

Die miniaturisierte Free-Flow Elektrophorese – Herstellung, Anwendung und Optimierung

Dissertationsschrift

zur Erlangung des Doktorgrades der Ingenieurwissenschaften
der Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik
der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Marco Becker

aus Dortmund

Tag der mündlichen Prüfung: 22. März 2010

Hauptreferent: Prof. Dr. A. Neyer

Korreferent: PD Dr. J. Franzke

Danksagung

Diese Arbeit wäre niemals ohne die Unterstützung und Hilfe von vielen Menschen möglich gewesen. Diesen Menschen möchte ich an dieser Stelle Danken.

Prof. Andreas Neyer danke ich für die kurzfristige Übernahme der Erstgutachtertätigkeit.

Mein Dank gilt PD Dr. Joachim Franzke, der mir es ermöglichte, dieses Thema bearbeiten zu dürfen. Danke auch für die Ratschläge, Diskussionen, Antworten und Anregungen. Sie haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Dr. Dirk Janasek möchte ich mich für die Betreuung während meiner Arbeit bedanken. Ohne die Diskussionen, Anregungen und Ideen wären etliche Ergebnisse nicht zustande gekommen. Als mein „Chemischer Fachberater“ war er außerdem mein erster Ansprechpartner bei chemischen Fragen oder Problemen.

Bedanken möchte ich mich natürlich auch bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Miniaturisierung am ISAS:

Uli Marggraf für die Umsetzung meiner mikrosystemtechnischen Träume. Ohne seine Hilfe wäre sowohl die Chipproduktion als auch die Weiterentwicklung der Chipherstellung nicht möglich gewesen. Danke dass du mich an deinem MST-Wissen hast teilhaben lassen! Und natürlich Danke für die vielen Stunden, die du für mich in Reinraum verbracht hast.

Danke an meine ehemaligen Büromitbewohner Antje Michels und Sven Tombrink. Neben den vielen Gesprächen, Diskussionen und Ideen danke ich euch auch für die hervorragende Büro-Atmosphäre. Es war mir eine Ehre....

Cornelia Beilein für die für die Zeit, Energie und Nerven, die Sie in unsere Experimente gesteckt hat. Und auch für die Zeit, Energie und Nerven, die Sie abseits des ISAS aufgebracht hat, um mein Leben zu bereichern.

Danke auch an die restlichen Miniaturisierer: Magnus, Norman, Ann-Kathrin, Kaoru, Claus, Bogdan, JP, Johnny, Helke, Ying, Peter, Michael, Rafael, Sarah, Heike, Marion, Saskia und Cordula. Die Zusammenarbeit mit euch hat mir sehr viel Spaß gemacht.

Hendrik Kortmann danke ich für die Zusammenarbeit im Bereich der Thermometrie, aber auch für die legendären Doktorandenfrühstücke und alles andere, was nicht mit unserer Arbeit zu tun hatte...

Dr. Peter Lampen danke ich für die Erstellung des MATLAB-Programms zur Bilddivision.

Dr. Volker Deckert und Dr. Christian Budich danke ich stellvertretend für die ehemalige Raman-Gruppe des ISAS. Die Zusammenarbeit mit euch hat nicht nur mein Wissen über Spektroskopie erweitert sondern auch viel Spaß gemacht.

Stellvertretend für die Mitarbeiter der Werkstatt des ISAS danke ich Hans-Georg Krebs und Jürgen Lonzynski. Ihr Ideenreichtum und die Qualität der Arbeiten haben einige Experimente erst möglich gemacht.

Auch dem EDV-Team des ISAS bin ich zu Dank verpflichtet. Dafür, dass Sie auf alle meine EDV-Probleme eine Lösung parat hatten, für die unbürokratische und schnelle Hilfe und die Geduld, die Sie mit mir hatten. Insbesondere Jens Hinrichs und Markus Schubert danke ich stellvertretend.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester, das Sie mir ermöglicht haben, diesen Weg zu gehen. Dafür, dass Sie immer an mich geglaubt und mir Rückhalt gegeben haben. Vielen Dank!

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	iv
1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	7
2.1 Miniaturisierung von analytischen Systemen	7
2.2 Grundlagen der Free-Flow Elektrophorese	10
2.2.1 Funktionsweise der Free-Flow Elektrophorese	10
2.2.1.1 Einkopplung des elektrischen Feldes in μ FFE-Chips	13
2.2.2 Trennmodi in der miniaturisierten Free-Flow Elektrophorese	18
2.2.2.1 Free-Flow Zonenelektrophorese (FF-ZE)	18
2.2.2.2 Free-Flow Isoelektrisches Fokussieren (FF-IEF)	22
2.2.2.3 Free-Flow Isotachophorese (FF-ITP)	26
2.2.2.4 Free-Flow Temperature Gradient Focusing (FF-TGF)	29
2.3 Simulation mit SolidWorks Flow Simulation	31
3 μFFE-Chips – Herstellung und Betrieb	37
3.1 Herstellung von μ FFE-Chips	37
3.1.1 Erste Generation von μ FFE-Chips	37
3.1.1.1 Glasstrukturierung der ersten μ FFE-Chipgeneration	40
3.1.1.2 PDMS-Strukturierung der ersten μ FFE-Chipgeneration	47
3.1.2 Zweite Generation von μ FFE-Chips	54
3.1.2.1 Zwei-Tiefen-Strukturierung von Glas	57
3.1.2.2 Zwei-Tiefen-Strukturierung von PDMS	63
3.2 Flüssigkeitsdichte Verbindung	69
3.2.1 Plasma-Bonden	69
3.2.2 Hochtemperaturbonden	71
3.2.3 Kleben	72

3.3	Chipbetrieb.....	78
3.3.1	World-to-Chip Verbindungen	78
3.3.2	Gasfreies befüllen des μ FFE-Chips.....	81
3.3.3	Betrieb der ersten μ FFE-Chipgeneration.....	82
3.3.4	Betrieb der zweiten μ FFE-Chipgeneration	84
4	Temperature Gradient Focusing in μFFE-Chips.....	91
4.1	Temperature Gradient Focusing – Einleitung und Theorie	91
4.2	Experimenteller Aufbau – Temperature Gradient Focusing	97
4.3	TGF-Chipdesigns und Materialkombinationen.....	100
4.3.1	Materialkombinationen.....	100
4.3.2	Chipdesigns und Simulation.....	102
4.4	Vorexperimente TGF	110
4.4.1	Aufheiz-/Abkühlverhalten des TGF Aufbau	110
4.4.2	Einfluss der Temperatur auf einen Probenstrom in der Kammer.....	112
4.4.3	Temperaturabhängigkeit von Farbstoffen	114
4.5	Experimentelle Bestimmung des Temperaturgradienten mittels Thermometrie...	116
4.5.1	Kalibrierung der thermometrischen Messung	116
4.5.2	Thermometrische Messung des Temperaturgradienten in der Kammer.....	120
4.6	Stabilität des Temperaturgradienten in Abhängigkeit von der Flussrate	122
4.7	Trennung und Fokussierung von Farbstoffen	124
4.8	Fokussierung von Proteinen	126
4.9	Trennung und Fokussierung eines Proteingemisches	131
4.10	FF-TGF - Zusammenfassung und Ausblick.....	133
5	Markerfreie Detektion in μFFE-Systemen durch SERS	135
5.1	Raman Grundlagen.....	137
5.2	Chipdesign und experimenteller Aufbau.....	142
5.3	SERS - Vorexperimente.....	144
5.3.1	Ablenkung der Kolloide im elektrischen Feld	144
5.3.2	Bestimmung der optimalen Kolloidgröße.....	146
5.4	Fokussierung von Myoglobin: Erstes Experiment	148
5.5	Anpassungen im experimentellen Aufbau	152
5.6	Fokussierung von Myoglobin: Zweites Experiment	154

5.7	Verhalten der Kolloide im Chip.....	158
5.8	Optimierungsmöglichkeiten.....	161
5.9	μ FFE-SERS – Zusammenfassung und Ausblick.....	163
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	165
	Literaturverzeichnis.....	170
	Anhang A.....	180

Abkürzungsverzeichnis

α	Polarisierbarkeit
α_{AF45}	Wärmeausdehnungskoeffizient von AF45-Glas
α_{D263T}	Wärmeausdehnungskoeffizient von D263T-Glas
α_0	statisches Dipolmoment
α_{SL}	Wärmeausdehnungskoeffizient von Soda-Lime-Glas
β	Änderung der Polarisierbarkeit eines Moleküls in Abhängigkeit von der Schwingung
b_K	Kanalbreite
b_{Maske}	Kanalbreite auf der Photomaske
c	Konzentration
c_A	Analytkonzentration
CAD	Computer Aided Design
CCD	Charge-coupled Device
CE	Capillary Electrophoresis, Kapillarelektrophorese
CFD	Computational Fluid Dynamics, Numerische Strömungsmechanik
c_{LE}	Konzentration des Leading Electrolyte
d	Distanz
D	Diffusionskoeffizient
Δp	Druckdifferenz zwischen Kanaleingang und Kanalausgang
ΔpH	Differenz zwischen höchstem und niedrigstem pH-Wert in einem pH-Gradienten
$\Delta(pI)_{min}$	minimale Differenz zwischen zwei isoelektrischen Punkten
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	elektrisches Feld
\vec{E}	elektromagnetisches Feld

E_0	temperaturunabhängiges elektrisches Feld
\vec{E}_0	Amplitude einer elektromagnetischen Schwingung
EOF	Elektroosmotischer Fluss
η	Viskosität
$\eta(T)$	temperaturabhängige Viskosität
$\eta(20)$	Viskosität bei 20 °C
$E_{\text{verstärkt}}$	verstärkendes elektromagnetisches Feld
f	Frequenz
$f_{\text{EP}}(T)$	temperaturabhängige Vorgänge, die die elektrophoretische Mobilität beeinflussen
FFE	Free-Flow Elektrophorese
FF-IEF	Free-Flow Isoelektrisches Fokussieren
FF-ITP	Free-Flow Isotachophorese
FF-TGF	Free-Flow Temperature Gradient Focusing
FF-ZE	Free-Flow Zonenelektrophorese
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
$f(T)$	temperaturabhängige Vorgänge, die die elektrische Leitfähigkeit beeinflussen
f_v	Frequenz einer Normal-Mode
h	Höhe der Trennkammer
HMDS	Hexamethyldisilazan
I	elektrische Stromstärke
IEF	Isoelektrisches Fokussieren
ITP	Isotachophorese
J	Stromdichte
l	Länge

λ	Wärmeleitfähigkeit
LE	Leading Electrolyte, Leitelektrolyt
MS	Massenspektrometer
μ	Mobilität
μ_A	Mobilität des Analyten
μ_{EP}	elektrophoretische Mobilität
μ_{FFE}	miniaturisierte Free-Flow Elektrophorese
μ_G	Mobilität des Gegenions
μ_{LE}	Mobilität des Leading Electrolyte
μ_{EP}^0	elektrophoretische Mobilität bei 20 °C
μ_{TAS}	micro Total Analysis System, Mikrototalanalysensystem
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEB	Post Exposure Bake
pI	isoelektrischer Punkt
$\vec{\varphi}$	Dipolmoment
q	elektrische Ladung
r	Radius
R	elektrischer Widerstand
Re	Reynoldszahl
REM	Rasterelektronenmikroskop
ρ	spezifischer elektrischer Widerstand
ρ_D	Dichte
SERS	Surface Enhanced Raman Spectroscopy, oberflächenverstärkte Raman-Streuung
σ	elektrische Leitfähigkeit
σ_0	elektrische Leitfähigkeit bei 20 °C

σ_{Peak}	Standardabweichung der Peakbreite
$\sigma_{Diff.}^2$	Varianz der Bandenverbreiterung durch Diffusion
σ_{EOF}^2	Varianz der Bandenverbreiterung aufgrund des EOF
$\sigma_{Ges.}^2$	Gesamtvarianz
$\sigma_{hydro.}^2$	Varianz der hydrodynamisch bedingten Bandenverbreiterung
$\sigma_{Inj.}^2$	Varianz der Bandenverbreiterung in Abhängigkeit von der Breite des Probenstroms
σ_{Joule}^2	Varianz der Bandenverbreiterung durch Joulesche Wärme
$\sigma_{Leitf.}^2$	Varianz der Bandenverbreiterung durch Leitfähigkeitsunterschiede
SPR	Surface Plasmon Resonance, Oberflächenplasmonenresonanz
t	Zeit
TE	Terminating Electrolyte, Endelektrolyt
TGF	Temperature Gradient Focusing
t_K	Kanaltiefe
U	elektrische Spannung
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v	Geschwindigkeit
\dot{V}	Volumenstrom
v_{EP}	elektrophoretische Geschwindigkeit
V_{eff}	effektive Spannung
v_{EOF}	Geschwindigkeit des Elektroosmotischen Flusses
v_{total}	Gesamtgeschwindigkeit
w	Breite des Probenstroms
W	Arbeit

1 Einleitung

In den letzten Jahren haben die so genannten „Life-Sciences“ sehr stark an Bedeutung gewonnen [1]. Ein Grund hierfür ist der Drang des Menschen, länger zu leben oder bisher unheilbare Krankheiten durch Entdeckung des richtigen Medikamentes oder der richtigen Therapie heilen zu können. Bevor allerdings solche Therapien entwickelt werden können, sind Kenntnisse über den menschlichen Körper und die in ihm ablaufenden Prozesse nötig. Erst das komplette Verständnis dieser komplexen Interaktionen im menschlichen Organismus ermöglicht es, Ansatzpunkte für Medikamente oder Therapien zu finden. Im Rahmen dieser Forschung kommt der Trennung und Konzentrierung von biologischen Stoffen eine besondere Bedeutung zu. Durch diese Techniken ist es möglich, einzelne Proben zu sammeln und isoliert zu betrachten.

In den letzten Jahrzehnten haben sich neben den thermischen Trennverfahren [2] (zum Beispiel durch Destillation oder Kristallisation) und den mechanischen Trennverfahren [2] (zum Beispiel durch Zentrifugation oder Sieben) auch die elektrophoretischen Trennverfahren etabliert. Als Beispiele seien hier die Gel-Elektrophorese [3-8] oder das isoelektrische Fokussieren [9-15] erwähnt. Im Jahre 1950 wurde eine weitere elektrophoretische Trenntechnik erstmals vorgestellt: die trägerfreie, kontinuierliche Elektrophorese [16], heute auch bekannt unter dem Namen Free-Flow Elektrophorese (FFE). Grassmann und Hannig präsentierten damals eine Apparatur zur kontinuierlichen Trennung von geladenen Teilchen. Hauptbestandteil dieser Apparatur war eine Kammer, die mit einem porösen Medium gefüllt war. Das zu trennende Gemisch lief langsam durch das poröse Medium. Ein quer zur Strömungsrichtung angelegtes elektrisches Feld sorgte dafür, dass die geladenen Teilchen je nach Ladung abgelenkt wurden und somit an verschiedenen Stellen die Kammer verließen. 1960 wurde diese Methode von Hannig dahingehend optimiert, dass auf das poröse Medium als Trägermaterial verzichtet und dafür die Trennung in homogener Lösung durchgeführt wurde [17]. Die Trennkammer bestand aus zwei aufeinanderliegenden Glasplatten (jeweils 50x50 cm). Zwischen den Platten befand sich ein 0,5 bis 1 mm dicker, U-förmiger Filterpapierstreifen, der zwischen den Glasplatten ein Trennvolumen erzeugte. Neben Farbstoffen wurden auch

Aminosäuren, Abbaupeptide und Serum getrennt [17]. Seitdem wurde die Free-Flow Elektrophorese ständig weiterentwickelt und zur Trennung verschiedenster Proben benutzt. So wurden Proteine [18, 19], DNA [20], Zellen [21], Zellbestandteile [22] und Nanopartikel [23] mit Hilfe der Free-Flow Elektrophorese kontinuierlich getrennt. Heutzutage werden kommerzielle Geräte von der Firma BD Diagnostics hergestellt und vertrieben. Auch im Weltraum wurden bereits FFE-Trennungen durchgeführt. Während des Space Shuttle-Fluges STS-47 im September 1992 wurden im SpaceLab-Japan mit Hilfe der Free-Flow Elektrophorese Zellen in der Mikrogravitations-Umgebung getrennt [24, 25]. Stehen allerdings nur kleine Probenmengen zur Verfügung, so wird einer der großen Nachteile der von Hannig präsentierten trägerfreien, kontinuierlichen Elektrophorese sichtbar: der große Bedarf und Verbrauch von Puffer- und Probenlösung. So werden für die Auftrennung von Serumproteinen aus 100 ml Serum etwa 2,5 Liter Pufferlösung benötigt [20].

Mikrofluidische Systeme, deren Entwicklung Anfang der 1990iger Jahre begann [26-30], erlaubten es, auch geringe Probenmengen zu trennen. Außerdem besitzt die Miniaturisierung von analytischen Methoden weitere Vorteile im Vergleich zu konventionellen Methoden [31].

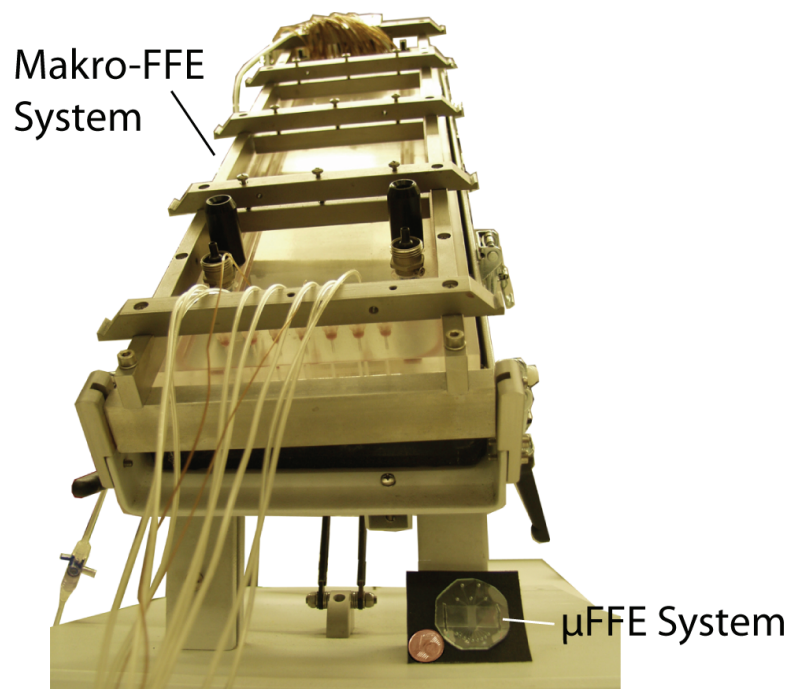


Abbildung 1.1: Vergleich zwischen einem Mikro- und einem Makro Free-Flow Elektrophorese System. Zum Größenvergleich befindet sich links neben dem µFFE-System ein 1 Cent-Stück.

Verringert man die Größe eines Systems in allen drei Raumdimensionen um den Faktor zehn, so verringert man zum Beispiel das Volumen um den Faktor 1000. Dadurch wird der Puffer- und Probenverbrauch deutlich reduziert. Auch die Geschwindigkeit der Trennung ändert sich mit einer Verkleinerung des Systems. Die Skalierungsgesetze sagen eine 100-fach schnellere Trennung bei einer 10-fachen linearen Verkleinerung des Systems voraus [32]. Weitere Vorteile der Miniaturisierung von analytischen Systemen werden in Kapitel 2 beschrieben. Free-Flow Elektrophorese-Systeme könnten durch Miniaturisierung also auch mit einem geringeren Proben- und Pufferverbrauch realisiert werden. In Abbildung 1.1 ist der Größenvergleich zwischen einem Makro-FFE System und einem am ISAS – Institute for Analytical Sciences entwickelten miniaturisierten FFE System (μ FFE) dargestellt. 1994 wurde das erste μ FFE-System von Raymond *et al.* vorgestellt [33]. Die Strukturen waren in Silizium hergestellt worden. Die Trennkammer war 10 mm breit, 50 mm lang und 50 μ m tief, ihr Volumen war mit 2,5 ml etwa 100-mal kleiner als das Kammervolumen des ersten FFE-Systems von Hannig. Auch wurden nur Spannungen von maximal 50 Volt zum Betrieb des miniaturisierte Systems benötigt, während bei dem Gerät von Hannig mit Spannungen im Bereich von 1500 Volt gearbeitet wurde [20]. Mit dem μ FFE-System wurden erfolgreich fluoreszenzmarkierte Aminosäuren getrennt [33].

Seit Beginn des neuen Jahrtausends gelangt die miniaturisierte Free-Flow Elektrophorese immer mehr in den wissenschaftlichen Fokus, erkennbar an der steigenden Zahl der Publikationen (Abbildung 1.2).

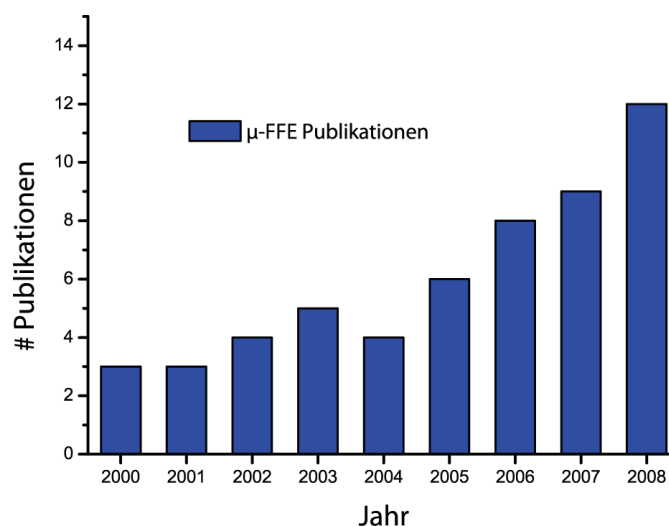


Abbildung 1.2: Anzahl der Publikation über μ FFE-Systeme (seit 2000).

War der erste μ FFE-Chip noch aus Silizium [33], so wurden in den letzten Jahren μ FFE-Systeme aus verschiedenen Materialien hergestellt. Dabei ist Glas aufgrund seiner chemischen Inertheit und mechanische Stabilität das am häufigsten für μ FFE-Systeme verwendete Material [34-38]. Auch wurden in den letzten Jahren verschiedene Betriebsmodi für die μ FFE entwickelt [38] oder aus anderen Gebieten der Analytik auf die miniaturisierte Free-Flow Elektrophorese übertragen [39].

Durch die intensive Forschung auf dem Gebiet der μ FFE wurde auch ihr Anwendungsspektrum erweitert. Inzwischen wurden in μ FFE-Systemen neben Zellenfragmenten [40], Aminosäuren [33, 41] und Farbstoffen [33-35, 41-46] auch Proteine [34, 39, 42, 46-49] getrennt und fokussiert. Auch sind die μ FFE-Systeme weiter verkleinert worden. Moderne μ FFE-Chips haben nur noch ein Trennbettvolumen von 200 nl [46]. Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren verschiedene Ansätze zur Einkopplung des elektrischen Feldes in den μ FFE-Chip entwickelt. Ein großes Problem bei der Einkopplung der Spannung ist das Auftreten von Elektrolyse an den Elektroden. Dabei wird Wasser in Wasserstoff und Sauerstoff gespalten und es bilden sich Gasblasen an den Elektroden. Gelangen diese Gasblasen in die Trennkammer, stören sie die Trennung beziehungsweise lassen sie unmöglich werden. Während beim ersten μ FFE-Chip von Raymond *et al.* [33] die Elektroden und die Trennkammer über flüssigkeitsgefüllte Seitenkanäle miteinander verbunden waren, wird seitdem die elektrische Verbindung zwischen Elektroden und Trennkammer auch durch ionendurchlässige Membrane [34, 45, 50, 51], tiefer geätzte Elektrodenkanäle [35, 52] oder durch Integration der Elektroden in die Trennkammer [40, 53] realisiert. Ein Großteil dieser Ansätze hat mit Gasblasen in der Trennkammer zu kämpfen. In den tiefen Elektrodenkanälen wird durch eine hohe Flussrate versucht, die Gasblasen aus dem Chip zu spülen [35, 52]. Die ionendurchlässigen Membranen halten zwar die Gasblasen von der Trennkammer fern, erlauben allerdings keine hohen Flussraten, da sonst die Membranen zerstört werden [34]. Bei der Integration von Elektroden in die Trennkammer wird durch elektrochemische Reaktionen versucht, die Gasblasen nach ihrem Entstehen in Flüssigkeit zu lösen. Das gelingt aber nur bedingt [53]. Durch die verschiedenen Ansätze zur Spannungseinkopplung und dem daraus entstehenden Chipdesign bewegt sich die Spannungseffizienz (Verhältnis zwischen der an die Elektroden angelegte Spannung und die tatsächlich in der Trennkammer wirkenden Spannung) der Systeme zwischen 4,5% [42] und 100% [40].

Die Detektion in miniaturisierten Free-Flow Elektrophorese Systemen erfolgt hauptsächlich durch Fluoreszenz [34, 35, 38, 39, 46, 54]. Die Proben werden dazu vor der Verwendung mit Fluoreszenzmarkern markiert und lassen sich dann im μ FFE-System durch Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge durch Fluoreszenz detektieren. Auch wurden Vorschläge gemacht, die μ FFE mit der Massenspektrometrie (MS) [41] oder dem Surface Plasmon Resonance (SPR)-Verfahren [38] als Detektionsmethode zu koppeln. Bis dato sind darüber aber keine Anwendungsergebnisse publiziert worden. Bei der nicht-miniaturisierten Free-Flow Elektrophorese wurde neben der Fluoreszenzdetektion auch die UV-Absorption zur Detektion innerhalb der Trennkammer verwendet [55, 56]. Allerdings ist dieser Detektionsansatz aufgrund der Größe der Detektoren nicht ohne weiteres auf die miniaturisierte Free-Flow Elektrophorese anwendbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die miniaturisierte Free-Flow Elektrophorese optimiert und für zukünftige Anwendungen weiterentwickelt.

Das zweite Kapitel der vorliegenden Arbeit befasst sich mit den Grundlagen der Miniaturisierung und den grundlegenden Prinzipien der (miniaturisierten) Free-Flow Elektrophorese. Des Weiteren werden die verschiedenen, bis zum heutigen Zeitpunkt bekannten Trennmodi für die μ FFE erläutert. Zusätzlich wird noch veranschaulicht, wie die in dieser Arbeit gezeigten Simulationen mit Hilfe der SolidWorks Flow Simulation Software erstellt wurden. Kapitel 3 erläutert detailliert die Herstellung und den Betrieb von μ FFE-Systemen. Hier werden auch die Optimierungen im Design- und Herstellungsprozess und im Betrieb der Chips dargestellt, die während dieser Arbeit gemacht worden sind. Die Entwicklung eines neuen Trennmodus für die μ FFE wird in Kapitel 4 beschrieben. Dazu wurde das Prinzip des Temperature Gradient Focusing aus der Kapillar-Elektrophorese (CE) [57] übernommen und für die μ FFE angepasst und optimiert. In Kapitel 5 wird die Entwicklung einer neuen Detektionsmethode für die μ FFE erläutert. Um eine markerfreie Detektion zu ermöglichen, wurde die spektroskopische Methode des Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) mit der miniaturisierten Free-Flow Elektrophorese kombiniert. Die Zusammenfassung der präsentierten Ergebnisse sowie ein Ausblick über zukünftige Anwendungsmöglichkeiten erfolgt im abschließenden Kapitel 6.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Miniaturisierung von analytischen Systemen

Alle in dieser Arbeit präsentierten Free-Flow Elektrophorese Systeme sind miniaturisierte Systeme. Diese Systeme besitzen Abmessungen im Bereich von einigen wenigen Mikrometern bis hin zu mehreren hundert Mikrometer [58, 59]. Es gibt auch miniaturisierte Systeme, deren Abmessungen im Nanometerbereich liegen, zum Beispiel in der Mikroelektronik [60-62]. In den letzten Jahren geht auch in der Analytik der Trend zu Nanometer-großen Systemen [63-66]. Die Herstellung solcher Systeme ist allerdings mit einem sehr hohen technologischen Aufwand verbunden. Heutzutage wird die Mikrosystemtechnik als Zukunftstechnologie angesehen und auch im Rahmen der Hightech-Strategie des Bundesministeriums für Bildung und Forschung entsprechend gefördert [67].

Die chemischen und physikalischen Grundgesetze haben sowohl in miniaturisierten Systemen als auch in makroskopischen Systemen ihre Gültigkeit. Allerdings bringt die Verkleinerung der Abmessungen einige Vorteile mit sich, die im Folgenden näher beschrieben werden. Diese Vorteile waren und sind die Hauptgründe für die Entwicklung und stetige Optimierung von miniaturisierten Systemen.

Verkleinert man die Kantenlänge eines Systems, so verkleinert man auch sein Volumen. Da das Volumen kubisch von der Kantenlänge abhängt, führt zum Beispiel eine zehnfache Reduzierung der Kantenlänge schon zu einer 1000-fachen Verkleinerung des Volumens. Dieses geringe Volumen ist für Anwendungen vorteilhaft, bei denen nur wenig Probenmaterial zu Verfügung steht. In makroskopischen Systemen ist außerdem das Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen sehr klein. Verkleinert man nun die Kantenlänge dieses System, so nimmt die Oberfläche quadratisch ab. Das Volumen jedoch hängt, wie bereits erwähnt, kubisch von der Kantenlänge ab und erfährt damit eine stärkere Abnahme. Das Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen ist im miniaturisierten System also deutlich größer als in einem makroskopischen System.

Da der Wärmetransport aber, unabhängig von der Größe des System, immer mit der gleichen Geschwindigkeit erfolgt, findet die Erwärmung oder die Abkühlung eines Volumens in einem Mikrosystem deutlich schneller statt als in einem nicht-miniaturisiertem System.

Der Stofftransport in analytischen Systemen kann auf verschiedenen Arten, wie zum Beispiel durch Über- [68-71] beziehungsweise Unterdruck [48, 72, 73] oder durch Elektroosmose [74-76], erfolgen. Zusätzlich zu diesem Stofftransport erfolgt durch die Diffusion noch ein thermisch bedingter Stofftransport, der zu einem Konzentrationsausgleich führt. Sie entsteht aufgrund der zufälligen Bewegung der einzelnen Teilchen (Brown'sche Molekularbewegung [77]) und nimmt mit steigender Temperatur zu. Die Diffusion erfolgt unabhängig von der Systemgröße und ist somit in miniaturisierten wie auch in nicht-miniaturisierten Systemen gleich. Da der Diffusionsweg in miniaturisierten Systemen kleiner ist, ist auch die Diffusionszeit kürzer. Dies führt zu einer schnelleren diffusiven Vermischung und einer kürzeren Reaktionszeit der Komponenten im Mikrosystem. Allerdings kann es dadurch auch zu einer raschen Verdünnung von Proben kommen.

Bei fluidischen Strömungen wird zwischen laminarer und turbulenter Strömung unterschieden. Während in turbulenten Strömungen Verwirbelungen auftreten, ist dies bei laminaren Strömungen nicht der Fall. Bei laminarer Strömung vermischen sich die Flüssigkeiten der einzelnen Ströme nicht und nur aufgrund von Diffusion kann es zu einer Vermischung kommen. Zur Beschreibung der Strömungsverhältnisse wird die Reynolds-Zahl Re verwendet:

$$Re = \frac{\rho_D v l}{\eta} \quad 2.1$$

ρ_D kennzeichnet die charakteristische Dichte der Flüssigkeit, v die Strömungsgeschwindigkeit des Fluides, l die Strömungslänge und η steht für die Viskosität des Fluids. Eine Reynoldszahl von $Re = 2300$ wird meist als kritische Reynolds-Zahl angenommen [78]. Oberhalb dieser Zahl liegen zunehmend turbulente Strömungen vor. In Mikrosystemen ergeben sich allerdings aufgrund der geringen Strömungslänge l sehr kleine Reynoldszahlen, die deutlich unter der kritischen Reynoldszahl liegen. Daher sind die fluidischen Strömungen in mikrofluidischen Systemen meistens laminar und damit berechenbar.

Durch die geringen Abmessungen in einem Mikrosystem kann man hohe elektrische Feldstärken durch Anlegen von geringen Spannungen erreichen. Wie bereits in Kapitel 1 beschrieben, benötigte Hannig in seinem makroskopischen Free-Flow Elektrophorese System 1500 Volt [20], während Raymond *et al.* in einem miniaturisiertem System mit 50 Volt erfolgreich Proben trennen konnten [33]. Durch die geringen Abmessungen der Mikrosysteme und dem daraus resultierenden geringen Platzbedarf lassen sich auch viele einzelne Systeme nebeneinander realisieren. So können auf engstem Raum chemische Reaktionen und Analysen parallel durchgeführt werden. Aufgrund ihrer geringen Abmessungen sind miniaturisierte Systeme außerdem einfach zu transportieren. Dadurch sind Messungen und Analysen direkt vor Ort, zum Beispiel am Patienten, möglich.

Im Vergleich zu makroskopischen Methoden ist die Detektion in miniaturisierten Systemen aufgrund der kleineren Abmessungen schwieriger. Die Detektionsmethoden müssen sehr sensitiv sein, da die Anzahl der Analytmoleküle aufgrund des geringeren Volumens in Mikrosystemen deutlich geringer ist. Heutzutage erfolgt die Detektion in miniaturisierten Systemen mit Hilfe von elektrochemischen [79, 80] und optischen Methoden [72, 81, 82] und der Massenspektrometrie [83, 84]. So wird auch die Detektion einzelner Moleküle und Zellen ermöglicht. Die Miniaturisierung erlaubt es auch, Mikrosysteme im Zellmaßstab herzustellen. Die Manipulation und Analyse von Zellen ist so nicht mehr nur auf Zellpopulationen beschränkt. Mit Hilfe der Miniaturisierung lassen sich einzelne Zellen fangen, verändern und untersuchen [58, 59, 85-87].

Die geringe Größe der Mikrosysteme erlaubt die Integration von Probenvorbereitung, Reaktion, Trennung und Detektion auf einem Mikrochip. Damit entstehen komplette miniaturisierte Analysesysteme auf kleinstem Raum. Dieses Konzept wird als „micro Total Analysis System“ (μ TAS) oder auch als „Lab on a Chip“ Konzept bezeichnet. Die Entwicklung dieser Labore im Westentaschenformat schreitet kontinuierlich voran. Mittlerweile sind solche Systeme, zum Beispiel von Agilent Technologies, Evotec Technologies oder Caliper Life Sciences, auch kommerziell erhältlich.

2.2 Grundlagen der Free-Flow Elektrophorese

Im Folgenden werden die Free-Flow Elektrophorese (FFE) und ihre Grundlagen näher erläutert. Dazu wird in Abschnitt 2.2.1 auf das grundlegende Prinzip der FFE eingegangen. Außerdem werden die verschiedenen Ansätze zur Lösung des Elektrolyse-Problems in miniaturisierten FFE-Chips beschrieben. Abschnitt 2.2.2 stellt dann kurz die bisher bekannten, verschiedenen Trennmodi der miniaturisierten Free-Flow Elektrophorese vor.

2.2.1 Funktionsweise der Free-Flow Elektrophorese

Die Free-Flow Elektrophorese ohne Trägermaterial wurde erstmalig 1960 von Hannig beschrieben [17] (vergl. Kapitel 1). Seitdem hat sich das zu Grunde liegende Prinzip der Free-Flow Elektrophorese nicht verändert. Free-Flow Elektrophorese Systeme bestehen aus einer Trennkammer, die von einem hydrodynamischen Fluss durchströmt wird. Senkrecht zu diesem hydrodynamischen Fluss wird ein elektrisches Feld an die Trennkammer angelegt (Abbildung 2.1).

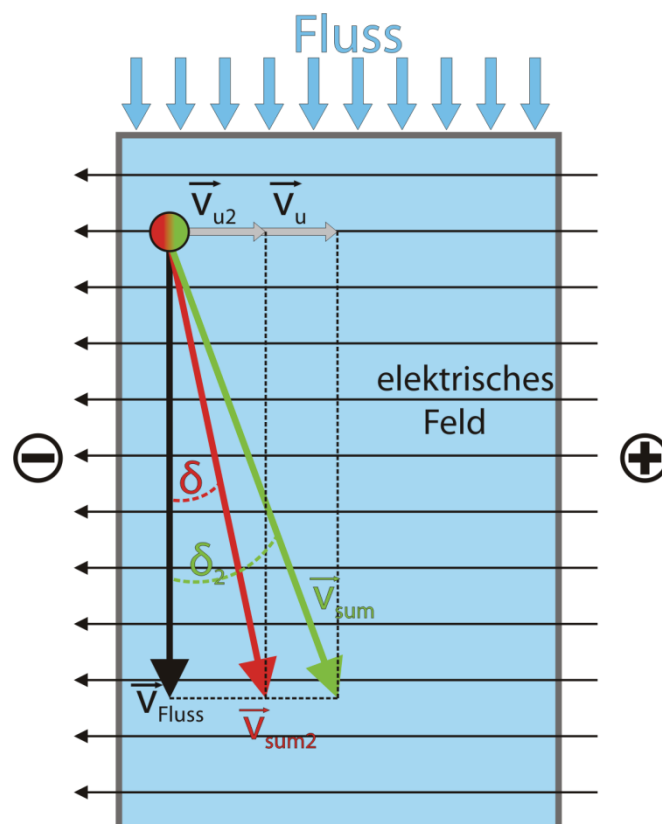


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der Free-Flow Elektrophorese.

Befindet sich ein Analytmolekül in der Trennkammer, so wird es durch das elektrische Feld von seiner ursprünglichen, dem hydrodynamischen Fluss folgenden Bahn abgelenkt. Diese Ablenkung erfolgt aufgrund der elektro-phoretischen Mobilität des Moleküls, welche durch die Molekülladung q , dem Molekülradius r und der Viskosität η bestimmt wird :

$$\mu_{EP} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad 2.2$$

Wird ein Analytgemisch, bei dem die Analyte verschiedene Ladungen und somit verschiedene elektro-phoretische Mobilitäten besitzen, als Probe in die Trennkammer gebracht, so werden die jeweiligen Analyte durch das elektrische Feld in der Trennkammer in verschiedenen Winkeln abgelenkt (Abbildung 2.1). Dadurch erreichen sie das Ende der Trennkammer an verschiedenen Positionen und verlassen dort durch unterschiedliche Ausgangskanäle das System (Abbildung 2.2b). Ein großer Vorteil der Free-Flow Elektrophorese ist die kontinuierliche Trennung. Möchte man große Mengen trennen, so sind bei der Kapillarelektrophorese (CE) [2], aufgrund des geringen Volumens in der Kapillare, viele Trennwiederholungen nötig (Abbildung 2.2a).

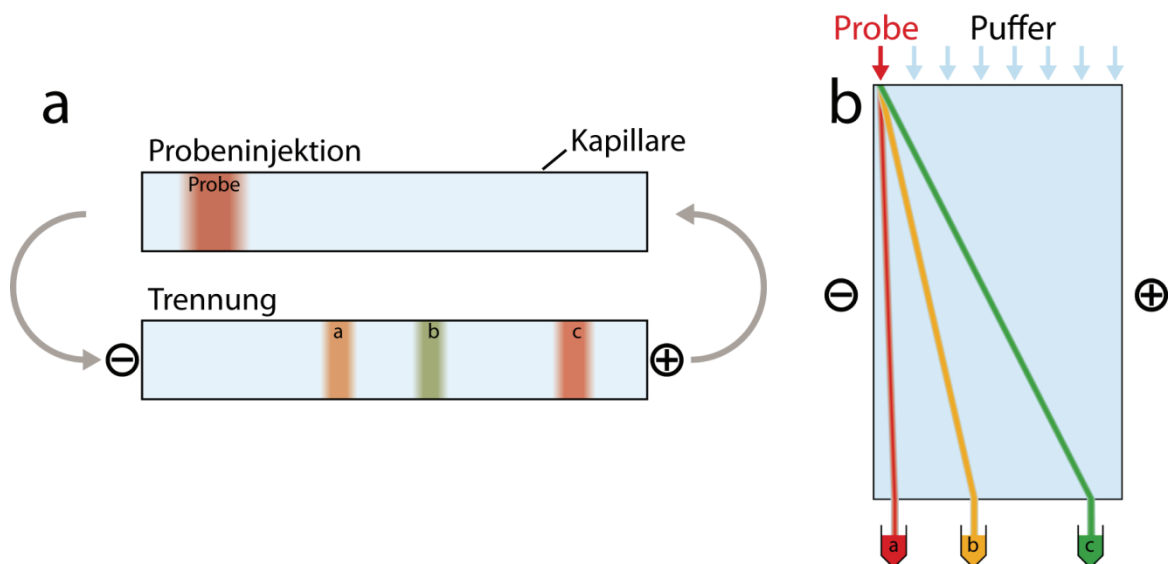


Abbildung 2.2: Vergleich zwischen Kapillarelektrophorese (CE) und Free-Flow Elektrophorese (FFE). Um mit Hilfe der CE große Volumina zu trennen sind viele Durchläufe nötig. Da die FFE eine kontinuierliche Trennmethode ist, ist die Trennung von großen Probenmengen kein Problem.

Dies bedeutet einen erheblichen Zeitaufwand. Bei der (miniaturisierten) Free-Flow Elektrophorese verläuft die Trennung kontinuierlich. Das Trennsystem kann solange wie gewünscht betrieben werden. So können auch größere Probenmengen getrennt werden. Während in der Kapillarelektrophorese eine zeitliche Trennung stattfindet (zur Detektion wird die Laufzeit der getrennten Analyte zum Detektor gemessen), erfolgt bei der Free-Flow Elektrophorese eine räumliche Trennung, das heißt es werden keine Laufzeitenmessungen zur Detektion benötigt. Durch die Trennung der Analyte auf verschiedene Ausgangskanäle ist außerdem eine Sammlung und weitere Verwendung der einzelnen, aufgetrennten Analyte möglich. Die Trennleistung der FFE wird durch die Parameter Flussgeschwindigkeit und angelegte Spannung beeinflusst. Die Flussgeschwindigkeit beeinflusst die Verweildauer der Analyte in der Trennkammer. Je länger die Analyte für die Durchquerung der Trennkammer benötigen, desto länger sind sie im Einflussbereich des elektrischen Feldes. Dementsprechend ist die Ablenkung größer, da die elektrophoretische Wanderung länger andauert. Allerdings bedeutet eine niedrige Flussgeschwindigkeit auch eine stärkere Diffusion zwischen der Probe und dem Puffer. Eine höhere Flussrate hingegen sorgt für einen höheren Stoffdurchsatz und reduziert den Einfluss der Diffusion. Allerdings wird durch die kurze Verweildauer der Analyte in der Trennkammer, und damit im elektrischen Feld, die Trennung schlechter. Die Spannung, beziehungsweise das elektrische Feld, sind für die elektrophoretische Wanderung der Analyte senkrecht zum hydrodynamischen Fluss in der Trennkammer verantwortlich. Je größer die angelegte Spannung und je stärker das resultierende elektrische Feld, desto größer ist die elektrophoretische Geschwindigkeit v_{EP} der Analyte in der Trennkammer. Diese ist durch

$$v_{EP} = \mu_{EP} E = \frac{q}{6\pi\eta r} E \quad 2.3$$

gegeben. E bezeichnet dabei die elektrische Feldstärke. Eine größere elektrophoretische Geschwindigkeit führt zu einer stärkeren Ablenkung der Moleküle.

2.2.1.1 Einkopplung des elektrischen Feldes in μ FFE-Chips

Wie schon erwähnt, beeinflusst das elektrische Feld die elektrophoretische Geschwindigkeit der Moleküle und damit auch direkt die Free-Flow Elektrophoretische Trennung innerhalb des Chips. Folglich spielt die Einkopplung der elektrischen Spannung in den Chip eine wichtige Rolle. Dabei entstehen durch Elektrolyse Gasblasen an den Elektroden. Gelangen diese Gasblasen in die Trennkammer, beeinflussen sie zum einen das elektrische Feld und zum anderen den hydrodynamischen Fluss durch die Trennkammer. Das kann dazu führen, dass eine Trennung unmöglich wird. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Effizienz der Spannungseinkopplung. Abhängig vom Chipdesign fällt ein gewisser Spannungsanteil über den Widerstand der Strukturen zwischen Elektrode und Trennkammer ab. Die Spannungseffizienz beschreibt das Verhältnis zwischen der insgesamt angelegten Spannung und dem Spannungsanteil, der das elektrische Feld in der Trennkammer erzeugt. Im Laufe der Entwicklung von miniaturisierten FFE-Chips sind verschiedene Ansätze zur Spannungseinkopplung entwickelt worden. Im Folgenden werden die vier wichtigsten Varianten näher beschrieben.

Seitenkanäle

Eine Variante zur Spannungseinkopplung stellt die Verwendung von Seitenkanälen dar [33, 36, 41, 42, 46, 88]. Dabei werden zwischen Trennkammer und Elektrodenreservoirs eine Vielzahl von parallelen Seitenkanälen in das Chipdesign integriert. In Abbildung 2.3 ist schematisch eine Hälfte eines solchen μ FFE-Chip dargestellt. Die flüssigkeitsgefüllten Seitenkanäle leiten den elektrischen Strom, besitzen aber aufgrund ihrer geringen Querschnitte einen, im Vergleich zur Trennkammer, hohen hydrodynamischen Widerstand. Außerdem können die Seitenkanäle die bei der Elektrolyse an den Elektroden entstehenden Gasblasen davon abhalten, in die Trennkammer zu gelangen. Abhängig von der Länge, dem Querschnitt und der Anzahl der Seitenkanäle liegt die erreichte Spannungseffizienz zwischen 4,5% [42] und 60% [38, 88] der an den Elektroden angelegten Spannung. Allerdings kann Flüssigkeit durch die Seitenkanäle in die Trennkammer einfließen und so die Trennung negativ beeinflussen. Um dies zu verhindern, muss der hydrodynamische Widerstand der Seitenkanäle durch eine Querschnittsverkleinerung weiter erhöht werden.

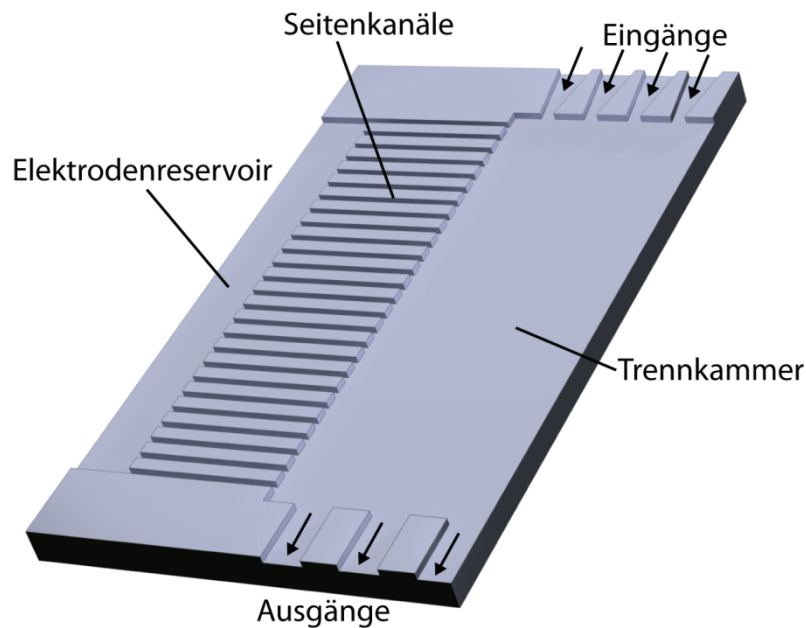


Abbildung 2.3: Skizze eines μ FFE-Chips mit Seitenkanälen. Die Seitenkanäle besitzen einen hohen hydrodynamischen Widerstand, erlauben aber die elektrische Leitung.

Dies hat allerdings einen Anstieg des elektrischen Widerstandes zur Folge, was sich in einer niedrigeren Spannungseffizienz auswirkt. Somit muss man sich, abhängig vom Anwendungszweck, bereits beim Design der Seitenkanäle zwischen einer hohen Spannungseffizienz und einem hohen hydrodynamischen Widerstand entscheiden.

Membrane

Eine weitere, häufig angewendete Variante ist die Benutzung von ionendurchlässigen Membranen, um die Kammer von den Elektrodenreservoirs zu trennen [34, 45, 50, 51] (Abbildung 2.4). Ein oft verwendetes Membranmaterial ist Polyacrylamid. Polyacrylamid wird, nach der eigentlichen Herstellung des μ FFE-Chips, in gelartiger Konsistenz in den Chip gepumpt und anschließend durch eine Photomaske belichtet. An den belichteten Stellen startet eine photosensitive Komponente die Polymerisation des Polyacrylamid und bildet dort eine schwammartige Membran. Diese Membran ist aufgrund ihrer sehr feinen Poren durchlässig für Ionen, leitet somit den Strom, und besitzt einen sehr großen hydrodynamischen Widerstand. So wird ein Einfließen von Flüssigkeit in die Trennkammer verhindert. Mit den Membranen wird eine Spannungseffizienz zwischen 15% [38, 50] und 69% [51] erreicht. Allerdings besitzt die Verwendung von Polyacrylamid zwei große Nachteile.

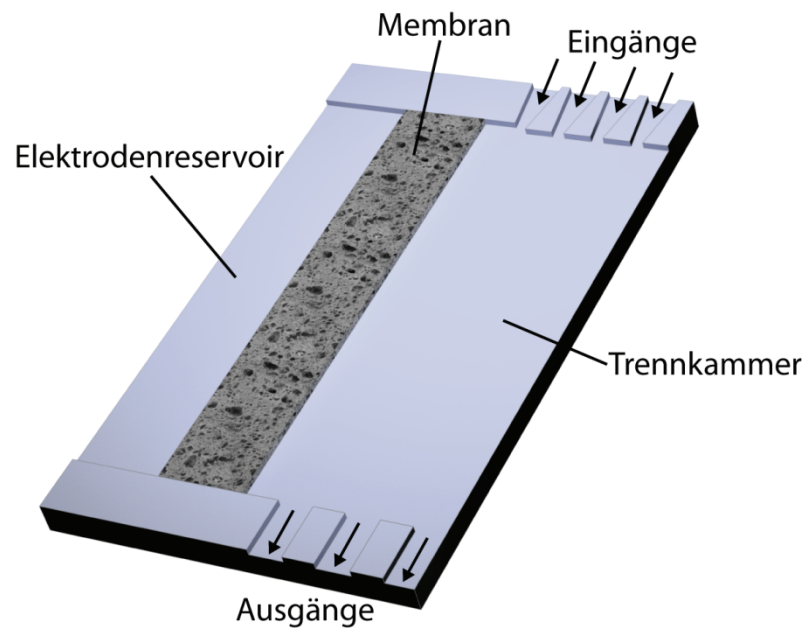


Abbildung 2.4: Skizze eines μ FFE-Chips, welcher eine ionendurchlässige Membran besitzt, um die Trennkammer elektrisch mit den Elektrodenreservoirs zu verbinden.

Zum einen ist die Herstellung dieser Membranen aufgrund der hohen Toxizität des Polyacryamids sehr aufwendig und zum anderen ist die Stabilität der Membranen ein kritischer Faktor. Bei zu hohen Flussgeschwindigkeiten brechen die Membranen, erlauben damit das Eindringen von Gasblasen in die Kammer und machen so eine Trennung unmöglich. So berichteten Kohlheyer *et al.* davon, dass bei Flussgeschwindigkeiten von mehr als 4 mm s^{-1} die Membranen innerhalb von Minuten zerstört werden [34].

Tiefe Elektrodenkanäle

Fonslow *et al.* benutzen eine andere Variante für ihre μ FFE-Chips [35]. Dabei wird die Elektrode in den Chip integriert (Abbildung 2.5). Zwischen Trennkammer und der Elektrode befindet sich ein tiefer Kanal. Dieser Kanal ist etwa viermal tiefer geätzt als die Trennkammer und wird mit einer circa 15-mal höheren Flussgeschwindigkeit betrieben [52]. Aufgrund der niedrigen Reynoldszahlen in Mikrosystemen (vergleiche Abschnitt 2.1) und der somit vorhandenen laminaren Flüsse gibt es zwischen der Flüssigkeit im tiefen Kanal und der Flüssigkeit in der Trennkammer keine Verwirbelung.

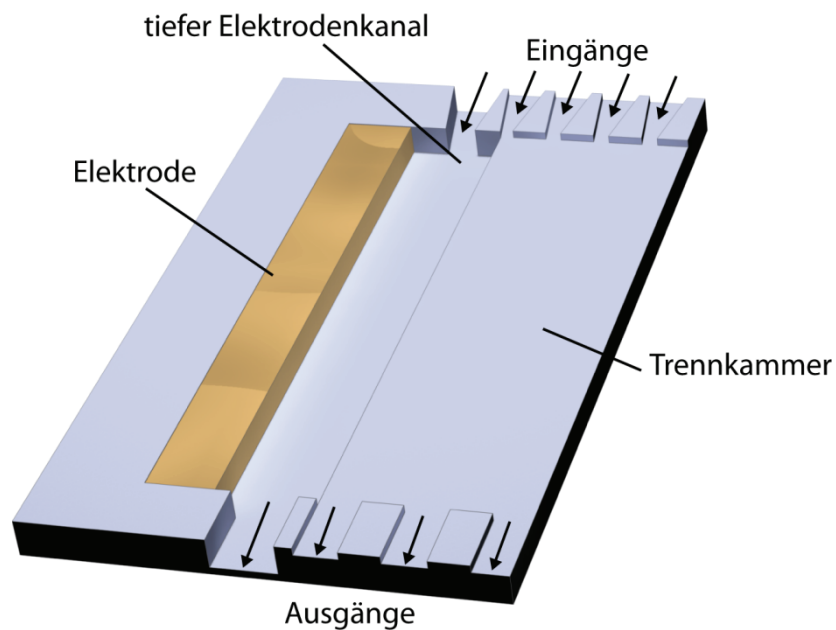


Abbildung 2.5: Skizze eines μ FFE-Chips, welcher zwischen Trennkammer und Elektrode einen tiefen Kanal besitzt. Dieser tiefe Kanal wird mit einer hohen Flussgeschwindigkeit betrieben. So sollen die Elektrolyseprodukte aus dem Chip entfernt werden bevor sie in die Trennkammer gelangen.

Durch die hohe Flussgeschwindigkeit sollen die Elektrolyseprodukte, die an der Elektrode entstehen, mitgerissen und in dem Elektrodenkanal aus dem Chip geführt werden. Die Spannungseffizienz bei diesem Ansatz liegt bei 91% [38]. Allerdings ist zum stabilen Betrieb des μ FFE-Chips eine sehr präzise Flusskontrolle nötig, damit die entstehenden Elektrolyseprodukte kontinuierlich aus dem Chip entfernt werden und nicht die Trennung in der Trennkammer beeinflussen.

Integrierte Elektroden

Als letzte Variante wird die Integration der Elektroden direkt an die Trennkammer beschrieben [40]. Abbildung 2.6 zeigt die Skizze eines solchen Chips. Die Elektrode bildet die Seitenwand der Trennkammer. Dadurch steht sie in direktem Kontakt zur Flüssigkeit in der Trennkammer, was in einer maximalen Spannungseffizienz von 100% resultiert [38]. Des Weiteren benötigt diese Variante, im Vergleich zur vorher beschriebenen Variante der tiefen Elektrodenkanäle, nur eine sehr einfache Flusskontrolle und ein sehr einfaches Chipdesign. Allerdings besteht keine Möglichkeit, eventuell entstehende Elektrolyseprodukte davon abzuhalten, in die Trennkammer zu gelangen und dort die Trennung zu beeinflussen.

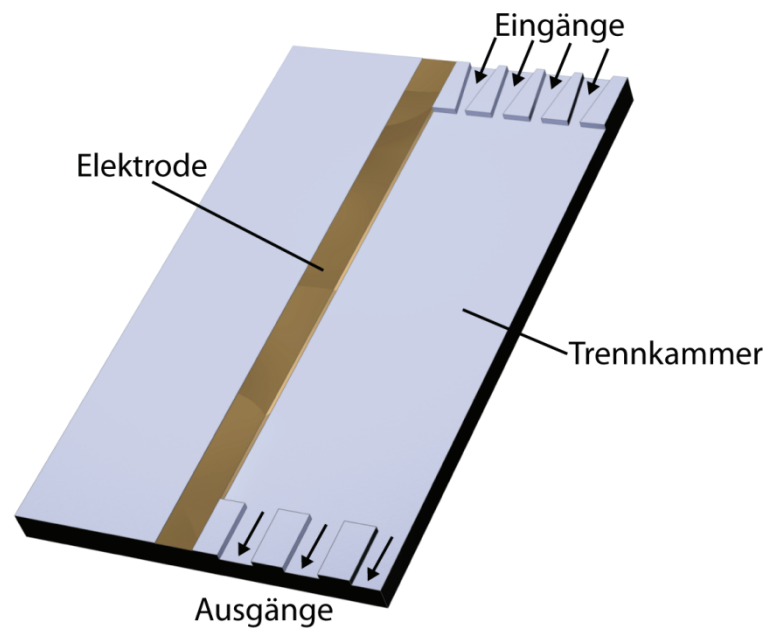


Abbildung 2.6: Skizze eines μ FFE-Chips mit integrierter Elektrode. Die Elektrode ist in direktem Kontakt zur Flüssigkeit in der Trennkammer.

Um bei dieser Variante die Bildung von Gasblasen an der Elektrode zu vermeiden, muss mit Spannungen unterhalb der Zersetzungsspannung [89] des Elektrolyten gearbeitet werden. So arbeiteten Lu *et al.* mit einer Gleichspannung von 2 Volt [40]. Aufgrund der sehr niedrigen Spannung und des daraus resultierenden schwachen elektrischen Feldes sind für eine Trennung sehr lange Verweildauern innerhalb der Trennkammer nötig. Damit während der langen Verweildauer die Rückvermischung der Analyte in der Trennkammer nicht aufgrund von Diffusion erfolgt, können mit dieser Variante nur Analyte mit einem niedrigen Diffusionskoeffizienten getrennt werden.

Neben den vier oben beschriebenen Varianten zur Einkopplung der Spannung in einen miniaturisierten FFE Chip gibt es noch weitere Ansätze, welche aber nur sehr selten Verwendung finden beziehungsweise nur einmal benutzt worden sind. In den meisten μ FFE-Chips wird eine der hier präsentierten Varianten verwendet [37, 38].

Alle in dieser Arbeit verwendeten μ FFE-Chips benutzen Seitenkanäle, um die Elektroden mit der Trennkammer zu verbinden.

2.2.2 Trennmodi in der miniaturisierten Free-Flow Elektrophorese

Es gibt verschiedene Trennmodi, die in der miniaturisierten Free-Flow Elektrophorese angewendet werden können, um Analyte innerhalb der Trennkammer zu trennen und zu fokussieren. Die verschiedenen Modi unterscheiden sich durch die verwendeten Puffer und die Art der Trennung. Durch Wahl des geeigneten Trennmodus ist es zum Beispiel möglich, die Analyte nach Ladung oder auch anhand ihres isoelektrischen Punktes zu trennen. Im Folgenden werden die vier Trennmodi beschrieben, welche bis dato für die miniaturisierte Free-Flow Elektrophorese bekannt sind. Alle Modi funktionieren nach dem in 2.2.1 beschriebenen Prinzip, indem ein elektrisches Feld senkrecht zum hydrodynamischen Fluss durch die Kammer angelegt wird.

2.2.2.1 Free-Flow Zonenelektrophorese (FF-ZE)

In der Free-Flow Zonenelektrophorese wird ein Puffer eingesetzt, der einen einheitlichen pH-Wert und eine gleichbleibende elektrische Leitfähigkeit besitzt. Die Analyte werden dann anhand ihrer elektrophoretischen Mobilität im elektrischen Feld getrennt (Abbildung 2.7).

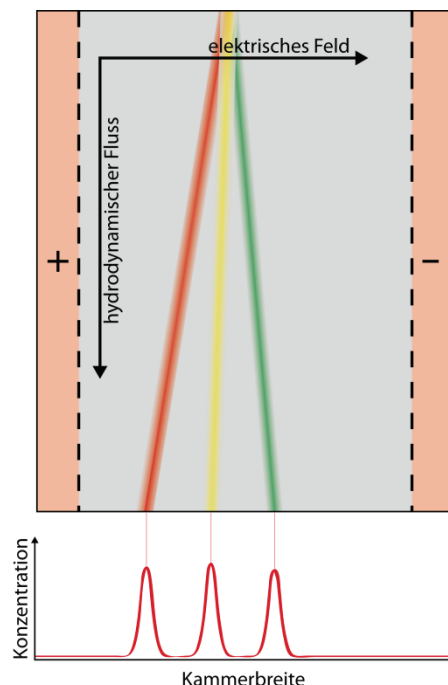


Abbildung 2.7: Prinzip der Free-Flow Zonenelektrophorese (FF-ZE). Die Analyte werden aufgrund verschiedener elektrophoretischer Mobilitäten in verschiedenen Winkeln abgelenkt und so voneinander getrennt.

Die elektrophoretische Mobilität ist proportional zur Ladung und Analytgröße (siehe Gleichung 2.2). Die Ablenkung eines Analyten in der Trennkammer erfolgt linear in einem konstanten Winkel und ist abhängig von der Distanz, die ein Analyt in einem elektrischen Feld zurücklegt. Diese wird durch

$$d = \mu_{EP}Et = v_{EP}t \quad 2.4$$

beschrieben. Dabei ist μ_{EP} die elektrophoretische Mobilität, v_{EP} die elektrophoretische Geschwindigkeit des Analyten, E ist die elektrische Feldstärke und t ist die Verweildauer des Analyten im elektrischen Feld [33].

Der FF-ZE-Modus ist der älteste aller bekannten Trennmodi in der FFE [17]. Das Ziel aller Trenntechniken ist eine hohe Trennauflösung, welche sich durch schmale Probenzonen mit scharfen Grenzen auszeichnet. Allerdings gibt es in der FF-ZE einige Effekte, die eine Bandenverbreiterung und damit eine Verschlechterung der Trennauflösung bewirken. Die Gesamtvarianz $\sigma^2_{Ges.}$ eines Probenstroms ergibt sich aus der Summe der Einzelvarianzen der Streueffekte [38]:

$$\sigma^2_{Ges.} = \sigma^2_{Inj.} + \sigma^2_{Diff.} + \sigma^2_{hydro.} + \sigma^2_{EOF} + \sigma^2_{Joule} + \sigma^2_{Leitf.} \quad 2.5$$

Die einzelnen Effekte sind: die Bandenverbreiterung in Abhängigkeit von der Breite des Probenstroms beim Eintritt in die Trennkammern ($\sigma^2_{Inj.}$), die Bandenverbreiterung durch Diffusion ($\sigma^2_{Diff.}$), die hydrodynamisch bedingte Bandenverbreiterung ($\sigma^2_{hydro.}$), die Bandenverbreiterung aufgrund des Elektroosmotischen Flusses (σ^2_{EOF}), die Bandenverbreiterung durch Joulesche Wärmeentwicklung (σ^2_{Joule}) und die Bandenverbreiterung durch Leitfähigkeitsunterschiede ($\sigma^2_{Leitf.}$). Die einzelnen Effekte werden im Folgenden näher beschrieben.

Bandenverbreiterung in Abhängigkeit von der Breite des Probenstroms

Die Verbreiterung des Probenstroms in der Trennkammer ist unter anderem auch abhängig von der Breite des Probenstroms am Kammereingang. Diese Abhängigkeit kann durch

$$\sigma^2_{Inj.} = \frac{w^2}{12} \quad 2.6$$

beschrieben werden [88], wobei w die Breite des Probenstroms am Kammereingang ist. Ein schmaler Probenstrom reduziert den Einfluss dieses Effektes.

Bandenverbreiterung durch Diffusion

Die laterale Diffusion ist ein weiterer Effekt in der FF-ZE, der die Bande eines Analyten ungewollt verbreitert. Die Diffusion ist abhängig vom Diffusionskoeffizienten D des Analyten und der Zeit t , die sich der Analyt in der Trennkammer befindet [35]:

$$\sigma_{Diff.}^2 = 2Dt \quad 2.7$$

Durch eine kürzere Verweilzeit in der Trennkammer lässt sich der Einfluss der Diffusion auf die Bandenverbreiterung reduzieren. Da im miniaturisierten FFE System die Verweilzeiten im Sekundenbereich liegen, ist der Einfluss der Diffusion auf die Bandenverbreiterung jedoch gering.

