

Universität Bielefeld  
Fakultät für Physik  
Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften  
Gruppenleiter: Prof. Dr. Dario Anselmetti

# Mikrofluidikstrukturen zum Fangen von E.coli und Bestimmung der Detektionsgrenze von Cofaktoren mittels UV/VIS- Spektroskopie

---

Dem Prüfungsausschuss im September 2016 zur Erlangung des Grades eines Bachelor of Science in der Technischen Fakultät vorgelegt.

Erstgutachter: Dr. Martina Viefhues

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dario Anselmetti



## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbständig verfasst und gelieferte Datensätze, Zeichnungen, Skizzen und graphische Darstellungen selbständig erstellt habe.

Bielefeld, den

---

Laura Schlüter



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>2</b>
2.1 PDMS .....	2
2.2 Das Fluid im Mikrofluidkanal .....	3
2.3 Brown'sche Molekularbewegung und Diffusion .....	3
2.4 Strömungsprozesse .....	4
2.4.1 Hydrodynamischer Transport .....	5
2.4.2 Taylor Dispersion: .....	5
2.4.3 Elektroosmotischer Fluss (EOF) .....	6
2.5 Fluoreszenz .....	7
2.6 Cofaktoren .....	8
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>9</b>
3.1 Herstellung der Mikrofluidikstrukturen .....	9
3.1.1 Photolithographie - Herstellung des Master-Wafers .....	10
3.1.2 Softlithographie - Herstellung der Mikrofluidikstrukturen .....	11
3.1.3 PDMS Plasmaoxidation .....	13
3.2 Verwendete Kanalgeometrien und Strukturen .....	15
3.3 <i>E. coli</i> BL21 (DE3) .....	16
3.4 Transport im Kanal über hydrodynamischen Druck .....	17
3.5 Transport im Kanal über EOF .....	17
3.5.1 Float Injektion: .....	18
3.5.2 Pinched Injektion .....	19
3.6 Detektion der Cofaktoren .....	20
<b>4. Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>20</b>
4.1 Herstellung des Master Wafer .....	20
4.2 Herstellung der Chips .....	21
4.3 Fangen der Zellen .....	25
4.4 Wechselwirkung mit dem Medium .....	27
4.5 Detektion der Cofaktoren .....	29
<b>5. Zusammenfassung und Perspektive</b> .....	<b>36</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>38</b>



## 1. Einleitung

Der zelluläre Metabolismus ist sehr komplex. Die metabolischen und regulatorischen Prozesse zu verstehen ist ein großes Ziel in der derzeitigen Forschung. Die Analyse der Zellantwort und der Genexpression ist besonders in Anbetracht der medizinischen Forschung ein Schwerpunkt [1,2].

Eine Analyse im kleinen Maßstab ist dafür von Vorteil. Die Detektion der mM-konzentrierten Zellbestandteile ist jedoch schwierig. Mikrofluidikkanäle bieten dafür neben den kleinen Maßstab für die *single-cell analysis* die Möglichkeit der Anpassung auf die Zelle und Analysemethode.

Zum Fangen einzelner Zellen im Mikrofluidkanal können elektrophoretische Kräfte, die optischen Pinzette, die Akustik, die Hydrodynamik oder mechanische Strukturen verwendet werden [3,4,5, 6]. Dabei gestaltet sich besonders die Analyse lebender Zellen als schwierig. Neben auftretenden Scherkräften kann die hohe Wachstumsrate von Prokaryonten problematisch werden [7,8,9].

Die Zellgröße und Zellform stellt zudem eine Limitation dar. So sind Prokaryonten vergleichsweise klein und somit schwieriger zu fangen als eukaryotische Zellen, die jedoch eine längere Generationszeit aufweisen und empfindlicher sind [9,10,11].

In dieser Arbeit war das Ziel *E.coli* in Pfostenstrukturen im Mikrofluidkanal zu fangen und die Zellteilung zu beobachten. Außerdem sollten die Cofaktoren  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+$  und  $\text{NADPH}$  im Mikrofluidkanal über UV/VIS-Spektroskopie detektiert werden. Mit der daraus bestimmten Detektionsgrenze konnte eine für die Detektion der von *E.coli* ausgehenden intrazellulären Cofaktoren benötigte, minimale Zellzahl bestimmt werden.

## 2. Theoretische Grundlagen

In dem  $\mu\text{m}$  großen Mikrofluidkanälen herrschen besondere Bedingungen. In diesem Kapitel werden zunächst die physikalischen Grundlagen der Mikrofluidik dargestellt. Dabei wird zunächst auf das verwendete Material eingegangen und des weiteren die theoretische Grundlagen der Mikrofluidik erläutert. Zuletzt werden die für die UV/VIS-spektroskopische Detektion wichtigen Hintergründe dargestellt.

### 2.1 PDMS

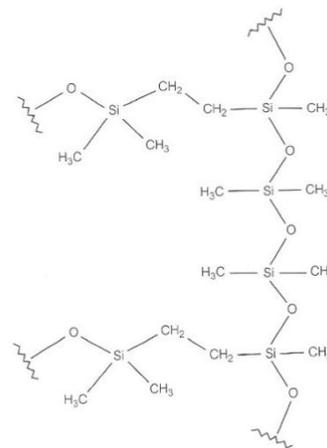
Mikrofluidikstrukturen können aus verschiedenen Materialien hergestellt werden. Die hier verwendeten Mikrofluidikstrukturen werden aus Polydimethylsiloxan (PDMS) geformt und mit Glas verschlossen.

Das handelsübliche Glas weist besonders im UV-Bereich eine begrenzte Transparenz auf. Dies ist bei dem verwendeten Quarzglas nicht der Fall, weshalb dieses für die Messungen mit dem UV/VIS verwendet wird [12].

PDMS ist im akademischen Bereich eines der häufigsten für Mikrofluidkanäle verwendeten Materialien. Es ist ein besonders für nicht polare Stoffe ein permeables, biokompatibles und im Wellenlängenbereich von 300 – 2200 nm transparentes Polymer [13]. Gase können PDMS durchdringen [13,14], weshalb es besonders im Hinblick auf die Zellkulturtechnik in der Mikrofluidik vorteilhaft ist.

Zusammengesetzt aus  $(\text{C}_2\text{H}_6\text{OSi})_n$  Monomeren ergibt sich das in Abbildung 1 dargestellte Polymer.

Die Elastizität des PDMS ermöglicht einen adhäsiven Kontakt zu glatten Oberflächen [13]. Mit PDMS können komplexe  $\mu\text{m}$  bis nm - kleinen 3D-Strukturen abgeformt werden. Um die Fluoreszenz einer Probe detektieren zu können, sollte die Autofluoreszenz des für die Mikrofluidikstruktur verwendeten Materials so niedrig wie möglich sein. PDMS besitzt ebenfalls eine Autofluoreszenz. Diese ist geringer als die



**Abbildung 1:** Strukturformel von Polydimethylsiloxan (PDMS) [13].

Autofluoreszenz anderer elastischer Materialien die ebenfalls für die Chipherstellung

geeignet sind [15]. Dennoch ist die Autofluoreszenz vergleichsweise hoch. Durch die Zugabe von Carbon-black Pigment kann die Autofluoreszenz jedoch um bis zu 84 % reduziert werden [12].

Das Material unterliegt einem Alterungsprozess. Da das PDMS nicht gereinigt werden kann, wird es im Single-Use verwendet. PDMS ist außerdem permeabel. Wie im Kapitel 4.4 thematisiert wird, kann dies zu Problemen führen wenn es zu Wechselwirkungen zwischen dem PDMS und der Probe bzw. dem Puffer kommt [13].

## 2.2 Das Fluid im Mikrofluidkanal

Im Mikrofluidkanal bildet ein Fluid ein spezifisches Flussprofil aus. Dies kann durch die dimensionslose Reynoldszahl beschrieben werden [12,16].

$$Re = \frac{\rho \cdot d \cdot v}{\eta} \quad (1)$$

Dabei ist  $v$  die charakteristische Strömungsgeschwindigkeit,  $\rho$  die Dichte,  $d$  die Kanallänge und  $\eta$  die spezifische Viskosität.

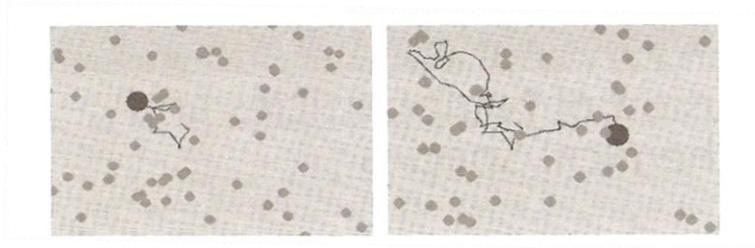
Es wird zwischen einem laminaren ( $Re < 1000$ ) oder turbulenten ( $Re > 1000$ ) Fluss unterschieden.

Ein laminarer Fluss ist durch geringere Strömungsgeschwindigkeiten und einem konstanten Feld der Strömungsvektoren gekennzeichnet. Dies bedeutet, dass zwei Flüssigkeiten ohne sich zu vermischen nebeneinander fließen würden [12]. Bei einer laminaren Strömung dominieren die Trägheitskräfte [16]. Turbulente Strömungen weisen dahingegen bedeutend höhere Strömungsgeschwindigkeiten auf und es kommt zu Verwirbelungen der Strömungslinien, sowie einer Mischung der Strömungsebenen. Auf Grund der Kanalgeometrie und der Eigenschaften vom Puffer, Medium oder Reinstwasser herrscht im Mikrofluidkanal meist ein laminares Flussprofil.

## 2.3 Brown'sche Molekularbewegung und Diffusion

Zusätzlich zum Flussprofil findet innerhalb von Flüssigkeiten und Gasen eine temperaturabhängige mikroskopische Bewegung von Teilchen statt. Sie wird als Brown'sche Molekularbewegung bezeichnet. Dabei findet eine lineare Bewegung der Moleküle statt, die

bei einer Kollision mit anderen Molekülen abgelenkt werden. Dieser durch Stöße bedingte Richtungswechsel findet auch bei Makromolekülen und Mikropartikeln statt. Somit wird ein insgesamt zufälliger Weg zurück gelegt [17]. Dabei verschiebt sich, wie in Abbildung 2 zu erkennen, der Schwerpunkt im zeitlichen Mittel jedoch nicht.



**Abbildung 2:** Zurückgelegter Weg eines Nanopartikels in einem Fluid durch die Brown'sche Molekularbewegung zu zwei unterschiedlichen Zeiten [18].

Die Brown'sche Molekularbewegung stellt die Grundlage für die Diffusion dar. Als Diffusion wird die ungerichtete Bewegung von Teilchen in einer Flüssigkeit beschrieben. Sie tritt bei einem Konzentrationsgradient von der höheren zur geringeren Konzentration auf. [18]

Die Fluktuation der Partikel in einer Flüssigkeit kann dabei über den Diffusionskoeffizienten mit der Einstein-Stokes-Gleichung beschrieben werden. Dabei gilt, je größer der Diffusionskoeffizient, desto schneller ist die Diffusion [16,17].

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \quad (2)$$

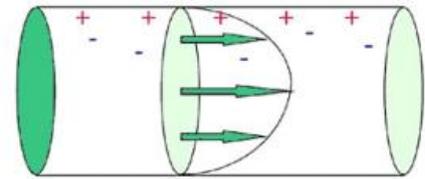
Hierbei ist  $D$  der Diffusionskoeffizient,  $k \cdot T$  die thermale Energie,  $\eta$  die Viskosität und  $r$  der Radius des Partikels.

