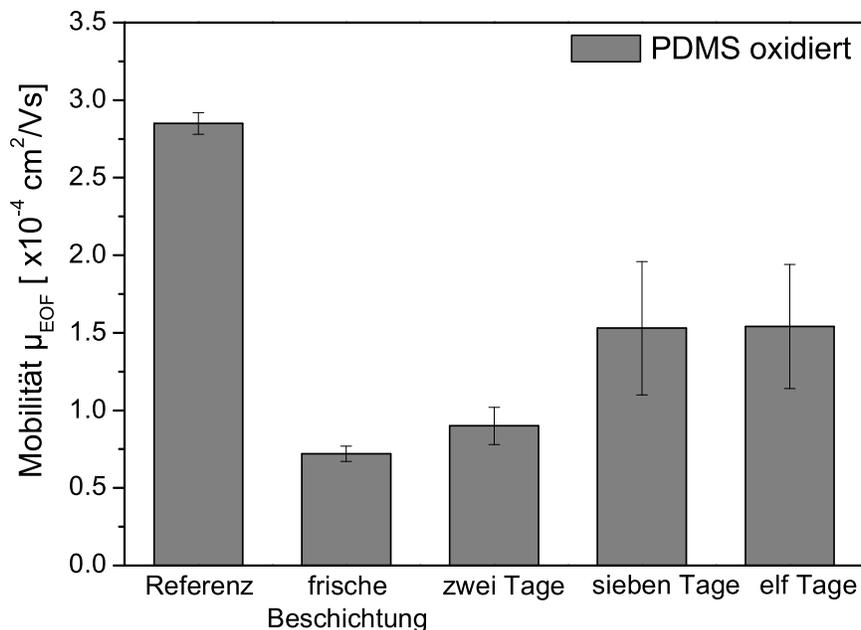


Abbildung 4.6: Langzeitstabilität der Si-POE₍₇₀₎-Si Beschichtung in oxidierten Mikrofluidik-Kanälen anhand von elektroosmotischen Flussmessungen

der signifikanten Verringerung um 86% direkt nach der Beschichtung ein Anstieg der μ_{eof} -Werte über den betrachteten Zeitraum zu verzeichnen, was auf eine instabilere Beschichtung hinweist. In oxidierten Kanälen hingegen bleibt die Mobilität trotz intensiver Spülvorgänge während des Messprozesses innerhalb der Woche unverändert, wie der Vergleich zwischen den Werten direkt nach der Beschichtung von $(1.5 \pm 0.3) \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ und sieben Tagen danach von $(1.6 \pm 0.1) \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ zeigt. Die Adsorption von F108 auf oxidierten (hydrophilen) Oberflächen erweist sich demnach als eine stabile Beschichtung.

Abbildung 4.7(b) zeigt, dass für L101 beschichtete Kanäle ein ähnliches Verhalten wie bei F108 zu beobachten ist. Im Fall der unbehandelten Kanäle steigt die Mobilität innerhalb des Zeitraumes an, während sie für oxidierte Kanäle nahezu unverändert bleibt. Insgesamt zeigt der Vergleich der Mobilitäten über die Zeitspanne von sieben Tagen, dass in oxidierten (hydrophilen) PDMS/Glas Mikrofluidik-Kanälen eine stabile Beschichtung mit F108 und L101 erzielt wird.

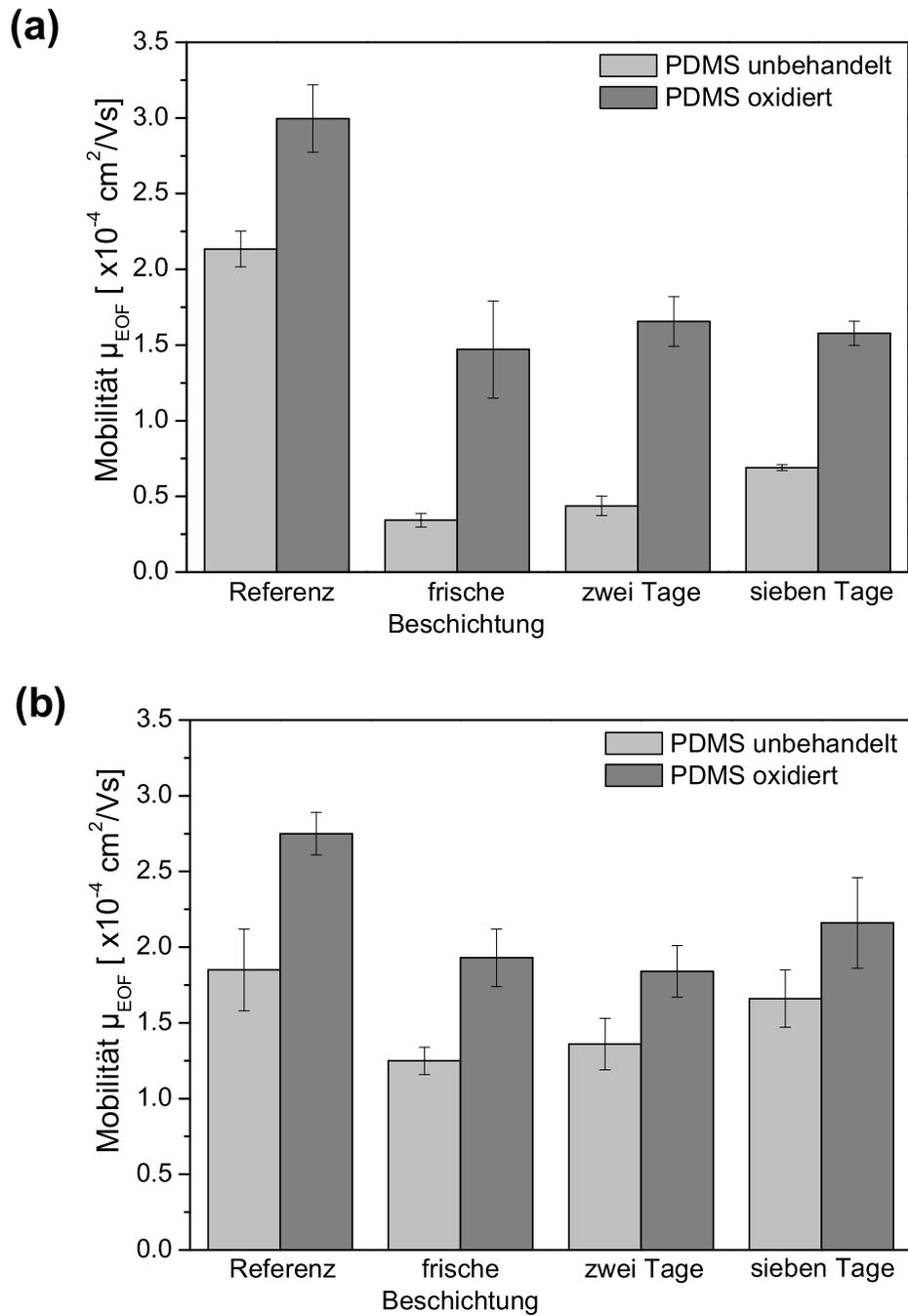


Abbildung 4.7: Langzeitstabilität der (a) F108-Beschichtung und (b) L101-Beschichtung in unbehandelten und oxidierten Mikrofluidik-Kanälen anhand von elektroosmotischen Flussmessungen

4.1.5 Auswirkungen von F108 auf die Proteinadsorption

Anhand von qualitativen Fluoreszenzmessungen ist die Verminderung der unspezifischen Proteinadsorption durch die Verwendung des Triblock-Copolymers F108 untersucht worden. Als Modell Protein ist das mit dem Farbstoff FITC markierte Rinderserumalbumin (BSA) ausgewählt worden. Für einen direkten Vergleich zwischen unbehandelten und Sauerstoffplasma oxidierten Oberflächen ist die Probe während des Oxidationsprozesses zur Hälfte abgedeckt worden, so dass sich sowohl eine unbehandelte hydrophobe Fläche als auch ein hydrophiler oxidierter Bereich ergibt. Abbildung 4.8(a) zeigt das Fluoreszenzbild dieser Probe nach der Inkubation in der Proteinlösung.

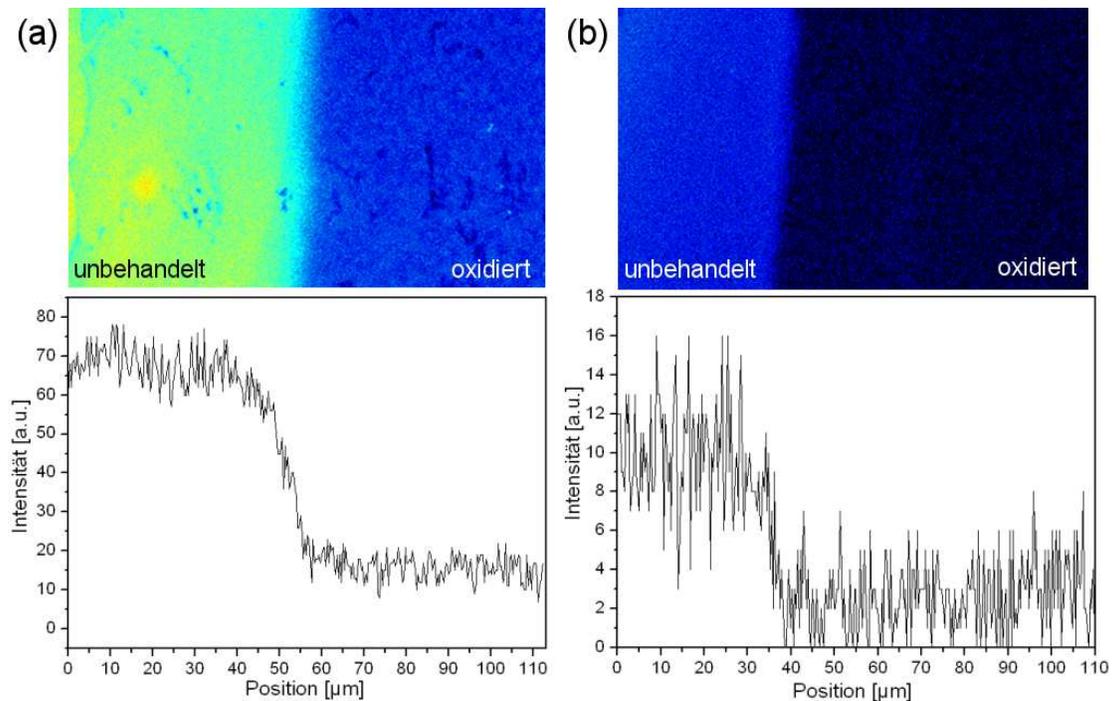


Abbildung 4.8: Fluoreszenzaufnahme der Proteinadsorption auf einer (a) unbeschichteten und (b) mit F108 beschichteten PDMS Oberfläche, wobei jeweils die linke Seite der Oberfläche unbehandelt (hydrophob) und die rechte Sauerstoffplasma oxidiert (hydrophil) ist.

In beiden Fällen zeigt die horizontale Querschnittsanalyse, dass BSA auf der hydrophoben Oberfläche stärker als auf der hydrophilen adsorbiert. Insgesamt ist die Adsorption auf der mit F108 beschichteten hydrophilen Oberfläche am geringsten.

Für die unbehandelte hydrophobe PDMS Oberfläche (Abb. 4.8(a): linke Probenseite) ergibt sich, wie aus der horizontalen Querschnittsanalyse zu erkennen ist, gegenüber der hydrophilen rechten Seite eine um den Faktor 4.7 höhere Fluoreszenzintensität. Demnach hat eine starke Adsorption des BSA-FITC an die hydrophobe Oberfläche stattgefunden. Daraus folgt, dass die Oxidation der Oberfläche bereits zu einer Reduktion der Fluoreszenz bzw. Proteinadsorption um $\sim 79\%$ geführt hat. Nachfolgend wird der Einfluss der F108-Beschichtung auf die Adsorption der Proteine an die hydrophobe bzw. hydrophile PDMS Oberfläche untersucht. Dafür wird die Probe wie zuvor halbseitig oxidiert und anschließend mit F108 beschichtet, bevor die Probe in der Proteinlösung inkubiert wird. In Abbildung 4.8(b) ist die Fluoreszenzaufnahme dieser Probe zu sehen. Insgesamt ist eine Abnahme der Fluoreszenzintensität um $\sim 85\%$ und damit der Proteinadsorption durch die F108-Beschichtung für die hydrophobe sowie für die hydrophile Seite zu erkennen. Ein Vergleich zwischen dem hydrophoben (unbehandelt) und hydrophilen (oxidierten) Bereich nach der F108-Beschichtung zeigt, dass wie zuvor die hydrophobe Oberfläche eine höhere Adsorption der Proteine aufweist. Es stellt sich also heraus, dass die flache F108 Konformation auf der oxidierten hydrophilen Oberfläche eine bessere Vermeidung der unspezifischen Proteinadsorption liefert.

Fazit

Im Rahmen der Oberflächenfunktionalisierung wurden die Oxidation und die POE Beschichtung von PDMS Oberflächen mit verschiedenen Methoden wie der Goniometrie, der Rasterkraftmikroskopie und der elektroosmotischen Flussmessung untersucht. Im Vergleich des Oxidationsprozesses im UV-Ozon Reiniger gegenüber dem in der eigens aufgebauten Sauerstoffplasmaanlage stellt sich heraus, dass die Sauerstoffplasma behandelten Oberflächen für die Herstellung mikrofluidischer Systeme besser geeignet sind. Bereits nach einer kurzen Behandlungsdauer von nur 30 s ergeben sich äußerst hydrophile Oberflächen ohne Risse in der obersten Schicht. Zusätzlich werden in Sauerstoffplasma oxidierten Kanälen die höchsten elektroosmotischen Mobilitäten erreicht.

Ferner wurden POE-Silane und Triblock-Copolymere zur Beschichtung von PDMS Oberflächen verwendet. Der Vergleich zeigt, dass die Adsorption von F108 auf Sauerstoffplasma oxidierten Oberflächen die beste Langzeitstabilität sowie die höchste Reduktion der Proteinadsorption aufweist. Für die Beschichtung mit F108 wurde abhängig von der Vorbehandlung der Oberfläche ein unterschiedlicher Adsorptionsmechanismus beobachtet. Auf hydrophoben (unbehandelten) PDMS Oberflächen wechselwirkt die hydrophobe POP-Einheit des F108 mit der hydrophoben Oberfläche, während auf der hydrophilen

(Sauerstoffplasma oxidierten) Oberfläche die Adsorption über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Seitenketten des F108 und den Silanolgruppen der Oberfläche erfolgt. Für die POE-Silane ergibt sich eine bessere Bindung an Sauerstoffplasma oxidierte Oberflächen im Vergleich zu UV-Ozon behandelten, da während des Oxidationsprozesses auf den Oberflächen eine größere Anzahl an Silanolgruppen gebildet wird.