Hydrodynamische Bandenverbreiterung

Aufgrund des Betriebes eines μ FFE-Systems mit Über- oder Unterdruck und der daraus resultierenden Strömungsprofile gibt es in der Trennkammer Gebiete mit unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten. Die Flüssigkeit in der Kammermitte fließt schneller als die Flüssigkeit am Boden oder an der Decke der Trennkammer. Die langsamer fließende Flüssigkeit verbringt eine längere Zeit im elektrischen Feld. In ihr enthaltene Analyte erfahren dadurch eine stärkere Ablenkung als die Analyte in der Kammermitte. Diese Varianz wird durch

$$\sigma_{hydro.}^2 = \frac{h^2 t}{105D} E^2 v_{EP}^2 \quad 2.8$$

beschrieben [35]. Dabei ist h die Höhe der Trennkammer. Auch dieser Effekt ist aufgrund der geringen Abmessung in miniaturisierten FFE Systemen gering.

Bandenverbreiterung durch Elektroosmotischen Fluss

An den Oberflächen, welche mit der Flüssigkeit in Berührung sind, entsteht eine elektrochemische Doppelschicht (Stern-Doppelschicht) [2]. Sobald eine Spannung an den Chip angelegt wird, wandert die positiv geladene Schicht an der Oberfläche in Richtung Kathode. Die Flüssigkeit zwischen den Oberflächen wird dabei mitgeführt und bewegt sich somit in Richtung der Kathode. Diese Bewegung wird als Elektroosmotischer Fluss (EOF) bezeichnet.

Durch den EOF in Richtung Kathode wird die Ablenkung der Analyte in der Trennkammer beeinflusst. Das resultiert in einer Varianz der getrennten Analytbanden (σ^2_{EOF}).

Bandenverbreiterung durch Joulesche Wärmeentwicklung

Fließt ein elektrischer Strom durch die Flüssigkeit in der Trennkammer, so wird aufgrund des elektrischen Widerstandes der Flüssigkeit Wärme erzeugt. Diese Wärme heizt die Flüssigkeit auf und führt in der Mitte des Kammerquerschnittes zu einer Änderung der Viskosität. Für den Fall konstanter Spannung U und konstantem Strom I in einem Zeitraum t gilt:

$$W = U I t \quad 2.9$$

Da die Viskosität die elektrophoretische Mobilität direkt beeinflusst (siehe Gleichung 2.2), verändert sich die Mobilität der Analyte abhängig von ihrer Position in der Trennkammer. Verschiedene Mobilitäten führen zu verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld. Zwei Moleküle eines Analyten können also unter verschiedenen Winkeln in der Kammer abgelenkt werden. Dies resultiert in einer Verbreiterung der eigentlichen Analytbande. Aufgrund des großen Verhältnisses zwischen Oberfläche und Volumen erfolgt aber in Mikrosystemen (siehe Abschnitt 2.1) die Ableitung der Wärme aus der Flüssigkeit deutlich schneller als in nicht-miniaturisierten Systemen, so dass dieser Effekt in μ FFE-Systemen reduziert ist.

Bandenverbreiterung durch Leitfähigkeitsunterschiede

Ein weiterer Effekt, der zur Bandenverbreiterung führen kann, tritt auf, wenn Puffer und Probe unterschiedliche Leitfähigkeiten besitzen. Diese Unterschiede führen zu unterschiedlichen Feldstärken innerhalb der Flüssigkeit. Dadurch besitzen die Analyte, je nach Position in der Kammer, unterschiedliche Migrationsgeschwindigkeiten, wodurch dann eine Verbreiterung der Analytbande hervorgerufen werden kann. Ein geeignetes Puffersystem, bei dem sowohl der Puffer als auch der Probenstrom die gleiche Leitfähigkeit haben, kann diesen Effekt minimieren.

Mit Hilfe der Free-Flow Zonenelektrophorese wurden bisher Aminosäuren [33], Proteine [47, 88] und fluoreszierende Farbstoffe [36, 41, 45, 51, 52] erfolgreich in miniaturisierten Free-Flow Elektrophorese Systemen getrennt.

2.2.2.2 Free-Flow Isoelektrisches Fokussieren (FF-IEF)

Das FF-IEF ist ein weiterer Trennmodus in der Free-Flow Elektrophorese. Die Trennung und Fokussierung erfolgt im Gegensatz zur FF-ZE nicht aufgrund von Ladungsunterschieden, sondern aufgrund von verschiedenen isoelektrischen Punkten (pI) der Analyte. Dabei macht man sich die pH-Wert-Abhängigkeit der sauren und basischen Aminosäuren eines Proteins zunutze. Je nach pH-Wert des umgebenden Mediums verändert sich die Ladung der Aminosäuren. Die Änderung des pH-Wertes beeinflusst somit auch die Nettoladung des Proteins. Beim Isoelektrischen Fokussieren wandert das Protein aufgrund eines elektrischen Feldes durch einen pH-Gradienten. Gelangt es an den pH-Wert, bei dem seine Nettoladung null ist, wirkt keine elektrophoretische Kraft mehr auf das Protein und damit wird seine Wanderungsgeschwindigkeit null. Der Punkt, bei dem die Nettoladung des Proteins null ist, wird isoelektrischer Punkt (pI) genannt. Abbildung 2.8 zeigt die Nettoladung zweier Proteine aufgetragen gegen den pH-Wert. Bringt man diese beiden Proteine zum Beispiel bei pH 6 in den pH-Gradienten, so besitzt Protein A eine negative Nettoladung, Protein B hingegen ist positiv geladen. Legt man nun ein elektrisches Feld parallel zum pH-Gradienten an, so wandern die Proteine bis zu ihrem jeweiligen pI .

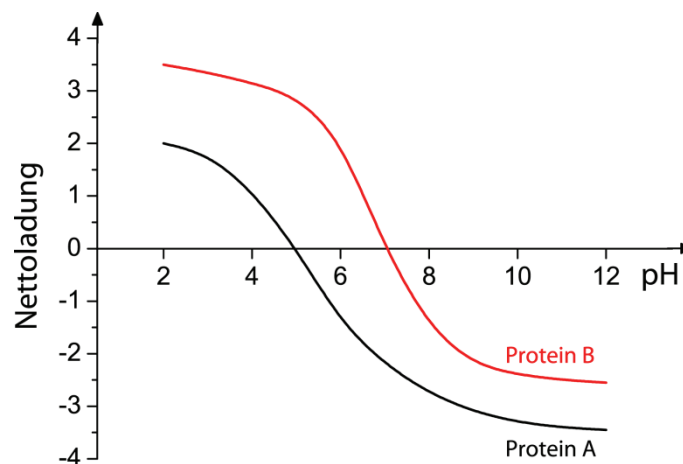


Abbildung 2.8: Nettoladungskurven von zwei verschiedenen Proteinen A und B.

Ab diesem Punkt besitzen Sie keine Ladung mehr und die Wanderung stoppt. Beim FF-IEF besteht der Puffer aus verschiedenen Ampholyten. Gibt es in der Trennkammer bereits einen natürlichen pH-Gradienten und wird eine Spannung an den Chip angelegt, so bilden die Ampholyte einen linearen pH-Gradienten in der Kammer

parallel zum elektrischen Feld und senkrecht zur Flussrichtung. Der natürliche pH-Gradient wird meist durch entsprechende Elektrodenelektrolyte mit einem hohen beziehungsweise einem niedrigen pH-Wert erzeugt. Die Analyte wandern dann aufgrund des elektrischen Feldes durch den erzeugten pH-Gradienten. Im Gegensatz zur FF-ZE Methode entsteht bei der Isoelektrischen Fokussierung keine Bandenverbreiterung (Abbildung 2.9).

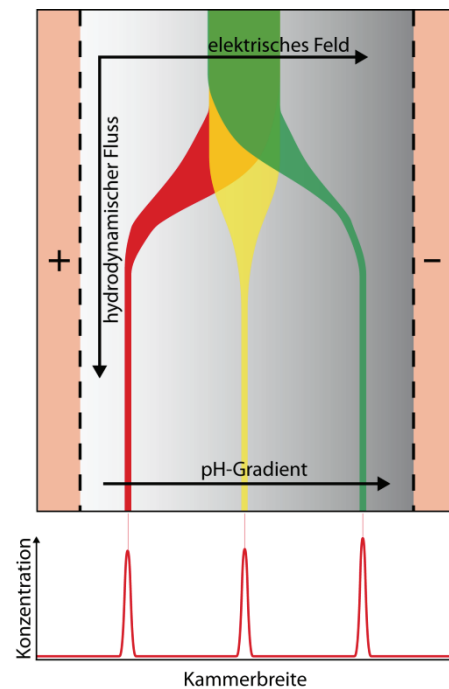


Abbildung 2.9: Prinzip der Free-Flow Isoelektrischen Fokussierung (FF-IEF). Die Analyte wandern aufgrund des elektrischen Feldes durch den pH-Gradienten. Entspricht der pH-Wert dem isoelektrischen Punkt, so beträgt die Nettoladung des Analyts null, die elektrophoretische Wanderung stoppt und der Analyt wird an dieser Stelle fokussiert.

Verlässt ein Analytmolekül die Zone, in der der pH-Wert des Puffers dem isoelektrischen Punkt des Moleküls entspricht, und diffundiert in eine Zone mit einem anderen pH-Wert, so bekommt das Molekül eine von null verschiedene Nettoladung. Das Molekül wird dann wieder durch das elektrische Feld beeinflusst und wandert zurück an den Punkt, an dem es eine neutrale Gesamtladung besitzt. Damit ist das FF-IEF eine selbstfokussierende Methode, bei der die vorher beschriebenen Effekte (siehe Abschnitt 2.2.2.1) der Bandenverbreiterung eine untergeordnete Rolle spielen.

Im stationären Zustand beschreibt die folgende Differentialgleichung den Gleichgewichtszustand zwischen dem elektrophoretischen Massetransport und der Diffusion [90]:

$$\frac{d(c\mu E)}{dx} = \frac{d}{dx} D \frac{dc}{dx} \quad 2.10$$

Dabei ist c die Konzentration des Analyten an der Position x im Trennsystem, μ ist die Mobilität am Punkt x , E ist die elektrische Feldstärke und D ist der Diffusionskoeffizient. Für einen finalen stationären Zustand ergibt sich für Gleichung 2.10 eine gaußsche Konzentrationsverteilung. Die Standardabweichung der Peakbreite kann dann folgendermaßen ausgedrückt werden [38]:

$$\sigma_{peak} = \pm \sqrt{\frac{D}{pE}} \quad 2.11$$

Die Standardabweichung ist abhängig von dem Diffusionskoeffizienten D , dem elektrischen Feld E und

$$p = -\frac{d\mu}{d(pH)} \frac{d(pH)}{dx} \quad 2.12$$

Dabei steht $d\mu/d(pH)$ für die Veränderung der elektrophoretischen Mobilität des Analyts in Abhängigkeit vom pH-Gradienten und $d(pH)/dx$ beschreibt den pH-Gradienten. Die maximale Auflösung eines FF-IEF Systems kann durch die minimale Differenz zwischen zwei isoelektrischen Punkten zweier Analyte beschrieben werden, die gerade noch mit einem Peakabstand von 3σ getrennt werden können [90]:

$$\Delta(pI)_{min} = 3\sigma = 3 \sqrt{\frac{D \left(\frac{d(pH)}{dx} \right)}{E \left(-\frac{d\mu}{d(pH)} \right)}} \quad 2.13$$

Ersetzt man in Gleichung 2.13 nun $d(pH)/dx$ durch $\Delta pH/l$, wobei l die Länge des pH-Gradienten und ΔpH die Differenz zwischen dem höchsten und niedrigsten pH-Wert im Gradienten ist, und E durch V_{eff}/l , wobei V_{eff} die effektive Spannung für die Trennung ist (vergleiche Spannungseffizienz, Abschnitt 2.2.1.1), so erhält man

$$\Delta(pI)_{min} = 3 \underbrace{\sqrt{\frac{\Delta(pH)}{V_{eff}}}}_{System} \underbrace{\sqrt{\frac{D}{-\frac{d\mu}{d(pH)}}}}_{Analyt} \quad 2.14$$

Man erkennt, dass die minimale Auflösung sowohl von Systemparametern als auch von Analytparametern abhängt. Um eine möglichst große Auflösung während einer FF-IEF Trennung zu bekommen, benötigt man einen möglichst kleinen pH-Gradienten (ΔpH) und eine hohe Spannung (V_{eff}). Auch erkennt man aus Gleichung 2.14, dass die Auflösung unabhängig von den Dimensionen des Trennsystems ist. Somit ist auch die maximale Anzahl von auflösbaren Peaks n im Trennsystem unabhängig von der Dimension des Systems [38]:

$$n = \underbrace{\sqrt{\Delta(pH)V_{eff}}}_{System} \underbrace{\sqrt{\frac{d\mu}{\frac{d(pH)}{16D}}}}_{Analyt} \quad 2.15$$

Durch Anwendung des FF-IEF Modus wurden bisher fluoreszierende IEF Farbstoffe [42, 45, 50], subzelluläre Organellen [40] und Proteine [34, 49] in miniaturisierten Free-Flow Elektrophorese Systemen getrennt und fokussiert. Durch die Eigenschaft der Selbstfokussierung und die daraus resultierende hohe Trennauflösung war es möglich, sieben fluoreszierende IEF Farbstoffe mit verschiedenen isoelektrischen Punkten in einer Trennkammer mit einer Breite von 3,5 mm zu trennen und zu fokussieren [34].

Nachteil des IEF ist allerdings die Tatsache, dass die meisten Analyte an ihrem isoelektrischen Punkt eine schlechte Löslichkeit besitzen. Dies kann zu Präzipitation und damit zu einer negativen Beeinflussung der Trennung führen [2].

2.2.2.3 Free-Flow Isotachophorese (FF-ITP)

Ein weiterer Trennmodus, der in einem Free-Flow Elektrophorese System benutzt werden kann, ist die Isotachophorese (ITP). Die Trennung während der Isotachophorese erfolgt, ähnlich wie bei der Zonenelektrophorese, nach der Mobilität der Analyte. Allerdings unterscheidet sich die Elektrolytanordnung der Isotachophorese deutlich von der der Zonenelektrophorese. Bei der FF-ZE befindet sich nur ein Elektrolyt in der Trennkammer, was in einer konstanten elektrischen Feldstärke resultiert. Für die Isotachophorese hingegen werden zwei Elektrolyte mit unterschiedlichen Mobilitäten verwendet. Der Leitelektrolyt (Leading Electrolyte, LE) besitzt die höchste Mobilität, der Endelektrolyt (Terminating Electrolyte, TE) die geringste Mobilität im System. Die Mobilität der Analyt-Ionen liegt zwischen den Mobilitäten von LE und TE. Durch die unterschiedlichen Mobilitäten von LE und TE bildet sich beim Anlegen eines konstanten Stroms ein Feldstärkegradient innerhalb der Trennkammer, parallel zum elektrischen Feld und senkrecht zum hydrodynamischen Fluss, aus.

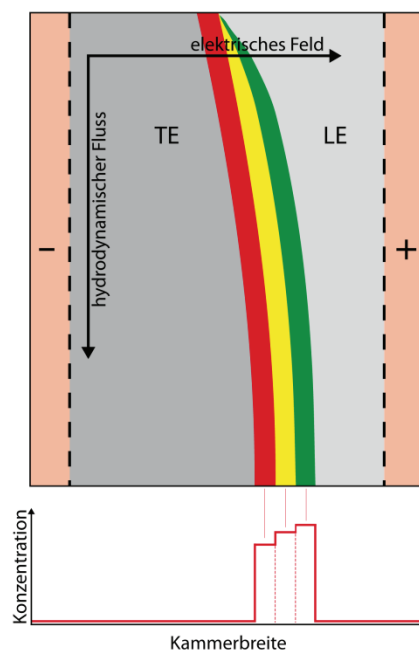


Abbildung 2.10: Prinzip der Free-Flow Isotachophorese (FF-ITP). In der Trennkammer befinden sich zwei verschiedene Elektrolyte, die einen Feldstärkegradienten erzeugen. Die Analyte befinden sich zwischen den beiden Elektrolyten. Bei Anlegen einer Spannung wandern die Analyte in eine Zone, in der das Produkt aus Feldstärke und Mobilität der Gesamtgeschwindigkeit der Elektrolytanordnung entspricht.

Bei angelegter Spannung wandern nun sowohl die Elektrolyte als auch die Probenanalyte in Richtung Anode. Der TE besitzt eine geringe Mobilität, dort herrscht aber die höchste Feldstärke. Die daraus resultierende Wanderungsgeschwindigkeit ist genauso hoch wie die Geschwindigkeit des LE, der zwar eine hohe Mobilität, aber eine geringe Feldstärke besitzt. Damit bewegt sich die ganze Elektrolytanordnung mit konstanter Geschwindigkeit. Die elektrophoretische Wanderung der Analyt-Ionen zwischen LE und TE wird, je nach Analyt-Mobilität und Feldstärke, an ihrer jeweiligen Position entweder beschleunigt oder gebremst. Befand sich ein Analyt-Ion mit einer geringen Mobilität an der Grenzfläche zum LE als die Spannung angelegt wurde, so befindet es sich nun in einem Gebiet mit einer geringen Feldstärke. Die elektrophoretische Geschwindigkeit, das Produkt aus elektrophoretischer Mobilität und elektrischer Feldstärke (Gleichung 2.3), ist im Vergleich zu den Analyt-Ionen, welche sich im Bereich derselben Feldstärke befinden, aber eine höhere Mobilität besitzen, geringer. Dadurch wird die Bewegung im Vergleich zu den Ionen mit höherer Mobilität gebremst. Da sich aber die gesamte Elektrolytanordnung bewegt, verschiebt sich die Position des Analyt-Ions in Richtung TE, also in den Bereich einer höheren Feldstärke. An einem Punkt entspricht die elektrophoretische Geschwindigkeit des Analyt-Ions der Geschwindigkeit der gesamten Elektrolytanordnung. Die relative Geschwindigkeit im Vergleich zur Elektrolytanordnung entspricht also null. An diese Stelle im Feldgradienten wandern nun alle identischen Analyt-Ionen, so dass sich eine Trennung und Fokussierung einstellt. Verlässt ein Analyt-Ion die Fokussierungszone, so beträgt die Relativgeschwindigkeit zur Elektrolytanordnung nicht mehr null und das Ion wird in Richtung Fokussierungszone beschleunigt beziehungsweise abgebremst, je nachdem in welche Richtung es die Zone verlassen hat. Ähnlich wie das FF-IEF ist die FF-ITP damit eine selbstschärfende Trennmethode. Die Analyt-zonen werden nicht durch Diffusion verbreitert. Die Konzentration der Analyt-Ionen passt sich der Konzentration des Leitelektrolyten nach der „beharrlichen Funktion“ von Kohlrausch [91] an:

$$c_A = c_{LE} \frac{\mu_A(\mu_{LE} + \mu_G)}{\mu_{LE}(\mu_A + \mu_G)} \quad 2.16$$

Dabei steht c_A für die Konzentration des Analyten, c_{LE} für die Konzentration des Leitelektrolyten, μ_A für die Mobilität des Analyten, μ_{LE} für die Mobilität des Leitelektrolyten und μ_G für die Mobilität des Gegenions. Das Gegenion sollte im Leitelektrolyt enthalten sein und in die entgegengesetzte Richtung wandern. Es gewährleistet die Elektroneutralität der Zonen sowie die pH-Stabilität [92].

Da bei der FF-ITP die Wanderungslänge der Elektrolyte und der Probe aufgrund der begrenzten Trennkammerbreite eingeschränkt und auch die Verweildauer aufgrund des hydrodynamischen Flusses sehr kurz ist, wird bei der FF-ITP die Trennung nicht bis zu ihrem Endpunkt vollzogen. Wenn die Probe die Trennkammer, abhängig von der Flussrate, nach wenigen Sekunden wieder verlässt, haben noch nicht alle Analyt-Ionen ihre jeweiligen Fokussierungszonen erreicht. Daraus resultiert eine unvollständige Trennung, wobei die isotachophoretische Trennung und Fokussierung innerhalb eines μ FFE-Chips direkt nach Eintritt der Probe in die Trennkammer startet. Daher ist es möglich, auch mit einer nicht bis zum Endpunkt durchgeführten Trennung gute Trennergebnisse zu erzielen.

Bisher wurden mit Hilfe der miniaturisierten Free-Flow Isotachophorese fluoreszierende Farbstoffe [44] und Proteine getrennt und fokussiert [46, 48].

2.2.2.4 Free-Flow Temperature Gradient Focusing (FF-TGF)

Ein weiterer, erst während dieser Arbeit entwickelter Modus zum Trennen und Fokussieren von Analyten ist das Free-Flow Temperature Gradient Focusing. Ähnlich wie das FF-IEF ist das FF-TGF eine Endpunktmethode, das heißt die Analyte werden an einer bestimmte Position in der Kammer fokussiert, verharren dort und werden durch den hydrodynamischen Fluss aus der Trennkammer transportiert (Abbildung 2.11). Durch einen extern an die Trennkammer angelegten Temperaturgradienten wird in einem temperaturabhängigen Puffer ein Leitfähigkeitsgradient erzeugt. Dieser Leitfähigkeitsgradient sorgt für eine, sich in Abhängigkeit mit der Analytposition ändernde, elektrophoretische Mobilität des Analyten. Nach Anlegen einer Spannung wandert ein negativ geladener Analyt im elektrischen Feld in Richtung Anode. Simultan dazu bewirkt der elektroosmotische Fluss einen Flüssigkeitstransport in Richtung Kathode. An einer Stelle in der Kammer sind elektrophoretische Geschwindigkeit und elektroosmotischer Fluss gleich. Die beiden Kräfte heben sich auf.

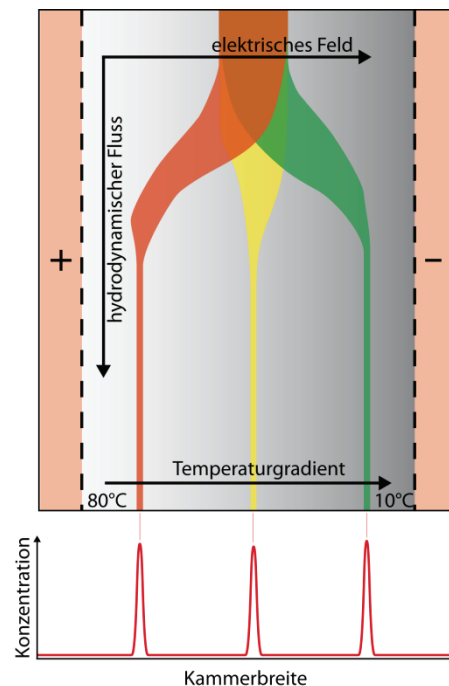


Abbildung 2.11: Prinzip des Free-Flow Temperature Gradient Focusing (FF-TGF). Der angelegte Temperaturgradient erzeugt im Elektrolytpuffer einen Leitfähigkeitsgradienten. Dieser sorgt dafür, dass sich die elektrophoretische Geschwindigkeit der Analyte während der Wanderung im elektrischen Feld ändert. An einer Stelle sind die elektrophoretische Geschwindigkeit in Richtung Anode und der elektroosmotische Fluss, der über die ganze Kammerbreite konstant ist, gleich. Dort wird der Analyt fokussiert und durch den hydrodynamischen Fluss aus der Kammer transportiert.

Der Analyt wird an dieser Stelle fokussiert und durch den hydrodynamischen Fluss aus der Trennkammer geführt. Auch bei diesem Trennmodus wird ein Molekül, was sich von der Fokussierungsposition wegbewegt, durch elektrophoretische Kraft beziehungsweise Elektroosmose wieder auf die Fokussierungsposition bewegt. Vorteil dieser Methode im Vergleich zur FF-IEF ist die Möglichkeit, auch Analyte ohne isoelektrischen Punkt trennen und fokussieren zu können.

Unter Verwendung des miniaturisierten FF-TGF wurden bisher fluoreszierende Farbstoffe und Proteine getrennt und fokussiert [39].

Die detaillierte Beschreibung der Entwicklung und Anwendung des Free-Flow Temperature Gradient Focusing ist in Kapitel 4 dieser Arbeit zu finden.

2.3 Simulation mit SolidWorks Flow Simulation

Um sowohl hydrodynamische als auch thermische Effekte, welche in μ FFE-Chips auftreten können, besser verstehen zu können, wurden einige Chipdesigns mit Hilfe der numerischen Strömungsmechanik simuliert. Die Software, die dazu verwendet wurde, heißt SolidWorks Flow Simulation und ist ein Modul der Software SolidWorks. Hersteller der Software ist die Firma Dassault Systèmes SolidWorks Corporation. Das Kernprogramm ist eine 3D-CAD (Computer Aided Design) Software, welche für die Konstruktion von parametrischen Modellen und Bauteilen entwickelt wurde. Durch die Verknüpfung von mehreren Teilen entstehen Baugruppen, welche dann das gesamte Modell bilden. Zur Vorbereitung der Simulation wurde ein digitales Abbild der zu simulierenden Struktur, beziehungsweise des zu simulierenden Chips, in SolidWorks konstruiert. Diese Konstruktion wurde anschließend mit Hilfe des Flow Simulation Moduls simuliert und die Ergebnisse ausgewertet. Neben reinen strömungsmechanischen Simulationen konnte hierbei auch der Einfluss von Temperaturen auf die Flüssigkeit im Chip untersucht werden. Im Folgenden wird sowohl auf die digitale Konstruktion als auch auf die Simulation eines μ FFE-Chips eingegangen und einige wichtige Punkte näher erläutert.

Ein in SolidWorks konstruierter Chip entstand durch Zusammenfügen der einzelnen Bauteile eines Chips. Dazu gehörten der Eingang, die Trennkammer, der Ausgang, die Seitenkanäle und der Chipboden. Wie beim realen Chip bestand auch hier der zu simulierende Chip aus einer Ober- und -Unterseite. Die Oberseite enthielt die Mikrostrukturen, die Chipunterseite (Chipboden) enthielt die Anschlusslöcher, welche die Mikrokanäle mit der Außenwelt verbanden. Zuerst wurden die einzelnen Bauteile mit den entsprechenden Abmessungen in SolidWorks gezeichnet und anschließend gespeichert. Dann wurden bis auf den Chipdeckel alle Chipteile zur Baugruppe „Chipoberseite“ zusammengefügt. Abbildung 2.12a zeigt die einzelnen Chip-Bauteile, die durch Verknüpfungen zu einer Baugruppe zusammengefügt wurden. Anschließend wurden die Fluidikstrukturen, wie bei einem realen μ FFE-Chip, verschlossen. Dazu wurde der Chipboden gezeichnet und mit den Anschlusslöchern versehen. Der Boden wurde anschließend mit der Chipoberseite verknüpft. So entstand der digitale μ FFE-Chip (Abbildung 2.12b). Da das Flow Simulation Modul jedoch nur abgeschlossene Volumina simulieren konnte, mussten alle Anschlusslöcher mit sogenannten „Lids“ verschlossen werden.

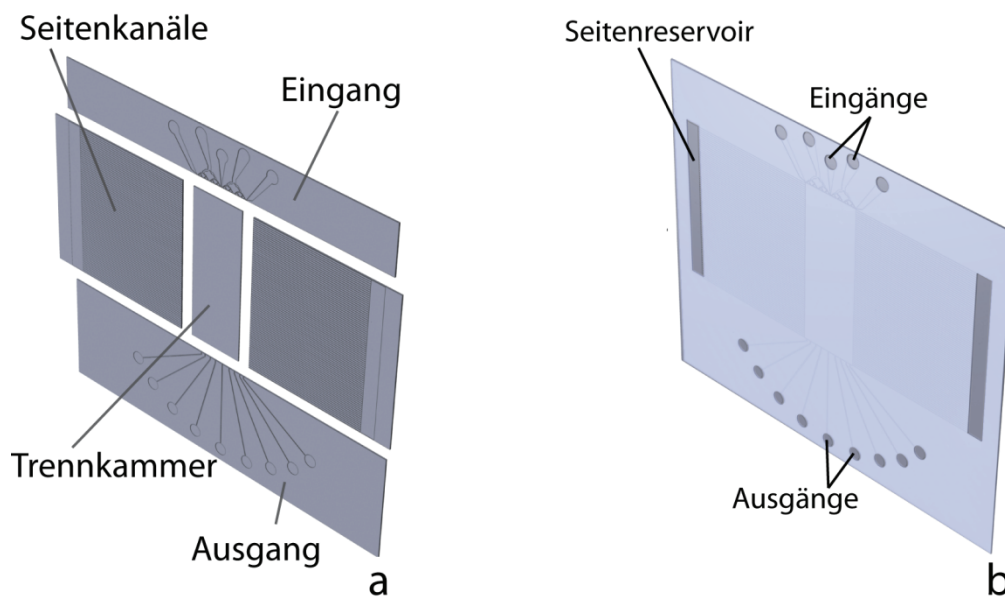


Abbildung 2.12: a) zeigt die einzelnen Bauteile, die zur Konstruktion der Chipunterseite benötigt wurden. b) zeigt die aus den einzelnen Bauteilen verknüpfte Baugruppe, welche bereits durch den Chipboden abgeschlossen worden ist.

Diese Lids wurden vom Flow Simulation Modul als definierte Ein- und Ausgänge zu dem zu simulierenden Volumen erkannt. Die Flächen der Lids, die an das zu simulierende Volumen grenzten, konnten nun mit verschiedenen Parametern versehen werden. Bei der Simulation des in Abbildung 2.12b gezeigten Chips wurden die Lids an den Chipeingängen als Flüssigkeitseingänge festgelegt. Für jedes Lid wurden dort zum Beispiel Parameter wie Flussrate, Strömungsart oder Temperatur der Flüssigkeit festgelegt. Bei den restlichen Lids (Seitenreservoir, Ausgänge) des Chips in Abbildung 2.12b wurde nur festgelegt, dass der an den dortigen Grenzflächen herrschende Druck 101325 Pascal beträgt. Damit konnten diese Flächen, abhängig von den Druckverhältnissen, die während der Simulation im Chip entstanden, sowohl als Eingang als auch als Ausgang in Frage kommen. Mit der Erzeugung und Parametrisierung der Lids war die eigentliche Konstruktion des Chips in SolidWorks abgeschlossen. Da der Chip nun ein geschlossenes Flüssigkeitsvolumen mit definierten Ein- und Ausgängen besaß, konnte das Flow Simulation Modul zur CFD-Simulation verwendet werden.

Bedingung für eine Simulation war, wie bereits erwähnt, ein geschlossenes Flüssigkeitsvolumen. Bevor man die Simulation starten konnte, mussten noch etliche allgemeine Simulationsparameter eingestellt werden. Als erstes musste der Name und

das Einheitensystem für die Simulation festgelegt werden. Anschließend wurde der Analysetyp definiert. Man konnte interne Simulationen (zum Beispiel Flüssigkeit in einem geschlossenen System) oder externe Simulationen (zum Beispiel Simulation des Luftwiderstandes eines Autos) durchführen. An dieser Stelle wurde auch festgelegt, ob die verwendeten Materialien Wärme leiteten oder Wärme abstrahlten, ob die Schwerkraft für die Simulation berücksichtigt werden sollte oder ob eine Rotation des zu simulierenden Körpers vorlag. Als nächstes musste die Standardflüssigkeit oder das Standardgas, mit dem die Simulation durchgeführt werden sollte, ausgewählt werden. Für alle Simulationen in dieser Arbeit wurde Wasser als Standardflüssigkeit gewählt. Danach wurde angegeben, ob es sich um eine laminare oder eine turbulente Strömung oder eine Mischung aus beidem handelt. Die Eigenschaften der Seitenwände (Rauigkeit, Temperatur, Wärmefluss) des Flüssigkeitsvolumens mussten im nächsten Schritt festgelegt werden. Anschließend wurden die Startverhältnisse der Simulation definiert. Dazu gehörten unter anderem die Temperatur, der Startdruck und die Start-Flussgeschwindigkeit. Im letzten Schritt wurden die Mesh-Eigenschaften definiert. Mit Hilfe dieses Gitters wurde das zu simulierende Bauteil in viele kleine Vierecke zerlegt, die Simulation also in viele, kleinere Teilsimulationen verkleinert. In der eigentlichen Simulation werden diese Teilsimulationen berechnet und anschließend zur Gesamtsimulation zusammengesetzt. Dabei galt: Je feiner das Mesh, desto genauer die Simulationsergebnisse. Vor Beginn der Simulation mussten noch die Ziele der Simulation festgelegt werden. Neben den globalen Zielen, wie zum Beispiel Flussgeschwindigkeit, Dichte der Flüssigkeit und Druck im System konnten auch Volumenziele oder Oberflächenziele definiert werden. Dadurch bestand die Möglichkeit, einzelne Parameter von bestimmten Elementen des zu simulierenden Bauteiles näher untersuchen zu können. Nachdem nun alle oben genannte Parameter und Einstellung vorgenommen worden waren, konnte die Simulation gestartet werden. Die Simulationsdauer war abhängig von der Meshgröße, der Anzahl der Ziele und der Größe des zu simulierenden Bauteils. Während der eigentlichen Simulation wurden durch das Flow Simulation Modul Navier-Stokes Gleichungen zur Berechnung der Flusscharakteristika gelöst [93]. Die Ergebnisse der Simulation wurden in einer Datei gespeichert.

Nach Beendigung der Berechnungen konnte die Simulation mit Hilfe verschiedener Werkzeuge ausgewertet werden. Als Beispiel wird im Folgenden die Auswertung mit

Hilfe von Cut-Plots und Trajektorien näher beschreiben. Abbildung 2.13 zeigt beide Varianten, Abbildung 2.13a zeigt einen Cut-Plot der Temperatur innerhalb der Trennkammer, Abbildung 2.13b zeigt Trajektorien, die durch die Kammer verlaufen. Bei einem Cut-Plot wird eine Ebene festgelegt, die das simulierte System schneidet. Die Simulationsergebnisse werden dann nur in dieser Ebene dargestellt. Die Trajektorien geben den Weg eines Partikels durch die Trennkammer wieder, die Färbung der Trajektorien zeigt die Temperatur an der jeweiligen Stelle an.

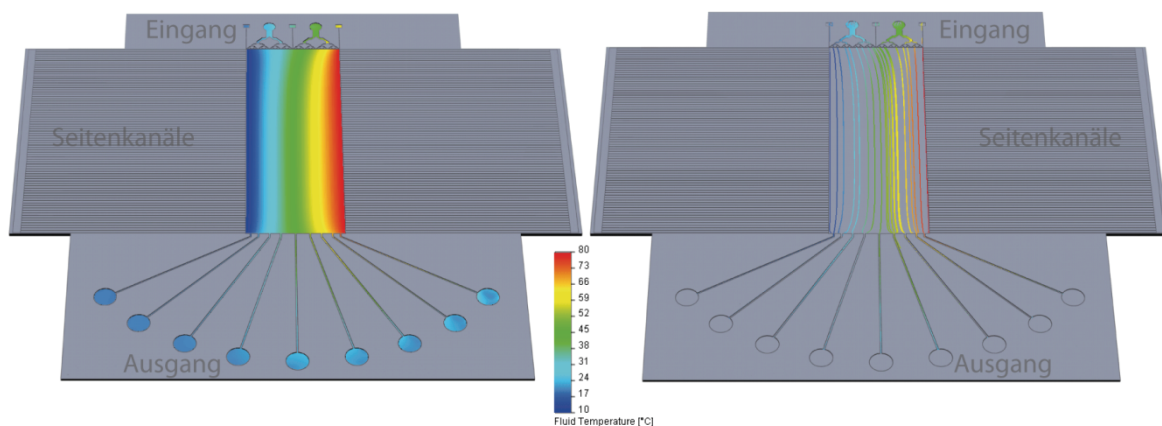


Abbildung 2.13: Auswertung der Simulation mit Hilfe von einem Cut-Plot (a) und Trajektorien (b). Die Farbe des Cut-Plots bzw. der Trajektorien zeigt die Temperatur an der jeweiligen Stelle an.

Mit der Simulation der in Abbildung 2.13 gezeigten Chips sollten die Auswirkungen eines extern an den Chip angelegten Temperaturgradienten untersucht werden. Dazu wurden in der Simulation unter den Seitenkanälen Heizelemente positioniert, die die linke Chipseite auf 10 °C kühlten und die rechte Chipseite auf 80 °C heizten. Die Temperatur war nur einer von vielen Parametern, die so visualisiert werden konnten. Ohne Probleme ließen sich mit Hilfe von Cut-Plots und Trajektorien zum Beispiel auch die Flussgeschwindigkeit, die Dichte der Flüssigkeit oder der Druck im System darstellen. Waren vor Beginn der Simulation neben den globalen Zielen auch Volumenziele oder Oberflächenziele definiert worden, so ließ sich so zum Beispiel der Druck auf eine Oberfläche bestimmen.

Wie bereits erwähnt, war die Dauer der Simulation von der Feinheit des Meshs, der Anzahl der zu berechnenden Ziele und von der Größe des zu simulierenden Bauteils abhängig. Für die in dieser Arbeit gezeigten Simulationen wurden Berechnungszeiten zwischen 12 Stunden und 116 Stunden benötigt. Reine hydrodynamische

Simulationen wurden schneller simuliert als Simulationen, bei denen noch thermische Effekte wie Wärmestrahlung oder Wärmeleitung in der Flüssigkeit und im Feststoff berücksichtigt werden mussten. Natürlich waren die Simulationsdauer und die Auflösung der Simulationen auch von der verwendeten Rechner-Hardware abhängig. Die ersten Simulationen wurden auf einem Desktop-PC mit einem 32-bit Betriebssystem durchgeführt. Da 32-bit Systeme allerdings nicht mehr als 3 Gigabyte Hauptspeicher adressieren können, traten bei diesem System vermehrt Simulationsabstürze aufgrund von Hauptspeichermangel auf. Dieses Problem wurde später durch ein leistungsfähiges 64-bit Serversystem gelöst, was die Adressierung von einem Terabyte Hauptspeicher erlaubte. Außerdem besaß das Serversystem mehrere Prozessorkerne, wodurch die Simulationsdauer weiter verringert wurde. Damit waren auch komplexe Simulationen, wie die in Abbildung 2.13 gezeigte Simulation von thermischen und hydrodynamischen Effekten mit einem sehr feinem Mesh (hier: 1.240.342 Zellen) möglich. Die Dauer dieser Simulation betrug etwa 34 Stunden.

3 μ FFE-Chips – Herstellung und Betrieb

In diesem Kapitel wird die Herstellung und der Betrieb von miniaturisierten Free-Flow Elektrophorese (μ FFE) Chips beschrieben. Zuerst wird die Herstellung der Strukturseite dargestellt. Dabei wird neben den verschiedenen Chipdesigns und Materialien auch die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Zwei-Tiefen-Herstellung vorgestellt. In Abschnitt zwei werden die verschiedenen Methoden zum flüssigkeitsdichten Zusammenfügen von Chipunter- und Chipoberseite beschrieben. Abschließend werden der eigentliche Chipbetrieb, die Besonderheiten und die dafür nötigen Vorarbeiten erläutert. Teile dieses Kapitels wurden in einem Artikel in der Fachzeitschrift „Journal of Chromatography A“ veröffentlicht [94].

3.1 Herstellung von μ FFE-Chips

Im Folgenden wird die Herstellung der miniaturisierten FFE Chips beschrieben. Ein μ FFE-Chip besteht aus einer Chipoberseite, welche die eigentlichen Strukturen enthält, und einer Chipunterseite, die wie ein Boden die Strukturen in der Oberseite verschließt. Die Chipunterseite enthält keine Mikrostrukturen. Daher wird in diesem Abschnitt nur die Herstellung und Strukturierung der Chipoberseite beschrieben. Abschnitt 3.2 beschreibt anschließend das dauerhafte Verbinden von Chipunter- und oberseite. Die Herstellung ist nach Chipgenerationen unterteilt. Für jede Generation wird die Oberteilherstellung sowohl aus Glas wie auch aus dem Polymer Polydimethylsiloxan (PDMS) beschrieben.

3.1.1 Erste Generation von μ FFE-Chips

Die erste Generation von μ FFE-Chips besaß das in Abbildung 3.1a skizzierte Chipdesign. Das Ausgangsdesign und die Trennkammer waren bei allen Chips identisch. Die Anzahl der Eingangsreservoirs und der Abstand der Seitenreservoirs war jedoch, abhängig vom benutzten Trennmodus (siehe Kapitel 2), variabel. In der ersten μ FFE-Chipgeneration besaßen alle Strukturen die gleiche Tiefe.

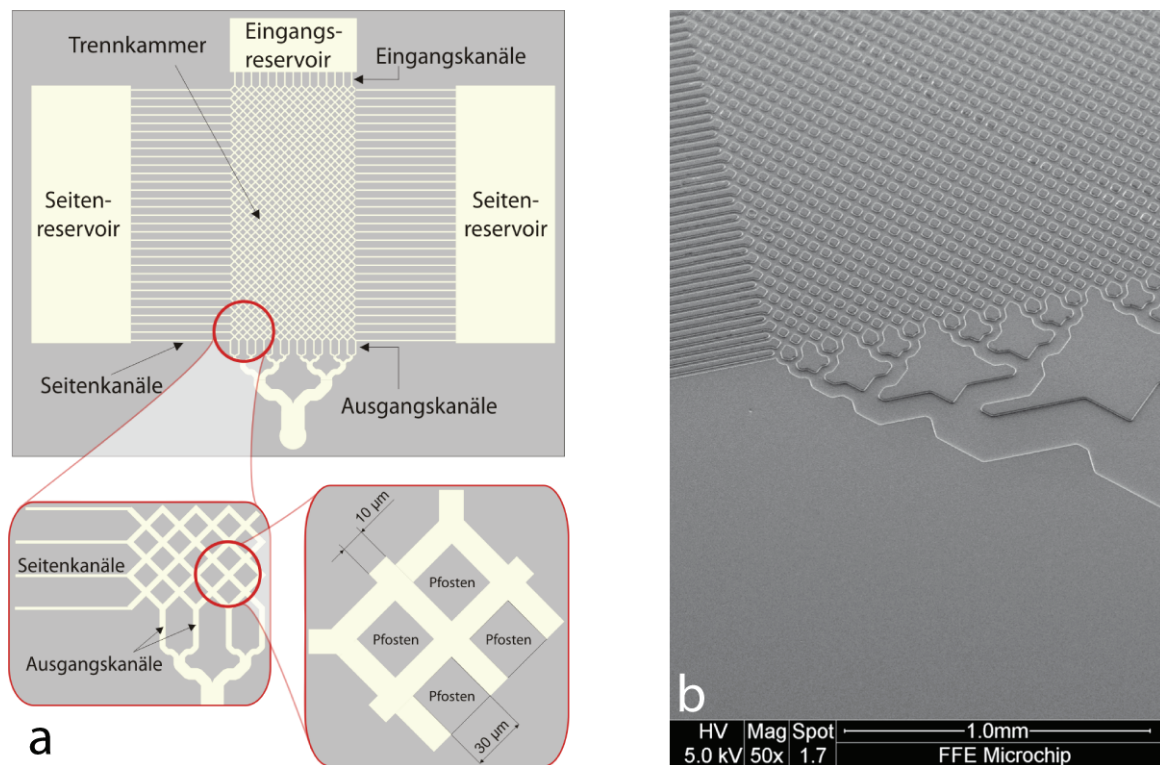


Abbildung 3.1: Skizze und Rasterelektronenmikroskop (REM)-Aufnahme der ersten Generation von μFFE-Chips. a) zeigt den schematischen Aufbau der Chips. In b) sieht man eine REM-Aufnahme des Bereichs, der in der ersten Vergrößerung in a) dargestellt ist.

Die Trennkammer war 4 mm breit und 12 mm lang. In der Kammer befanden sich 31.104 viereckige Pfosten, die man in Abbildung 3.1b sehr gut erkennen kann. Diese Pfosten waren 30 μm lang und 30 μm breit. Der Abstand zwischen zwei Pfosten beträgt 10 μm (siehe Abbildung 3.1a, zweite Vergrößerung). Die Pfosten hatten zwei Funktionen. Zum einen verlängerten sie den Weg, den die Flüssigkeit zurücklegen musste, um durch die Trennkammer zu fließen. Da die Flüssigkeit „Zick-Zack“ durch die Kammer floss, verlängert sich der Weg um den Faktor $\sqrt{2}$. Dadurch erhöhte sich die Verweilzeit der Flüssigkeit in der Trennkammer und somit auch die Verweildauer im elektrischen Feld, was in einer besseren Trennauflösung resultierte. Zum anderen verhinderten die Pfosten, dass die Trennkammer während des Bondingprozesses (siehe Abschnitt 3.2) kollabierte und der Chip dadurch unbrauchbar wurde.

An jeder Seite der Trennkammer befanden sich 222 Seitenkanäle. Jeder dieser Kanäle war 10 μm breit. Sowohl die Länge als auch die Tiefe der Seitenkanäle waren variabel.

Die Länge wurde durch die Position der Seitenreservoirs, die Tiefe der Seitenkanäle durch die Vorform beziehungsweise die Ätztiefe bestimmt.

Wie bereits erwähnt, war die Anzahl der Eingangsreservoirs variabel. In Abbildung 3.1a gibt es nur ein großes Eingangsreservoir. Es war aber kein Problem, durch eine kleine Designänderung drei getrennte Eingangsreservoirs, zum Beispiel für den Isotachophorese-Trennmodus, als Eingang zu benutzen. Insgesamt führten 64 Eingangskanäle mit einer Breite von je $10\ \mu\text{m}$ in die Trennkammer. Ebenso wie bei den Seitenkanälen waren Tiefe und Länge der Eingangskanäle variabel.

In dem Design der ersten μ FFE-Chipgeneration gab es insgesamt 64 Ausgangskanäle, durch die die Flüssigkeit die Trennkammer verließ. Wie in Abbildung 3.1 zu sehen, wurden diese 64 Ausgangskanäle durch eine spezielle Kanalstruktur zu einem Ausgangskanal zusammengefasst. Der Flüssigkeitstransport im Chip erfolgte durch Anlegen eines Unterdrucks an diesen Ausgang.

Im Folgenden werden die Prozesse erläutert, die zur Herstellung von Chipoberseiten mit dem oben beschriebenen Chipdesign nötig waren. Dabei werden sowohl die Prozesse für die Glasstrukturierung wie auch die Prozesse zur Strukturierung von PDMS beschrieben.

3.1.1.1 Glasstrukturierung der ersten μFFE-Chipgeneration

Bevor mit der eigentlichen Herstellung der strukturierten Chipoberseite begonnen werden konnte, benötigte man eine photolithographische Maske mit den Strukturen des Chipdesigns.

Herstellung der Photomaske

Zuerst wurde das Chipdesign in eine CAD-Datei umgesetzt. In dieser Arbeit wurde dazu das Programm AutoCAD der Firma Autodesk benutzt. Das in der CAD-Datei gespeicherte Design wurde dann zur Firma JD Phototools in Großbritannien geschickt, wo das Design auf eine Emulsionsfolie gedruckt wurde. Die minimale Strukturbreite, die so hergestellt werden konnte, betrug 8 μm. Da die bedruckte Folie 25 x 30 cm groß war, wurden mehrere Designs auf einer Folie zusammengefügt. Um aus der Folienmaske eine robuste Glas/Chrom-Photomaske zu machen, wurde der in Abbildung 3.2 gezeigte Prozess benutzt.

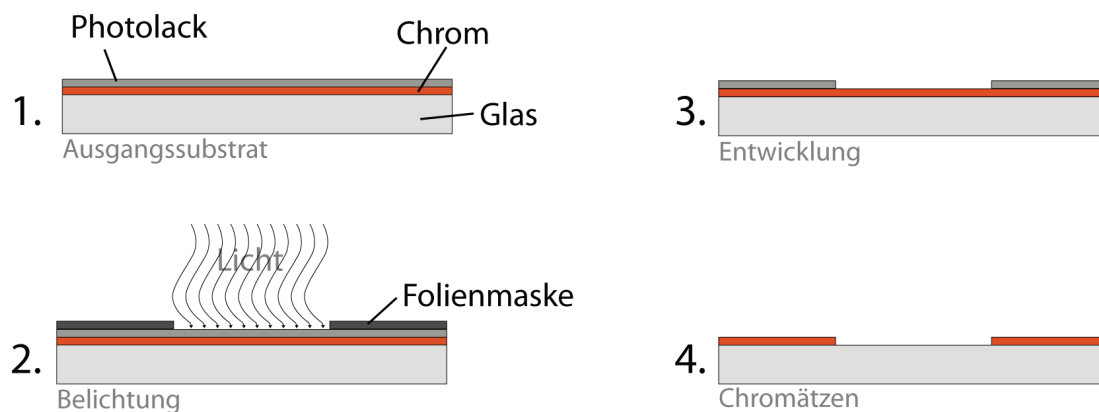


Abbildung 3.2: Herstellungsprozess für eine Glas/Chrom-Photomaske.

Im ersten Schritt wurde die Folie zerschnitten, um die einzelnen Designs zu separieren. Die Folie wurde anschließend auf eine Soda-Lime-Glasplatte gelegt, auf welche zuvor eine 100 nm dicke Chromschicht und darauf eine 530 nm dicke Schicht des Photoresist AZ 1518 aufgebracht worden waren (Abbildung 3.2-1). Anschließend wurde der Photolack durch die Folienmaske hindurch belichtet (Abbildung 3.2-2). Da nur die eigentlichen Chipstrukturen auf der Folie lichtdurchlässig waren, konnte das Licht nur an diesen Stellen die Photomaske passieren. Die Belichtung erfolgte in einem MA6-Belichter der Firma Süss. Für fünf Sekunden wurde mit einer Wellenlänge von 366 nm und einer Intensität von 20 mW/cm² belichtet. Damit die dünne Folienmaske

homogen auf der Photolackschicht liegen konnte, wurde auf die Folienmaske eine Glasplatte gelegt. Nach der Belichtung wurde der Photolack unter Verwendung des Entwicklers Microposit 351 für 45 bis 60 Sekunden entwickelt. An den belichteten Stellen löste sich der Photolack während der Entwicklung und legte dort die Chromschicht frei (Abbildung 3.2-3). Anschließend wurde das freigelegte Chrom mit Hilfe der Chromätze Chrome Etch 18 entfernt. Im letzten Schritt wurde der verbleibende Photolack durch Aceton und den Remover AZ 100 entfernt. Damit sind die Strukturen der Folienmaske in die Chromschicht übertragen worden (Abbildung 3.2-4). Diese Chrom/Glas-Photomaske wurde nun im Weiteren zum photolithographischen Transfer des Designs benutzt.

Herstellung der Strukturseite

Die Herstellung beziehungsweise Strukturierung der Chipoberseiten der ersten Chipgeneration folgte dem Prozessschema in Abbildung 3.3.

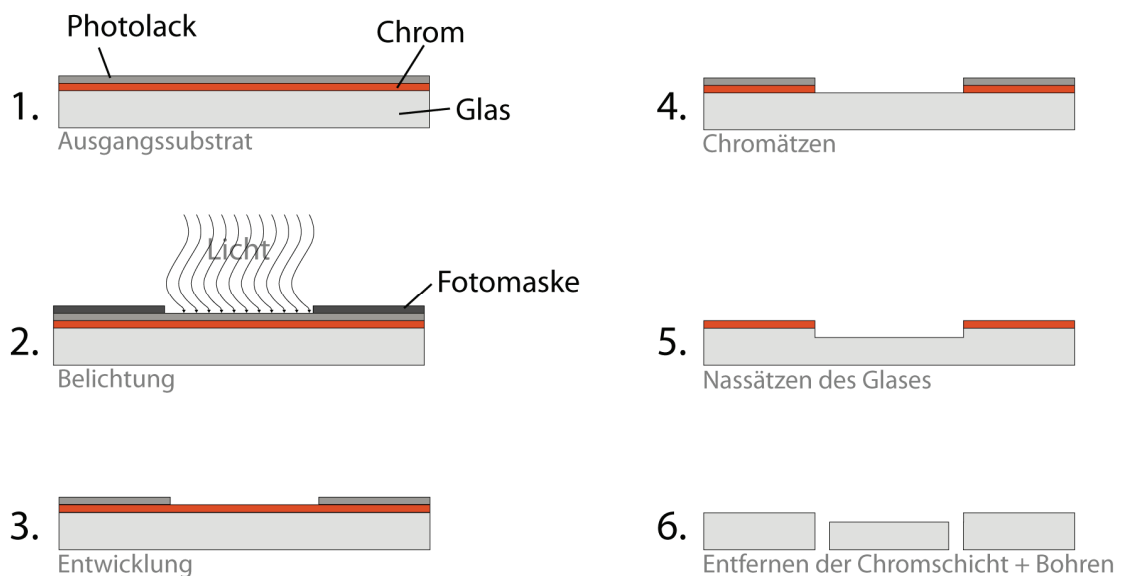


Abbildung 3.3: Prozessschema für die Strukturierung der Glasoberseiten der ersten Chipgeneration.

Nach sechs Prozessschritten war die Herstellung der Chipoberseiten beendet. In dem oben gezeigten Schema sind allerdings die nach jedem Prozessschritt folgende Reinigung des Substrates mit deionisiertem Wasser und die anschließende Trocknung mit Stickstoff nicht erwähnt. Die oben gezeigten Prozessschritte werden im Folgenden

näher erläutert. Der ganze Prozess fand in einem Gelbraum im Reinraum statt, um eine ungewollte Belichtung des Photolackes durch Tageslicht zu verhindern.

Als Grundsubstrat diente eine 1,1 mm dicke Soda-Lime Glasplatte. Diese wurde, ähnlich wie bei der Photomaschinenherstellung, mit einer 100 nm dicken Chromschicht beschichtet. Auf die Chromschicht wurde eine etwa 530 nm dicke Schicht des Photolackes AZ 1518 aufgebracht (Abbildung 3.3-1).

Im nächsten Schritt erfolgte der Transfer der Strukturen von der Photomaschine in den Photolack (Abbildung 3.4).

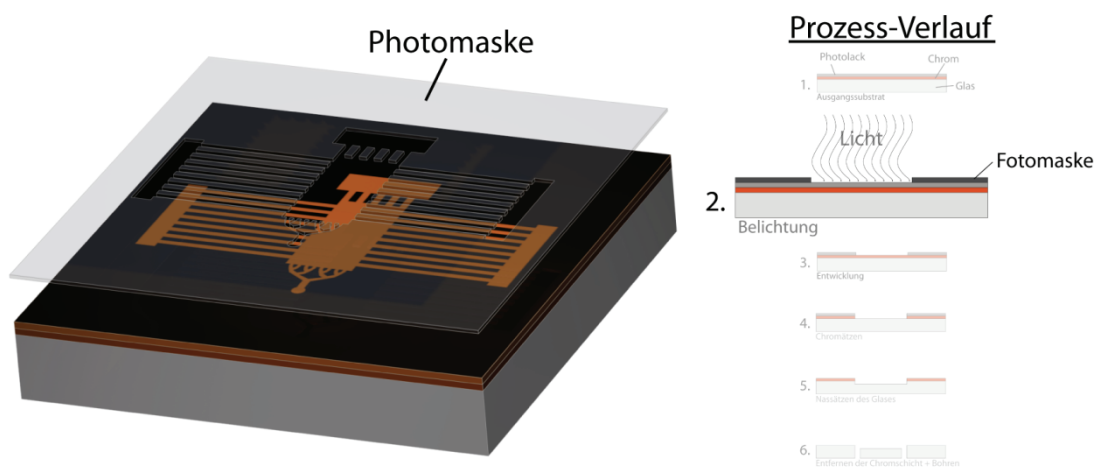


Abbildung 3.4: Skizze der Photolackbelichtung durch die zuvor hergestellte Photomaschine. Zur besseren Visualisierung wurde die Photomaschine in einem Abstand zum Photolack dargestellt. Während der eigentlichen Belichtung lag die Photomaschine auf der Photolackschicht auf.

Dazu wurde die Photomaschine auf das Substrat gelegt und angedrückt. Diese Belichtungsform wird Kontaktbelichtung genannt. Das Verfahren bietet eine sehr hohe Auflösung, da der Auflösungsverlust durch Lichtbeugung nur durch die Dicke der Photolackschicht bestimmt wird. Allerdings kann die Photomaschine beim Kontakt mit dem Substrat, zum Beispiel durch Kratzer, beschädigt werden. Außerdem kann die Maske durch die Kontaktbelichtung verschmutzt werden. Damit sich diese Nachteile nicht auf die Qualität der Belichtungen auswirkten, wurde mit einer Kopie der Master-Photomaschine gearbeitet. Falls die Kopie beschädigt wurde, konnte von der Master-Maschine eine neue Kopie erstellt werden.

Die Belichtung erfolgte in einer LV202E UV-Box der Firma Mega Electronics. In der Box befanden sich zwei UV-Röhren mit einer Gesamtleistung von 16 Watt. Zum Übertrag der Strukturen musste, abhängig von der Dicke und dem Alter des Photolacks, etwa 55 Sekunden belichtet werden. Mit zunehmenden Photolackalter war eine längere Belichtungsdauer notwendig. Nach der Belichtung erfolgte die Entwicklung des Photolacks (Abbildung 3.5).

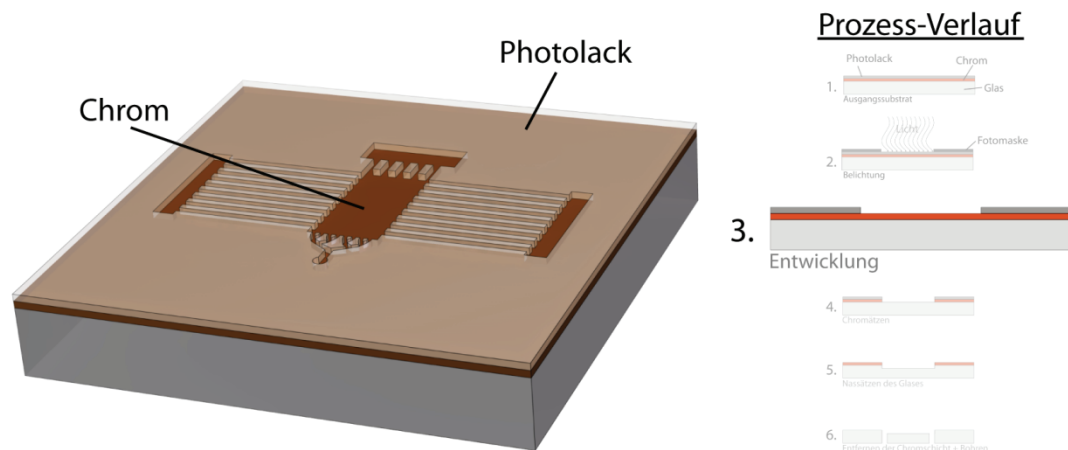


Abbildung 3.5: Entwicklung des belichteten Photolackes (Skizze).

Da der Photolack AZ 1518 ein Positivresist ist, wurden die belichteten Stellen des Photolacks durch den Entwickler abgelöst. Dazu wurde das komplette Substrat in eine Entwicklerlösung eingetaucht. Als Entwickler wurde Microposit 351 der Firma Shipley benutzt und zur Herstellung der Entwicklerlösung 1:5 mit deionisiertem Wasser verdünnt. Abhängig vom Alter der Entwicklerlösung dauerte die Entwicklung zwischen 60 und 120 Sekunden. Danach war die Chromschicht an den belichteten Stellen freigelegt (Abbildung 3.6).

Damit beim nasschemischen Ätzen des Glases mit Flußsäure nur an den gewünschten Stellen geätzt wurde, musste die Chromschicht als Ätzmaske benutzt werden (Abbildung 3.6). Der Photolack allein reichte nicht als Ätzmaskierung, da er sich nach etwa drei Minuten in der Flußsäure auflöste. Die Chromschicht hingegen war resistent gegenüber der Flußsäure und diente somit als Ätzmaske.

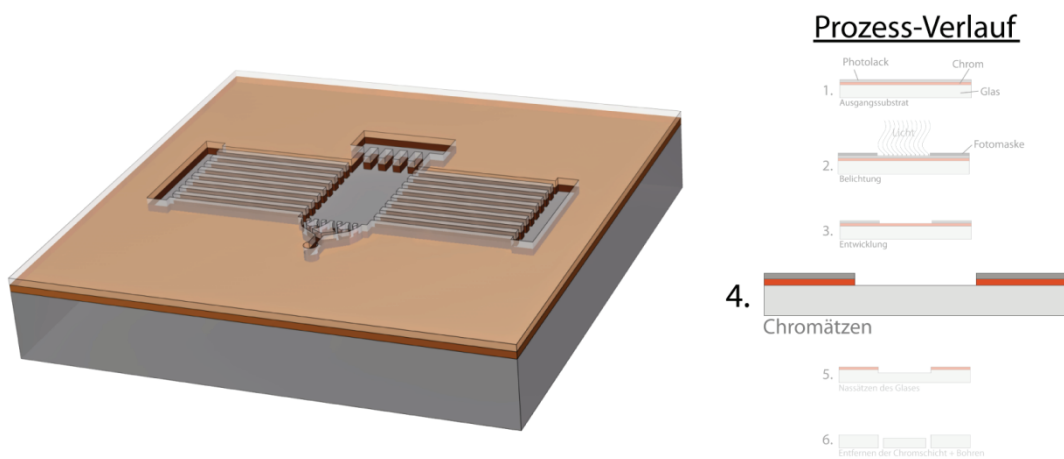
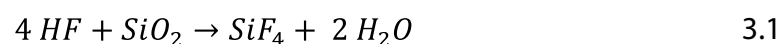


Abbildung 3.6: Ätzen der Chromschicht auf der Glasplatte. Die so strukturierte Chromschicht diente als Ätzmaske für das nun folgende nasschemische Ätzen des Glases mit Flußsäure.

Nach dem Freilegen der Chromschicht an den im Photolack belichteten Stellen erfolgte nun das Ätzen der Chromschicht. Dazu wurde das komplette Substrat in die Chromätze „Chrome Etch 18“ der Firma OrganoSpezialChemie GmbH getaucht. Nach etwa zwei Minuten hatte sich das Chrom an den freigelegten Stellen aufgelöst. Damit waren die Strukturen aus der Photomaske nun in die als Ätzmaske fungierende Chromschicht übertragen worden.

Im nun folgenden Schritt erfolgte die eigentliche Strukturierung des Glases. Dazu wurde das komplette Glassubstrat in Flußsäure gelegt. Flußsäure ist die wässrige Lösung von Fluorwasserstoff (HF). Kommt die Säure mit Glas in Berührung, so bildet sich Siliciumtetrafluorid:



Dieses Siliciumtetrafluorid bildet mit weiterem Fluorwasserstoff die wasserlösliche Hexafluorokieselsäure:



Aufgrund dieser Reaktionen wird das Glas geätzt. Das nasschemische Glasätzen mit Flußsäure ist ein isotroper Ätzprozess, bei dem kein gerichtetes Ätzen in eine Richtung stattfindet, sondern die Flußsäure das Glas in alle Raumrichtungen gleich stark ätzt. Dadurch entstehen halbrunde Ätzprofile der Strukturen (siehe Abbildung 3.7).

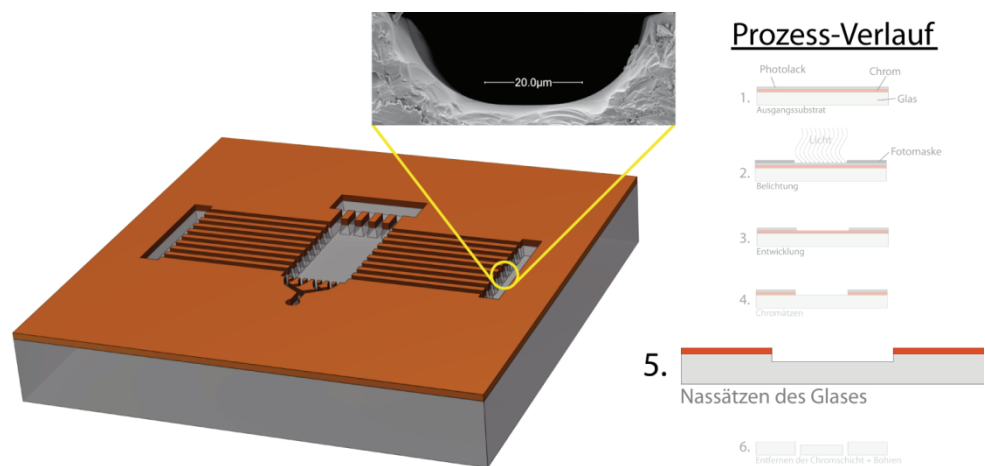


Abbildung 3.7: Strukturierung der Glasplatte durch nasschemisches Ätzen mit Flußsäure. Durch das isotrope Ätzen besaßen die Strukturen halbrunde Ätzprofile.