## 2.4 Strömungsprozesse

Die Flüssigkeit in Mikrofluidkanälen kann gezielt bewegt werden. Dafür wird zwischen zwei Methoden unterschieden. Für das gezielte Strömen der Probe im Mikrofluidkanal kann der Elektroosmotische Fluss (EOF) oder der Druckgetriebene Fluss (HDF) verwendet werden.

### 2.4.1 Hydrodynamischer Transport

Der hydrodynamische Transport basiert auf dem Druckunterschied in den Kanälen [19]. Der Druckunterschied kann über das Proben- und Puffervolumen in den Kapillaren oder über angeschlossene Pumpen erzeugt werden. Auf Grund von viskosen Kräften des Fluids und Reibungskräften im Kanal bildet sich bei einer laminaren Strömung ein wie in Abbildung 3 dargestelltes parabelförmiges Flussprofil aus.



**Abbildung 3:** Parabelförmiges Flussprofil bei dem hydrodynamischen Transport nach Hagen Poiseuille [21].

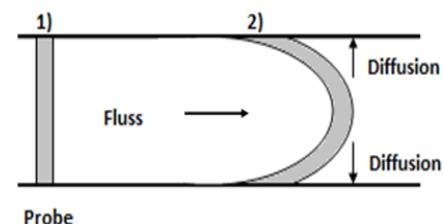
Ein durch hydrodynamischen Druck entstandenes Strömungsprofil kann mit der Hagen-Poiseuille Gleichung beschrieben werden [20].

$$V_z = \frac{\Delta p \cdot \pi \cdot R^4}{8 \cdot \eta \cdot l} \quad (3)$$

Dabei entspricht  $V_z$  dem Volumenstrom,  $\Delta p$  der Druckdifferenz am Anfang und Ende des Rohres,  $R$  dem Kanaldurchmesser,  $\eta$  der Viskosität und  $l$  der Kapillarenlänge.

### 2.4.2 Taylor Dispersion:

Das zuvor beschriebene, durch Druck betriebene parabelförmige Flussprofil einer Probe würde im Kanal eine Bandenverbreiterung erfahren. Grund dafür ist ein schnellerer Fluss in der Mitte der Bande und ein auf Grund von Reibung langsamerer Fluss an der Kanalwand (No-Slip Bedingung). Der parabelförmige Fluss würde somit immer weiter gestreckt werden und schmaler werden. Die Taylor Dispersion, ein Phänomen aus druckbetriebener Bewegung und Diffusion, wirkt dem entgegen. Dabei diffundieren Teilchen von der Spitze des



**Abbildung 4:** Ausbildung des parabelförmigen Flussprofils der Probenbande aus einer 1) linearen Probenbande unter Berücksichtigung der 2) Diffusion an den Grenzfläche von Probe und Puffer (Taylor Dispersion).

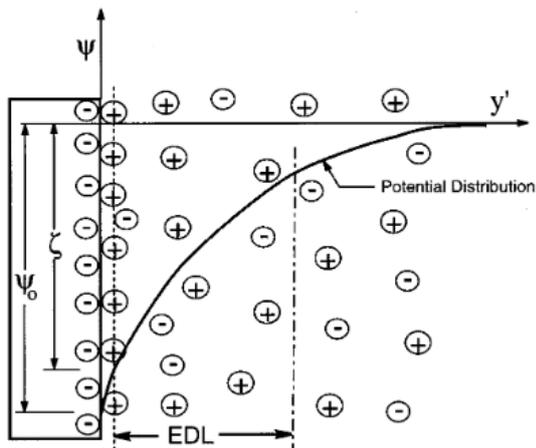
parabelförmigen Flussprofils seitlich weg, sodass eine breite, parabelförmige Bande ausgebildet wird [16,19].

### 2.4.3 Elektroosmotischer Fluss (EOF)

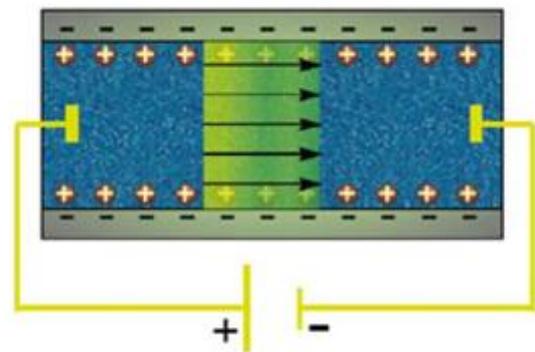
Eine weitere Möglichkeit das Fluid im Mikrofluidkanal gezielt zu bewegen ist die Verwendung des Elektroosmotischen Fluss (EOF).

Dabei wird der Fluss im Kanal über eine angelegte elektrische Spannung gesteuert. Diese bewirkt eine Bewegung der Ionen, die das Fluid mit sich ziehen.

Zunächst lagern sich an der negativ geladenen Oberfläche des Kanals positive Ionen an und es kommt zur Bildung einer Doppelschicht. Zur Kanalmitte hin grenzt die Debye Schicht an. Sie ist eine diffusive Schicht, in der die Ionen, im Gegensatz zur Doppelschicht, mobil sind. Die Konzentration der Ionen nimmt hier zur Kanalmitte hin ab [21].



**Abbildung 5:** Ladungstrennung an der negativ geladenen Oberfläche und Ausbildung einer starren Doppelschicht. Zugleich die Ausbildung der Debye Schicht mit einer zur Kanalmitte abnehmenden Konzentration mobiler Ionen [22].



**Abbildung 6:** Durch den EOF bedingter Fluss im Mikrofluidkanal auf Grund eines angelegten elektrischen Feldes bei vorhandener Ionen-Doppelschicht an einer negativ geladenen Kanalwand und dem Einwirken viskoser Kräfte [21].

Wird ein externes elektrisches Feld angelegt, bewirkt dies eine Bewegung der Gegenionen in der Debye Schicht. Die positiven Ionen werden von der negativen Spannungsquelle angezogen und ziehen auf Grund von viskosen Kräften das Fluid mit sich. Durch Reibungskräfte bildet sich dann ein stempelförmiges Flussprofil aus [21, 22].

Der Vorteil des Transports über den EOF besteht darin, dass die Probe im Vergleich zum hydrostatischen Transport in einer schmalen Bande bewegt wird. Der Prozess unterliegt

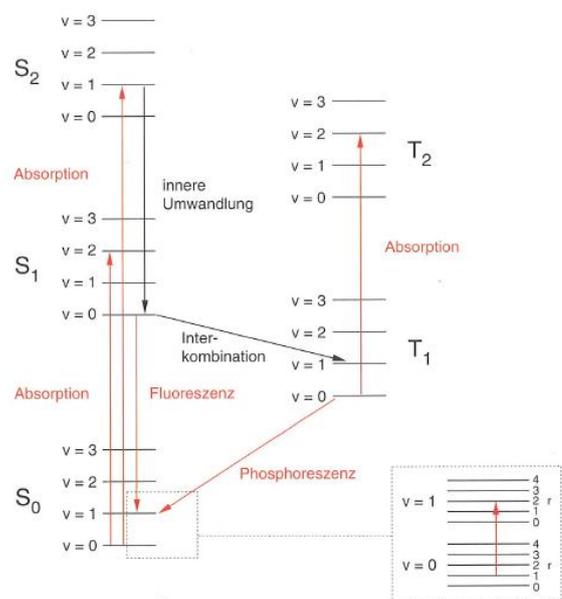
jedoch vielen Einflüssen wie der Oberflächenchemie, dem pH-Wert oder der Probenart, wodurch diese Methode weniger reproduzierbar ist als der hydrodynamische Transport [16,19].

## 2.5 Fluoreszenz

Über die Fluoreszenz (Autofluoreszenz oder Marker) können auch kleine Probenmengen detektiert werden. Diese Methode ist auch im Mikrofluidkanal anwendbar.

Als Fluoreszenz wird die Abgabe eines Photons bezeichnet. Sie ist darauf zurück zu führen, dass Teilchen und Moleküle immer den energetisch niedrigsten Zustand anstreben. Beim Erlangen eines energetisch hohen Zustands wird, durch die Abgabe von Energie, wieder ein energetisch niedrigeres Niveau erreicht. Die Abgabe von Energie kann in Form von Photonen oder Schwingungsenergie (Wärmeenergie) erfolgen. Die Emission eines Photons ist mit maximal  $10^{-9}$  s schneller als die Schwingungsrelaxation und tritt daher bevorzugt auf [23].

Dabei können die Übergänge nur innerhalb bestimmter diskreter Energieniveaus erfolgen. In dem in Abbildung 7 dargestellten Jablonski Diagramm ist dargestellt, dass durch die Absorption von Licht einer spezifischen Wellenlänge das Molekül von dem energetisch niedrigen Singulett-Grundzustand  $S_0$  den energetisch höheren angeregten Singulettzustand  $S_1$  oder  $S_2$  erreicht. Dabei verbleibt das Molekül nur sehr kurz im  $S_2$  Zustand. Innerhalb von  $10^{-13}$  s [23] findet durch innere Umwandlung ein strahlungsloser Übergang in den nächst niedrigeren angeregten Schwingungszustand statt (von  $S_2$  in  $S_1$ ). Die Emission eines Photons aus dem  $S_2$  Zustand ist hier selten. Auch im angeregten



**Abbildung 7:** Jablonski Diagramm. Thermoschema eines Moleküls mit möglichen energetischen Übergängen. Die strahlungslosen Übergänge sind schwarz und die Übergänge welche über Absorption oder Emission stattfinden sind rot dargestellt. [10]

Singulettzustand  $S_1$  wird das energetisch niedrigste Niveau angestrebt. Durch Abgabe eines Photons wird dieser energetisch niedrige  $S_0$  Zustand erreicht. Dabei wird nicht exakt der

energetische Ausgangspunkt  $S_0 v_0$ , sondern ein energetisch höherer Zustand  $S_0 v_1-v_4$  erlangt. Im Vergleich zur Absorption besitzt die Fluoreszenz auf Grund der Schwingungsrelaxion eine kleinere Energie. Somit findet bei der Emission eine Verschiebung des Spektrums zu den großen Wellenlängen statt. Dieser Effekt wird als Stokes' Shift bezeichnet [10,23, 24].

Die Markierung einzelner Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen oder fluoreszierenden Proteinen ist eine vielseitig verwendete Methode in der Bioanalytik. Neben fluoreszierender Moleküle wie GFP oder Rhodamin besitzen auch einige Aminosäuren (Aromaten) und Stoffwechselprodukte wie die reduzierte Form des  $NAD^+$  oder des reduzierten  $NADP^+$  fluoreszierende Eigenschaften [11].

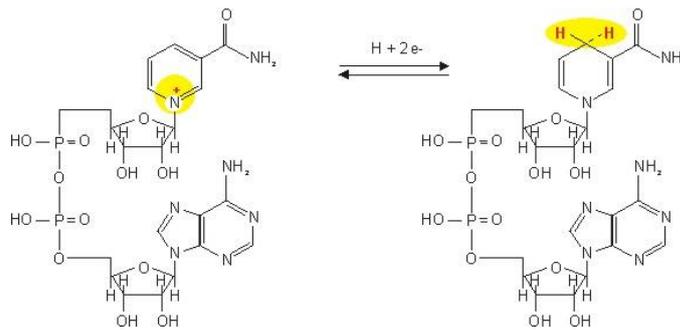
## 2.6 Cofaktoren

Einige Stoffwechselprodukte besitzen eine Autofluoreszenz, so auch die Coaktoren NADH und NADPH [11].