4.2 Native Fluoreszenzdetektion

Für den Nachweis von Proteinen im nM-Bereich in PDMS/Quarz Mikrofluidik-Systemen sind sensitive Methoden erforderlich, da mit der Miniaturisierung bei gleichbleibender Konzentration die Anzahl der zu detektierenden Moleküle abnimmt. Die Laser-Induzierte Fluoreszenzdetektion stellt eine empfindliche Methode mit Nachweisgrenzen bis in den *fM*-Bereich dar [H3,18–21]. Bei dieser Methode werden die Proteine mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, was üblicherweise durch chemische Reaktionen mit den Aminogruppen oder anderen reaktiven Gruppen erfolgt [22]. Existieren mehrere Reaktionsgruppen an einem Protein, so können Protein-Konstrukte mit einer unterschiedlichen Anzahl an gebundenen Farbstoffen entstehen. In Folge der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten resultiert eine Signalverbreiterung, die sich nachteilig auf die Trenneffizienz auswirkt [15, 22]. Diese Problematik kann durch die Verwendung der nativen Fluoreszenz als Nachweismethode für die Proteine vermieden werden. Diese Methode beruht auf der Detektion der im UV-Bereich anregbaren Aminosäuren Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr) und Tryptophan (Trp). Für den Nachweis von Proteinen einer lysierten Zelle erweist sich die markierungsfreie Detektion ebenfalls als vorteilhaft, da der zeitaufwändige und Stress verursachende Präparationsschritt entfällt. Die erforderliche Detektionssensitivität ergibt sich aus einer Abschätzung der Proteinkonzentrationen für eine Zelle. Unter Annahme einer $10\ \mu\text{m}$ großen Zelle (vergleichbar mit Sf9-Insektenzellen) in einem $10^3\ \mu\text{m}^3$ Würfel errechnet sich eine Detektionssensitivität von 100 nM für ein selten vorkommendes Protein mit ca. 10^5 Kopien (Kap. 2.1).

Im Folgenden wird die Detektionssensitivität des hier verwendeten experimentellen Fluoreszenzaufbaus näher betrachtet.

4.2.1 Detektionssensitivität

Die Anregung im UV-Bereich erfordert zunächst eine Betrachtung der Fluoreszenzspektren der hier verwendeten Mikrofluidik-Chip Materialien (PDMS und Quarz) im Vergleich zur Trp Fluoreszenz. In Abb. 4.9 sind die Spektren für PDMS (schwarz), Quarz (blau) und Trp (rot) im Bereich von 270-500 nm bei einer Anregung mit 266 nm zu sehen. Im Spektralbereich um 300 nm weist PDMS eine hohe Hintergrundfluoreszenz auf, was mit dem Emissionsmaximum von Tyrosin (Tyr) (siehe Kap. 2.5, Tabelle 2.1) überlappt. Die auftretenden Schwankungen im Signal, speziell in diesem Bereich, werden durch

den verwendeten Dichroit hervorgerufen, wie der Vergleich mit dem Transmissionspektrum des Spiegels zeigt. Das Emissionsspektrum des Trp liegt gegenüber dem des Tyr in einem Wellenlängenbereich, in dem das PDMS eine deutlich geringere Fluoreszenz aufweist. Für eine optimale Detektionssensitivität ist daher ein Emissionsfilter bei 360 nm mit einer Halbwertsbreite von ± 25 nm als Detektionsfenster ausgewählt worden (Abb. 4.9). Das synthetische Quarz zeigt über den kompletten Spektralbereich keine Fluoreszenz.

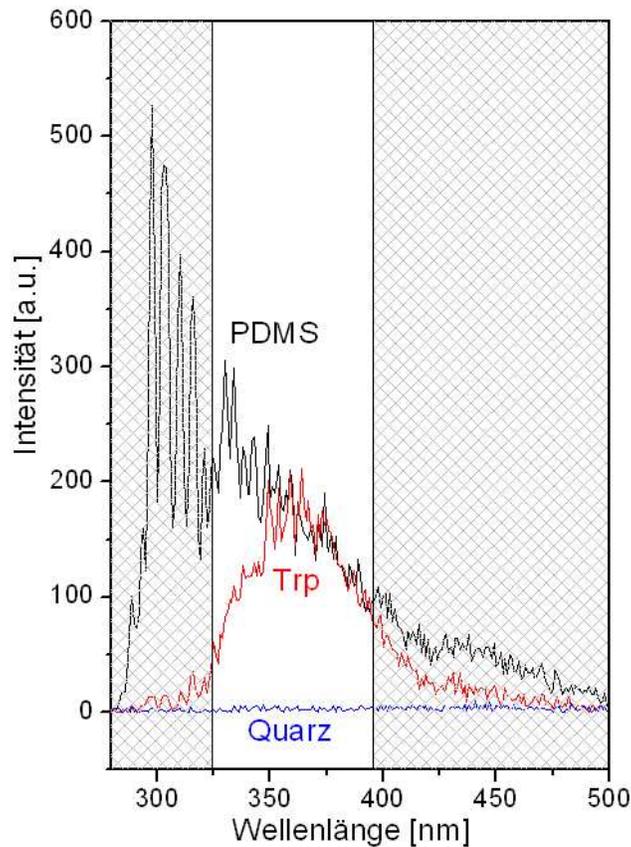


Abbildung 4.9: Fluoreszenzspektrum von PDMS (schwarz), einer $10 \mu\text{M}$ Trp Lösung (rot) und Quarz (blau)

Ferner wird der Einfluss verschiedener Lochblendengrößen auf die Detektionssensitivität des konfokalen Fluoreszenzaufbaus untersucht. Die Lochblende befindet sich direkt vor dem Detektor, wo sie als räumlicher Filter zur Unterdrückung der von außerhalb des Fokus stammenden Fluoreszenz dient. Für die Untersuchung wird das Fluoreszenzsignal einer 250 nM Trp Lösung analysiert, die mit einer elektrischen Feldstärke von 750 V/cm in einen linearen PDMS/Quarz Mikrofluidik-Kanal injiziert wird. Die Abhängigkeit des

Signal-zu-Rausch Verhältnisses (S/N) vom Durchmesser der Lochblenden (100-1000 μm) ist in Abbildung 4.10 in rot dargestellt.

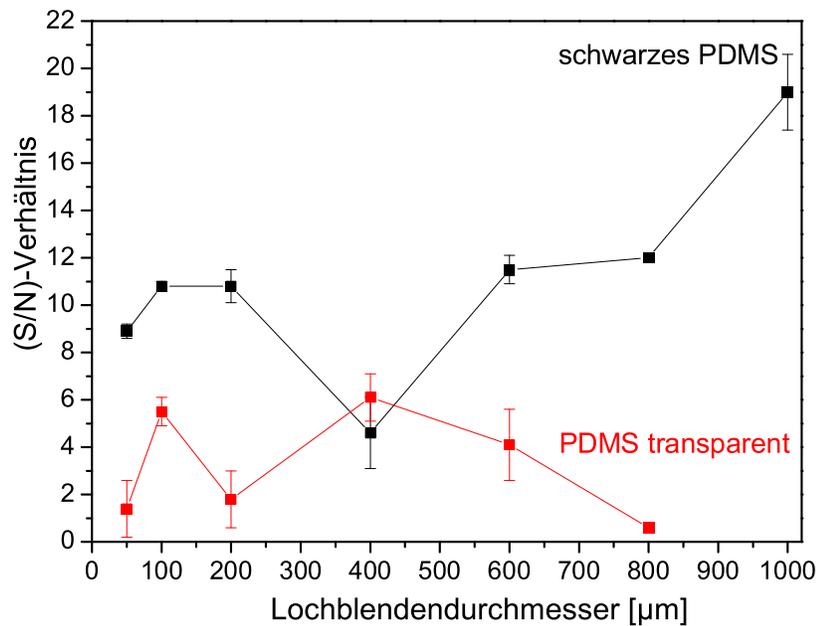


Abbildung 4.10: (S/N)-Verhältnis in Abhängigkeit des Durchmessers der Lochblenden für transparentes (rot) und schwarzes PDMS (schwarz)

Für einen Durchmesser von 400 μm ergibt sich das höchste (S/N)-Verhältnis, da der Durchmesser des Detektionsvolumens (objektseitige Lochblendengröße²) mit 12 μm gut mit der experimentell ermittelten Strahltaile des Lasers von $(12.7 \pm 1.0) \mu\text{m}$ im Fokus übereinstimmt. Unter der Annahme eines zylindrischen Volumens ergibt sich mit einer Kanaltiefe von 24 μm ein Anregungsvolumen von 3 pL. Für das Detektionsvolumen errechnet sich nach S. Wilhelm [107] eine Höhe (z-Tiefe) von 34 μm , die größer als die Kanaltiefe von 24 μm ist, so dass sich das effektive Detektionsvolumen aus dem objektseitigen Lochblendendurchmesser (12 μm) und der Kanaltiefe 24 μm zu 2.7 pL zusammensetzt. Letzteres stimmt gut mit dem Anregungsvolumen von 3 pL überein. Der Vergleich mit der 200 μm großen Lochblende zeigt zwar eine bessere Anpassung der Höhe an die Kanaltiefe (17 μm), doch reduziert sich das Volumen durch die objektseitige

²Die objektseitige Lochblendengröße ergibt sich als Quotient aus dem Lochblendendurchmesser und der Vergrößerung (x33).

Lochblendengröße von $6\ \mu\text{m}$ zu $0.7\ \text{pL}$. Für größere Lochblenden nimmt die Hintergrundfluoreszenz stark zu, so dass sich ein niedrigeres (S/N)-Verhältnis ergibt. Jiang et al. [108] erhielten ebenso das höchste Signal-zu-Rausch Verhältnis, wenn der objektseitige Lochblendendurchmesser mit dem Durchmesser der Strahltaile übereinstimmt.

Mit der optimalen Lochblendengröße von $400\ \mu\text{m}$ ist das Fluoreszenzsignal von Trp für verschiedene Konzentrationen aufgenommen worden. Abbildung 4.11 zeigt eine gute Linearität der Peakflächen über den Bereich von $100\ \text{nM}$ bis $10\ \mu\text{M}$ mit einem Regressionsfaktor von $r = 0.997$. Der Einsatz in Abb. 4.11 zeigt exemplarisch die Detektion einer $1\ \mu\text{M}$ Trp Lösung.

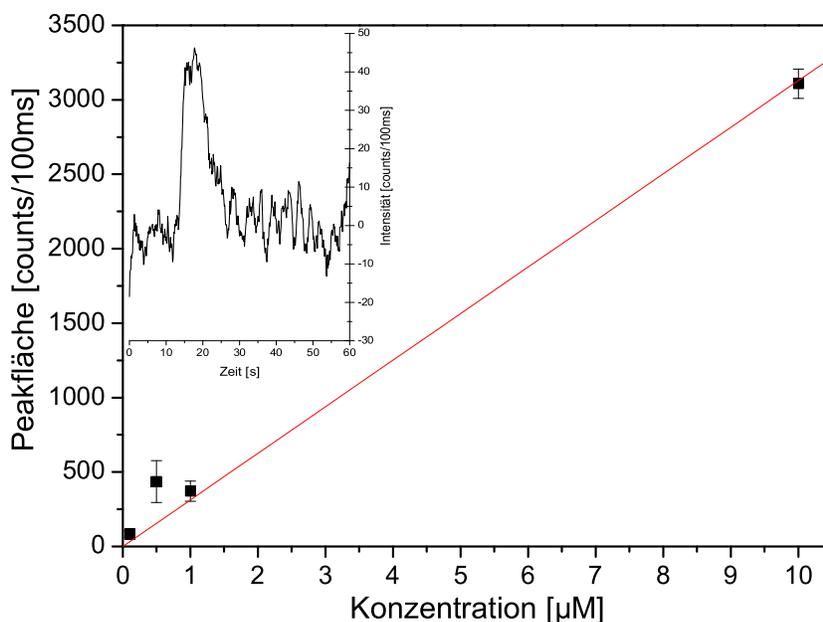


Abbildung 4.11: Peakfläche in Abhängigkeit der Trp Konzentration. Der Einsatz zeigt die Detektion einer $1\ \mu\text{M}$ Trp Lösung.

Die Injektion erfolgt mit $600\ \text{V/cm}$, wobei Spannungen von $540\ \text{V}$ für die Einengung auf den Kreuzungsbereich verwendet werden. Für die Auftrennung wird eine elektrische Feldstärke von $440\ \text{V/cm}$ genutzt. Die native Fluoreszenzdetektion findet im Abstand von $20\ \text{mm}$ von der Kreuzung statt.

Eine weitere Erhöhung der Detektionssensitivität kann durch die Verringerung der Hintergrundfluoreszenz des PDMS erreicht werden. Dafür werden dem unpolymersierten und transparenten PDMS schwarze Kohlenstoffpigmente (engl. pigment black) mit einem Mischverhältnis von 1:100 beigefügt. Abbildung 4.12 zeigt einen solchen schwarzen

PDMS/Quarz Mikrofluidik-Chip.



Abbildung 4.12: Ein mit schwarzen Kohlenstoffpigmenten versetzter Mikrofluidik-Chip mit Eosin gefüllten Reservoirs

Das (S/N)-Verhältnis für schwarzes PDMS (schwarz) ist in Abbildung 4.10 dargestellt. Im Gegensatz zum transparenten PDMS ergibt sich für schwarzes PDMS ein Anstieg des (S/N)-Verhältnisses mit zunehmender Lochblendengröße. Der Vergleich mit transparenten PDMS ($400\ \mu\text{m}$) zeigt eine 3fache Steigerung des (S/N)-Verhältnisses für die $1000\ \mu\text{m}$ Lochblende des schwarzen PDMS. Die Ursache dafür liegt in der geringeren Hintergrundfluoreszenz des schwarzen PDMS bei gleicher Anregung, wie die für den Bereich von 270 nm-520 nm spektral aufgelösten Fluoreszenzspektren des transparenten (rote Linie) und schwarzen PDMS (schwarze Linie) zeigen (siehe Abb. 4.13). Für das Emissionsmaximum von Trp bei 353 nm ergibt sich eine Reduktion der Hintergrundfluoreszenz um 71% durch die Verwendung der schwarzen Kohlenstoffpigmente. Johnson-White et al. [109] beobachteten ähnliche Abnahmen der Hintergrundfluoreszenz in ihren Untersuchungen. Des Weiteren zeigt sich eine schnellere Stabilisierung der Hintergrundfluoreszenz für das schwarze PDMS (siehe Einsatz in Abb. 4.13). Während für transparentes PDMS zunächst eine hohe Hintergrundfluoreszenz auftritt, die allmählich abklingt und sich nach ca. 25 Minuten stabilisiert, nimmt die Fluoreszenzintensität im Fall des schwarzen PDMS bereits innerhalb von 400 s rapide ab und erreicht einen stabilen Wert. Der Einsatz von schwarzen Kohlenstoffpigmenten sollte demnach zu einer Verbesserung in der Fluoreszenzdetektion führen.