Durch das isotrope Ätzen verbreitern sich die Strukturen um die doppelte Ätztiefe. Die μ FFE-Chips der ersten Generation wurden 17 μm tief geätzt. Besaß zum Beispiel ein Seitenkanal in der Chromschicht eine Breite von 10 μm , so war der geätzte Kanal im Glas 44 μm breit (10 μm Maskenbreite plus 17 μm zusätzliche Breite an jeder Kanalseite). Zum Ätzen wurde eine gepufferte Flußsäure verwendet. Eine gepufferte HF-Lösung beinhaltet neben der Flußsäure auch noch eine weitere Säure, um die beim Glasätzen entstehenden Reaktionsprodukte weiter abzubauen. Hier wurde eine 4%ige Flußsäure-Lösung, gepuffert mit einer ebenfalls 4%igen Salpetersäure, zum Ätzen des Glases verwendet. Um die schon erwähnte Strukturtiefe von 17 μm zu erreichen, musste das Substrat zwischen 17 und 42 Minuten in der Flußsäure verbleiben. Je häufiger mit der gleichen HF-Lösung geätzt wurde, desto geringer wurde die Ätzrate der Lösung und dementsprechend verlängerte sich die Ätzdauer.

Nach dem Ätzen der Strukturen wurden in die Chipoberseite die Anschlusslöcher für die Kanäle und die Öffnungen für die Flüssigkeitsreservoirie gebohrt. Dazu wurde eine Bohrmaschine der Firma Proxxon verwendet, als Bohrer wurde ein Diamant-Schleifstift mit einem Durchmesser von einem Millimeter benutzt. Anschließend wurden die Kanten der Bohrlöcher mit einem Schleifkopf geglättet.

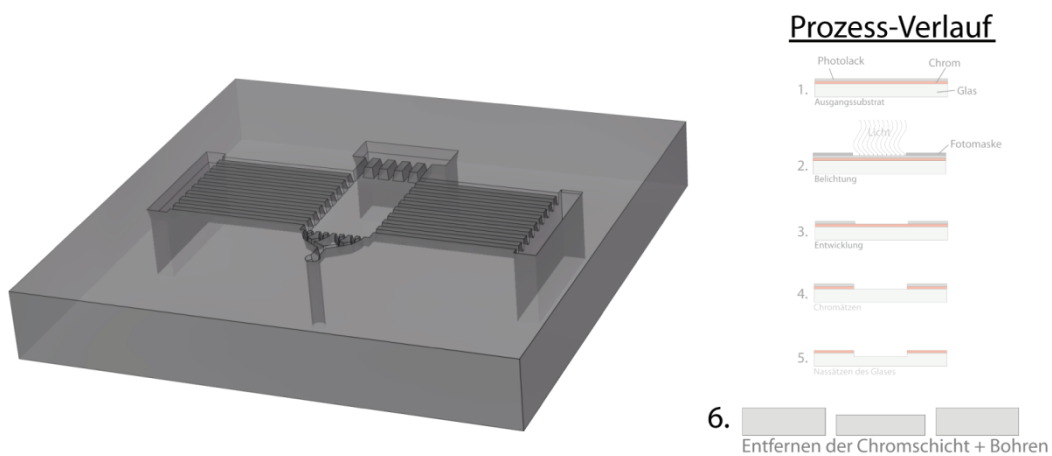


Abbildung 3.8: Fertige Chipunterseite nach dem Bohren der Anschlusslöcher und entfernen der Chromschicht.

Nach dem Bohren wurde die restliche Chromschicht mit Chromätze von der Glasplatte entfernt. Damit war die Strukturierung der Glaschipoberseite abgeschlossen (Abbildung 3.8).

3.1.1.2 PDMS-Strukturierung der ersten μ FEE-Chipgeneration

Bei der Herstellung der Strukturseite eines μ FEE-Chips aus PDMS wurden die Strukturen durch Abformung von einer Photolack-Vorform in das PDMS übertragen. Damit war die eigentliche Herstellung der PDMS-Oberseiten relativ einfach und schnell durchzuführen. Im Vergleich zur Herstellung aus Glas wurde aber eine Vorform zur Abformung benötigt, welche durch die in Abbildung 3.9 gezeigten Prozessschritte hergestellt wurde.

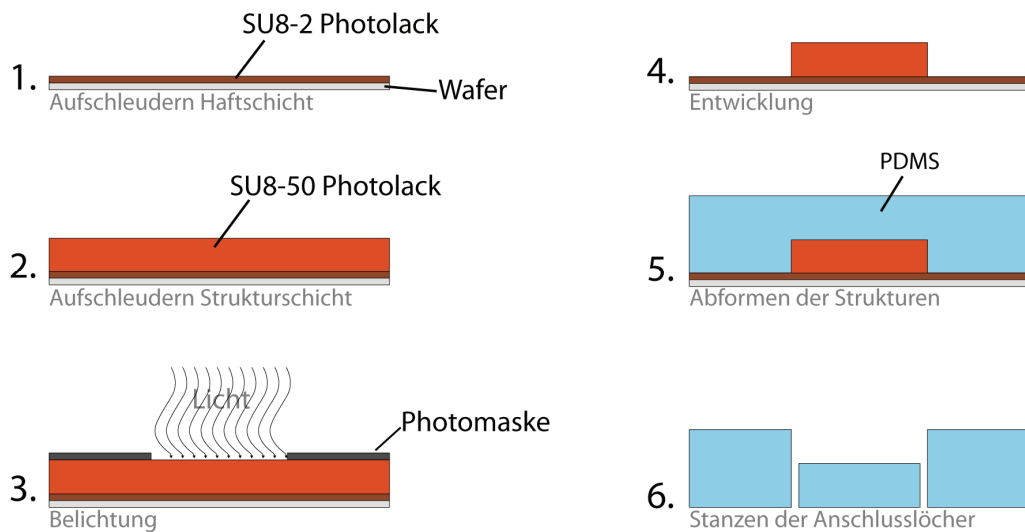


Abbildung 3.9: Prozessschritte zur Herstellung einer strukturierten Chipunterseite aus PDMS. Die Schritte 1 bis 4 sind Bestandteil der Vorformherstellung, die Abformung erfolgt in Schritt 5. In Schritt 6 werden die Reservoirs und Anschlusslöcher hergestellt.

Für die Vorformherstellung wurde der Negativphotolack SU-8 der Firma MicroChem Corp. verwendet. Der Photolack wurde durch Aufspleuern in einer Lackschleuder auf das Substrat aufgebracht. Der Lack besteht aus drei Bestandteilen [95]: Harz, Lösungsmittel und der photoempfindlichen Komponente. EPON-Resin, ein Epoxidharz, dient als Grundharz. Das Harz ist in dem Lösungsmittel γ -Butyrolacton gelöst. Triarylsulfoniumhexafluor-antimonat ist die photoempfindliche Komponente, die durch UV-Licht eine Quervernetzung der Lackmoleküle, und damit ein Härten des Photolacks, auslöst. SU-8 ist in verschiedenen Viskositäten verfügbar. Die zu erreichende Lackdicke ist von der Viskosität abhängig. Die Schichtdicke, gemessen in μm , die bei einer Schleuderdrehzahl von 3000 Umdrehungen pro Minute erreicht wird, dient als Bezeichnung des jeweiligen SU-8 Typs. Bei der hier beschriebenen Vorformherstellung wurden die Photolacke SU-8-2 und SU-8-50 verwendet, mit denen

sich Schichtdicken von 2 μm beziehungsweise 50 μm bei einer Schleuderdrehzahl von 3000 Umdrehungen pro Minute erzeugen lassen. Durch Veränderung der Schleuderdrehzahl kann die Schichtdicke verändert werden. Die benötigte Drehzahl für eine bestimmte Lackdicke kann aus den in Abbildung 3.10 gezeigten Schleuderkurven abgelesen werden [96, 97].

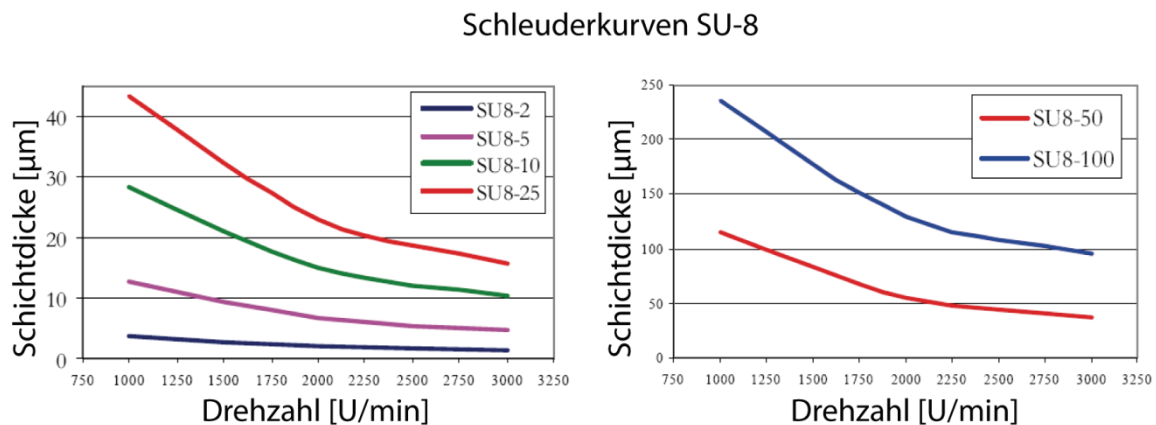


Abbildung 3.10: Schleuderkurven für verschiedene SU-8 Versionen (Herstellerangaben).

Als Grundlage für die Vorform diente ein 6" Siliziumwafer (Abbildung 3.9-1). Auf diesen Wafer wurden in den folgenden Prozessschritten verschiedene Photolacke aufgeschleudert und strukturiert. Damit die eigentliche Strukturlackschicht besser auf dem Wafer haften konnte, wurde eine dünne Haftschiicht aus SU-8-2 Lack als Grundlage auf den Wafer geschleudert. Dazu wurde der Wafer mit Hilfe eines Vakuum-Aufsatzes in der Lackschleuder fixiert. Abhängig von der Größe des Wafers wurde nun eine bestimmte Menge SU-8-2 Lack in die Mitte des Wafers gegeben (1ml Lack pro Größenzoll des Wafers). Im nun folgenden Anschleudern wurde der Lack auf dem Wafer verteilt. Dazu beschleunigte die Lackschleuder den Wafer in 2,5 Sekunden auf 500 Umdrehungen pro Minute (U/min). Diese Geschwindigkeit wurde anschließend für weitere 5,5 Sekunden gehalten. Danach erfolgte ohne Unterbrechung das Ausschleudern des Lackes auf die gewünschte Schichtdicke. Dazu beschleunigte die Lackschleuder den Wafer auf 3500 U/min. Nach 40 Sekunden beträgt die Lackdicke circa 1,5 μm . Der belackte Wafer wurde nun für den sogenannten Softbake aus der Lackschleuder genommen und für zwei Minuten auf eine 95 °C heiße Heizplatte gelegt, um das Lösungsmittel zu verdampfen und so die Lackschicht zu verfestigen. Da SU-8 ein Negativphotolack ist, wurden vom Lackentwickler nur die unbelichteten

Stellen abgelöst. Da die Haftschrift aber komplett erhalten bleiben musste, wurde der Photolack nach dem Softbake auf dem MA6-Belichter für zehn Sekunden komplett flutbelichtet. Während der Belichtung wurde die photoempfindliche Komponente des SU8-2 in eine Säure umgewandelt. Anschließend erfolgte auf einer Heizplatte für zwei Minuten bei 95 °C der Post Exposure Bake (PEB). Dabei induzierte die während der Belichtung entstandene Säure die Polymerisation im Photolack. Nach dem Abkühlen des Wafers war die Herstellung der Haftschrift abgeschlossen und die Strukturschicht konnte nun aufgeschleudert werden. Die Dicke der Strukturschicht bestimmte die spätere Höhe der Strukturen im μ FEE-Chip. Damit die gewünschte Höhe von etwa 20 μ m erreicht werden konnte, wurde eine Lackmenge von 10 ml verwendet. Da die Viskosität des SU-8-50 Lackes, welcher für die Strukturschicht verwendet wurde, höher war als die des SU-8-2, musste die Anschleuderphase auf 15 Sekunden bei 500 U/min verlängert werden. Das anschließende Ausschleudern des Lackes erfolgte bei 3500 U/min für 40 Sekunden. Danach beträgt die Schichtdicke der Strukturschicht etwa 20 μ m (Abbildung 3.11).

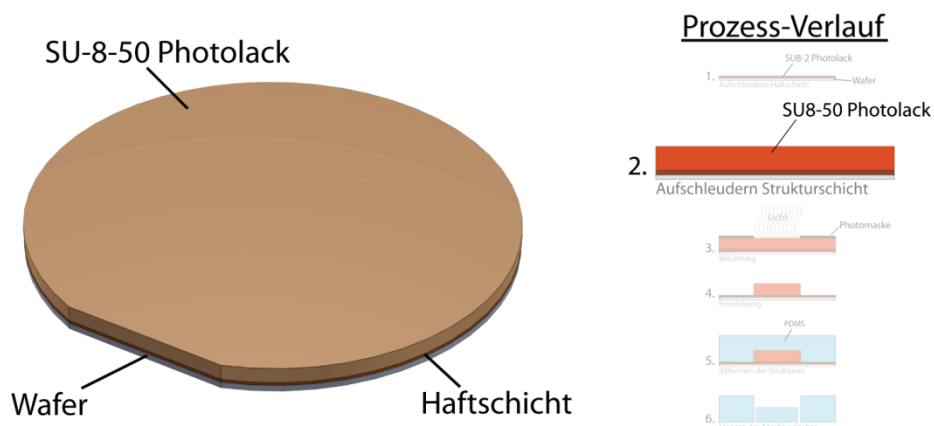


Abbildung 3.11: Wafer nach Aufschleudern der Haftschrift und der Strukturschicht. Die Haftschrift war circa 1,5 μ m dick und bildete die Grundlage für die etwa 20 μ m dicke Strukturschicht.

Die Dicke konnte in Abhängigkeit vom Alter des Photolackes, die Anzahl der Lackentnahmen aus der Vorratsflasche sowie der Temperatur und der Luftfeuchtigkeit variieren. Bei einer zu starken Abweichung der Schichtdicke wurde der SU-8-50 Lack entfernt und das Aufschleudern der Strukturschicht wiederholt. Nach dem Ausschleudern erfolgte der Softbake.

Dabei wurde der belackte Wafer erst für drei Minuten auf eine 62 °C warme Heizplatte gelegt, direkt anschließend wurde die Heizplatte auf 95 °C hochgeheizt.

Nach zehn Minuten bei 95 °C wurde der Wafer von der Heizplatte genommen und langsam abgekühlt. Nun erfolgte die Belichtung der Strukturschicht.

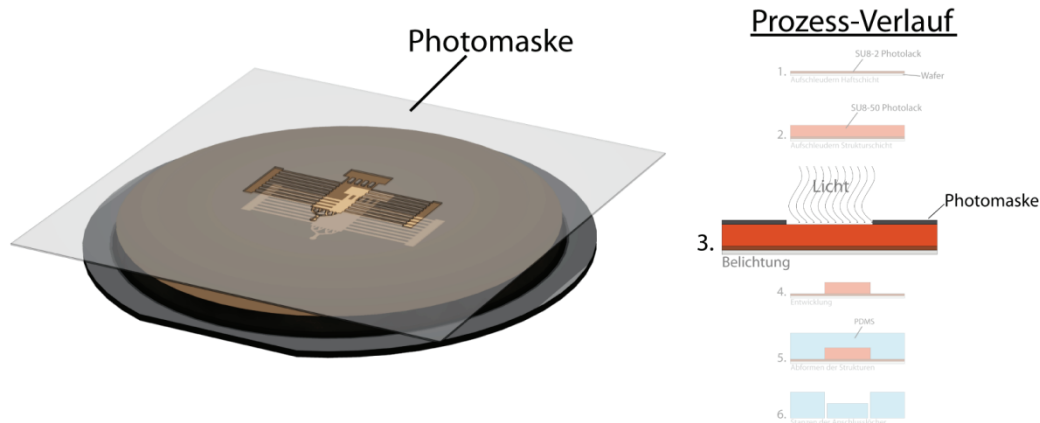


Abbildung 3.12: Belichtung der Strukturschicht mit Hilfe einer Photomaske. Zur besseren Visualisierung ist zwischen Lackschicht und Photomaske ein Abstand belassen worden. Während der echten Belichtung lag die Maske auf dem Photolack auf.

Dazu wurde, ähnlich wie bei der Glasstrukturierung, der Photolack durch eine Photomaske (siehe Abschnitt 3.1.1) belichtet (Abbildung 3.12). Zur besseren Darstellung ist in Abbildung 3.12 zwischen Photomaske und Lackschicht ein Abstand belassen worden. Die echte Belichtung auf dem MA6-Belichter erfolgte durch Kontaktbelichtung (siehe 3.1.1.1). Dabei wurde die Photomaske auf den Photolack gedrückt. In Abbildung 3.12 erkennt man außerdem, dass die Randbereiche der beiden Photolackschichten entfernt worden sind. Dies war nötig, da während des Aufschleuderns des Photolacks an den Waferkanten eine Randwulst entstand. Diese Wulst war höher als die eigentliche Lackoberfläche. Bei der Kontaktbelichtung läge die Maske auf der Randwulst auf und die Qualität der Belichtung wäre dadurch verringert. Zur Entfernung der Randwulst wurde der Wafer bei 1500 U/min in der Lackschleuder rotiert und der Waferrand mit Aceton abgespült. Nach der Randwulstentfernung wurde der belackte Wafer über Nacht gelagert, damit im Lack eine Relaxation stattfinden konnte. Das verhinderte ein Kleben des Photolacks an der Photomaske.

Zur Übertragung der Strukturen in die Strukturschicht wurde sieben Sekunden lang belichtet. Der anschließende PEB war, wie der Softbake auch, in zwei Schritte unterteilt. Zuerst wurde der belichtete Wafer für drei Minuten auf 62 °C und anschließend für zehn Minuten auf 95 °C erwärmt. Danach wurde der belichtete Wafer von der Heizplatte genommen und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Der nächste Schritt war die Entwicklung der belichteten Strukturlackschicht.

Zur Entwicklung der Strukturlackschicht wurde der Entwickler mr-DEV 600 der Firma MicroResist verwendet. Dazu wurde der komplette Wafer nach dem Abkühlen für fünf Minuten in ein Entwicklerbad gelegt. Eine Feinentwicklung wurde durch portionsweises Abschleudern des Entwicklers auf der Lackschleuder erreicht. Nach der Entwicklung waren von der Strukturschicht nur noch die belichteten Bereiche übrig (Abbildung 3.13).

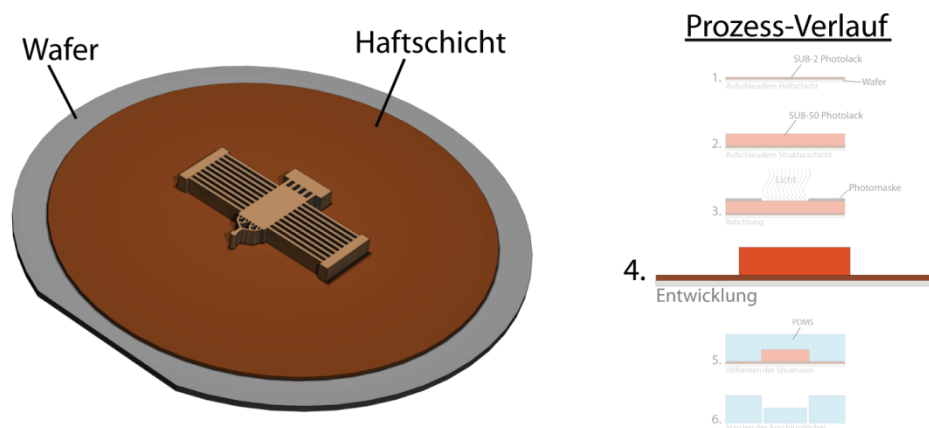


Abbildung 3.13: Nach der Belichtung und Entwicklung der Strukturschicht blieben nur noch die belichteten Bereiche der Strukturschicht übrig.

Um nun die thermische, chemische und physikalische Stabilität der Lackstrukturen zu erhöhen, wurde ein Hardbake durchgeführt. Dazu wurde der Wafer einmal auf 160 °C aufgeheizt und anschließend an der Raumluft abkühlen gelassen, bis er Raumtemperatur erreicht hatte. Das langsame Abkühlen verhinderte die Bildung von Spannungen im Lack, welche zu Rissen in den Lackstrukturen hätten führen können. Nach dem Hardbake wurde der komplette Wafer noch mit Hexamethyldisilazan (HMDS) beschichtet. Normalerweise wird HMDS zur Verbesserung der Haftung von Photolacken auf Halbleiteroberflächen verwendet [98]. Bei der PDMS-Abformung hingegen erleichterte eine HMDS-Behandlung der Strukturen das Abziehen

beziehungsweise Abformen des PDMS vom Wafer. Nach dem Aufdampfen des HMDS war die Vorformherstellung abgeschlossen.

Mit der fertigen Vorform konnte nun die eigentliche PDMS-Chipoberseite hergestellt werden. Polydimethylsiloxan (PDMS) ist ein additionsvernetzendes, anorganisches Polymer auf Siliziumbasis. In dieser Arbeit wurde das Produkt Sylgard 184 der Firma Dow Corning benutzt. Es besteht aus zwei viskosen Komponenten, der Basiskomponente und dem Härter. Mischt man die beiden Komponenten, so startet der Vernetzungsprozess, und das PDMS beginnt auszuhärten. Damit eine vollständige und gleichmäßige Vernetzung stattfinden kann, muss das Mischungsverhältnis richtig gewählt werden. In diesem Fall lag das vom Hersteller angegebene Mischungsverhältnis bei 1:10 (Härter : Basiskomponente). Nach dem Start der Vernetzung härtete das PDMS, abhängig von der Menge des Materials, nach etwa 48 Stunden bei Raumtemperatur aus. Der Vernetzungsprozess ließ sich aber durch Wärmezufuhr beschleunigen.

Da durch das Mischen der beiden Materialkomponenten Luftblasen im PDMS-Gemisch entstanden, diese Luftblasen aber eine fehlerfreie Abformung behindern konnten, wurden die Luftblasen mit Hilfe eines Vakuums aus dem noch flüssigen PDMS entfernt. Das entgaste PDMS-Gemisch wurde dann über die Vorform gegossen und verteilte sich so zwischen den Lackstrukturen. Dabei lag die Vorform auf einer Heizplatte.

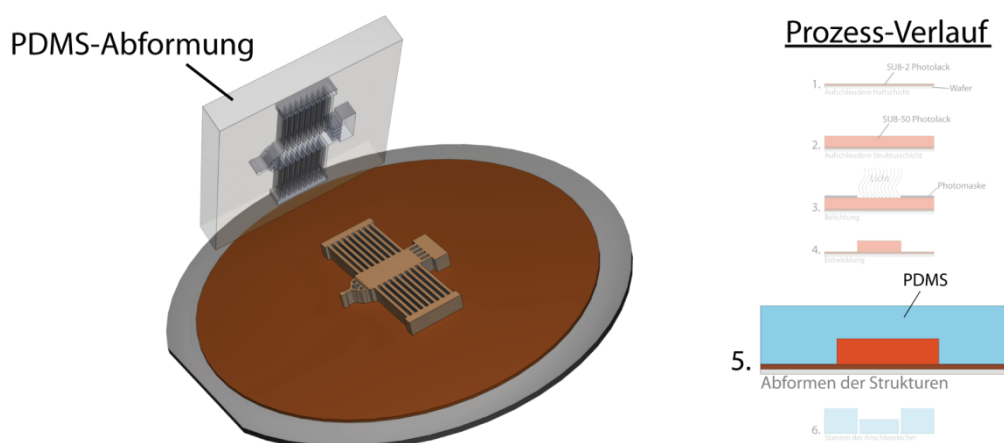


Abbildung 3.14: Abformung des PDMS von der Vorform. Die Strukturen der Lackschicht sind in das PDMS übertragen worden, wobei Stege der Lackschicht als Gräben in die PDMS-Abformung übertragen wurden.

Nachdem sich das flüssige PDMS, begrenzt durch einen Gießrahmen, auf dem Wafer verteilt hatte, wurde die Heizplatte auf etwa 100 °C aufgeheizt. Durch die hohe Temperatur war das PDMS nach circa zehn Minuten komplett vernetzt und konnte nun von der Vorform entfernt werden (Abbildung 3.14). Das ausgehärtete PDMS ist farblos, transparent und flexibel. Beim Entfernen des PDMS von der Vorform musste behutsam vorgegangen werden, da sonst eventuell feine Stege der Lackschicht abbrechen beziehungsweise beschädigt werden konnten.

Im letzten Schritt wurden die Reservoirs und das Anschlussloch am Chipausgang aus der Abformung geschnitten beziehungsweise gestanzt.

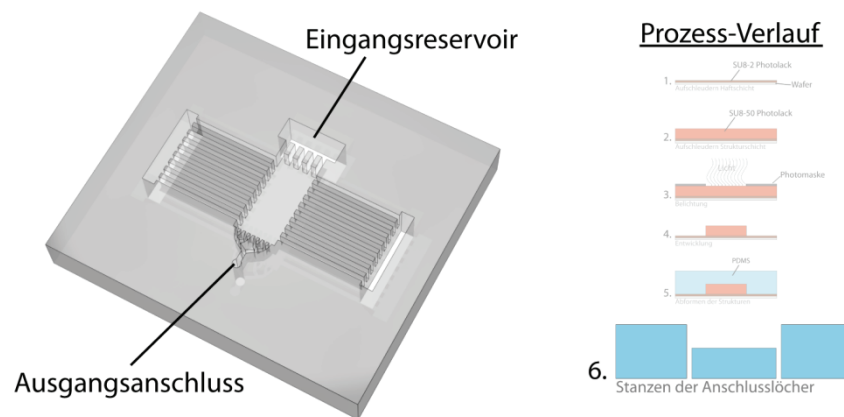


Abbildung 3.15: Fertige PDMS Chipunterseite. Nach dem Abformen wurden noch die Reservoirs aus dem PDMS geschnitten und der Ausgangsanschluss aus dem PDMS gestanzt.

Zum Stanzen wurde ein am ISAS – Institute for Analytical Sciences entwickelter Aufbau verwendet [99]. Dabei wurde eine Kabelendhülse durch das PDMS gedrückt, die so das Anschlussloch erzeugte. Durch Wechseln der Kabelendhülse ließen sich verschieden große Löcher in das PDMS stanzen. Die Eingangs- und Seitenreservoirs wurden mit Hilfe eines Skalpellens aus dem PDMS herausgeschnitten. Dabei war zu beachten, dass die Reservoirs Kontakt mit den Fluidikkanälen haben, welche das Reservoir mit der Trennkammer verbanden. Nach dem Stanzen des Ausgangsanschlusses und dem Schneiden der Reservoirs war die Herstellung der Chipoberseite aus PDMS abgeschlossen.

3.1.2 Zweite Generation von μFFE-Chips

Nach einigen Experimenten zeigte sich, dass die μFFE-Chips der ersten Generation einige Nachteile im Betrieb aufwiesen. Der größte Nachteil bestand darin, dass mit den Chips der ersten Generation kein Überdruckbetrieb möglich war. Im Überdruckbetrieb wird die Flüssigkeit nicht durch einen Unterdruck am Chipausgang durch den Chip transportiert, sondern die Flüssigkeit wird durch einen Überdruck an den Eingängen durch den Chip bewegt. Dieser Überdruck kann durch Spritzenpumpen an den Chipeingängen sehr einfach erzeugt werden. Zwei Eigenschaften der ersten Chipgeneration verhinderten den Überdruckbetrieb. Zum einen war keine geeignete Eingangskonfiguration vorhanden, da an die Eingangsreservoirs kein Überdruck angelegt werden konnte. Dieses Problem konnte zwar durch eine Designveränderung der Eingänge gelöst werden, allerdings gab es immer noch die zweite Eigenschaft, die einen Überdruckbetrieb verhinderte. Wurde ein Chip der ersten Generation mit Überdruck betrieben, so verließ der Probenstrom die Trennkammer nicht durch die Ausgangskanäle, sondern wurde durch die Seitenkanäle aus der Kammer gedrückt. Da die Seitenkanäle dieselbe Tiefe wie die Trennkammer besaßen, war der hydrodynamische Widerstand der Seitenkanäle nicht hoch genug, um zu verhindern, dass die Flüssigkeit die Trennkammer durch die Seitenkanäle verlässt. Eine genauere Erläuterung der Probleme, die im Betrieb der ersten Chipgeneration auftraten, sind in Abschnitt 3.3.3 beschrieben.

Um die oben genannten Probleme zu lösen, wurde eine neue Generation von μFFE-Chips entwickelt. Die wichtigste Neuerung im Vergleich zur ersten Generation waren die sehr flachen Seitenkanäle. Die Seitenkanäle besaßen nicht mehr die gleiche Tiefe wie die Trennkammer, sondern waren deutlich flacher. So besaß die Trennkammer eine Tiefe von 17,5 μm, die Seitenkanäle waren aber nur 1,5 μm tief. Dadurch erhöhte sich der hydrodynamische Widerstand der Seitenkanäle sehr stark und so konnte eine Leckage durch die Seitenkanäle verhindert werden. Durch optimierte Herstellungsprozesse war es möglich, das komplette Zwei-Tiefen-Design in der Chipoberseite zu integrieren und so Glas- wie auch die PDMS-Chipoberseiten mit zwei verschiedenen Strukturturen herzustellen.

Wie schon erwähnt, wurde neben der Herstellungsoptimierung auch das Design der zweiten μ FFE-Chipgeneration verändert. Abbildung 3.16 zeigt das neue, optimierte Chipdesign der zweiten Chipgeneration.

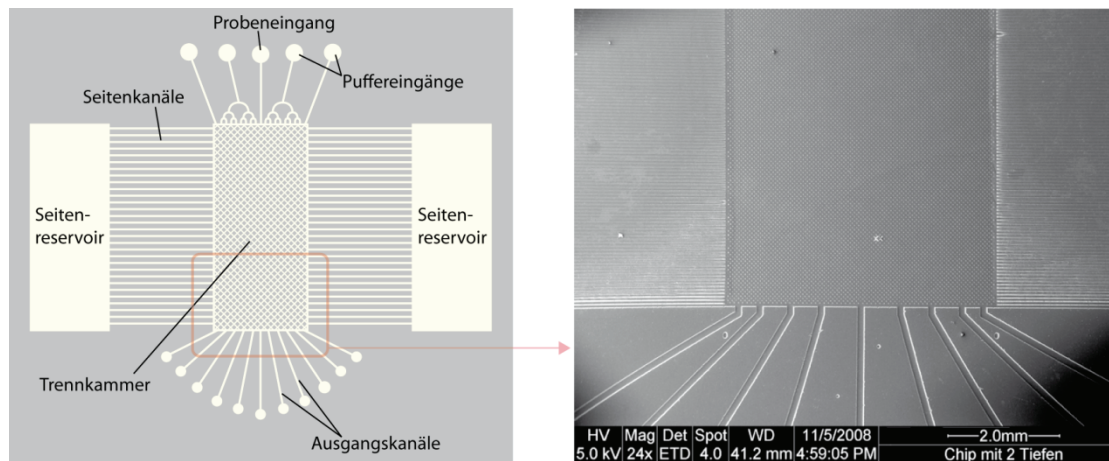


Abbildung 3.16: Schematische Designübersicht der zweiten Generation der μ FFE-Chips. Die Rasterelektronenmikroskopaufnahme zeigt die Ausgänge und den unteren Teil der Trennkammer.

Ein Vergleich zwischen den Chipgenerationen (Abbildung 3.1 und Abbildung 3.16) lässt sofort die Designunterschiede erkennen. Die zweite Chipgeneration besaß insgesamt fünf Chipeingänge. Dabei waren die beiden äußeren Puffereingänge und der Probeneingang jeweils Ein-Kanal-Eingänge, das heißt es fand keine Kanalverästelung statt, sondern von diesen Eingängen führte nur ein Kanal direkt in die Trennkammer. Die Puffereingänge links und rechts vom Probeneingang hingegen wurden durch eine sich verästelnde Kanalstruktur auf jeweils 32 Kammereingangskanäle aufgeteilt. Die Verästelung besaß 6 Stufen. Jeweils zwei Kanäle der unteren Ebene wurden zu einem doppelt so breiten Kanal zusammengefasst. Insgesamt besaß die Trennkammer 65 Eingangskanäle. Alle 65 Eingangskanäle der Trennkammer waren in der Photomaske $10\ \mu\text{m}$ breit. Die endgültige Breite im Chip war abhängig von der Ätztiefe (siehe Kapitel 3.1.1.1).

Die Anzahl der Seitenkanäle war mit 222 Seitenkanälen pro Kammerseite gleich geblieben. Jeder Seitenkanal besaß in der Photomaske eine Breite von $10\ \mu\text{m}$. Eine größere Anzahl von Seitenkanälen wäre aber möglich gewesen, da die Seitenkanäle nur wenige μm tief isotrop geätzt werden sollten und dadurch die Kanalverbreiterung auch nur wenige μm betrug. Während die Seitenkanäle der ersten Chipgeneration

nach dem 17 μm tiefen isotropen Ätzen etwa 42 μm breit waren, sollten die Seitenkanäle der zweiten Generation nur etwa 1,5 μm tief geätzt werden. Nach dem Ätzen ergab sich so eine Kanalbreite von 13 μm . Die Länge der Seitenkanäle war, abhängig von der Position der Seitenreservoirs, variabel.

Das Design der Ausgangskanäle wurde ebenfalls verändert. Die Trennkammer im Design der ersten Chipgeneration besaß 64 Ausgangskanäle, die zu einem großen Kanal zusammenliefen. In der zweiten Chipgeneration wurden neun separate Ausgangskanäle an die Trennkammer angeschlossen. Die separaten Kanäle sollten zur Fraktionierung der im Chip getrennten Analyte dienen. Während bei der ersten Chipgeneration am Ausgang eine Pumpe zur Erzeugung des Unterdrucks angeschlossen war und so den Ausgang blockierte, sind die Ausgänge beim Überdruckbetrieb nicht blockiert. Damit ist es möglich, die getrennten Analyte durch verschiedene Ausgänge aus dem Chip zu führen. Da die Fraktionierung in diesem Design zum ersten Mal realisiert wurde, sind nur neun Ausgangskanäle integriert worden, um eine möglichst einfache Kontaktierung der Ausgangslöcher zu ermöglichen. Mehr Ausgangskanäle erlaubten eine feinere Fraktionierung, allerdings war die Kontaktierung der Anschlusslöcher sehr komplex. Damit alle Ausgangskanäle den gleichen hydrodynamischen Widerstand hatten, mussten sie alle gleich lang sein. Wäre das nicht der Fall, würde die Flüssigkeit nicht gleichmäßig durch alle Kanäle die Trennkammer verlassen, sondern die Ausgangskanäle mit dem niedrigsten Flusswiderstand würden bevorzugt. Die neun Ausgangskanäle waren jeweils 7,2 mm lang und besaßen vor dem Ätzen eine Breite von 70 μm .

Im Folgenden wird die Herstellung von zwei Strukturteilen in einem Glassubstrat beziehungsweise einer PDMS-Vorform beschrieben. Auf die Kontaktierung der Ein- und Ausgänge wird in Abschnitt 3.3.1 näher eingegangen. Die Auswirkungen der flachen Seitenkanäle auf den Chipbetrieb werden in Abschnitt 3.3.4 beschrieben.

3.1.2.1 Zwei-Tiefen-Strukturierung von Glas

Der erste Ansatz zur Integration von zwei verschiedenen Tiefen in einem Chip sah vor, in die Chipoberseite die tieferen Strukturen (Trennkammer, Eingangs- und Ausgangskanäle) zu ätzen und die Anschlusslöcher und Seitenreservoir zu bohren und in die Chipunterseite die $1,5 \mu\text{m}$ tiefen Seitenkanäle zu ätzen. Vor dem Bonden von Chipober- und -unterseite wurden die beiden Glasplatten so gegeneinander ausgerichtet, dass die Trennkammer und die Seitenreservoir in der Chipoberseite durch die Seitenkanäle in der Chipunterseite verbunden waren. Allerdings zeigte sich, dass das Ausrichten der Glasplatten nicht so exakt wie nötig erfolgen konnte. Durch eine fehlerhafte Ausrichtung der Glasplatten zueinander waren die Seitenkanäle nur auf einer Seite mit dem Seitenreservoir verbunden, während sich auf der anderen Seite ein Spalt von etwa $100 \mu\text{m}$ zwischen Seitenreservoir und Seitenkanalende befand. Um diese Ausrichtungsprobleme zu umgehen, wurde der Herstellungsprozess optimiert, so dass nun beide Struktur Tiefen in die Chipoberseite integriert werden konnten und damit vor dem Bonding keine Ausrichtung der Glasplatten mehr nötig war. Abbildung 3.17 zeigt den modifizierten Herstellungsprozess.

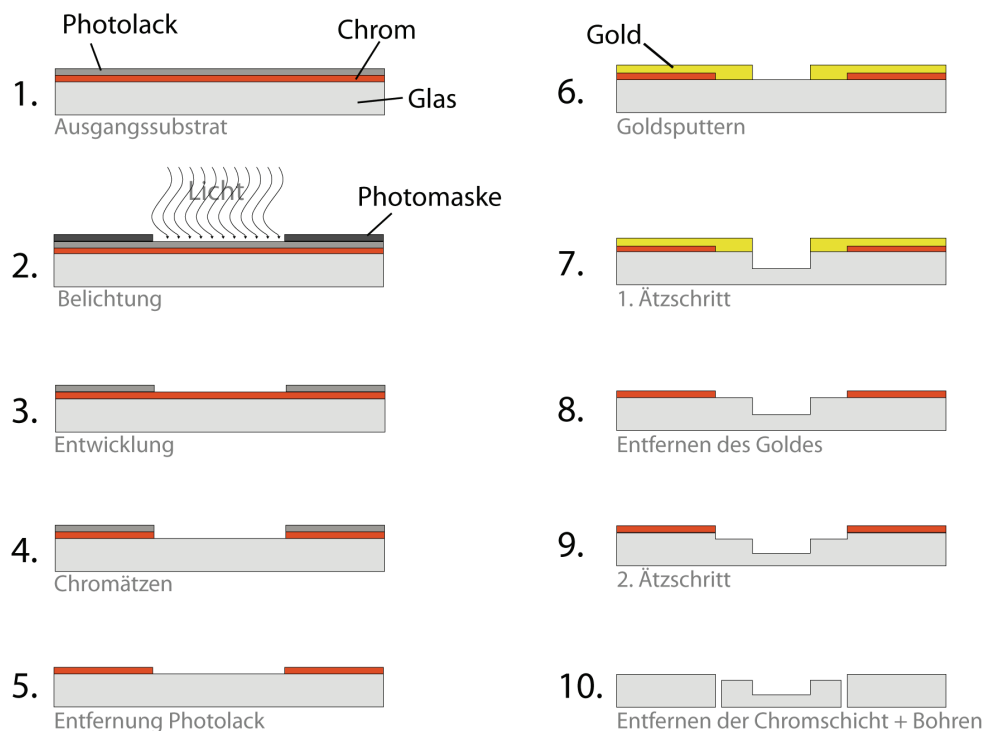


Abbildung 3.17: Schematische Prozessübersicht für die Herstellung von zwei Struktur Tiefen in einer Glasplatte. Die Schritte 1 bis 4 sind identisch mit der Herstellung der Struktur oberseiten der ersten Chipgeneration.

Mit Hilfe einer zusätzlich aufgetragenen Goldschicht und einem zweistufigen Ätzprozess wurden die unterschiedlichen Tiefen in das Glas geätzt. Die Prozessschritte 1 bis 4 sind identisch mit der Herstellung der ersten Chipgeneration. Daher werden in diesem Kapitel nur die Prozessschritte 5 bis 9 detaillierter beschrieben, das Bohren der Anschlusslöcher und das Entfernen der Chromschicht (Prozessschritt 10) ist ebenfalls in Kapitel 3.1.1.1 bereits beschrieben worden. Zwischen den in Abbildung 3.17 gezeigten Prozessschritten wurde die Glasplatte jeweils mit deionisiertem Wasser gereinigt und mit Stickstoff getrocknet.

Nachdem die Strukturen mit Hilfe der Photolithographie in die Chromschicht übertragen worden waren (Prozessschritte 1-4 in Abbildung 3.17), musste, bevor die zusätzliche Goldschicht auf die Chromschicht aufgebracht werden konnte, der restliche Photolack entfernt werden (Abbildung 3.17-5.). Dazu wurde die komplette Glasplatte für zwei Minuten in Dimethylformamid getaucht. Nach der Photolackentfernung konnte das Gold auf die Chromschicht aufgebracht werden. Das Gold wurde durch Sputtering [61] auf der Chromschicht abgeschieden. Dazu wurde eine Sputteranlage der Firma Balzer, Modell BAK 604, verwendet. Zuerst wurde die Chromoberfläche durch einen Rücksputterschritt mit 75 cm^3 Argon pro Minute gereinigt, um die Haftung der Goldschicht zu erhöhen.

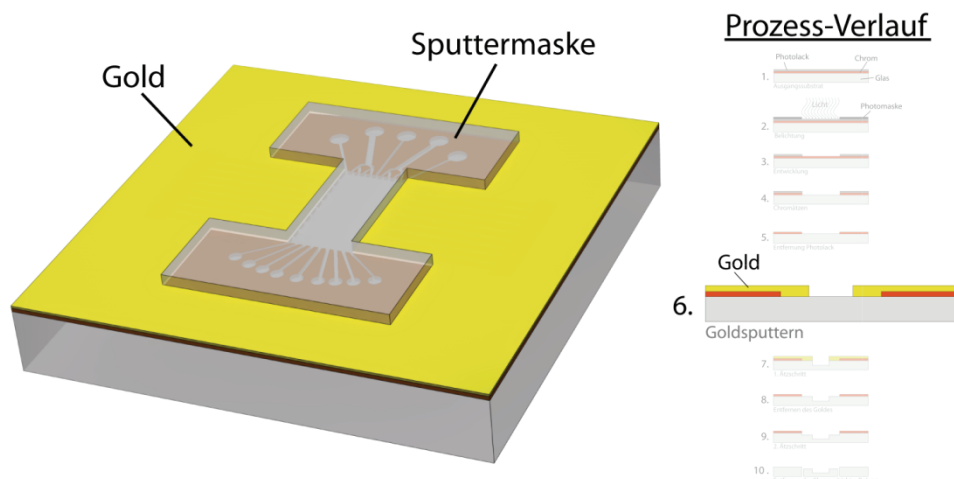


Abbildung 3.18: Um ein Ätzen der Seitenkanäle im ersten Ätzschritt zu verhindern, wurden die Seitenkanäle mit Gold besputtert. Die Trennkammer, die Eingänge und Ausgänge wurden durch eine Sputtermaske abgedeckt, so dass diese Strukturen im ersten Ätzschritt freilagen.

Anschließend wurde bei einer eingekoppelten Leistung von 1,9 kW und einer Reflektionsspannung von 0,85 kV mit einer Sputterrate von 55 nm pro Minute die Goldschicht auf die Chromschicht aufgebracht. Damit nur die Seitenkanäle von Gold bedeckt wurden, wurden die Trennkammer, die Eingänge und die Ausgänge während des Sputtervorgangs von einer Plexiglasmaske bedeckt (Abbildung 3.18). Die Sputtermaske wurde manuell ausgerichtet und fixiert. Die Goldschicht auf den Seitenkanälen sollte verhindern, dass diese während des ersten Ätzschrittes von der Flusssäure angegriffen werden. Da die Trennkammer, die Eingänge und Ausgänge nicht mit Gold bedeckt waren, wurden diese Strukturen im ersten Ätzschritt geätzt. Dazu wurde wieder eine 4%ige Flusssäure benutzt, die mit 4%iger Salpetersäure gepuffert worden war. Der erste Ätzschritt dauerte, Abhängig von der Reinheit der Flusssäure, zwischen 15 und 40 Minuten. Dabei wurden die Strukturen etwa 16 μ m tief geätzt (Abbildung 3.19).

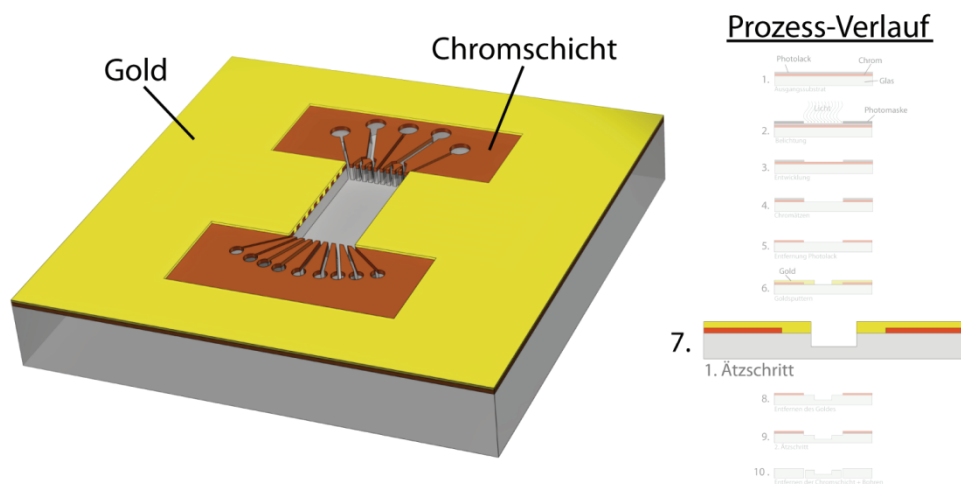


Abbildung 3.19: Nach dem ersten Ätzschritt sind die Trennkammer, die Eingänge und Ausgänge etwa 16 μ m tief in das Glas geätzt worden. Die Seitenkanäle waren durch das Gold geschützt worden.

In den ersten Versuchen zur Herstellung von zwei Strukturturen in einer Glasplatte betrug die Dicke der Goldschicht 220 nm. Es zeigte sich aber, dass eine Goldschicht dieser Dicke nicht ausreichte, um ein Ätzen der Seitenkanäle zu verhindern. Die Flusssäure perforierte die Goldschicht, so dass viele kleine Löcher in die Seitenkanäle geätzt wurden (Abbildung 3.20a).

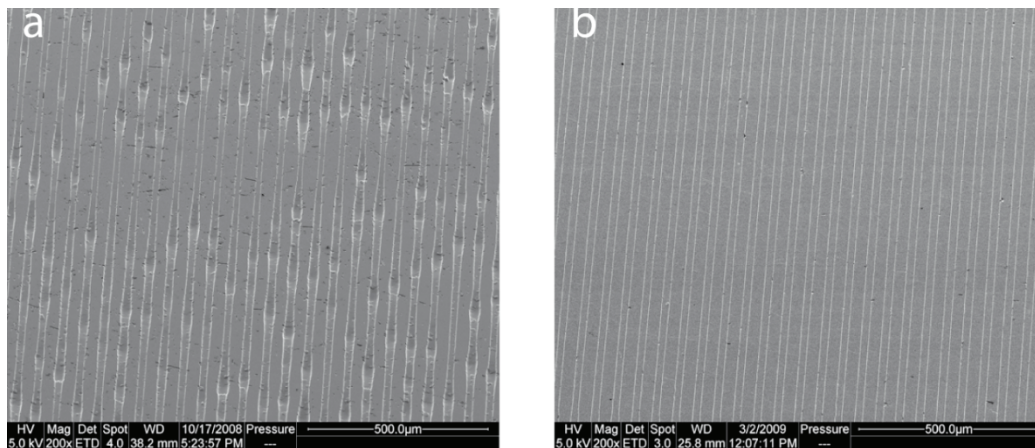


Abbildung 3.20: REM-Aufnahmen der Seitenkanäle nach dem ersten Ätzen. a) zeigt Kanäle, die von einer 220 nm dicken Goldschicht bedeckt waren. Die Kanäle in b) waren von 550 nm Gold bedeckt.

Diese Löcher verringerten den hydrodynamischen Gesamtwiderstand der Seitenkanäle, da der Widerstand im Bereich der Löcher geringer war als im nicht perforierten Bereich. Um diesen Effekt zu verhindern, wurde die Dicke der Goldschicht auf 550 nm erhöht. Bei dieser Schichtdicke konnte keine Perforation der Goldschicht beobachtet werden. Die Seitenkanäle wurden im ersten Ätzschritt nicht geätzt (Abbildung 3.20b). Deshalb wurde eine Schichtdicke von 550 nm Gold zur Standarddicke in der Zwei-Tiefen Glasstrukturierung.

Nach dem ersten Ätzschritt wurde das Gold wieder von der Chromschicht entfernt. Dazu wurde die Glasplatte für mehrere Minuten in eine Iod-Kaliumiodid-Lösung getaucht. Die Iod-Kaliumiodid-Lösung entfernte das Gold von der Chromschicht während die Chromschicht selbst nicht angegriffen wurde.

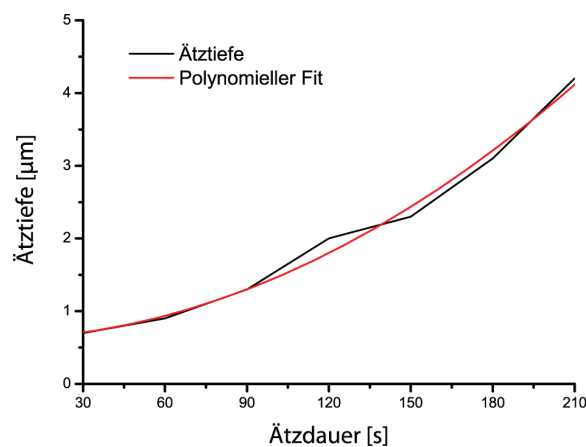


Abbildung 3.21: Bestimmung der Ätzdauer zum Ätzen der wenige μm tiefen Seitenkanäle. Damit die Seitenkanäle eine Tiefe von 1,5 μm besaßen, musste man circa 105 Sekunden lang ätzen.

Damit konnte das Chrom auch im zweiten Ätzschrift als Ätzmaskierung verwendet werden. Dabei wurde das Glas wieder mit einer 4%igen, mit Salpetersäure gepufferten Flußsäure geätzt. Diese Flußsäure wurde aber nur zum Ätzen von Strukturturen von wenigen μm eingesetzt, so dass die Ätzrate als nahezu konstant betrachtet werden konnte. In einem Experiment wurde die Ätztiefe für verschiedene Ätzzeiten bestimmt (Abbildung 3.21). Da die Seitenkanäle nur etwa $1,5 \mu\text{m}$ tief werden sollten, musste die Ätzdauer des zweiten Ätzschriftes nur etwa 105 Sekunden betragen. Neben den Seitenkanälen wurden die restlichen Strukturen auch um $1,5 \mu\text{m}$ tiefer. Insgesamt waren die Trennkammer, die Eingänge und Ausgänge dann etwa $17,5 \mu\text{m}$ tief. Abbildung 3.22 zeigt neben der schematischen Übersicht des zweiten Ätzschriftes auch Rasterelektronenmikroskopaufnahmen von jeweils einem flachen, im zweiten Ätzschrift entstandenen, $1,5 \mu\text{m}$ tiefen Seitenkanal (Abbildung 3.22b) und von einem bereits im ersten Ätzschrift geätzten, insgesamt $17,5 \mu\text{m}$ tiefen Ausgangskanal (Abbildung 3.22c).

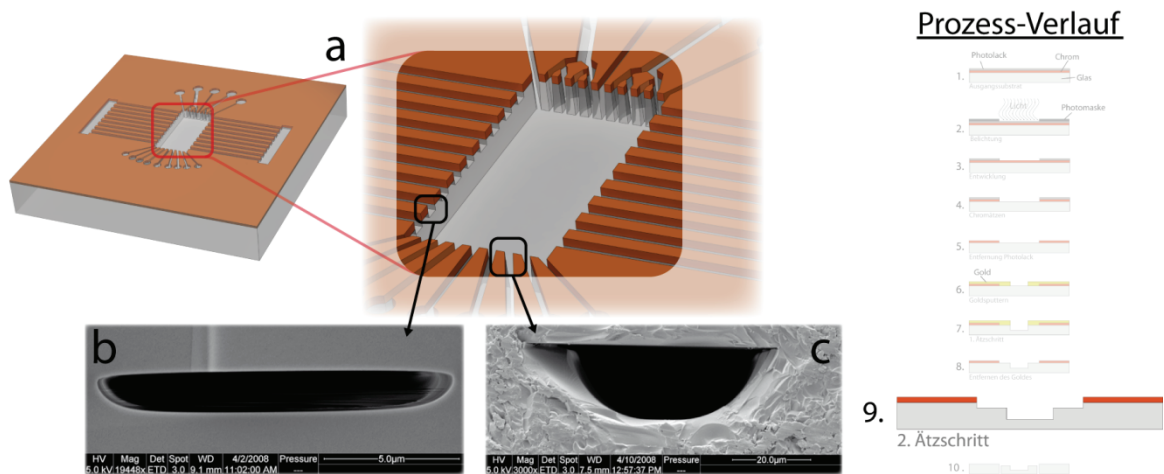


Abbildung 3.22: Übersicht über den zweiten Ätzschrift. a) zeigt schematisch das Aussehen der Glasplatte nach dem 2. Ätzschrift, b) zeigt einen etwa $1,5 \mu\text{m}$ tiefen Seitenkanal, c) zeigt einen etwa $17,5 \mu\text{m}$ tiefen Ausgangskanal. Beide Kanäle befanden sich in einer Glasplatte.

Die in Abbildung 3.23 gezeigte weißlichtinterferometrische Aufnahme zeigt, dass es einen kontinuierlichen Übergang zwischen den beiden Strukturturen gibt. Auch zeigt sich, dass die Anfänge der Seitenkanäle, welche die Trennkammer berühren, durch die Unterätzung ein wenig breiter als die eigentliche Kanalbreite sind.

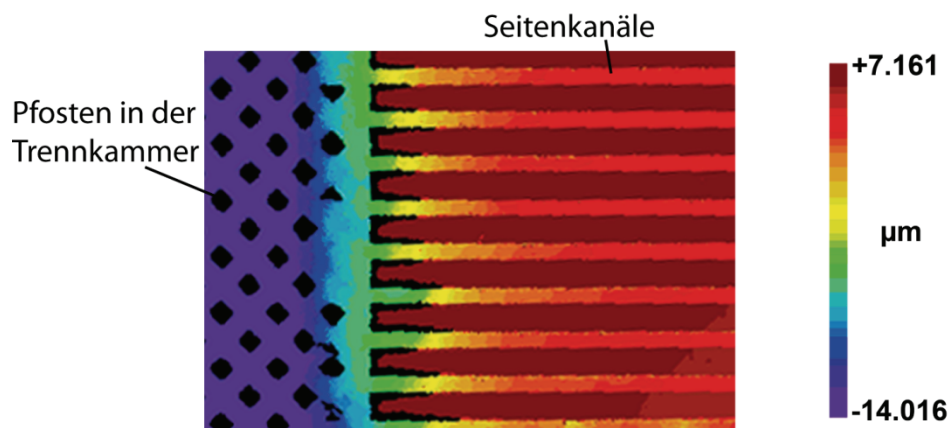


Abbildung 3.23: Interferometrische Aufnahme des Übergangsbereiches zwischen Trennkammer (lila) und Seitenkanälen (rot). Man erkennt, dass der Übergang kontinuierlich erfolgt.

Anhand der Verbreiterung der Seitenkanäleingänge konnte abgeschätzt werden, dass die Unterätzung der Goldschicht etwa 20 μm beträgt. Abbildung 3.24 zeigt eine REM-Aufnahme des Kreuzungsbereiches zwischen Trennkammer und Seitenkanälen. Auch hier lässt sich der kontinuierliche Übergang zwischen der tiefen Trennkammer und den flachen Seitenkanälen erkennen.

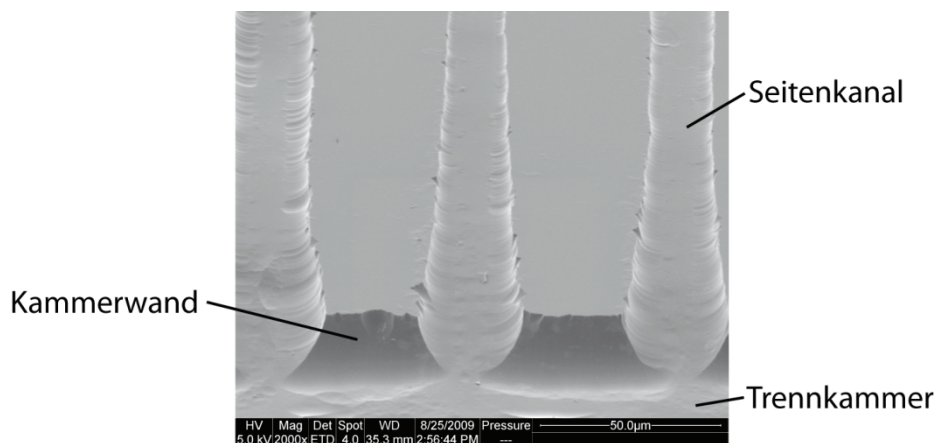


Abbildung 3.24: REM-Aufnahme des Übergangsbereiches zwischen Trennkammer und Seitenkanälen.

Nach dem zweiten Ätzschritt wurden, wie bei den μFFE-Chips der ersten Generation, die Anschlusslöcher und die Seitenreservoirs in das Glas gebohrt. Im letzten Schritt wurde die Chromschicht mit Hilfe einer Chromätzlösung von der Glasplatte entfernt. Damit war die Herstellung der Zwei-Tiefen-Chipoberseite in Glas abgeschlossen.

3.1.2.2 Zwei-Tiefen-Strukturierung von PDMS

Auch in PDMS ließen sich zwei Strukturhöhen in einem Substrat herstellen. Dazu war allerdings eine Optimierung des Vorform-Herstellungsprozesses nötig. Die Abformung des eigentlichen PDMS-Substrates erfolgte genauso wie bereits in Abschnitt 3.1.1.2 beschrieben. Zur Herstellung einer Vorform mit zwei Strukturhöhen waren Veränderungen in der Photomaske und zwei zusätzliche Belichtungsschritte nötig. Abbildung 3.25 zeigt den um vier Prozessschritte erweiterten Herstellungsprozess.

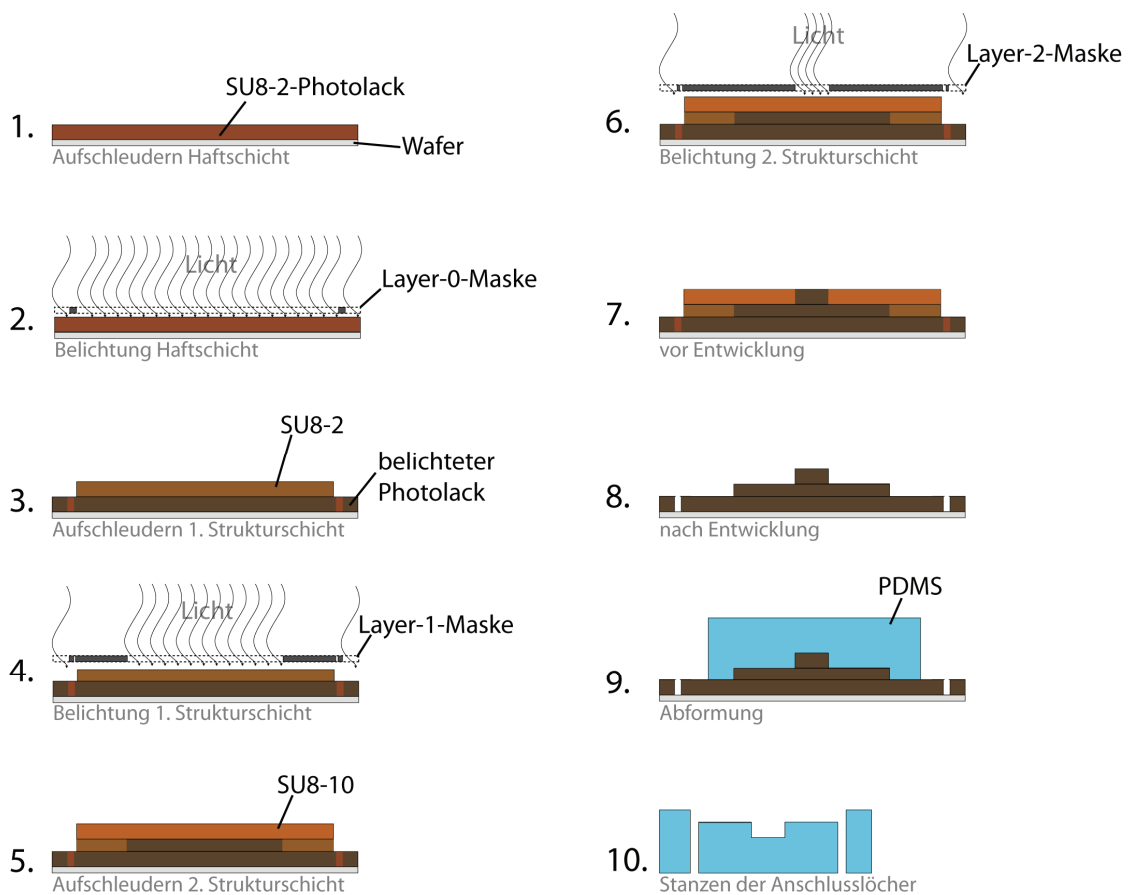


Abbildung 3.25: Prozessübersicht für die Herstellung einer Vorform mit zwei verschiedenen Strukturhöhen und anschließender Abformung.

Das Herstellungsprinzip sah eine schichtweise Belackung und Belichtung der einzelnen Lackschichten vor. Zum besseren Verständnis der hier beschriebenen Herstellung sei noch einmal erwähnt, dass es sich bei dem Photolack SU-8 um einen Negativresist handelt, das heißt, dass die belichteten Stellen des Lackes vernetzen und nicht vom Entwickler abgelöst werden. Die Prozessschritte 1 (Aufspleuern der

Haftschicht), 9 (Abformung) und 10 (Stanzen der Anschlusslöcher) sind identisch mit den jeweiligen Prozessschritten der Vorformherstellung der ersten Chipgeneration (siehe Abschnitt 3.1.1.2) und werden daher hier nicht näher beschrieben.

Wie bereits erwähnt, wurden zwei zusätzliche Belichtungen zur Vorformherstellung benötigt. Damit die Strukturen der verschiedenen Lackschichten exakt zueinander ausgerichtet waren, wurden die jeweiligen Photomasken mit Hilfe von Justiermarken an der vorherigen Belichtung ausgerichtet. Abbildung 3.26a zeigt die verwendeten Justiermarken, wobei nur die Marken eines Layers in der jeweiligen Photomaske vorhanden waren. Pro Belichtung wurden die Justierstrukturen des jeweiligen Layers an den schon im Lack vorhandenen Teilen der Justiermarke ausgerichtet. Die einzelnen Elemente der Justiermarken hatten einen minimalen Abstand von 25 μm zueinander und ließen sich präziser justieren als deckungsgleiche Elemente.

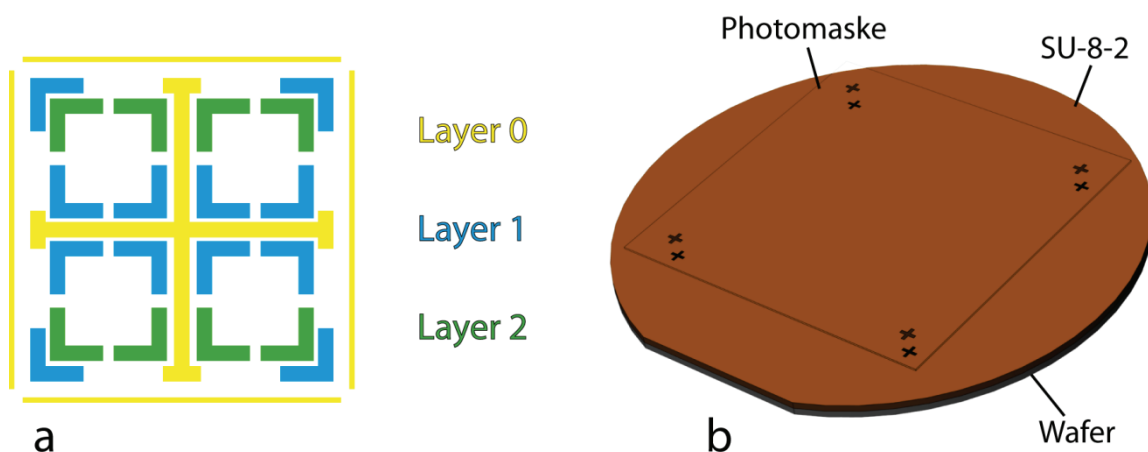


Abbildung 3.26: a) Justiermarke zum Ausrichten der Photomasken während der drei Belichtungen. Auf der Photomaske der ersten Belichtung befanden sich nur die Layer-0-Strukturen. Die Layer-1-Strukturen befanden sich auf der zweiten Photomaske und wurden an den bereits übertragenen Strukturen des Layer-0 ausgerichtet. Die Layer-2-Strukturen wurden dann an den schon im Photolack vorhandenen Layer-0- und Layer-1-Strukturen ausgerichtet. b) zeigt den ersten Belichtungsschritt zum Übertragen der Layer-0-Strukturen in die Haftschicht.