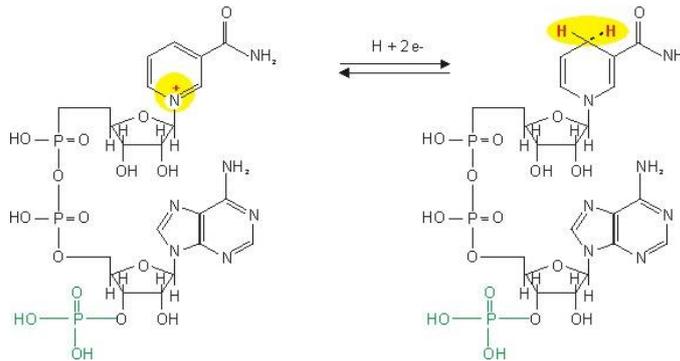
Sie sind für den Stoffwechsel essenzielle Cofaktoren. Dabei wirken NADH und dessen oxidierte Form  $NAD^+$  an katabolischen und NADPH und die oxidierte Form  $NADP^+$  an anabolischen Stoffwechselprozessen mit. Im Stoffwechsel dient  $NAD^+$  als Elektronenakzeptor und ist als dieser bei Redoxreaktionen wichtig. Im Zitratzyklus wird  $NAD^+$  oxidiert, indem zwei Elektronen und ein Proton vom Zucker auf das  $NAD^+$  übertragen werden. Bei der Zellatmung wird das so gebildete NADH als Elektronendonator für die Synthese von ATP verwendet. Mit einem NADH Molekül werden dabei 2-3 ATP synthetisiert [11].

NADPH ist ein Derivat des NADH und besitzt eine zusätzliche Phosphatgruppe an dem Riboseteil.  $NADP^+$  und NADPH sind u.a. für die Synthese von Fettsäuren und den Abbau mehrfach ungesättigter Fettsäuren wichtig [25].

Die Konzentration der Cofaktoren in Zellen ist von der Art der Zelle, aber auch den Kultivierungsbedingungen abhängig. So weisen CHO-Zellen eine ungefähre  $NAD^+$  Konzentration von 0,07 fmol/Zelle [25] und Hefezellen dahingegen besitzen eine  $NAD^+$  Konzentration von 1 - 2 mM [26]. Bei *E. coli* beträgt die Konzentration von  $NAD^+$  2,6 mM. Die Konzentration von NADH in *E.coli* beträgt 0,083 mM, die von  $NADP^+$  0,0021 mM und von NADPH 0,21 mM [23]. Die Autofluoreszenz der Cofaktoren kann mittels UV/VIS-Spektroskopie detektiert werden (siehe Kapitel 4.4).



**Abbildung 8:** Es ist die Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}$  anhand der Strukturformel dargestellt [27].



**Abbildung 9:** Es ist die Reduktion von  $\text{NADP}^+$  zu  $\text{NADPH}$  anhand der Strukturformel dargestellt [27].

### 3. Material und Methoden

Vor dem Fangen der Zellen und der Detektion der Cofaktoren im Mikrofluidkanal müssen zunächst die  $\mu\text{m}$  großen Mikrofluidikstrukturen hergestellt werden.

#### 3.1 Herstellung der Mikrofluidikstrukturen

Die Mikrofluidikstrukturen werden aus PDMS geformt. Dafür wird mittels Photolithografie zunächst ein Master-Wafer mit dem Negativ der Strukturen erstellt. Bei der Softlithografie werden dann verschiedene Formen PDMS auf den Master-Wafer aufgetragen und die Kanalstrukturen geformt.

### 3.1.1 Photolithographie - Herstellung des Master-Wafers

Als Grundlage für den Master-Wafer wird ein Siliziumwafer (CrysRec, Deutschland) verwendet. Dieser wird zunächst für 5 min in einem Säurebad mit Caro'scher Säure gereinigt. Diese besteht zu  $\frac{2}{3}$  (Volumenprozent) aus Schwefelsäure (VWR CHEMICALS, 95%) und zu  $\frac{1}{3}$  aus Wasserstoffperoxid (VWR CHEMICALS, 30% absolut). Nach dem Caro'schen Säurebad wird der Wafer mit Reinstwasser (Anlagenhersteller: MilliPore) abgespült. Anschließend wird dieser Schritt ein weiteres Mal mit einem neu angesetzten Säurebad wiederholt.

Danach wird der Wafer zwei mal für 5 min in ein jeweils neu angesetztes Wasserbad gelegt. Daraufhin wird das Wasser vom Wafer für 30 s bei 3000 rpm abzentrifugiert (Delta10, Ble-Laboratory Equipment, Deutschland). Um den Wafer vollständig zu trocknen wird dieser für 15 min bei 200°C auf der Heizplatte (HAT-300, ATV Technologie, Deutschland) gebacken [28]. Ab dem folgenden Schritt, sollte der Wafer bis zur endgültigen Entwicklung nicht mit Licht der Wellenlänge < 560 nm belichtet werden.

Der SU8-Photolack (MicroChem, NANO SU-8 Negative Tone Photoresists) wird in die Mitte des Wafers aufgetragen und für eine gleichmäßige Verteilung [28] des Fotolacks 30 s bei 1000 rpm gespincoated (Convac, Deutschland). Die erste Schicht des Photolacks bestimmt die Höhe des Spaltes über der Barriere. Hier wurde für eine Schichtdicke von 600 nm der SU-8(0.28) verwendet.

Der Prebake wurde bei 65°C für 1 min auf der Heizplatte durchgeführt.

Für die Belichtung des Photolacks wird eine mit Chrom beschichtete Glasmaske (Delta Mask, Niederlande) verwendet. Diese wird auf dem Wafer positioniert und für 1,7 s im Parallelbelichter (MJB3, Süss MicroTec, Deutschland) mit einer Quecksilberlampe belichtet.

Damit der Photolack polymerisiert, wird der Wafer mit dem folgenden Programm auf einer Heizplatte (PR 5 SR, Detlef Gestigkeit Elektrotechnik, Deutschland) gebacken: [29]

- 1) In 5 min auf 40°C für 1 min. halten
- 2) In 10 min auf 65°C für 50 min. halten
- 3) In 10 min auf 95°C für 3 min. halten

Der Wafer wird für 1 min in Entwickler (Microresist technology, mr-Dev 600) gelegt, anschließend nacheinander mit Aceton (absolut, Fischer Scientific, UK) und Isopropanol

(absolut, VWR CHEMICALS, Deutschland) gespült und mit Stickstoff (Linde, Deutschland) getrocknet. Auf dem Wafer sind nun die negativen Kanalstrukturen geformt.

Die Schichtdicke wird mit einem Profilometer (DekTak 3030 ST, Stanford Nanofabrication Facility Equipment, USA) vermessen.

Eine zweite Schicht aus Photolack bestimmt zusammen mit der ersten Schicht die gesamte Kanalhöhe.

Bevor die zweite Schicht Photolack aufgetragen wird, werden die Passermarken mit Klebeband abgeklebt, sodass der Photolack diese nicht verdeckt. Es wird der Photolack SU8 (5) (MicroChem, NANO SU-8 Negative Tone Photoresists) mittig auf den Wafer aufgetragen, 30 s bei 3000 rpm zentrifugiert und mit dem zuvor verwendeten Programm schrittweise auf 95 °C erhitzt.

Das Klebeband wird, wenn die Heizplatte 65 °C erreicht, wieder entfernt und der Wafer für 3 min bei 95°C vorgebacken. Der Wafer wird mit einer anderen Chrommaske (Delta Mask, Niederlande) für 7 s belichtet. Anschließend wird der Wafer 3 min bei 95°C gebacken und 1 min in mr-Dev FPhotolack entwickelt.

Dann wird der Wafer nacheinander mit Aceton und Isopropanol gewaschen und mit Stickstoff getrocknet. Bei 200°C wird der Wafer für 15 min auf der Heizplatte gebacken und nach einer Kontrolle der Strukturen silanisiert.

Dafür wird der Wafer mit 9 µL Tridecafluor-1,1,2,2-tetrahydrooctyltrichlorsilan (TTTS) (97 % abcr, Deutschland) in einen Exsikkator gegeben. Dieser wird für 30 min abgepumpt und anschließend 30 min im Vakuum belassen.

### **3.1.2 Softlithographie - Herstellung der Mikrofluidikstrukturen**

Der Chip besteht aus zwei verschiedenen Schichten, dem hartem und weichem PDMS. Das h-PDMS ermöglicht eine stabile Pfostenstruktur. Im Gegensatz zu dem w-PDMS ist das h-PDMS stabiler, dadurch aber auch spröder und somit empfindlicher gegenüber mechanischer Belastung.

Es ist zu beachten, dass sich das h-PDMS durch die Plasmaoxidation zusammen zieht. Dadurch kommt es zu einer Wölbung des PDMS-Chips. Um dies zu vermeiden, wurde im weiteren Verlauf der Experimente das h-PDMS lediglich auf die Kanalkreuzungen mit den Pfostenstrukturen punktförmig aufgetragen.

PDMS besitzt eine nicht zu vernachlässigende Autofluoreszenz im UV-Bereich [30]. Um diese zu verringern, wird an der Detektionsstelle vor dem Auftragen des w-PDMS zunächst black-PDMS (b-PDMS) punktförmig in mehreren Schichten aufgetragen. Dadurch kann die Autofluoreszenz um bis zu 65 % [30] deutlich gesenkt werden. Dies ermöglicht die Detektion der Cofaktoren.

Nach dem Silanisieren wird das PDMS auf den Wafer gegeben. Es wird zunächst b-PDMS verwendet. Dafür werden 10 g Silicon Elastomer, 0,1 g Silicon Elastomer curing agent und 0,6 g black Pigment gut vermenget.

Das b-PDMS wird auf der Heizplatte bei 65°C mehrfach punktförmig auf die für die Detektion vorgesehenen Stellen aufgetragen, sodass es eine ungefähre Höhe wie das spätere w-PDMS aufweist.

Anschließend wird eine Schicht h-PDMS bei 65°C auf der Heizplatte auf die Kanalkreuzungen aufgetragen. Dafür werden 3,7 g Vinylmethylsiloxane-dimethylsiloxane trimethylsiloxy terminated copolymer, 7-8 Mole vinylmethylsiloxane (abcr, Deutschland), 1 Tropfen 2,4,6,8 – Tetramethyl – 2,6,8 – Tetravinylcyclotetrasiloxane (Aldrich, USA), 17 µL Platinum – divinyltetramethyldisiloxane complex in Xylene (2.1-2.4% Pt) (abcr, Deutschland) und zur Vervollständigung 1 mL 25-35% Methylhydrosiloxane)-dimethylsiloxane-copolymer (abcr, Deutschland) (kurz vor dem Auftragen) gut vermischt.

Das h-PDMS wird entweder nur auf den Kanalkreuzungen, oder mittig auf den Wafer aufgetragen. Bei einer mittigen Auftragung des h-PDMS, wird der Wafer 10 s bei 1500 rpm zentrifugiert.

Der Wafer wird anschließend 3 min auf der Heizplatte bei 65°C gebacken.

Das w-PDMS wird aus 6,7 g Silicon Elastomer Base (SYLGARD) und 0,67 g Silicon Elastomer curing agent(SYLGARD, 184) erstellt.

Dieses wird mittig auf den Wafer gegeben und nach einer gleichmäßigen Verteilung und der Auflösung von Blasen auf der Heizplatte mit dem folgenden Programm gebacken.