Anhand der Injektion von 100 nM Trp Lösung ist die Detektionssensitivität mit den optimierten Lochblendengrößen für beide Chipsysteme analysiert worden, da für den Nachweis von selten vorkommenden Proteinen einer Zelle eine Empfindlichkeit $< 100\ \text{nM}$ erforderlich ist (Kap. 2.1). In Abbildung 4.14 sind die zwei Elektropherogramme der Trp Injektion in ein (a) transparentes PDMS/Quarz Mikrofluidik-System mit einer Lochblende von $400\ \mu\text{m}$ und (b) von $1000\ \mu\text{m}$ für das schwarze PDMS zu sehen. Für die Injektion der Aminosäurelösung nach der *pinched* Methode sind in beiden Fällen die gleichen Be-

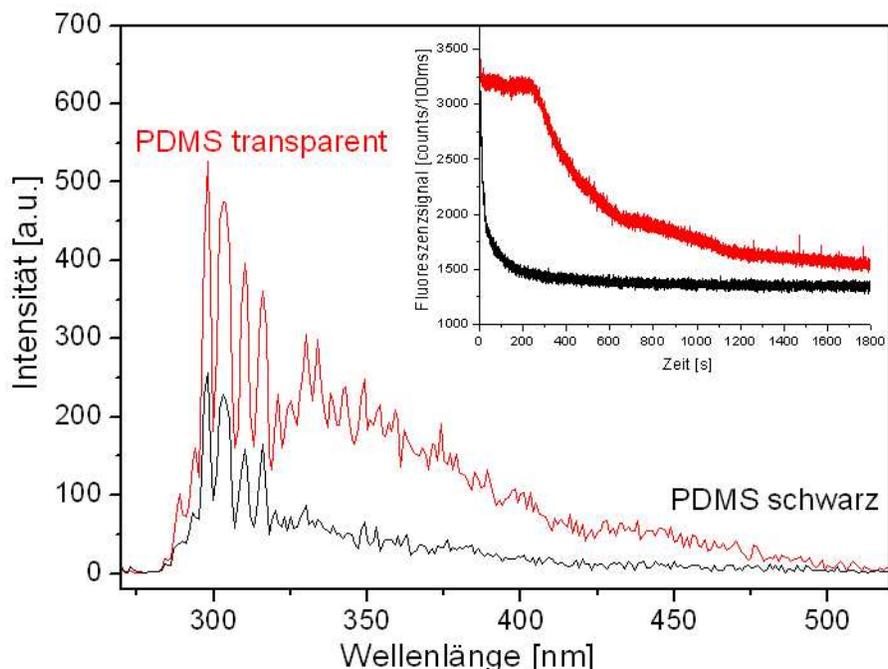


Abbildung 4.13: Fluoreszenzspektrum von transparentem (rot) und schwarzem PDMS (schwarz). Im Einsatz: Hintergrundfluoreszenzabnahme über eine Zeitspanne von 30 min für transparentes und schwarzes PDMS

dingungen verwendet worden.

Im Fall des transparenten PDMS wird für die Detektion der 100 nM Aminosäurelösung ein (S/N)-Verhältnis von 3 erzielt, was der theoretischen Detektionsgrenze entspricht. Für das schwarze PDMS hingegen ergibt sich für die Injektion der gleichen Konzentration ein deutlich über der Detektionsgrenze liegendes Signal. Ein Vergleich zwischen den Peakhöhen beider Signale weist eine Erhöhung um den Faktor 8 auf. Die Bestimmung des (S/N)-Verhältnisses liefert einen Wert von $(S/N) = 12$, was zu einer theoretischen Detektionsgrenze von 25 nM Trp führt. Gegenüber den Resultaten von Schulze et al. [110], die in einem Quarzchip auf einer kürzeren Migrationsstrecke ein (S/N)-Verhältnis von $(S/N) = 8$ für eine $2 \mu\text{m}$ Trp Lösung erzielten, liefern diese Ergebnisse eine deutliche Verbesserung der Detektionssensitivität um eine Größenordnung. Die markierungsfreie Detektion der 100 nM Trp Lösungen entspricht daher der bis dahin geringsten elektrokinetisch injizierten Aminosäurekonzentration in Mikrofluidik-Kanälen.

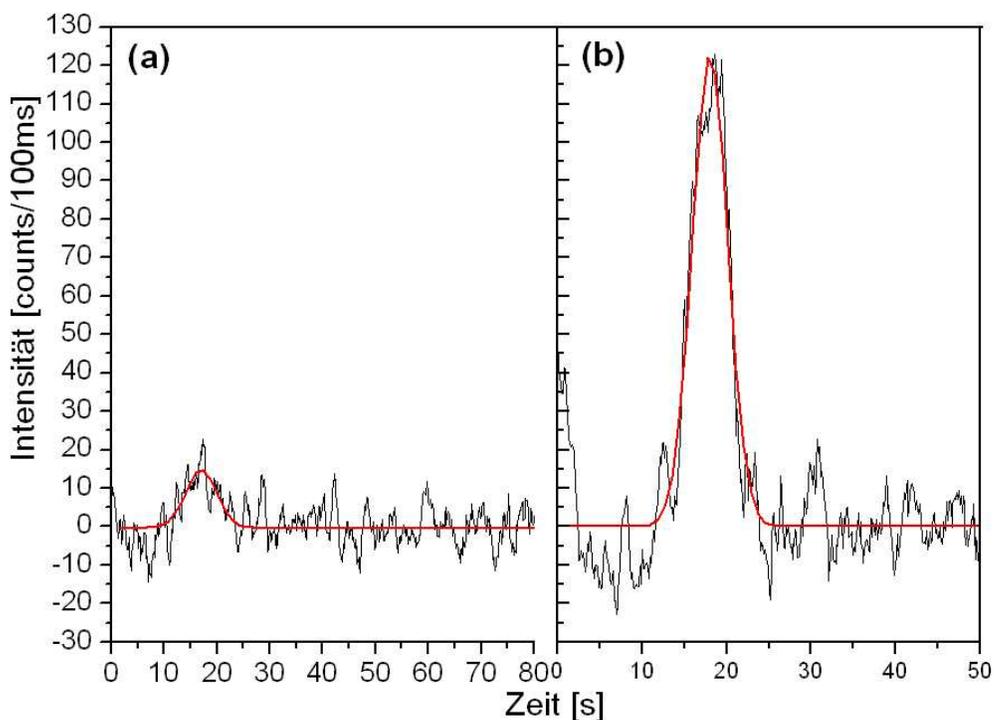


Abbildung 4.14: Elektrokinetische Injektion von 100 nM Trp in ein Mikrofluidik-System aus (a) transparentem und (b) schwarzem PDMS. Bei der Detektion sind die optimierten Lochblenden von (a) $400\ \mu\text{m}$ und (b) $1000\ \mu\text{m}$ verwendet worden.

Die Injektion erfolgt in beiden Fällen mit $600\ \text{V/cm}$, wobei Spannungen von $540\ \text{V}$ für die Einengung auf den Kreuzungsbereich verwendet werden. In den Trennkanal wird mit einer elektrischen Feldstärke von $440\ \text{V/cm}$ injiziert. Die native Fluoreszenzdetektion findet im Abstand von $20\ \text{mm}$ von der Kreuzung statt. Beide Signale sind Basislinien korrigiert und geglättet worden.

4.2.2 Proteintrennung und -detektion

Nach der erfolgreichen Detektion von Aminosäuren wird im Folgenden nun der Nachweis von Proteinen mit nativer Fluoreszenz betrachtet. Für eine Auftrennung sind die Proteine Lysozym C und Avidin ausgewählt worden. In beiden Proteinen kommen die für die UV-Anregung erforderlichen Aminosäuren Tyrosin (Tyr) und Tryptophan (Trp) vor. Im Lysozym C liegen 3 Tyr und 6 Trp vor, während das Avidin 4 Tyr und 16 Trp besitzt. Abbildung 4.15 zeigt die elektrokinetische Auftrennung des Proteingemi-

ches ($500 \mu\text{M}$ Lysozym C und $125 \mu\text{M}$ Avidin) in einem unbeschichteten PDMS/Quarz Mikrofluidik-System innerhalb von 40 s. Für die Injektion des Gemisches ist die *floating*

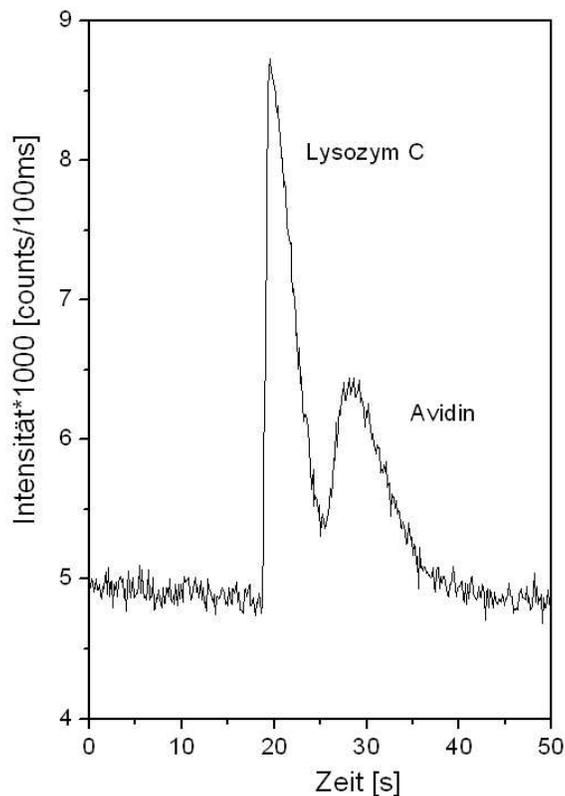


Abbildung 4.15: Elektrokinetische Auftrennung von Lysozym C und Avidin in unbeschichteten PDMS/Quarz Mikrofluidik-Kanälen

Die Injektion des Proteingemisches in das PDMS/Quarz Mikrofluidik-System nach der *floating* Methode erfolgt mit 350 V/cm . Für die Auftrennung wird eine elektrische Feldstärke von 770 V/cm verwendet. Die native Fluoreszenzdetektion findet im Abstand von 12 mm von der Kreuzung statt. Als Puffersystem wird TRIS-Puffer ($\text{pH } 8.2$) genutzt.

Methode verwendet worden. Die Zuordnung der Proteine zu den Signalen erfolgt durch die separaten Injektionen beider Proteine unter gleichen Bedingungen. Bei dem linken Peak bei 20.6 s (Abb 4.15) handelt es sich um das Lysozims C, während bei 28.7 s das Avidin detektiert wird. Die Migrationsreihenfolge der Proteine stimmt mit der Erwartung überein, dass das Lysozym C aufgrund seiner molekularen Masse (14.3 kDa) und des pI -Wertes ($\text{pI} > 11$) im TRIS-Puffer ($\text{pH } 8.2$) eine höhere Mobilität als das Avidin mit 66 kDa und einem pI -Wert von 10.5 besitzt. Als theoretische Plattenzahl ergibt sich

für Lysozym C ein Wert von $N = 254$ und für Avidin $N = 58$ (Kap. 2.4.2, Gl. (2.31)). Die Ursache der verhältnismäßig niedrigen Plattenzahlen liegt zum einen in der Verwendung der *floating* Methode als Injektionstechnik. Durch die Ausbreitung des Proteingemisches in die Seitenkanäle im Injektionsschritt wird ein großes Analytvolumen in den Separationskanal injiziert, was zu Signalverbreiterungen und infolgedessen zu niedrigeren theoretischen Plattenzahlen führen kann. Eine weitere Beeinträchtigung der Signal- und Trenneffizienz rührt von der hydrophoben Natur des PDMS her, da Wechselwirkungen zwischen apolaren Analyten und der unbehandelten Polymeroberfläche auftreten können [58, 81, 111]. Lacher et al. [51] zeigten, dass hydrophobe Peptide stärker mit der PDMS Oberfläche wechselwirkten und niedrigere theoretische Plattenzahlen resultierten. Dieses könnte ebenso die Ursache der hier erhaltenen niedrigen Plattenzahlen sein, da die PDMS Oberfläche trotz UV-Ozon Behandlung, wie in Kap. 4.1.1 gezeigt, hydrophob bleibt. Ein Ansatz zur Verminderung dieser Adsorption ist die Verwendung hydrophiler Oberflächen [51]. Durch die Oxidation im Sauerstoffplasma können in kürzester Zeit hydrophile PDMS Oberflächen hergestellt werden (Kap. 4.1.1). Als nachteilig erweist sich dieser Ansatz jedoch bei der Analyse von kationischen Proteinen, da diese elektrostatisch mit den deprotonierten Silanolgruppen auf der Oberfläche wechselwirken. Towns et al. [112] zeigten in einer Untersuchung des Adsorptionsverhalten anionischer und kationischer Proteine in Quarz-Kapillaren, dass das kationische Lysozym C bereits größtenteils am Kapillaranfang adsorbierte.

Ein alternativer Ansatz zur Verminderung der unspezifischen Adsorption sowie der Verbesserung der Stabilität der Oberflächengruppen stellt die chemische Modifizierung der Oberfläche dar [82, 98]. Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit haben gezeigt, dass das Triblock-Copolymer F108 eine stabile Beschichtung für Sauerstoffplasma oxidierte PDMS/Glas Mikrofluidik-Kanäle darstellt (siehe Kap. 4.1.3 bzw. [H2]).

Anhand der Injektionen von Tryptophan und eines Proteingemisches wird der Einfluss von F108 auf elektrophoretische Anwendungen untersucht. Der Vergleich der Migrationszeiten von $10 \mu\text{M}$ Trp in unbeschichteten und beschichteten Kanälen zeigt, dass in beschichteten Kanälen die Gesamtmobilität geringer ist als in unbeschichteten. Die Ursache liegt in der Verringerung der elektroosmotischen Mobilität um $\sim 50\%$ durch die Adsorption des F108 an die Kanalwände (siehe Kap. 4.1.4). Für eine Auftrennung eines Proteingemisches in beschichteten Mikrofluidik-Kanälen sind die Proteine Lysozym C (3 Tyr und 6 Trp) und Trypsinogen (10 Tyr und 4 Trp) ausgewählt worden. Abb. 4.16 zeigt die Basislinien aufgelöste Trennung des Proteingemisches in einer jeweiligen Konzentration von $50 \mu\text{M}$. Für die Injektion des Proteingemisches ist die *pinched* Methode verwendet worden. Die Bestimmung der Migrationsreihenfolge der Proteine

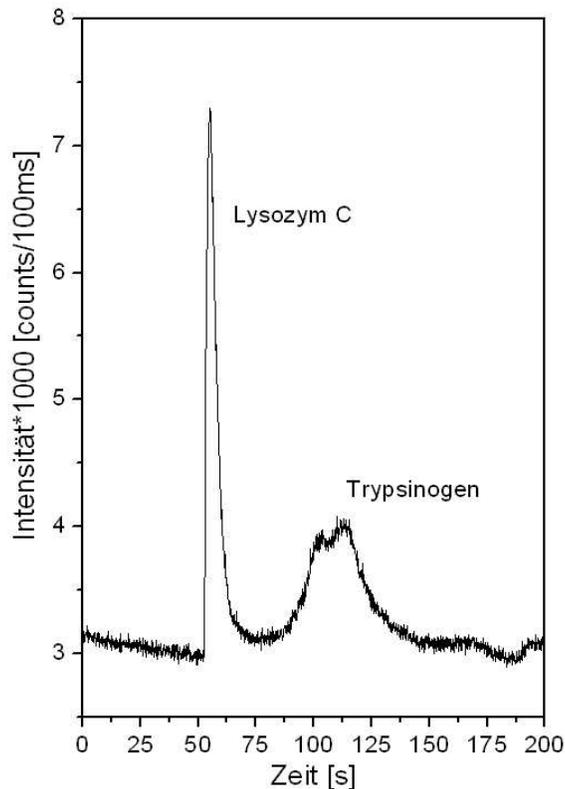


Abbildung 4.16: Elektrokinetische Auftrennung von Lysozym C und Trypsinogen in F108 beschichteten PDMS/Quarz Mikrofluidik-Kanälen

Die Injektion des Proteingemisches in das PDMS/Quarz Mikrofluidik-System nach der pinched Methode erfolgt mit 600 V/cm , wobei Spannungen von 540 V zur Einarbeitung auf den Kreuzungsbereich angelegt werden. Für die Auftrennung wird eine elektrische Feldstärke von 463 V/cm verwendet. Die native Fluoreszenzdetektion findet im Abstand von 35 mm von der Kreuzung statt. Als Puffersystem wird Phosphatpuffer ($\text{pH } 8.6$) genutzt.

erfolgt hier ebenso durch die Injektion der einzelnen Proteine unter gleicher Bedingung. Das linke Signal bei 56 s (Abb. 4.16) lässt sich dem Lysozym C und bei 110 s dem Trypsinogen zuordnen. Wiederum handelt es sich bei dem Lysozym C um das leichtere Protein (14.3 kDa) mit der höheren positiven Ladung ($\text{pI} > 11$) im Phosphatpuffer ($\text{pH } 8.6$). Die molekulare Masse von Trypsinogen beträgt 24 kDa und der pI -Wert 9.3 . Die Breite bzw. Doppelspitze des Trypsinogens (Abb. 4.16) könnte von einer teilweisen Umwandlung des Trypsinogen in Trypsin durch Abspaltung eines Peptidfragments herrühren.