Nachdem der blanke Wafer mit der etwa 1,5 μm dicken SU-8-2-Haftschicht belackt worden war (Abbildung 3.25-1, Parameter der Belackung siehe Abschnitt 3.1.1.2), wurde durch die erste Belichtung der Vernetzungsprozess im Lack gestartet (Abbildung 3.25-2). Im Unterschied zur Herstellung der ersten Chipgeneration erfolgte diese Belichtung durch eine Photomaske. Dabei wurden nur die Layer-0-Strukturen

der Justiermarken in die Haftschrift übertragen und dienten somit als Grundjustagemarken für alle weiteren Belichtungen (Abbildung 3.26b).

Nachdem die erste Belichtung erfolgt war, wurde eine 1-2 μm dicke SU-8-2-Schicht auf die bereits vorhandene Haftschrift geschleudert (Abbildung 3.25-3). Diese Schicht ergab in der späteren Vorform die flachen Seitenkanäle. Der Lack wurde in der Lackschleuder bei 500 U/min für acht Sekunden auf dem Wafer verteilt und anschließend bei 3000 U/min für 40 Sekunden ausgeschleudert. Nach dem Ausschleudern der Lackschicht erfolgte der Softbake für zwei Minuten bei 95 °C. Nach dem Abkühlen der Lackschicht erfolgte der zweiten Belichtungsschritt (Abbildung 3.25-4). Auf der Photomaske der zweiten Belichtung befand sich das komplette Chipdesign und die Layer-1-Strukturen der Justiermarken (Abbildung 3.27).

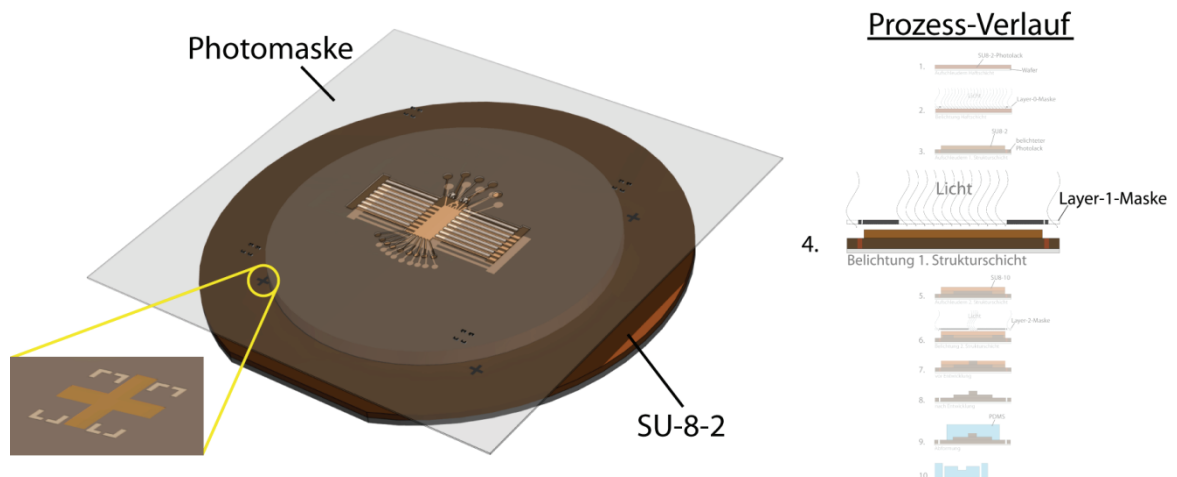


Abbildung 3.27: Mit der zweiten Belichtung wurden die kompletten Chipstrukturen in die etwa 1-2 μm dicke SU-8-2-Schicht übertragen. Die Photomaske wurde an den Justiermarken in der Haftschrift ausgerichtet.

Die Photomaske der zweiten Belichtung wurde an den in der Haftschrift vorhandenen Layer-0-Justiermarken ausgerichtet. Dafür wurde in der Lackschleuder bei 1500 U/min die Randwulst der Lackschicht entfernt, so dass die Justagemarken in der Haftschrift sichtbar waren. Je nach Lackdicke konnte man die Justagemarken aber auch durch den Lack hindurch erkennen. Die Belichtung auf dem MA-6 Belichter dauerte drei Sekunden. Der anschließende Postbake dauerte zwei Minuten bei einer Temperatur von 95 °C.

Würde man nun den Photolack entwickeln, wären alle Strukturen des Chipdesigns nur wenige μm hoch. Da aber nur die Seitenkanäle eine geringe Strukturhöhe besitzen sollten, wurde auf alle anderen Strukturen im nächsten Prozessschritt eine zusätzliche, dickere Lackschicht „aufgesetzt“. Dazu wurde eine circa $18\ \mu\text{m}$ dicke SU-8-10-Schicht auf die zweite SU-8-2-Schicht (Layer-1-Schicht), aufgeschleudert. Das Anschleudern des Lackes erfolgte bei $500\ \text{U/min}$ für 15 Sekunden. Die Schichtdicke wurde durch das Ausschleudern bei $1600\ \text{U/min}$ für 40 Sekunden bestimmt. Beim anschließenden Softbake wurde der Wafer zuerst bei $62\ ^\circ\text{C}$ für zehn Minuten erwärmt und danach für 30 Minuten auf $95\ ^\circ\text{C}$ erhitzt. Dieser zweistufige Softbake vermied das Entstehen von Spannungen in den bereits belichteten Lackschichten auf dem Wafer. Nach dem langsamen Abkühlen des Wafers auf Raumtemperatur und der anschließenden Entfernung der Randwulst konnte der dritte Belichtungsschritt vorgenommen werden. Aufgrund einer Lackdicke von knapp $20\ \mu\text{m}$ dauerte die Belichtung mit sieben Sekunden im MA6-Belichter mehr als doppelt so lange wie bei den vorherigen SU-8-Schichten.

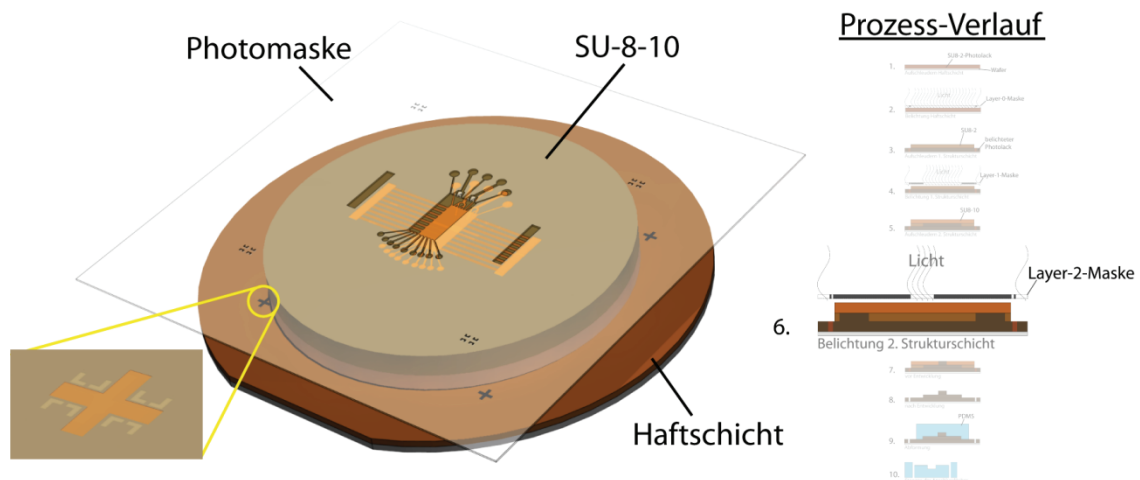


Abbildung 3.28: Dritte Belichtung im Herstellungsprozess für eine PDMS-Vorform mit zwei Strukturhöhen. Die Photomaske enthielt nur diejenigen Strukturen, welche in der späteren Abformung tiefer als die Seitenkanäle sein sollten.

Wie bei allen bisherigen Belichtungen erfolgte auch hier wieder die Ausrichtung der Photomaske an den schon im Photolack befindlichen Justiermarken. Die Photomaske der dritten Belichtung besaß neben den Layer-2-Justierelementen nur die Strukturen, die in der späteren Abformung die größere Tiefe besitzen sollten, also die Ein- und Ausgangskanäle, die Trennkammer und die Seitenreservoirs. Der anschließende

Postbake bestand, ebenso wie der Softbake, aus zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde der Wafer für fünf Minuten auf 62 °C erwärmt, der zweite Schritt dauerte 15 Minuten bei einer Temperatur von 95 °C.

Nachdem der Wafer wieder Raumtemperatur erreicht hatte, konnten die belichteten Lackschichten entwickelt werden. Wie schon bei der Herstellung der ersten Chipgeneration wurde der Wafer dazu für fünf Minuten in ein Entwicklerbad getaucht.

Der Entwickler mr-Dev 600 von MicroResist löste in dieser Zeit den nicht belichteten Photolack der einzelnen Lackschichten auf. Das Ergebnis nach der Entwicklung ist in Abbildung 3.29 zu sehen.

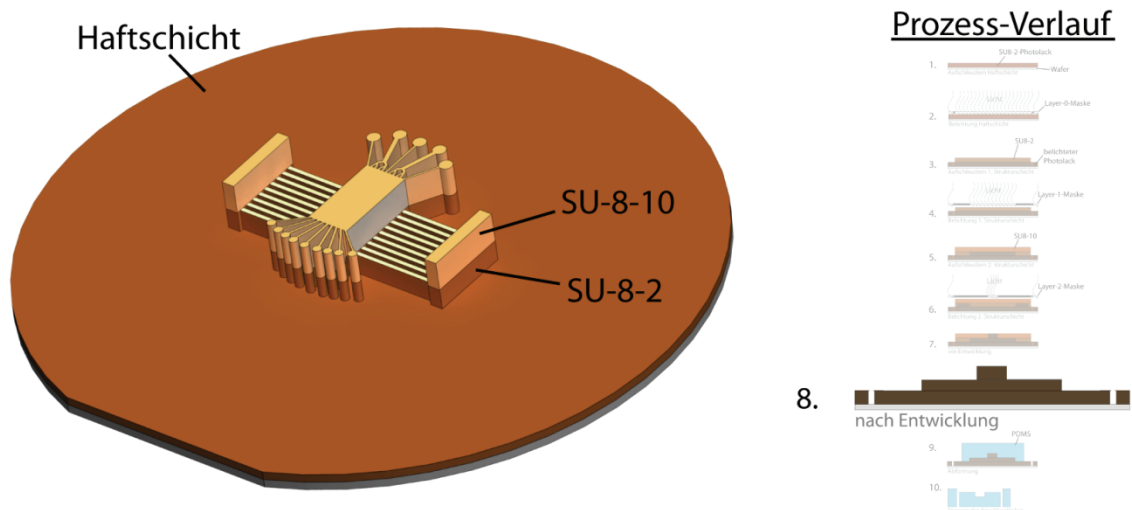


Abbildung 3.29: Nach der Entwicklung der Photolackschichten blieben nur die belichteten Strukturen auf dem Wafer übrig. Man kann deutlich die zwei verschiedenen Strukturhöhen erkennen, die Seitenkanäle sind nur in der Layer-1-Schicht vorhanden und damit nur 1-2 μm hoch, die Höhe der restlichen Strukturen ist die Summe aus den Schichtdicken der Layer-1- und Layer-2-Schichten.

Um die Widerstandsfähigkeit des Photoresist zu erhöhen, erfolgte nach der Entwicklung des Lackes noch ein Hardbake. Dabei wurde das komplette Substrat auf 160 °C aufgeheizt und anschließend auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Im letzten Prozessschritt der Vorformherstellung wurde der Photolack noch mit Hexamethyldisiazan (HMDS) beschichtet, um das Ablösen des PDMS von der Vorform während der Abformung zu erleichtern. Danach war die Herstellung einer Vorform mit zwei verschiedenen Strukturhöhen abgeschlossen.

Das Übertragen der Strukturen von der Vorform in das Polydimethylsiloxan erfolgte nach dem in Abschnitt 3.1.1.2 beschriebenen Prozess. Allerdings musste beim Abformen sehr vorsichtig vorgegangen werden, da sonst die Gefahr bestand, dass die dünnen Stege der Seitenkanäle auf der Vorform abreißen. Nach dem Abformen war die Herstellung der PDMS-Strukturseite abgeschlossen. Abbildung 3.30 zeigt eine REM-Aufnahme einer PDMS-Abformung mit zwei Strukturturen. Um den Unterschied zwischen den Strukturturen deutlich zu machen, beginnen die flachen Seitenkanäle nicht direkt an der Trennkammer, sondern erst nach etwa 500 μm .

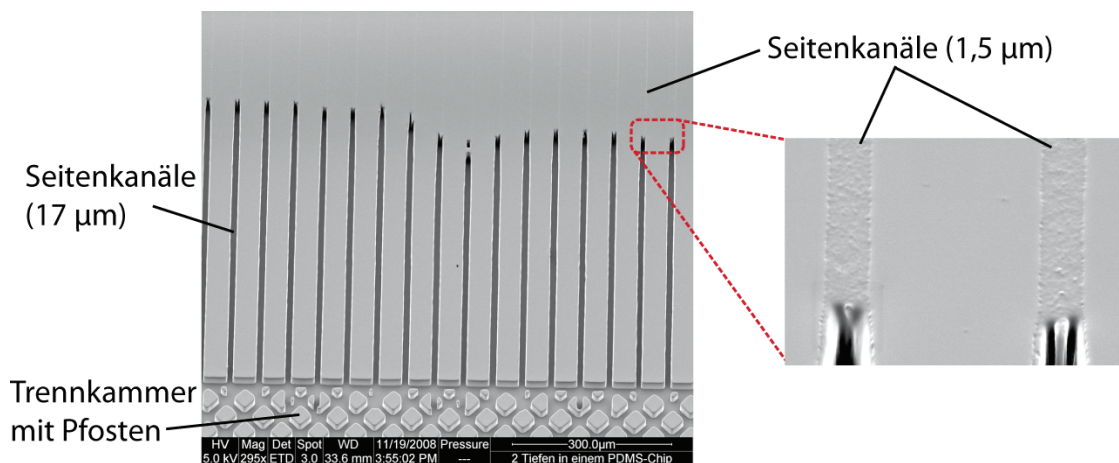


Abbildung 3.30: REM-Aufnahme eines 2-Tiefen PDMS Substrats. Die flachen Seitenkanäle beginnen nicht direkt an der Kammer.

Deutlich ist der Unterschied zwischen den beiden Strukturturen erkennbar. Während man den ersten Teil der Seitenkanäle aufgrund der Strukturhöhe noch sehr gut erkennen kann, sind die flachen, nur 1,5 μm tiefen Abschnitte der Seitenkanäle schwer zu identifizieren.

3.2 Flüssigkeitsdichte Verbindung

Wie bereits erwähnt, besteht ein μ FEE-Chip immer aus zwei Teilen: Der strukturierten Chipoberseite und der unstrukturierten Chipunterseite, dem Boden. Erst durch das flüssigkeitsdichte Verbinden dieser beiden Teile entsteht der μ FEE-Chip. Abhängig vom Chipmaterial gibt es verschiedene Techniken, um die beiden Teile miteinander zu verbinden. Während PDMS-PDMS- oder PDMS-Glas-Chips mit Hilfe einer Oberflächenplasmabehandlung dauerhaft verbunden werden können, wird zur Herstellung eines Glas-Glas-Chips das Hochtemperaturbonds verwendet. Alternativ zum Hochtemperaturbonds können die Glasober- und -unterseite auch miteinander verklebt werden. Dies ist aber aufgrund der geringen Strukturiefen und der benötigten dünnen Klebstoffschichten ein schwieriger Prozess. Im Folgenden werden die verschiedenen Techniken näher beschrieben.

3.2.1 Plasma-Bonds

Wie bereits erwähnt, wurden Chipoberseiten aus PDMS mittels Plasmabonding dauerhaft mit einem Boden aus Glas oder PDMS verbunden. Auch zur Fixierung des Ausgangsinterfaces (Abschnitt 3.3.1) auf einem Glaschip wurde das Plasmabonds verwendet. Beim Plasmabonds wurden die Kontaktflächen der Chipober- und -unterseite durch ein Sauerstoffplasma modifiziert. Kammen die modifizierten Oberflächen in Kontakt, so bildeten sich dazwischen stabile chemische Bindungen. Dies bewirkte die dauerhafte und flüssigkeitsdichte Verbindung der beiden Chipteile. Die Plasmabehandlung fand in einer speziellen Vakuumkammer statt, die in Abbildung 3.31 schematisch dargestellt ist. Vor der Plasmabehandlung mussten die Oberflächen der zu verbindenden Teile gereinigt werden, da schon kleinste Verunreinigungen oder Fett auf den Oberflächen ein vollständiges Bonds verhindern konnten. Die Teile lagen zwischen zwei Elektroden. An der oberen Elektrode lag eine Hochspannung an, die untere Elektrode war direkt mit der Erde verbunden. Nachdem die Chipteile auf die untere Elektrode gelegt worden waren, wurde die Anlage geschlossen und evakuiert. Der Druck wurde über einen Drucksensor gemessen. Da der Sensor keine absoluten Drücke anzeigte, wurde zur Kalibrierung die Kammer für zehn Minuten evakuiert und anschließend die Anzeige des Sensors auf null gesetzt. Die Plasmabehandlung selbst fand bei einem Druck von 1 mbar statt.

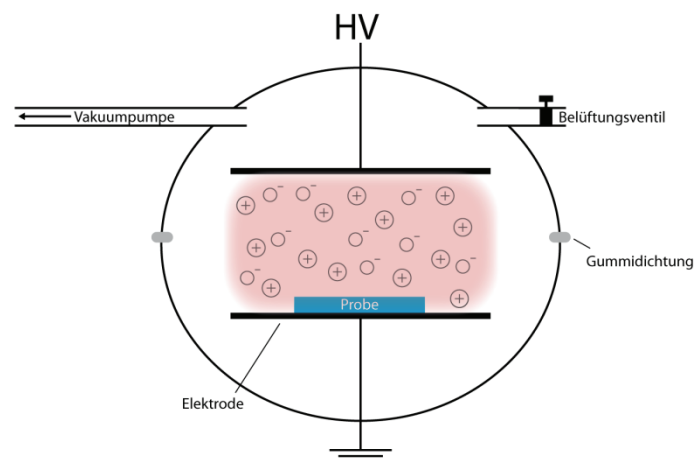


Abbildung 3.31: Schematische Darstellung der Anlage zur Plasmabehandlung der Oberfläche.

Als dieser Wert erreicht war, wurde die Hochspannung eingeschaltet und dadurch das Plasma zwischen den Elektroden gezündet. Da durch das Vakuum die Menge an Fremdgasen in der Prozesskammer verringert wurde, verbesserte sich die Qualität der Plasmabehandlung. Durch die Plasmabehandlung wurden an der Oberfläche der Probe Molekülbindungen aufgebrochen. Es bildeten sich sehr reaktive, polare Gruppen, welche die stabile Verbindung zwischen den beiden Chipteilen erzeugten [100]. Die Plasmabehandlung dauerte fünf Minuten, danach wurde die Spannung abgeschaltet und die Anlage mit Stickstoff belüftet. Das anschließende Zusammenführen der beiden Chipteile sollte möglichst zeitnah nach der Plasmabehandlung erfolgen, da der Effekt der Oberflächenmodifikation mit der Zeit abnimmt und sich zusätzlich Verunreinigungen an der Oberfläche anlagern können. Bei Verwendung des Plasmabondens wurde außerdem darauf geachtet, dass die Proben kein Metall beinhalteten, da dieses das elektrische Feld zwischen den Elektroden stören könnte und das Plasma somit nicht mehr gleichmäßig in der ganzen Anlage brennen würde. Zur Verbesserung des Bondings wurde nach dem Zusammenführen der Chipteile über Nacht ein Gewicht auf beide Chipteile gelegt. Danach war die Verbindung zwischen der Chipober- und -unterseite so stark, dass sie nicht ohne Zerstörung des Chips voneinander getrennt werden konnten.

3.2.2 Hochtemperaturbonden

Für die dauerhafte Verbindung von zwei Glasplatten wurde ein anderes Verfahren benutzt: das Hochtemperaturbonden. Dabei wurden die aufeinanderliegenden Glasplatten in einem Ofen auf die Glasübergangstemperatur des Glases erhitzt. Bei dieser Temperatur erfolgte der Übergang vom kristallinen in den gummielastischen Bereich. Die Gewichte, welche zusätzlich auf die Glasplatten gelegt worden waren, drückten die Glasplatten zusammen, so dass die Grenzflächen bei Erreichen der Glasübergangstemperatur verschmolzen. Nach dem Abkühlen waren die beiden Glasplatten fest miteinander verbunden und ließen sich auch nicht mehr voneinander trennen. Für die Soda-Lime Gläser, welche in dieser Arbeit für die Herstellung der μ FFE-Chips verwendet wurden, lag die Glasübergangstemperatur bei 581 °C. Für das Bonding der Soda-Lime Gläser wurde ein spezielles Bondprogramm programmiert. Nach dem Start des Programms heizte der Bondofen innerhalb einer Stunde die Glasplatten auf 400 °C auf und hielt diese Temperatur für drei Stunden. Anschließend erhöhte der Ofen innerhalb einer Stunde die Temperatur auf die Glasübergangstemperatur von 581 °C und hielt diese Temperatur für vier Stunden. Während dieser Zeit fand die Verschmelzung der beiden aufeinanderliegenden Glasoberflächen statt. Danach kühlte der Ofen die Glasplatten innerhalb von elf Stunden langsam wieder auf Raumtemperatur herab. Der ganze Bondprozess dauerte somit insgesamt 20 Stunden.

Damit das Hochtemperaturbonden auch erfolgreich angewendet werden konnte, mussten die Glasplatten, bevor sie in den Ofen gelegt wurden, gereinigt werden. Wurde dies nicht gemacht, konnten Dreck und Staub, aber auch Lackrückstände auf den Oberflächen zu Einschlüssen und nichtgebondeten Stellen führen. Die Bondvorbereitungen bestanden aus fünf Schritten, zwischen denen die Glasplatten jeweils mit deionisiertem Wasser gereinigt und mit Stickstoff getrocknet wurden. Im ersten Schritt wurden beide Glasplatten für fünf Minuten in Aceton gelegt. Daran anschließend erfolgte ein fünf-minütiges Bad in Dimethylformamid. Danach wurden die beiden Glasplatten für 15 Minuten in Methanol gereinigt. Im vierten Schritt wurde Peroxomonoschwefelsäure, auch Piranhasäure genannt, hergestellt. Dazu wurde 30%iges Wasserstoffperoxid mit konzentrierter Schwefelsäure im Verhältnis 1:2 gemischt. In dieser Säure erfolgte für 30 Minuten der vierte und letzte Reinigungsschritt. Nach dem Abspülen und Trocknen wurden die gesäuberten Glasoberflächen aufeinander gelegt.

Mit Hilfe einer Spritze wurde an den Rand der Glasplatten deionisiertes Wasser aufgebracht, was sich dann aufgrund der Kapillarkräfte zwischen die Glasplatten bewegte und dort eine Wasserschicht zwischen den Glasplatten bildete. Die Wasserschicht verhinderte, dass sich Luftblasen zwischen den Glasplatten befanden, welche während des Bondens in das Glas eingeschlossen werden konnten. Danach wurden die Glasplatten zwischen zwei Keramikschalen positioniert und anschließend in den Bondofen gelegt.

Die Ausbeute beim Hochtemperaturbonden war sowohl von einer sauberen Glasoberfläche, als auch von dem richtigen Gewicht zur Beschwerung der Glasplatten im Bondofen abhängig. Ein zu leichtes Gewicht erzeugte nicht genügend Druck auf die Glasplatten und führte zu einem ungleichmäßigen Bonding, da die Glasplatten nicht über die ganze Fläche miteinander verschmolzen. Ein zu schweres Gewicht führte zu Spannungen im Glas und damit zu einem Reißen der Glasplatten während des Bondprozesses. Die besten Bondresultate für zwei Soda-Lime Glasplatten wurden mit einem 472 g schweren Gewicht erzielt.

3.2.3 Kleben

Als Alternative zum Hochtemperaturbonden wurde versucht, Glaschips durch Verkleben der beiden Chipteile herzustellen. Grund für diese Versuche war, dass sich mit dem Hochtemperaturbonden nur Glasplatten vom gleichen Glastyp verbinden ließen. Zwei unterschiedliche Glassorten mit zwei verschiedenen Temperaturausdehnungskoeffizienten sorgten für ein Zerschlagen der Gläser während des Bondings, da die Ausdehnung der Gläser beim Aufheizen und Abkühlen unterschiedlich war und so Spannungen im Glas entstanden. Durch das Verkleben der Chips sollte versucht werden, auch verschiedene Gläser beziehungsweise Materialien miteinander zu einem Chip zu verbinden. Da mit Chips der zweiten Generation gearbeitet wurde, lag die größte Herausforderung in dem Aufbringen der Klebeschicht. Wie bereits vorher beschrieben, besaß die zweite Chipgeneration nur 1,5 μm tiefe Seitenkanäle. Damit der geklebte Chip aber auch verwendet werden konnte, durften die Seitenkanäle nicht durch Kleber verschlossen werden. Das bedeutet, dass die Klebeschicht dünner als 1 μm sein musste, um diese Anforderung zu erfüllen.

In den ersten Versuchen wurde SU-8 Photolack als Kleber verwendet. Vorteile dabei waren, dass man durch die Chipherstellung die Eigenschaften von SU-8 kannte und es standardisierte Prozesse zum Aufbringen von dünnen SU-8 Schichten gab. Es zeigte sich aber, dass die Herstellung von 1 μm dicken SU-8 Schichten auf Glas weder durch Aufschleudern noch durch Ausrollen möglich war. Die SU-8 Schicht war entweder nicht homogen und mit lackfreien Stellen durchzogen oder zu dick. Ein weiteres Problem war die UV-Belichtung des SU-8 zwischen den Glasplatten, da Soda-Lime Glas in diesem Wellenlängenbereich eine Transmission von weniger als 20% besitzt. Diese Probleme führten dazu, dass SU-8 als Kleber verworfen wurde.

Auch wurde versucht, schon belichteten SU-8 Lack als Kleber zu benutzen. Dabei wurde eine entsprechend dünne SU-8 Schicht auf einen Wafer aufgeschleudert und komplett belichtet. Auf diese Lackschicht wurde dann die strukturierte Glasplatte gepresst und das ganze System dabei auf die Glasübergangstemperatur des Photolacks [101-103] erhitzt. Bei dieser Temperatur verflüssigt sich SU-8 wieder. Durch den Druck sollte das Glas nun in den weichen SU-8 gedrückt werden und nach dem anschließenden Abkühlen das Glas mit dem Wafer verklebt sein. Mit dieser Technik gab es erste Erfolge, allerdings waren die Ergebnisse nicht reproduzierbar. Außerdem brachen während der Versuche sehr häufig der Wafer oder die strukturierte Glasplatte, so dass auch diese Methode zum Verkleben von Chips verworfen wurde.

Ein weiterer Versuch wurde mit dem Kleber GB 310 der Firma Delo unternommen. In den ersten Versuchen wurde der Kleber mit einer Hardgummirolle auf die Chipoberfläche aufgerollt. Allerdings war aufgrund der hohen Viskosität des Klebers keine gleichmäßige Schichtdicke zu erzielen. In der Literatur wird eine spezielle Methode zum Verkleben von Glasplatten mit Hilfe eines UV-Klebers beschrieben [104]. Dort wurde die Viskosität des Klebers durch Verdünnung mit Aceton verringert. Dieses Gemisch wurde dann zwischen zwei aufeinanderliegende Glasplatten gebracht. Das Kleber-Aceton-Gemisch verteilte sich durch die Kapillarkräfte gleichmäßig zwischen den Glasplatten. Um anschließend die Fluidikkanäle in den Glasplatten vom Kleber zu reinigen, wurden diese mit Aceton gespült. Danach erfolgte eine fünf-minütige UV-Belichtung zur Aushärtung des Klebers. Nach Angaben in [104] soll die resultierende Schichtdicke des Klebers 1 μm betragen haben. Mit dieser Methode wurden dann auch Versuche zum Verbinden der μFFE -Chips unternommen.

Um das Problem mit den $1,5\ \mu\text{m}$ tiefen Seitenkanäle zu umgehen, wurden diese Versuche mit einem Chip der ersten Generation durchgeführt. Ein Verkleben der beiden Chipteile war möglich, allerdings traten einige Probleme auf, die in Abbildung 3.32 dargestellt sind.

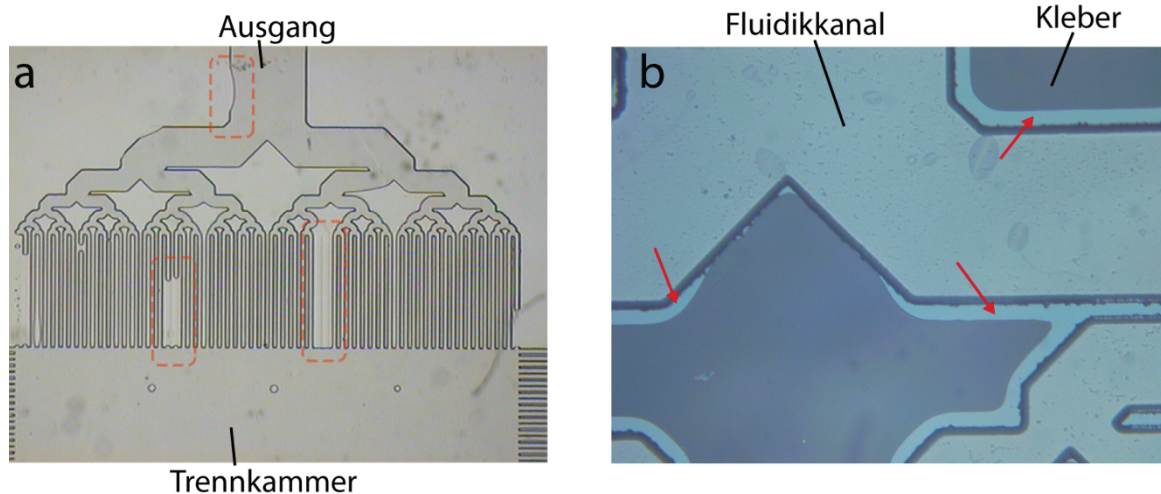


Abbildung 3.32: Unter der Verwendung der in [104] beschriebenen Methode wurde versucht, einen Chip der ersten Generation zu verkleben. Allerdings zeigte sich, dass sich der Kleber durch Spülen mit Aceton nicht aus allen Kanälen entfernen ließ (a) und dass das Aceton den Kleber auch unter dem Glas an den Kanälerrändern entfernte (b).

In Abbildung 3.32a erkennt man, dass nach dem Spülen mit Aceton nicht alle Kanäle frei von Kleber waren. Die hier gezeigten Kanäle sind die Kanäle zum Ausgangsloch, was bedeutet, dass das Aceton auf jeden Fall durch diese Kanäle fließen musste um den Chip zu verlassen. Außerdem unterspülte das Aceton die Randbereiche der Fluidikkanäle im Chip und entfernte dort auch den Kleber (Abbildung 3.32b). Würde man mit dieser Methode die Chips der zweiten Generation verbinden wollen, so wäre dies höchstwahrscheinlich nicht möglich. Zum einen wäre es kaum möglich, die flachen Seitenkanäle durch Spülen mit Aceton vom Kleber zu befreien, besonders unter Berücksichtigung der Tatsache, dass es nicht möglich war, den Kleber aus den Ausgangskanälen zu entfernen. Zum anderen besteht nach dem Spülen mit Aceton die Gefahr, dass der Kleber unter den $44\ \mu\text{m}$ breiten Stegen, welche die Seitenkanäle voneinander trennen, entfernt worden ist und somit die Seitenkanäle nicht mehr den benötigten hydrodynamischen Widerstand besitzen.

Auch wenn nicht alle Kanäle vom Kleber befreit werden konnten, so war es doch möglich, den in Abbildung 3.32 gezeigten Chip zur Fokussierung zu benutzen. Abbildung 3.33 zeigt die Fokussierung des Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein in dem Chip. Zur Fokussierung wurde der Isotachophorese-Modus (siehe Kapitel 2.2.2.3) verwendet. Der Farbstoff besaß eine Konzentration von 200 μM , der Gesamtfluss betrug 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ und zur Fokussierung wurde eine Spannung von 350 Volt an die Elektroden des Chips gelegt.

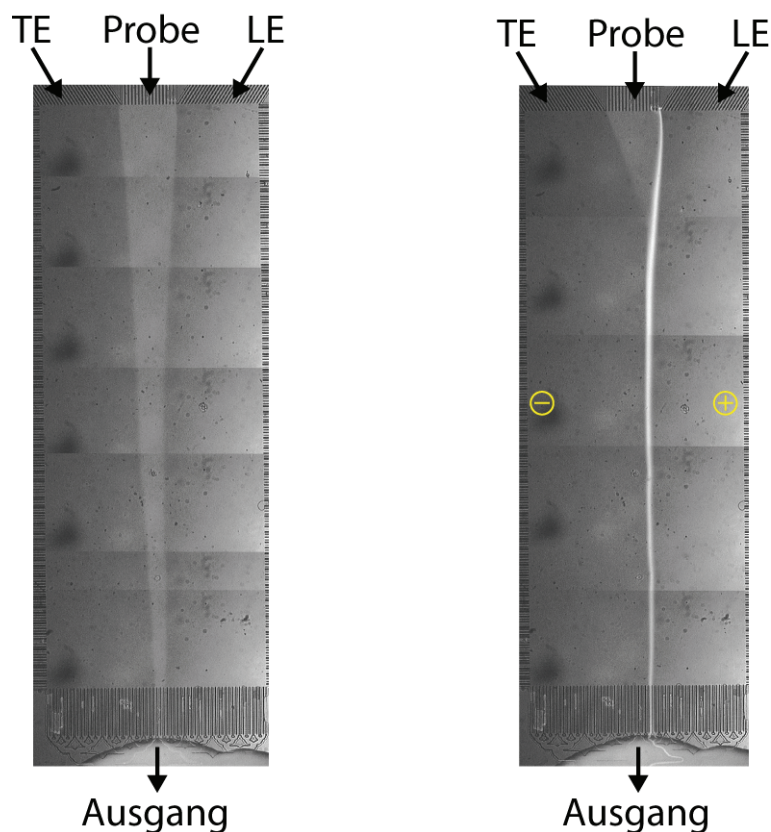


Abbildung 3.33: Isotachophoretische Fokussierung des Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein in einem geklebten μFFE -Chip der ersten Generation. Der Flüssigkeitstransport durch den Chip erfolgte durch Anlegen eines Unterdrucks am Chipausgang.

Die schwarzen Flecken auf der linken Kammerseite wurden durch einen Fleck auf dem Objektiv verursacht. Da die Kammerbilder in Abbildung 3.33 aus mehreren Einzelbildern zusammengesetzt wurden, erscheint der Fleck mehrmals in einem kompletten Kammerbild. Im Bereich der Ausgangskanäle kann man erkennen, dass nicht alle Kanäle vom Kleber befreit wurden.

Um nun auch die Chips der zweiten Generation mit einem Kleber dauerhaft verbinden zu können, wurde der in [104] beschriebene Klebeprozess weiter modifiziert. Um die Viskosität des Delo GB 310 Klebers zu senken, wurde er mit Aceton im Verhältnis 1:3 (Kleber : Aceton) verdünnt. 1 ml dieser Verdünnung wurde dann auf einen in der Lackschleuder fixierten Wafer aufgetragen, bei 500 U/min für 15 Sekunden angeschleudert und danach für 60 Sekunden bei 4000 U/min ausgeschleudert. Die resultierende Schichtdicke auf dem Wafer lag bei etwa 1 μm . Danach wurde der Wafer für zwei Minuten in einen 90 °C heißen Konvektionsofen gelegt, um das Aceton aus dem Kleber zu verdampfen. Nach dem Abkühlen wurde eine erste UV-Belichtung des Klebers vorgenommen. Die Belichtung in dem MA6-Belichter dauerte eine Minute mit einer Leistung von circa 20 mW pro Quadratcentimeter. Durch die Belichtung wurde der Vernetzungsprozess im Kleber gestartet, was zu einer Erhöhung der Viskosität des Klebers führte. Nach der Belichtung wurde die Klebeschicht von dem Wafer auf eine Klebewalze übertragen und dann parallel zu den flachen Seitenkanälen auf den Chip aufgetragen. Durch die Viskositäts-erhöhung aufgrund der Belichtung sollte ein Volllaufen der Seitenkanäle verhindert werden. Nach dem Aufrollen der Kleberschicht wurden die beiden Chipteile zusammengepresst und mit Gewichten beschwert. Anschließend wurden die beiden Teile für fünf Minuten in einen 90 °C heißen Konvektionsofen gelegt. Danach erfolgte die zweite Belichtung zum Aushärten des Klebers. Diese wurde ebenfalls auf dem MA6-Belichter durchgeführt und dauerte zwei Minuten. Untersuchungen unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM) zeigten, dass die Dicke der Klebeschicht auch nach dem Aushärten noch 1 μm entsprach. In Abbildung 3.34b erkennt man, dass der Kleber nicht in die Kanäle gelaufen ist, sondern nur die Seitenwände der Kanäle benetzt hat. Dies kann durch das Pressen der Strukturseite in den Kleber verursacht worden sein. Für die REM-Aufnahmen in Abbildung 3.34 wurde ein Teil der Strukturseite entfernt. Dort, wo sich vor der Entfernung die Stege der Kanäle befunden haben, sind nun Furchen in der Kleberschicht. Diese Furchen deuten auf eine sehr starke Verbindung zwischen Stegen und Kleber hin, beim Ablösen wurde ein Teil des Klebers aus der Kleberschicht herausgerissen.

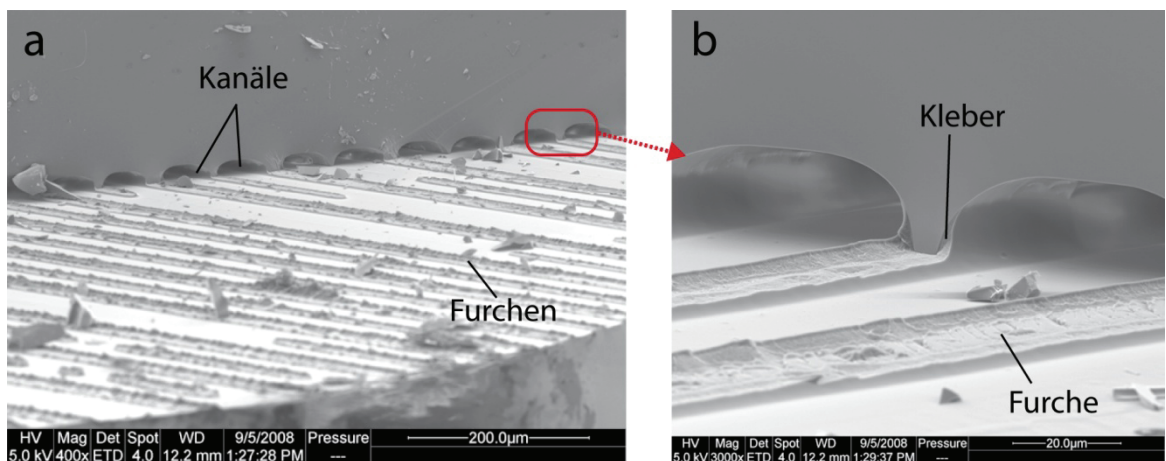


Abbildung 3.34: REM-Aufnahmen der Klebeflächen nach dem Kleben mit der modifizierten Klebemethode. Die Furchen in a) sind beim Ablösen der Chipteile voneinander entstanden; an diesen Stellen sind die Stege zwischen den Kanälen aus dem Kleber gerissen worden. In b) erkennt man, dass der Kleber sich nur an den Kanalwänden "hochgezogen" hat, die Kanaldecke aber nicht erreicht hat.

Allerdings waren die Ergebnisse, welche mit der modifizierten Klebemethode erzielt wurden, ebenfalls nicht reproduzierbar. Das Problem lag aber nicht im Verkleben der Kanäle, sondern daran, dass eine Aushärtung des Klebers nicht reproduzierbar war. Nach Rücksprache mit dem Hersteller des GB 310 Klebers deutet alles darauf hin, dass sich in einer 1 μm dünnen Klebeschicht nicht genügend Moleküle der photoempfindlichen Komponente befinden. Diese Komponente startet bei UV-Belichtung den Vernetzungsprozess des Klebers. Ist nicht genug von der photoempfindlichen Komponente in der belichteten Schicht, härtet der Kleber nicht vollständig, sondern nur an einigen Stellen aus. Dadurch bleibt der Rest des Klebers flüssig und es kommt keine dauerhafte, komplett flüssigkeitsdichte Verbindung zustande.

Weitere Versuche zum Kleben von mikrofluidischen Chips wurden in dieser Arbeit nicht unternommen.

3.3 Chipbetrieb

Nach dem Strukturieren der Chipoberseite und dem Verbinden der Chipoberseite mit der Chipunterseite, dem Boden, ist die eigentliche Chipherstellung abgeschlossen. Zwischen Fertigstellung des Chips und einem Experiment müssen allerdings noch die Fluidikkanäle kontaktiert und der Chip mit Flüssigkeit befüllt werden. Daneben wird in diesem Kapitel auch noch der Betrieb der beiden bereits vorgestellten Chipgenerationen beschrieben.

3.3.1 World-to-Chip Verbindungen

Zum Betrieb eines μFFE-Chips mussten die Fluidikkanäle mit der Außenwelt verbunden werden. Bestand der μFFE-Chip aus PDMS, wurde jeweils eine Kapillare in die gestanzten Ausgangslöcher gesteckt und verklebt. Auf das andere Kapillarende wurde ein Silikonschlauch geschoben. Das flexible PDMS drückte auf die Kapillare, stabilisierte und dichtete sie zugleich ab. Bei einem Glaschip hingegen war das nicht möglich. Hier benötigte man spezielle Führungshülsen zum Fixieren der Kapillaren. Zuerst wurde eine Kapillare in eine Führungshülse geklebt. Die Hülse stabilisierte die Kapillare und sorgte dafür, dass beim Übergang zwischen Ausgangsloch und Kapillareingang keine Flüssigkeit austrat. In dieser Arbeit wurden sowohl Führungshülsen aus Grafit wie auch aus PDMS verwendet.

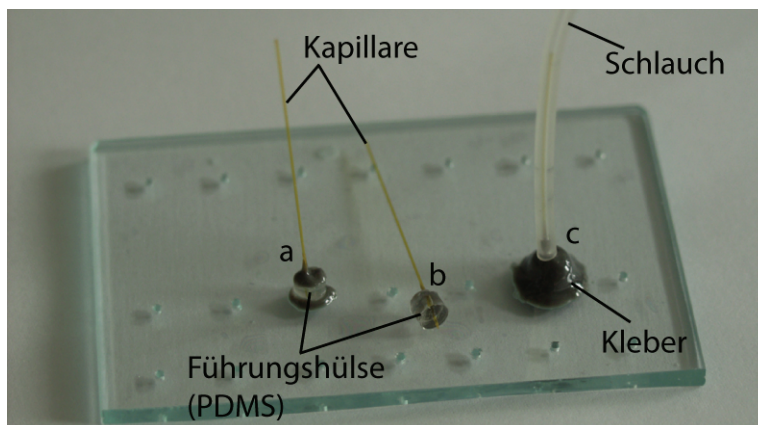


Abbildung 3.35: Flüssigkeitsdichte Verbindung eines Chipausganges mit einem Silikonschlauch. Zuerst wurde eine Kapillare durch die Führungshülse gesteckt und verklebt (b). Die Führungshülse wurde dann auf das Ausgangsloch geklebt (a). Nachdem der Kleber getrocknet war, wurde auf die Kapillare ein Silikonschlauch geschoben und mit der Führungshülse komplett mit Kleber vergossen (c).

Grafithülsen besaßen in der Mitte ein Loch, durch das die Kapillare geschoben wurde. Die PDMS-Hülsen besaßen kein Loch, sondern die Kapillare wurde einfach durch das PDMS hindurch geschoben. Nach dem Verkleben (Abbildung 3.35b) wurde die Führungshülse mit der Kapillare auf das Ausgangsloch geklebt (Abbildung 3.35a). Für alle Anschlüsse wurde eine Kapillare mit einem Innendurchmesser von 250 µm und einem Außendurchmesser von 360 µm verwendet. Nachdem die Führungshülse mit der Kapillare auf dem Chip fixiert worden war, wurde die Hülse komplett mit Kleber vergossen und auf die Kapillare wurde ein Silikonschlauch geklebt (Abbildung 3.35c). An diesen Schlauch konnte nun die Pumpe oder eine Spritze angeschlossen werden. Damit war die flüssigkeitsdichte Verbindung zwischen Fluidikkanal und Außenwelt abgeschlossen.

Wie bereits erwähnt, wurde in der zweiten Chipgeneration ein neues Ausgangsdesign implementiert (siehe Abbildung 3.16). Diese Ausgangsvariante ermöglichte es, im Chip getrennte Proben separat aus dem Chip zu entnehmen und weiterzuverarbeiten. Bestand der Chip aus PDMS, so war die Kontaktierung der Ausgangskanäle einfach. Die Kapillaren wurden einfach in die gestanzten Ausgangslöcher gesteckt. Bei Glaschips hingegen gestaltete sich die Kontaktierung von mehreren Ausgangslöchern schwierig, da die Ausgangslöcher nur etwa 1 mm Abstand zueinander hatten. Da die Führungshülsen aber einen Durchmesser von circa 4 mm hatten, war es nicht mehr möglich, die Ausgänge mit dieser Methode zu kontaktieren. Zur Lösung dieses Problems wurde ein Ausgangsinterface für Glaschips entwickelt, welches die Kontaktierung aller Ausgangslöcher mit Kapillaren erlaubte, die Kapillaren fixierte und die einzelnen Ausgangslöcher so voneinander trennte, dass keine nachträgliche Vermischung der getrennten Analyte stattfinden konnte. Dazu wurde ein etwa fünf mm dickes PDMS-Stück hergestellt, welches so groß war, dass es alle Ausgangslöcher gleichzeitig bedecken konnte. Das PDMS wurde auf die Ausgangslöcher gelegt und mit einer Kanüle wurde durch das PDMS hindurch in die Ausgangslöcher gestochen, so dass für jedes Ausgangsloch deckungsgleich ein Kanal im PDMS entstand. Die eigentliche Kanülenspitze war mechanisch entfernt worden, damit die Kanüle eine flache Spitze besaß. Nachdem mit der Kanüle die Kanäle in das PDMS gestochen worden waren, mussten die PDMS-Reste, die beim Stechen der Kanäle entstanden waren, aus den Kanälen entfernt werden.

Die anschließende dauerhafte und flüssigkeitsdichte Fixierung des PDMS auf dem Glas erfolgte mit Hilfe des Plasma-Bondens (siehe Abschnitt 3.2.1). Nach der Plasma-behandlung wurde das PDMS so ausgerichtet, dass jeder PDMS-Kanal genau das dazugehörige Ausgangsloch des Chips kontaktierte. Nun wurde das PDMS auf das Glas gedrückt und über Nacht mit einem Gewicht beschwert, um das Bonding zu verbessern. War das PDMS-Glas Bonding erfolgreich, so wurden Kapillaren in die PDMS-Kanäle gesteckt. Da die Kapillare einen geringfügig größeren Durchmesser als die PDMS-Kanäle hatten, wurden sie durch den Druck des PDMS auf die Kapillare im PDMS fixiert und abgedichtet. Auf die Kapillaren wurde ein Silikonschlauch gesteckt und abschließend wurde alles mit einem schnellhärtenden Silikon (Panasil, Fa. Kettenbach, Deutschland) verklebt. Abbildung 3.36 verdeutlicht noch einmal das Prinzip des Ausgangsinterfaces.

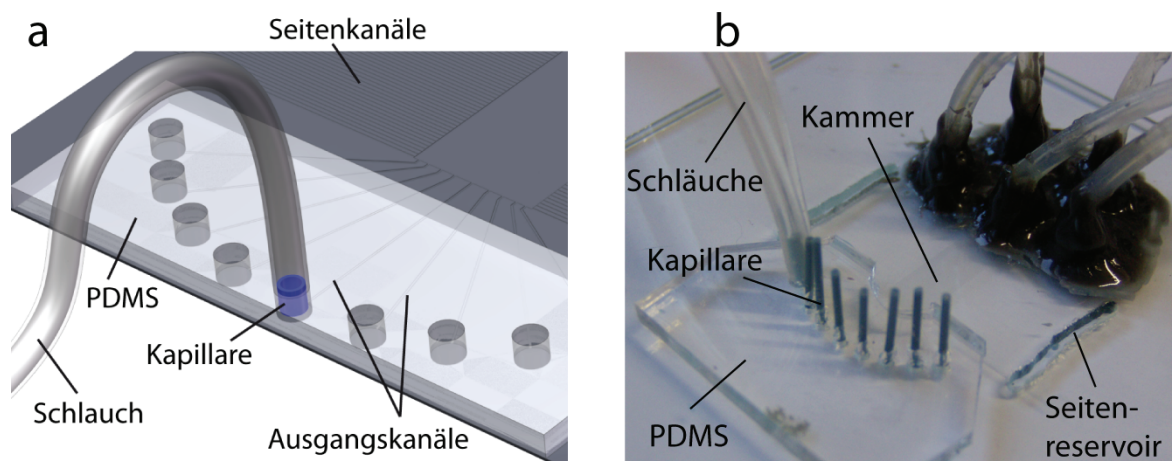


Abbildung 3.36: Darstellung des Ausgangsinterfaces. a) zeigt die schematische Darstellung, b) zeigt das Ausgangsinterface auf einem fertigen Glaschip.

In Abbildung 3.36a ist das Interface schematisch dargestellt, Abbildung 3.36b zeigt das Interface auf einem Glaschip. Mit Hilfe des Ausgangsinterfaces war es möglich, im μFFE-Chip getrennte Substanzen separat aus dem Chip zu führen und zu sammeln, ohne dass eine erneute Vermischung nach Verlassen der Trennkammer erfolgte.

3.3.2 Gasfreies befüllen des μ FFE-Chips

Nachdem die Fluidikkanäle kontaktiert worden waren, musste der Chip befüllt werden. Dabei war es wichtig, dass sich bei Beginn des Experimentes keine Luftblasen mehr in den Kanälen oder der Trennkammer befanden, da diese den Fluss der Probe oder des Puffers beeinflussen konnten. Befanden sich Luftblasen in den Seitenkanälen und wurde eine Spannung angelegt, so erwärmten sich die Luftblasen, dehnten sich aus und gelangten so in die Trennkammer. Da der elektrische Widerstand der Luftblasen deutlich höher war als der Widerstand der Flüssigkeiten, veränderte sich dadurch auch das elektrische Feld in der Trennkammer, was zu einem Zusammenbrechen der Trennung führen konnte.

Um einen μ FFE-Chip frei von Luftblasen befüllen zu können, bedurfte es eines speziellen Aufbaus. Nur durch das aktive Pumpen von Flüssigkeit durch den Chip ließen sich nicht alle Luftblasen aus dem Chip entfernen. Besonders in den flachen Seitenkanälen oder im Bereich mit geringeren Strömungsgeschwindigkeiten konnten sich Luftblasen befinden, die so nicht zu entfernen waren. Auch das Chipmaterial spielte eine Rolle. Während die Glasoberfläche hydrophil war und damit das Entfernen von Luftblasen aus dem Chip erleichterte, war die PDMS-Oberfläche hydrophob und erschwerte somit das Befüllen der PDMS-Chips. Zum erstmaligen Befüllen der Chips wurde deshalb ein Exsikkator verwendet. In diesen wurden die Chips plaziert und alle Chipöffnungen (Eingänge, Ausgänge, Seitenreservoirs) wurden mit Flüssigkeit gefüllt, beziehungsweise alle angeschlossenen Schläuche in ein mit Flüssigkeit gefülltes Glas gesteckt. Als Flüssigkeit konnte sowohl deionisiertes Wasser als auch die jeweilige Pufferlösung verwendet werden. Danach wurde der Exsikkator verschlossen und evakuiert. Beim Belüften des Exsikkators wurde dann die Flüssigkeit, die die Chipöffnungen bedeckte, in den Chip gedrückt und füllte die Strukturen. Falls sich noch immer Luftblasen im Chip befanden, wurde der Vorgang noch einmal wiederholt. Danach war der Chip luftblasenfrei und konnte in Betrieb genommen werden.

3.3.3 Betrieb der ersten μFFE-Chipgeneration

Wie bereits in Abschnitt 3.1.1 erwähnt, wurde die Flüssigkeitsbewegung in den Chips der ersten Generation durch einen Unterdruck am Ausgang erzeugt. Dazu wurde eine Spritzenpumpe an den Ausgang angeschlossen und die gewünschte Flussrate eingestellt. Der Kolben der Spritze bewegte sich dann aus der Spritze heraus und erzeugte so einen Unterdruck im System, welcher die Flüssigkeiten aus den Reservoirs in den Chip sog. Damit der ganze Chip mit nur einer Spritze betrieben werden konnte, wurden alle 64 Ausgangskanäle in einen großen Ausgangskanal zusammengeführt (Abbildung 3.1a). So konnte man durch Änderung der Spritzenparameter direkt die Flussrate im Chip beeinflussen. Dadurch war ein sehr simpler experimenteller Aufbau realisierbar. Allerdings musste darauf geachtet werden, dass die Flüssigkeitsreservoirs des Chips nicht leergesaugt wurden, da ansonsten Luft in den Chip gelangen konnte. Die Chips der ersten Generation besaßen auch einige Nachteile im Betrieb, die dann zur Entwicklung der zweiten Chipgeneration führten. Ein sich nachteilig auswirkender Effekt beim Betrieb der ersten Chipgeneration war das hydrodynamische Fokussieren. Da durch den Unterdruck in der Kammer die Flüssigkeit aus den Seitenreservoirs durch die Seitenkanäle in die Trennkammer strömte, wurde dadurch der Probenstrom in der Trennkammer zusammengeschoben. Dieses Fokussieren ist in Abbildung 3.37 sowohl an einem Farbstoffstrom in der Trennkammer als auch an den Strömungslinien einer Simulation (Abbildung 3.37b) erkennbar. In Abbildung 3.37a erkennt man, dass der Fluoreszenzfarbstoffstrom beim Durchfließen der Kammer schmaler wird und auch die Intensität des Farbstoffes nachlässt. Die Flüssigkeit aus den Seitenreservoirs drückt nicht nur den Probenstrom zusammen. Durch den zusätzlichen Einfluss an Flüssigkeit wird die Probe beim Durchfließen der Trennkammer auch zusätzlich verdünnt, was zur abnehmenden Fluoreszenzintensität führt. Der Effekt des hydrodynamischen Fokussierens ist auch sehr deutlich an den Strömungslinien in Abbildung 3.37b zu erkennen. Die Linien laufen nicht senkrecht durch die Trennkammer sondern sind in Richtung Kammermitte abgelenkt. Außerdem erkennt man, dass die Geschwindigkeit der Flüssigkeit in der Trennkammer zunimmt, je näher sie dem Kammerausgang kommt.

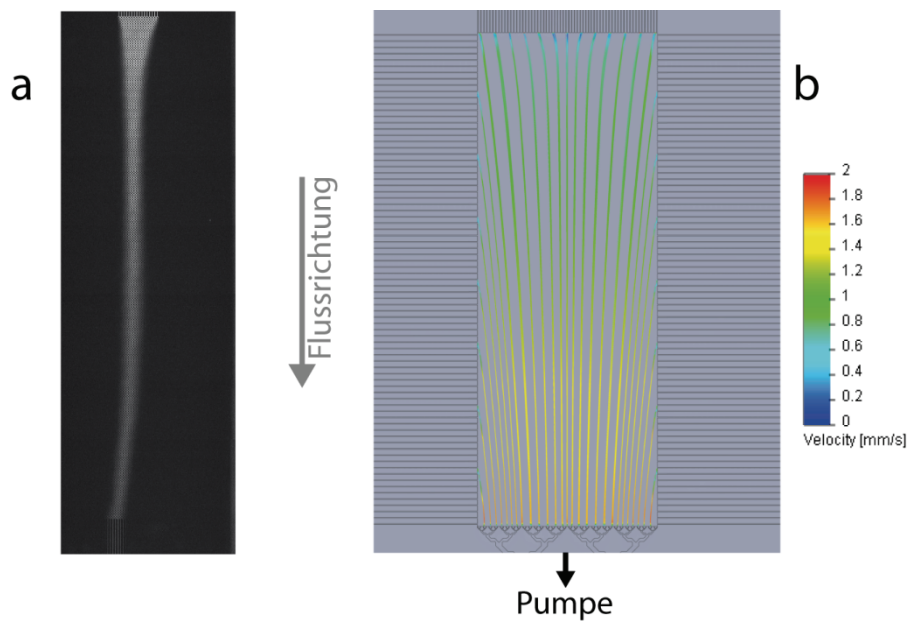


Abbildung 3.37: Auswirkungen der hydrodynamischen Fokussierung. a) zeigt einen Farbstoffstrom in der Kammer. Die Breite des Stroms und die Helligkeit des Farbstoffes reduzieren sich auf dem Weg durch die Kammer. b) zeigt die simulierten Strömungslinien in der Trennkammer eines Chips der ersten Generation.

Ein weiterer Nachteil der ersten Chipgeneration ergab sich durch das Anlegen des Unterdrucks am Chipausgang. Durch das Zusammenführen aller Ausgangskanäle zu einem einzigen Ausgangskanal wurden die in der Trennkammer getrennten Analyte beziehungsweise Komponenten wieder vermischt. Außerdem war der Ausgang durch die Spritze blockiert, die den Unterdruck im Chip erzeugte. Damit die Ausgänge nicht blockiert wurde, musste der Chip, anstatt mit Unterdruck, mit Überdruck betrieben werden, das heißt die Probe und die Pufferlösungen mussten an den Eingängen in den Chip gepumpt werden. Allerdings war dies mit der ersten Chipgeneration nicht möglich. Simulationen und Experimente haben gezeigt, dass ein Teil der Flüssigkeit nicht durch die Ausgangskanäle, sondern durch die Seitenkanäle die Trennkammer verlässt. Abbildung 3.38 zeigt die Simulationsergebnisse für den Fall, dass die Flüssigkeit am Chipeingang mit einer Flussrate von $5 \mu\text{l}/\text{min}$ in den Chip gepumpt wird. Die Strömungslinien verlaufen auch hier nicht senkrecht durch die Trennkammer. Sie werden von der Kammermitte nach außen abgelenkt.

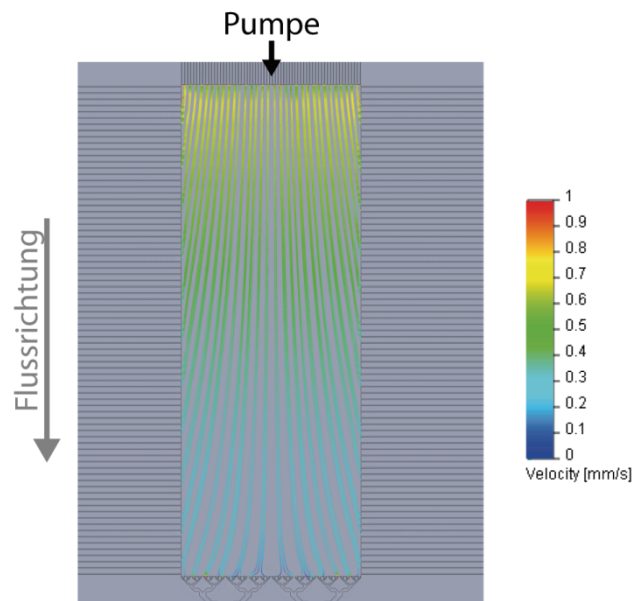


Abbildung 3.38: Ergebnis einer Simulation, bei der die Flüssigkeit durch Pumpen am Chipeingang durch den Chip transportiert wurde. Ein Teil der Flüssigkeit verlässt die Trennkammer durch die Seitenkanäle.

Das hat nicht nur zur Folge, dass die Flüssigkeit die Trennkammer durch die Seitenkanäle verlässt, auch eine Verbreiterung des Probenstroms wird dadurch hervorgerufen. Experimente haben aber gezeigt, dass der Probenstrom den Kammerausgang nicht erreicht. Er wird etwa auf Höhe der Kammermitte in die Seitenkanäle gedrückt. In Abbildung 3.38 erkennt man auch, dass die Flussgeschwindigkeit am Kammereingang am höchsten ist und dann kontinuierlich abnimmt.

Um die beschriebenen Probleme zu lösen, wurde die zweite Chipgeneration entwickelt. Durch flache Seitenkanäle mit einem hohen hydrodynamischen Widerstand sollte sowohl der Effekt der hydrodynamischen Fokussierung vermieden als auch der druckbetriebene Chipbetrieb ermöglicht werden.

3.3.4 Betrieb der zweiten μFFE-Chipgeneration

Der Betrieb der zweiten Chipgeneration war im Vergleich zur ersten Chipgeneration komplexer, da nun mit fünf Spritzenpumpen anstatt mit einer gearbeitet wurde. Jede dieser fünf Pumpen versorgte einen der fünf Chipeingänge. An den Ausgängen wurde über das Ausgangsinterface die Flüssigkeit aus jedem Ausgangskanal separat nach

außen geführt. Wie bereits in Abschnitt 3.1.2 gezeigt, waren die 67 Kammer-
 eingangskanäle auf fünf Chipeingänge verteilt. Dabei gab es drei Chipeingänge, die
 jeweils nur einen Kammereingangskanal versorgen, und zwei Chipeingänge, die
 jeweils auf 32 Kammereingänge aufgeteilt wurden. Daraus resultierten
 unterschiedliche Flussraten für die einzelnen Pumpen, was eine kontinuierliche
 Kontrolle der Pumpenparameter nötig machte, um einen stabilen Fluss in der
 Trennkammer zu erzeugen. Allerdings ermöglichte die Verwendung von mehreren
 Pumpen auch das hydrodynamische „Verschieben“ des Probenstromes in der Kammer.
 Dazu wurde die Flussrate der Eingänge auf einer Kammerseite erhöht, während die
 Flussrate der Eingänge auf der anderen Kammerseite verringert wurde. Aufgrund des
 größeren Volumenstroms auf der Kammerseite mit der hohen Flussrate wurde der
 Probenstrom in Richtung der Kammerseite mit dem geringeren Volumenstrom
 verschoben. So ließen sich getrennte Probenströme gezielt auf einen Ausgangskanal
 lenken. Im Vergleich zu den Chips der ersten Chipgeneration war auch keine
 Verbreiterung oder Verdünnung des Probenstroms in der Trennkammer zu erkennen.
 Abbildung 3.39a zeigt einen Farbstoffstrom in einem Chip der zweiten Generation.