- 1) für 40 min. bei 20°C
- 2) in 5 min. auf 40°C, für 1 min halten
- 3) in 5 min. auf 65°C, für 40 min halten

Anschließend wird auf der Heizplatte bei 65°C das PDMS mit einer Pinzette am Rand vorsichtig vom Wafer gelöst und mit Hilfe einer Metallplatte ohne zu starkes Biegen vom Wafer abgezogen. Das fertige PDMS wird in einer Petrischale gelagert [31].

Die Kanalstrukturen werden mit einem Skalpell aus dem PDMS ausgeschnitten und an den Enden Reservoirs gestanzt. Die PDMS-Ausschnitte werden vor der Plasmaoxidation im Ultraschallbad (T490A, Elma, Deutschland) jeweils für 10 s in Aceton, Ethanol (VWR, AnalaR NORMAPUR, absolut) und Reinstwasser gereinigt und mit Stickstoff getrocknet.

Im Ultraschallbad werden die Deckgläser (Thermo Scientific, Menzel-Gläser, Deutschland) für jeweils mindestens 30 s in Aceton, Ethanol und Wasser gereinigt und anschließend mit Stickstoff getrocknet. Die Deckgläser werden nacheinander, befestigt auf der Vakuumzentrifuge, mit 0,8 mL w-PDMS für 30 sec bei 3000 rpm beschichtet und anschließend auf der Heizplatte für 10 min bei 65 °C gebacken.

Für die UV/VIS-Messung werden für die Chips Deckgläser aus Quarzglas verwendet, da dieses im Gegensatz zum handelsüblichen Glas besonders im UV-Bereich keine begrenzte Transparenz aufweist [12].

Auf Grund der Mehrfachverwendung des Quarzglas wird dieses mit Caro'scher Säure (1:2 Wasserstoffperoxid und Schwefelsäure) gereinigt und mit Stickstoff getrocknet.

Im späteren Verlauf des Projektes wurde die zusätzliche Reinigung der Deckgläser mit Hellmanex III (Hellma analytics, alkalisches Reinigungsmittel) für zwei Mal 5 min bei 60°C in einem Ultraschallbad bzw- 4 h mit n-Heptan (Merck, pro analysi) bei Raumtemperatur durchgeführt.

Vor der Plasmaoxidation werden die Deckgläser im Ultraschallbad für jeweils 30 s in Aceton, Ethanol und Reinstwasser gereinigt und mit Stickstoff getrocknet.

### **3.1.3 PDMS Plasmaoxidation**

Damit die im PDMS geformte Mikrofluidikstruktur geschlossen ist, wird das PDMS mit einem Deckglas verbunden. Dafür werden das Deckglas und das PDMS zunächst plasmaoxidiert.

Durch das Plasma werden Verunreinigungen entfernt welche die Haftung an dem Deckglas erschweren würden. Außerdem wird die Oberflächenchemie des PDMS verändert. Dabei

wird die Siloxan-Gruppe des PDMS ( $C_2H_6OSi$ ) in eine Silanol-Gruppe ( $Si-OH$ ) umgewandelt. Die Oberfläche des PDMS erhält so hydrophile Eigenschaften [32]. Die sich auf dem Quarzglas und dem PDMS befindenden OH-Gruppen ermöglichen die Ausbildung von kovalenten Bindungen ( $Si-O-Si$ ) [33-34]. Das PDMS haftet dadurch fest am Deckglas, wodurch der fertige Mikrofluidchip entsteht.

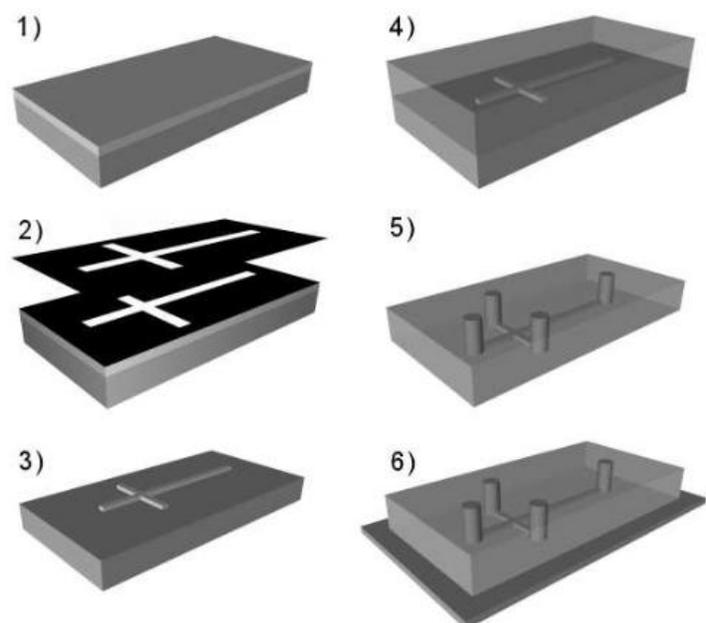
Für die Plasmaoxidation wird eine selbst gebaute Plasmaanlage verwendet [35].

Vor der Plasmaoxidation der Proben findet zunächst ein Leerlauf statt. Über eine Vakuumpumpe wird der Druck in der Plasmakammer auf  $5 \cdot 10^{-2}$  mbar gesenkt. Dann wird die Kammer über ein Nadelventil mit Sauerstoff bis auf einen Druck von  $10^{-1}$  mbar geflutet. Dabei ist zu beachten, dass für eine bessere Bindung des PDMS am Deckglas die Kammer zunächst für 2 min auf einen Druck von  $6 \cdot 10^{-1}$  mbar mit Sauerstoff (Linde, Deutschland) geflutet und der Sauerstoff daraufhin so reduziert wird, sodass ein Druck von  $10^{-1}$  erreicht wird. Die Plasmaoxidation wird 30 s durchgeführt.

Nach erfolgter Plasmaoxidation wird das Sauerstoffventil geschlossen und dem System Stickstoff zugeführt, sodass die Plasmakammer geöffnet werden kann.

Die gereinigten Deckgläser und PDMS-Ausschnitte (mit dem Kanal nach oben) werden auf dem Probenteller platziert und dieser auf das Podest in der Plasmakammer positioniert. Die Plasmakammer wird geschlossen und die Vakuumpumpe gestartet. Das weitere Verfahren ist identisch zum Leerlauf.

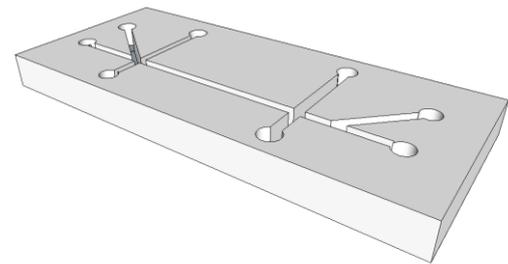
**Abbildung 10:** Herstellung eines Mikrofluidikchips. Der Siliciumwafer wird mit Photolack beschichtet 1) und durch eine Chrommaske belichtet 2). Nach der Entwicklung ermöglichen die Negativ-Strukturen auf dem Wafer 3) die Abformung von Mikrofluidikstrukturen im PDMS 4). An den Enden der Kanäle werden Probenreservoir gestanzt 5) und der im PDMS abgeformte Kanal nach erfolgter Plasmaoxidation irreversibel mit Glas verschlossen 6) [41].



Die plasmaoxidierten PDMS-Chips werden auf dem Deckglas mit dem Kanal nach unten platziert. Wenn sie zwischen dem PDMS und dem beschichteten Deckglas bzw. dem Quarzglas kovalente Bindungen ausgebildet haben werden die Reservoire mit Reinstwasser befüllt. Um ein Austrocknen zu verhindern werden die fertigen Chips auf einem PDMS-Block in einer mit Reinstwasser gefüllten Petrischale gelagert.

### 3.2 Verwendete Kanalgeometrien und Strukturen

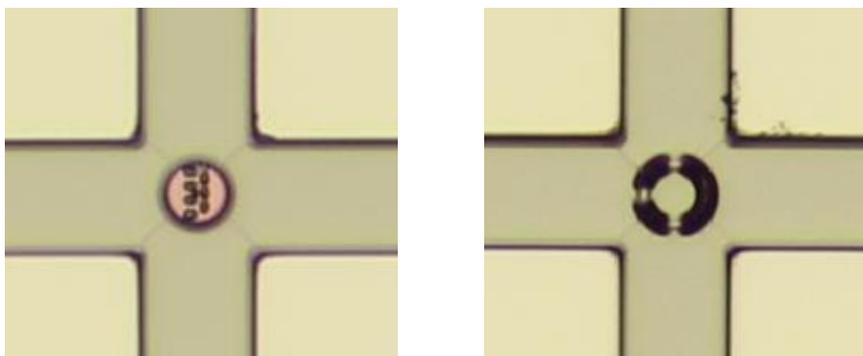
Für das Fangen der Zellen und die Detektion der Cofaktoren wurde die gleiche Kanalkonstruktion verwendet. Diese besteht aus zwei miteinander verbundenen Kanalkreuzungen.



Die Detektionsstelle der Cofaktoren befindet sich in dem langen Kanalbereich zwischen den beiden Kanalkreuzungen. Die **Abbildung 11:** Es ist die verwendete Mikrofluidstruktur skizziert. (nicht maßstabsgetreu)

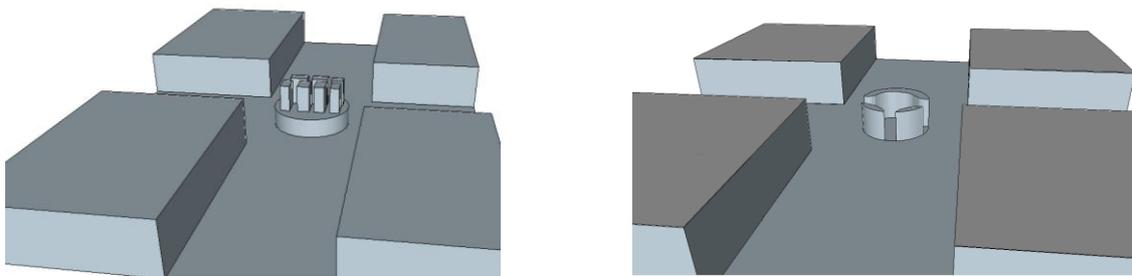
Das Fangen der *E. coli* ist mit in den Kanal integrierten Pfostenstrukturen möglich. Zum Fangen der Zellen wurden die in **Abbildung 12** dargestellten Pfostenstrukturen verwendet. Die Single-Struktur besteht aus einzelnen mittig in der Kanalkreuzung positionierte Pfeiler. Bei der Multi-Pfostenstruktur handelt es sich um eine runde Anordnung von länglichen Pfosten in der Mitte der Kanalkreuzung.

Für das Fangen der *E.coli* ist hier die Spalthöhe zwischen der Kanaldecke und den Pfostenstrukturen limitierend. Ist die Spalthöhe größer als die *E.coli*, können die Pfosten von den Zellen leicht überströmt werden.



**Abbildung 12:** Mikroskopische Aufnahme der verwendeten Pfostenstrukturen auf dem Master Wafer von **a)** Single-Struktur **b)** Multi-Struktur, 40 fach vergrößert.

Die zwei verwendeten Strukturen sind einzeln auf dem Kanalboden oder auf einem großen Pfosten positioniert. Die Strukturen welche auf einem großen Pfosten positioniert sind reichen näher an die Kanaldecke. Sie können von den *E.coli* nicht überströmt werden. Bei Strukturen ohne einen großen Pfosten ist der Spalt zwischen Struktur und Kanaldecke größer als die Zellen, sodass diese die Struktur überströmen können.