Für Lysozym C lässt sich ein Signal-zu-Rausch Verhältnis von $(S/N) = 123$ bestimmen, so dass die theoretischen Detektionsgrenze mit $(S/N) = 3$ für Lysozym C bei einer Konzentration von $1.25 \mu\text{M}$ liegt. Dieses stimmt gut mit der von Schulze et al. [113] veröffentlichten Detektionsgrenze von $0.9 \mu\text{M}$ für Lysozym C in einem Quarz Mikrofluidik-Chip überein. Letzteres demonstriert zusätzlich, dass für PDMS/Quarz Mikrofluidik-Chips verglichen mit Systemen vollständig aus Quarz ähnliche Nachweisgrenzen erzielt werden können.

Im Vergleich zu der Trennung in unbeschichteten PDMS/Quarz Mikrofluidik-Kanälen zeigt sich für Lysozym C eine Steigerung der theoretischen Plattenzahl um den Faktor 3 auf $N = 764$. Daraus resultiert eine theoretische Plattenhöhe H von $H = 45.8 \mu\text{m}$, die vergleichbar mit der von Xiao et al. [114] erhaltenen Plattenhöhe für die Injektion von fluoreszent markierten BSA ist. Die Verwendung der *pinched* Methode sowie der F108-Beschichtung hat demnach für die Detektion von Lysozym C bereits zu einer verbesserten Effizienz geführt.

Eine weitere Steigerung der theoretischen Plattenzahlen kann durch die Optimierung der *pinched* Methode im UV-Bereich erzielt werden. Die Effizienz dieser Methode hängt stark von der v-förmigen Einengung des Analytvolumens auf den Kreuzungsbereich ab [60]. Für eine optimale Anwendung ist daher eine optische Kontrolle der Einstellungsparameter im Kreuzungsbereich für jeden einzelnen Mikrofluidik-Chip erforderlich, da die Parameter von Mikrochip zu Mikrochip leicht variieren können. Eine zusätzliche Verbesserung kann durch die Verwendung ergänzender Beschichtungen erreicht werden. Hu et al. [115] demonstrierten, dass mit quervernetzenden Beschichtungen in PDMS Mikrofluidik-Kanälen eine Erhöhung der Trenneffizienz gegenüber einfach aufgetragenen PEG-Monomeren erzielt werden kann. Für die PEG-Monomer Beschichtung erhielten sie für ein fluoreszentes Peptid ebenso theoretische Plattenzahlen von $N \sim 750$ in PDMS Mikrofluidik-Kanälen, die sich auf Werte von $N \sim 18600$ mit der quervernetzenden Beschichtung steigern ließen.

4.3 Einzelzellanalytik im Mikrofluidik-Chipformat

Die derzeitigen Zellanalysemethoden im Bereich der Biologie und Medizin basieren auf der Untersuchung von Ensembles aus 10^5 - 10^6 Zellen, wodurch wichtige Informationen über die chemische Zusammensetzung und biologische Aktivität einzelner Zellen verloren gehen. Ferner ist es bekannt, dass Zellen in Abhängigkeit ihres metabolischen Zustands unterschiedlich auf externe Stimulationen reagieren. Das Interesse an Methoden zur Einzelzellanalyse ist daher stark gestiegen. Mikrofluidische Systeme sind aufgrund ihrer mit Zelldurchmessern vergleichbaren Kanaldimensionen im Mikrometerbereich prädestiniert für den Einsatz in der Einzelzellanalytik [9, 116]. Ferner lassen sich diverse Zellhandhabungs- und Prozessschritte wie z.B. Kultivierung, Sortierung von Zellen in die Systeme integrieren [9, 49]. Zusätzlich verkürzen sich die Analysezeiten, was neben der Parallelisierbarkeit einen hohen Durchsatz ermöglicht. Die erforderliche Detektionssensitivität für den Nachweis selten vorkommender Proteine einer einzelnen Zelle liegt bei Konzentration < 100 nM (siehe Kap. 2.1). Die vorangegangenen Resultate mit der Detektion von 84 nM Avidin-FITC im Sichtbaren [H3] und 100 nM Tryptophan im UV-Bereich (Kap. 4.2.1) zeigen, dass mit dem hier vorgestellten Fluoreszenzaufbau die erforderliche Detektionssensitivität erreicht werden kann.

Im folgenden Kapitel wird ein Konzept zur Einzelzellanalytik im Mikrofluidik-Chipformat vorgestellt, sowie der erstmalige Nachweis mit Sf9-Insektenzellen im sichtbaren sowie im ultravioletten Bereich gezeigt. Die einzelnen Schritte der Methode sind schematisch in Abb. 4.17 dargestellt. Als Mikrofluidik-System wird eine aus zwei Kanälen bestehende Struktur mit einem speziellen Kreuzungsbereich verwendet. Im ersten Schritt wird ein Ensemble an Insektenzellen in ein Reservoir des Kanalsystems gegeben und optisch durch das Okular auf ihren Zustand hin überprüft. Nach Kriterien wie der Transfektionseffizienz wird dann eine einzelne Zelle aus dem Ensemble mit der optischen Pinzette ausgewählt und im anschließenden Schritt entlang des Kanals zum Kreuzungspunkt beider Kanäle navigiert. Dort wird die Zelle entweder durch einen Spannungspuls oder mit dem Detergenz Sodiumdodecylsulphat (SDS) lysiert und in den Trennungskanal injiziert (Schritt 3). Unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes migriert der Zellinhalt entlang des Kanals und wird elektrokinetisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgt mittels Laser-Induzierter Fluoreszenz (LIF) im sichtbaren sowie ultravioletten Spektralbereich (Schritt 4). In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Schritte ausführlicher

dargestellt.

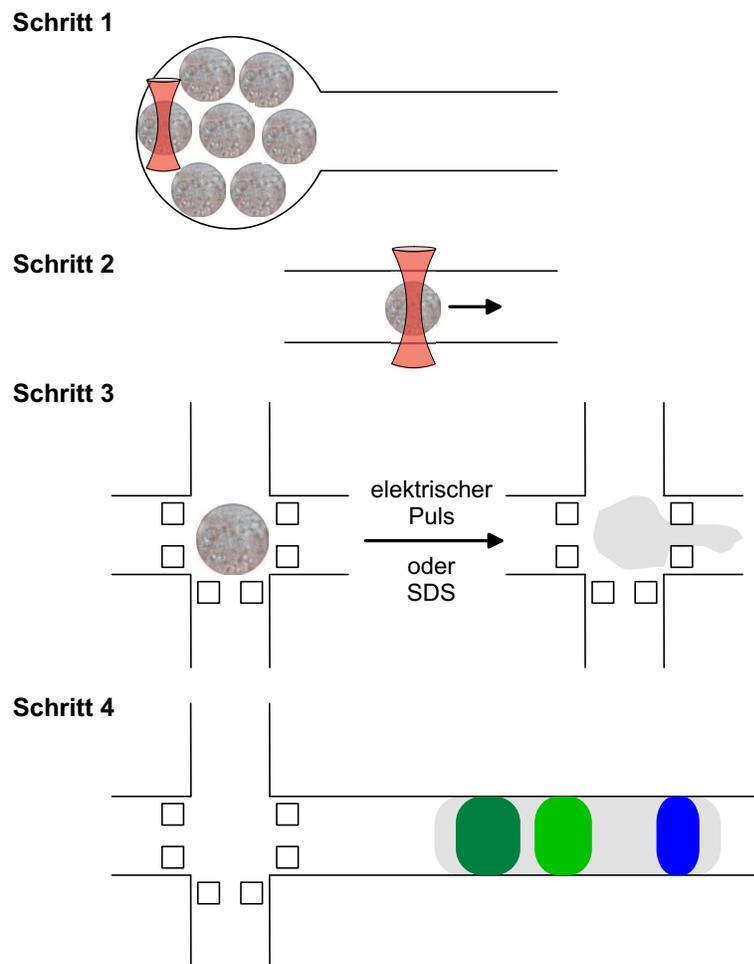


Abbildung 4.17: Schematische Darstellung der Methode für die Einzelzellanalyse

Schritt 1 Selektion einer einzelnen Zelle; **Schritt 2** Navigation der Zelle mittels optischer Pinzette; **Schritt 3** Lyse der Zelle mit elektrischem Puls oder SDS; **Schritt 4** Elektrophoretische Auftrennung des Zellinhalts

4.3.1 Selektion und Transport einzelner Zellen

Das für die Einzelzellanalytik-Methode verwendete Mikrofluidik-System ist in Abb. 4.18(a) schematisch gezeigt.

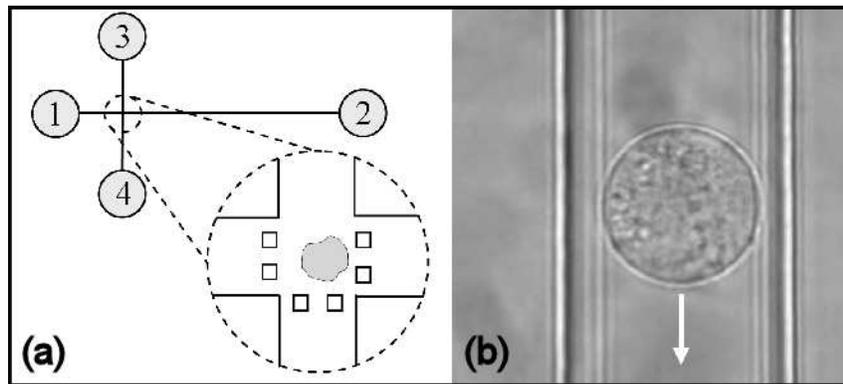


Abbildung 4.18: (a) Schematisches Bild des Mikrofluidik-Systems zur Einzelzellanalytik; (b) Bewegung der Zelle innerhalb des Kanals mittels optischer Pinzette

Die Maße der Kanalstruktur sind auf die Größe der Sf9-Insektzellen abgestimmt worden. Laut Literatur [117] beträgt der mittlere Durchmesser der Zellen $(15 \pm 2.5)\mu\text{m}$. Da die Zellen adherent wachsen und infolgedessen zur Adhäsion an Oberflächen neigen, ist eine Breite von $30\mu\text{m}$ für die Kanäle gewählt worden. So können die Zellen ohne Kontakt zur Kanalwand innerhalb der Strukturen, deren Höhe $27.4\mu\text{m}$ beträgt, mit der optischen Pinzette (Abb. 4.18(b)) geführt werden. Zusätzlich wird eine Adhäsion der Zellen sowie der Proteine mit einer F108-Beschichtung entsprechend der Erkenntnisse aus Kap. 4.1.5 vermieden.

Die Insektzellen werden zu Beginn in Reservoir 3 des Mikrofluidik-Systems gegeben. Abbildung 4.19(a) zeigt einen Ausschnitt aus dem mit Sf9-Insektzellen gefüllten Reservoir (im Hellfeld). Ein Teil dieser Zellen exprimiert ein fluoreszentes Fusionsprotein. Die Effizienz einer solchen einfachen Transfektion liegt zwischen 20% – 50%, wie das Fluoreszenzbild in Abb. 4.19(b) anschaulich demonstriert. Die Verwendung der optischen Pinzette ermöglicht, eine transfizierte Zelle gezielt auszuwählen und zum Eingang des Kanalsystems zu führen. Die mittlere Kraft, mit welcher die Zelle in der optischen Falle gehalten wird, beträgt $75 \pm 21\text{pN}$. Vom Kanaleingang wird die Zelle entweder mittels optischer Pinzette (Abb. 4.18(b)) oder hydrodynamisch durch Änderung der Tropfengrößen auf den Reservoirs entlang des Kanals zum Kreuzungsbereich transportiert. Die Pfosten im Kreuzungsbereich mit einer Grundfläche von $8 \times 8\mu\text{m}^2$ dienen als Hindernisse, zwischen denen die Zellen gefangen und immobilisiert werden können (phys. Falle). Abbildung 4.20(a) und (b) zeigen eine Rasterelektronenmikroskopie- (REM) sowie eine Hellfeldaufnahme des Kreuzungsbereiches.

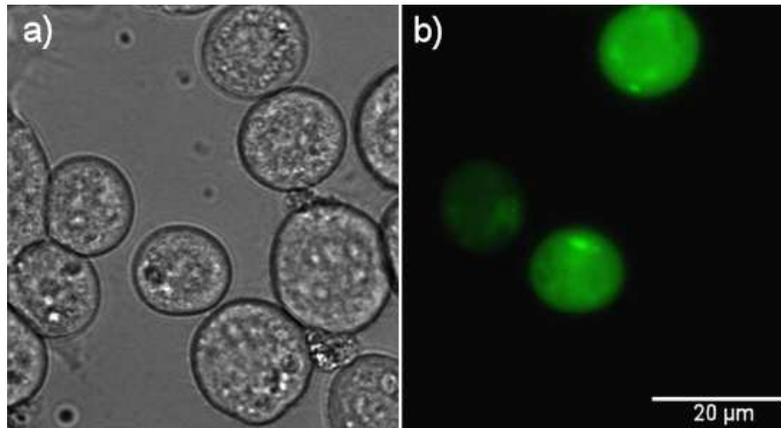


Abbildung 4.19: (a) Mikroskopische Hellfeld- und (b) Fluoreszenzbildaufnahme transfizierter Zellen im Zellmedium

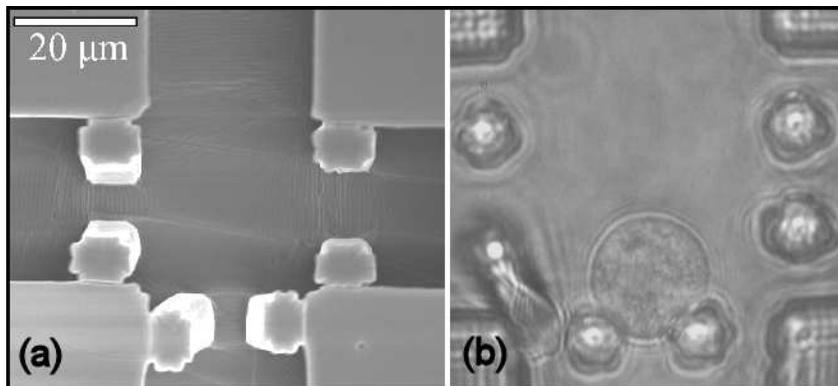


Abbildung 4.20: (a) REM-Bild des Kreuzungsbereichs mit Pfosten (b) Hellfeldaufnahme einer Insektenzelle im Kreuzungsbereich

4.3.2 Zell-Lyse

Für den Aufschluss der sich im Kreuzungsbereich befindlichen Zelle werden die chemische Lyse mit dem Detergenz SDS und die elektrische Lyse mit einem hohen Spannungspuls eingesetzt. Bei der chemischen Lyse werden die Phospholipide und Proteinkomponenten durch das SDS aus der Zellmembran extrahiert und gemischte Mizellen aus SDS und Proteinen gebildet. Dieses bewirkt die Lyse der Zellmembran und eine darauffolgende Freisetzung des Zellinhalts. In Abbildung 4.21 ist der zeitliche Verlauf einer SDS-Lyse zu sehen. Während in Abb. 4.21(a) noch die intakte Zelle im Kreuzungsbereich vorhanden ist, beginnt im nächsten Bild (Abb. 4.21(b)) bereits der Prozess der Lyse.