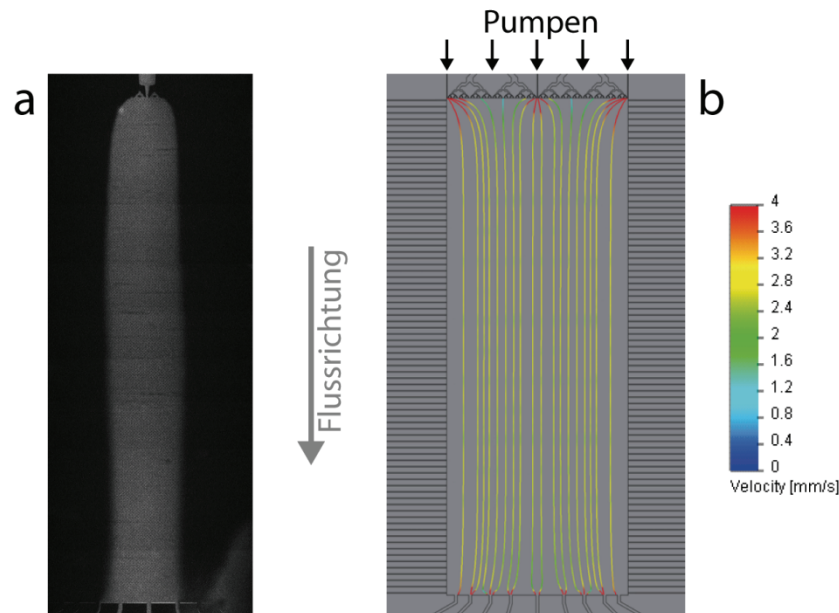


Abbildung 3.39: Strömungsverlauf und Strömungslinien in einem μ FFE-Chip der zweiten Generation. In a) ist keine Verbreiterung oder Verdünnung des Probenstroms erkennbar. Die simulierten Strömungslinien in b) verlaufen abgesehen vom Eingangs- und Ausgangsbereich nahezu senkrecht durch die Trennkammer, dazu ist die Strömungsgeschwindigkeit in der Kammer stabil.

Die Grenzfläche des Probenstroms verläuft fast senkrecht durch die Kammer, eine Verbreiterung oder Verdünnung des Probenstroms ist nicht erkennbar. Die Simulation zeigt vergleichbare Ergebnisse. Die Strömungslinien in Abbildung 3.39b verlaufen senkrecht durch die Trennkammer. Nur im Eingangsbereich und Ausgangsbereich erfolgt eine Ablenkung. Im Eingangsbereich der Trennkammer wird die Ablenkung durch die Flüssigkeit, welche durch die Einzelkanaleinlässe in die Trennkammer einströmt, verursacht. Die Kanäle wirken wie Düsen und verdrängen die Flüssigkeit der benachbarten Eingangskanäle. Im Ausgangsbereich der Kammer verursacht die Anordnung der Ausgangskanäle die Ablenkung der Strömungslinien. Zum einen sind nur neun Ausgangskanäle vorhanden, so dass die Flüssigkeit von der senkrechten Bahn durch die Trennkammer abweichen muss, um durch einen Ausgangskanal die Kammer verlassen zu können. Zum anderen sind die Ausgangskanäle nicht gleichmäßig über die Kammerbreite verteilt, was ebenfalls zu einer Strömungsablenkung führt. Insgesamt zeigte sich, dass die Probleme der hydrodynamischen Fokussierung und der Probenverdünnung mit der Entwicklung der zweiten Chipgeneration gelöst werden konnten.

Ein weiteres Problem der ersten Chipgeneration, das Blockieren des Chipausgangs, konnte durch den druckbetriebenen Flüssigkeitstransport bei den Chips der zweiten Generation ebenfalls gelöst werden. In Kombination mit dem Ausgangsinterface war es nun möglich, die im Chip getrennten Proben getrennt voneinander aus dem Chip zu führen und weiter zu verwenden.

Konsequenzen der Zwei-Tiefen Technik

Mit der Herstellung von zwei verschiedenen Strukturturen in einem Chipsubstrat war es möglich, den hydrodynamischen Widerstand der Seitenkanäle deutlich zu erhöhen und so einen ungewollten Flüssigkeitsverlust durch die Seitenkanäle zu verhindern. Im vorher beschriebenen Herstellungsprozess war die Trennkammer etwa 11-mal tiefer als die Seitenkanäle. Um die Veränderung des hydrodynamischen Widerstandes zwischen einem 17 μm tiefen Seitenkanal der ersten Chipgeneration und einem 1,5 μm tiefen Seitenkanal der zweiten Chipgeneration näherungsweise zu bestimmen, kann man die Hagen-Poiseuille-Gleichung für rechteckige Kanäle verwenden [105]:

$$\dot{V} = \frac{K \cdot \min(b_K, t_K)^3 \cdot \max(b_K, t_K)}{12\eta l} \cdot \Delta p \quad 3.3$$

\dot{V} steht dabei für den Volumenstrom durch den Kanal, b_K ist die Breite, t_K die Tiefe des Kanals, η bezeichnet die dynamische Viskosität der strömenden Flüssigkeit, l ist die Länge des Kanals und Δp ist die Druckdifferenz zwischen Eingang und Ausgang des Kanals. Der Term $\min(b_K, t_K)$ liefert als Ergebnis den kleineren der beiden Parameter b_K und t_K , der Term $\max(b_K, t_K)$ hat als Ergebnis den größeren Parameter. Der Faktor K ist durch

$$K = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n-1)} \frac{192}{\pi^5} \frac{\min(b_K, t_K)}{\max(b_K, t_K)} \tanh \left[(2n-1) \frac{\pi \max(b_K, t_K)}{2 \min(b_K, t_K)} \right] \quad 3.4$$

gegeben. Bei Berechnung der ersten Näherung von K beträgt die maximale Abweichung vom exakten Wert 0,67%, in dritter Näherung beträgt die Abweichung nur noch 0,01% [105].

Nach Gleichung 3.3 war der hydrodynamische Widerstand eines Seitenkanals der zweiten Generation (Kanal tiefe: 1,5 μm , Breite nach Ätzen: 13 μm , Länge: 1,2 cm) etwa 4605-mal größer als der hydrodynamische Widerstand eines Seitenkanals der ersten Chipgeneration (Kanal tiefe: 17 μm , Breite nach Ätzen: 44 μm , Länge: 1,2 cm). Abbildung 3.40 zeigt den errechneten Verlauf des Widerstandsverhältnisses zwischen diesen beiden Seitenkanalvarianten.

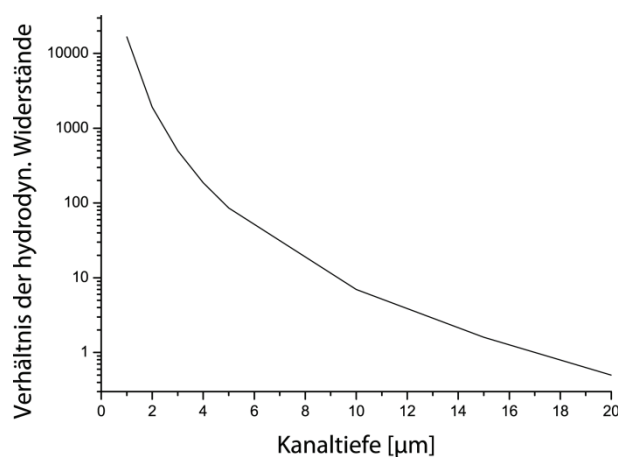


Abbildung 3.40: Verhältnis des hydrodynamischen Widerstandes zwischen einem flachen Seitenkanal der zweiten Chipgeneration und einem 17 μm tiefen Seitenkanal der ersten Generation.

Ein mehr als 4000-fach höherer Flusswiderstand im Vergleich zur ersten Chipgeneration reichte wie gesehen aus, um einen überdruckbetriebenen Chipbetrieb zu ermöglichen.

Durch die Verringerung der Seitenkanaltiefe erhöhte sich aber auch der elektrische Widerstand der Seitenkanäle. Der elektrische Widerstand R bestimmt sich nach dem Ohmschen Gesetz:

$$R = \frac{U}{I} \quad 3.5$$

Dabei bezeichnet U die elektrische Spannung und I die elektrische Stromstärke. Der elektrische Widerstand kann aber auch durch den Querschnitt A eines Leiters, seiner Länge l und dem spezifischen Widerstand ρ berechnet werden:

$$R = \rho \frac{l}{A} \quad 3.6$$

Da der exakte spezifische Widerstand der verwendeten Pufferlösungen nicht bekannt war, aber bei beiden Chipgenerationen die gleichen Lösungen verwendet wurden, lässt sich Gleichung 3.6 vereinfacht schreiben als

$$R \sim \frac{l}{A} \quad 3.7$$

Die Länge der Seitenkanäle war unabhängig von der Chipgeneration, sie betrug immer 1,2 cm. Die Kanalbreite nach dem Ätzen war durch das isotrope Ätzen direkt von der Ätztiefe abhängig. Somit waren auch die elektrischen Seitenkanalwiderstände direkt von der Strukturtiefe abhängig. Abbildung 3.41 zeigt den Verlauf des elektrischen Widerstand eines Seitenkanals in Abhängigkeit von der Kanaltiefe nach Gleichung 3.7. Die Werte können für Glaschips allerdings nur als Näherungen angesehen werden, da die Kanäle im Glas keinen eckigen Querschnitt, sondern einen halbrunden Querschnitt besaßen (siehe Abbildung 3.22). Aufgrund dessen ist der eigentliche Querschnitt noch kleiner, was zu einem noch höheren elektrischen Widerstand führt. Damit nun die elektrische Feldstärke innerhalb der Trennkammer die gleichen Werte wie bei den Chips der ersten Generation erreichen konnte, musste eine deutlich höhere Spannung an die zweite Chipgeneration angelegt werden.

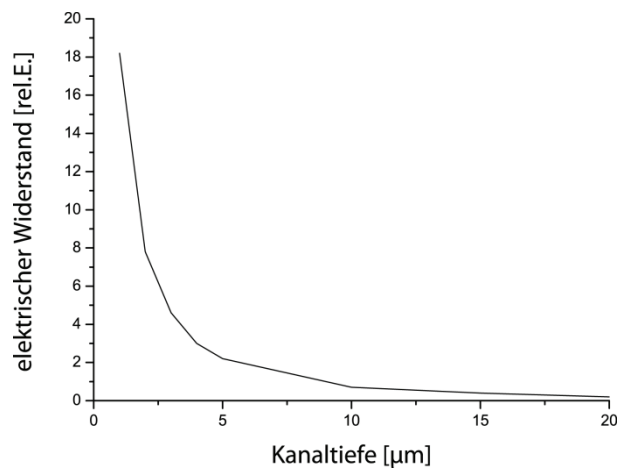


Abbildung 3.41: Abhängigkeit des elektrischen Widerstandes von der Tiefe des Kanals. Zur Vereinfachung wurde mit einem rechteckigen Kanalquerschnitt gerechnet.

Für eine Analytablenkung mussten an die Chips der ersten Generation Spannungen im Bereich von mehreren hundert Volt (200 V bis 400 V) angelegt werden. Bei den Chips der zweiten Generation waren es Spannungen im Bereich von mehreren Kilovolt (2 kV bis 4 kV). Grund hierfür war der hohe Spannungsabfall in den flachen Seitenkanälen aufgrund des hohen elektrischen Widerstandes.

Die geringe Kanaltiefe führte auch zu einer stärkeren Erwärmung der Seitenkanäle. Ein elektrischer Leiter erwärmt sich umso mehr, je größer die Stromdichte in dem Leiter ist. Die Stromdichte J ist gegeben durch

$$J = \frac{I}{A} \quad 3.8$$

I beschreibt die angelegte Stromstärke und A den Querschnitt des Leiters. Im Falle der Seitenkanäle kann die Stromdichte auch durch

$$J = \frac{I}{t_K(2t_K + b_{Maske})} \quad 3.9$$

angegeben werden. Dabei steht t_K für die Tiefe des Seitenkanals und $2t_K + b_{Maske}$ für die Seitenkanalbreite. Die Seitenkanalbreite ist die Summe aus der Grundkanalbreite b_{Maske} und der ätzbedingten Kanalverbreiterung. Die Kanalverbreiterung ist Folge des isotrope Ätzen und entspricht der doppelten Ätztiefe $2t_K$. Die Grundkanalbreite ist die Kanalbreite auf der Photomaske und beträgt konstant 10 µm. Anhand von Gleichung 3.9 erkennt man, dass die Stromdichte bei geringerer Kanaltiefe steigt. Eine größere Stromdichte bewirkt eine stärkere Wärmeerzeugung im Seitenkanal.

Die Messung dieser Erwärmung ist allerdings sehr komplex und war in dieser Arbeit nicht mehr möglich. Eine Temperaturmessung mit temperaturabhängigen Farbstoffen direkt im Chip ist nicht möglich. Sobald die Spannung angelegt wird, bewegen sich die geladenen Farbstoffe im elektrischen Feld. Selbst ungeladene Farbstoffe würden durch den elektroosmotischen Fluss in Bewegung versetzt werden. Eine externe, an der Chipoberfläche durchgeführte Messung ist ebenfalls schwierig, da die Wärmeverteilung im Chipmaterial zu Messfehlern führen kann.

Um eine erste Übersicht über die entstehende Temperaturverteilung in der Trennkammer zu bekommen, wurde eine Simulation erstellt. Die Simulation wurde bei einer Gesamtflussrate von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchgeführt. Für jeden Seitenkanal wurde eine Wärmeerzeugung von $8,03 \times 10^{-8}$ J/s festgelegt. Dieser Wert wurde für einen 1,5 μm tiefen, 1,2 cm langen und 13 μm breiten Seitenkanal berechnet, der mit reinem Wasser ($\rho=18,2$ M Ωcm) gefüllt war. Für die Berechnung wurde eine Spannung von 3 kV angenommen. Die Simulation hat gezeigt, dass sich in so einem Fall in den Randbereichen der Trennkammer ein Temperaturgradient ausbildet (Abbildung 3.42).

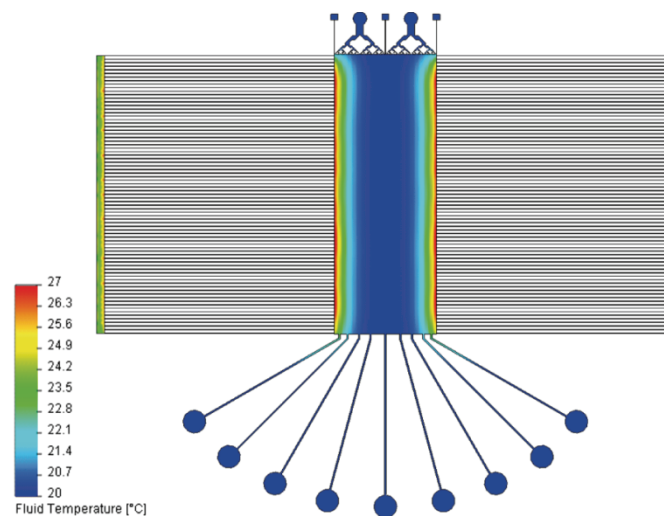


Abbildung 3.42: Simulation eines Chips mit 1,5 μm tiefen Seitenkanälen. Bedingt durch die Wärmeerzeugung in den Seitenkanälen entstehen Temperaturgradienten an den Kammerseiten.

Besitzt der verwendete Puffer eine temperaturabhängige Leitfähigkeit, kann dies in den Kammerrandbereichen zu einer Veränderung der elektrischen Feldstärke, und somit zu einer Beeinflussung der Trennung führen.

4 Temperature Gradient Focusing in μ FFE-Chips

Temperature Gradient Focusing (TGF) ist eine aus der Kapillarelektrophorese (CE) bekannte Methode zum Trennen und Fokussieren von Analyten [57, 106, 107], die auch schon in Mikrokanälen angewendet wurde [108-110]. Im folgenden Kapitel wird die Anwendung des Temperature Gradient Focusing mit der miniaturisierten Free-Flow Elektrophorese beschrieben. Einige der in diesem Kapitel genannten Ergebnisse wurden in einem Artikel in der Fachzeitschrift „Electrophoresis“ veröffentlicht [39].

4.1 Temperature Gradient Focusing – Einleitung und Theorie

Die Trennung und Anreicherung von organischen Substanzen ist heutzutage ein wichtiger Prozessschritt, sowohl in der Forschung als auch in der Produktion im Life-Science Sektor. So können zum Beispiel Proteine eines Proteingemisches aufgetrennt und anschließend angereichert werden, um für weitere Analysen höhere Konzentrationen der einzelnen Proteine zu erreichen. Eine weit verbreitete Methode zum Trennen und Fokussieren von Proteinen ist das Isoelektrische Fokussieren (IEF) (siehe Kapitel 2.2.2.2).

In der klassischen isoelektrischen Fokussierung erfolgt die Trennung normalerweise in einem Polyacrylamid-[111, 112] oder einem Agarosegel [113-115]. In diesen Gels wurde vor dem Start der Trennung ein pH-Gradient immobilisiert [2, 116, 117]. Nach dem Einbringen der Proteine wird ein elektrisches Feld an das Gel angelegt, so dass die eingebrachten Proteine zu wandern beginnen. Nachteile der klassischen Gelmethode sind die mangelnde Automatisierbarkeit, der hohe Zeitaufwand und die schlechte Quantifizierbarkeit, da zur Detektion Färbereaktionen [2, 118, 119] durchgeführt werden müssen. Außerdem gibt es Probleme bei der Reproduzierbarkeit der Trennergebnisse.

Um die oben genannten Nachteile der klassischen IEF zu überwinden, wurde das IEF auf die Kapillarelektrophorese (CE) übertragen. Die daraus resultierende Methode wird CE-IEF genannt. Im CE-IEF wird der pH-Gradient in der Kapillare durch eine große

Anzahl von Ampholyten mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten gebildet [2, 9, 120]. Bei Anlegen einer Spannung an die Kapillare wandern die Ampholyten zu ihren pI-Werten und bilden so den pH-Gradienten. Bringt man nun ein Proteingemisch in die Kapillare ein, so fokussieren sich die einzelnen Proteine an ihren pI's. Ähnlich wie beim klassischen IEF besitzt auch das CE-IEF einige Nachteile. Die Kapillarelektrophorese ist eine diskontinuierliche Methode. Möchte man größere Probenmengen trennen, bedarf es mehrerer Durchläufe. Ein weiteres Problem gibt es bei der Detektion der getrennten Proteine. Da sich die Proteine an ihrem pI irgendwo in der Kapillare fokussieren und sich der Detektor bei der CE meist am Ende der Kapillare befindet, müssen die fokussierten Proteine erst noch zum Detektor bewegt werden. Diese Mobilisierung kann durch verschiedene Arten erfolgen, zum Beispiel durch Erzeugen eines elektroosmotischen Flusses (EOF), durch Anlegen eines hydrodynamischen Druckes oder durch nachträgliche Veränderung des pH-Gradienten, was zu einer erneuten Wanderung der Proteine in der Kapillare führt [2].

Das Free-Flow isoelektrische Fokussieren (FF-IEF) löst die Probleme des CE-IEF, da es als kontinuierliche Trennmethode die Trennung großer Probenmengen erlaubt und auch der Transport der getrennten Proteine zum Detektor kein Problem darstellt.

Um allerdings die genannten IEF-Varianten (Gel-IEF, CE-IEF, FF-IEF) anwenden zu können, müssen die Proteine bestimmte Voraussetzungen erfüllen. Zum einen müssen sie einen isoelektrischen Punkt besitzen, damit es einen Punkt im pH-Gradienten gibt, an dem die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld stoppt. Zum anderen müssen die Proteine an ihrem isoelektrischen Punkt eine genügend hohe Löslichkeit besitzen. Die Löslichkeit eines Proteins wird aber sehr stark durch den pH-Wert der Umgebung beeinflusst und ist am isoelektrischen Punkt des Proteins am niedrigsten [57, 121]. Somit ist der Anwendungsbereich der isoelektrischen Fokussierung sehr begrenzt.

Um diese Einschränkungen zu überwinden, entwickelten Ross und Locascio 2002 das Temperature Gradient Focusing (TGF) für die CE [57]. Das TGF erlaubt die Trennung und Fokussierung von geladenen Analyten, unabhängig von ihrem isoelektrischen Punkt. Dabei erfolgt die Fokussierung des Analyten an dem Punkt im System, wo sich seine elektrophoretische Geschwindigkeit und der elektroosmotische Fluss gegeneinander aufheben. An diesem Punkt beträgt die Gesamtgeschwindigkeit des

Analyten null. Die Mechanismen und Vorgänge während des TGF lassen sich am einfachsten am Beispiel eines Mikrokanals verdeutlichen. In Abbildung 4.1 sieht man einen puffergefüllten Mikrokanal mit Elektroden an beiden Enden. Der Kanal wird auf der einen Seite geheizt und auf der anderen Seite gekühlt, so dass ein Temperaturgradient in der Flüssigkeit im Mikrokanal entsteht, hier durch den Farbverlauf angedeutet.

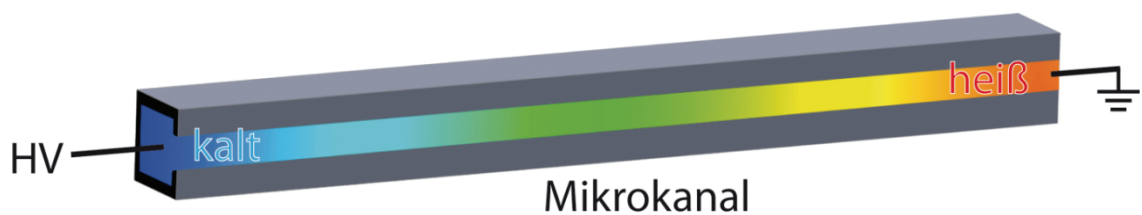


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung eines Temperaturgradienten in einem Mikrokanal.

Die Geschwindigkeit eines Analyten in diesem Mikrokanal ergibt sich aus der Summe seiner elektrophoretischen Geschwindigkeit v_{EP} und der elektroosmotischen Geschwindigkeit v_{EOF} :

$$v_{\text{total}} = v_{EP} + v_{EOF} \quad 4.1$$

Die elektrophoretische Geschwindigkeit eines Analyten im Mikrokanal wird durch das Produkt des elektrischen Feldes E und der elektrophoretischen Mobilität μ_{EP} des Analyten beschrieben:

$$v_{EP} = E\mu_{EP} \quad 4.2$$

Das elektrische Feld im Mikrokanal kann durch

$$E = \frac{U}{l} = \frac{IR}{l} = \frac{I}{l} \rho \frac{l}{A} = \frac{I}{A} \rho = \frac{I}{A\sigma} \quad 4.3$$

berechnet werden, wobei I den elektrischen Strom, A den Kanalquerschnitt und σ die Leitfähigkeit des Puffers bezeichnet.

Um nun eine Fokussierung zu erzielen, darf die elektrophoretische Geschwindigkeit über den gesamten Mikrokanal nicht konstant sein, sondern es muss ein Geschwindigkeitsgradient im Mikrokanal vorliegen. Wenn das der Fall ist, kann die zur elektrophoretischen Geschwindigkeit entgegen gerichtete elektroosmotische Geschwindigkeit so eingestellt werden, dass die Gesamtgeschwindigkeit an einer

Stelle im Kanal null ist. An dieser Stelle wird der Analyt fokussiert. Aus Gleichung 4.3 ergibt sich, dass sich durch eine veränderbare Leitfähigkeit der Gradient der elektrophoretischen Geschwindigkeit erzeugen lässt. Aus diesem Grund wird beim TGF ein Puffer mit einer temperaturabhängigen Leitfähigkeit benutzt. In Abbildung 4.2 wird schematisch das Prinzip des TGF dargestellt. Abbildung 4.2a zeigt den Temperaturverlauf im Mikrokanal nachdem die Temperatur angelegt worden ist.

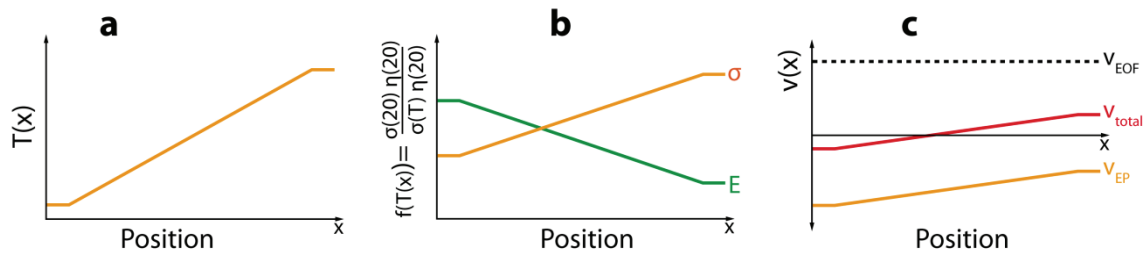


Abbildung 4.2: TGF in einem Mikrokanal (Schematische Darstellung). a) zeigt den Temperaturverlauf im Kanal. b) Aufgrund der temperaturabhängigen Leitfähigkeit des Puffers ist auch das elektrische Feld temperaturabhängig. c) Der elektroosmotische Fluss kann nun so eingestellt werden, dass sich an einer Stelle im Kanal die elektrophoretische Geschwindigkeit und die entgegen gesetzte wirkende elektroosmotische Geschwindigkeit aufheben. An dieser Stelle wird der Analyt fokussiert.

Im Folgenden wird der Strom als konstant angesehen, da der Stromfluss durch den Kanal an jeder Stelle gleich ist. Der Spannungsabfall und das elektrische Feld in einem Teilbereich des Mikrokanals hingegen sind abhängig von der jeweiligen Temperatur des Bereiches und damit nicht konstant über die Kanallänge.

In Abbildung 4.2b erkennt man die temperaturabhängige Leitfähigkeit σ des Puffers. Mit steigender Temperatur steigt auch die Leitfähigkeit. In den meisten Fällen ist eine Veränderung der Pufferviskosität durch eine Temperaturveränderung der Hauptgrund für die temperaturabhängige Leitfähigkeitsänderung eines Puffers. Diese temperaturabhängige Leitfähigkeitsänderung kann durch

$$\sigma = \frac{\eta(20)\sigma_0}{\eta(T)f(T)} \quad 4.4$$

beschrieben werden [57]. Dabei ist T die Temperatur, σ_0 die Leitfähigkeit des Puffers bei $T=20^\circ\text{C}$, $\eta(T)$ die temperaturabhängige Viskosität, und die Funktion $f(T)$ bildet alle anderen temperaturabhängigen Vorgänge (zum Beispiel Vorgänge, die durch eine temperaturabhängige Ionenstärke hervorgerufen werden) ab. Die Funktion $f(T)$ ist auf $f(20) = 1$ normalisiert.

Nach Gleichung 4.3 ist damit auch das elektrische Feld E temperaturabhängig (Abbildung 4.2b). Mit steigender Temperatur wird das elektrische Feld schwächer. Das temperaturabhängige elektrische Feld lässt sich nun, unter Verwendung von 4.3 und 4.4, folgendermaßen berechnen:

$$E = \frac{I\eta(T)f(T)}{A\sigma_0\eta(20)} \equiv E_0 \frac{\eta(T)f(T)}{\eta(20)} \quad 4.5$$

Da die elektrophoretische Mobilität ebenfalls, ähnlich wie die Leitfähigkeit, über die Viskosität temperaturabhängig ist, lässt sich die Mobilität, analog zu 4.4, schreiben als

$$\mu_{EP} = \frac{\eta(20)\mu_{EP}^0}{\eta(T)f_{EP}(T)} \quad 4.6$$

wobei μ_{EP}^0 für die elektrophoretische Mobilität bei $T = 20 \text{ °C}$ steht und die Funktion $f_{EP}(T)$ wiederum Temperaturabhängigkeiten der elektrophoretischen Mobilität beschreibt, die nicht auf Änderungen der Viskosität zurückzuführen sind ($f_{EP}(20) = 1$).

Unter Verwendung von 4.5 und 4.6 lässt sich die elektrophoretische Geschwindigkeit v_{EP} dann schreiben als:

$$v_{EP} = E_0\mu_{EP}^0 \frac{f(T)}{f_{EP}(T)} \quad 4.7$$

Aus Gleichung 4.7 geht hervor, dass die temperaturabhängige elektrophoretische Geschwindigkeit nur von $f(T)$ und $f_{EP}(T)$ abhängig ist. Haben $f(T)$ und $f_{EP}(T)$ die gleiche Temperaturabhängigkeit oder sind beide konstant, dann ist v_{EP} nicht temperaturabhängig. Der angelegte Temperaturgradient wird zwar aufgrund von Viskositätsänderungen einen Gradienten im elektrischen Feld erzeugen (siehe Gleichung 4.5), dieser Feldgradient erzeugt aber keinen Geschwindigkeitsgradienten im Kanal. Haben $f(T)$ und $f_{EP}(T)$ verschiedene Temperaturabhängigkeiten, so wird der Temperaturgradient einen Gradienten in der elektrophoretischen Geschwindigkeit erzeugen (Abbildung 4.3c).

Der zur elektrophoretischen Geschwindigkeit entgegen gesetzt wirkende elektroosmotische Fluss (EOF) hingegen ist konstant über den ganzen Mikrokanal. Der EOF kann nun so eingestellt werden, dass sich die elektroosmotische Geschwindigkeit v_{EOF} und die elektrophoretische Geschwindigkeit v_{EP} aufheben (siehe Gleichung 4.1).

An dieser Stelle beträgt die Gesamtgeschwindigkeit des Analyten null und er wird dort fokussiert (Abbildung 4.3c).

Grundlegende Voraussetzung für das Temperature Gradient Focusing ist somit ein Puffer mit einer temperaturabhängigen elektrischen Leitfähigkeit. Im Free-Flow-TGF-System wird der Temperaturgradient dann senkrecht zur Flussrichtung, parallel zum elektrischen Feld, an die Trennkammer beziehungsweise an den Chip angelegt (Abbildung 4.3). Durch das Anlegen des elektrischen Feldes entsteht eine elektrophoretische Bewegung der Analyte. Da sich, wie oben beschrieben, durch den Temperaturgradienten ein Leitfähigkeitsgradient im Puffer und damit ein Gradient im elektrischen Feld bildet, wird die elektrophoretische Bewegung zu einer Seite hin schwächer, da hier die Leitfähigkeit des Puffers höher ist.

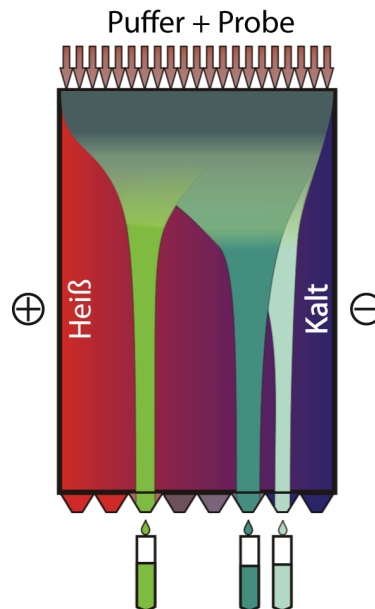


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des Free-Flow Elektrophoretischen Temperature Gradient Focusing.

Da aber der elektroosmotische Fluss über die ganze Kammerbreite, unabhängig von der Temperatur, gleich groß ist, gibt es eine Stelle, an der sich die elektrophoretische Bewegung in die eine und der elektroosmotische Fluss in die andere Richtung gegenseitig aufheben. Dort wird der Analyt fokussiert und durch den hydrodynamischen Fluss aus der Kammer befördert.

4.2 Experimenteller Aufbau – Temperature Gradient Focusing

Um das TGF auf die Free-Flow-Elektrophorese anwenden zu können, musste der experimentelle Aufbau modifiziert werden. Neben der Fixierung des Chips und der Detektion musste im Aufbau natürlich auch die Möglichkeit vorhanden sein, das System zu heizen beziehungsweise zu kühlen. Um das zu erreichen, wurde ein spezieller Mikroskopaufsatz entworfen (Abbildung 4.4).

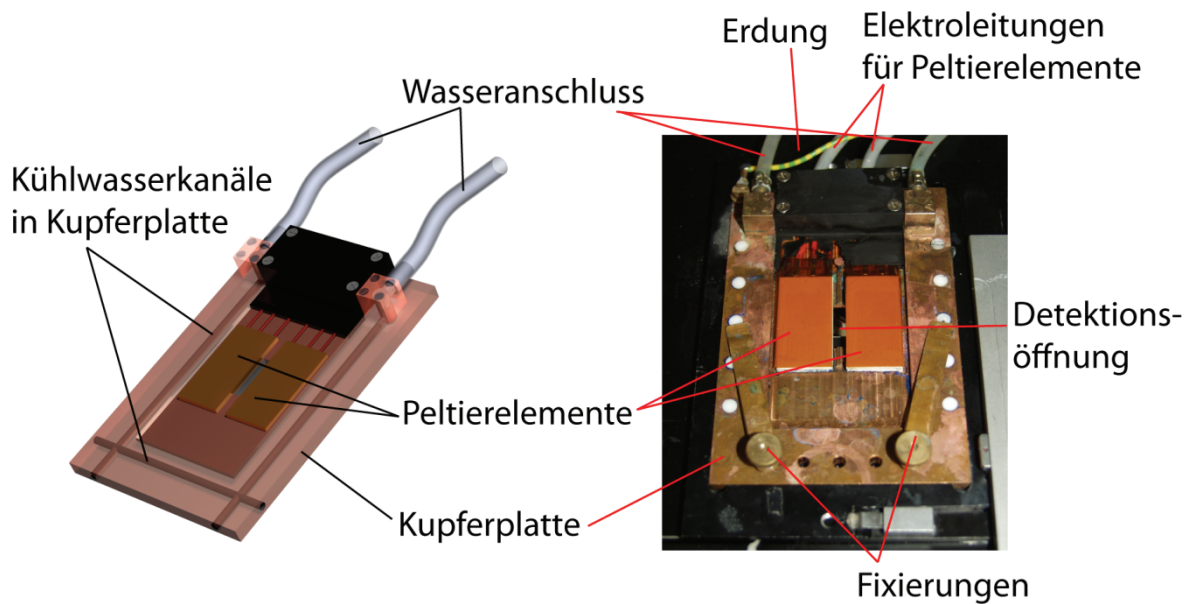


Abbildung 4.4: TGF-Aufsatz. Die linke Skizze zeigt die Kühlwasserkanäle in der Kupferplatte, das rechte Bild zeigt den kompletten Aufsatz auf dem Mikroskop.

Die Grundplatte des Aufsatzes war aus Kupfer gefertigt. Kupfer besitzt eine sehr hohe Temperaturleitfähigkeit und ermöglicht damit eine effiziente Temperierung des Aufsatzes. Um in der späteren Anwendung den Chip heizen beziehungsweise kühlen zu können, wurden in die Kupferplatte zwei Peltierelemente integriert. Diese saßen in einer Versenkung in der Mitte. Die Oberseite der Peltierelemente schloss mit dem Rest der Platte bündig ab, so dass der Chip im späteren Betrieb sowohl auf dem Kupfer als auch auf den Peltierelementen lag. Durch den direkten Kontakt zwischen Temperaturelementen und Chip war ein effizienter Wärmetransfer gewährleistet. Die Ansteuerung und Stromversorgung der Peltierelemente erfolgte über zwei Leitungen an der Rückseite des TGF-Aufsatzes. Zur Steuerung der Peltiers wurden zwei Temperaturcontroller verwendet. Die Peltierelemente besaßen einen Abstand von 4,5 mm. Dazwischen war eine Öffnung in die Kupferplatte gebohrt worden, um eine

Detektionsöffnung zu schaffen. Die Trennkammer des Chips lag während des Experiments genau zwischen den beiden Peltierelementen. Der freie optische Weg auf die Trennkammer erlaubte mit Hilfe des Mikroskops sowohl eine optische Inspektion als auch eine optische Detektion. Der TGF-Aufsatz wurde durch einen externen Thermostaten mittels Wasser gekühlt. Dazu wurden in die Kupferplatte Kanäle gebohrt. Diese Kanäle laufen außen um die Versenkung (Abbildung 4.4a) herum. Die offenen Enden der Kanäle wurden durch Schrauben verschlossen, so dass ein geschlossenes System entstand. Der Thermostat pumpte das Wasser durch einen der Wasserschläuche in die Kupferplatte, dort kühlte das Wasser den Kupferblock, und durch den anderen Schlauch wurde das Wasser zurück in den Thermostaten geleitet. Um den Chip auf dem TGF-Aufsatz fixieren zu können, wurde ein Klemmsystem benutzt. Im vorderen Teil der Platte wurden Löcher in das Kupfer gebohrt. In diese Löcher konnten nun Klemmen gesteckt werden (siehe Bild in Abbildung 4.4), welche den Chip auf den TGF-Aufsatz drückten und ihn so gegen Verrutschen fixierten.

Der oben beschriebene TGF-Aufsatz befand sich in der Verfahrenseinheit des Mikroskops und war dort durch Klemmen fixiert. Abbildung 4.5 zeigt den Mikroskopaufbau, der für die Temperature-Gradient-Focusing-Experimente verwendet wurde. Für die Experimente wurde ein inverses DMIL Mikroskop der Firma Leica verwendet. Eine Quecksilberdampfampe (Leistung 50W), ebenfalls von Leica, wurde als Lichtquelle für die optische Detektion verwendet. Für Fluoreszenzuntersuchungen wurden Filterwürfel verwendet, um die richtige Anregungs- und Emissionswellenlänge für die jeweiligen Proben einzustellen. Dabei wurde durch einen Bandpassfilter die Anregungswellenlänge für die Probe festgelegt (Abbildung 4.5, blaue Linie). Das so gefilterte Licht wurde auf einen dichromatischen Spiegel abgelenkt und durch ein Objektiv auf die Probe fokussiert. Das dort angeregte Fluoreszenzlicht traf nach Durchqueren des Objektivs wieder auf den dichromatischen Spiegel. Da es aber langwelliger als das Anregungslicht war, wurde es dort nicht abgelenkt, sondern passierte den Spiegel und gelangte dann anschließend in den Detektor (Abbildung 4.5, grüne Linie).

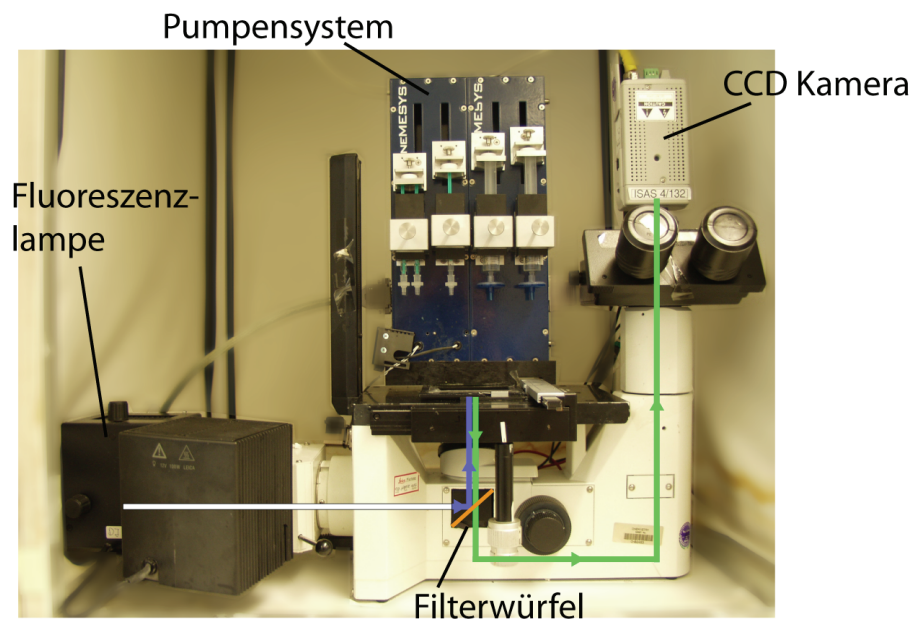


Abbildung 4.5: Experimenteller TGF-Aufbau inklusive der optischen Wege im System.

Das computergesteuerte Pumpensystem (neMESYS, cetoni, Korbußen), das zum Betrieb der Mikrofluidikchips benutzt wurde, ist ebenfalls in Abbildung 4.5 zu sehen. Die Pumpen förderten bis zu Flussraten von wenigen Nanolitern pro Minute die Flüssigkeiten pulsationsfrei, was stabile Flüssigkeits-Phasenfronten und stabile Flussraten erlaubte. Ein weiterer Vorteil war die Erweiterbarkeit des neMESYS-Systems. Mit einem Pumpencontroller ließen sich bis zu 32 Pumpenachsen ansteuern. Des Weiteren erlaubte die Pumpenkontroll-Software einen schnellen Überblick über die eingestellten Pumpenparameter. Für die TGF-Experimente wurden, wie in Abbildung 4.5 dargestellt, vier Pumpenachsen verwendet. Da eine Achse mit zwei Spritzen betrieben wurde, konnten so fünf Chipeingänge parallel betrieben werden.

Als Spannungsquelle zur Erzeugung des elektrischen Feldes innerhalb des Chips wurde ein Gleichstrom-Hochspannungsgenerator der Firma F.u.G. Elektronik (Rosenheim) verwendet.

4.3 TGF-Chipdesigns und Materialkombinationen

Im Rahmen der Free-Flow Temperature-Gradient-Focusing (FF-TGF) Experimente wurden verschiedene Chipdesigns und Materialkombinationen verwendet. In diesem Unterkapitel wird nur auf die Designs der TGF-Chips und die verwendeten Materialkombinationen für die Chips eingegangen. Für nähere Informationen zur Chipherstellung und zum Bonding sei auf das Kapitel 3 verwiesen. Außerdem werden die Simulationsergebnisse der verschiedenen Chipdesigns gezeigt.

4.3.1 Materialkombinationen

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Materialkombinationen zur TGF-Chipherstellung verwendet. Durch die separate Herstellung der Ober- und Unterseite eines μ FFE-Chips war es kein Problem, Chips aus verschiedenen Materialien zu testen.

Die ersten FF-TGF Chips wurden aus PDMS und Glas hergestellt. Dabei wurden die Strukturen des Chips in PDMS abgeformt. Das PDMS mit den abgeformten Strukturen bildet in dem späteren Chip die Oberseite, welche mit den Schlauchanschlüssen und den Reservoirs versehen wurde. Als Unterseite wurde 200 μ m dicke Glas verwendet. Durch die Glasplatte wurde ein schneller Temperaturübertrag auf die Flüssigkeiten im Chip gewährleistet. Dies ist besonders beim TGF von Bedeutung, da das Erzeugen eines Temperaturgradienten im Puffer sehr wichtig ist. Die Materialkombination PDMS-Glas besaß einige Vorteile. Zum einen erlaubte die Verwendung von PDMS eine schnelle und, im Vergleich zur Glasstrukturierung, einfachere Herstellung der Strukturseite. Zum anderen übertrug die dünne Glasplatte als Chipunterseite die Temperatur schnell auf die Flüssigkeit im Chip. Allerdings gab es auch einige Nachteile. Die Hydrophobizität des PDMS erschwerte das erstmalige, luftblasenfreie Befüllen des PDMS-Glaschips. Des Weiteren konnten sich zum Beispiel Proteine an der PDMS-Oberfläche anlagern und somit zur Trennung nicht mehr zu Verfügung stehen. Zwar ließen sich die Anlagerung an der PDMS-Oberfläche durch Methylzellulose verhindern, dies erforderte aber einen zusätzlichen Spülschritt des Chips. Das Handling der 200 μ m dicken Glasplatte war ein weiteres Problem. Zu starker Druck auf den Chip oder zu hoher Wasserdruck beim Abspülen der Glasplatte während der Herstellung konnten schon das Brechen der Platte zur Folge haben.

Um das Handlingproblem in den Griff zu bekommen, wurde versucht, das Dünnglas als Chipunterseite durch eine dünne PDMS-Schicht zu ersetzen. Da die Wärmeleitfähigkeit von PDMS aber etwa vier Mal niedriger als die von Glas ist (λ_{PDMS} : 0,18 W/mK; λ_{Glas} : 0,8 W/mK) bedeutete das, dass die PDMS-Unterseite nur etwa 50 μm dick sein durfte, um eine ähnlich schnelle Wärmeübertragung wie bei der Verwendung von Dünnglas als Unterseitenmaterial zu erreichen. Durch eine spezielle Rolltechnik war es möglich, circa 70 μm dicke PDMS-Schichten herzustellen und mit der strukturierten PDMS-Oberseite zu bonden. Allerdings gab es auch bei einem reinen PDMS-Chip Nachteile. So konnten die oben genannten Probleme der Anlagerung und Hydrophobizität nicht überwunden werden. Aufgrund der Flexibilität des PDMS bestand die Gefahr des Brechens der Chipunterseite nicht mehr, allerdings brachte das Verarbeiten einer 70 μm dicken PDMS-Schicht auch Probleme (Abreißen, Kleben des PDMS an diversen Oberflächen). Auch wölbte sich die PDMS-Unterseite aufgrund ihrer geringen Dicke, wenn ein hydrodynamischer Druck an den Chip angelegt wurde.

Als Alternative zu Chips aus PDMS wurde ein reiner Glaschip verwendet. Hierbei wurden sowohl die Unterseite als auch die Oberseite des Chips aus Glas hergestellt. Die Herstellung eines solchen Glaschips ist ebenfalls in Kapitel 3 beschrieben. Für die ersten FF-TGF Chips aus Glas wurde Soda-Lime-Glas (Kalknatronglas) benutzt. Dieser Glastype ist die am meisten verbreitete Glassorte [122]. Es wird unter anderem zur Herstellung von Behälterglas und Flachglas verwendet. Aufgrund des hohen Wärmeausdehnungskoeffizienten von $\alpha_{\text{SL}}=9,4 \times 10^{-6}/\text{K}$ ist Soda-Lime-Glas sehr empfindlich gegenüber Temperaturschwankungen. Das kann zu Spannung im Glas führen, die im Extremfall einen Bruch des Glases verursachen. Dieses wurde in den ersten Experimenten deutlich. Das Anlegen eines Temperaturgradienten von 70 °C (Peltierelementtemperaturen: 10 °C und 80 °C) erfolgte noch ohne Probleme. Wollte man nun die Richtung des Temperaturgradienten umkehren, und erfolgte diese Kehrung ohne ausreichende Abkühlzeit für das Glas, so zerbrach der Chip. Um diese Probleme zu vermeiden, wurde alternativen Glassorten verwendet. Diese sollten einen niedrigeren Temperatureausdehnungskoeffizienten und somit eine geringere Temperaturempfindlichkeit besitzen. Die Borosilikatgläser D 263 T ($\alpha_{\text{D263T}}=7,2 \times 10^{-6}/\text{K}$) und AF 45 ($\alpha_{\text{AF45}}=4,5 \times 10^{-6}/\text{K}$) von der Firma Schott haben deutlich niedrigere Temperatureausdehnungskoeffizienten als Soda-Lime-Glas und daher eine höhere

thermische Stabilität. Allerdings erwies sich die Herstellung von μ FFE-Chips aus diesen Glassorten als sehr schwierig, beziehungsweise war mit den zur Verfügung stehenden Möglichkeiten nicht realisierbar. Dabei gab es zwei Hauptprobleme: das Nassätzen des Glases und das Hochtemperaturbonden der Gläser. Das AF 45 ließ sich trotz diverser Versuche nur mit extrem geringen Abtragsraten ätzen (ca. 0,04 $\mu\text{m}/\text{min}$), beim D 263 T wurden mit ca. 0,4 $\mu\text{m}/\text{min}$ deutlich höhere Ätzraten erreicht. Das abschließende Hochtemperaturbonden der Glasplatten bereitete allerdings viel mehr Probleme. Beide Gläser besitzen eine jeweils höhere Glasübergangstemperatur als das Soda-Lime-Glas. Dadurch mussten die Bondprogramme des Bondofens neu programmiert und angepasst werden. Allerdings waren die Bondergebnisse nicht reproduzierbar. Da die Borosilikatgläser in der Anschaffung auch deutlich teurer als Soda-Lime Glas sind, wurde von einer aufwendigen und teuren Prozessoptimierung abgesehen und beschlossen, für die weiteren FF-TGF-Experimente Soda-Lime-Glas zu verwenden und auf abrupte Temperaturwechsel zu verzichten.

4.3.2 Chipdesigns und Simulation

In dieser Arbeit wurden verschiedene Chipdesigns aus beiden Chipgenerationen für das FF-TGF verwendet. Abbildung 4.6 zeigt das Chipdesign der ersten Chipgeneration, mit dem die ersten FF-TGF Experimente durchgeführt wurden.

In diesem Design gab es nur ein großes Probenreservoir, in das die Analytmischung gefüllt wurde. Durch einen Unterdruck am Ausgang wurde die Probe dann in die Trennkammer gesaugt. Die Trennkammer besaß 64 Kammereingangskanäle und ebenso viele Kammerausgangskanäle. Die Seitenkanäle links wie rechts besaßen die gleiche Länge. Wie man aber in Abbildung 4.6 erkennt, waren nicht an den kompletten Trennkammerseiten Seitenkanäle vorhanden. Auf jeder Kammerseite gab es zwei Kanalbündel. Jedes Bündel bestand aus 109 einzelnen Seitenkanälen und verband ein Seitenreservoir mit der Trennkammer. Durch das Fehlen von Seitenkanälen im mittleren Kammerteil sollte der Einfluss der hydrodynamischen Fokussierung beim unterdruckbetriebenen Chip (siehe Kapitel 3) verringert werden.

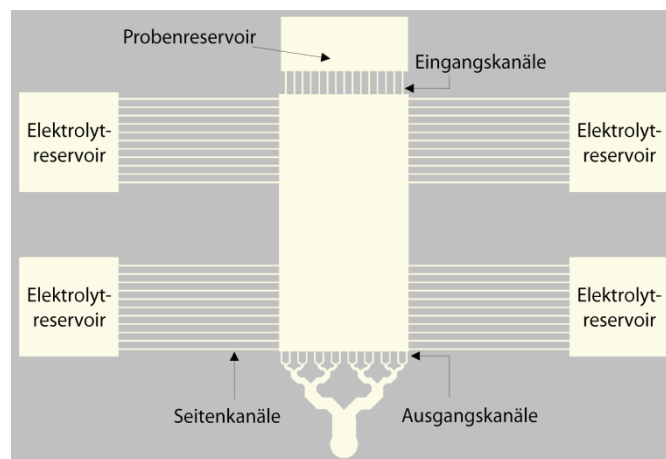


Abbildung 4.6: Erstes TGF Chipdesign. Jedes der vier Seitenreservoirs wurde durch 109 Seitenkanäle mit der Trennkammer verbunden.

Die Trennkammer war 4 mm breit und 12 mm lang, jeder Kammereingangs-, Kammerausgangs- und Seitenkanal war auf der Photomaske 10 μm breit. Dieses Design fand bei der Herstellung von sowohl PDMS-Glas- wie auch bei reinen Glaschips Verwendung. Die Länge der Seitenkanäle war nicht vorgegeben, sondern abhängig davon, an welcher Position die Seitenreservoirs in den Chip geschnitten beziehungsweise gebohrt wurden. Durch Veränderung der Position der Seitenreservoirs ließen sich sowohl der hydrodynamische als auch der elektrische Widerstand der Seitenkanäle verändern. Wie bereits in Kapitel 3.1.1 erwähnt, konnte die Strukturtiefe im Herstellungsprozess eingestellt werden. In der PDMS-Chipherstellung änderte man die Strukturhöhe der Vorformen. Bei der Glaschipherstellung wurde die Ätzdauer und damit die Ätztiefe variiert. Um nun herauszufinden, wie sich verschiedene Chipparameter beim Anlegen eines Temperaturgradienten verändern, wurde ein Chipmodell mit dem oben beschriebenen Design mit Hilfe des CFD Simulationsprogrammes „SolidWorks Flow Simulation“ (siehe Kapitel 2.3) simuliert (Abbildung 4.7). Die Simulation berücksichtigte nur hydrodynamische und thermische Effekte, eine Simulation des elektrischen Feldes war nicht möglich.

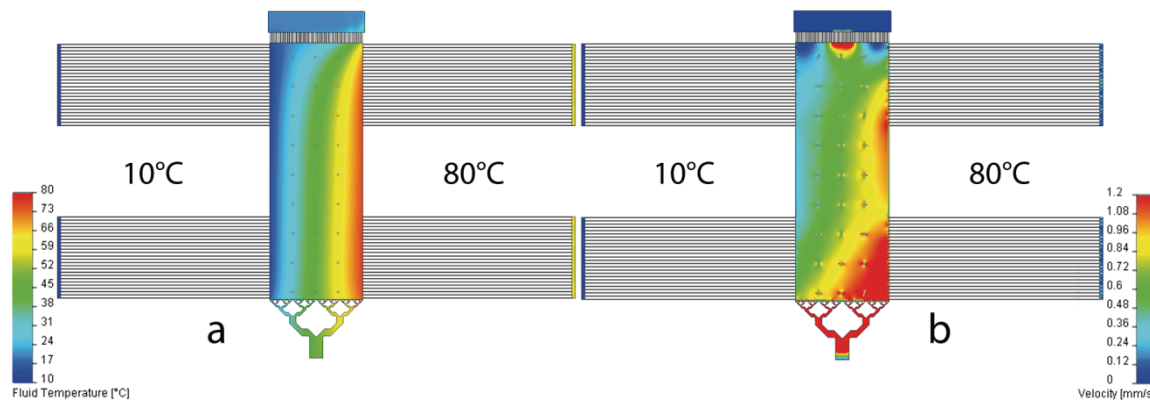


Abbildung 4.7: Simulationsergebnisse des ersten TGF-Designs: a) Temperaturverlauf in der Flüssigkeit nach Anlegen der Temperatur, b) Geschwindigkeitsprofil im Chip nach Anlegen der Temperatur. Die Flussrate betrug 5 μ l/min, die Seitenkanäle waren 1 cm lang.

Für die Simulation wurde eine Flussrate von 5 μ l/min am Chipausgang festgelegt. Das Eingangsreservoir und die beiden Seitenreservoirs wurden auf Umgebungsdruck festgelegt. Abbildung 4.7a zeigt, dass sich erst nach dem ersten Seitenkanalbündel ein stabiler Temperaturgradient in der Trennkammer ausbildet. Abbildung 4.7b zeigt die verschiedenen Flussgeschwindigkeiten der Flüssigkeit in der Trennkammer. Eigentlich erwartet man einen stabilen Geschwindigkeitsgradienten in der Kammer. Auf der heißen Seite sollte die Flüssigkeit aufgrund der wärmebedingten, geringeren Dichte eine höhere Geschwindigkeit als auf der kalten Kammerseite haben. Allerdings fließt jeweils auf Höhe der Seitenkanalbündel Flüssigkeit in die Trennkammer. Da die Geschwindigkeit der einfließenden Flüssigkeit auf der heißen Kammerseite höher ist als die Geschwindigkeit der einfließenden Flüssigkeit auf der kalten Kammerseite, verschiebt sich der Flussgeschwindigkeitsgradient. Insgesamt sorgt dies für einen sich über die Kammerlänge verändernden Flussgeschwindigkeitsgradienten. Zusätzlich fällt auf, dass die Probe nicht gleichmäßig aus dem Eingangsreservoir in die Trennkammer einfließt. Am Kammerrand ist die Flussgeschwindigkeit fast null, während die Flüssigkeit aus den mittleren Kammereingangskanälen mit einer sehr hohen Geschwindigkeit in die Trennkammer gelangt.

Das zweite verwendete Chipdesign (Abbildung 4.8) ähnelte in seiner Struktur sehr dem oben beschriebenen Chipdesign. Die Anzahl der Seitenkanäle pro Bündel, die Anzahl der Kammereingangs- und Ausgangskanäle und auch die Breite der Kanäle waren gleich geblieben. Allerdings gab es zwei wichtige Änderungen.

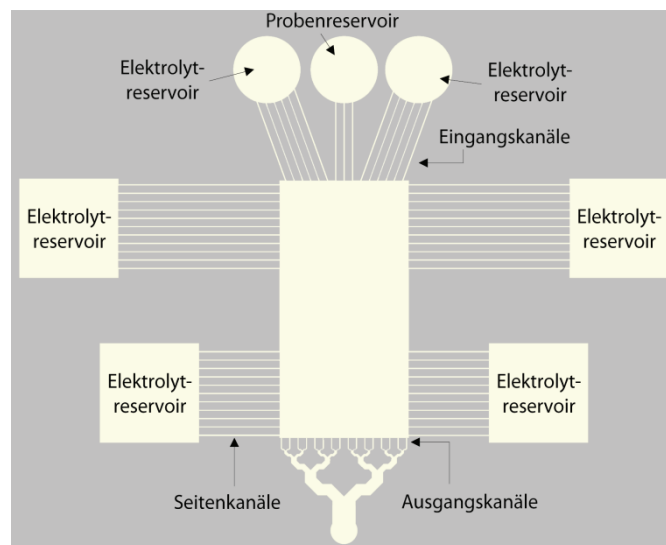


Abbildung 4.8: Zweites TGF Chipdesign. Im Vergleich zum ersten Design wurden die Eingänge und die Länge der Seitenkanäle verändert.

Zum einen wurde das Eingangsdesign verändert. Anstatt eines großen Probenreservoirs gab es nun drei getrennte Eingangsreservoirs. Diese Anordnung sollte es ermöglichen, einen dünneren Probenstrom in der Trennkammer zu erzeugen. Damit sollte eine bessere Detektierbarkeit einer Trennung beziehungsweise Fokussierung ermöglicht werden. Zum anderen wurde die Länge der Seitenkanäle verändert. Die Seitenkanäle waren nun nicht mehr alle gleich lang, sondern es gab zwei verschiedene Seitenkanallängen. Die Seitenkanalbündel am Eingang der Trennkammer waren doppelt so lang wie die am Ausgang der Kammer. Die längeren Seitenkanäle hatten einen höheren hydrodynamischen Widerstand als die kürzeren Kanäle. Damit sollte die aus den Seitenreservoirs einfließende Flüssigkeitsmenge am Kammereingang verringert werden. So sollte die Flüssigkeit aus den Eingangsreservoirs gleichmäßiger in die Kammer gelangen. Außerdem sollte der beim FF-TGF immer auftretende Geschwindigkeitsgradient in der Kammer möglichst lange stabil gehalten werden. Wie bereits im ersten TGF-Design erfolgte der Flüssigkeitstransport im Chip durch Anlegen eines Unterdrucks an den Ausgang. Ein Chipmodell mit dem in Abbildung 4.8 gezeigten Design wurde ebenfalls simuliert (Abbildung 4.9). Wiederum sind der Temperaturverlauf (Abbildung 4.9a) und das Geschwindigkeitsprofil (Abbildung 4.9b) im Chip dargestellt. Man erkennt, dass die Veränderung der Seitenkanalanordnung das ungleichmäßige Einfließen der Flüssigkeit am Kammereingang verringert hat.

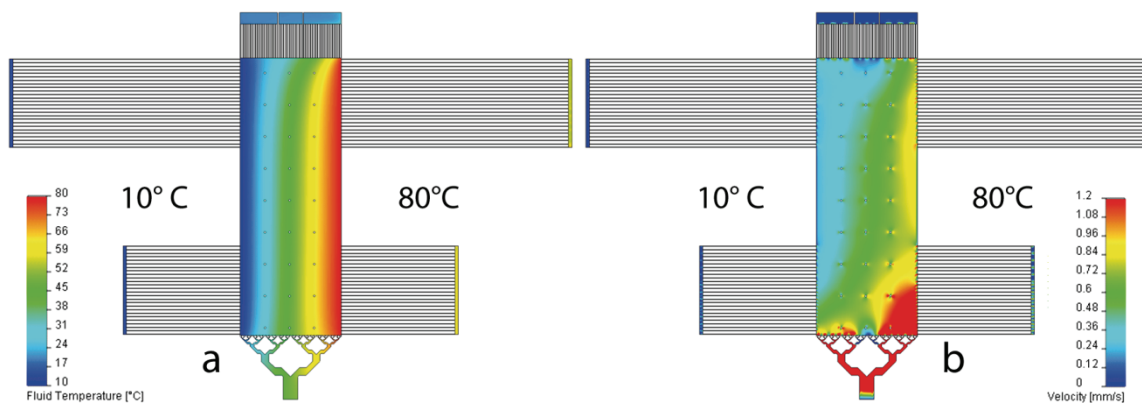


Abbildung 4.9: Simulationsergebnisse des zweiten TGF-Designs a) Flüssigkeitstemperatur b) Geschwindigkeitsprofil in der Trennkammer. Die Flussrate betrug 5 μ l/min, die Seitenkanäle waren 1 cm beziehungsweise 0,5 cm lang.

Auch der Geschwindigkeitsgradient ist stabiler als im ersten Chipdesign. Erst im Bereich des zweiten Seitenkanalbündels findet eine Zonenverschiebung statt. Beide oben beschriebenen Chipdesigns besitzen jedoch einen Nachteil. Durch die Spaltung der Seitenkanäle an jeder Kammerseite in zwei Bündel kann das elektrische Feld sich nicht mehr gleichmäßig über die Kammer ausbreiten. Im Bereich der Seitenkanalbündel ist das elektrische Feld stärker als zwischen den Seitenkanalbündeln. Diese Unregelmäßigkeiten im elektrischen Feld lassen eine elektrophoretische Fokussierung bzw. Trennung nur direkt am Kammereingang oder direkt vor dem Kammerausgang zu. Abbildung 4.10 zeigt eine FF-TGF Trennung von zwei Farbstoffen in einem Chip mit dem in Abbildung 4.6 gezeigten Chipdesign.

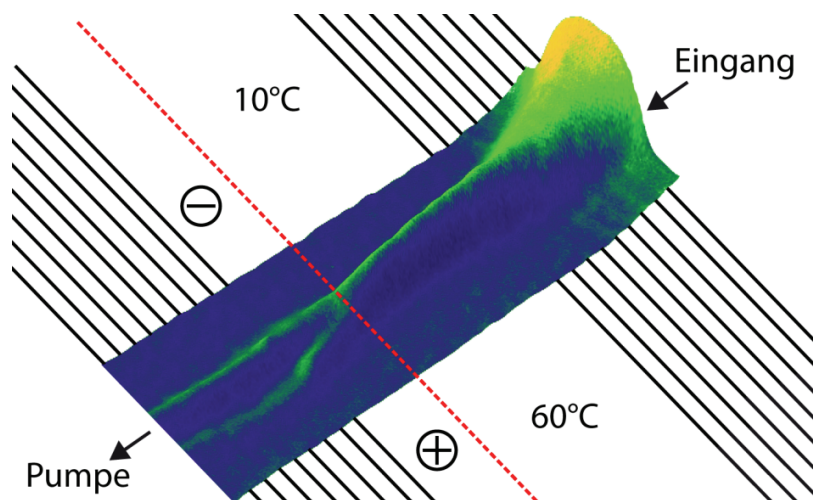


Abbildung 4.10: FF-TGF Trennung zweier Farbstoffe in einem Chip mit dem in Abbildung 4.6 gezeigten Chipdesign. Die Trennung fand nur zwischen den Seitenkanälen am Ausgang statt.

Durch die in Kapitel 3 beschriebene Fertigungsmethode wurden die Seitenkanäle $1,5 \mu\text{m}$, die Trennkammer und die Eingangs- und die Ausgangskanäle $17,5 \mu\text{m}$ tief geätzt. Die Simulationsergebnisse des Zwei-Tiefen-FF-TGF-Chips (Abbildung 4.12) zeigen deutliche Unterschiede im Vergleich zu den Simulationsergebnissen der beiden vorher beschriebenen FF-TGF-Chipdesigns.

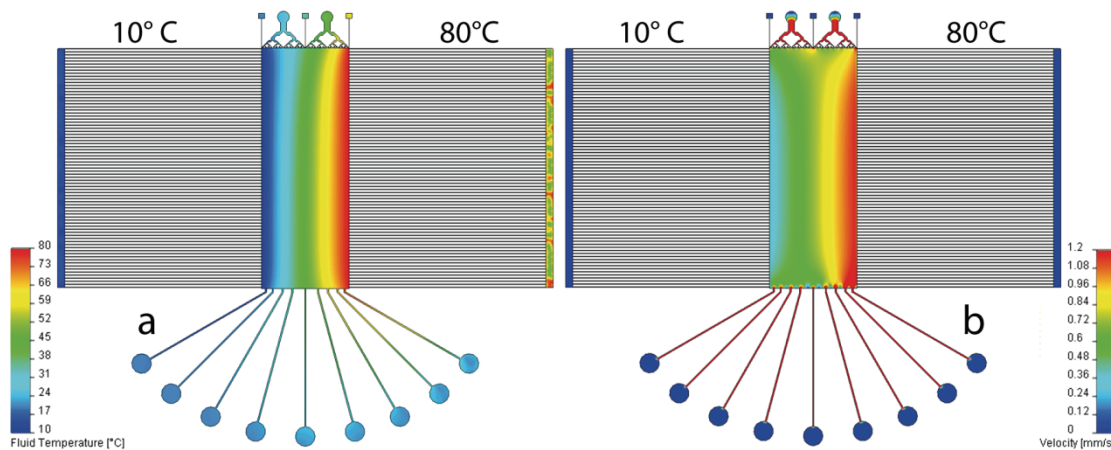


Abbildung 4.12: Simulationsergebnisse des Zwei-Tiefen-FF-TGF-Chips a) Temperatur der Flüssigkeit im Chip, b) Geschwindigkeit der Flüssigkeit im Chip bei einer Gesamtflussrate von $5 \mu\text{l}/\text{min}$. Die Länge der Seitenkanäle betrug 1 cm .