**Abbildung 13:** Skizze der **a)** erhöhten Single-Pfostenstruktur **b)** Multi-Pfostenstruktur

- ① Kanalbreite: 30  $\mu\text{m}$  Spalthöhe: 680 nm
- ② Kanalbreite: 30  $\mu\text{m}$  Spalthöhe: 550 nm
- ③ Kanalbreite: 30  $\mu\text{m}$  Spalthöhe: 400 nm

### 3.3 *E. coli* BL21 (DE3)

*E. coli* ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges Darmbakterium, welches anaeroben Stoffwechsel betreibt. Es besitzt einen Durchmesser von 0,7 – 1,4  $\mu\text{m}$ , eine Länge von 2 – 4  $\mu\text{m}$  und ein Volumen von 0,5 – 5  $\mu\text{m}^3$  [36].

Die Generationszeit beträgt, abhängig von Faktoren wie dem Medium, der Temperatur und dem Zellzyklus 20 - 60 Minuten. *E. coli* ist einer der gentechnologisch wichtigsten Organismen [11]: Der Stamm BL21 wurde mit dem Lac Promotor und einer zusätzlichen T7-Polymerase für eine hohe Expressionsrate rekombinanter Proteine entwickelt. Die Stämme besitzen spezifische genetische Marker und eine Induzierbarkeit der Proteinexpression. Zudem besitzt der verwendete Stamm nicht das Plasmid welches u.a. für Enterotoxine codiert. Somit hat der Stamm eine begrenzte pathogene Wirkungsweise [37,38].

Im Experiment wird *E. coli* als Suspensionskultur in TB- bzw. LB-Medium und mit Carbenicillin in einer Konzentration von  $0,5 \cdot 10^6$  Z/mL bis  $6,4 \cdot 10^8$  Z/mL verwendet (Kultiviert von Severin Wedde).

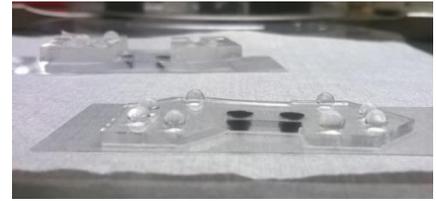
### 3.4 Transport im Kanal über hydrodynamischen Druck

Die *E. coli* werden über einen hydrostatischen Druck gezielt in den Mikrofluidkanal geströmt. Dafür wird die unterschiedliche Füllhöhe der Reservoirs oder eine Pumpstation, die über das MAFCS Control 1.08 von Fluigent gesteuert wird, verwendet.

Die Füllhöhe der Reservoirs wird so angepasst, dass die Zellen auf Grund des Druckunterschiedes von dem Reservoir in den Kanal und zu der Pfostenstruktur strömen. Für den druckgetriebene Transport mit Hilfe der Pumpe wird ein Plexiglasblock mit passenden Reservoirs mittels adhäsiver Kräfte auf den Chip befestigt. Die Probe und das Medium werden dann in die Reservoirs gegeben und die Pumpschläuche in den Öffnungen des Blocks befestigt. Die Konstruktion wird unter dem Mikroskop platziert und die Schläuche mit der Pumpe (Fluigent, MFCS-4C) verbunden.

### 3.5 Transport im Kanal über EOF

Um die Cofaktoren im Kanal gezielt strömen zu können, wird der EOF verwendet. Um über Elektroden ein elektrisches Feld anzuschließen, wird entweder der Plexiglasblock, oder zugeschnittene Stücke aus w-PDMS mit passend gestanzten Reservoirs verwendet. Die Elektroden werden mit dem Plexiglasblock verbunden bzw. in die Reservoirs gesteckt. Die Spannung wird über das Programm LabView (6i, 2000) geregelt.



**Abbildung 14:** Fotografie eines Mikrofluidchips mit den schwarz pigmentierten Detektionsstellen und gefüllten Reservoirs.



**Abbildung 15:** Fotografie eines mit dem Plexiglas verbundenen Mikrofluidchip und einer angeschlossenen Pumpe, fixiert auf dem Objektträger.

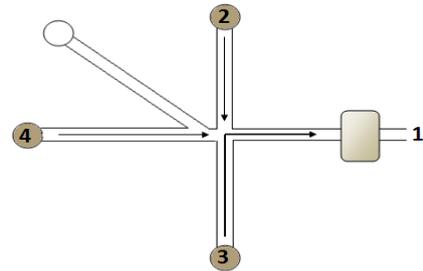


**Abbildung 16:** Fotografie eines Mikrofluidchips auf dem Objektträger, verbunden mit einzelnen PDMS-Blöcken und angeschlossenen Elektroden.

Die Injektion der Probe findet über die *Float- und Pinched- Injektionsmethode* statt.

### 3.5.1 Float Injektion:

Bei der *Float Injektion* wird die Probe für die Detektion vom Probenreservoir (3) zur Detektionsstelle (1) geströmt. Zunächst wird die Detektionsstelle mit Puffer/Medium überströmt, dann mit der Probe. Dazu wird zunächst im *Load* das Zielreservoir (1) hinter der Detektionsstelle geerdet und an den mit Reinstwasser gefüllten Reservoiren (2)(4) eine positive Spannung angelegt. Dadurch verbleibt die Probe im Reservoir (3) und die Detektionsstelle wird mit Reinstwasser überströmt wird.



**Abbildung 17:** *Float-Injektion:* Probenstrom aus dem Probenreservoir (3) zur Detektionsstelle (1), unter leichter Gegenströmung aus den Reservoiren (2) und (4).

Für die Detektion, dem *Dispose*, wird wie in Abbildung 17 dargestellt an dem mit Probe befüllten Reservoir (3) eine positive Spannung angelegt. Dadurch wird die Probe an der Kanalkreuzung in den Kanal (1) zu der Detektionsstelle geströmt. Damit die Probe an der Kanalkreuzung nicht zu den mit Reinstwasser gefüllten Reservoiren (2)(4) strömt, wird an diesen eine geringer positive Spannung angelegt.

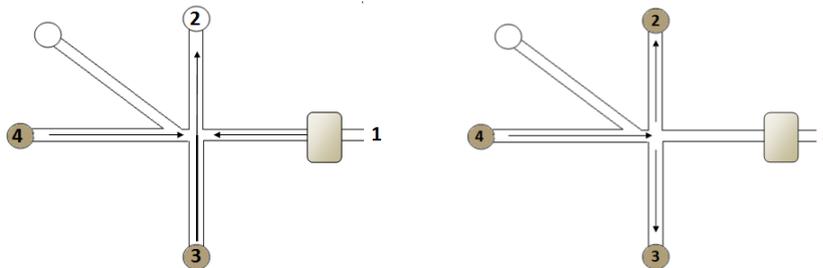
**Tabelle 1:** Es sind die angelegten Spannungen für den Probenstrom im *Load* und *Dispose* angegeben. Dabei handelt es sich um eine *Float Injektion*.

Elektrode/Reservoir	1	2	3	4
<b>Load</b>				
Spannung [mV]	ground	100	0	100
<b>Dispose</b>				
Spannung [mV]	ground	30	150	30

### 3.5.2 Pinched Injektion

Bei der *Pinched Injektion* wird die Probe über die Kanalkreuzung geströmt und dort verjüngt. Für die Detektion wird nur die sich in der Kanalkreuzung befindende Probemenge zur Detektionsstelle geströmt.

Um dies zu erreichen wird für den Load an dem Probenreservoir (3) eine positive Spannung angelegt und das gegenüber liegenden Reservoir (2) wird geerdet. Um den Strom an der Kanalkreuzung zu verengen wird an den beiden anderen Reservoiren (1)(4) eine geringere positive Spannung angelegt als an dem Probenreservoir (2). Für die Detektion wird das Reservoir hinter der Detektionsstelle (1) geerdet und an die mit Probe gefüllten Kanälen (2)(3) keine Spannung angelegt. Dadurch wird nur die sich an der Kanalkreuzung befindende Probemenge zur Detektionsstelle geströmt.



**Abbildung 18:** *Pinched Injektion*: Die Probe wird zunächst vom Probenreservoir (3) über die Kanalkreuzung (Load) und anschließend von der Kanalkreuzung zu der Detektionsstelle (1) geströmt (Detektion).

Die für die *Pinched Injektion* angelegten Spannungen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 2:** Es sind die angelegten Spannungen für den Probenstrom im *Load* und *Dispose* angegeben. Dabei handelt es sich um eine *Float Injektion*.

Elektrode/Reservoir	1	2	3	4
<b>Load</b>				
Spannung [mV]	50	ground	200	50
<b>Dispose</b>				
Spannung [mV]	ground	off	off	200

### 3.6 Detektion der Cofaktoren

Für die Detektion der Fluoreszenzintensität der Cofaktoren wird ein invertiertes optisches Mikroskop verwendet. Es wird ein Anregungslicht von 266 nm verwendet. Dieses wird durch die Probe gelenkt und Wellenlängen unter 360 nm am UV Detektor (Zentro Elektrik) gemessen.

Für die Detektion wird der Laserfokus auf die Detektionsstelle im Kanal eingestellt. Dafür wird ein 40 fach UV-Transparentes Objektiv (OFR LMU-40x-UVB) verwendet. Für die Beobachtungen der Zellen wird ein 100 fach Ölemulsionsobjektiv (Zeiss Plan-Neofluar) verwendet.

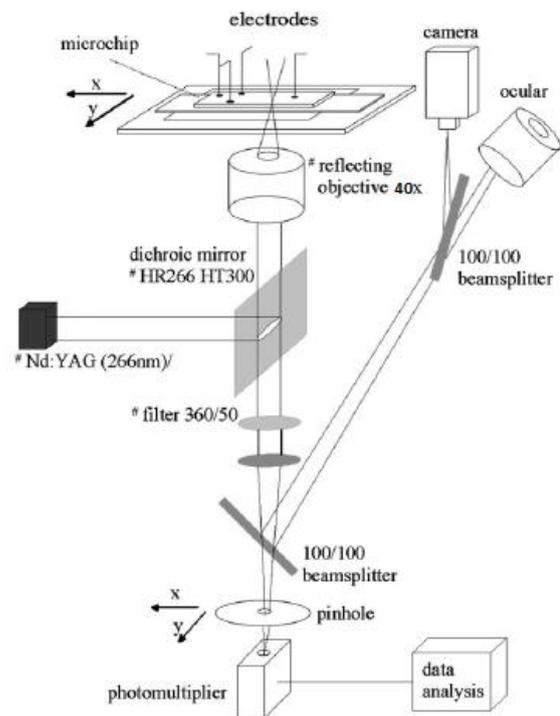


Abbildung 19: Mikroskopischer Apparatenaufbau [6]

## 4. Ergebnisse und Diskussion

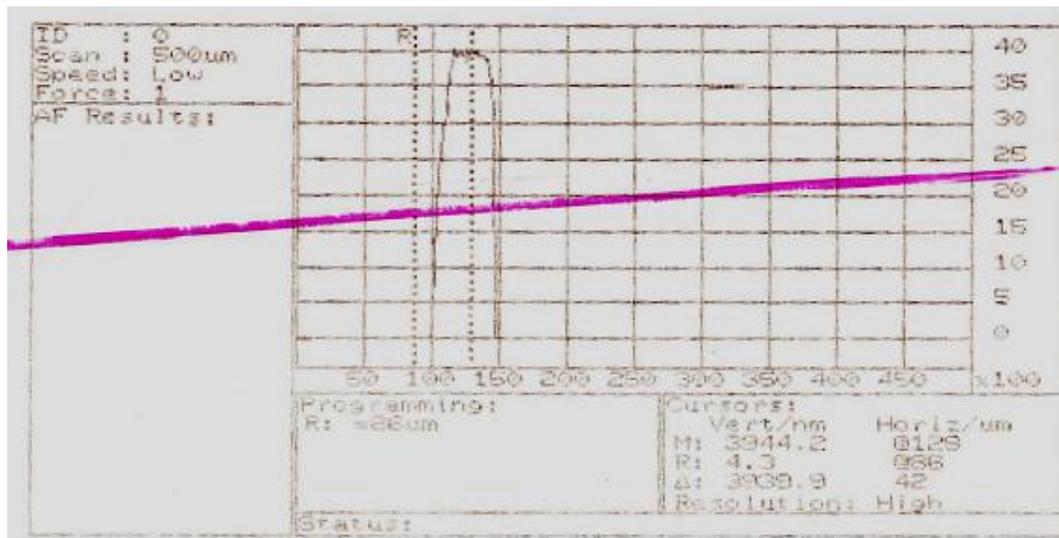
Zunächst wurde einer der verwendeten Master-Wafer hergestellt. Mit diesem wurden Mikrofluidikstrukturen erstellt, welche zum Fangen der *E.coli* und der Detektion der Cofaktoren verwendet werden sollten.