Für die chemische Lyse der Zelle wird eine Konzentration von 0.5% SDS verwendet, die hydrodynamisch entlang des horizontalen Kanals gepumpt wird. In Abb. 4.21(c) ist der Vorgang soweit vorangeschritten, dass sich nur noch Reste der Zelle an den Pfosten befinden. Im letzten Bild (Abb. 4.21(d)) ist die Zellmembran vollständig aufgelöst und der Zellinhalt mit der Strömung in den Kanal injiziert worden, in dem die elektrokinetische Auftrennung und Detektion stattfindet. Für eine vollständige chemische Lyse der Zelle wird typischerweise eine Zeitspanne von 6 s benötigt.

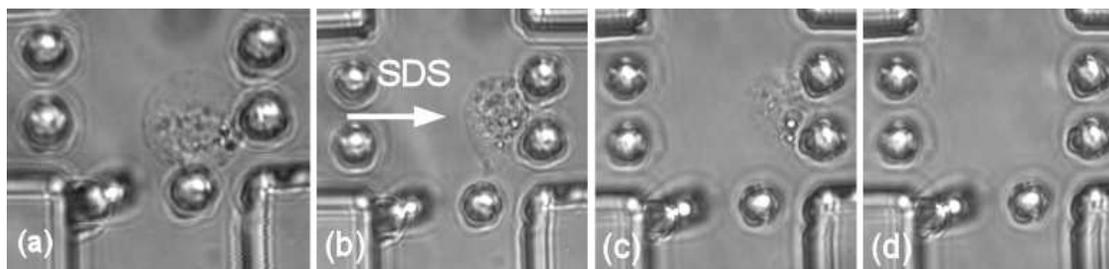


Abbildung 4.21: Lyse der Zelle mit einer 0.5% SDS-Lösung

(a) Im Kreuzungsbereich immobilisierte Zelle; (b-d) Zeitlicher Verlauf der SDS-Lyse.

Bei der elektrischen Lyse wird die Zelle einem kurzen Hochspannungspuls ausgesetzt, der kleine Löcher in der Zellmembran entstehen lässt. Die Ionenpermeabilität verursacht eine Leitfähigkeit der Lipiddoppelschicht sowie ein lokales Joulesches Aufwärmen, was zu thermischen Phasenübergängen in der Membran führt. Durch die zusätzliche molekulare Umorientierung der Ladungen und Dipole in den Lipiden wird die Zellmembran zerstört und der Zellinhalt freigesetzt [26]. In Abbildung 4.22 ist der zeitliche Verlauf einer elektrischen Zell-Lyse zu sehen. Bild 4.22(a) zeigt die im Kreuzungsbereich immobilisierte fluoreszierende Zelle vor der durch ein elektrisches Feld induzierten Lyse mit 4000 V/cm für 100 ms . Im Anschluss an den Hochspannungspuls wird ein elektrisches Feld von 420 V/cm entlang des horizontalen Kanals angelegt, das für die Injektion des Zellinhaltes in den Kanal sorgt (siehe Abb. 4.22(c)+(d)).

Die Aufnahmen demonstrieren, dass beide Lyseverfahren in mikrofluidischen Systemen einsetzbar sind. Im Vergleich zeichnet sich die elektrische Lyse durch den Vorteil einer kürzeren Lysezeit sowie eines definierten Lysebeginns aus. Im Fall von SDS wird eine Zeitspanne von Sekunden gegenüber Millisekunden für die Zell-Lyse benötigt. Da die Dauer der Lyse die Breite des Injektionsvolumens bestimmt, kann sich dieses in Form von Signalverbreiterungen nachteilig auf die Proteinauftrennung auswirken. Durch die

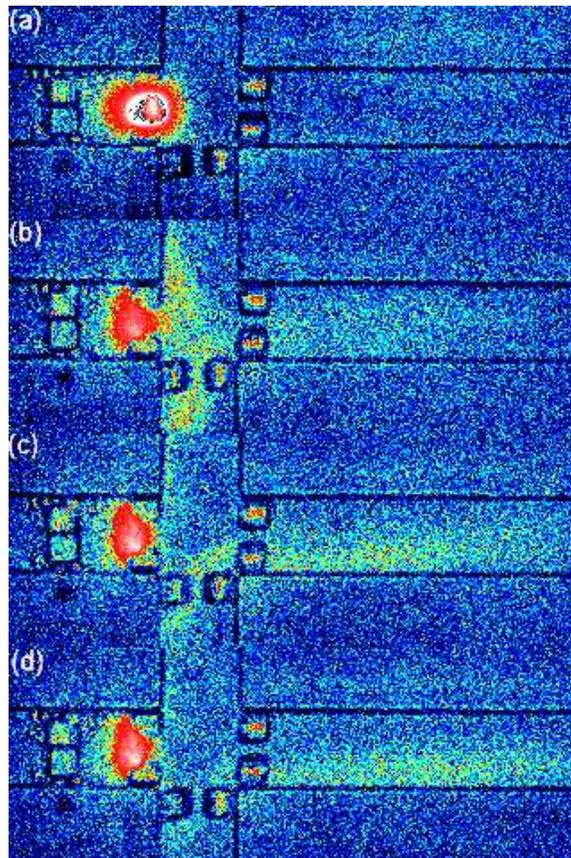


Abbildung 4.22: Fluoreszenzaufnahmen der elektrischen Lyse einer Zelle über eine Zeitspanne von 120 ms

Bilder (a) - (d) zeigen den zeitlichen Verlauf der elektrischen Lyse einer fluoreszenten Zelle, die durch einen Spannungspuls von 4000 V/cm erzielt wird. Die Injektion erfolgt mit einer elektrischen Feldstärke von 420 V/cm .

Verwendung höherer SDS Konzentrationen in Kombination mit anderen Injektionsmethoden (z.B. *gated* Methode) lassen sich die Lysezeiten allerdings verringern.

4.3.3 Einzelzelldetektion

Im letzten Schritt der Einzelzellanalytik-Methode wird das Zell-Lysat im Separationskanal elektrokinetisch aufgetrennt und mit Laser-Induzierter Fluoreszenz im sichtbaren und im UV-Bereich detektiert.

VIS-LIF Detektion von fluoreszenten Fusionsproteinen

Zunächst sind zur Überprüfung des Konzepts einfach transfizierte Zellen verwendet worden, die ein fluoreszentes Fusionsprotein (GFP-T31N) im Cytoplasma exprimieren. Im Einsatz von Abb. 4.23 ist eine im Kreuzungsbereich an den Pfosten immobilisierte Zelle gezeigt, deren GFP-T31N mit der Quecksilberdampfampe zur Fluoreszenz angeregt worden ist. Für die chemische Lyse der Zelle wird dem Separationspuffer zusätzlich SDS in einer Konzentration von 0.1% hinzugefügt, der mit einer elektrischen Feldstärke von 100 V/cm in den Kanal injiziert wird. Das Einzelzellektropherogramm in Abb. 4.23 stellt die erfolgreiche Detektion des Fusionsproteins GFP-T31N nach 334 s mit einem (S/N)-Verhältnis von 400 dar. Die Detektionszeit entspricht nicht der Migrationszeit des Protein-Konstrukts, da der Zeitpunkt Null im Elektropherogramm mit der Injektion des SDS-Puffers übereinstimmt und nicht dem Beginn der chemischen Lyse.

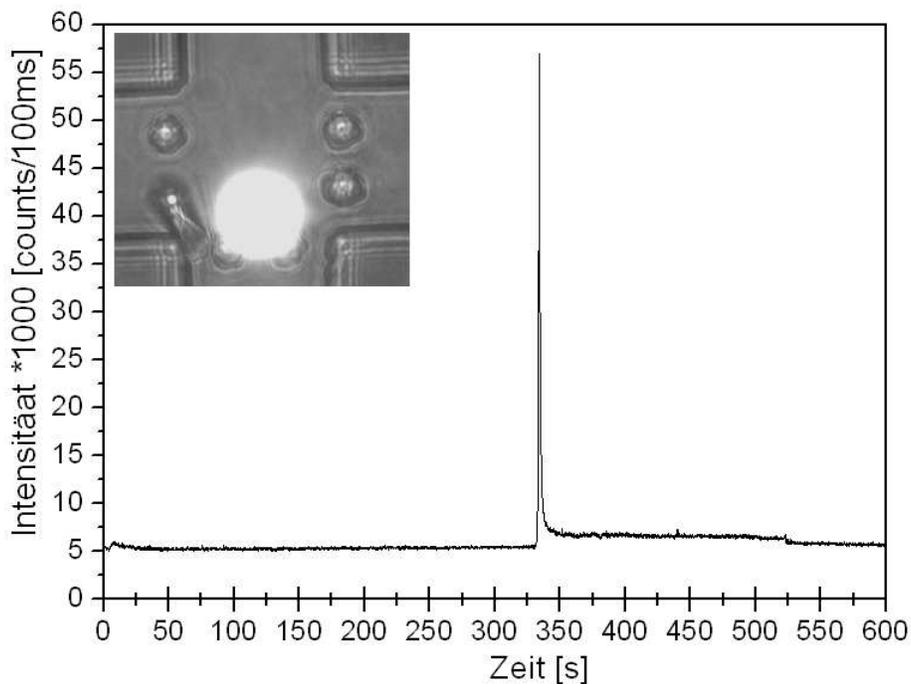


Abbildung 4.23: Elektropherogramm einer mit SDS lysierten einfach transfizierten Zelle mit dem Fusionsprotein GFP-T31N

Die Injektion des SDS-Puffers erfolgt mit einer elektrischen Feldstärke von 100 V/cm. In einer Entfernung von 1000 μm wird das Zell-Lysat detektiert. Trennpuffer: 0.1% SDS, 8% Pullulan, 100 mM CHES/TRIS pH 8.4.

Ferner ist die elektrische Lyse mit einem kurzen Hochspannungspuls zur Lyse der einfach transfizierten Zelle eingesetzt worden. Abbildung 4.24 zeigt den erfolgreichen Nachweis des Fusionsproteins GFP-T31N bei 169 s mit einem (S/N)-Verhältnis von 550. Im Ein-

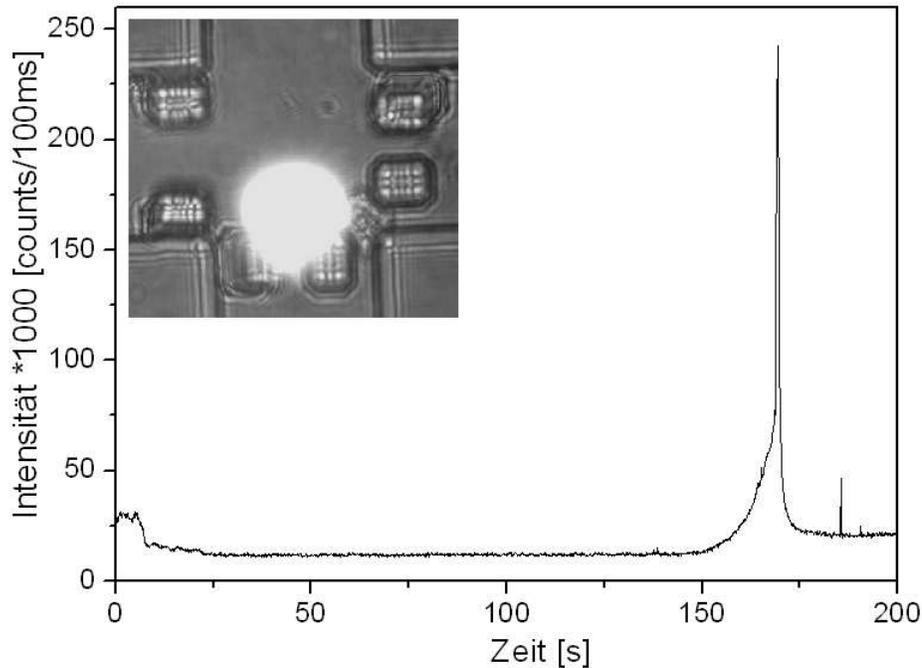


Abbildung 4.24: Elektropherogramm einer elektrisch lysierten einfach transfizierten Zelle mit dem Fusionsprotein GFP-T31N

Die elektrische Lyse der Zelle erfolgt mit einer elektrischen Feldstärke von 1250 V/cm für 50 ms, während für die Injektion des Zell-Lysats in den Kanal eine Separationsfeldstärke von 830 V/cm verwendet wird. Die Detektion findet bei 8 mm statt. Trennpuffer: 4% Pullulan, 100 mM CHES/TRIS pH 8.4.

satz der Abb. 4.24 ist die fluoreszierende Zelle vor der elektrischen Lyse zu sehen. Die Lyse wird mit einer elektrischen Feldstärke von 1250 V/cm für 50 ms durchgeführt, während für die anschließende Injektion des Zell-Lysats in den Kanal eine Feldstärke von 830 V/cm verwendet wird. Die Detektionszeit von 169 s entspricht in diesem Fall der Migrationszeit des Fusionsproteins, da die Aufnahme des Elektropherogramms mit dem Zeitpunkt der Lyse gestartet wird. Die beiden Lysemethoden können nur bedingt verglichen werden, da die Migrationszeit des Fusionsproteins im Fall der SDS-Lyse nicht mit der Detektionszeit übereinstimmt. Die Zeitspanne beinhaltet ebenso den Transport des SDS-Puffers zur Zelle hin. Des Weiteren wurde bei der SDS-Lyse eine niedrigere

elektrische Feldstärke zur Injektion des Zell-Lysats verwendet.

Nach den erfolgreichen Einzelzellanalysen mit dem Fusionsprotein GFP-T31N wird die Methode mit zweifach transfizierten Zellen durchgeführt. Als Fusionsproteine werden Pep12-YFP und γ -PKC-GFP verwendet, die in unterschiedlichen Bereichen der Zelle lokalisiert sind. Das Fusionsprotein Pep12-YFP lagert sich in den Endomembransystemen, vornehmlich den Lysosomen, ab, während das γ -PKC-GFP im Cytosol vorkommt. Im Einsatz von Abb. 4.25 ist ein Fluoreszenzbild der zweifach transfizierten Zelle gezeigt, wobei Pep12-YFP in rot und γ -PKC-GFP in grün dargestellt ist. Der erfolgreiche Nachweis beider Proteine nach der SDS-Lyse ist in Abbildung 4.25 zu sehen. Ein Vergleich mit den Einzelzelektropherogrammen der einfach transfizierten Zellen ist nur bedingt möglich, da der Puffer und die Injektionsmethoden verschieden sind.