Bei einem Vergleich der simulierten Temperaturgradienten, die sich nach Anlegen der Temperatur in der Flüssigkeit ausbilden (Abbildung 4.7a und Abbildung 4.12a) ist zu erkennen, dass der Temperaturgradient im Zwei-Tiefen-Chip sich früher ausbildet und stabiler ist. Ein Vergleich der simulierten Geschwindigkeiten im Chip (Abbildung 4.7b und Abbildung 4.12b) zeigt, dass der unterdruckbetriebene Chip durch den Seiteneinfluss der Flüssigkeit in die Trennkammer einen unregelmäßigeren Geschwindigkeitsgradienten in der Kammer besitzt. Sowohl die Ausbildung des Temperaturgradienten in der Flüssigkeit, als auch die Stabilität des Geschwindigkeitsgradienten in der Trennkammer, beeinflussen die Fokussierung. Da der Zwei-Tiefen-Chip die stabileren Temperatur- und Flussgeschwindigkeitsprofile aufweist, ist dieses Chipdesign am besten für das FF-TGF geeignet. Einige der im Folgenden beschriebenen Experimente wurden allerdings nicht mit Zwei-Tiefen-Chips durchgeführt, da die Entwicklung der Herstellungstechnik noch nicht abgeschlossen war. Nach der Entwicklung der Zwei-Tiefen-Technik wurden aber nur noch reine Glaschips mit dem beschriebenen Zwei-Tiefen-Design für die Experimente verwendet.

Da die Chipherstellung aus temperaturunempfindlichen Gläsern nicht möglich war (siehe Kapitel 4.3.1), wurden nur Chips aus Soda-Lime-Glas benutzt. Damit keine Brüche oder Defekte beim Anlegen der Temperatur auftraten, wurde vor dem Wechsel der Temperaturgradientenrichtung darauf geachtet, dass der Glaschip behutsam auf Raumtemperatur abgekühlt wurde. So traten im weiteren Verlauf der Experimente keine temperaturbedingten Schäden mehr an den Soda-Lime-Glaschips auf.

4.4 Vorexperimente TGF

Bevor mit den eigentlichen Trenn- und Fokussierungsexperimenten begonnen wurde, sind einige Vorexperimente durchgeführt worden. Dazu gehörte neben der Bestimmung der temperaturabhängigen Fluoreszenzintensität von Farbstoffen auch eine Charakterisierung des Aufheiz- und Abkühlverhaltens des TGF-Aufbaus. Außerdem wurde der Einfluss eines Temperaturgradienten auf einen Probenstrom in einem μ FFE-Chip untersucht.

4.4.1 Aufheiz-/Abkühlverhalten des TGF Aufbau

Zum Heizen und Kühlen des Chips im TGF-Aufbau (siehe Kapitel 4.2) wurden zwei Peltierelemente verwendet. Da die Peltierelemente von verschiedenen Controllern angesteuert wurden, ergaben sich für beide Heizelemente verschiedene Aufheiz- beziehungsweise Abkühlzeiten. Als Controller wurden ein Newport Laser Diode Controller Model 6000 und ein Profile Laser Diode Controller LDC 400 verwendet. Abbildung 4.13a zeigt das Aufheizverhalten beider Peltierelemente von Raumtemperatur auf 80 °C. Die Temperatur der Peltierelemente wurde mit Hilfe des TH-03 Temperature Data Logger der Firma pico Technology aufgezeichnet. Das Newport-Gerät besaß die steiler Flanke während des Heizprozesses und erreichte somit 15 Sekunden vor dem Profile-Gerät die eingestellten 80 °C.

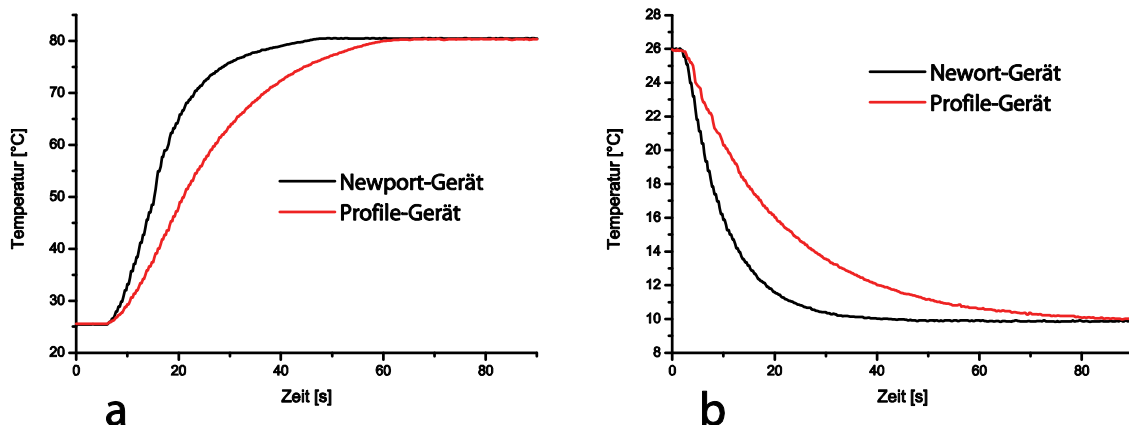


Abbildung 4.13: Aufheiz- und Abkühlverhalten der beiden Peltierelemente im TGF-Aufbau.

Auch das Abkühlverhalten beider Geräte wurde gemessen. Abbildung 4.13b zeigt den Temperaturverlauf der Peltierelemente, wenn eine Temperatur von 10 °C am Controller eingestellt wurde. Auch hier erreichte das Newport-Gerät eher die eingestellte Temperatur. Etwa 40 Sekunden später erreichte das vom Profile-Gerät gesteuerte Peltierelement die gewünschten 10 °C.

Messungen haben gezeigt, dass es keinen Unterschied macht, ob der Chipboden aus 200 µm (wie bei PDMS-Glas-Chip) oder 1,1 mm dicken Glas (wie bei Glas-Glas-Chip) besteht. Liegen beide Gläser auf einem Peltierelement und werden von diesem erwärmt, so erfolgt die Temperaturänderung auf der Glasoberseite bei beiden Gläsern gleich schnell.

Die Temperatur an der Oberfläche der beiden Glasplatten war bei dem hier benutzten Aufbau also nicht abhängig von der Dicke der Glasschicht, sondern wurde nur durch das Aufheiz- beziehungsweise Abkühlverhalten der Peltierelemente bestimmt. Damit erfolgte die Ausbildung des Temperaturgradienten bei einem PDMS-Deckglas-Chip genauso schnell wie bei einem reinen Glaschip. Durch die Kenntnis der verschiedenen Heiz- und Kühlverhalten der Peltierelemente ließ sich somit die Zeit abschätzen, die für eine vollständige Ausbildung des Temperaturgradienten in der Flüssigkeit benötigt wurde. Nach spätestens 80 Sekunden erreichten die Peltierelemente die eingestellten Temperaturen. Da mit Erreichen der Zieltemperatur diese auch gleichzeitig an der Flüssigkeit anlag, konnte davon ausgegangen werden, dass der Temperaturgradient dann in der Flüssigkeit bereits bestand.

4.4.2 Einfluss der Temperatur auf einen Probenstrom in der Kammer

Wie bereits in den vorher gezeigten Simulationsergebnissen (Abbildung 4.12) gesehen, veränderte sich nach Anlegen des Temperaturgradienten die Geschwindigkeit der Flüssigkeit in der Trennkammer. Es bildete sich ein Geschwindigkeitsgradient aus. Um nun den Einfluss dieser Geschwindigkeitsänderung auf einen Probenstrom in der Kammer zu untersuchen, wurde folgendes Experiment durchgeführt. Als Probe diente ein Gemisch aus den Proteinen Myoglobin und Trypsin-Inhibitor, welche mit einem Fluoreszenzlabel (Fluorescein-Isothiocyanate, FITC) markiert waren. An einen Zwei-Tiefen-Chip wurde eine Gesamtflussrate von $5 \mu\text{l}/\text{min}$ angelegt, wobei die Probenflussrate $1 \mu\text{l}/\text{min}$ betrug. Abbildung 4.14a zeigt den Probenstrom in der Trennkammer, ohne dass eine Temperatur angelegt wurde. Der Probenstrom ist leicht nach rechts verschoben, war aber stabil. Abbildung 4.14b zeigt den Probenstrom bei angelegter Temperatur. In diesem Fall ist das linke Peltierelement 80°C heiß, das rechte Peliterelement 10°C kühl. Man erkennt eine Wanderung des Probenstroms nach links, zur heißen Seite der Kammer. Überlagert man die beiden Kammern in einem Bild, wird die Wanderung noch deutlicher (Abbildung 4.14c).

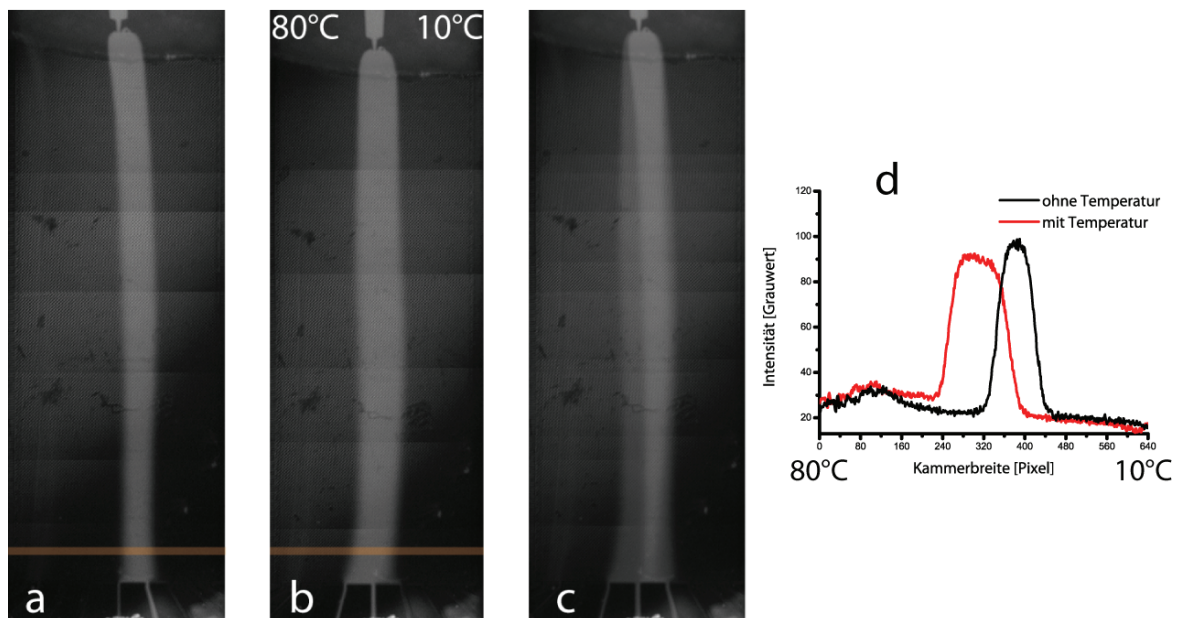


Abbildung 4.14: Probenwanderung bei Anlegen der Temperatur a) Probenstrom in Trennkammer ohne Temperatur; b) Probenstrom in Trennkammer mit Temperatur; c) Überlagerung von a) und b); d) Spektren, gemessen an den markierten Stellen in a) und b).

Dabei ist der hellere Probenstrom der Probenstrom aus Abbildung 4.14a. Abbildung 4.14d zeigt ein Linienspektrum, welches an der gekennzeichneten Stelle in Abbildung 4.14a und Abbildung 4.14b gemessen wurde. Die Wanderung zur heißen Seite ist deutlich erkennbar. Die Ablenkung beziehungsweise die Wanderung zur heißen Seite scheint aber nicht über die ganze Kammerlänge zu wirken. Würde die Wanderung an jeder Stelle in der Kammer vorherrschen, so würde man erwarten, dass die Probenmoleküle an jeder Stelle eine Ablenkung zur heißen Seite erfahren und somit auf einer schrägen Bahn in Richtung der heißen Seite durch die Kammer wandern. Dies ist aber nicht der Fall. Simulationen haben gezeigt, dass es bei angelegter Temperatur am Kammereingang eine starke Quergeschwindigkeit in Richtung der heißen Seite der Trennkammer gibt (Abbildung 4.15). Diese ist nur am Kammereingang zu finden und nimmt in Richtung Kammerausgang stark ab.

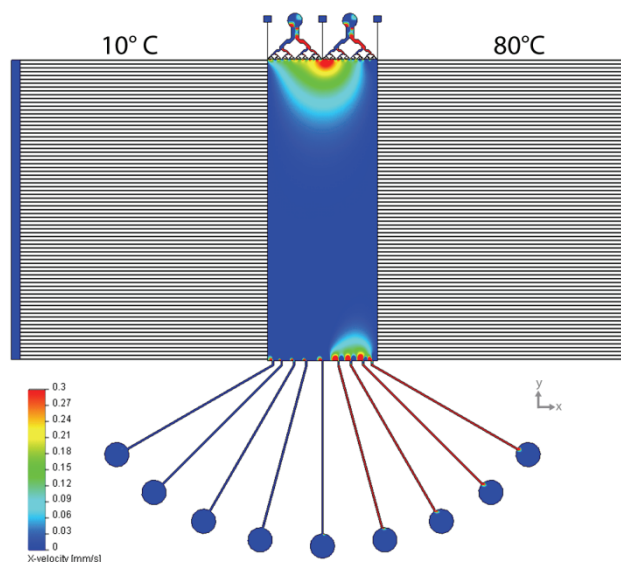


Abbildung 4.15: Simulation der Quergeschwindigkeit in x-Richtung der Trennkammer bei angelegter Temperatur. Der Plot zeigt nur Bewegungen an, die in positiver x-Richtung, also von links nach rechts, verlaufen. Am Kammereingang ist eine hohe Quergeschwindigkeit erkennbar.

Eine genaue Aussage über die dort wirkenden Mechanismen ist im Moment nicht möglich. Vermutlich erzeugt der Temperaturgradient einen Dichtegradienten. Auf der heißen Seite der Kammer sinkt die Dichte der Flüssigkeit und die Geschwindigkeit steigt. Dieses Dichteungleichgewicht resultiert in einem Molekülkonzentrationsungleichgewicht. Bei Eintritt in die Kammer erfolgt nun ein Konzentrationsausgleich in Richtung der heißen Kammerseite, welcher diese hohe Quergeschwindigkeit bewirkt.

Diese Vermutung ist allerdings schwer durch Experimente zu bestätigen, da Messungen innerhalb der Kammer kaum zu realisieren sind.

Festzuhalten bleibt aber, dass durch das Anlegen der Temperatur an den FF-TGF Chip eine Wanderung des Probenstroms erfolgte. Die Analyte bewegten sich in Richtung der heißen Seite der Trennkammer.

4.4.3 Temperaturabhängigkeit von Farbstoffen

Die Detektion während der FF-TGF Experimente fand ausschließlich durch Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen statt. Die Farbstoffe dienten entweder direkt als Probe oder sie wurden als Fluoreszenzmarker zur Markierung der Proteine verwendet. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass Fluoreszenzfarbstoffe eine von der Temperatur abhängige Fluoreszenzintensität besitzen [123]. Dies ist von Bedeutung, da sich der Farbstoff beim FF-TGF in einem Temperaturgradienten befindet und er dadurch bei verschiedenen Temperaturen verschiedene Intensitäten besitzen kann.

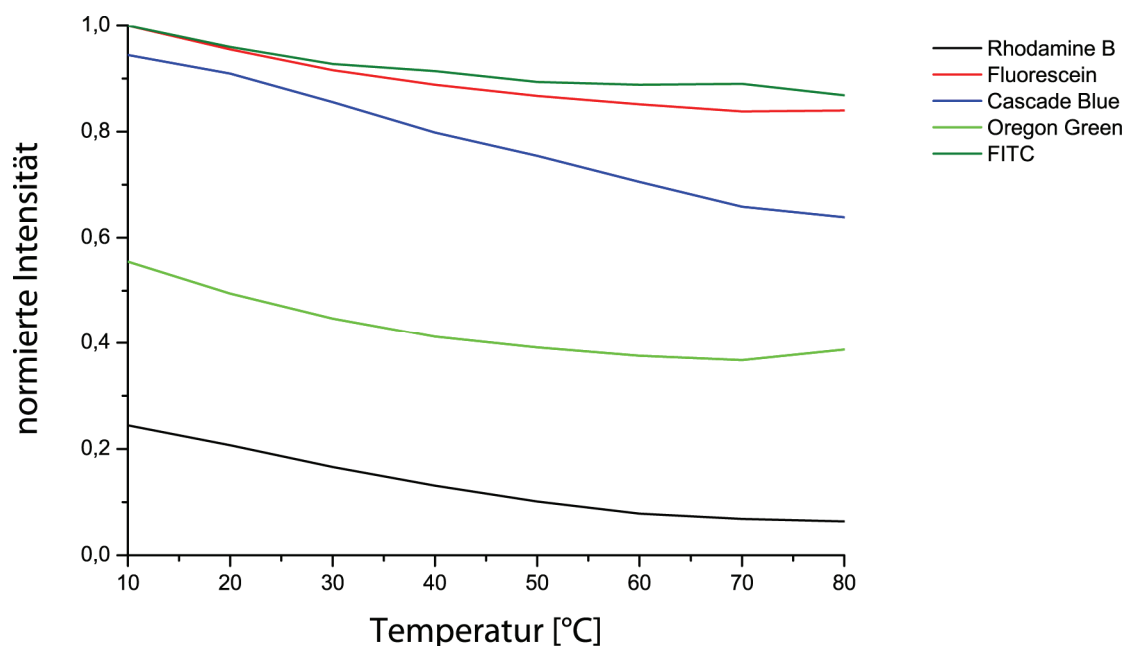


Abbildung 4.16: Fluoreszenzintensität verschiedener Farbstoffe in Abhängigkeit von der Temperatur. Alle Farbstoffe besaßen eine Konzentration von $10 \mu\text{M}$ und waren in 100 mM Tris-Phenol-Puffer gelöst worden.

Dieser Intensitätsverlust kann die Detektion einer Fokussierung beeinflussen. Zur Korrektur der erhaltenen Detektionsergebnisse war es notwendig, die Intensitätsänderung der Fluoreszenz, in Abhängigkeit der Temperatur, zu bestimmen. Vor der Messung wurden die Farbstoffe im Tris-Phenol-Puffer verdünnt, der auch in den FF-TGF Experimenten verwendet wurde. Die Proben wurden dann in ein Fluoreszenzspektrometer vom Typ Spex FluoroMax gegeben. Der Probenhalter im Fluoreszenzspektrometer war an einen externen Thermostaten angeschlossen, so dass die Proben direkt in dem Spektrometer geheizt werden konnten. Abbildung 4.16 zeigt die temperaturabhängige Fluoreszenzintensität aller in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und Fluoreszenzlabel. Man erkennt, dass alle untersuchten Farbstoffe eine Temperaturabhängigkeit besitzen. Bei allen Farbstoffen sank die Fluoreszenzintensität mit steigender Temperatur. Den stärksten Intensitätsabfall gab es bei dem Farbstoff Rhodamin B. Er verlor fast 60% seiner Intensität im Vergleich zu seiner Fluoreszenzintensität bei Raumtemperatur (20 °C).

Mit Hilfe dieser Messung war es möglich, die folgenden FF-TGF-Messungen und Experimente im Bezug auf die temperaturabhängigen Intensitätswerte der Farbstoffe zu korrigieren.

4.5 Experimentelle Bestimmung des Temperaturgradienten mittels Thermometrie

Wie in diesem Kapitel bereits mehrfach erwähnt, stellt der Temperaturgradient in der Flüssigkeit im Chip einen der wichtigsten Faktoren beim Temperature Gradient Focusing dar. Simulationen (Abbildung 4.12a) haben gezeigt, dass sich beim Anlegen der Temperatur ein gleichmäßiger Temperaturgradient in der Flüssigkeit ausbildet. Um dies nun im Experiment zu überprüfen, wurde die Temperatur der Flüssigkeit in der Trennkammer thermometrisch gemessen [124, 125]. Dazu wurde sich die oben beschriebene temperaturabhängige Fluoreszenzintensität von Rhodamin B zu Nutze gemacht. Bevor aber die eigentliche Messung am Chip erfolgte, wurde zuerst noch die thermometrische Messmethode kalibriert, um jedem Intensitätswert des Farbstoffes einen Temperaturwert zuordnen zu können.

4.5.1 Kalibrierung der thermometrischen Messung

Zur Messung der Temperatur in der Trennkammer eines FF-TGF Chips wurde der Farbstoff Rhodamin B [126] verwendet. Wie bereits in Abschnitt 4.4.3 gezeigt, besaß die Fluoreszenzintensität von Rhodamin B eine starke Temperaturabhängigkeit. Diese Temperaturabhängigkeit konnte zur Messung der Temperatur benutzt werden. Brachte man eine Rhodamin-B-Lösung in die Trennkammer eines FF-TGF-Chips und legte einen Temperaturgradienten an die Kammer an, so bildete sich ein Fluoreszenzintensitätsgradient in der Flüssigkeit aus. Die Farbstoffmoleküle auf der heißen Seite der Kammer besaßen die geringste Fluoreszenzintensität, die Moleküle auf der kalten Seiten die höchste Intensität. Um nun aber einem Intensitätswert eine Temperatur zuordnen zu können, musste das System vorher kalibriert werden. Dazu wurde der Farbstoff auf verschiedene Temperaturen erhitzt und die zu dem jeweiligen Temperaturwert gehörende Intensität gemessen. Aus den so gewonnen Daten ließ sich dann eine Gleichung erstellen, mit der sich für jeden Intensitätswert des Farbstoffes ein Temperaturwert errechnen ließ. Wichtig dabei war aber, dass die Kalibrierung in dem Aufbau durchgeführt wurde, in dem später das eigentliche Experiment stattfand. Die Sensitivität der als Detektor verwendeten CCD-Kamera, die Intensität des Fluoreszenzanregungslichtes, die optische Dämpfung und diverse andere Parameter können von Aufbau zu Aufbau variieren. Würde die Kalibrierung in

einem anderen Aufbau stattfinden, könnten die später errechneten Temperaturwerte von den tatsächlichen Werten stark abweichen. Um nun die Temperaturabhängigkeit des Rhodamin B auf dem für das spätere Experiment verwendeten Aufbau zu messen, wurde eine spezielle, selbsterstellte Konstruktion verwendet (Abbildung 4.17). Kernstück war ein Plastikgefäß, welches am Boden mit einer Glasscheibe verklebt worden war. So entstand im Inneren ein flüssigkeitsdichtes Volumen.

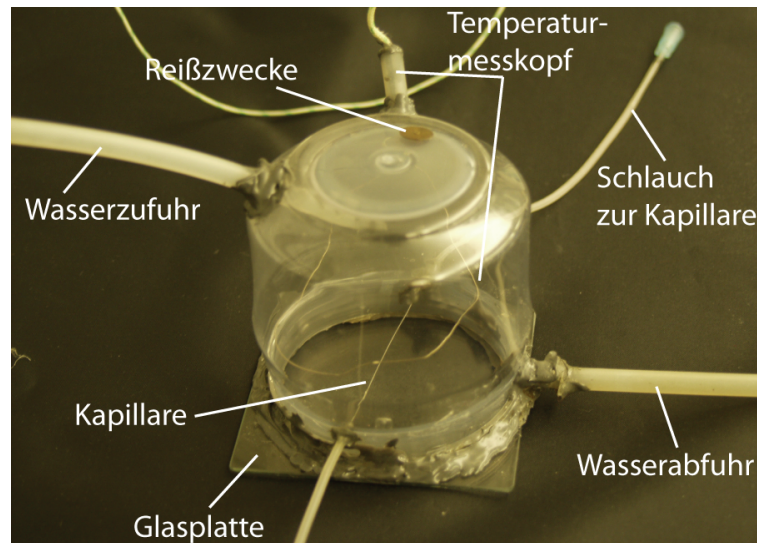


Abbildung 4.17: Konstruktion, welche zur Kalibrierung der thermometrischen Messung verwendet wurde.

Durch das Plastik wurde eine Kapillare geschoben, mit dem Plastikgehäuse verklebt und von außen mit Silikonschläuchen kontaktiert. In diese Kapillare wurde später während der Messung das Rhodamin B gepumpt. Durch den Glasboden der Konstruktion war es auf dem inversen Mikroskop möglich, die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes in der Kapillare zu detektieren. Durch zwei Schläuche konnte Wasser in das Innere der Konstruktion geleitet werden. Dieses Wasser wurde durch einen externen Thermostaten geheizt und kontinuierlich durch die Konstruktion und damit auch an der Kapillare vorbei geleitet. Zur Messung der aktuellen Wassertemperatur im Flüssigkeitsgefäß wurde noch der Temperaturfühler eines Thermometers in die Konstruktion integriert. Eine Reißzwecke auf der Oberseite des Plastikgefäßes diente als manuelles Überdruckventil. Durch den kontinuierlichen Wasserkreislauf wurde Luft in die Messkammer transportiert. Die Luft sammelte sich im Gefäß und dehnte sich bei steigender Temperatur aus.

Dieser Druck führte vor der Verwendung der Ventil-Reißzwecke zu Beschädigungen an den Klebestellen, was Undichtigkeiten zur Folge hatte. Durch das Entfernen der Reißzwecke konnte die Kammer später regelmäßig entlüftet und der Druck in der Kammer reduziert werden.

Um den Intensitätsverlauf des Rhodamin B in Abhängigkeit der Temperatur zu messen, wurde zuerst das Wasser im System auf 10 °C gekühlt. Anschließend wurde der Farbstoff in die Kapillare gepumpt. Damit die Farbstofflösung in der Kapillare die Temperatur des umgebenden Wassers annehmen konnte, wurde die eigentliche Intensitätsmessung erst zwei Minuten nachdem der Farbstoff in die Kapillare gepumpt beziehungsweise die nächste Temperaturschwelle erreicht worden war, gestartet. Die Intensität wurde bei den Temperaturen 10 °C, 20 °C, 22 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C und 80 °C gemessen. Die Messung bei 22 °C diente als Referenzmessung für die Intensität bei Raumtemperatur. Die Messergebnisse zeigten, dass es keinen Unterschied macht, ob man an jeder Temperaturschwelle frische Farbstofflösung in die Kapillare pumpt oder beim Start der Messung einmal die Kapillare mit Farbstofflösung füllt und das ganze Experiment ohne Austausch der Lösung durchführt. Damit konnte eine Intensitätsabnahme durch Photobleaching [127, 128] während des Experiments ausgeschlossen werden. Zu Beginn der Experimente wurde neben Rhodamin B auch Rhodamin 110 als interner Standard mit in die Lösung gegeben. Rhodamin 110 besitzt keine temperaturabhängige Fluoreszenzintensität. Durch Normierung der Rhodamin B-Intensität auf die Intensität des Rhodamin 110 der jeweiligen Temperatur sollten nicht-temperaturabhängige Intensitätsänderungen eliminiert werden. Weitere Kalibrierungsmessungen und Messungen am Chip haben aber gezeigt, dass es keinen Unterschied zwischen den Ergebnissen mit und ohne Rhodamin 110 gab. Daher wurde bei den folgenden Messungen nur Rhodamin B als Temperaturindikator benutzt. Abbildung 4.18 zeigt die Ergebnisse der Kalibrierungsmessung für Rhodamin B im beschriebenen Aufbau. Die schwarze Kurve stellt die gemessenen Intensitätswerte pro Temperatur, gemittelt über 30 Einzelbilder, dar. Alle Intensitätswerte wurden auf die Intensität bei 22 °C normiert. Die rote Kurve ist eine polynomische Trendlinie dritten Grades der Messwerte. Sie bildet vor allen Dingen im Bereich der höheren Temperaturen die originalen Messwerte sehr gut nach.

Die Gleichung der Trendlinie lautet:

$$y = -(3,009 \cdot 10^{-6})x^3 - (4,137 \cdot 10^{-4})x^2 + 0,006x + 1,030 \quad 4.8$$

Die durchschnittliche Abweichung der nach Gleichung 4.8 errechneten Temperaturwerte von den gemessenen Temperaturwerten beträgt 0,85 °C, wobei die größte Abweichung von den eingestellten Temperaturwerten bei 10 °C und 20 °C liegt.

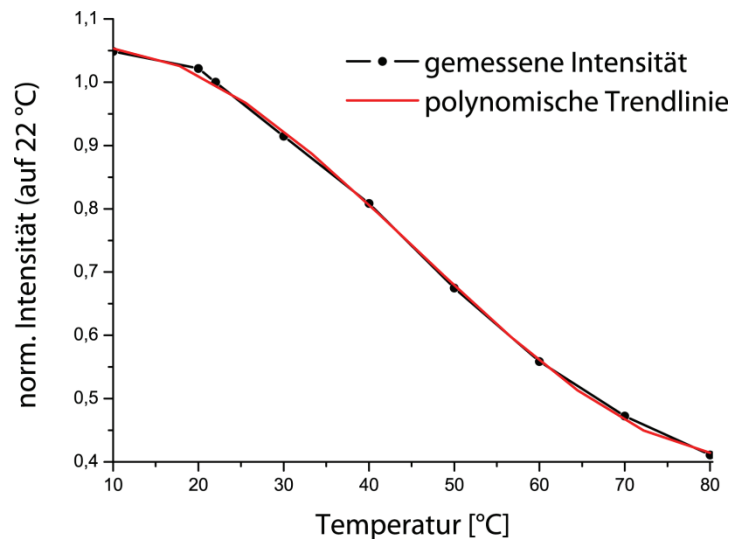


Abbildung 4.18: Kalibrierung der Fluoreszenzintensität des Rhodamin B in Abhängigkeit von der Temperatur.

Grund dafür war die Bildung von Kondenswasser am Kalibrationsaufbau, was die optische Fokussierung und Aufnahme der Messkapillare beeinträchtigte. Mit Gleichung 4.8 ließ sich nun die Temperatur aus der gemessenen Fluoreszenzintensität berechnen. Bei dem hier beschriebenen thermometrischen Verfahren mit Hilfe von Rhodamin B bildeten 138 Grauwerte eine Temperaturspanne von 70 °C ab, so dass eine theoretische Auflösung von 0,5 °C möglich war.

4.5.2 Thermometrische Messung des Temperaturgradienten in der Kammer

Nachdem die Kalibration der Temperaturabhängigkeit des Farbstoffes erfolgt war, konnte die Messung des Temperaturgradienten in der Flüssigkeit in der Trennkammer gestartet werden. Dazu wurde ein spezielles Chipdesign ohne Seitenkanäle verwendet. Damit hängt die Ausbildung des Temperaturgradienten nur von der Wärmeleitung im Chipmaterial und nicht noch zusätzlich durch die Seitenkanäle einströmende heiße oder kalte Flüssigkeit ab. Während des Experiments wurde kein hydrodynamischer Fluss an den Chip angelegt. Dadurch fand während der Messung kein Austausch der Farbstofflösung statt. Als Testlösung wurde eine 100 μ M Rhodamin B-Lösung in den Chip gepumpt. Anschließend wurde bei 22 °C Raumtemperatur ein Referenzvideo der Kammer aufgenommen. Danach wurde das rechte Peltierelement auf 10 °C gekühlt und das linke Element auf 80 °C geheizt. Fünf Minuten nach Anlegen der Temperatur wurde das eigentliche Messvideo von der Kammer aufgenommen.

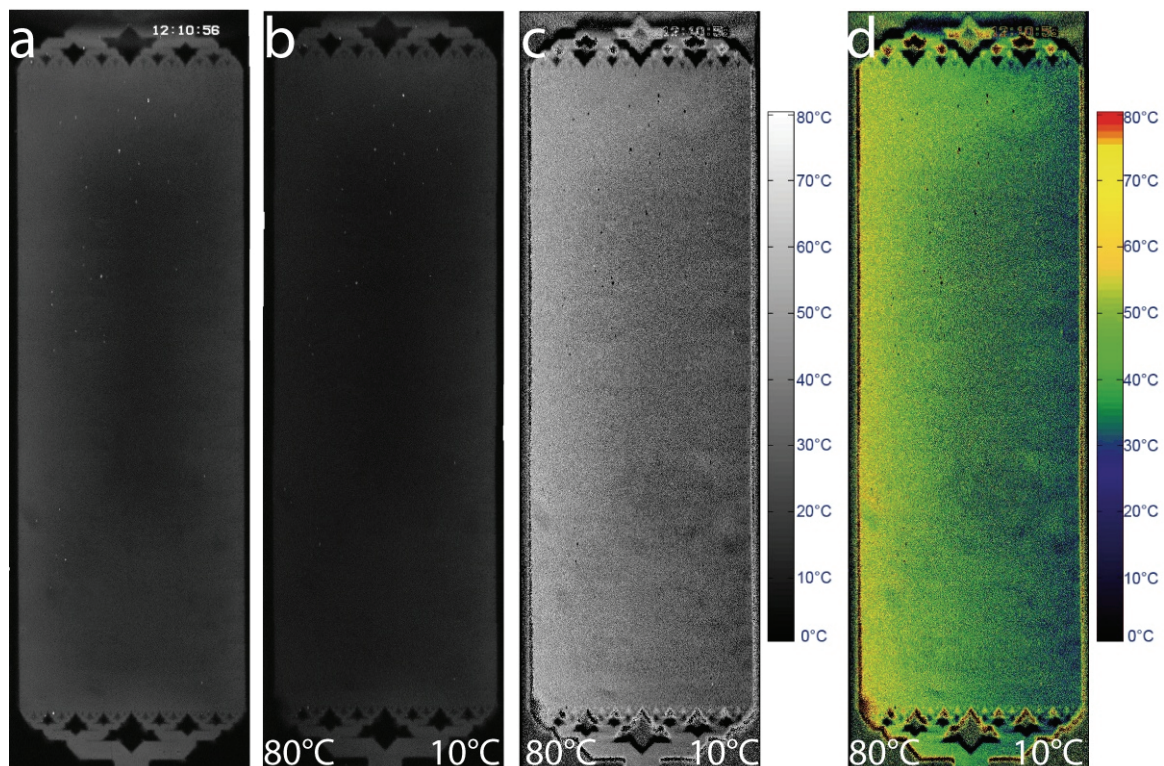


Abbildung 4.19: Kammerbilder der einzelnen Schritte zur experimentellen Bestimmung des Temperaturgradienten in der Flüssigkeit a) Referenzkammer bei 22 °C, b) Kammer bei angelegtem Temperaturgradient, c) Kammer nach der Division von a) und b) und der anschließenden Berechnung der Temperaturwerte aus den Grauwerten, d) Falschfarbenaufnahme von c).

Aus jedem der beiden Videos wurde nun jeweils ein zusammengesetztes Bild der Trennkammer erstellt, so dass ein Referenzkammerbild (Abbildung 4.19a) und ein Messkammerbild (Abbildung 4.19b) entstanden. Mit Hilfe eines MATLAB-Programms wurde nun das Messkammerbild durch das Referenzkammerbild dividiert. Nach der Division berechnete das MATLAB-Programm mit Hilfe von Gleichung 4.8 aus den Grauwerten des Divisionsergebnisses die Temperatur und erzeugte außerdem eine Temperaturskala. Der Quellcode des MATLAB-Programms ist in Anhang A zu finden. Abbildung 4.19c zeigt das eigentliche Ergebnis der MATLAB Division, Abbildung 4.19d zeigt dasselbe Bild nach Einfärbung mit Falschfarben. In beiden Bildern ist der Temperaturgradient gut zu erkennen. Außerdem ist zu erkennen, dass sich der Gradient in der Flüssigkeit gleichmäßig zwischen der heißen und der kalten Seite verteilt. Das entspricht den Ergebnissen der durchgeführten Simulationen.

4.6 Stabilität des Temperaturgradienten in Abhängigkeit von der Flussrate

Wie in Abschnitt 4.5 beschrieben, fand das Experiment zur Messung des Temperaturgradienten in der Trennkammer ohne angelegten hydrodynamischen Fluss statt. Da ein hydrodynamischer Fluss aber die Verweildauer der Flüssigkeit in der Trennkammer und somit auch die Zeit der Flüssigkeit im Temperaturgradienten beeinflusst, wurde in einem weiteren Experiment die Stabilität des Temperaturgradienten in Abhängigkeit von der angelegten hydrodynamischen Flussrate untersucht. Dazu wurde das gleiche Chipdesign wie in Abschnitt 4.5 verwendet. Der Chip besaß somit nur jeweils einen Ein- und Ausgang und keine Seitenkanäle. Als Indikator wurde ebenfalls eine 100 μ M Rhodamin B-Lösung verwendet. Im Vergleich zum Experiment in Abschnitt 4.5, wo ganze Kammerbilder verwendet wurden, wurde hier nur an einer Linie über die gesamte Kammerbreite die Temperatur gemessen. Vor Beginn der eigentlichen Messung wurde ein Referenzbild der Messposition bei 22 °C aufgenommen. Anschließend wurden die Peltierelemente in Betrieb genommen, das linke Element wurde auf 80 °C geheizt, das rechte wurde auf 10 °C gekühlt. Es wurden nun verschiedene Flussraten eingestellt, und nach jeweils zwei Minuten Anpassungszeit wurde ein Bild der Messposition aufgenommen. Dieses wurde dann durch das Referenzbild dividiert und die Grauwerte mit Hilfe von Gleichung 4.8 in Temperaturwerte umgerechnet. Zur Division und Umrechnung der Grauwerte wurde wieder ein MATLAB-Programm eingesetzt. Bei folgenden Flussraten wurde jeweils der Temperaturgradient an der Messposition gemessen: 0 μ l/min, 5 μ l/min, 10 μ l/min, 25 μ l/min, 50 μ l/min, 75 μ l/min, 100 μ l/min, 150 μ l/min, 200 μ l/min, 250 μ l/min, 300 μ l/min und 350 μ l/min. Abbildung 4.20 zeigt die gemessenen Temperaturgradienten in Abhängigkeit von den angelegten Flussraten. Bis zu einer Flussrate von 100 μ l/min bleibt der Temperaturgradient stabil. Wird die Flussrate weiter erhöht, verändert das den Temperaturgradienten in der Flüssigkeit. Durch die höhere Flussrate und die demzufolge niedrigere Durchlaufzeit der Flüssigkeit durch die Trennkammer verringert sich die Zeit, die der Flüssigkeit zur Temperaturanpassung bleibt. Die Flüssigkeit auf der heißen Kammerseite erreicht nicht mehr die Temperaturen wie bei niedrigeren Flussraten. Dies ist in Abbildung 4.20 am Abfall des Maximalwertes der Temperatur zu erkennen. Auch die Temperatur auf der kalten Seite sinkt mit steigender Flussrate.

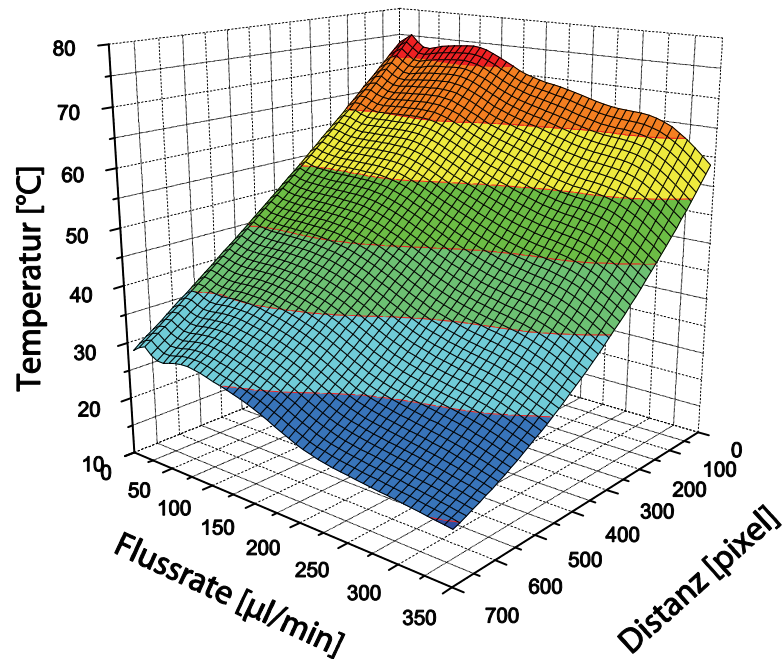


Abbildung 4.20: Stabilität des Temperaturgradienten in Abhängigkeit von der hydrodynamischen Flussrate.

Während die Temperaturdifferenz zwischen Starttemperatur der Flüssigkeit (Raumtemperatur: 22 °C) und Peltierelementtemperatur auf der heißen Kammerseite 60 °C beträgt, ist der Temperaturunterschied auf der kalten Kammerseite nur 10 °C. Nach Abbildung 4.20 wird die Flüssigkeit auf der kalten Seite bei geringen Flussraten circa 30 °C warm. Verringert sich nun die Maximaltemperatur der Flüssigkeit in der Kammer, so ist das kalte Peltierelement in der Lage, die Flüssigkeit weiter als 30 °C herunter zu kühlen, so dass auch die Minimaltemperatur in Abbildung 4.20 sinkt. Bei einem Kammerdurchlauf muss sich die Temperatur der Flüssigkeit auf der kalten Seite lediglich um 10 °C ändern, so dass trotz der höheren Flussraten dafür immer noch ausreichend Zeit zur Verfügung steht.

Das Experiment zeigte, dass der Temperaturgradient bis zu einer hydrodynamischen Flussrate von 100 µl/min stabil ist. Da die Flussrate bei Trenn- und Fokussierungsexperimenten zwischen 3 µl/min und 15 µl/min lag, konnte in diesen Experimenten von einem stabilen Temperaturgradienten in der Trennkammer ausgegangen werden.

4.7 Trennung und Fokussierung von Farbstoffen

Die Trennung und Fokussierung von Farbstoffen mittels FF-TGF war eines der ersten FF-TGF-Trennexperimente im Rahmen dieser Arbeit. Zum damaligen Zeitpunkt stand die Zwei-Tiefen-Technik zur Chipherstellung noch nicht zur Verfügung. Daher wurde für das im Folgenden beschriebene Experiment ein PDMS-Glas-Chip benutzt. Als Chipdesign wurde das in Abbildung 4.8 gezeigte Design mit unterschiedlich langen Seitenkanälen verwendet. Als Proben wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescein und Oregon Green 488 benutzt. Die Konzentration der Farbstoffe betrug jeweils $200 \mu\text{M}$. Als Puffer wurde ein Tris-Phenol-Puffer mit einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ verwendet. Wie bereits erwähnt, besaß der Puffer eine temperaturabhängige elektrische Leitfähigkeit [129]. Die Flussrate am Ausgang betrug $10 \mu\text{l}/\text{min}$. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit Licht in einem Wellenlängenbereich von 420 nm bis 490 nm angeregt. Die maximale Emission erfolgte bei 514 nm (Fluorescein) beziehungsweise 525 nm (Oregon Green 488).

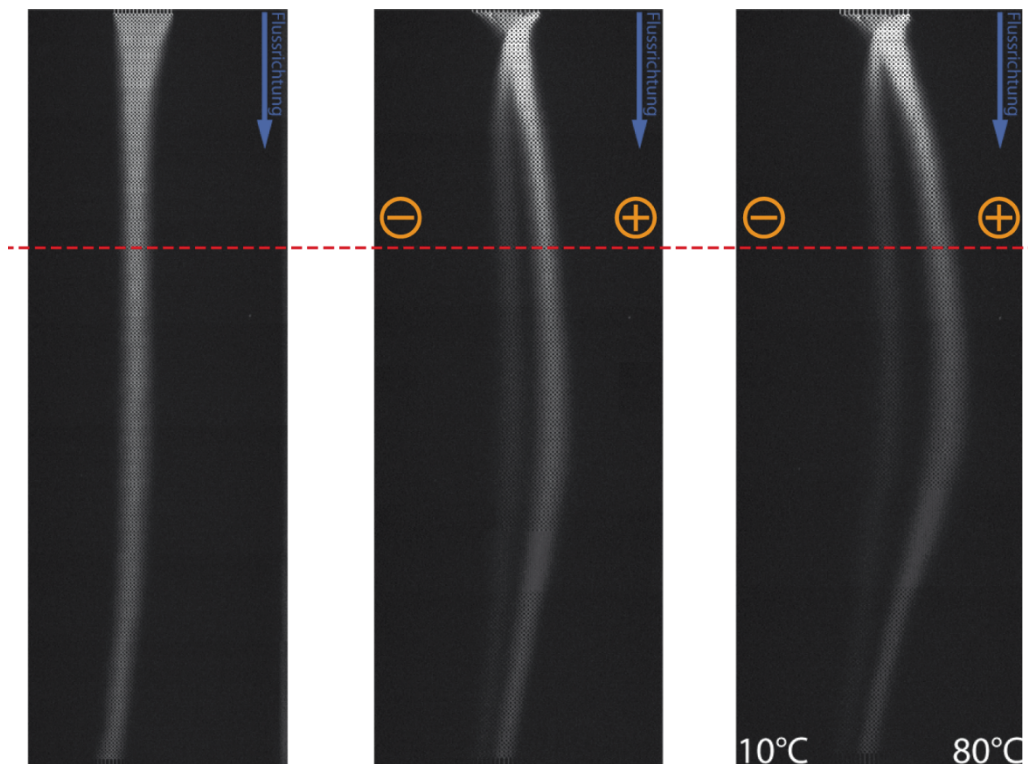


Abbildung 4.21: Trennung von zwei Farbstoffen mittels FF-TGF in einem PDMS-Glas-Chip
a) Probenstrom in der Trennkammer ohne Spannung und ohne Temperaturgradient, b) Trennung der Farbstoffe nach Anlegen der Spannung, c) Trennung der Farbstoffe nach Anlegen von Spannung und Temperaturgradient.

Das Farbstoffgemisch wurde in das mittlere Eingangsreservoir gefüllt. Durch die beiden anderen Eingangsreservoirs gelangte Pufferlösung in die Trennkammer. Die Seitenreservoirs wurden ebenfalls mit Pufferlösung befüllt. Die Elektroden wurden nur in die Seitenreservoirs mit den längeren Seitenkanälen gelegt. Dadurch war das elektrische Feld im Kammereingangsbereich am stärksten (oberhalb der gestrichelten Linie in Abbildung 4.21). Für das Experiment wurde eine Spannung von 1 kV an die Elektroden angelegt. In Abbildung 4.21 sieht man die Ergebnisse des Experimentes. Abbildung 4.21a zeigt den Probenstrom in der Trennkammer ohne dass eine Spannung oder der Temperaturgradient angelegt sind. In Abbildung 4.21b erkennt man eine Trennung der beiden Farbstoffe nur nach Anlegen einer Spannung von 1 kV. Ein Temperaturgradient ist in Abbildung 4.21b noch nicht angelegt. Die Trennung mit der Kombination von Temperaturgradient und Spannung ist in Abbildung 4.21c zu sehen. Im Vergleich zu Abbildung 4.21b erkennt man, dass die beiden Probenströme im oberen Bereich der Kammer einen größeren Abstand zueinander haben. Dies resultiert in einer besser zu detektierenden Trennung und erleichtert die Trennung auf verschiedene Ausgangskanäle. Eine Intensitätszunahme kann in Abbildung 4.21 nicht beobachtet werden. Der Grund dafür ist die schon beschriebene Abnahme der Fluoreszenzintensität der Farbstoffe mit steigender Temperatur. Da zwei verschiedene Farbstoffe verwendet wurden, war eine Korrektur sehr komplex, da für jeden Farbstoff eine eigene Korrekturfunktion auf die ganze Kammer angewendet werden musste, welche aber auch die Intensität des anderen Farbstoffs beeinflusste.

4.8 Fokussierung von Proteinen

Um nun die Verwendbarkeit der FF-TGF Technik bei der Trennung und Fokussierung von biologischen Proben zu demonstrieren, wurden einzelne Proteine fokussiert. Dazu wurden die Proteine Myoglobin, Cytochrom C, Peroxidase und Trypsin-Inhibitor mit dem Farbstoff FITC markiert, um eine Fluoreszenzdetektion zu ermöglichen. Ein reiner Glaschip mit dem Zwei-Tiefen-Design (siehe Abbildung 4.11) wurde für das Experiment verwendet. Bei allen in diesem Abschnitt gezeigten Proteinexperimenten wurde an die äußersten 1-Kanal-Puffereingänge eine Flussrate von 0,6 μ l/min angelegt. An die inneren Puffereingänge wurde eine höhere Flussrate angelegt. Der linke, innere Eingang wurde mit einer Flussrate von 1,5 μ l/min, der rechte innere Eingang mit einer Flussrate von 1 μ l/min betrieben. Diese Ungleichheit der Flussraten an den inneren Eingängen sorgte für eine leichte Verschiebung des Probenstroms nach rechts. Dadurch konnte die Wanderungstrecke der Probe nach links vergrößert werden, so dass höhere Spannungen angelegt werden konnten, bevor die Probe die Kammerseiten erreichte. Der Probenstrom besaß bei allen Protein-Fokussierungen eine Flussrate von 1 μ l/min, so dass der Chip mit einer Gesamtflussrate von 4,7 μ l/min während der Experimente betrieben wurde. Die Konzentration der jeweiligen Proteinlösungen betrug immer 10 μ M. Tris-Phenol mit einer Konzentration von 500 μ M diente als Puffer für die Experimente. Das linke Peltierelement wurde bei allen Experimenten auf 80 °C geheizt, während das rechte Peltierelement auf 10 °C gekühlt wurde. Ebenso lag bei allen Experimenten die Anode auf der linken, heißen Seite der Trennkammer.

Myoglobin

Abbildung 4.22a zeigt die verschiedenen Spektren, die im Rahmen der Fokussierungsexperimente gemessen wurden. Alle Intensitätsspektren wurden an derselben Stelle in der Kammer gemessen. Zur Kennzeichnung der Messposition ist in Abbildung 4.22b noch einmal die Kammer während des Myoglobin-Experiments gezeigt. Die Messposition befand sich am unteren Ende der Trennkammer (orangene Linie). Das blaue Spektrum in Abbildung 4.22 wurde gemessen, wenn keine Spannung und kein Temperaturgradient an den FF-TGF Chip gelegt wurden, der Probenstrom also nur durch die Trennkammer floss.

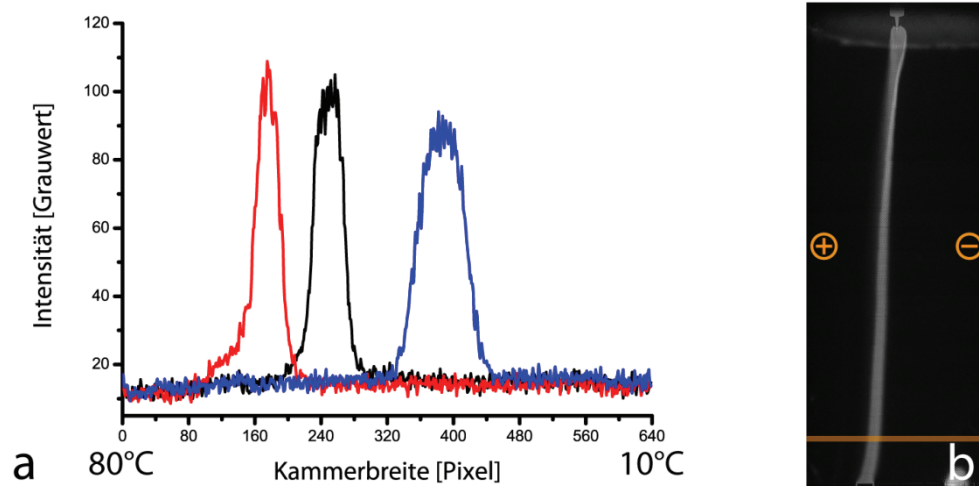


Abbildung 4.22: a) Spektren der Myoglobin-Fokussierung. Blaues Spektrum: Probestrom ohne Spannung und ohne Temperatur; schwarzes Spektrum: nur Spannung (3,44 kV) angelegt, keine Temperatur; rotes Spektrum: Spannung (3,44 kV) und Temperaturgradient angelegt. b) Bild der Kammer mit Probenstrom, wenn nur Spannung (3,44 kV) angelegt ist.

Wie schon vorher erwähnt, war der Probenstrom durch die verschiedenen Flussraten an den inneren Puffereingängen leicht nach rechts verschoben. Legte man nun eine Spannung von 3,44 kV an den Chip an, so wurde das Myoglobin abgelenkt. Diese Ablenkung wird durch das schwarze Spektrum in Abbildung 4.22a dargestellt. Im Vergleich zum blauen Spektrum erkennt man eine Abnahme der Peakbreite und ein Anstieg der Intensität. Legte man nun zusätzlich den Temperaturgradienten an den Chip (rotes Spektrum in Abbildung 4.22a), so erkennt man eine zusätzliche, leichte Intensitätszunahme und die bereits in Abschnitt 4.4.2 erwähnte Wanderung des Peaks zur heißen Seite. Das rote Spektrum in Abbildung 4.22a ist aber noch unkorrigiert, das heißt, die Intensitätsabnahme des Fluoreszenzmarkers bei steigender Temperatur ist noch nicht berücksichtigt. Mit den Daten der in Abschnitt 4.4.3 beschriebenen Messungen war es nun möglich, eine Korrekturgleichung zu errechnen und diese auf das rote TGF-Spektrum aus Abbildung 4.22a anzuwenden. Abbildung 4.23 zeigt erneut die Spektren der Myoglobin-Fokussierung, diesmal aber mit korrigiertem TGF-Spektrum. Vergleicht man die beiden TGF-Spektren aus Abbildung 4.22a und Abbildung 4.23, so lässt sich ein Unterschied zwischen korrigiertem und unkorrigiertem Spektrum feststellen.

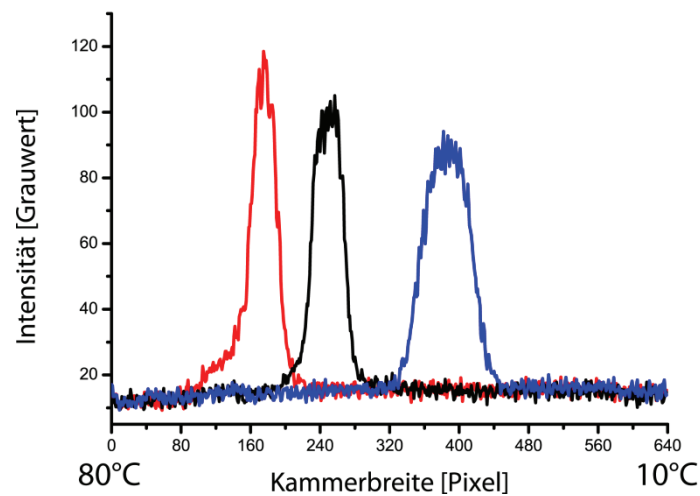


Abbildung 4.23: Abbildung der Spektren der Myoglobin-Fokussierung mit korrigiertem TGF-Spektrum (rotes Spektrum).

Bei den folgenden Protein-Fokussierungen wird direkt das korrigierte Spektrum gezeigt, die Messung und Korrektur des TGF-Spektrums erfolgte aber genauso wie eben beschrieben.

Cytochrom C

Abbildung 4.24 zeigt die verschiedenen Spektren während der Fokussierung des Proteins Cytochrom C.

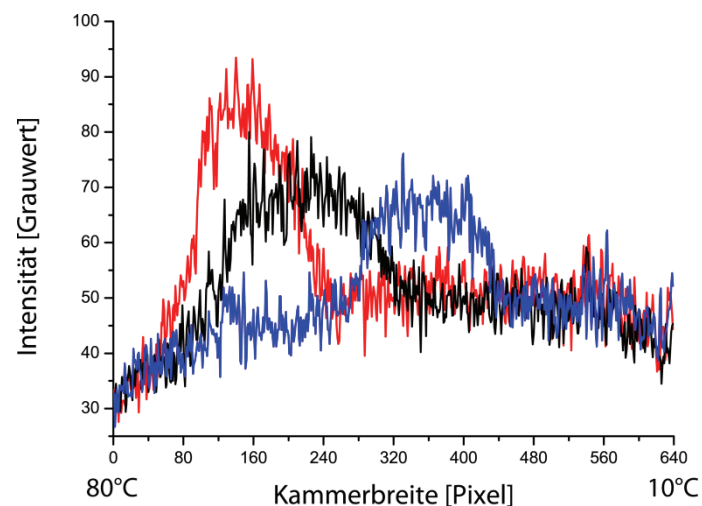


Abbildung 4.24: Die verschiedenen Spektren während der Fokussierung von Cytochrom C: blaues Spektrum: nur Fluss, ohne Spannung und Temperatur; schwarzes Spektrum: nur Spannung (3,44 kV); rotes Spektrum: Spannung (3,44 kV) und Temperatur, korrigiert.

Im Vergleich zum Myoglobin war das Rauschen in den Spektren viel stärker. Dies lag vermutlich daran, dass der Labeling-Prozess nicht so gut wie erwartet funktioniert hatte. Dadurch musste die interne Verstärkung der CCD-Kamera sehr hoch eingestellt werden, wodurch das starke Rauschen entstand. Trotz des hohen Rauschens war aber eine zusätzliche Fokussierung des Proteins nach Anlegen des Temperaturgradienten erkennbar. Wie beim Myoglobin wurde eine Spannung von 3,44 kV während des Experiments angelegt.

Peroxidase

Abbildung 4.25 zeigt die Fokussierung des Proteins Peroxidase. Auch hier war das Rauschen in den Spektren stärker als beim Myoglobin, allerdings nicht so stark wie beim Cytochrom C.

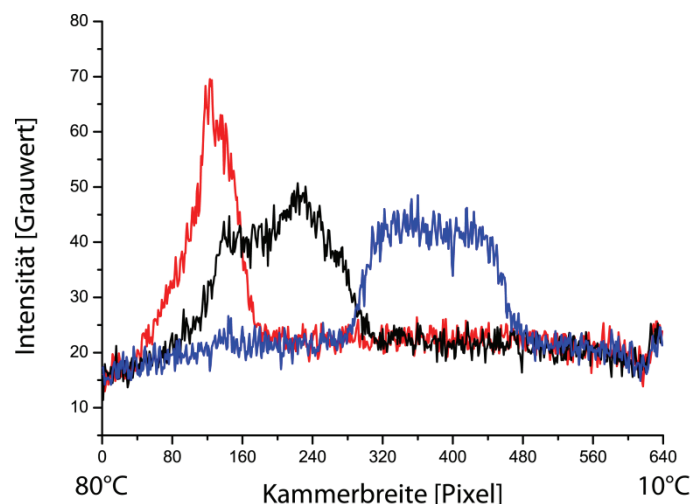


Abbildung 4.25: Fokussierung des Proteins Peroxidase: Das blaue Spektrum zeigt den Probenstrom durch die Trennkammer ohne angelegte Spannung und Temperatur, das schwarze Spektrum stellt den Probenstrom bei angelegter Spannung (2,47 kV) dar; das rote Spektrum zeigt die Fokussierung bei angelegter Spannung (2,47 kV) und angelegtem Temperaturgradienten. Dieses Spektrum ist bezüglich der Temperaturabhängigkeit des Farbstoffes bereits korrigiert worden.

Für die Fokussierung wurde eine Spannung von 2,47 kV an den Chip gelegt. Die zusätzliche Fokussierung, welche nach Anlegen des Temperaturgradienten erfolgte, ist deutlich zu erkennen.

Trypsin-Inhibitor

Im vierten Experiment wurde das Protein Trypsin-Inhibitor mit Hilfe der FF-TGF Methode fokussiert. Während des Experiments wurde eine Spannung von 2,47 kV angelegt. Auch hier ließ sich die zusätzliche Fokussierung der Probe nach Anlegen des Temperaturgradienten erkennen.

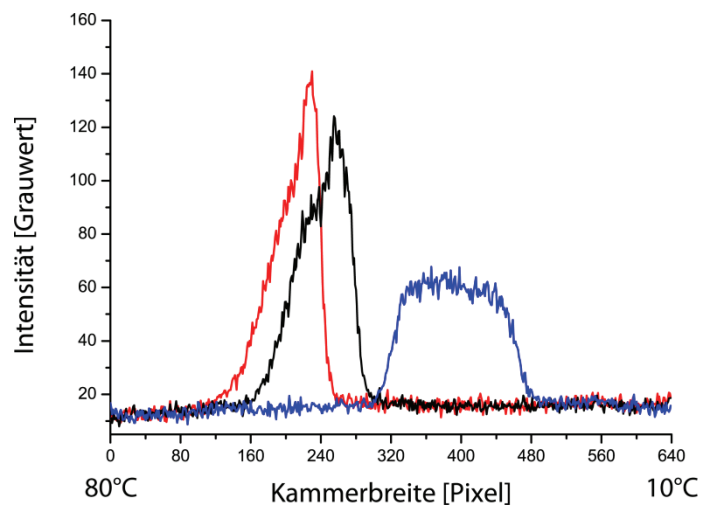


Abbildung 4.26: Fokussierung von Trypsin-Inhibitor: blaues Spektrum: nur Fluss, ohne Spannung und Temperatur; schwarzes Spektrum: Probenstrom bei angelegter Spannung (2,47 kV); rotes Spektrum: Probenstrom bei angelegter Spannung (2,47 kV) und Temperatur. Das rote Spektrum ist bezüglich des Intensitätsabfalles des Farbstoffes bei steigenden Temperaturen korrigiert.

Die hier beschriebenen Experimente zeigen, dass die Technik des Free-Flow Temperature-Gradient-Focusing zur Fokussierung von Proteinen geeignet ist. Durch das Anlegen des Temperaturgradienten an den Chip konnte bei jedem der vier Proteine eine zusätzliche Fokussierung erreicht werden.

4.9 Trennung und Fokussierung eines Proteingemisches

Im vorherigen Abschnitt wurde die Fokussierung von Proteinen mit Hilfe der FF-TGF-Technik beschrieben. Im Folgenden wird nun gezeigt, dass die FF-TGF-Methode auch zur Trennung von Proteinen geeignet ist. Dazu wurde ein Probengemisch aus den zwei Proteinen Myoglobin und Trypsin-Inhibitor verwendet. Jedes Protein lag in einer Konzentration von 10 μM vor und wurde mit dem Fluoreszenzmarker FITC gelabelt. Es wurde mit einer Gesamtflussrate von 3,7 $\mu\text{l}/\text{min}$ gearbeitet, wobei die Flussrate des Probenstroms 1,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ betrug. Das heiße Peltierelement besaß eine Temperatur von 80 $^{\circ}\text{C}$ und heizte die rechte Chipseite. Das kalte Peltierelement lag dementsprechend an der linken Seite des Chips und seine Temperatur betrug 10 $^{\circ}\text{C}$. Für das Experiment wurde ein reiner Soda-Lime Glaschip mit dem Zwei-Tiefen-Design benutzt. An die Elektroden in den Seitenreservoirs wurde eine Spannung von 3,15 kV angelegt, wobei sich die Anode auf der heißen Seite befand. Abbildung 4.27 zeigt drei Stufen der Trennung.

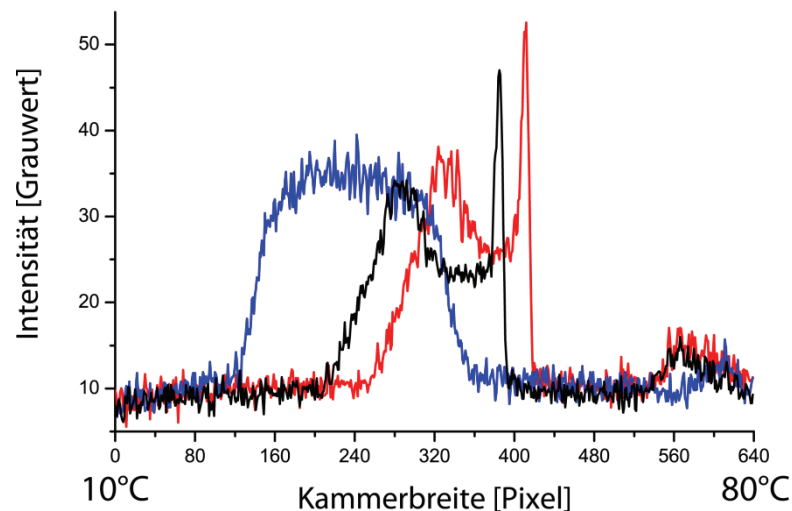


Abbildung 4.27: FF-TGF Trennung von Myoglobin und Trypsin-Inhibitor: Das blaue Spektrum zeigt den Probenstrom ohne angelegte Spannung oder Temperatur. Das schwarze Spektrum zeigt den Probenstrom wenn nur Spannung (3,15 kV) angelegt wird. Das rote Spektrum zeigt den Probenstrom bei angelegter Spannung (3,15 kV) und angelegtem Temperaturgradienten. Eine Korrektur bezüglich der Intensitätsabhängigkeit des Farbstoffes von der Temperatur wurde bereits durchgeführt.