### 4.1 Herstellung des Master Wafer

Für die Abbildung der Mikrofluidikstrukturen aus PDMS wurde zunächst ein Master Wafer hergestellt. Dafür wurde ein Siliciumwafer mit zwei Schichten Photolack überschichtet, diese belichtet und entwickelt, sodass die Negativstruktur der Mikrofluidikstruktur auf dem Masterwafer abgebildet ist.

Die erste Schicht des Photolacks bestimmt dabei die Spalthöhe zwischen der Kanaldecke und der für das Fangen der Zellen abgebildeten Pfostenstruktur.

Die erste Schicht des Photolacks sollte 1,5  $\mu\text{m}$  hoch sein, sodass die *E.coli* bei einer Größe von 3  $\mu\text{m}$  die Pfostenstrukturen nicht überströmen können. Die Messung der Schichthöhe ist in der Abbildung 20 dargestellt. Der Graph zeigt die Erhöhte Struktur des Kanals an. Diese beträgt hier ungefähr 4  $\mu\text{m}$ . Bei dieser Spalthöhe können die *E.coli* die Pfostenstruktur leicht überströmen, weswegen die Mikrofluidikstrukturen des hergestellten Master-Wafer für das Fangen der *E.coli* ungeeignet sind. Für die Detektion der Cofaktoren könne die damit abgeformten Mikrofluidikstrukturen dennoch verwendet werden.



**Abbildung 20:** Es ist die Höhenmessung (mit Hilfe des Profilometers) der abgebildeten ersten Schicht der Negativstruktur auf dem Masterwafer dargestellt. Die Höhe der Struktur beträgt 3,93  $\mu\text{m}$  und definiert die Spaltbreite zwischen der Kanaldecke und der Pfostenstruktur.

## 4.2 Herstellung der Chips

Bei der Herstellung der Chips waren Risse und ein Wölbung des PDMS zu beobachten. Die Risse traten dabei nur bei den Chips mit dem Quarzglas auf.

Da eine neue Plasmaanlage verwendet wurde, wurden die in Abbildung 21 - 22 dargestellte Risse im PDMS zunächst als Verglasen des PDMS vermutet [39].

Da das h-PDMS weniger flexibel als das w-PDMS ist und daher schneller reißt bzw. splittert und sich bei der Plasmaoxidation zusammen zieht, wurde dieses nur auf die Kanalkreuzungen aufgetragen. Dadurch sollten die Risse reduziert und die Wölbung des Chips und somit die Haftung an das Quarzglas verbessert werden. Damit die Pfostenstruk-

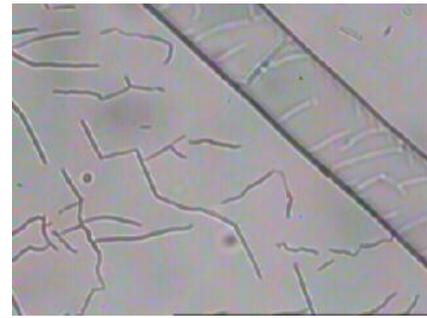
turen im Kanal nicht kollabierten mussten diese aus dem stabileren h-PDMS abgebildet werden. Dafür wurde das h-PDMS gezielt auf die Kanalkreuzung aufgetragen.

Die Bindung von PDMS und Quarzglas konnte durch die begrenzte Auftragung des h-PDMS nicht verbessert werden und auch die Risse wurden nicht gemindert.

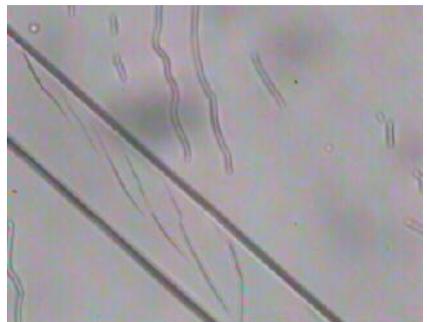
Deshalb wurde zunächst die Zeit der Plasmaoxidation von 30 s schrittweise auf bis zu 8 s reduziert. Je kürzer die Zeit der Plasmaoxidation war, desto weniger stark und seltener traten die Risse auf. Jedoch war dann auch die Bindung zwischen PDMS und Quarzglas umso schwächer.

Für die Detektion der Cofaktoren wurden die Quarzgläser wiederverwendet. Um die PDMS- Rückstände von dem Quarzglas zu lösen, wurden sie mehrfach in Caro'scher Säure gereinigt. Nach mehrfacher Verwendung desselben Quarzglases hat das PDMS immer schlechter bis gar nicht an dem Quarzglas gebunden.

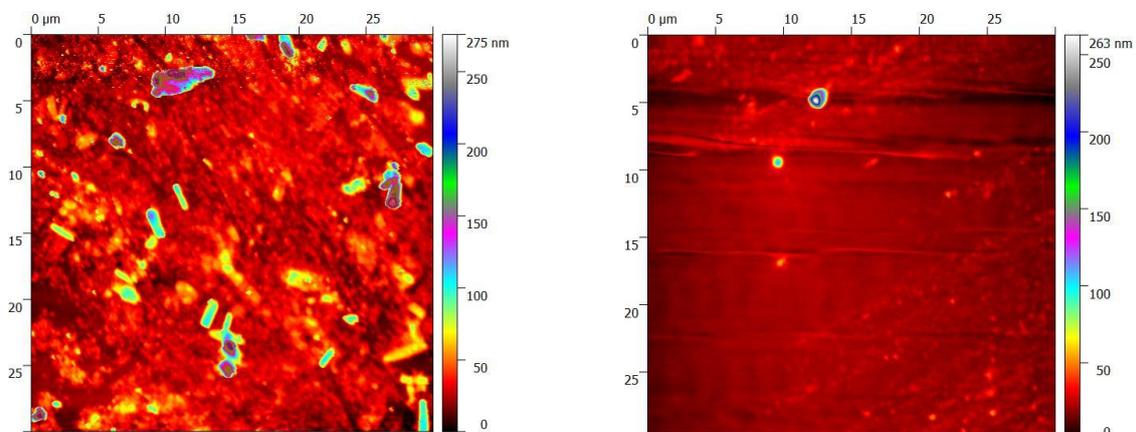
Die Ursache dafür ist die durch die Wiederverwendung zunehmende Verunreinigung des Quarzglases. Dies konnte durch Oberflächenaufnahmen mit dem AFM (Atomic Force Microscopy) von der Oberfläche des Quarzglases bestätigt werden.



**Abbildung 21:** Mikroskopaufnahme vom Mikrofluidkanal im gerissenen PDMS, 40 fach vergrößert.



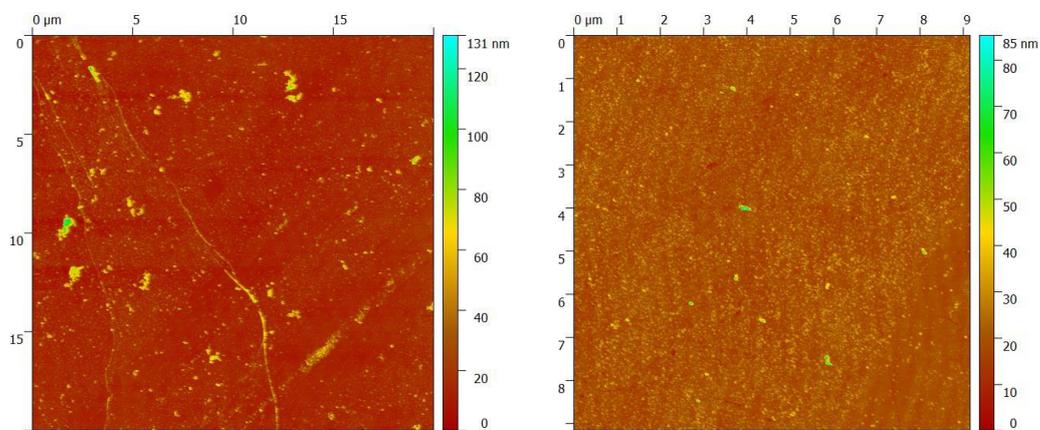
**Abbildung 22:** Mikroskopaufnahme vom Mikrofluidkanal im gerissenen PDMS, 40 fach vergrößert.



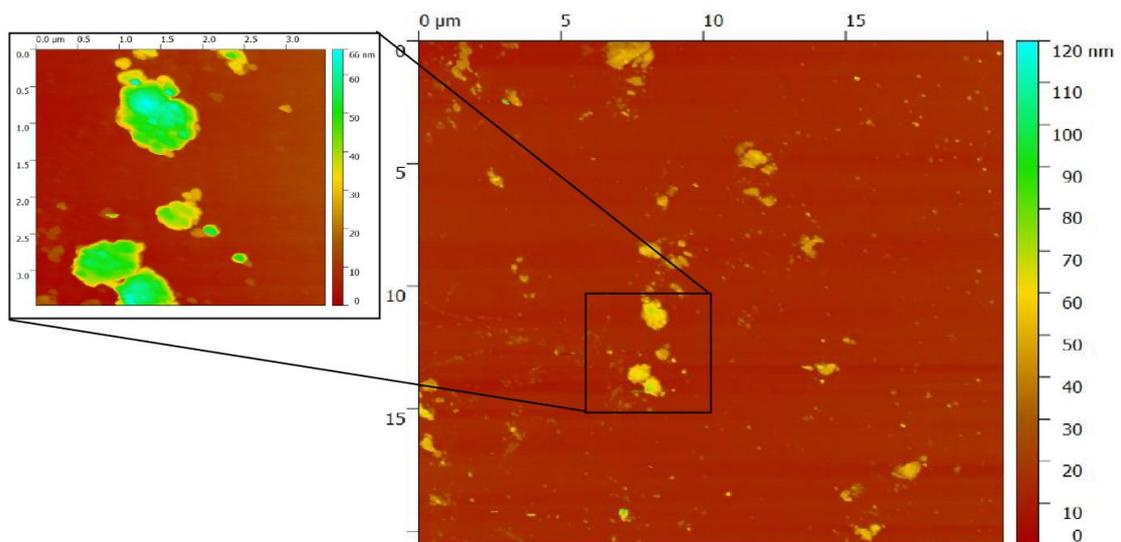
**Abbildung 23:** Abbildung der Oberflächenstruktur des Quarzglases von der *a)* Vorderseite und *b)* Rückseite mit dem AFM.