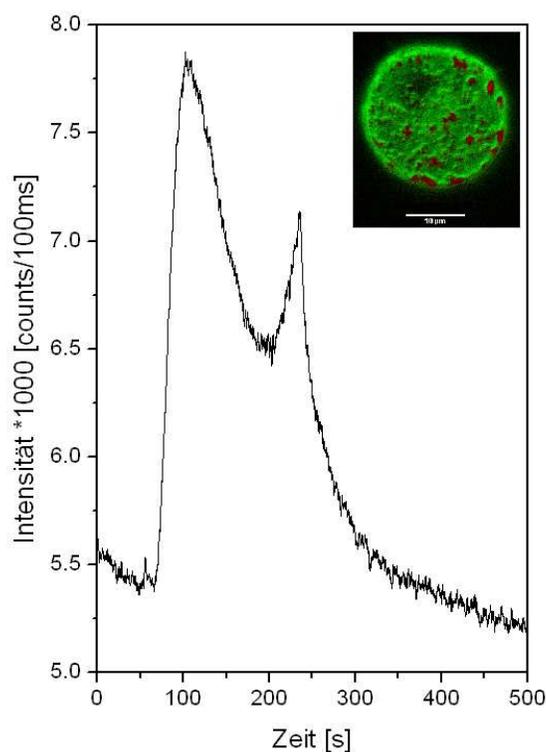


Abbildung 4.25: Elektropherogramm einer SDS lysierten zweifach transfizierten Zelle mit den Fusionsproteinen γ -PKC-GFP und Pep12-YFP

Für die Lyse wird der SDS-Puffer mit einer elektrischen Feldstärke von -263 V/cm injiziert. Die Detektion erfolgt im Abstand von 15 mm. Trennpuffer: 1% SDS, 4% Pullulan, 0.1% POP-6, 100 mM CHES/TRIS pH 8.4. Das Signal ist geglättet worden.

Native UV-LIF Proteindetektion

Nachdem sich mit den vorangegangenen Einzelzellektropherogrammen das Konzept im sichtbaren Bereich erfolgreich bewährt hat, wird nun die native Fluoreszenz als Nachweismethode eingesetzt. Dieses bietet die Möglichkeit markierungsfrei nicht nur einzelne Proteine, sondern den Protein-Fingerabdruck einer einzelnen Zelle zu detektieren. Abbildung 4.26 zeigt ein mit UV-LIF Detektion aufgenommenes Elektropherogramm einer elektrisch lysierten Zelle mit ~ 10 deutlichen Peaks. Für einen Vergleich ist zusätzlich ein Elektropherogramm mit vier im Kreuzungsbereich immobilisierten Zellen aufgenommen worden (Abb. 4.26). Es zeigt sich, dass in dem Fall ~ 20 Peaks mit höheren Intensitäten aufgelöst werden können. Die gestiegene Intensität der Peaks ergibt sich durch den höheren Proteinanteil der vier Zellen im Vergleich zu der einzelnen Zelle. Obwohl die Expressionslevels zwischen verschiedenen Zellen erwartungsgemäß variieren und eine Interpretation der Elektropherogramme erschweren, können drei Peakgruppen in beiden Elektropherogrammen identifiziert werden. Die Zuordnung wird erzielt, in dem die Migrationszeiten der Peakgruppen entsprechend der unterschiedlichen elektrischen Feldstärken für die Trennung (240 V/cm für die einzelne Zelle gegenüber 360 V/cm für die vier Zellen) mit dem Faktor 1.5 skaliert werden. Peaks mit Migrationszeiten größer als 100 s des vier Zellen-Elektropherogramms sind im Einzelzellektropherogramm zum einen aufgrund der niedrigeren elektrischen Feldstärke und zum anderen aufgrund der Proteinkonzentrationen unterhalb der Detektionsgrenze nicht zu sehen. Insgesamt ist die Anzahl der detektierten Peaks sowie die Trenneffizienz noch verhältnismäßig niedrig, doch durch eine Optimierung des Trenn- und Detektionskonzepts sowie der Verwendung einer ergänzenden Beschichtung [111] kann eine Verbesserung erzielt werden. In mikrofluidischen Systemen stellt dieses Resultat bis dato das erste Einzelzellektropherogramm mit nativer Fluoreszenz dar.

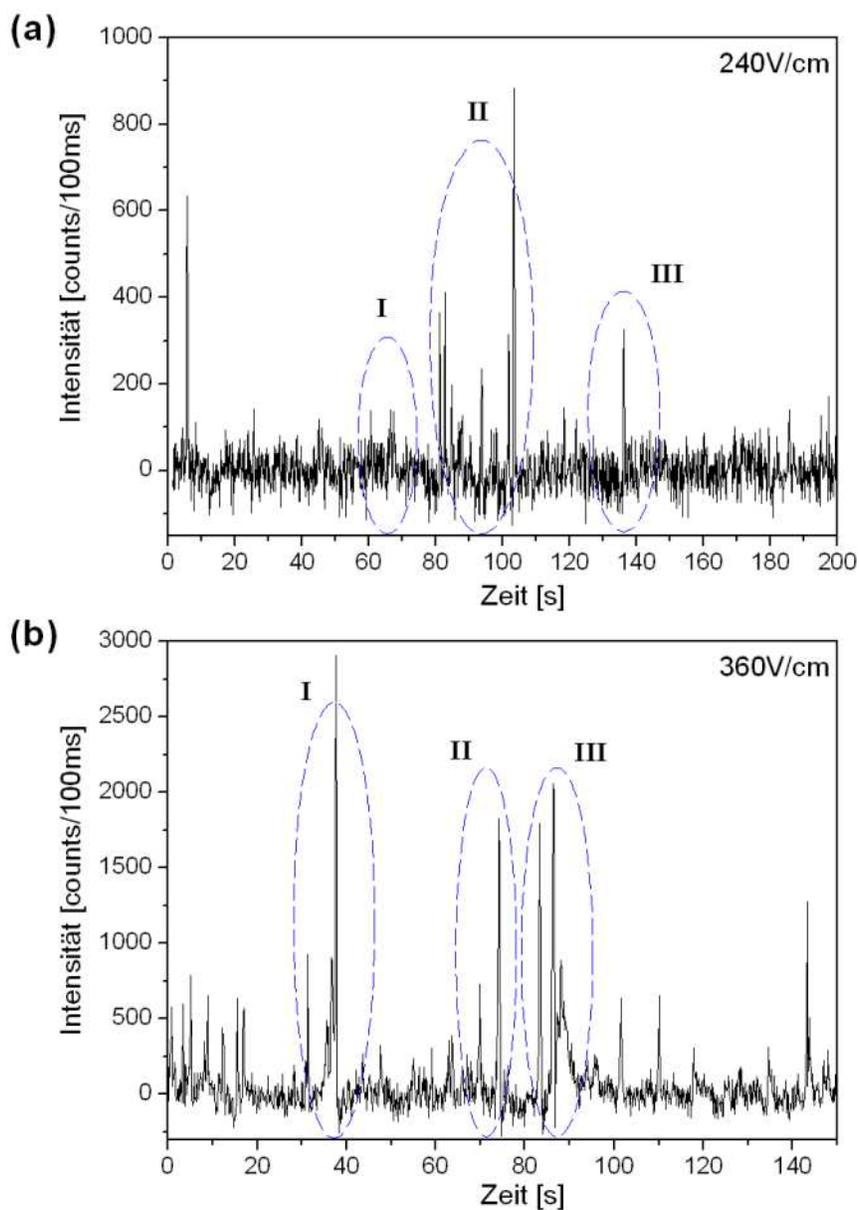


Abbildung 4.26: Basislinienkorrigierte Elektropherogramme (a) einer elektrisch lysierten Zelle und (b) von vier Zellen im Kreuzungsbereich mit nativer UV-LIF Detektion. Die elektrischen Feldstärken für die Injektion des Zell-Lysats unterscheiden sich um den Faktor 1.5 ((a) 240 V und (b) 360 V/cm), so dass die Peakgruppen bei (a) 65 s (I), 90 s (II) und 130 s (III) den in (b) bei 37 s (I), 74 s (II) und 87 s (III) zugeordnet werden können.

Die Lyse der Zelle wird durch ein elektrisches Feld von (a) 1200 V/cm und (b) 1900 V/cm (50 ms) erzielt. Die native Fluoreszenzdetektion findet in einer Entfernung von 2500 μm statt. Trennpuffer: 4% Pullulan, 100 mM CHES/TRIS pH 8.4

5 Zusammenfassung & Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit ist ein Konzept zur Einzelzellanalytik in Mikrofluidik-Systemen vorgestellt worden. Die Methode kombiniert die einzelnen Schritte von der Auswahl und Navigation der Zelle über die Lyse bis hin zur Proteinauftrennung und -detektion auf einem einzelnen Mikrofluidik-Chip.

Dafür wurde zunächst eine geeignete Oberflächenfunktionalisierung zur Vermeidung von Zelladhäsion und unspezifischer Proteinadsorption an die PDMS Kanalwände entwickelt. Es stellte sich heraus, dass sowohl die Silanisierung als auch die Adsorption mit POE zur Beschichtung der PDMS/Glas Mikrofluidik-Kanäle verwendbar sind. Insbesondere die F108-Beschichtung auf Sauerstoffplasma oxidierten Oberflächen hat sich durch eine gute Langzeitstabilität bewährt.

Für die Proteinanalytik wurde ein höchst empfindlicher konfokaler Aufbau zur LIF-Detektion im sichtbaren sowie im UV-Bereich realisiert. Es konnte gezeigt werden, dass mit dem Aufbau 100 nM Aminosäurekonzentrationen detektierbar sind. Durch die Verwendung von schwarzen Kohlenstoffpigmenten konnte das (S/N)-Verhältnis um das 4fache gesteigert werden, was einer theoretischen Detektionsgrenze von 25 nM entspricht. Dieses stellt die bisher niedrigste elektrokinetisch injizierte und mittels UV-LIF detektierte Aminosäurekonzentration in Mikrofluidik-Kanälen dar. Des Weiteren ist die Auftrennung von Proteinen in kürzester Zeit (150 s) in F108 beschichteten PDMS/Quarz Mikrofluidik-Kanälen gelungen.

Das Konzept der Einzelzellanalytik ist zunächst an genetisch transfizierten Zellen im sichtbaren Bereich durchgeführt worden. Dabei wurden die transfizierten Zellen mittels einer optischen Pinzette ausgewählt und zum Punkt der Lyse transportiert. Für die Lyse der Zelle konnten sowohl die elektrische Lyse mit definierten Hochspannungspulsen als auch die chemische Lyse mit dem Detergenz SDS in mikrofluidischen Systemen erfolgreich eingesetzt werden. Zur Überprüfung des vorgestellten Konzepts wurden einfach (T31N-GFP) und anschließend zweifach transfizierte Zellen (γ -PKC-GFP und PEP12-YFP) analysiert. Die Elektropherogramme demonstrieren den erfolgreichen Nachweis

der GFP- und YFP-Konstrukte nach der Lyse der jeweiligen Zelle. Aufbauend auf diesen erfolgreichen Ergebnissen ist es erstmalig gelungen, Elektropherogramme einzelner Zellen mit nativer Fluoreszenz aufzunehmen. Im Vergleich des Einzelzellektropherogramms mit einem vier Zellen Elektropherogramm konnten gesteigerte Peakintensitäten durch den höheren Proteinanteil festgestellt sowie einzelne Peakgruppen zugeordnet werden.

Für zukünftige Einzelzellanalysen ist eine weitere Steigerung der Trenneffizienz erzielbar, indem die bisherige Beschichtung zur Vermeidung unspezifischer Proteinadsorption durch dynamische oder quervernetzende Polymer Beschichtungen ergänzt wird. Ferner bietet die Verwendung eines vollständig aus Quarz hergestellten Mikrofluidik-Chips neben einer verringerten Hintergrundfluoreszenz den Vorteil, eine bessere Kontrollierbarkeit des elektroosmotischen Flusses aufgrund definierterer Oberflächeneigenschaften zu ermöglichen.

Neue parallelisierte Kanalgeometrien bieten in Kombination mit anderen Injektionsmethoden (z.B. die *gated* Injektion) die Möglichkeit der gleichzeitigen und schnellen Analyse von einzelnen Zellen. Dadurch wird ein direkter Vergleich der Analysen unter identischen Bedingungen bei gleichzeitiger Erhöhung des Durchsatzes möglich. Mit Hilfe der Dielektrophorese lassen sich einzelne Zellen in einem elektrisch inhomogenen Wechselfeld energetisch fangen und berührungslos transportieren. Diese Methode ist gegenüber der optischen Pinzette vollständig auf dem Mikrofluidik-Chip integrierbar und automatisierbar, so dass sich eine einfachere Handhabung des Lab-On-A-Chip ergibt.

Als zukünftiges Ziel wird die Realisierung einer markierungsfreien Detektion eines Protein-Fingerabdruckes in Mikrofluidik-Systemen verfolgt. Mit dieser Methode wird die Möglichkeit bestehen, Zellen in verschiedenen Stadien und unter bestimmten Bedingungen (z.B. Stresseinwirkung) zu untersuchen. Durch den Vergleich der Protein-Profile können Erkenntnisse über zelluläre Zusammenhänge gewonnen werden und so Beiträge zur System Nanobiologie geliefert werden.

Publikationsliste

Veröffentlichungen

[H1] A. ROS, W. HELLMICH, T. T. DUONG UND D. ANSELMETTI: *Towards Single Molecule Analysis in PDMS Microdevices: From the Detection of Ultra Low Dye Concentrations to Single DNA Molecule Studies*, Journal of Biotechnology, 112: 65–72, 2004

[H2] W. HELLMICH, J. REGTMEIER, T. T. DUONG, R. ROS, D. ANSELMETTI UND A. ROS: *Poly(oxyethylene) Based Surface Coatings for Poly(dimethylsiloxane) Microchannels*, Langmuir, 21: 7551–7557, 2005

[H3] W. HELLMICH, CH. PELARGUS, K. LEFFHALM, A. ROS UND D. ANSELMETTI: *Single Cell Manipulation, Analytics and Label-free Protein Detection in Microfluidic Devices for Systems NanoBiology*, Electrophoresis, 26: 3689–3696, 2005

[H4] W. HELLMICH, K. LEFFHALM, A. SISCHKA, T. T. DUONG, N. JENSEN, K. NIEHAUS, K. TÖNSING, A. ROS UND D. ANSELMETTI: *Towards Single Cell Fingerprinting in Microfluidic Device Format: Single Cell Manipulation, Protein Separation and Detection*, Proceedings of the μ TAS 2005 (ISBN: 0-9743611-1-9) Vol. 1: 406–408, Boston 2005

[H5] A. ROS, W. HELLMICH, J. REGTMEIER, T. T. DUONG UND D. ANSELMETTI: *Bioanalysis in Structured Microfluidic Systems*, Electrophoresis, im Druck, 2006

[H6] W. HELLMICH, D. GREIF, C. PELARGUS, D. ANSELMETTI UND A. ROS: *Improved Native UV Laser Induced Fluorescence Detection for Single Cell Analysis in Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Devices*, Journal of Chromatography, im Druck, 2006

[H7] W. HELLMICH, CH. PELARGUS, K. LEFFHALM, A. ROS UND D. ANSELMETTI: *Single Cell Manipulation, Analytics and Label-free Protein Detection in Microfluidic Devices for Systems NanoBiology* (Buchbeitrag), *Microfluidic Applications in Biology*, Wiley-VCH 2006

Konferenzbeiträge

[H7] W. HELLMICH, A. ROS UND D. ANSELMETTI: *Native Fluorescence Detection of Proteins in PDMS Microfluidic Devices* (Vortrag), NanoTech 2003, Montreux (Ch)

[H8] W. HELLMICH, A. ROS UND D. ANSELMETTI: *UV Laser Induced Fluorescence Detection of Proteins in PDMS Microfluidic Devices* (Poster), DPG-Frühjahrstagung 2004, Regensburg