Das blaue Spektrum zeigt den Probenstrom ohne angelegte Spannung oder Temperatur. Der Probenstrom durchfließt nur die Kammer. Das schwarze Spektrum zeigt den Probenstrom, wenn die Spannung von 3,15 kV an den Chip angelegt wurde. Eine Trennung und Fokussierung ist deutlich erkennbar. Das rote Spektrum zeigt nun

den Probenstrom bei zusätzlich zur Spannung angelegtem Temperaturgradienten. Man erkennt die Wanderung des Probenstroms zur heißen Seite der Trennkammer. Außerdem lässt sich deutlich ein Anstieg der Peakhöhen beobachten. Das rote Spektrum wurde bereits bezüglich der Temperaturabhängigkeit der Farbstoffintensität korrigiert. Im Vergleich zur Farbstofftrennung in Abschnitt 4.7 ist dies hier ohne Probleme möglich. Es waren zwar zwei verschiedene Analyte im Probengemisch vorhanden, allerdings waren beide mit demselben Fluoreszenzmarker gelabelt. Dadurch war die Intensitätsabnahme nur durch die Position in der Trennkammer, beziehungsweise im Temperaturgradienten, abhängig. Eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Farbstoffen, und damit eventuell verschiedenen Temperaturabhängigkeiten, war somit nicht nötig.

Mit diesem Experiment wurde gezeigt, dass die FF-TGF Technik neben der Fokussierung und Konzentration von Proteinen auch zur Trennung von Proteingemischen eingesetzt werden kann. Im Vergleich zur reinen Free-Flow-Zonenelektrophoretischen Trennung (Abbildung 4.27, schwarzes Spektrum) ergibt sich eine stärkere Konzentrierung der getrennten Proteine (Abbildung 4.27, rotes Spektrum).

4.10 FF-TGF - Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel wurde die Anwendung der Temperature Gradient Focusing Methode auf die Free-Flow Elektrophorese beschrieben [39]. Neben diversen Charakterisierungsexperimenten konnte die Fokussierung und Trennung von Proteinen mittels FF-TGF gezeigt werden. Vergleicht man die Ergebnisse der Fokussierungen mit denen des CE-TGF, so stellt man fest, dass beim CE-TGF vielfach höhere Fokussierungsfaktoren erreicht werden können. Ross *et al.* beschreiben Experimente, bei denen eine 10.000-fache Fokussierung des Analyten erreicht wird [57]. Um diese starken Fokussierungen zu erreichen, wurden aber sehr lange Zeiträume gebraucht. Die 10.000-fache Fokussierung benötigte zum Beispiel 100 Minuten. Bei den in diesem Kapitel gezeigten Fokussierungen wurde eine maximal zweifache Konzentrierung der Probe (Abbildung 4.25) erreicht. Allerdings muss hier beachtet werden, dass die Free-Flow-Elektrophorese eine kontinuierliche Trennmethode ist. Bei einer Gesamtflussrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ benötigt ein Analytmolekül etwa 9,8 Sekunden, um durch die Trennkammer zu fließen. Das heißt, es befindet sich auch nur 9,8 Sekunden im Einflussbereich des elektrischen Feldes und des Temperaturgradienten. Beim CE-TGF erreicht man nach einer Minute Konzentrationen, die dem zweifachen bis 100-fachen der Ausgangskonzentration entsprechen [57]. Beim FF-TGF erreicht man eine zweifache Konzentration bereits nach knapp zehn Sekunden. Das zeigt, dass die Ergebnisse des Free-Flow-Temperature-Gradient-Focusing durchaus mit dem CE-TGF vergleichbar sind. Zusätzlich besitzt das FF-TGF aber die Möglichkeit, Analyte kontinuierlich zu trennen und zu fokussieren.

5 Markerfreie Detektion in μ FFE-Systemen durch SERS

Die am häufigsten verwendete Detektionsmethode in der miniaturisierten Free-Flow Elektrophorese ist die Fluoreszenzdetektion [34-37, 39, 41, 42, 45, 46, 53]. Dabei wird das Analytmolekül mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Dieser Prozess wird Labeling genannt. Das Analytmolekül wird mit dem Fluoreszenzmarker in einem bestimmten Verhältnis gemischt, die verschiedenen Moleküle reagieren chemisch miteinander und gehen so eine Bindung ein. Diese fluoreszenzmarkierten Analyte lassen sich nun mit Hilfe der Fluoreszenzdetektion detektieren. Allerdings werden durch den Labelingprozess die Eigenschaften des Analytmoleküls verändert. Die fluoreszenzmarkierten Analytmoleküle weisen so zum Beispiel eine andere elektrische Ladung, Größe oder elektrophoretische Mobilität auf als die unmarkierten Analytmoleküle. Da bei einer elektrophoretischen Trennung aber genau nach diesen Analyteigenschaften getrennt wird, kann es somit zu einer Veränderung der Trennergebnisse kommen. Die elektrophoretische Trennung ist dann nicht mehr nur von den Analyteigenschaften abhängig, sondern auch von den Eigenschaften des Farbstoffmarkers.

Es gab bereits einige Ansätze, um die Fluoreszenzdetektion durch andere optische Detektionsmethoden zu ersetzen. So wurde bei Free-Flow-Elektrophorese-Geräten die Absorption von UV-Licht zur Detektion verwendet. Dabei wurden mit einer Scanapparatur 48 Ausgangskapillaren gescannt und für jede Kapillare ein Absorptionsspektrum gemessen [56]. Ein anderer Ansatz war die Verwendung von vier Lichtwellenleitern, die direkt an der Trennkammer befestigt waren [55]. Mit Hilfe dieser Lichtwellenleiter wurde ebenfalls die Absorption des UV-Lichtes beim Passieren der Trennkammer detektiert. So wurde die Proteinkonzentration in der Trennkammer gemessen. Nachteil der bisher bekannten alternativen optischen Detektionsmethoden für FFE ist, dass sie bisher nur an nicht-miniaturisierten FFE-Geräten verwendet wurden.

Im Bereich der Kapillarelektrophorese (CE) findet man neben der UV-Detektion auch noch andere, nicht fluoreszenzbasierte Detektionsmethoden. Eine dieser Methoden ist die Leitfähigkeitsdetektion [130-135]. Dabei wird über Elektroden die Veränderung der Leitfähigkeit in der Flüssigkeit gemessen und so die Analyte detektiert. Diese

Variante ist aber in miniaturisierten FFE-Systemen mit mehreren Ausgängen schwer zu realisieren. Eine andere optische Detektionsmethode, die in der CE [136] und auch in Mikrokanäle [137-140] erfolgreich angewendet wird, ist die Detektion mittels Raman-Spektroskopie. Der große Vorteil der Raman-Spektroskopie ist die Möglichkeit der qualitativen Messung. Raman-Spektren sind wie ein spektroskopischer Fingerabdruck. Jedes Molekül besitzt molekülspezifische Spektralbanden. Somit ist es möglich, anhand des Spektrums direkt das Molekül zu identifizieren.

Dieses Kapitel beschreibt die durchgeführten Experimente, um die Vorteile der Raman-Spektroskopie mit denen der Free-Flow-Elektrophorese zu verbinden und somit eine qualitative, fluoreszenzunabhängige Detektionsmöglichkeit für miniaturisierte FFE-Systeme zu schaffen. Im Experiment sollte ein markerfreies Protein mit Hilfe der FFE-Technik fokussiert und an den Chipausgängen mit Hilfe einer speziellen Raman-Methode, der oberflächenverstärkten Raman-Streuung (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS), detektiert werden.

Einige der in diesem Kapitel präsentierten Ergebnisse wurden in einem Artikel in der Fachzeitschrift „Analyst“ veröffentlicht [141]. Außerdem wurde die Kombination von Free-Flow Elektrophorese (FFE) mit der markerfreien Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)-Detektion unter der Nummer 10 2008 032 164.8-52 zum Patent angemeldet.

5.1 Raman Grundlagen

In diesem Abschnitt werden die grundlegenden Prinzipien der Raman-Spektroskopie erläutert und eine Variante der Raman-Spektroskopie, das Surface Enhanced Raman Scattering (SERS), beschrieben.

Im Jahre 1928 veröffentlichte Chandrasekhara Venkata Raman eine Arbeit über die modifizierte Streustrahlung an Molekülen in Lösung [142]. Diese Entdeckung begründete die Raman-Spektroskopie, welche hauptsächlich auf dem sogenannten Raman-Effekt beruht. Wird ein Strom von Photonen auf eine Probe gelenkt, so treffen die Photonen auf die Moleküle der Probe. Bei diesem Zusammenstoß können drei verschiedene Arten von Streuung auftreten. Diese lassen sich anhand der Wellenlänge der Streuung unterscheiden. Ein Molekül der Probe wird durch die Energie des Photons, mit dem es zusammenstößt, in einen virtuellen Energiezustand gehoben. Bei Zurückfallen in den energetischen Grundzustand gibt das Molekül die aufgenommenen Energie in Form eines neuen Photons wieder ab. Entspricht die Energie des emittierten Photons der des eingestrahlteten Photons, so handelt es sich um einen elastischen Stoß. Diese Art der Streuung wird Rayleigh-Streuung genannt (Abbildung 5.1a). Mit einer geringen Wahrscheinlichkeit findet keine elastische Streuung, sondern eine Energieübertragung beim Zusammenstoß zwischen Molekül und Photon statt. Diese inelastische Streuung wird als Raman-Effekt bezeichnet. Bei der inelastischen Streuung unterscheidet man zwei Fälle. Ist die Energie des abgestrahlten Photons geringer als die Energie des anregenden Photons, so spricht man von Stokes-Streuung (Abbildung 5.1b). Fällt das Molekül nun nicht in den Grundzustand, sondern in ein angeregtes Vibrationsniveau zwischen Grundzustand und virtuellem Energieniveau zurück, so besitzt das abgestrahlte Photon weniger Energie als das anregende Photon besaß. Befindet sich das Molekül bereits in einem angeregten Vibrationsniveau und wird dann von einem Photon getroffen, so wird es in ein höheres virtuelles Energieniveau gehoben. Fällt es aus diesem höheren Energieniveau in den Grundzustand zurück, so wird ein Photon mit einer höheren Energie im Vergleich zum anregenden Photon abgestrahlt. Dieser Prozess wird Anti-Stokes-Streuung bezeichnet (Abbildung 5.1c).

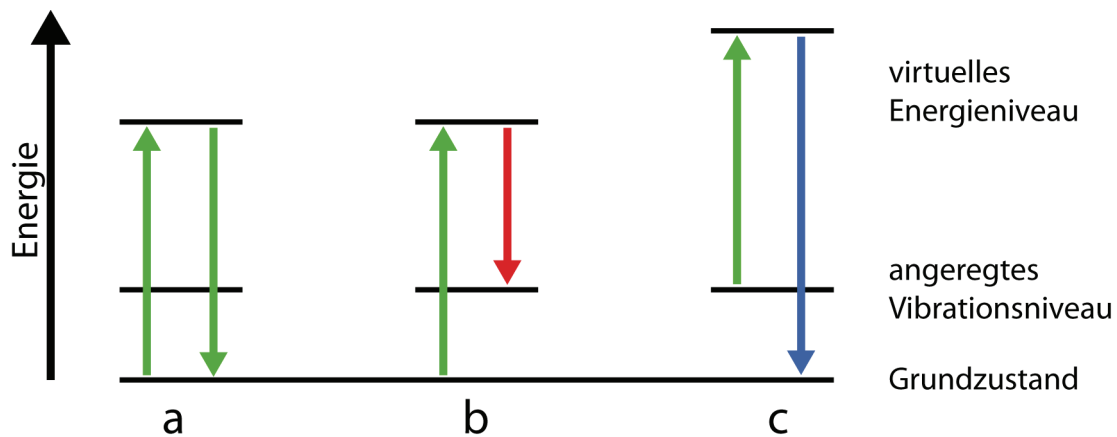


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des Raman-Effektes. Ein Molekül wird von einem Photon mit einer bestimmten Energie und Frequenz getroffen (grüner Pfeil). Bei einem elastischen Stoß besitzt das abgestrahlte Photon die gleiche Energie und Frequenz wie das eingestrahlte Photon (a). Wird Energie zwischen Photon und Molekül übertragen, so spricht man von einem inelastischen Stoß. Besitzt das abgestrahlte Photon dabei weniger Energie, so spricht man von Stokes-Streuung (b). Besitzt das abgestrahlte Photon bei einem inelastischen Stoß mehr Energie als das anregende Photon, so spricht man von Anti-Stokes-Streuung (c).

Durch die Energieänderung und die damit verbundenen Frequenzverschiebungen beim inelastischen Stoß kann man anhand der Frequenz des emittierten Photons zwischen Stokes- und Anti-Stokes-Streuung unterscheiden. Im klassischen Fall regt ein elektromagnetisches Feld \vec{E} ein Molekül mit der Frequenz f an:

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \sin 2\pi f t \quad 5.1$$

Dieses elektromagnetische Feld induziert in dem Molekül ein Dipolmoment $\vec{\varphi}$:

$$\vec{\varphi} = \alpha \vec{E} = \alpha \vec{E}_0 \sin 2\pi f t \quad 5.2$$

α steht hierbei für die Polarisierbarkeit des Moleküls. Nach Gleichung 5.2 schwingt der Dipol mit der Frequenz f und emittiert Photonen mit derselben Frequenz wie der des anregenden elektromagnetischen Feldes. Dieses emittierte Licht ist die Rayleigh-Streuung (Abbildung 5.1a). Schwingt der Dipol nun mit der Frequenz f_v , einer seiner Normal-Moden, so verschiebt sich die Elektronenwolke periodisch um das Atom. Dadurch ändert sich die Polarisierbarkeit zu:

$$\alpha = \alpha_0 + \beta \sin 2\pi f_v t \quad 5.3$$

α_0 ist das statische Dipolmoment und β beschreibt, wie stark sich die Polarisierbarkeit des Moleküls in Abhängigkeit von der Schwingung ändert.

Aus den Gleichungen 5.2 und 5.3 ergibt sich somit die Gleichung für das in dem Molekül induzierte Dipolmoment:

$$\vec{\varphi} = (\alpha_0 + \beta \sin 2\pi f_v t) \vec{E}_0 \sin 2\pi f t \quad 5.4$$

Durch Umformen von Gleichung 5.4 ergeben sich folgende Terme:

$$\vec{\varphi} = \underbrace{\alpha_0 \vec{E}_0 \sin 2\pi f t}_{\text{Rayleigh}} - \frac{1}{2} \beta \vec{E}_0 \left[\underbrace{\cos 2\pi (f + f_v) t}_{\text{Anti-Stokes}} - \underbrace{\cos 2\pi (f - f_v) t}_{\text{Stokes}} \right] \quad 5.5$$

Der induzierte Dipol emittiert somit drei Arten von Strahlung. Beim ersten Term, der Rayleigh-Streuung, sind die Energie und die Frequenz gegenüber dem eingestrahlten Licht unverändert. Der zweite Term in Gleichung 5.5 beschreibt die Anti-Stokes-Streuung. Hier sind aufgrund des Energieübertrags vom anregenden Photon auf das Molekül die Energie und die Frequenz des emittierten Lichtes höher. Aufgrund dessen ist das emittierte Licht bei der Anti-Stokes-Streuung blauverschoben (Abbildung 5.1c). Der dritte Term beschreibt die Stokes-Streuung. Hier sind Energie und Frequenz des emittierten Lichtes geringer als beim anregenden Licht. Daher findet bei einer Stokes-Streuung eine Rotverschiebung (Abbildung 5.1b) statt. Aus Gleichung 5.5 lässt sich auch erkennen, dass bei einer Molekül-Polarisierbarkeit β von null keine Raman-Streuung auftritt.

Surface-Enhanced Raman Scattering

Die Wahrscheinlichkeit einer inelastischen Streuung ist im Vergleich zur elastischen Rayleigh-Streuung etwa um einen Faktor 10^3 bis 10^4 geringer. Daher braucht man unter normalen Messbedingungen einen Laser als Anregungslichtquelle, einen sensitiven Detektor und eine große Anzahl streuender Moleküle, um ein Raman-Spektrum aufzunehmen. Da aber bei modernen biologischen Analysen meist nur geringe Mengen eines Stoffes vorhanden sind, sind die Anwendungsmöglichkeiten für die Raman-Spektroskopie hier sehr beschränkt. Im Jahre 1974 beobachteten Fleischmann *et al.* dass Proben, die auf einer rauen Silberelektrode adsorbiert waren, ein starkes Raman-Signal besaßen [143]. Diese Signalverstärkung wurde wenig später auch durch Jeanmaire [144] und Albrecht [145] beobachtet. Jeanmaire und Van Duyne folgerten, dass die hohe Raman-Intensität mit der Kontaktfläche von Molekül und Silber zusammenhängt [144]. Damit war erstmal die oberflächenverstärkte Raman-

Streuung (Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS) beschrieben worden. Die SERS-Technik wurde seitdem ständig verbessert. Es wurde klar, dass die Verstärkung des Signals von der Rauigkeit der Oberfläche und dem Material der verstärkenden Oberfläche abhängt. Neben Silber, das die stärkste Signalverstärkung zeigt, wurden auch mit Gold oder Kupfer große Verstärkungen erreicht [146]. Allerdings muss je nach Material die Anregungswellenlänge angepasst werden. Mit der SERS-Technik lassen sich bis zu 10^5 -fach stärkere Signale erzeugen als bei normalem, unverstärktem Raman [147]. Die eigentliche Verstärkung des Raman-Signals ist die Summe aus einer elektromagnetischen und einer chemischen Verstärkung.

Aus Gleichung 5.5 ergibt sich, dass sich die inelastische Streuung durch eine Erhöhung des elektromagnetischen Feldes \vec{E}_0 oder der schwingungsabhängigen Polarisierbarkeit β verstärken lässt. Die elektromagnetische Verstärkung hat ihre Ursache in der Induktion von lokalisierten Plasmonen auf der Oberfläche des rauen Metalls [148]. Mit Plasmonen bezeichnet man die kollektive Schwingung von freien Elektronen gegen die positiv geladenen Kerne in Metallen. Oberflächenplasmonen sind evaneszente Oberflächenwellen. Auf glatten Oberflächen breitet sich das elektrische Feld parallel zur Oberfläche aus. Auf rauen Oberflächen hingegen können sich Plasmonen auch senkrecht zur Oberfläche ausbilden. Aufgrund des resonanten Charakters der lokalisierten Plasmonen tritt eine Polarisierung und eine Vergrößerung des elektrischen Feldes ein. Einige Metalle erlauben die Anregung von Plasmonen mit sichtbarem beziehungsweise ultraviolettem Licht. Metalle wie Gold, Silber und Kupfer eignen sich besonders gut als verstärkende Materialien. Daneben haben auch Größe und Form der verstärkenden Partikel Einfluss auf die elektromagnetische Verstärkung. Das verstärkende Feld nimmt mit der Distanz d zum Partikel ab [149]:

$$E_{\text{verstärkt}} \propto \left(\frac{r}{r+d} \right)^{12} \quad 5.6$$

r ist dabei der Radius des verstärkenden Partikels. Gleichung 5.6 zeigt, dass sich die Reichweite der Verstärkung erhöht, wenn der verstärkende Partikel größer ist. Die Verstärkung hingegen ist nicht von der Partikelgröße abhängig.

Bei der chemischen Verstärkung wird die Polarisierbarkeit des Moleküls erhöht, was nach Gleichung 5.5 ebenfalls zu einer Verstärkung des Raman-Signals führt. Die Erhöhung der Polarisierung erfolgt durch kurzreichweitige Wechselwirkungen,

vermutlich durch „charge-transfer“-Effekte zwischen Probe und verstärkender Oberfläche. Die chemische Verstärkung wirkt nur auf die direkt auf dem verstärkenden Partikel adsorbierten Moleküle, da die Verstärkung von der Bindung zwischen Molekül und Oberfläche abhängt [150].

5.2 Chipdesign und experimenteller Aufbau

Für die μ FFE-SERS Experimente wurde ein spezielles Chipdesign entworfen. Da es bei den Experimenten darum ging, die SERS-Detektion in μ FFE-Systemen zu implementieren, wurde das μ FFE-System bewusst einfach gehalten. Als Grunddesign diente das bereits in Kapitel 4.3.2 beschriebene Design. Allerdings gab es einige Modifizierungen, so waren die Seitenreservoirs komplett längs der Kammer. Auch wurden jeweils beide Trennkammerseiten komplett mit Seitenkanälen kontaktiert. Jedes Seitenreservoir war durch 350 Seitenkanäle mit der Trennkammer verbunden. In die Kammer mündeten 62 Eingangskanäle und am Ausgang der Trennkammer befanden sich 64 Ausgangskanäle. Diese 64 Ausgangskanäle wurden zu einem großen Ausgangskanal zusammengeführt. Alle Strukturen des Designs besaßen mit $17\ \mu\text{m}$ die gleiche Tiefe. In der Kammer befanden sich 31.104 Pfosten, die ein Zusammenfallen der Kammer während des Glasbondings verhindern sollten (vergleiche Kapitel 3.2.2). Durch das Anlegen eines Unterdrucks am Ausgang wurden die Puffer und die Probe durch den Chip gesaugt. Da nur ein Ausgang vorhanden war, ließ sich das ganze System mit nur einer Pumpe betreiben. Dies sorgte für eine weitere Vereinfachung des Versuchsaufbaus, was bei den engen Platzverhältnissen am Raman-Messplatz von Vorteil war. Als Pumpe wurde eine Spritzenpumpe (sp210iw, World Precision Instruments) verwendet. Abbildung 5.2a zeigt das für die SERS- μ FFE Experimente benutzte Chipdesign.

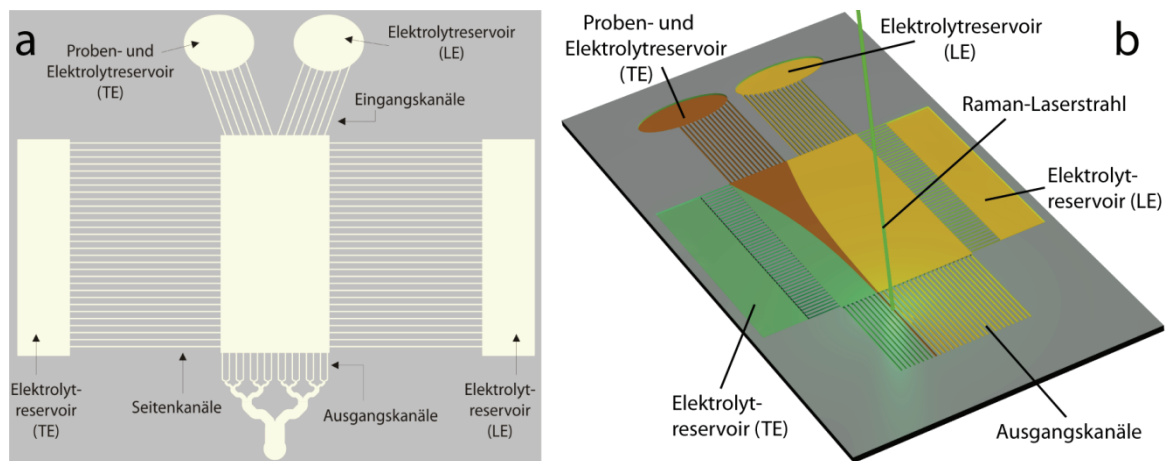


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung des SERS- μ FFE-Chips. a) zeigt das verwendete Chipdesign, in b) erkennt man, wo die Raman-Messung am μ FFE-Chip stattfand.

Durch die große Anzahl von Seitenkanälen, die die gleiche Tiefe wie die Trennkammer besaßen, und den Betrieb des Chip mittels Unterdruck war mit einer starken hydrodynamischen Fokussierung der Probe in der Trennkammer zu rechnen (vergleiche Kapitel 3.3.3).

Der Chip wurde komplett aus Glas hergestellt. Hierbei kam Soda-Lime-Glas zum Einsatz. Der Chip war nach dem Bonden 2,2 mm dick. Die Glasdicke spielte allerdings bei den Experimenten keine Rolle, da mit sichtbarem Licht angeregt wurde, bei dem das Glas eine Transmission von über 90% besaß und somit das Licht keine nennenswerte Dämpfung beim Glasdurchtritt erfuhr. Die eigentlichen Raman-Messungen fanden in den 64 Ausgangskanälen statt. Für die Molekülanregung wurde ein Krypton-Ionen-Laser (Coherent, USA) mit einer Wellenlänge von 568 nm verwendet. Das Licht wurde durch ein inverses Mikroskop, auf dem der μ FFE-Chip befestigt war, auf die Ausgangskanäle fokussiert. In dem Mikroskop kam ein LCPPlanFI-Objektiv (Olympus) mit einer 20-fachen Vergrößerung zum Einsatz. Um die Dämpfung des Lichts beim Übergang zwischen Objektiv und Chip möglichst gering zu halten, wurde Indexöl verwendet. Ein LabRam HR-Spektrometer von JobinYvon diente als Detektor der Raman-Streuung. Für die Raman-Messung im Chip wurde der Laserstrahl nacheinander auf jeden einzelnen Ausgangskanal gerichtet (Abbildung 5.2b). So erhielt man für jeden Ausgangskanal ein SERS-Spektrum.

Mit Hilfe der Isotachophorese (ITP), welche bereits erfolgreich in μ FFE-Systemen angewendet wurde (siehe Kapitel 2), sollte die Probe fokussiert werden. Die ITP erlaubt eine sehr starke Fokussierung und die Fokussierungsergebnisse besitzen eine hohe Reproduzierbarkeit. Als zu fokussierende Probe wurde das Protein Myoglobin verwendet.

5.3 SERS - Vorexperimente

Um hohe Raman-Signalintensitäten für die μ FFE-Detektion zu erhalten, wurde nicht die klassische Raman-Spektroskopie, sondern die oberflächenverstärkte Raman-Streuung als Detektionsmethode gewählt. Die Signalverstärkung wurde durch Silberkolloide erreicht. Die Kolloide wurden sowohl mit der Probenlösung als auch mit den Pufferlösungen gemischt, so dass im ganzen μ FFE-System Silberkolloide vorhanden waren. Bevor allerdings erste Detektionsexperimente am Chip erfolgen konnten, mussten durch Vorexperimente zwei wichtige Eigenschaften der Kolloide untersucht werden. Im ersten Experiment wurde die Ablenkung der Silberkolloide im elektrischen Feld untersucht. Würde das elektrische Feld einen Einfluss auf die Bewegung der Kolloide haben und die Kolloide würden im elektrischen Feld abgelenkt werden, so wären die SERS-Experimente in der genannten Form nicht realisierbar. Die Ablenkung der Analyte würde dann durch die Bewegung der Kolloide im elektrischen Feld beeinflusst.

Das zweite Experiment befasste sich mit der Größe der Kolloide. Wie bereits erwähnt, erhöht sich die Reichweite der Verstärkung mit der Größe des verstärkenden Partikels (Gleichung 5.6). Damit eine bestmögliche Verstärkung des Signals stattfindet, musste eine optimale Kolloidgröße für die Detektionsexperimente bestimmt werden.

5.3.1 Ablenkung der Kolloide im elektrischen Feld

Um herauszufinden, ob die Silberkolloide vom elektrischen Feld beeinflusst werden, wurden zwei Experimente durchgeführt. Im ersten Experiment wurde die Ablenkung des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin B im elektrischen Feld gemessen. Dazu wurde eine 100 μ M konzentrierte Lösung mit einem pH-Wert von drei angesetzt. Bei diesem pH-Wert sollte das Rhodamin elektrisch neutral sein beziehungsweise eine sehr kleine Restladung besitzen. Die Rhodamin-B-Lösung wurde dann in eines der beiden Eingangsreservoirs des SERS- μ FFE-Chip gefüllt (Abbildung 5.2a). In das andere Eingangsreservoir wurde ein Puffer mit einem pH-Wert von ebenfalls drei gefüllt. Die Flussrate während des Experiments betrug 5 μ l/min. Während des Experiments wurde ein Bild der Kammer aufgezeichnet und so die Position des Rhodamin B-Flusses in der Trennkammer bestimmt. Anschließend wurde eine Spannung von 400 Volt an den Chip gelegt, wobei sich die Anode auf der linken Chipseite befand (entspricht dem

linken Reservoir in Abbildung 5.2a). Auch hier wurde von der Position des Rhodamin B in der Trennkammer eine Aufnahme gemacht. Um jetzt den etwaigen Einfluss des elektrischen Feldes auf die Silberkolloide zu untersuchen, wurde das Experiment erneut durchgeführt, allerdings wurde die Rhodamin-B-Lösung durch eine Rhodamin B/Silberkolloid-Lösung ausgetauscht. Die Rhodamin-B/Silberkolloid-Lösung wurde schon eine Stunde vor dem Experiment inkubiert, was eine stärkere Bindung zwischen dem Farbstoff und den Silberkolloiden bewirkte. Auch bei diesem Experiment wurden Bilder des Probenstromes in der Trennkammer mit und ohne Spannung aufgenommen. Anschließend wurde die Ablenkung zwischen der reinen Rhodamin B-Lösung und der Rhodamin B-Silberkolloid-Lösung verglichen. Idealerweise sollte keine Ablenkung erkennbar sein. Falls doch eine Ablenkung des Probenstroms erkennbar wäre, und diese Ablenkung bei beiden Lösungen gleich wäre, dann könnte daraus geschlossen werden, dass es sich hierbei nur um die Ablenkung des Rhodamin-B-Farbstoffes im elektrischen Feld handelt und das elektrische Feld die Silberkolloide nicht beeinflusst. Ist die Ablenkung nicht identisch, so werden die Silberkolloide durch das elektrische Feld beeinflusst. Abbildung 5.3 zeigt die Ergebnisse der beiden Messungen.

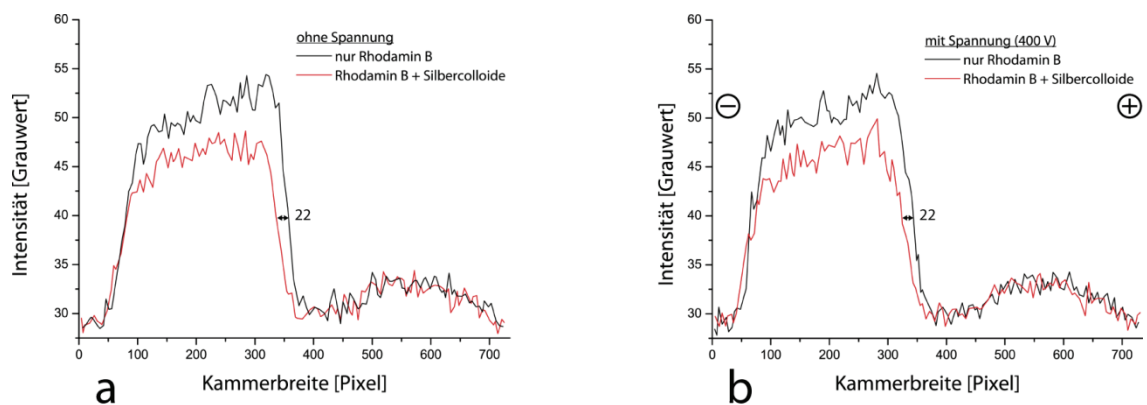


Abbildung 5.3: Untersuchung der etwaigen Ablenkung der Silberkolloide im elektrischen Feld. a) zeigt die Spektren der Rhodamin B- und der Rhodamin B/Silberkolloid-Lösung ohne angelegte Spannung. Die Lösung mit den Kolloiden besitzt eine geringere Intensität und ein schmaleres Spektrum. b) zeigt die beiden Lösungen bei einer Spannung von 400 V. Eine Verschiebung der Probenströme beziehungsweise eine Wanderung der Rhodamin B/Silberkolloid-Lösung ist nicht erkennbar. Der Abstand zwischen den beiden Spektren ist identisch zum Abstand der Spektren in a).

In Abbildung 5.3a erkennt man, dass der Farbstoff/Kolloid-Strom schmaler ist als der reine Rhodamin B-Strom und eine geringere Intensität besitzt. Legt man nun ein elektrisches Feld an die Trennkammer an und vergleicht die gemessenen Spektren mit den Spektren, die ohne Spannung gemessen wurden, so erkennt man, dass keine sichtbare Ablenkung beim Anlegen des elektrischen Feldes erfolgt ist. Der relative Abstand zwischen den Spektren ist gleich geblieben (Abbildung 5.3). Dieses Ergebnis zeigte, dass die Silberkolloide nicht vom elektrischen Feld beeinflusst wurden und somit nicht die elektrophoretische Wanderung der Analytmoleküle beeinflussen.

5.3.2 Bestimmung der optimalen Kolloidgröße

Für ein starkes SERS-Signal spielt die Größe der Silberkolloide eine besondere Rolle. Je größer die Kolloide, desto stärker ist das SERS-Signal. Die Silberkolloide wurden nach dem Rezept von Lee und Meisel hergestellt [151] und besaßen in ihrem Ursprungszustand einen Durchmesser von circa 250 nm. Durch das Mischen der fertigen Silberkolloide mit Ascorbinsäure konnte man nun die Agglomeration fördern und somit größere Kolloide erzeugen. Da die Silberkolloide sich aber sowohl in der Probe wie auch den Puffern befanden und mit durch den Chip flossen, durfte eine kritische Kolloidgröße nicht überschritten werden, um ein Verstopfen des μ FFE-Chips zu vermeiden. Die kleinsten Strukturen im verwendeten Design waren die Seiten- und die Ausgangskanäle. Ein Kanal war nach dem Glasätzen jeweils etwa 40 μ m breit und 17 μ m tief. Damit die Kolloide problemlos durch den Chip fließen konnten, sollte ihr Durchmesser etwa 10 μ m betragen. Um das optimale Mischungsverhältnis zwischen Silberkolloiden und Ascorbinsäure für die Agglomeration von Silberkolloiden mit einem Durchmesser von 10 μ m zu bestimmen, wurden Mischungen mit verschiedenen Verhältnissen angesetzt. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde die Größe der Kolloide vermessen. Abbildung 5.4a zeigt den gemessenen Verlauf der Kolloidgröße in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis.

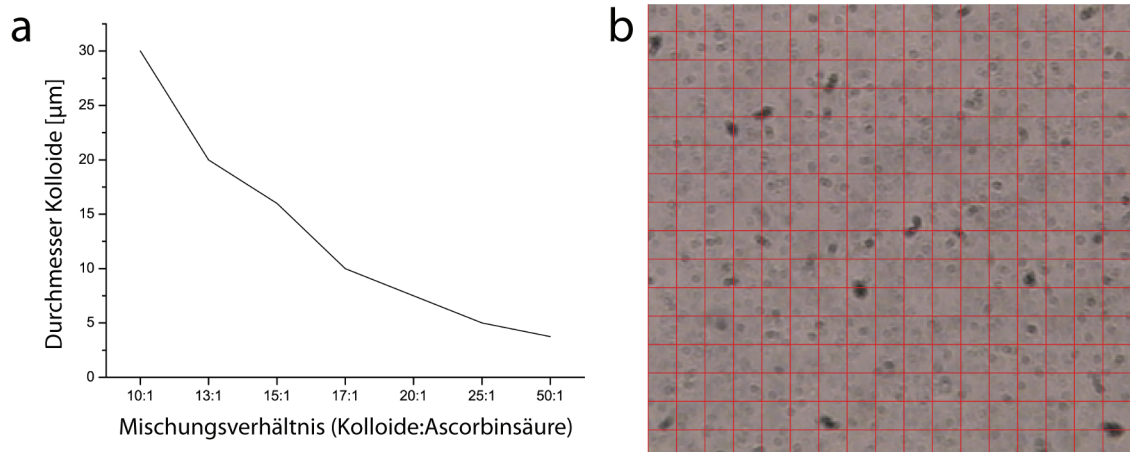


Abbildung 5.4: Agglomeration der Silberkolloide und Bestimmung des optimalen Mischungsverhältnisses zwischen Silberkolloiden und Ascorbinsäure. a) zeigt den Größenverlauf der Kolloide in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis, b) zeigt Kolloide bei einem Mischungsverhältnis von 17:1 (Kolloide:Ascorbinsäure). Ein Rasterquadrat hat eine Größe von 10 µm x 10 µm.

Bei einem Mischungsverhältnis von 17:1 besaßen die Kolloide eine Größe von 10 µm oder kleiner. Abbildung 5.4b zeigt eine Mikroskopaufnahme der Kolloide bei einem Mischungsverhältnis von 17:1 (Kolloide:Ascorbinsäure). Man kann erkennen, dass die Silberkolloide alle kleiner als die kritische Größe von 10 µm sind. Ein Mischungsverhältnis von 17:1 (Kolloide:Ascorbinsäure) war also am besten geeignet, um agglomerierte Silberkolloide zu erzeugen, die 10 µm im Durchmesser (oder kleiner) waren.

5.4 Fokussierung von Myoglobin: Erstes Experiment

Nachdem mit dem vorher beschriebenen Experiment ein Einfluss des elektrischen Feldes auf die Silberkolloide ausgeschlossen werden konnte, sollte nun erstmalig eine Protein-Fokussierung in einem μ FFE-Chip durch die SERS-Technik detektiert werden. Als Probe wurde das Protein Myoglobin verwendet. Da eine markerfreie Detektion des Myoglobins stattfinden sollte, konnte die Fokussierung des Proteins nicht fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert werden. Außerdem würde das Fluoreszenzspektrum des Farbstoffes das Raman-Spektrum überdecken und somit eine Raman-Detektion unmöglich machen. Da eine optische Kontrolle der Fokussierung während des Experiments nicht möglich war, mussten die optimalen Chippparameter, wie zum Beispiel Flussrate oder Fokussierungsspannung, im Voraus bestimmt werden. Dazu wurde fluoreszenzmarkiertes Myoglobin als Probe verwendet und mittels Isotachophorese im μ FFE-Chip (Abschnitt 5.2) fokussiert. In diesem Vorversuch waren weder die Puffer noch die Probe mit Silberkolloiden gemischt. Mit Hilfe dieses Vorversuches wurden als Parameter eine Flussrate von 5 μ l/min und eine Spannung von 204 Volt bestimmt. Die Anode befand sich dabei auf der rechten Chipseite (vergleiche Abbildung 5.2). Als Leading Electrolyte (LE) wurde eine 10 mM Chlorid-Lösung verwendet, welche durch Ethanolamin auf einen pH-Wert von 9,3 eingestellt wurde. Als Terminating Electrolyte (TE) wurde eine 6 mM β -Alanin-Lösung verwendet. Diese Lösung wurde mit Hilfe von $\text{Ba}(\text{OH})_2$ auf einen pH-Wert von 10,2 eingestellt. Sowohl der LE als auch der TE wurden nun mit Silberkolloiden gemischt. Um die Gefahr einer Kanalverstopfung in diesem Experiment möglichst gering zu halten, wurden nur nicht-agglomerierte Kolloide verwendet. Das Mischungsverhältnis zwischen LE beziehungsweise TE und den Kolloiden betrug 1:10. Das Myoglobin wurde im TE gelöst. Die Myoglobinkonzentration in dieser Lösung betrug 2,5 mM. Diese Lösung wurde dann im Verhältnis 1:10 (Myoglobinlösung : Silberkolloide) mit den Kolloiden verdünnt und für eine Stunde inkubiert. Die resultierende Myoglobinkonzentration in der Probe nach dem Mischen mit der Kolloidlösung betrug 227 μ M. Der Laser des Raman-Aufbaus hatte eine Wellenlänge von 568 nm und eine Leistung von 4 mW bei einem Spotdurchmesser von circa 3 μ m. Die Messdauer pro Ausgangskanal wurde auf zehn Sekunden festgelegt. Die Messung wurde im äußersten Ausgangskanal auf der linken Seite begonnen (vergl. Abbildung 5.2a).

Für jeden Ausgangskanal wurde ein Spektrum aufgenommen. Abbildung 5.5 zeigt das Ergebnis der ersten Messungen aller Ausgangskanäle. Eine Spannung lag noch nicht an. Die Probe floss nur durch die Kammer, ohne durch ein elektrisches Feld beeinflusst zu werden.

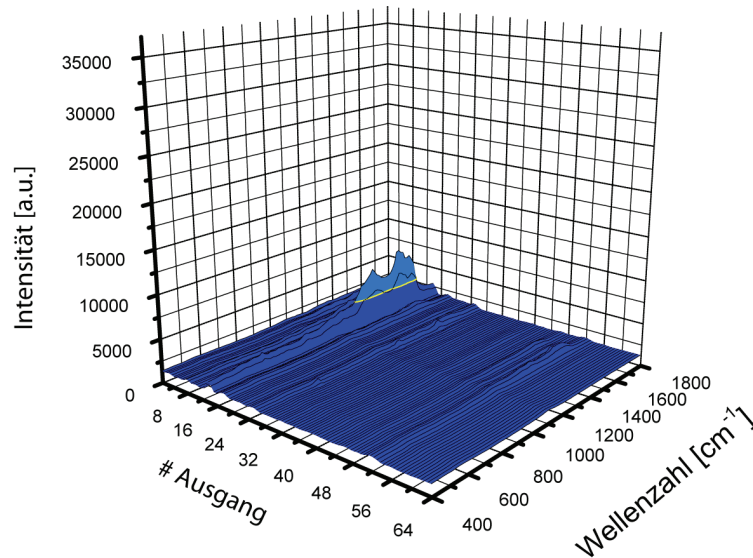


Abbildung 5.5: FFE-SERS-Detektion von Myoglobin. Die Abbildung zeigt die Spektren aller 64 Ausgänge, wenn keine Spannung angelegt wurde. Man erkennt ein Molekülspektrum bei Ausgangskanal 13.

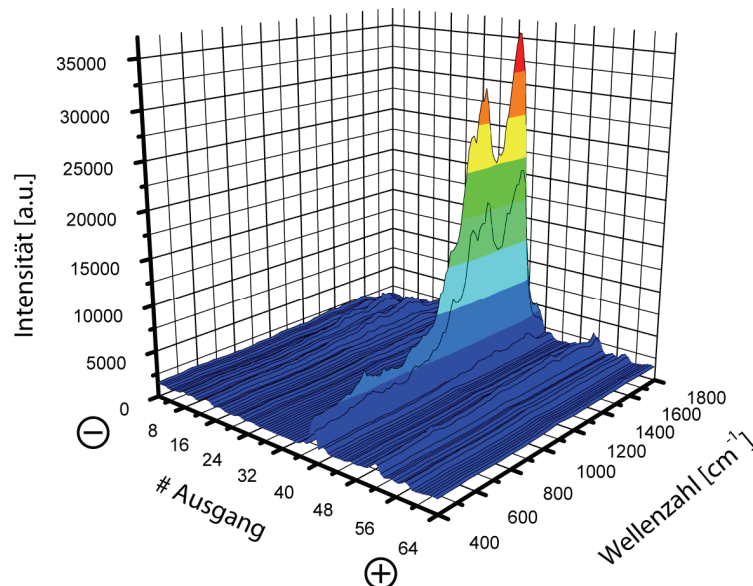


Abbildung 5.6: FFE-SERS Detektion von Myoglobin. Die Abbildung zeigt die Spektren aller 64 Ausgänge, wenn eine Spannung von 204 Volt an den Chip gelegt wurde. Die Spektren der Kanäle 38 und 39 weisen eine sehr hohe Intensität auf.

Nun wurde die Spannung von 204 Volt an den Chip angelegt. In Abbildung 5.6 ist eine deutliche Veränderung in einigen Spektren zu erkennen. In den Kanälen 38 und 39 sind sehr intensive Spektren gemessen worden. Vergleicht man die Position des Molekülspektrums aus Abbildung 5.5 mit den beiden intensiven Spektren aus Abbildung 5.6, so erkennt man eine Wanderung des Molekülsignals um etwa 22 Ausgangskanäle. Diese Wanderung der Spektren lässt auf eine elektrophoretische Bewegung in der Trennkammer schließen. Allerdings ist der sehr starke Anstieg der Signalintensität so nicht erwartet worden. Die gemessenen Intensitäten entsprechen einer etwa 32-fachen Verstärkung des Signals. Bei einer genaueren Betrachtung der gemessenen Spektren wurde festgestellt, dass es sich bei den starken gemessenen Spektren aus Abbildung 5.6 nicht um reine Myoglobin-Spektren handelt.

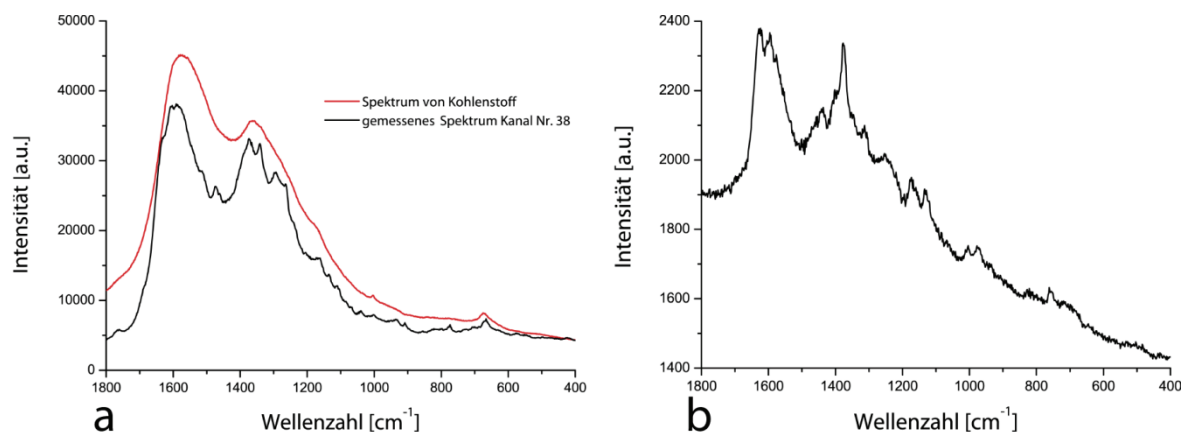


Abbildung 5.7: Untersuchung der Raman-Spektren. a) zeigt das gemessene, intensive Spektrum am Kanal 38 (schwarzes Spektrum) im Vergleich zu einem Kohlenstoff-Spektrum (rotes Spektrum), was ebenfalls im Chip gemessen wurde. b) zeigt ein SERS-Spektrum von Myoglobin (Konzentration: 454 μM).

Abbildung 5.7a zeigt den Vergleich zwischen dem gemessenen Spektrum an Kanal 38 (schwarzes Spektrum) und ein Kohlenstoff-Spektrum (rotes Spektrum). Das Kohlenstoff-Spektrum wurde nach dem Experiment in Ablagerungen vor den Ausgangskanälen im Chip gemessen. Es zeigt sich, dass sich die beiden Spektren sehr ähnlich sehen. Vergleicht man nun das gemessene Spektrum mit einem Myoglobin-Referenzspektrum (Abbildung 5.7b), so erkennt man, dass dem gemessenen Spektrum an Kanal 38 einige, für Myoglobin typische, Spektralbanden wie zum Beispiel die Doppelpeaks bei einer Wellenzahl von 1600 cm^{-1} fehlen beziehungsweise nur ganz schwach ausgebildet sind. Es scheint, als bestünde das schwarze Spektrum in

Abbildung 5.7a aus einem Kohlenstoff-Spektrum, auf dem einige wenige Myoglobinspezifische Peaks „aufsitzen“. Weitere Raman-Messungen in Ablagerungen an den Ausgangskanälen zeigten, dass sich ungewöhnlich viel Kohlenstoff in der Trennkammer befand. Diese Kohlenstoffablagerungen sind vermutlich durch eine Verbrennung des Myoglobins in der Trennkammer entstanden. Daraus folgt, dass eine Laserleistung von 4mW bei einem Spotdurchmesser von 3 μm eindeutig zu hoch ist, um SERS-Signale von Proteinen zu messen, ohne diese zu beschädigen oder zu zerstören.

Allerdings hat dieses erste Experiment gezeigt, dass eine SERS-Detektion von Molekülspektren (Kohlenstoff) im Chip möglich ist. Außerdem ließ sich die elektrophoretische Wanderung der Probe in der Trennkammer detektieren.

5.5 Anpassungen im experimentellen Aufbau

Aufgrund der in Abschnitt 5.4 gewonnenen Ergebnisse wurden einige Änderungen der Parameter des Experiments vorgenommen.

Um ein Verbrennen des Myoglobins zu verhindern, musste die Intensität des Lasers bei gleichbleibender Spotgröße verringert werden. Die geringere Intensität und die damit geringere Energie zur Anregung der Moleküle sollte durch eine längere Integrationszeit während der Raman-Messung ausgeglichen werden. Abbildung 5.8 vergleicht die SERS-Spektren einer Messung mit einer hohen Laserleistung und einer kurzen Integrationszeit mit einer Messung mit halber Laserleistung und doppelter Integrationszeit. Als Probe wurde bei beiden Messungen eine Myoglobin-Lösung mit einer Konzentration von 227 μ M verwendet. Die Lösung war im Verhältnis 1:10 (Myoglobinlösung : Silberkolloide) mit den Kolloiden gemischt worden.

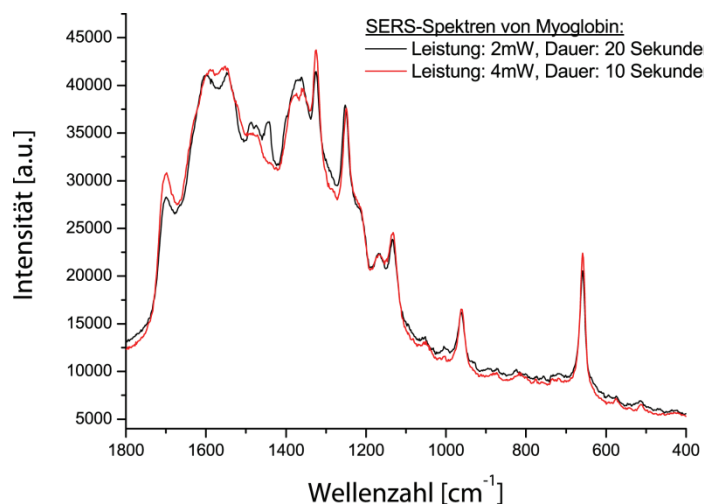


Abbildung 5.8: Vergleich zwischen einem SERS-Spektrum von Myoglobin, was mit einer hohen Laserleistung und einer kurzen Integrationszeit gemessen wurde (rotes Spektrum) und einem SERS-Spektrum, welches mit einer nur halb so hohen Laserleistung aber mit einer doppelt so langen Integrationszeit gemessen wurde (schwarzes Spektrum).

Abbildung 5.8 zeigt, dass die Auflösung des SERS-Spektrums, das mit halber Laserleistung und doppelter Integrationszeit (schwarzes Spektrum) gemessen wurde, besser als die des Spektrums mit hoher Laserleistung und kürzerer Integrationszeit (rotes Spektrum) ist. Zum Beispiel sind im schwarzen Spektrum die Peaks bei 1600 cm^{-1} deutlich ausgeprägter als im roten Spektrum. Auch die Peaks bei 1500 cm^{-1} sind im schwarzen Spektrum besser aufgelöst als im roten Spektrum. Es wird deutlich, dass

eine Verdopplung der Integrationszeit und eine Halbierung die Laserleistung die Auflösung der SERS-Messung nicht verschlechtert sondern verbessert.

Um die Detektion noch eindeutiger zu machen, wurde auch die Konzentration des Myoglobins in der Myoglobin-Silberkolloid-Lösung von 227 μM auf 454 μM verdoppelt. Außerdem wurden die in Abschnitt 5.3.2 gewonnenen Ergebnisse dazu benutzt, agglomerierte Silberkolloide herzustellen. Sowohl die Konzentrationserhöhung der Probe als auch die Vergrößerung der Silberkolloide sollte eine Detektion erleichtern und ein stärkeres Myoglobinsignal liefern.

5.6 Fokussierung von Myoglobin: Zweites Experiment

Mit den Erfahrungen aus dem ersten μ FFE-SERS Experiment (Abschnitt 5.4) und den Änderungen aus Abschnitt 5.5 wurde ein zweites Experiment durchgeführt. Als Puffer wurden die schon im ersten Fokussierungs-Experiment beschriebenen LE- und TE-Lösungen verwendet. Als Probe wurde wieder Myoglobin verwendet, das in TE gelöst worden war, diesmal allerdings mit der oben erwähnten höheren Konzentration von $454 \mu\text{M}$. Sowohl die Puffer als auch die Probe wurden im Verhältnis 1:10 mit den agglomerierten Silberkolloiden gemischt. Zur Agglomeration wurde den Silberkolloiden Ascorbinsäure im Verhältnis 1:17 (Ascorbinsäure:Kolloide) zugegeben. Die Bestimmung des optimalen Mischungsverhältnisses wurde in Abschnitt 5.3.2 beschrieben. Der Chip wurde während des Experimentes mit einer Flussrate von $5 \mu\text{l}/\text{min}$ betrieben. Abbildung 5.9 zeigt noch einmal eine Übersicht über den Chip.

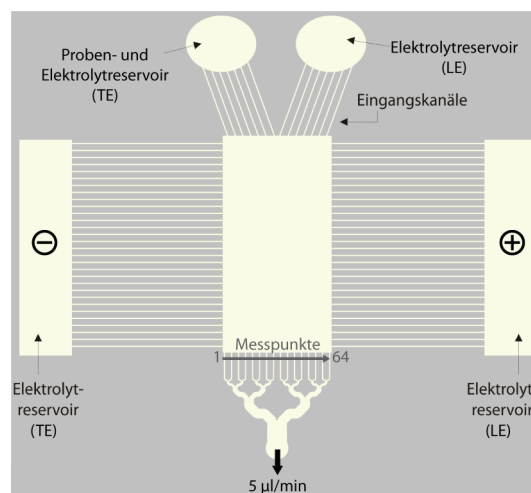


Abbildung 5.9: Übersicht über den Chip, welcher im Rahmen des zweiten Fokussierungsversuches benutzt wurde.

Zur Erzeugung des elektrischen Feldes wurde eine Spannung von 210 Volt an die Elektroden angelegt. Die Anode lag im rechten Seitenreservoir des Chips (Abbildung 5.9). Der Laser war wieder auf eine Wellenlänge von 568 nm eingestellt. Die Laserleistung wurde, im Vergleich zum ersten Fokussierungs-Experiment, auf 1,3 mW reduziert und die Integrationszeit für die Messung der SERS-Spektren auf jeweils 20 Sekunden erhöht. In jedem Ausgangskanal des μ FFE-Chips wurde wieder ein

Spektrum gemessen, beginnend mit dem äußersten linken Ausgangskanal (siehe Abbildung 5.9). Abbildung 5.10 zeigt die gemessenen Spektren für alle 64 Ausgangskanäle, wenn keine Spannung an den Chip angelegt war.

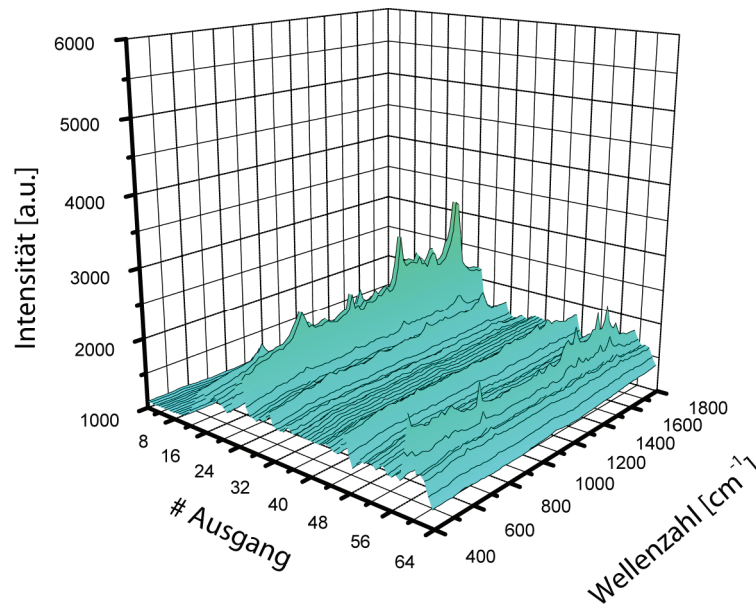


Abbildung 5.10: Übersicht über alle in den Ausgangskanälen gemessenen SERS-Spektren. Eine Spannung war während dieser Messung nicht angelegt. Myoglobin-Spektren lassen sich bei den Ausgangskanälen 22-25 erkennen.

In den Ausgangskanälen 22 bis 25 lassen sich Spektren erkennen, die sich in Intensität und Form von den restlichen gemessenen Spektren unterscheiden. Ein Vergleich mit den Myoglobin-Spektren in Abbildung 5.8 zeigt, dass es sich bei den Spektren um Myoglobin-Spektren handelt. Die Spektralbanden bei den Wellenzahlen 1600 cm^{-1} und 1300 cm^{-1} lassen sich eindeutig zuordnen.

Nun wurde eine Spannung von 210 Volt an den Chip gelegt und erneut ein SERS-Spektrum für jeden Ausgangskanal gemessen. Abbildung 5.11 zeigt die Übersicht über alle 64 gemessenen SERS-Spektren in den Ausgangskanälen. In den Kanälen 23 und 24 war ein deutlicher Intensitätsanstieg der Spektren zu verzeichnen. Anhand der Spektralbanden ließen sich diese Spektren wieder eindeutig dem Myoglobin zuordnen.

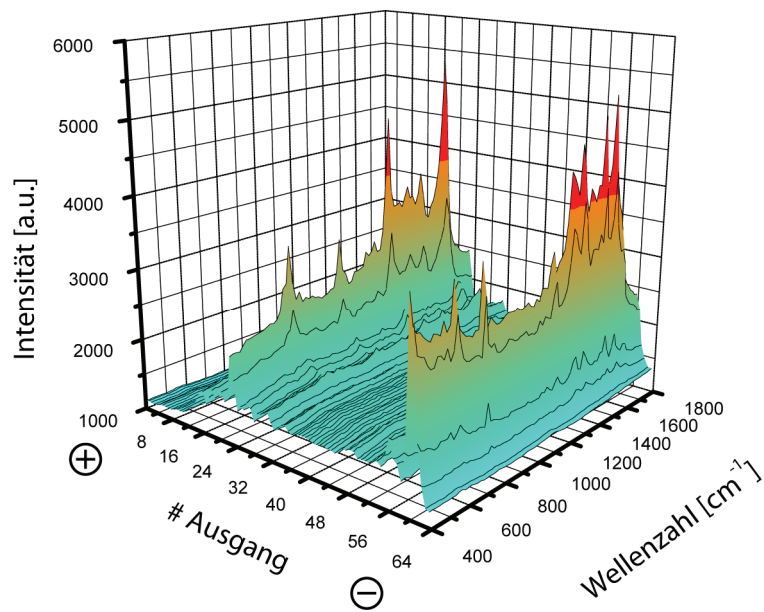


Abbildung 5.11: Übersicht über die gemessenen SERS-Spektren. Eine Spannung von 210 Volt lag am Chip an. Ein Signalanstieg kann in den Kanälen 23 und 24 beobachtet werden. Zusätzlich gibt es in den Kanälen 61 und 62 noch sehr intensive Spektren.

Zusätzlich war eine Intensitätszunahme der SERS-Spektren in den Ausgangskanälen 61 und 62 messbar. Vergleicht man die Spektren der Kanäle 61 und 62 mit den Spektren der Kanäle 23 und 24, so erkennt man, dass diese Spektren nicht identisch sind. Die Spektren in den Kanälen 61 und 62 sind definitiv keine Myoglobin-Spektren. Um die Ursache dieser ungewollten Spektren herauszufinden, wurden die Ausgangskanäle 61 bis 64 mit Hilfe eines Mikroskops untersucht (Abbildung 5.12).

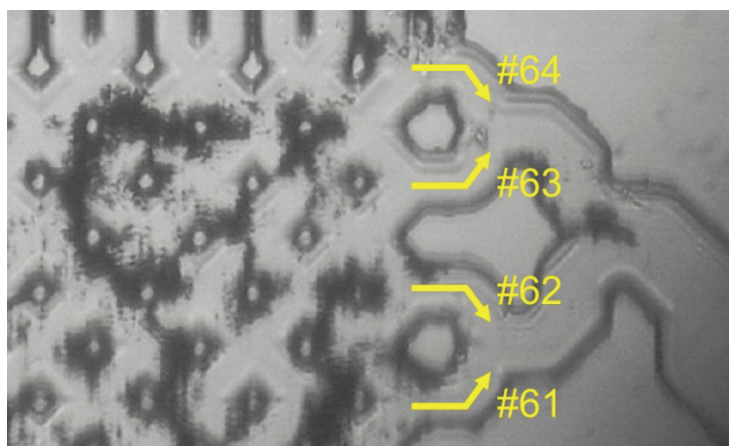


Abbildung 5.12: Mikroskopische Aufnahme der Ausgangskanäle 61 bis 64. Vor den Kanälen haben sich Kolloidklumpen gebildet.

Man erkennt, dass sich kurz vor den Ausgangskanälen 61 und 62 Silberkolloidklumpen an den Pfosten in der Kammer gebildet haben. Diese Klumpen erzeugen während der Messung die ungewollten Spektren. Auch in Abbildung 5.10 sind in den Kanälen 61 und 62 schon erste Anzeichen der Fremdspektren zu erkennen. Je länger das Experiment dauert, desto größer werden die Kolloidklumpen und desto stärker wird das gemessene Raman-Signal an diesen Stellen.

Die Detektion einer Fokussierung und Konzentrierung des Myoglobins nach Anlegen der Spannung war deutlich in den Ausgangskanälen 23 und 24 zu erkennen. Vergleicht man die Spektren, welche im Kanal 23 ohne Spannung und mit Spannung gemessen wurden, so wird die Konzentrierung deutlich sichtbar (Abbildung 5.13).

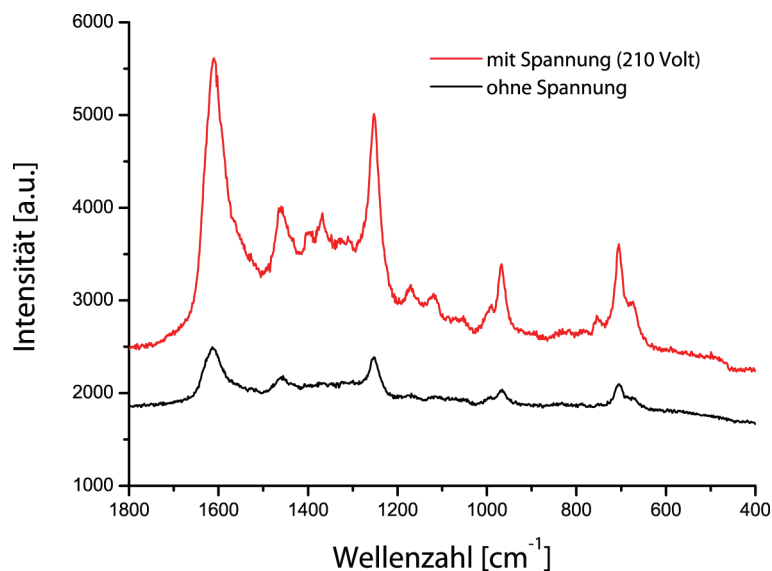


Abbildung 5.13: SERS-Spektren, gemessen im Ausgangskanal 23. Das schwarze Spektrum wurde ohne angelegte Spannung am Chip gemessen, das rote Spektrum wurde während der ITP-Fokussierung des Myoglobins im Chip gemessen. Die Konzentrierung ist durch die Intensitätszunahme des roten Spektrums deutlich zu erkennen.

Beide Spektren weisen die gleichen Spektralbanden auf. Die Ausprägung der Banden ist aber im roten Spektrum deutlich besser, was auf eine höhere Molekülanzahl während der Messung, und damit auf eine Konzentrierung, hindeutet. Der Verstärkungsfaktor zwischen den beiden Spektren in Abbildung 5.13 beträgt etwa fünf. Da mit der Raman-Spektroskopie aber keine, beziehungsweise nur in sehr speziellen Fällen quantitative Aussagen getroffen werden können [152], ist nicht feststellbar, wie stark die wirkliche ITP-Konzentrierung im Chip war.