Wie in der Abbildung 23 zu erkennen ist, befinden sich besonders auf der Vorderseite des für die Chips verwendeten Quarzglas starke Verunreinigungen. Diese sind bis zu 250 nm hoch. Mit Gwyddion wurde eine mittlere Rauigkeit von 12,3 nm für die Vorderseite und 3,24 nm für die Rückseite des Quarzglas bestimmt. Unter Betrachtung der gesamten Kanalhöhe von 6  $\mu\text{m}$  wird deutlich, dass bei dieser unebenen Oberfläche keine geschlossene Kontaktfläche zustande kommt und sich Areale ohne Kontakt bilden. Dies könnte auch die Ursache der Risse sein.

Um zu testen ob eine andere Reinigung effektiver ist, wurden zusätzliche Reinigungen der Quarzgläser mit n-Heptan bzw. Hellmanex III durchgeführt.



**Abbildung 24:** Abbildung der Oberflächenstruktur des Quarzglas von der **a)** Vorderseite und **b)** Rückseite mit dem AFM nach zweifacher Reinigung mit Caro'scher Säure (2 Schwefelsäure : 1 Wasserstoffperoxid für jeweils 20 min und mit n-Heptan für 4 h.



**Abbildung 25:** Abbildung der Oberflächenstruktur des Quarzglas mit dem AFM nach zweifacher Reinigung mit Caro'scher Säure (2 Schwefelsäure : 1 Wasserstoffperoxid) für jeweils 20 min und mit Hellmanex III für 2x 5 min bei 65 °C im Ultraschallbad.

Im Vergleich zu der Abbildung 23 wird in der Abbildung 24 deutlich, dass die Behandlung mit n-Heptan die PDMS-Rückstände vom Quarzglas vermindert. Die Rückstände sind ungefähr 40 nm hoch, maximal 85 nm. Die Oberfläche ist insgesamt sehr ungleichmäßig. Dies wird durch die mit Gwyddion bestimmten mittlere Rauigkeit von 5,26 nm für die Vorderseite und 2,98 nm für die Rückseite des Quarzglases bestätigt. Wie in Abbildung 25 dargestellt ist, bewirkt die Behandlung mit Hellmanex III eine gleichmäßigere Oberflächenstruktur mit einer Höhe von 10-20 nm und mit nur wenigen Erhebungen von bis zu 66 nm. Die mittlere Rauigkeit beträgt hier 2,48 nm. Der Vergleich der mittleren Rauigkeit von den mit Caro'scher Säure und den zusätzlich mit n-Heptan oder Hellmanex III gereinigten Quarzgläsern zeigt eine deutlich ebenere Oberfläche und somit eine Verbesserung der Reinigung. Der Vergleich zeigt auch, dass die Verunreinigungen und PDMS-Rückstände mit Hellmanex III besser als mit n-Heptan vom Quarzglas abgelöst werden können.

Dies bestätigte sich auch bei der Herstellung neuer Chips. Dafür wurden PDMS-Chip und das gereinigte Deckglas zunächst in Aceton, Ethanol und Wasser gereinigt, sowie für 30 s plasmaoxidiert. Die Bindung zwischen den PDMS-Chips und den zusätzlich mit n-Heptan bzw. Hellmanex III gereinigten Quarzgläsern trat sofort ein. Dabei bildete sich zwischen dem PDMS und dem mit Hellmanex III behandelten Quarzglas schneller eine stärkere Bindung aus als bei dem mit n-Heptan behandeltem Quarzglas.

Trotz Plasmaoxidation von 30 s ist das PDMS nicht gerissen. Die unebene Oberfläche der Quarzgläser könnte also nicht nur die Bindung zwischen PDMS und Quarzglas verhindern, sondern zusätzlich zum Einreißen des PDMS führen. Zwischen den bindenden Bereichen des PDMS könnten die Schmutzpartikel eingeschlossen worden sein und was auf Grund der auf das PDMS erhöht einwirkenden mechanischen Kräfte zu dessen Reißen führt.

Die Reinigung mit Caro'scher Säure reicht allein nicht aus. Die zusätzliche Reinigung mit Hellmanex III ermöglicht eine ausreichend saubere und ebene Oberfläche des Quarzglases, sodass das PDMS gut bindet.

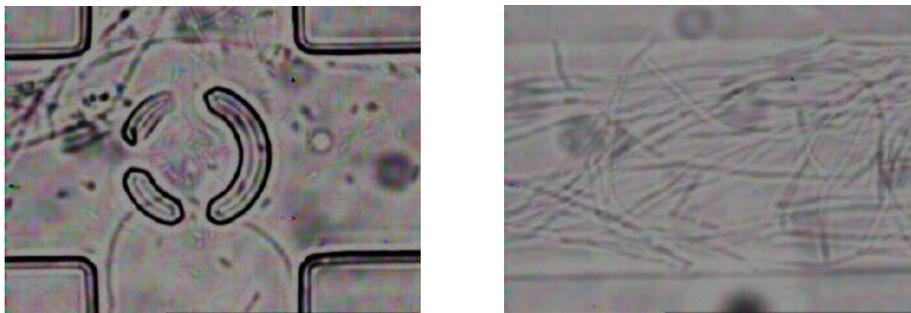
Die Bindung des PDMS am Quarzglas kann durch einen zusätzlichen Reinigungsschritt mit Hellmanex III auch bei einer Mehrfachverwendung des Quarzglases gewährleistet werden.

### 4.3 Fangen der Zellen

Ein Ziel dieser Arbeit war die Beobachtung der Zellteilung von in der Pfostenstruktur des Mikrofluidkanals gefangener *E.coli*.

Bei der Verwendung von Zellen im Mikrofluidkanal sollte besonders auf eine mögliche Kontamination geachtet werden. Kontaminationen sind nicht nur für die Kultivierung oder Detektion der Zellen störend, sondern können auch den Kanal verstopfen.

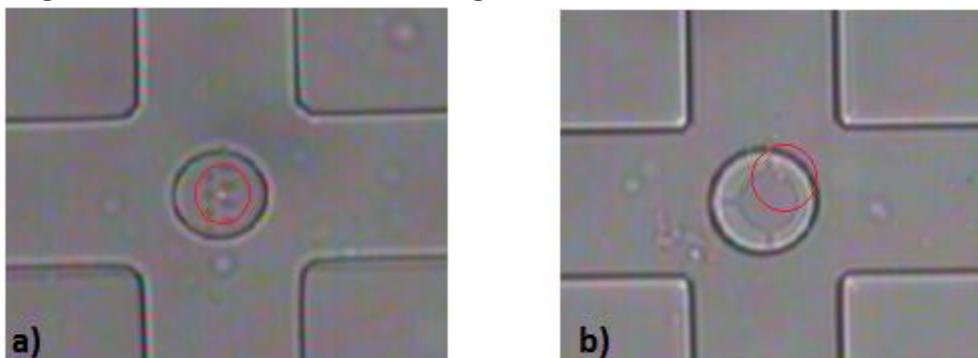
Dies wird in Abbildung 26 deutlich. Die dort sichtbare Kontamination mit langen Fäden führte zu einer Verstopfung des gesamten Kanals und erschwerte das Fangen der Zellen und eine längere Beobachtung der gefangenen Zellen.



**Abbildung 26:** Festgesetzte längliche Fäden aus der *E.coli* Kultur **a)** an der Multi-Struktur und **b)** im Kanal des Mikrofluidsystems.

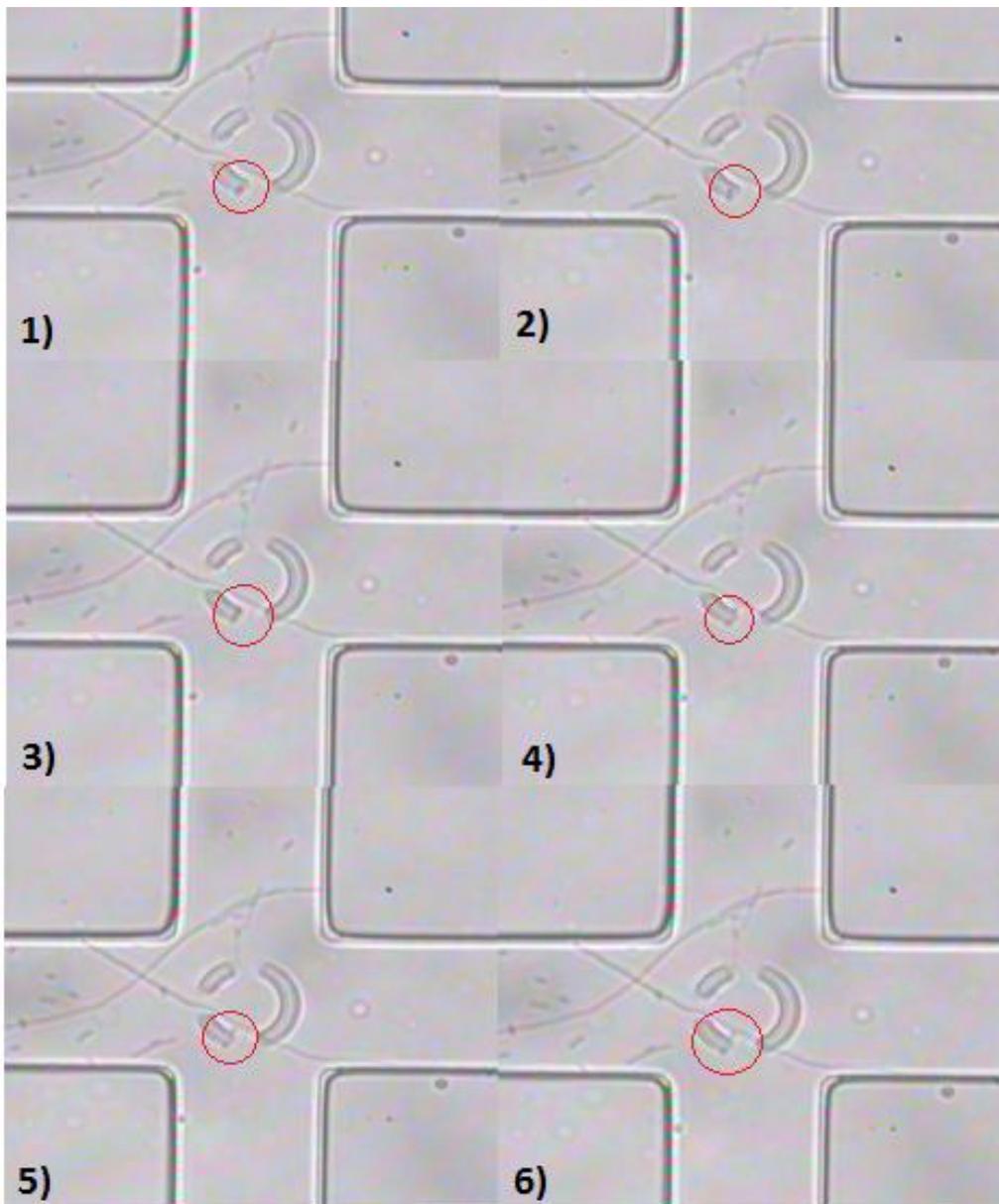
Für das Fangen der Zellen wurden die in den Abbildungen 12 - 13 dargestellten Strukturen verwendet.