[H9] W. HELLMICH, J. REGTMEIER, D. ANSELMETTI UND A. ROS: *Surface Coating Strategies for Poly(dimethylsiloxane) Microchannels* (Poster), 18th International Symposium on Micro-Scale Bioseparations 2005 (MSB), New Orleans (USA)

[H10] W. HELLMICH, J. REGTMEIER, D. ANSELMETTI UND A. ROS: *Surface Coating Strategies for Poly(dimethylsiloxane) Microchannels* (Vortrag), DPG-Frühjahrstagung 2005, Berlin

Literaturverzeichnis

- [1] IDEKER, T., T. GALITSKI und L. HOOD: *A New Approach to Decoding Life: Systems Biology*. Ann. Rev. Genomics Hum. Genet., 2:343–372, 2001.
- [2] WESTON, A. D. und L. HOOD: *Systems Biology, Proteomics, and the Future of Health Care: Toward Predictive, Preventative, and Personalized Medicine*. Journal of Proteome Research, 3(2):179–196, 2004.
- [3] HOOD, L., J. R. HEATH, M. E. PHELPS und B. LIN: *Systems Biology and New Technologies Enable Predictive and Preventative Medicine*. Science, 306:640–643, 2004.
- [4] LOTTSPREICH, F. und H. ZORBAS: *Bioanalytik*. Spectrum Akademischer Verlag, 1998.
- [5] HEATH, J. R., M. E. PHELPS und L. HOOD: *NanoSystems Biology*. Molecular Imaging and Biology, 5(5):312–325, 2003.
- [6] KNIGHT, J.: *Honey, I shrunk the lab*. Nature, 418:474–475, 2002.
- [7] FIGEYS, D. und D. PINTO: *Lab-on-a-Chip: A Revolution in Biological and Medical Sciences*. Analytical Chemistry, 72:330A–335A, 2000.
- [8] McDONALD, J. C., D. C. DUFFY, J. R. ANDERSON, D. T. CHIU, H. WU, O. J. A. SCHUELLER und G. M. WHITESIDES: *Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)*. Electrophoresis, 21:27–40, 2000.
- [9] ANDERSSON, H. und A. VAN DEN BERG: *Microfluidic devices for cellomics: a review*. Sensors and Actuators B, 92:315–325, 2003.
- [10] SCHASFOORT, R. B. M.: *Proteomics-on-a-chip: the challenge to couple lab-on-a-chip unit operations*. Expert Review of Proteomics, 1(1):123–132, 2004.

- [11] MANZ, A., N. GRABER und H. M. WIDMER: *Miniaturized Total Chemical Analysis Systems: a Novel Concept for Chemical Sensing*. Sensors and Actuators B, B1:244–248, 1990.
- [12] MITCHELL, P.: *Microfluidics - downsizing large-scale biology*. Nature Biotechn., 19:717–721, 2001.
- [13] (WTC), WICHT TECHNOLOGIE CONSULTING: *Nexus III Bericht - Marktanalyse für MEMS und Mikrosysteme III.2005-2009*. Report, 2006.
- [14] LION, N., F. REYMOND, H. H. GIRAULT und J. S. ROSSIER: *Why the move to microfluidics for protein analysis?* Current Opinion in Biotechnology, 15(1):31–37, 2004.
- [15] LIU, Y., R. S. FOOTE, C. T. CULBERTSON, S. C. JACOBSON, R. S. RAMSEY und J. M. RAMSEY: *Electrophoretic Separation of Proteins on a Microchip*. Journal of Microcolumn Separations, 12(7):407–411, 2000.
- [16] DOLNIK, V., S. LIU und S. JOVANOVIĆ: *Capillary Electrophoresis on a microchip*. Electrophoresis, 21:41–54, 2000.
- [17] AUROUX, P.-A., D. IOSSIFIDIS, D. R. REYES und A. MANZ: *Micro Total Analysis Systems. 2. Analytical Standard Operations and Applications*. Analytical Chemistry, 74:2637–2652, 2002.
- [18] HARRISON, D. J., A. MANZ, Z. FAN, H. LÜDI und H. M. WIDMER: *Capillary Electrophoresis and Sample Injection Systems Integrated on a Planar Glass Chip*. Analytical Chemistry, 64:1926–1932, 1992.
- [19] JACOBSON, S. C., R. HERGENRÖDER, L. B. KOUTNY und J. M. RAMSEY: *High Speed Separation on a Microchip*. Analytical Chemistry, 66:1114–1118, 1994.
- [20] OCVIRK, G., T. THOMPSON und D. J. HARRISON: *Optimization of confocal epifluorescence microscopy for microchip-based miniaturized total analysis systems*. The Analyst, 123:1429–1434, 1998.
- [21] LIANG, Z., N. CHIEM, G. OCVIRK, T. TANG, K. FLURI und D. J. HARRISON: *Microfabrication of a Planar Absorbance and Fluorescence Cell for Integrated Capillary Electrophoresis Devices*. Analytical Chemistry, 68:1040–1046, 1996.

- [22] LIU, Y., R. S. FOOTE, S. C. JACOBSON, R. S. RAMSEY und J. M. RAMSEY: *Electrophoretic Separation of Proteins on a Microchip with Noncovalent, Postcolumn Labeling*. Analytical Chemistry, 72:4608–4613, 2000.
- [23] HU, S., L. ZHANG, S. KRYLOV und N. J. DOVICH: *Cell Cycle-Dependent Protein Fingerprint from a Single Cancer Cell: Image Cytometry Coupled with Single-Cell Capillary Sieving Electrophoresis*. Analytical Chemistry, 75(14):3495–3501, 2003.
- [24] HU, S., L. ZHANG, R. NEWITT, R. AEBERSOLD, J. R. KRALY, M. JONES und N. J. DOVICH: *Identification of Proteins in Single-Cell Capillary Electrophoresis Fingerprints Based on Comigration with Standard Proteins*. Analytical Chemistry, 75(14):3502–3505, 2003.
- [25] HU, S., D. A. MICHELS, MD. A. FAZAL, C. RATISOONTORN, M. L. CUNNINGHAM und N. J. DOVICH: *Capillary Sieving Electrophoresis/ Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography for Two-Dimensional Protein Fingerprinting of Single Mammalian Cell*. Analytical Chemistry, 76(14):4044–4049, 2004.
- [26] MCCLAIN, M. A., C. T. CULBERTSON, S. C. JACOBSON, N. L. ALLBRITTON, C. E. SIMS und J. M. RAMSEY: *Microfluidic Devices for the High-Throughput Chemical Analysis of Cells*. Analytical Chemistry, 75(21):5646–5655, 2003.
- [27] MUNCE, N. R., J. LI, P. R. HERMAN und L. LILGE: *Microfabricated System for Parallel Single-Cell Capillary Electrophoresis*. Analytical Chemistry, 76(17):4983–4989, 2004.
- [28] GAO, J., X.-F. YIN und Z.-L. FANG: *Integration of single cell injection, cell lysis, separation and detection of intracellular constituents on a microfluidic chip*. Lab on a Chip, 4:47–52, 2004.
- [29] XIA, F., W. JIN, X. YIN und Z. FANG: *Single-cell analysis by electrochemical detection with a microfluidic device*. Journal of Chromatography A, 1063:227–233, 2005.
- [30] GAO, N., W. WANG, X. ZHANG, W. JIN, X. YIN und Z. FANG: *High-Throughput Single-Cell Analysis for Enzyme Activity without Cytolysis*. Analytical Chemistry, 78(9):3213–3220, 2006.
- [31] ALBERTS, B., A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS und P. WALTER: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Sciences, 2002.

- [32] LODISH, H., D. BALTIMORE, A. BERK, A. L. ZIPURSKY, P. MATSUDAIRA und J. DARNELL: *Molekulare Zellbiologie*. de Gruyter Verlag, 1996.
- [33] MÜLLER-ESTERL, W.: *Biochemie-Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Spektrum Akademischer Verlag, 2004.
- [34] MANZ, A., D. J. HARRISON, E. VERPOORTE und H. M. WIDMER: *Planar Chips Technology for Miniaturization of Separation Systems: A Developing Perspective in Chemical Monitoring*. *Advanced Chromatograph*, 33:1–66, 1993.
- [35] REYES, D. R., D. IOSSIFIDIS, P.-A. AUROUX und A. MANZ: *Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology*. *Analytical Chemistry*, 74:2623–2636, 2002.
- [36] ADAM, G., P. LÄUGER und G. STARK: *Physikalische Chemie und Biophysik*. Springer Verlag, 2003.
- [37] BRUUS, H.: *Theoretical Microfluidics*. Report, 2004.
- [38] BEEBE, D. J., G. A. MENSING und G. M. WALKER: *Physics and Applications of Microfluidics in Biology*. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 4:261–286, 2002.
- [39] DORFMÜLLER, T., W. T. HERING und K. STIERSTADT: *Bergmann Schäfer: Lehrbuch der Experimentalphysik, Band I*. Walter de Gruyter Verlag Auflage, 1998.
- [40] DERTINGER, S. K. W., D. T. CHIU, N. L. JEON und G. M. WHITESIDES: *Generation of Gradients Having Complex Shapes Using Microfluidic Networks*. *Analytical Chemistry*, 73(6):1240–1246, 2001.
- [41] STONE, H. A. und S. KIM: *Microfluidics: Basic Issues, Applications, and Challenges*. *American Institute of Chemical Engineers*, 47(6):1250–1254, 2001.
- [42] WALKER, G. M. und D. J. BEEBE: *A passive pumping method for microfluidic devices*. *Lab on a Chip*, 2:131–134, 2002.
- [43] GROSSMAN, P. D. und J. C. COLBURN: *Capillary Electrophoresis- Theory and Practice*. Academic Press, 1992.
- [44] ROSS, D., T. J. JOHNSON und L. E. LOCASCIO: *Imaging of electroosmotic flow in plastic microchannels*. *Analytical Chemistry*, 73:2509–2515, 2001.

- [45] PAUL, P. H., M. G. GARGUILO und D. J. RAKESTRAW: *Imaging of Pressure- and Electrokinetically Driven Flows through Open Capillaries*. Analytical Chemistry, 70:2459–2467, 1998.
- [46] JORGENSON, J. W. und K. LUKACS: *Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries*. Analytical Chemistry, 53:1298–1302, 1981.
- [47] JORGENSON, J. W. und K. LUKACS: *High-Resolution Separations based on Electrophoresis and Electroosmosis*. Journal of Chromatography, 218:209–216, 1981.
- [48] JACOBSON, S. C., R. HERGENRÖDER, L. B. KOUTNY und J. M. RAMSEY: *Open Channel Electrochromatography on a Microchip*. Analytical Chemistry, 66:2369–2373, 1994.
- [49] SIA, S. K. und G. M. WHITESIDES: *Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies*. Electrophoresis, 24:3563–3576, 2003.
- [50] PITTMAN, J. L., C. S. HENRY und S. D. GILMAN: *Experimental Studies of Electroosmotic Flow Dynamics in Microfabricated Devices during Current Monitoring Experiments*. Analytical Chemistry, 75(3):361–370, 2003.
- [51] LACHER, N. A., N. F. DE ROOIJ, E. VERPOORTE und S. M. LUNTE: *Comparison of the performance characteristics of poly(dimethylsiloxane) and Pyrex microchip electrophoresis devices for peptide separations*. Journal of Chromatography A, 1004:225–235, 2003.
- [52] HUANG, X., M. J. GORDON und R. N. ZARE: *Current-Monitoring Method for Measuring the Electroosmotic Flow Rate in Capillary Zone Electrophoresis*. Analytical Chemistry, 60:1837–1838, 1988.
- [53] BADAL, M. Y., M. WONG, N. CHIEM, H. SALIMI-MOOSAVI und D. J. HARRISON: *Protein Separation and surfactant control of electroosmotic flow in poly(dimethylsiloxane)-coated capillaries and microchips*. Journal of Chromatography A, 947:277–286, 2002.
- [54] WANG, B., L. CHEN, Z. ABDULALI-KANJI, J. H. HORTON und R. D. OLESCHUK: *Aging Effects on Oxidized and Amine-Modified Poly(dimethylsiloxane) Surfaces Studied with Chemical Force Titrations: Effects on Electroosmotic Flow Rate in Microfluidic Channels*. Langmuir, 19(23):9792–9798, 2003.

- [55] LIU, S. F. Y.: *Capillary Electrophoresis: principles, practice and applications*. Elsevier Science Publisher, 1993.
- [56] WANDER, B. J., A. A. A. M. VAN DE GOOR und F. M. EVERAERTS: *Methods for On-Line Determination and Control of Electroendosmosis in Capillary Electrochromatography and Electrophoresis*. Journal of Chromatography, 470:89–93, 1989.
- [57] ROBERTS, M. A., J. S. ROSSIER, P. BERCIER und H. H. GIRAULT: *UV Laser Machined Polymer Substrates for the Development of Microdiagnostic Systems*. Analytical Chemistry, 69(11):2035–2042, 1997.
- [58] OCVIRK, G., M. MUNROE, T. THOMPSON, R. OLESCHUK, K. WESTRA und D. J. HARRISON: *Electrokinetic control of fluid flow in native poly(dimethylsiloxane) capillary electrophoresis devices*. Electrophoresis, 21:107–115, 2000.
- [59] LOCASCIO, L. E., C. E. PERSO und C. S. LEE: *Measurement of electroosmotic flow in plastic imprinted microfluidic devices and the effect of protein adsorption on flow rate*. Journal of Chromatography A, 857:257–284, 1999.
- [60] ZHANG, C. X. und A. MANZ: *Narrow Sample Channel Injectors for Capillary Electrophoresis on Microchips*. Analytical Chemistry, 73(11):2656–2662, 2001.
- [61] JACOBSON, S. C., R. HERGENRÖDER, L. B. KOUTNY, R. J. WARMACK und J. M. RAMSEY: *Effects of Injection Schemes and Column Geometry on the Performance of Microchip Electrophoresis Devices*. Analytical Chemistry, 66:1107–1113, 1994.
- [62] SEILER, K., Z. FAN, K. FLURI und D. J. HARRISON: *Electroosmotic Pumping and Valveless Control of Fluid Flow within a Manifold of Capillaries on a Glass Chip*. Analytical Chemistry, 66:3485–3491, 1994.
- [63] JACOBSON, S. C., L. B. KOUTNY, R. HERGENRÖDER, A. W. MOORE und J. M. RAMSEY: *Microchip Capillary Electrophoresis with an Integrated Postcolumn Reactor*. Analytical Chemistry, 66:3472–3476, 1994.
- [64] EFFENHAUSER, C. S., A. MANZ und H. M. WIDMER: *Glass Chips for High-Speed Capillary Electrophoresis Separations with Submicrometer Plate Heights*. Analytical Chemistry, 65:2637–2642, 1993.