5.7 Verhalten der Kolloide im Chip

In den Fokussierungsversuchen (Abschnitt 5.4 und 5.6) hat sich gezeigt, dass Silberkolloide im Laufe des Experiments Klumpen bilden. Da die Dauer der oben genannten Experimente nur etwa eine Stunde betrug, waren die Kolloidklumpen noch relativ klein. Für eine länger andauernde Anwendung ist aber zu befürchten, dass die Kolloidklumpen den Chip komplett verstopfen und eine weitere Benutzung unmöglich machen könnten. Zwar besteht die Möglichkeit, den Chip nach dessen Benutzung mit Salpetersäure zu spülen und so die Silberkolloidklumpen aufzulösen, allerdings eignet sich diese Methode nicht für länger andauernde Experimente, sondern vielmehr, um den Chip für eine Wiederverwendung zu reinigen.

In Abbildung 5.12 ist zu sehen, dass sich die Kolloidklumpen an den Pfosten in der Kammer bildeten. Mit fortschreitender Dauer des Experiments lagerten sich immer mehr Kolloide an die Pfosten an, bis irgendwann „Kolloidbrücken“ zwischen den Pfosten entstanden waren. Dieses ist ebenfalls in Abbildung 5.12 zu erkennen. Die Anlagerung an die Pfosten war höchstwahrscheinlich hydrodynamisch bedingt. Simulationen haben gezeigt, dass sich vor und nach den Pfosten Zonen mit einer geringeren Flussgeschwindigkeit ausbilden. Gelangt ein Kolloid in eine solche Zone wird es langsamer und lagert sich dann auf den Kammerboden oder an den Pfosten in der Kammer ab. Um diesen Effekt zu vermeiden, wurde ein Chip hergestellt, bei dem die Pfostenanzahl in der Trennkammer drastisch reduziert wurde. Anstatt der üblichen 31.104 Pfosten befanden sich nur 27 Pfosten in der Trennkammer. Ein kompletter Verzicht auf die Pfosten war nicht möglich, da die Trennkammer sonst während des Hochtemperaturbondens bei der Chipherstellung (siehe Kapitel 3) kollabierte. Ein weiterer Ansatz war, nicht mehr alle Flüssigkeiten im μ FFE-System mit Silberkolloiden zu mischen, sondern nur noch die Probe. Diese Kolloid-Reduzierung im System sollte auch der Klumpenbildung entgegenwirken. Dazu wurde das Eingangsdesign des Chips verändert. Anstatt zweier Eingangsreservoirs wurden drei Reservoirs benutzt. Der Kolloidstrom sollte in der Chipmitte in die Trennkammer gelangen und auf beiden Seiten von einem Pufferstrom begrenzt werden. Außerdem wurde die Flussrate von 5 μ l/min auf 10 μ l/min erhöht. Eine höhere Flussrate resultierte in einer höheren Flussgeschwindigkeit in der Trennkammer und damit in einer höheren Geschwindigkeit der Kolloide. Die höhere Geschwindigkeit sollte ebenfalls das Absetzen der Kolloide in der Trennkammer verhindern.

Um dieses Design zu testen, wurde ein hydrodynamisches Experiment gemacht. In diesem Experiment wurde auf die SERS-Detektion verzichtet, es sollte nur das Verhalten der Kolloide im Chip studiert werden. Als Probe kam eine reine Silberkolloidlösung ohne Protein zum Einsatz.

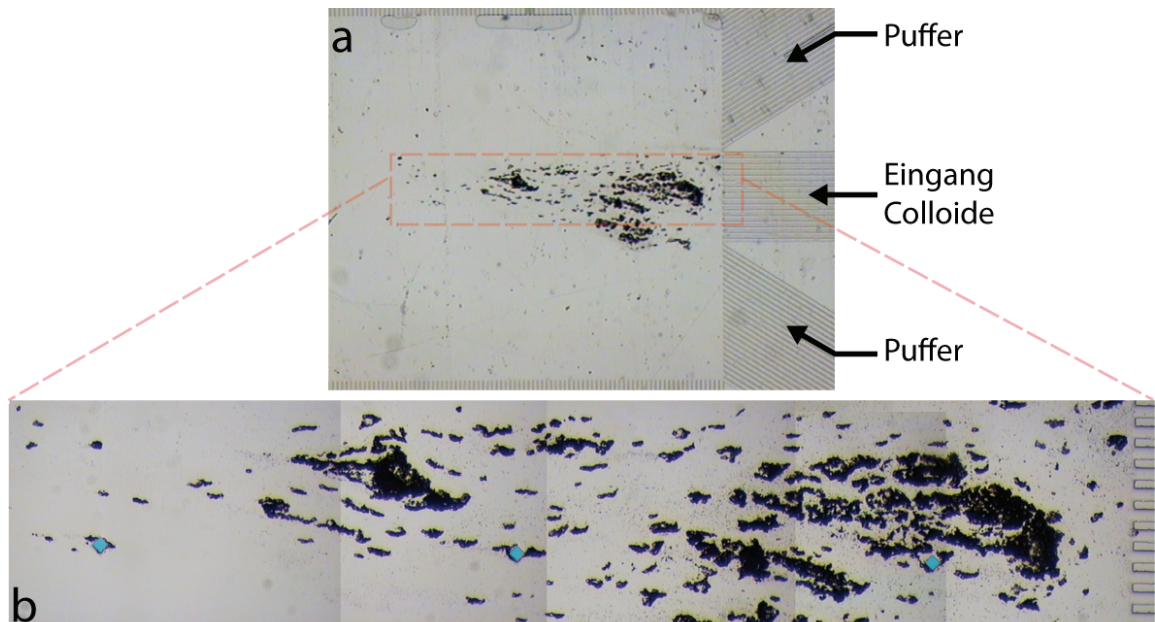


Abbildung 5.14: Trotz diverser Maßnahmen, um ein Absetzen und Verklumpen der Kolloide in der Kammer zu vermeiden (höhere Flussrate, weniger Pforten in der Trennkammer, weniger Kolloide), bildeten sich Kolloidcluster. Zur besseren Kenntlichmachung sind die Pforten in der Kammer blau markiert worden.

In Abbildung 5.14 erkennt man, dass sich trotz der genannten Veränderungen Kolloidklumpen in der Trennkammer bildeten. Allerdings bildeten sich hier die Ablagerungen kurz nach den Eingängen in die Trennkammer und nicht an den Ausgängen. In der Vergrößerung in Abbildung 5.14 lässt sich erkennen, dass sich die Kolloide nicht an den verbleibenden Pforten festgesetzt, sondern sich in der leeren Kammer abgesetzt haben. Simulationen haben gezeigt, dass die Geschwindigkeit der Kolloide in den Eingangskanälen deutlich höher ist als in der Trennkammer. In Abbildung 5.15 ist das simulierte Geschwindigkeitsprofil im Eingangsbereich der Trennkammer dargestellt. Kurz nach den Eingangskanälen für die Kolloide gibt es eine dreieckige Zone, in der eine sehr niedrige Flussgeschwindigkeit herrscht.

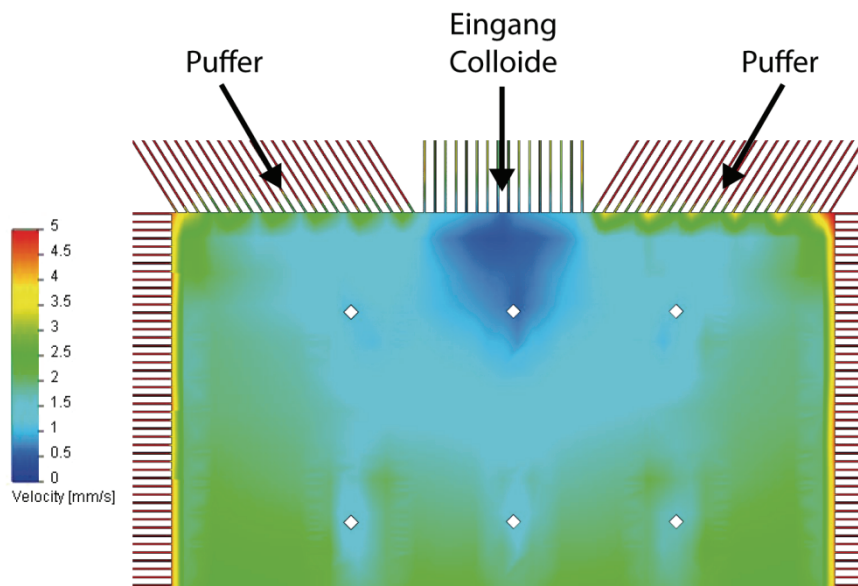


Abbildung 5.15: Simulationsergebnisse des Eingangsbereiches der Trennkammer. Vor den Eingangskanälen ist eine Zone niedriger Geschwindigkeit zu erkennen.

Vergleicht man die Simulationsergebnisse mit der im Experiment beobachteten Ablagerung der Kolloide in der Trennkammer (Abbildung 5.14), so zeigt sich, dass sich die Kolloide im Experiment ebenfalls in einer dreieckigen Zone nach den Eingangskanälen ablagern. Abgesehen von den Kolloidanlagerungen im Eingangsbereich waren in der Trennkammer aber keine weiteren Kolloidklumpen entstanden.

Die Experimente haben gezeigt, dass eine Reduzierung der Pfostenanzahl in der Kammer wahrscheinlich der Kolloidklumpenbildung entgegenwirken kann. Die Kolloidansammlungen in Abbildung 5.14 sind nur im Eingangsbereich der Trennkammer zu beobachten, der Rest der Kammer ist klumpenfrei. Um Ablagerungen im Chip komplett zu vermeiden, müssen aber Änderungen am Chipdesign gemacht werden. Die Kolloide müssen bei Ihrer Wanderung durch den Chip immer in Bewegung bleiben. Gelangen sie irgendwo auf ihrem Weg durch die Trennkammer in eine Zone mit keiner oder sehr niedriger Flussgeschwindigkeit, lagern sie sich an der Oberfläche an. Solche Zonen sind zum Beispiel vor und nach den Pfosten in der Kammer und, in dem in diesem Abschnitt beschriebenen Design, am Kammereingang zu finden.

5.8 Optimierungsmöglichkeiten

Aus den durchgeführten Experimenten wird klar, dass die Silberkolloide und ihre ungewollten Ablagerungen in der Trennkammer die Hauptprobleme während der μ FFE-SERS-Experimente darstellten. Erste Optimierungen (Abschnitt 5.7) brachten nicht den gewünschten Erfolg. Eine Überarbeitung des Chipdesigns ist wahrscheinlich nötig, um das Problem lösen zu können. Ein anderer Ansatz zur Optimierung des Systems ist der Verzicht auf Silberkolloide in den Flüssigkeiten. Stattdessen werden in der Raman-Spektroskopie auch stationäre Silberinseln zur Signalverstärkung verwendet [153-155]. Dazu wird Silber mit einer Dicke von circa 10 nm auf eine Oberfläche aufgedampft. Danach wird die Oberfläche auf 200 °C aufgeheizt. Dabei wird das Silber auf der Oberfläche flüssig und bildet Silberinseln. Durch die Inselbildung wird die ganze Oberfläche inhomogen und die zu untersuchenden Moleküle können sich besser an das Silber anhaften. Sobald ein Molekül mit dem Silberinseln in Kontakt kommt, verstärkt das Silber den Raman-Effekt, so dass SERS-Experimente auch ohne Silberkolloide möglich sind. Die Verwendung von Silberinseln in μ FFE-Chips bringt allerdings einige Probleme, hauptsächlich während der Chipherstellung, mit sich. Um in jedem Ausgangskanal SERS-Messungen durchführen zu können, muss in jedem Kanal eine Detektionsfläche aus Silber aufgedampft werden. Dieses ortsgenaue Bedampfen der Silberflächen lässt sich durch eine Aufdampfmaske realisieren. Das Temperieren zur Inselbildung stellt ebenfalls kein Problem dar. Allerdings gibt es im weiteren Herstellungsverlauf zwei große Probleme. Das erste Problem ergibt sich beim Hochtemperaturbonden der beiden Glasplatten. Bei Temperaturen von über 500 °C verdampfen die dünnen Silberschichten. Damit ist das Hochtemperaturbonden nicht dazu geeignet, um die beiden Glasplatten des Chips dauerhaft miteinander zu verbinden. Um dieses Problem zu lösen, wurde versucht, die beiden Glasplatten mittels Klebtechnik miteinander zu verbinden (siehe Kapitel 3). Das zweite Problem ist die Oxidation der dünnen Silberschichten. Normalerweise werden SERS-Substrate mit besagten dünnen Silberschichten in einer Argon-Schutzgasatmosphäre gelagert, um eine Oxidation des Silbers zu verhindern. Da eine μ FFE-Chipherstellung in einer Schutzgasatmosphäre aufgrund der vielen Prozessschritte nahezu unmöglich ist, wurde in Erwägung gezogen, anstatt des Silbers Gold zu verwenden. Gold ist ebenfalls ein Material, was eine Verstärkung des Raman-Signals bewirkt. Der Verstärkungsfaktor von SERS-Messung mit Goldsubstraten ist

allerdings etwa 50-mal schlechter als SERS-Messungen mit Silbersubstraten [146]. Außerdem müssen für SERS-Messungen mit Gold einige Parameter des Raman-Systems verändert werden. Absorbtionsmessungen haben gezeigt, dass das Absorptionsmaximum von 9 nm dicken Gold bei einer Wellenlänge von etwa 900 nm liegt (Abbildung 5.16).

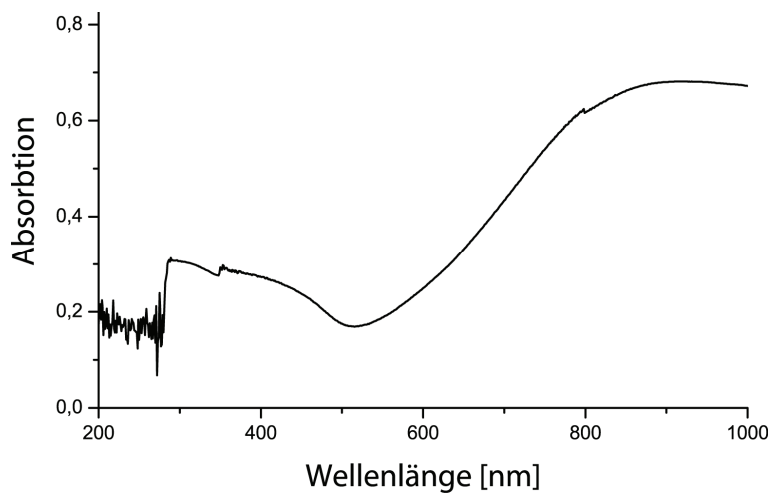


Abbildung 5.16: Bestimmung des Absorptionsmaximums von 9 nm dicken Gold auf einer Glasoberfläche. Das Maximum liegt bei einer Wellenlänge von etwa 900 nm.

Das bedeutet, dass ein Laser mit einer solchen Wellenlänge als Anregungslaser verwendet werden sollte, um einen möglichst großen Energieübertrag in das Molekül zu gewährleisten. Dafür müssen aber neben einem neuen Laser auch diverse Filter im Raman-System verändert und neu justiert werden. In dieser Arbeit wurden bereits erste Experimente mit Gold als SERS-Material in einem Mikrokanal durchgeführt, allerdings konnte bisher keine Verstärkung des Raman-Signals aufgrund des Goldes gemessen werden. Hier besteht also weiterhin Optimierungsbedarf, um eine SERS-Detektion in μ FFE-Chips ohne die Verwendung von Silberkolloiden zu ermöglichen.

5.9 μ FFE-SERS – Zusammenfassung und Ausblick

Die Experimente und Ergebnisse, die in diesem Kapitel präsentiert wurden, haben gezeigt, dass eine markerfreie Detektion mit Hilfe der SERS-Technik in μ FFE-Systemen möglich ist. Eine Fokussierung des Myoglobins konnte durch SERS-Spektren eindeutig detektiert werden. Die SERS-Detektion eignet sich sehr gut als Online-Detektionsmöglichkeit, da die Proben für die Detektion nicht verändert werden müssen und auch kein direkter Kontakt mit den Flüssigkeiten im μ FFE-System nötig ist. Eine Marker-Entfernung von den Probemolekülen nach der Detektion entfällt, so dass die Proben nach Durchlaufen des μ FFE-Systems direkt weiterverarbeitet werden können.

Allerdings hat sich gezeigt, dass die Verwendung von Silberkolloiden als SERS-Substrat mit einigen Schwierigkeiten behaftet ist. In den Experimenten haben sich die Kolloide in der Trennkammer abgesetzt und Kolloidklumpen gebildet. Vermutlich hängt dies mit Zonen geringer Flussgeschwindigkeit und damit mit dem Chipdesign zusammen. Eine Design-Optimierung könnte hier das Problem der Klumpenbildung verringern und eventuell lösen. Ein weiterer Ansatz zur Lösung des Kolloidklumpen-Problems ist die Verwendung von stationären SERS-Substraten in den Ausgangskanälen. Damit könnte auch insgesamt auf die Silberkolloide verzichtet werden, da die Detektion dann an diesen stationären SERS-Substraten stattfinden würde. Die Verwendung von Silber als stationäres SERS-Substrat ist aber durch die benötigte Schutzgasatmosphäre sehr komplex beziehungsweise aufgrund des Herstellungsprozesses der μ FFE-Chips nahezu unmöglich. Erste Experimente mit Goldsubstraten in den Ausgangskanälen haben bisher keine Verstärkung des Raman-Signals gezeigt, allerdings stehen die Experimente hier noch ganz am Anfang.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Weiterentwicklung und Optimierung der miniaturisierten Free-Flow-Elektrophorese stand im Mittelpunkt dieser Arbeit. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Herstellung und Anwendung von miniaturisierten Free-Flow-Elektrophorese-Systemen und die Detektion in solchen Systemen gelegt.

Im Bereich der Chipherstellung wurde ein neuer Herstellungsprozess für μ FFE-Chips entwickelt. Die mit diesem Prozess hergestellten Chips ermöglichten einen überdruckinduzierten Flüssigkeitstransport durch den Chip und besaßen mehrere, voneinander getrennte Ausgangskanäle.

Vor der Weiterentwicklung des Herstellungsprozesses besaß ein μ FFE-Chip nur einen Ausgangskanal. An diesem Ausgang wurde durch eine Pumpe ein Unterdruck erzeugt und so die Flüssigkeit durch den Chip transportiert. Vorteil dieser Methode war, dass der ganze Chip mit nur einem Pumpensystem betrieben werden konnte. Allerdings blockierte die Pumpe den Chipausgang, so dass es nicht möglich war, getrennte Proben einzeln aus dem Chip zu entnehmen. Zusätzlich wurden bei diesen Chips die in der Trennkammer getrennten Proben am Chipausgang wieder vermischt, so dass eine weitere Verwendung der im Chip getrennten Proben nicht möglich war. Eine weitere Einschränkung ergab sich aus der Tatsache, dass alle Strukturen in den μ FFE-Chips die gleiche Tiefe besaßen. Durch den Unterdruck am Chipausgang wurde nicht nur Flüssigkeit aus dem Eingangsreservoir in die Trennkammer gesaugt, auch aus den Seitenreservoirien wurde durch die Seitenkanäle Flüssigkeit in die Trennkammer transportiert. Diese durch die Seitenkanäle in die Trennkammer einfließende Flüssigkeit „drückte“ den Probenstrom in der Kammermitte zusammen. Dadurch ergab sich eine hydrodynamische Fokussierung der Probe in der Trennkammer. Experimente haben auch gezeigt, dass durch diesen Effekt die Probe verdünnt wird. Simulationen ergaben zusätzlich, dass die Flussgeschwindigkeit in der Trennkammer nicht gleichmäßig ist. Sie nimmt in Richtung Kammerausgang zu. Aufgrund der einheitlichen Strukturtiefe in den Chips war es auch nicht möglich, diese mit Hilfe von Pumpen an den Eingängen zu betreiben und so am Ausgang die getrennten Proben entnehmen zu können. Grund hierfür war, dass ein Großteil der Flüssigkeit durch die

Seitenkanäle aus der Trennkammer gedrückt wurde, selbst der Probenstrom gelangte nicht bis zu den Ausgangskanälen. Diese Tatsachen führten zur Weiterentwicklung des Chipdesign und des Herstellungsprozesses. Ziel war es, den hydrodynamischen Widerstand der Seitenkanäle soweit zu erhöhen, dass ein Chipbetrieb durch Pumpen am Chipeingang möglich war, ohne dass die Flüssigkeit die Trennkammer durch die Seitenkanäle verließ. Für PDMS-Chips wurde dazu eine Vorform mit zwei verschiedenen Strukturhöhen mit Hilfe des Multi-Layer Prozesses hergestellt und abgeformt. Im Herstellungsprozess für Glaschips wurden durch eine zusätzliche Goldschicht als Ätzmaske und einen zweiten Ätzschritt zwei verschiedene Strukturhöhen in einer Glasplatte realisiert. Dabei waren die Trennkammer und die Eingangs- und Ausgangskanäle elf Mal tiefer als die Seitenkanäle, was den hydrodynamischen Widerstand der Seitenkanäle um mehr als das 4000-fache im Vergleich zum den ersten μ FFE-Chips ansteigen ließ. Mit diesen Chips war es möglich, Pumpen am Eingang zum Flüssigkeitstransport zu nutzen und mehrere, getrennte Ausgänge zu integrieren, so dass eine separate Entnahme der getrennten Proben aus dem Chip möglich war. Experimente und Simulationen zeigten, dass weder ein hydrodynamisches Fokussieren, noch eine Probenverdünnung in diesen Chips auftrat. Auch die Flussgeschwindigkeit in der Trennkammer war nun gleichmäßig. Allerdings wurde durch die geringe Strukturhöhe und dem daraus stark angestiegenen elektrischen Widerstand der Seitenkanäle eine etwa zehnfach höhere elektrische Spannung nötig, um ein genügend starkes elektrisches Feld zur Trennung in der Kammer zu erzeugen. Durch den hohen Widerstand der Seitenkanäle tritt auch eine erhöhte Wärmezeugung aufgrund von Joulescher Wärme auf. Durch weitere Designoptimierungen sollten sich diese Effekte aber minimieren lassen.

Durch die Weiterentwicklung des Fertigungsprozesses ist nun die Herstellung von μ FFE-Systemen möglich, die mit Überdruck betrieben werden können, keine hydrodynamische Fokussierung erzeugen und die es ermöglichen, die im Chip getrennten Proben separat, ohne nachträgliche Vermischung aus dem Chip zu entnehmen und weiterzuverwenden.

Im Bereich der Anwendungsentwicklung wurde erstmals das Temperature Gradient Focusing (TGF) in Kombination mit der miniaturisierten Free-Flow Elektrophorese angewendet. Das TGF ist ein für die Kapillarelektrophorese (CE) entwickelter

Trennmodus. In der CE wird er als Alternative zum isoelektrischen Fokussieren (IEF) verwendet, da es mit Hilfe des TGF möglich ist, auch Analyte ohne isoelektrischen Punkt zu trennen und zu fokussieren. Beim TGF wird zusätzlich zum elektrischen Feld auch ein Temperaturgradient an die Kapillare angelegt. Dadurch verändert sich die Leitfähigkeit des temperaturabhängigen Puffers, so dass es über die Kapillare zu einem Gradienten der elektrophoretischen Mobilität der Analyte kommt. An einer Stelle in der Kapillare entspricht die aktuelle elektrophoretische Geschwindigkeit der Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses, der in die entgegengesetzte Richtung wirkt. Beide Geschwindigkeiten heben sich auf, so dass die resultierende Analytgeschwindigkeit null beträgt. Der Analyt wird an dieser Stelle fokussiert. Um diese Methode erfolgreich im Bereich der μ FFE anzuwenden, wurde ein spezieller Aufbau zur Erzeugung des Temperaturgradienten in einem μ FFE-Chip entwickelt und charakterisiert. Auch die Temperaturabhängigkeit von Fluoreszenzfarbstoffen wurde untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei allen untersuchten Farbstoffen die Fluoreszenzintensität mit steigender Temperatur abnahm. Mit Hilfe von Thermometrie erfolgte die experimentelle Messung des Temperaturgradienten innerhalb der Trennkammer. Um die Anwendbarkeit und Stabilität des TGF auch bei höheren Flussraten zu untersuchen, wurde die Stabilität des Temperaturgradienten in Abhängigkeit von der Flussrate in der Trennkammer bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass der Gradient bis zu einer Flussrate von 100 μ l/min stabil ist, erst bei höheren Flussraten bildete sich der Temperaturgradient nicht mehr vollständig in der Flüssigkeit in der Trennkammer aus. Da die μ FFE-Chips normalerweise bei Flussraten von 5 μ l/min bis 10 μ l/min betrieben wurden, konnte von einem stabilen Temperaturgradienten in der Trennkammer ausgegangen werden. Mit Hilfe des FF-TGF wurden dann Farbstoffe und fluoreszenzmarkierte Proteine getrennt und fokussiert. Es zeigte sich, dass durch Anlegen des Temperaturgradienten an den Chip die Fokussierung verstärkt werden konnte. Allerdings war durch die Temperaturabhängigkeit der Farbstoffe eine nachträgliche Korrektur der Ergebnisse nötig.

Durch die Adaption des TGF für die Free-Flow Elektrophorese ist ein weiterer Trennmodus für μ FFE-Systeme entwickelt worden, der eine Alternative zu bereits bekannten Trennmodi bietet und die Einsatzmöglichkeiten der miniaturisierten Free-Flow Elektrophorese erweitert.

Neben der Herstellung und der Anwendung von μ FFE-Systemen wurde auch die Detektion in diesen Systemen weiterentwickelt. Bisher ist die Fluoreszenzdetektion die Standarddetektionsmethode in μ FFE-Systemen. Durch das Labeling mit dem Fluoreszenzmarkern werden aber die Eigenschaften der Probenmoleküle verändert, zum Beispiel Molekülgröße oder Molekülladung. Diese Veränderungen können die Free-Flow Elektrophoretische Trennung beeinflussen. Die Trennung erfolgt nicht mehr nur aufgrund der ursprünglichen Moleküleigenschaften. Um diese Probleme zu vermeiden, wurde durch Verwendung der Ramanspektroskopie eine markerfreie Detektion für μ FFE-Systeme entwickelt. In der Ramanspektroskopie wird die inelastische Streuung eines zuvor angeregten Moleküls gemessen. Diese Streuung ist mit einem spektroskopischen Fingerabdruck vergleichbar und ermöglicht eine qualitative Detektion. Damit mit dem normalerweise sehr schwachen Raman-Effekt eine Detektion möglich ist, muss das Signal verstärkt werden. Dazu bringt man raue metallische Oberflächen in die Nähe des zu detektierenden Moleküls. Diese oberflächeninduzierte Verstärkung wird Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) genannt. Um nun SERS als Detektionsmethode für μ FFE-Systeme anwenden zu können, mussten einige Vorexperimente gemacht werden. Zum einen musste die Größe der Collide an die Kanalgröße im Chip angepasst werden. Durch Zugabe von Ascorbinsäure war es möglich, Kolloide mit einem Durchmesser zwischen 5 μ m und 10 μ m herzustellen. Damit Silberkolloide überhaupt in einem Free-Flow Elektrophoretischen System verwendet werden konnten, durften sie von dem elektrischen Feld in der Trennkammer nicht beeinflusst werden. Experimente zeigten, dass dies nicht der Fall ist. Zusätzlich wurden die Laserleistung des Anregungslasers und die Integrationszeit während der Messung optimiert. Zur Detektion wurden an den Ausgangskanälen des Chips nacheinander SERS-Messungen durchgeführt. Die Detektion der Fokussierung von Myoglobin war deutlich anhand der SERS-Spektren möglich. Allerdings lagerten sich die Kolloide innerhalb der Trennkammer ab und bildeten Klumpen.

Durch die Kombination der μ FFE-Chips mit der SERS-Detektion ist eine markerfreie, qualitative Detektionsmethode für miniaturisierte Free-Flow Elektrophorese Systeme entwickelt worden. Die SERS-Detektion eignet sich auch zur Online-Detektion während einer Trennung. So wäre es möglich, direkt zu bestimmen, welcher Analyt durch welchen Ausgangskanal den Chip nach der Trennung verlässt.

Trotz der erwähnten Weiterentwicklungen besteht allerdings immer noch Optimierungsbedarf. Im Bereich der Herstellung ist es nötig, den elektrischen Widerstand der flachen Seitenkanäle zu senken. Gleichzeitig muss aber der nötige hydrodynamische Widerstand beibehalten werden, um auch weiterhin die Vorteile eines druckbetrieben μ FFE-Chips nutzen zu können. Im Bereich der SERS-Detektion muss die Ablagerung der Silberkolloide in der Trennkammer verhindert werden. Hierzu gab es in dieser Arbeit bereits erste Experimente. Dabei wurde komplett auf Silberkolloide verzichtet. Die SERS-Detektion sollte an Nanometer dicken, metallischen Inseln in den Ausgangskanälen stattfinden. Allerdings konnten bis jetzt nur einige Vorexperimente realisiert werden. Zusätzlich wurden erste Schritte unternommen, um die Anzahl der Ausgangskanäle eines μ FFE-Chips zu erhöhen. Chips mit 64 Ausgangskanälen, jeder einzeln über ein separates Ausgangsloch kontaktierbar, wurden bereits hergestellt. Aufgrund des geringen Abstandes zwischen den einzelnen Ausgangslöchern ist es allerdings sehr schwierig, jedes dieser Löcher separat zu kontaktieren. Die Modifizierung und Anpassung eines am ISAS – Institute for Analytical Sciences entwickeltes, wiederverwendbares Chipinterface [156] stellt hier eine vielversprechende Möglichkeit dar.

Literaturverzeichnis

- [1] Landesinitiative Life Sciences Niedersachsen – BioRegion, Life Science-Report 2009,2009.
- [2] F. Lottspeich, H. Zorbas, *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, 1998.
- [3] E. Rojas, M. C. Lopez, M. Valverde, "Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications", *Journal of Chromatography B* 1999, 722, 225-254.
- [4] M. Barany, K. Barany, C. S. Giometti, "Gel electrophoresis for studying biological function", *Analytica Chimica Acta* 1998, 372, 33-66.
- [5] P. G. Righetti, C. Gelfi, "Electrophoresis gel media: the state of the art", *Journal of Chromatography B* 1997, 699, 63-75.
- [6] V. Dolnik, "Capillary Gel-Electrophoresis", *Journal of Microcolumn Separations* 1994, 6, 315-330.
- [7] B. H. Zimm, "Mechanism of Gel-Electrophoresis of DNA - Unexpected Findings", *Current Opinion in Structural Biology* 1993, 3, 373-376.
- [8] D. H. L. Bishop, J. Claybroo, S. Spiegel, "Electrophoretic Separation of Viral Nucleic Acids on Polyacrylamide Gels", *Journal of Molecular Biology* 1967, 26, 373.
- [9] L. H. H. Silvertand, J. S. Torano, W. P. van Bennekom, G. J. de Jong, "Recent developments in capillary isoelectric focusing", *Journal of Chromatography A* 2008, 1204, 157-170.
- [10] M. Vlckova, M. A. Schwarz, "Microchip isoelectric focusing applications", *Chimia* 2008, 62, 244-248.
- [11] P. G. Righetti, A. Bossi, "Isoelectric focusing of proteins and peptides in gel slabs and in capillaries", *Analytica Chimica Acta* 1998, 372, 1-19.
- [12] P. G. Righetti, C. Gelfi, M. Conti, "Current trends in capillary isoelectric focusing of proteins", *Journal of Chromatography B* 1997, 699, 91-104.
- [13] P. G. Righetti, A. Bossi, C. Gelfi, "Capillary isoelectric focusing and isoelectric buffers: An evolving scenario", *Journal of Capillary Electrophoresis* 1997, 4, 47-59.
- [14] P. G. Righetti, E. Gianazza, K. Ek, "New Developments in Isoelectric-Focusing", *Journal of Chromatography* 1980, 184, 415-456.
- [15] O. Vesterberg, "Isoelectric-Focusing - Review of Analytical Techniques and Applications", *American Laboratory* 1978, 10, 13-18.
- [16] W. Grassmann, K. Hannig, "Über ein Verfahren zur Stofftrennung durch Kataphorese", *Angewandte Chemie* 1950, 7, 170.
- [17] K. Hannig, "Die trägerfreie kontinuierliche Elektrophorese und ihre Anwendung", *Zeitschrift für Analytische Chemie* 1960, 181, 244-254.

- [18] M. Poggel, T. Melin, "Free-flow zone electrophoresis: A novel approach and scale-up for preparative protein separation", *Electrophoresis* 2001, 22, 1008–1015.
- [19] M. Poggel, T. Melin, S. Treutlein, "Band-broadening effects in preparative free-flow zone electrophoresis", *Electrophoresis* 2002, 23, 2252–2258.
- [20] K. Hannig, "Neue Möglichkeiten zur Trennung von Makromolekülen mit Hilfe der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese", *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere* 1968, 227, 37-41.
- [21] Y. Wang, W. S. Hancock, G. Weber, C. Eckerskorn, D. Palmer-Toy, "Free flow electrophoresis coupled with liquid chromatography–mass spectrometry for a proteomic study of the human cell line (K562/CR3)", *Journal of Chromatography A* 2004, 269–278.
- [22] C. Obermaier, V. Jankowski, C. Schmutzler, J. Bauer, R. Wildgruber, M. Infanger, J. Köhrle, *et al.*, "Free-flow isoelectric focusing of proteins remaining in cell fragments following sonication of thyroid carcinoma cells", *Electrophoresis* 2005, 26, 2109–2116.
- [23] R. R. Peterson, D. E. Cliffl, "Continuous Free-Flow Electrophoresis of Water-Soluble Monolayer-Protected Clusters", *Analytical Chemistry* 2005, 77, 4348-4353.
- [24] T. Akiba, A. Nishi, M. Takaoki, H. Matsumiya, F. Tomita, R. Usami, S. Nagaoka, "Separation of bacterial cells by free flow electrophoresis under microgravity: a result of the SpaceLab-Japan project on Space Shuttle flight STS-47", *Acta Astronautica* 1995, 36, 177-181.
- [25] K. Hannig, J. Bauer, "Free flow electrophoresis in Space Shuttle program (BIOTEX)", *Advances in Space Research* 1989, 9, 91-96.
- [26] A. van den Berg, T. S. J. Lammerink, *Microsystem Technology in Chemistry and Life Science*, Springer-Verlag Berlin, Berlin 33 1998, pp. 21-49.
- [27] T. S. Sammarco, B. N. Johnson, D. T. Burke, C. H. Mastrangelo, M. A. Burns, "A microfluidic pumping and reaction system for chemical analysis devices", *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 1996, 211, 219.
- [28] S. Shoji, M. Esashi, "Microflow Devices and Systems", *Journal of Micromechanics and Microengineering* 1994, 4, 157-171.
- [29] W. K. Schomburg, J. Vollmer, B. Bustgens, J. Fahrenberg, H. Hein, W. Menz, "Microfluidic Components in Liga Technique", *Journal of Micromechanics and Microengineering* 1994, 4, 186-191.
- [30] M. Elwenspoek, T. S. J. Lammerink, R. Miyake, J. H. J. Fluitman, "Towards Integrated Microliquid Handling Systems", *Journal of Micromechanics and Microengineering* 1994, 4, 227-245.
- [31] D. Janasek, J. Franzke, A. Manz, "Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems", *Nature* 2006, 442, 374-380.
- [32] A. Manz, N. Graber, H. M. Widmer, "Miniaturized Total Chemical Analysis Systems: a Novel Concept for Chemical Sensing", *Sensors and Actuators B* 1990, 1, 244-248.

- [33] D. E. Raymond, A. Manz, H. M. Widmer, "Continuous Sample Pretreatment Using a Free-Flow Electrophoresis Device Integrated onto a Silicon Chip", *Analytical Chemistry* 1994, 66, 2858-2865.
- [34] D. Kohlheyer, J. C. T. Eijkel, S. Schlautmann, A. v. d. Berg, R. B. M. Schasfoort, "Microfluidic High-Resolution Free-Flow Isoelectric Focusing", *Analytical Chemistry* 2007, 79, 8190-8198.
- [35] B. R. Fonslow, M. T. Bowser, "Optimizing Band Width and Resolution in Micro-Free Flow Electrophoresis", *Analytical Chemistry* 2006, 78, 8236-8244.
- [36] B. R. Fonslow, M. T. Bowser, "Free-Flow Electrophoresis on an Anodic Bonded Glass Microchip", *Analytical Chemistry* 2005, 77, 5706-5710.
- [37] R. T. Turgeon, M. T. Bowser, "Micro free-flow electrophoresis: theory and applications", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2009, 394, 187-198.
- [38] D. Kohlheyer, J. C. T. Eijkel, A. v. d. Berg, R. B. M. Schasfoort, "Miniaturizing free-flow electrophoresis – a critical review", *Electrophoresis* 2008, 29, 977-993.
- [39] M. Becker, A. Mansouri, C. Beilein, D. Janasek, "Temperature Gradient Focusing in Miniaturized Free-Flow Electrophoresis Devices", *Electrophoresis* 2009, doi:10.1002/elps.200900359.
- [40] H. Lu, S. Gaudet, M. A. Schmidt, K. F. Jensen, "A Microfabricated Device for Subcellular Organelle Sorting", *Analytical Chemistry* 2004, 5705-5712.
- [41] C.-X. Zhang, A. Manz, "High-Speed Free-Flow Electrophoresis on Chip", *Analytical Chemistry* 2003, 75, 5759-5766.
- [42] Y. Xu, C.-X. Zhang, D. Janasek, A. Manz, "Sub-second isoelectric focusing in free flow using a microfluidic device", *Lab on a Chip* 2003, 3, 224-227.
- [43] R. T. Turgeon, M. T. Bowser, "Improving sensitivity in micro-free flow electrophoresis using signal averaging", *Electrophoresis* 2009, 30, 1342-1348.
- [44] V. N. Stone, S. J. Baldock, L. A. Croasdell, Leonard A. Dillon, P. R. Fielden, N. J. Goddard, C. L. P. Thomas, *et al.*, "Free flow isotachopheresis in an injection moulded miniaturised separation chamber with integrated electrodes", *Journal of Chromatography A* 2007, 1155, 199-205.
- [45] D. Kohlheyer, G. A. J. Besselink, S. Schlautmann, R. B. M. Schasfoort, "Free-flow zone electrophoresis and isoelectric focusing using a microfabricated glass device with ion permeable membranes", *Lab on a Chip* 2006, 6, 374-380.
- [46] D. Janasek, M. Schilling, J. Franzke, A. Manz, "Isotachopheresis in Free-Flow Using a Miniaturized Device", *Analytical Chemistry* 2006, 78, 3815-3819.
- [47] H. Kobayashi, K. Shimamura, T. Akaida, K. Sakano, N. Tajima, J. Funazaki, H. Suzuki, *et al.*, "Free-flow electrophoresis in a microfabricated chamber with a micromodule fraction separator Continuous separation of proteins", *Journal of Chromatography A* 2003, 990, 169-178.

- [48] M. Becker, C. Budich, V. Deckert, D. Janasek, "Isotachophoretic free-flow electrophoretic focusing and SERS detection of myoglobin inside a miniaturized device", *Analyst* 2009, 134, 38-40.
- [49] J. W. Albrecht, J. El-Ali, K. F. Jensen, "Cascaded free-flow isoelectric focusing for improved focusing speed and resolution", *Analytical Chemistry* 2007, 79, 9364-9371.
- [50] J. W. Albrecht, K. F. Jensen, "Micro free-flow IEF enhanced by active cooling and functionalized gels", *Electrophoresis* 2006, 27, 4960-4969
- [51] D. P. d. Jesus, L. Blanes, C. L. d. Lago, "Microchip free-flow electrophoresis on glass substrate using laser-printing toner as structural material", *Electrophoresis* 2006, 27, 4935-4942.
- [52] B. R. Fonslow, V. H. Barocas, M. T. Bowser, "Using Channel Depth To Isolate and Control Flow in a Micro Free-Flow Electrophoresis Device", *Analytical Chemistry* 2006, 78, 5369-5374.
- [53] D. Kohlheyer, J. C. T. Eijkel, S. Schlautmann, A. v. d. Berg, R. B. M. Schasfoort, "Bubble-free operation of a microfluidic free-flow electrophoresis chip with integrated Pt electrodes", *Analytical Chemistry* 2008, 80, 4111-4118.
- [54] M. C. Roman, P. R. Brown, "Free-Flow Electrophoresis", *Analytical Chemistry* 1994, 66, 86-94.
- [55] D. Bottenus, C. F. Ivory, "On-Line Optical Fiber Detection in a Preparative Free-Flow Electrofocusing Apparatus", *Biotechnology Progress* 2006, 22, 842-846.
- [56] W. K. M. Sanganza, T. H. Ridgway, A. M. Stalcup, C. J. Seliskar, "An online fiber-optic UV-visible detector for continuous free-flow electrophoresis", *Electrophoresis* 2005, 26, 4270-4276.
- [57] D. Ross, L. E. Locascio, "Microfluidic Temperature Gradient Focusing", *Analytical Chemistry* 2002, 74, 2556-2564.
- [58] P. S. Dittrich, K. Tachikawa, A. Manz, "Micro total analysis systems. Latest advancements and trends", *Analytical Chemistry* 2006, 78, 3887-3907.
- [59] J. West, M. Becker, S. Tombrink, A. Manz, "Micro total analysis systems: Latest achievements", *Analytical Chemistry* 2008, 80, 4403-4419.
- [60] M. Ferrari, L. Cremonesi, P. Bonini, S. Stenirri, B. Foglieni, "Molecular diagnostics by microelectronic microchips", *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2005, 5, 183-192.
- [61] U. Hilleringmann, *Silizium-Halbleitertechnologie*, Vieweg + Teubner Verlag, 2008.
- [62] T. Tille, *Mikroelektronik*, Springer Verlag, 2005.
- [63] M. L. Kovarik, S. C. Jacobson, "Nanofluidics in Lab-on-a-Chip Devices", *Analytical Chemistry* 2009, 81, 7133-7140.
- [64] X. C. Xuan, "Ion separation in nanofluidics", *Electrophoresis* 2008, 29, 3737-3743.

- [65] R. B. Schoch, J. Y. Han, P. Renaud, "Transport phenomena in nanofluidics", *Reviews of Modern Physics* 2008, 80, 839-883.
- [66] D. Ho, D. Garcia, C. M. Ho, "Nanomanufacturing and characterization modalities for bio-nano-informatics systems", *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2006, 6, 875-891.
- [67] Hightech-Strategie des Bundesministeriums für Bildung und Forschung, <http://www.bmbf.de/de/5701.php>
- [68] Y. W. Kim, J. Y. Yoo, "Three-dimensional focusing of red blood cells in microchannel flows for bio-sensing applications", *Biosensors & Bioelectronics* 2009, 24, 3677-3682.
- [69] L. C. Jellema, T. Mey, S. Koster, E. Verpoorte, "Charge-based particle separation in microfluidic devices using combined hydrodynamic and electrokinetic effects", *Lab on a Chip* 2009, 9, 1914-1925.
- [70] G. Suarez, Y. H. Jin, J. Auerswald, S. Berchtold, H. F. Knapp, J. M. Diserens, Y. Leterrier, *et al.*, "Lab-on-a-chip for multiplexed biosensing of residual antibiotics in milk", *Lab on a Chip* 2009, 9, 1625-1630.
- [71] S. M. Kim, "Microfluidic system for electroelution of proteins from a clinical sampling strip", *Microsystem Technologies-Micro-and Nanosystems-Information Storage and Processing Systems* 2009, 15, 695-701.
- [72] S. H. Cho, J. Godin, Y. H. Lo, "Optofluidic Waveguides in Teflon AF-Coated PDMS Microfluidic Channels", *IEEE Photonics Technology Letters* 2009, 21, 1057-1059.
- [73] Y. Zhao, H. S. Zeng, "Fabricating non-photodefinable polymer microstructures for micro-total-analysis", *Sensors and Actuators B* 2009, 139, 673-681.
- [74] P. L. Laamanen, E. Blanco, R. Cela, R. Matilainen, "Improving sensitivity in simultaneous determination of copper carboxylates by nonaqueous capillary electrophoresis", *Journal of Chromatography A* 2006, 1110, 261-267.
- [75] N. E. Baryla, N. P. Toltl, "On-line preconcentration in capillary electrophoresis using monolithic methacrylate polymers", *Analyst* 2003, 128, 1009-1012.
- [76] T. Kawamata, M. Yamada, M. Yasuda, M. Seki, "Continuous and precise particle separation by electroosmotic flow control in microfluidic devices", *Electrophoresis* 2008, 29, 1423-1430.
- [77] G. Adam, P. Läger, G. Stark, *Physikalische Chemie und Biophysik*, Springer Verlag, 2009.
- [78] N. Nguyen, *Mikrofluidik - Entwurf, Herstellung und Charakterisierung*, B.G. Teubner Verlag, 2004.
- [79] M. Javanmard, A. H. Talasaz, M. Nemat-Gorgani, F. Pease, M. Ronaghi, R. W. Davis, "Electrical detection of protein biomarkers using bioactivated microfluidic channels", *Lab on a Chip* 2009, 9, 1429-1434.
- [80] D. Wei, M. J. A. Bailey, P. Andrew, T. Ryhanen, "Electrochemical biosensors at the nanoscale", *Lab on a Chip* 2009, 9, 2123-2131.

- [81] E. Rodrigues, R. A. S. Lapa, "Development of micro-flow devices by direct-milling on poly(methyl methacrylate) substrates with integrated optical detection", *Microchimica Acta* 2009, 166, 189-195.
- [82] M. Fleger, A. Neyer, "PDMS microfluidic chip with integrated waveguides for optical detection", *Microelectronic Engineering* 2006, 83, 1291-1293.
- [83] P. Hoffmann, M. Eschner, S. Fritzsche, D. Belder, "Spray Performance of Microfluidic Glass Devices with Integrated Pulled Nanoelectrospray Emitters", *Analytical Chemistry* 2009, 81, 7256-7261.
- [84] P. Hoffmann, U. Hausig, P. Schulze, D. Belder, "Microfluidic glass chips with an integrated nanospray emitter for coupling to a mass spectrometer", *Angewandte Chemie-International Edition* 2007, 46, 4913-4916.
- [85] H. Kortmann, P. Chasanis, L. M. Blank, J. Franzke, E. Y. Kenig, A. Schmid, "The Envirostat - a new bioreactor concept", *Lab on a Chip* 2009, 9, 576-585.
- [86] H. Kortmann, L. M. Blank, A. Schmid, "Single Cell Analysis Reveals Unexpected Growth Phenotype of *S. cerevisiae*", *Cytometry Part A* 2009, 75A, 130-139.
- [87] F. Kurth, C. A. Schumann, L. M. Blank, A. Schmid, A. Manz, P. S. Dittrich, "Bilayer microfluidic chip for diffusion-controlled activation of yeast species", *Journal of Chromatography A* 2008, 1206, 77-82.
- [88] D. E. Raymond, A. Manz, H. M. Widmer, "Continuous separation of high molecular weight compounds using a microliter volume free-flow electrophoresis microstructure", *Analytical Chemistry* 1996, 68, 2515-2522.
- [89] C. Czeslik, H. Seemann, R. Winter, *Basiswissen Physikalische Chemie*, Vieweg+Teubner Verlag, 2008.
- [90] P. G. Righetti, *Isoelectric Focusing: Theory, Methodology and Applications*, Elsevier Biomedical, 1983.
- [91] F. W. G. Kohlrausch, *Annual Review of Physical Chemistry* 1897, 62, 209-239.
- [92] T. Meißner, *Isotachophorese Zonenelektrophorese - Grundlagen und Anwendungsmöglichkeiten*, J&M Analytische Mess- und Regeltechnik, Aalen, 2000.
- [93] Dassault Systèmes, *SolidWorks Flow Simulation 2009 Technical Reference*, 2009.
- [94] M. Becker, U. Marggraf, D. Janasek, "Separation of proteins using a novel two-depth miniaturized free-flow electrophoresis device with multiple outlet fractionation channels", *Journal of Chromatography A* 2009, doi:10.1016/j.chroma.2009.1006.1079.
- [95] F. Völklein, T. Zetterer, *Praxiswissen Mikrosystemtechnik*, Vieweg+Teubner, 2006.
- [96] MicroChem Corp., Datenblatt Negativlack SU-8 Typ 2-25, http://www.microchem.com/products/pdf/SU8_2-25.pdf
- [97] MicroChem Corp., Datenblatt Negativlack SU-8 Typ 50-100, http://www.microchem.com/products/pdf/SU8_50-100.pdf

- [98] G. Reed, A. Knights, *Silicon Photonics: An Introduction*, Wiley & Sons, 2004.
- [99] C. A. Schumann, *Chemische Manipulation von Einzelzellen in mikrofluidischen Umgebungen*, Der andere Verlag GmbH, 2009.
- [100] J. C. McDonald, D. C. Duffy, J. R. Anderson, D. T. Chiu, H. Wu, O. J. A. Schueller, G. M. Whitesides, "Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)", *Electrophoresis* 2000, 21, 27-40.
- [101] X. D. Wang, L. J. Ge, J. J. Lu, X. J. Li, K. Q. Qiu, Y. C. Tian, S. J. Fu, *et al.*, "Fabrication of enclosed nanofluidic channels by UV cured imprinting and optimized thermal bonding of SU-8 photoresist", *Microelectronic Engineering* 2009, 86, 1347-1349.
- [102] P. Abgrall, C. Lattes, V. Conederal, X. Dollat, S. Colin, A. M. Gue, "A novel fabrication method of flexible and monolithic 3D microfluidic structures using lamination of SU-8 films", *Journal of Micromechanics and Microengineering* 2006, 16, 113-121.
- [103] B. Bilenberg, T. Nielsen, B. Clausen, A. Kristensen, "PMMA to SU-8 bonding for polymer based lab-on-a-chip systems with integrated optics", *Journal of Micromechanics and Microengineering* 2004, 14, 814-818.
- [104] Y. Pan, R. Yang, "A glass microfluidic chip adhesive bonding method at room temperature", *Journal of Micromechanics and Microengineering* 2006, 16, 2666-2672.
- [105] H. Bruus, *Theoretical Microfluidics*, Oxford University Press Inc., 2008.
- [106] M. S. Munson, G. Danger, J. G. Shackman, D. Ross, "Temperature Gradient Focusing with Field-Amplified Continuous Sample Injection for Dual-Stage Analyte Enrichment and Separation", *Analytical Chemistry* 2007, 79, 6201-6207.
- [107] D. Ross, K. M. Balss, S. J. Hoebel, B. J. Jones, C. Malliaris, W. N. Vreeland, "Scanning temperature gradient focusing for simultaneous concentration and separation of complex samples", *Proceedings of μ TAS 2005* 2005, 1022-1024.
- [108] T. Matsui, J. Franzke, A. Manz, D. Janasek, "Temperature gradient focusing in a PDMS/glass hybrid microfluidic chip", *Electrophoresis* 2007, 28, 4606-4611.
- [109] J. G. Shackman, M. S. Munson, D. Ross, "Temperature gradient focusing for microchannel separations", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007, 387, 155-158.
- [110] M. S. Munson, J. M. Meacham, L. E. Locascio, D. Ross, "Counterflow rejection of adsorbing proteins for characterization of biomolecular interactions by temperature gradient focusing", *Analytical Chemistry* 2008, 80, 172-178.
- [111] O. O. Arun, M. Ugur, "Using the pseudoperoxidase staining method in the polyacrylamid gel isoelectric focusing technique for determining the origin of meat in sausages", *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences* 1999, 23, 599-603.
- [112] A. Gorg, W. Postel, R. Westermeier, "Simple Method for Preparing Pre-Cast Polyacrylamid Gel Plates for Isoelectric-Focusing", *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung* 1977, 164, 160-162.

- [113] R. Yokoyama, Y. Iwafune, H. Kawasaki, H. Hirano, "Isoelectric focusing of high-molecular-weight protein complex under native conditions using agarose gel", *Analytical Biochemistry* 2009, 387, 60-63.
- [114] T. Hirabayashi, "Agarose isoelectric focusing for the detection of many isoforms and high molecules in muscle protein analysis", *Electrophoresis* 2000, 21, 446-451.
- [115] M. Ichimura, M. Okamoto, S. Mori, H. Tohge, K. Ochi, H. Harada, "Affinity isoelectric focusing of human serum apolipoprotein B-containing lipoproteins on agarose gels with cyclodextrins", *Electrophoresis* 1998, 19, 687-691.
- [116] S. Poznanovic, G. Schwall, H. Zengerling, M. A. Cahill, "Isoelectric focusing in serial immobilized pH gradient gels to improve protein separation in proteomic analysis", *Electrophoresis* 2005, 26, 3185-3190.
- [117] J. Poland, M. A. Cahill, P. Sinha, "Isoelectric focusing in long immobilized pH gradient gels to improve protein separation in proteomic analysis", *Electrophoresis* 2003, 24, 1271-1275.
- [118] W. Havemeister, H. Rehbein, H. Steinhart, C. Gonzales-Sotelo, M. Krogsgaard-Nielsen, B. Jorgensen, "Visualization of the enzyme trimethylamine oxide demethylase in isoelectric focusing gels by an enzyme-specific staining method", *Electrophoresis* 1999, 20, 1934-1938.
- [119] N. P. Patestos, M. Fauth, B. J. Radola, "Fast and Sensitive Protein Staining with Colloidal Acid Violet 17 Following Isoelectric-Focusing in Carrier Ampholyte Generated and Immobilized Ph Gradients", *Electrophoresis* 1988, 9, 488-496.
- [120] F. Kilar, "Recent applications of capillary isoelectric focusing", *Electrophoresis* 2003, 24, 3908-3916.
- [121] H. P. Latscha, G. W. Linti, H. A. Klein, *Analytische Chemie. Chemie-Basiswissen 3*, Springer Verlag, 2003.
- [122] Bundesverband Glasindustrie e.V.,
<http://www.bvglas.de/der-werkstoff/glasarten/kalknatronglaeser/>
- [123] W. Liu, J. Wu, E. S. Li, E. S. Selamat, "Emission Characteristics of Fluorescent Labels with Respect to Temperature Changes and Subsequent Effects on DNA Microchip Studies", *Applied and Environmental Microbiology* 2005, 71, 6453-6457.
- [124] D. Ross, M. Gaitan, L. E. Locascio, "Temperature Measurement in Microfluidic Systems Using a Temperature-Dependent Fluorescent Dye", *Analytical Chemistry* 2001, 73, 4117-4123.
- [125] O. Filevich, R. Etchenique, "1D and 2D Temperature Imaging with a Fluorescent Ruthenium Complex", *Analytical Chemistry* 2006, 78, 7499-7503.
- [126] F. V. v. Steyern, J.-O. Josefsson, S. Tagerud, "Rhodamine B, a Fluorescent Probe for Acidic Organelles in Denervated Skeletal Muscle", *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1996, 44, 267-274.
- [127] A. Delon, Y. Usson, J. Derouard, T. Biben, C. Souchier, "Photobleaching, mobility, and compartmentalisation: Inferences in fluorescence correlation spectroscopy", *Journal of Fluorescence* 2004, 14, 255-267

- [128] P. S. Dittrich, P. Schwille, "Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single-molecule analysis with one- and two-photon excitation", *Applied Physics B: Lasers and Optics* 2001, 73, 829-837.
- [129] K. M. Balss, D. Ross, H. C. Begley, K. G. Olsen, M. J. Tarlov, "DNA Hybridization Assays Using Temperature Gradient Focusing and Peptide Nucleic Acids", *Journal of the American Chemical Society* 2003, 126, 13474-13479.
- [130] G. Fercher, W. Smetana, M. J. Vellekoop, "Microchip electrophoresis in low-temperature co-fired ceramics technology with contactless conductivity measurement", *Electrophoresis* 2009, 30.
- [131] S. Nussbaurner, S. Fleury-Souverain, S. Rudaz, P. Bonnabrya, J. L. Veuthey, "Determination of suxamethonium in a pharmaceutical formulation by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection (CE-(CD)-D-4)", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2009, 49, 333-337.
- [132] P. Kuban, P. C. Hauser, "Ten years of axial capacitively coupled contactless conductivity detection for CZE - a review", *Electrophoresis* 2009, 30, 176-188.
- [133] K. H. Priestersbach, F. Rittig, H. Pasch, "Separation of non-UV-absorbing synthetic polyelectrolytes by CE with contactless conductivity detection", *Electrophoresis* 2008, 29, 4407-4411
- [134] J. P. Hutchinson, C. Johns, M. C. Breadmore, E. F. Hilder, R. M. Guijt, C. Lennard, G. Dicoski, *et al.*, "Identification of inorganic ions in post-blast explosive residues using portable CE instrumentation and capacitively coupled contactless conductivity detection", *Electrophoresis* 2008, 29, 4593-4602.
- [135] J. Zikmundova, P. Tuma, F. Opekar, "A dual spectrophotometric/contactless conductivity detector for CE determination of incompletely separated amino acids", *Journal of Separation Sciences* 2008, 31, 353-355.
- [136] C.-Y. Chen, M. D. Morris, "On-line multichannel Raman spectroscopic detection system for capillary zone electrophoresis", *Journal of Chromatography* 1991, 540, 355-363.
- [137] K. R. Ackermann, T. Henkel, J. Popp, "Quantitative Online Detection of Low-Concentrated Drugs via a SERS Microfluidic System", *ChemPhysChem* 2007, 8, 2665 - 2670.
- [138] P. Measor, L. Seballos, D. Yin, J. Z. Zhang, E. J. Lunt, A. R. Hawkins, H. Schmidt, "On-chip surface-enhanced Raman scattering detection using integrated liquid-core waveguides", *Applied Physics Letters* 2007, 90, 211107.
- [139] P. A. Walker, M. A. Burns, B. N. Johnson, M. D. Morris, "Isotachophoretic Separations on a Microchip. Normal Raman Spectroscopy Detection", *Analytical Chemistry* 1998, 70, 3766-3769.
- [140] M. Lee, J.-P. Lee, H. Rhee, J. Choo, Y. G. Chai, E. K. Lee, "Applicability of laser-induced Raman microscopy for in situ monitoring of imine formation in a glass microfluidic chip", *Journal of Raman Spectroscopy* 2003, 34, 737-742.

- [141] M. Becker, C. Budich, V. Deckert, D. Janasek, "Isotachophoretic free-flow electrophoretic focusing and SERS detection of myoglobin inside a miniaturized device", *Analyst* 2009, 134, 38-40.
- [142] C. V. Raman, K. S. Krishnan, "A new type of secondary radiation", *Nature* 1928, 121, 501-502
- [143] M. Fleischmann, P. J. Hendra, A. J. McQuillan, "Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode", *Chemical Physics Letters* 1974, 26, 163-166.
- [144] D. L. Jeanmaire, R. P. v. Dyne, "Surface Raman Spectroelectrochemistry, Part 1: Heterocyclic, Aromatic and Aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode", *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1977, 84, 1-20.
- [145] M. G. Albrecht, J. A. Creighton, "Anomalous Intense Raman Spectra of Pyridine at a Silver Electrode", *Journal of the American Chemical Society* 1977, 99, 5215-5217.
- [146] E. J. Zeman, G. C. Schatz, "An Accurate Electromagnetic Theory Study of Surface Enhancement Factors for Ag, Au, Cu, Li, Na, Al, Ga, In, Zn, and Cd", *Journal of Physical Chemistry* 1987, 634-643.
- [147] K. Kneipp, S. Haka, H. Kneipp, K. Badizadegan, N. Yoshizawa, C. Boone, K. E. Shafer-Peltier, *et al.*, "Surface-enhanced Raman spectroscopy in single living cells using gold nanoparticles", *Applied Spectroscopy* 2002, 56, 150-154.
- [148] M. Moskovits, "Surface-enhanced Spectroscopy", *Reviews of modern Physics* 1985, 57, 783-826.
- [149] S. L. McCall, P. M. Platzman, P. A. Wolff, "Surface enhanced Raman scattering", *Physics Letters* 1980, 77A, 381-383.
- [150] A. Otto, I. Mrozek, H. Grabhorn, W. Akemann, "Surface-enhanced Raman scattering", *Journal of Physics: Condensed Matter* 1994, 4, 1143-1212.
- [151] P. C. Lee, D. Meisel, "Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols", *Journal of Physical Chemistry* 1982, 86, 3391-3395.
- [152] M. Sackmann, A. Materny, "Surface enhanced Raman scattering (SERS) - a quantitative analytical tool?" *Journal of Raman Spectroscopy* 2006, 37, 305-310.
- [153] S. E. J. Bell, N. M. S. Sirimuthu, "Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) for sub-micromolar detection of DNA/RNA mononucleotides", *Journal of the American Chemical Society* 2006, 128, 15580-15581.
- [154] A. Rasmussen, V. Deckert, "Surface- and tip-enhanced Raman scattering of DNA components", *Journal of Raman Spectroscopy* 2006, 37, 311-317.
- [155] V. Deckert, D. Zeisel, R. Zenobi, T. Vo-Dinh, "Near-field surface Raman imaging of dye-labeled DNA with 100-nm resolution", *Analytical Chemistry* 1998, 70, 2646-2650.
- [156] H. Kortmann, L. M. Blank, A. Schmid, "A rapid, reliable, and automatable lab-on-a-chip interface", *Lab on a Chip* 2009, 9, 1455-1460.

Anhang A

Das folgende MATLAB-Programm wurde für die Division der Grauwertpixel in den Kammerbilder in Kapitel 4.5 verwendet. Außerdem fand es auch bei der Stabilitätsmessung des Temperaturgradienten in Abhängigkeit von der Flussrate (Kapitel 4.6) Verwendung.

Temperaturverteilung.m:

```
% Temperaturverteilung
function T = Temperaturverteilung

%Einlesen der ersten Bilddatei
[filename1,pathname1] = uigetfile('*.bmp', 'Öffne RhB-File');
if ((filename1 == 0) & (pathname1 == 0))
    fprintf(1, 'FEHLER: Kein bmp-file!\n')
    return
end

%Einlesen der zweiten Bilddatei
[filename2,pathname2] = uigetfile('*.bmp', 'Öffne RhB Referenz-File (22Grad)');
if ((filename2 == 0) & (pathname2 == 0))
    fprintf(1, 'FEHLER: Kein bmp-file!\n')
    return
end

%Division der Bilder
file1 = strcat(pathname1,filename1);
file2 = strcat(pathname2,filename2);
fprintf(1, 'Lese %s\n', file1);
B = imread(file1);

fprintf(1, 'Lese %s\n', file2);
H = imread(file2);
H = 49.114;

B = double(B)./255;
H = double(H)/255;

B=0.299*B(:,:,1)+0.587*B(:,:,2)+ 0.114*B(:,:,3);
H=0.299*H(:,:,1)+0.587*H(:,:,2)+ 0.114*H(:,:,3);

R = B ./ H;

%Falls die Temperaturbestimmung nicht durch Division eines
%Referenzbildes sondern durch eine Kalibrationsgleichung
%erfolgt, ist die folgende Zeile zu aktivieren und die
%entsprechende Kalibrationsgleichung einzusetzen.
%T = -369.09*R.^3+812.38*R.^2-664.1*R+241.43;
```

```
%Erzeugung der Temperaturscala
```

```
Tmin = min(min(T));
```

```
T = T - Tmin;
```

```
Tmax = max(max(T));
```

```
T = T ./ Tmax;
```

```
T = uint8(T * 120);
```

```
T = uint8(T);
```

```
%Speichern des Divionsergebnisses
```

```
[filename3,pathname3] = uiputfile('*.bmp', 'Result');
```

```
if ((filename3 == 0) & (pathname3 == 0))
```

```
    fprintf(1, 'FEHLER: Kein bmp-file!\n')
```

```
    return
```

```
end
```

```
map = gray(120);
```

```
file3 = strcat(pathname3,filename3);
```

```
fprintf(1, 'Schreibe %s\n', file3);
```

```
imwrite(T,map,file3)
```

```
image(T);
```

```
colormap(map);
```

```
colorbar(0,120);
```

```
return
```


Lebenslauf

Name: Marco Becker

Geburtsdatum: 16.06.1980

Geburtsort: Dortmund

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Wohnort: Dortmund

Schulbildung: 07/1986-06/1990 Steinhammergrundschule Dortmund

08/1990-06/1999 Bert-Brecht Gymnasium Dortmund
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium: 10/1999-03/2006 Diplom-Informationstechnik, TU Dortmund
Abschluss: Diplom-Ingenieur

Berufliche Laufbahn: seit 07/2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Leibnitz-Institut für Analytische Wissenschaften –ISAS- e.V. in der Arbeitsgruppe Miniaturisierung