-
- [65] JACOBSON, S. C., R. HERGENRÖDER, A. W. MOORE und J. M. RAMSEY: *Pre-column Reactions with Electrophoretic Analysis Integrated on a Microchip*. Analytical Chemistry, 66:4127–4132, 1994.
- [66] KUHN, R. und S. HOFFSTETTER-KUHN: *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*. Springer Verlag, 1993.
- [67] NEUMANN, E., S. KAKORIN und K. TÖNSING: *Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes*. Bioelectrochem. Bioenerg., 48:3–16, 1999.
- [68] FELGNER, P. L., T. R. GADEK, M. HOLM, R. ROMAN, H. W. CHAN, M. WENZ, J. P. NORTHROP, G. M. RINGOLD und M. DANIELSEN: *Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7413–7417, 1987.
- [69] PARKER, A. L., C. NEWMAN, S. BRIGGS, L. SEYMOUR und P. J. SHERIDAN: *Nonviral gene delivery: techniques and implications for molecular medicine*. Expert Reviews in Molecular Medicine, 5(22):1–15, 2003.
- [70] LAKOWICZ, J. R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Kluwer Academic/Plenum Publisher, 2nd Auflage, 1999.
- [71] WINTER, R. und F. NOLL: *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Teubner Studienbücher Chemie, 1998.
- [72] ALONSO, M. und E. J. FINN: *Physik 3 - Quantenphysik und statistische Physik*. Inter European Editions, 1974.
- [73] ASHKIN, A.: *Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers*. Journal (Full), 1997.
- [74] SVOBODA, K. und S. M. BLOCK: *Biological Applications of Optical Forces*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 23:247–285, 1994.
- [75] XIA, Y. und G. M. WHITESIDES: *Softlithographie*. Angewandte Chemie, 110:568–594, 1998.
- [76] AEBI, U. und T. D. POLLARD: *A Glow Discharge Unit to Render Electron Microscope Grids and Other Surfaces Hydrophilic*. Journal of Electron Microscopy Technique, 7:29–33, 1987.

- [77] SISCHKA, A.: *Kraftspektroskopie und Einzelmoleküldetektion mit der Optischen Pinzette*. Thesis/Dissertation, 2006.
- [78] SISCHKA, A., R. ECKEL, K. TÖNSING, R. ROS und D. ANSELMETTI: *Compact microscope-based optical tweezers system for molecular manipulation*. Review of Scientific Instruments, 74(11):4827–4831, 2003.
- [79] FUJII, T.: *PDMS-Based microfluidic devices for biomedical applications*. Micro-electronic Engineering, 61-62:907–914, 2002.
- [80] NG, J. M. K., I. GITLIN, A. D. STROOCK und G. M. WHITESIDES: *Components for integrated poly(dimethylsiloxane) microfluidic systems*. Electrophoresis, 23:3461–3473, 2002.
- [81] LINDER, V., E. VERPOORTE, W. THORMANN, N. F. D. ROOIJ und H. SIGRIST: *Surface Biopassivation of Replicated Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Channels and Applications to Heterogeneous Immunoreaction with On-Chip Fluorescence Detection*. Analytical Chemistry, 73(17):4181–4189, 2001.
- [82] MAKAMBA, H., J. H. KIM, K. LIM, N. PARK und J. H. HAHN: *Surface modification of poly(dimethylsiloxane) microchannels*. Electrophoresis, 24:3607–3619, 2003.
- [83] MRKSICH, M. und G. M. WHITESIDES: *Using Self-Assembled Monolayers to understand the Interactions of man-made Surfaces with Proteins and Cells*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 25:55–78, 1996.
- [84] EFIMENKO, K., W. E. WALLACE und J. GENZER: *Surface Modification of Sylgard-184 Poly(dimethyl siloxane) Networks by Ultraviolet and Ultraviolet/Ozone Treatment*. Journal of Colloid and Interface Science, 254:306–315, 2003.
- [85] YE, H., Z. GU und D. H. GRACIAS: *Kinetics of Ultraviolet and Plasma Surface Modification of Poly(dimethylsiloxane) Probed by Sum Frequency Vibrational Spectroscopy*. Langmuir, 22(4):1863–1868, 2006.
- [86] HILLBORG, H., N. TOMCZAK, A. OLÀH, H. SCHÖNHERR und G. J. VANCISO: *Nanoscale Hydrophobic Recovery: A Chemical Force Microscopy Study of UV/Ozone-Treated Cross-Linked Poly(dimethylsiloxane)*. Langmuir, 20(3):785–794, 2004.

-
- [87] HILLBORG, H., J. F. ANKNER, U. W. GEDDE, G. D. SMITH, H. K. YASUDA und K. WIKSTRÖM: *Crosslinked polydimethylsiloxane exposed to oxygen plasma studied by neutron reflectometry and other surface specific techniques*. Polymer, 41(18):6851–6863, 2000.
- [88] KIM, J., M. K. CHAUDHURY und M. J. OWEN: *Hydrophobic Recovery of Polydimethylsiloxane Elastomer Exposed to Partial Electrical Discharge*. Journal of Colloid and Interface Science, 226:231–236, 2000.
- [89] OWEN, M. J. und P. J. SMITH: *Plasma treatment of polydimethylsiloxane*. Journal of Adhesion Science and Technology, 8(10):1063–1075, 1994.
- [90] DONZEL, C., M. GEISSLER, A. BERNARD, H. WOLF, B. MICHEL, J. HILBORN und E. DELAMARCHE: *Hydrophilic Poly(dimethylsiloxane) Stamps for Microcontact Printing*. Advanced Materials, 13(15):1164–1167, 2001.
- [91] PROPERT, S.: *Untersuchung einer an der Universität Bielefeld eingesetzten Plasmareaktionszelle für die nanophysikalische Anwendung*. Report, 2005.
- [92] DUFFY, D. C., J. C. McDONALD, O. J. A. SCHUELLER und G. M. WHITESIDES: *Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane)*. Analytical Chemistry, 70:4974–4984, 1998.
- [93] REN, X., M. BACHMAN, C. SIMS, G. P. LI und N. ALLBRITTON: *Electroosmotic properties of microfluidic channels composed of poly(dimethylsiloxane)*. Journal of Chromatography B, 762:117–125, 2001.
- [94] MORRA, M., E. OCCHIELLO, R. MAROLA, F. GARBASSI, P. HUMPHREY und D. JOHNSON: *On the Aging of Oxygen Plasma-Treated Polydimethylsiloxane Surfaces*. Journal of Colloid and Interface Science, 137(1):11–24, 1990.
- [95] DELAMARCHE, E., A. BERNARD, H. SCHMID, A. BIETSCH, B. MICHEL und H. BIEBUYCK: *Microfluidic Networks for Chemical Patterning of Substrates: Design and Application to Bioassays*. Journal of American Chemical Society, 120:500–508, 1998.
- [96] LEE, G.-B., C.-H. LIN, K.-H. LEE und Y.-F. LIN: *On the surface modification of microchannels for microcapillary electrophoresis chips*. Electrophoresis, 26:4616–4624, 2005.

- [97] WHEELER, A. R., G. TRAPP, O. TRAPP und R. N. ZARE: *Electroosmotic flow in a poly(dimethylsiloxane) channel does not depend on percent curing agent*. Electrophoresis, 25:1120–1124, 2004.
- [98] DOHERTY, E. A. S., R. J. MEAGHER, M. N. ALBARGHOUTH und A. E. BARRON: *Microchannel wall coatings for protein separations by capillary and chip electrophoresis*. Electrophoresis, 24:34–54, 2003.
- [99] MATHUR, S. und B. M. MOUDGIL: *Adsorption Mechanism(s) of Poly(Ethylene Oxide) on Oxide Surfaces*. Journal of Colloid and Interface Science, 196:92–98, 1997.
- [100] PAPRA, A., A. BERNARD, D. JUNCKER, N. B. LARSEN, B. MICHEL und E. DELAMARCHE: *Microfluidic Networks Made of Poly(dimethylsiloxane), Si, and Au Coated with Polyethylene Glycol for Patterning Proteins onto Surfaces*. Langmuir, 17:4090–4095, 2001.
- [101] DELAMARCHE, E., C. DONZEL, F. S. KAMOUNAH, H. WOLF, M. GEISLER, R. STUTZ, P. SCHMIDT-WINKLER, B. MICHEL, H. J. MATHIEU und K. SCHAUMBURG: *Microcontact Printing Using Poly(dimethylsiloxane) Stamps Hydrophilized by Poly(ethylene oxide) Silanes*. Langmuir, 19(21):8749–8758, 2003.
- [102] DIAZ-QUIJADA, G. A. und D. D. M. WAYNER: *A Simple Approach to Micropatterning and Surface Modification of Poly(dimethylsiloxane)*. Langmuir, 20(22):9607–9611, 2004.
- [103] BARNES, T. J. und C. A. PRESTIDGE: *PEO-PPO-PEO Block Copolymers at the Emulsion Droplet- Water Interface*. Langmuir, 16(9):4116–4121, 2000.
- [104] SHAR, J. A., T. M. OBEY und T. COSGROVE: *Adsorption studies of polyethers- Part1. Adsorption onto hydrophobic surfaces*. Colloids And Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 136:21–33, 1998.
- [105] SCHRÖEN, C. G. P. H., M. A. COHEN STUART, K. VAN DER VOORT MAARSCHALK, A. VAN DER PADT und K. VAN'T RIET: *Influence of Preadsorbed Block Copolymers on Protein Adsorption: Surface Properties, Layer Thickness, and Surface Coverage*. Langmuir, 11(8):3068–3074, 1995.
- [106] HU, S., X. REN, M. BACHMAN, C. SIMS, G. P. LI und N. ALLBRITTON: *Surface-Directed, Graft Polymerization within Microfluidic Channels*. Analytical Chemistry, 76(7):1865–1870, 2004.

-
- [107] WILHELM, S.: *Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie: Grundlagen*. Mikroskopie von Carl Zeiss, 1998.
- [108] JIANG, G., S. ATTIYA, G. OCVIRK, W. E. LEE und D. J. HARRISON: *Red diode laser induced fluorescence detection with a confocal microscope on a microchip for capillary electrophoresis*. *Biosensors & Bioelectronics*, 14:861–869, 2000.
- [109] JOHNSON-WHITE, B. und J. GOLDEN: *Reduction of background signal in automated array biosensors*. *Measurement Science and Technology*, 16(9):N29–N31, 2005.
- [110] OLÀH, A., H. HILLBORG und G. J. VANCISO: *Hydrophobic recovery of UV/ozone treated poly(dimethylsiloxane): adhesion studies by contact mechanics and mechanism of surface modification*. *Applied Surface Science*, 239:410–423, 2005.
- [111] HU, S., X. REN, M. BACHMAN, C. E. SIMS, G. P. LI und N. ALLBRITTON: *Cross-linked coatings for electrophoretic separations in poly(dimethylsiloxane) microchannels*. *Electrophoresis*, 24:3679–3688, 2003.
- [112] TOWNS, J. K. und F. E. REGNIER: *Impact of Polycation Adsorption on Efficiency and Electroosmotically Driven Transport in Capillary Electrophoresis*. *Analytical Chemistry*, 64(21):2473–2478, 1992.
- [113] SCHULZE, P., M. LUDWIG, F. KOHLER und D. BELDER: *Deep UV Laser-Induced Fluorescence Detection of Unlabeled Drugs and Proteins in Microchip Electrophoresis*. *Analytical Chemistry*, 77(5):1325–1329, 2005.
- [114] XIAO, D., T. VAN LE und M. J. WIRTH: *Surface Modification of the Channels of Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Chips with Polyacrylamide for Fast Electrophoretic Separations of Proteins*. *Analytical Chemistry*, 76(7):2055–2061, 2004.
- [115] FIGEYS, D. und D. PINTO: *Proteomics on a chip: Promising developments*. *Electrophoresis*, 22:208–216, 2001.
- [116] ANDERSON, J. R. und A. VAN DEN BERG: *Microtechnologies and nanotechnologies for single-cell analysis*. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(1):44–49, 2004.
- [117] MENESES-ACOSTA, A., R. Z. MENDONCA, H. MERCHANT, L. COVARRUBIAS und O. T. RAMIREZ: *Comparative Characterization of Cell Death between Sf9 Insect Cells and Hybridoma Cultures*. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(4):441–457, 2001.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während dieser Zeit begleitet und unterstützt haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit in seiner Abteilung durchführen zu können. Ich danke ihm für sein erneut entgegengebrachtes Vertrauen, seine inspirierende Begeisterungsfähigkeit und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Markus Sauer danke ich für seine freundliche Bereitschaft das Zweitgutachten zu erstellen.

Insbesondere möchte ich mich bei Frau Dr. Alexandra Ros für die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Durch ihre wertvollen Ratschläge, ihre hilfreichen Impulse sowie ihre Diskussionsbereitschaft hat sie wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenfalls gilt mein Dank Priv. Doz. Dr. Robert Ros für die Einführung in die Rasterkraftmikroskopie, den praktischen Tipps und die wissenschaftliche Diskussion zu dieser Arbeit.

Zu Dank bin ich auch gegenüber Frau Dr. Katja Tönsing verpflichtet, die mich in die praktische Chemie einführte und unermüdlich Fragen zu diesem Thema beantwortete.

Ein ganz besonderer Dank geht an Jan Regtmeier, der mich tatkräftig bei dieser Arbeit unterstützt hat. Sei es als SHK bei den Arbeiten zur Oberflächenbeschichtung, als unterhaltender Labor- und Bürokollege, als nachfolgender Finnbahn-Trainer, als Korrekturleser oder einfach nur als Freund.

Bei Herrn Christoph Pelargus bedanke ich mich für die Unterstützung hinsichtlich des experimentellen Aufbaus sowie für die Hilfe bei technischen Fragen.

Meinem Nachfolger Dominik Greif wünsche ich viel Erfolg bei der Fortführung des Projekts und bedanke mich für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Andy Sischka für die Einführung in die optische Pinzette und die Hilfe bei den Messungen.

Sven Proppert danke ich für die Arbeiten zur Charakterisierung der Plasmaanlage, die

er im Rahmen seiner Studienarbeit in unserer Abteilung durchgeführt hat.

Bei Herrn Dr. Rainer Eckel möchte ich mich für seine geduldige Hilfe bei chemischen Fragen, für das Korrekturlesen und für die sonnigen Tage im Büro bedanken.

Vielen Dank auch an Gabi Krome für die Hilfe bei bürokratischen Problemen und die aufmunternden Worte.

Ein herzliches Dankeschön an alle Mitglieder der Abteilung *Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaft* für die angenehme und lockere Arbeitsatmosphäre, für die spaßigen Ausflüge (Kanufahrten, Kegeln, Bremen, etc.), die leckeren Grillabende und manches Feierabendbier in lustiger Runde.

Herrn Prof. Dr. Karsten Niehaus danke ich für die zur Verfügung gestellten Sf9-Insektenzellen und die gute Zusammenarbeit mit seiner Abteilung *Proteom- und Metabolomforschung*. Speziell gilt dabei Nickels Jensen mein Dank, der die Zellen präpariert hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Heinzmann bedanke ich mich für die Möglichkeit, das Goniometer in seiner Abteilung *Molekül- und Oberflächenphysik* für die Oberflächencharakterisierung benutzen zu können. Insbesondere danke ich Dr. Armin Brechling für die gute Einführung in die Messmethode, sowie die anfängliche Unterstützung bei den Messungen.

Bei der Mechanik- und Elektronik-Werkstatt bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit.

Meinen Freunden, speziell Claudia Fischer und Eva Schwenzfeier-Hellkamp, danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit, für die moralische Unterstützung und die Ablenkung vom Uni-Alltag.

Ein ganz besonderer Dank geht an Thanh Tu, der mir in dieser für uns beiden stressigen und schwierigen Zeit zur Seite gestanden hat, meine Launen mit Geduld ertragen hat, mich tatkräftig unterstützt hat und mich einfach so lieb hat, wie ich bin.

Meinem Großvater gedenke ich in Ehren für seine Zuversicht und seinen festen Glauben in die Arbeit seiner Enkeltochter.

Zuguterletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die etliche Höhen und Tiefen während der gesamten Studienzzeit mit mir durchlebt haben. Mit ihrer liebevollen Unterstützung und steten Aufmunterung haben sie mir das Studium ermöglicht und mich in meinem Weg bestärkt.