Das Fangen der Zellen war mit der rundlich angeordneten Pfostenstruktur (Multi) am einfachsten möglich. Dabei musste der Fluss aus dem Probenreservoir in mittlerer Höhe in die Kreuzung einfließen, sodass die Zellen mittig auf die Öffnung der Struktur zuströmten. Der einfache Eintritt der Zellen in die Pfostenstruktur ist vorteilhaft. Auf Grund der seitlichen Öffnungen strömen die Zellen jedoch leicht, ohne an der Struktur hängen zu bleiben, wieder raus. Dies gestaltete sich für die Kultivierung als Problem.



**Abbildung 27:** Im Mikrofluidkanal in der **a)** Single- und **b)** Multi- Pfostenstruktur gefangene *E.coli* bei einer Spaltbreite zwischen Struktur und Kanalwand von **a)** 680 nm und **b)** 550 nm.

In der Single-Pfostenstruktur ist die gefangene Zelle zwischen den einzelnen Pfeilern fester fixiert und kann nur schwer rausgeströmt werden als bei der Multi-Struktur. Nachteilig ist jedoch die Schwierigkeit die Zelle in dieser Struktur zu fangen. Bei einer zu hohen Strömungsgeschwindigkeit prallen die Zellen eher von der Struktur ab und strömen um diese herum. Bei einem langsameren Fluss gestaltet sich dahingegen die Beeinflussung der Strömungsrichtung als schwieriger. Zudem ist es mit der Single-Struktur, im Gegensatz zu der Multi-Struktur, bisher nicht möglich gewesen mehrere Zellen gleichzeitig zu fangen. Dies ist besonders für die Einzelzellanalyse vorteilhaft, aber für die Detektion zellulärer Stoffwechselprodukte in geringer Konzentrationen nachteilig.



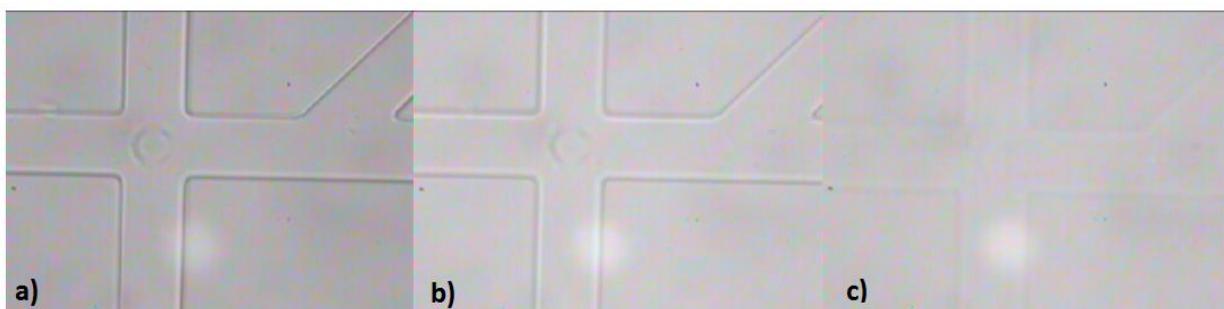
**Abbildung 28:** Mikroskopaufnahmen der in der Multi-Pfostenstruktur gefangenen Zelle und Beobachtung der Zellteilung bei 40 facher Vergrößerung zu den Zeiten  $t_1) = 6$ ,  $t_2) = 12$ ,  $t_3) = 14$ ,  $t_4) = 17,75$ ,  $t_5) = 18$ ,  $t_6) = 18,25$ .

Um die Zellteilung von *E. coli* im Mikrofluidikkanal zu beobachten muss die Zelle über den gesamten Beobachtungszeitraum in der Pfostenstruktur gefangen bleiben. Das Fangen der Zellen bei der Verwendung der Single-Struktur dauert bedeutend länger als bei der Multi-Struktur und es können nur einzelne Zellen gefangen werden. Dafür sind die Zellen darin fester gefangen.

In Abbildung 28 ist die Zellteilung einer in der Multi-Struktur des Mikrofluidikkanals gefangenen Zelle gezeigt. Dabei nimmt die Zelle zunächst an Größe zu 2). Bei der beginnenden Abschnürung nimmt sie dann eine dickere, längliche Form an 3), wobei wie in Abbildung 28 zu erkennen, an der Mitte der Zelle eine Einschnürung stattfindet 4). Diese Einschnürung wird immer enger 5), sodass es zur Trennung der Zellen kommt 6).

#### 4.4 Wechselwirkung mit dem Medium

Beim Fangen der Zellen fiel auf, dass der Kanal und die Strukturen immer undeutlicher wurden. Dies war zuvor unter der Verwendung von Reinstwasser in den Kanälen nicht aufgetreten, sodass diese Opazität auf das verwendete TB-Medium zurück zu führen ist. Die einzelnen Medienbestandteile wurden daraufhin in den verwendeten Konzentrationen einzeln injiziert und die Wirkung auf das PDMS beobachtet.



**Abbildung 29:** Mikroskopaufnahme des Mikrofluidikkanals bei 40 facher Vergrößerung mit der Zunahme der Opazität des PDMS unter Einströmung von TB-Medium in den Mikrofluidikkanal. Die Zeitdifferenz von **a-b)** betrug 25 min und von **b-c)** 5 min.

Dabei wurde beim Pepton in der Konzentration von 12 g/L festgestellt, dass das PDMS an bestimmten Kanalregionen opak wird. Auf Grund der Permeabilität betrifft dieser Effekt auch das umliegende PDMS außerhalb des Kanals.

Die Wechselwirkung zwischen PDMS und Pepton bzw. Medium lässt innerhalb von 1 - 3 h nach. Das Pepton bzw. das Medium scheint weiter in den PDMS-Chip zu diffundiert, sodass die Konzentration an den einzelnen Stellen wieder sinkt und die Opazität wieder abnimmt.



**Abbildung 30:** Es ist die Wechselwirkung von PDMS und Pepton abgebildet. Der Probenfluss (von rechts) staut sich an dem Riss im Kanal und bewirkt die Opazität des PDMS. Der Teil des Kanals rechts vom Riss ist dabei kaum mehr zu erkennen.

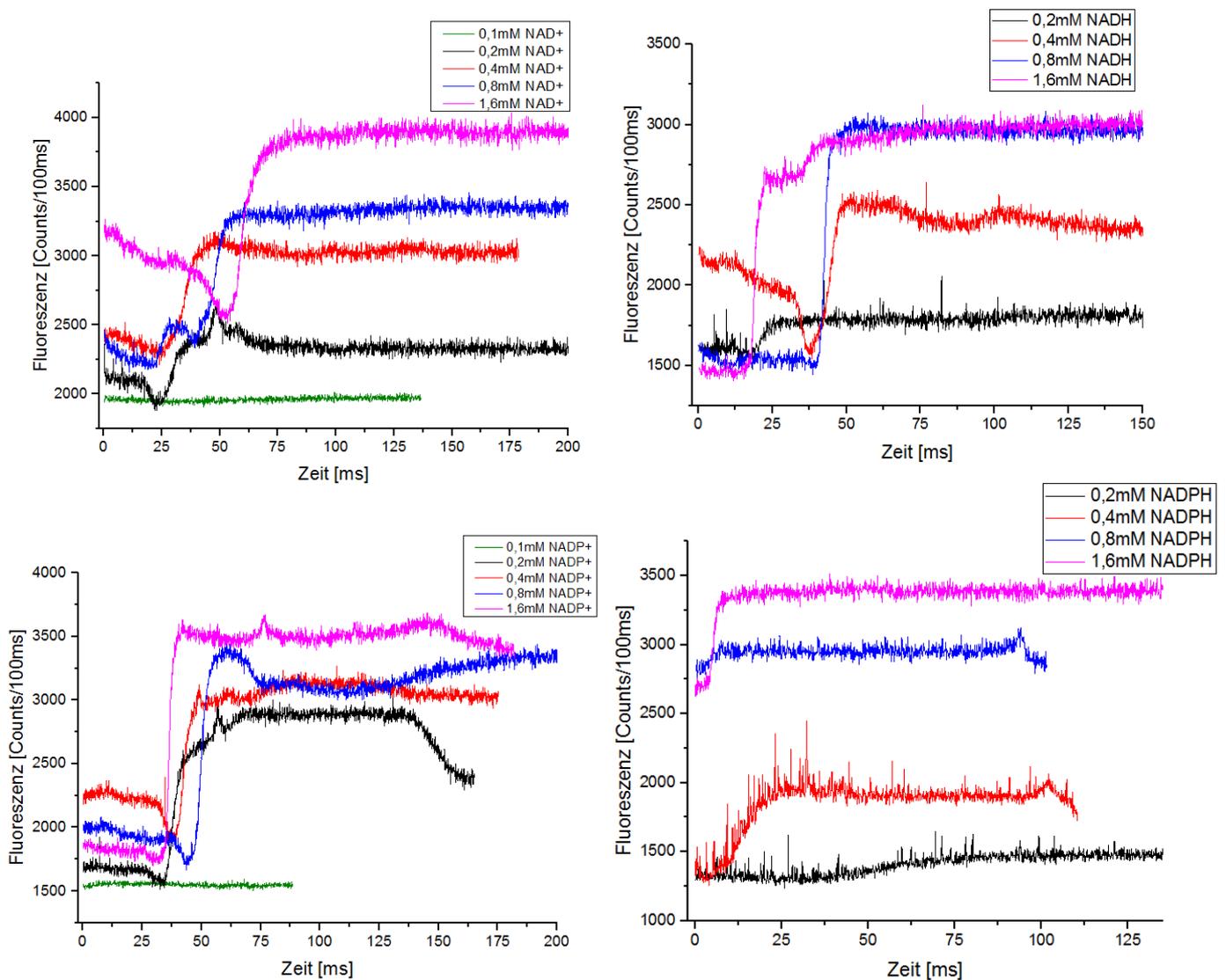
Die Opazität tritt besonders bei den Kanalregionen nahe der Kreuzung auf. Dort wurde h-PDMS verwendet, sodass zu vermuten ist, dass diese Wechselwirkung auf das h-PDMS zurück zu führen ist. Um dies zu testen wurde ein Chip aus h-PDMS mit 12 g/L Pepton befüllt. Die Opazität war auch hier an der Kanalkreuzung besonders stark, schien sich aber weiter auszubreiten als bei dem Chip mit dem punktförmig aufgetragenen h-PDMS. Dass die Opazität auf die Wechselwirkung zwischen h-PDMS und Pepton zurück zu führen ist, konnte nicht zweifelsfrei bewiesen werden, ist jedoch zu vermuten.

## 4.5 Detektion der Cofaktoren

Um die Cofaktoren einzelner an den Strukturen gefangener Zellen detektieren zu können, muss zunächst die Detektionsgrenze bestimmt werden.

Dafür wurden die oxidierten und reduzierten Formen der Cofaktoren in verschiedenen Konzentrationen detektiert. Dies geschah bei zwei verschiedenen Injektionsmethoden.

Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.



**Abbildung 31:** Detektion der Fluoreszenzintensität der oxidierten und reduzierten Formen der Cofaktoren in verschiedenen Konzentrationen im UV-Bereich bei einer Anregung von 266 nm. Es handelt sich um eine *Float Injektion*.

In der Abbildungen 31 ist bei allen Konzentrationen der verschiedenen Cofaktoren ein starker Anstieg der Fluoreszenzintensität und ein darauf folgender konstante Fluoreszenzintensität zu erkennen. Bei der *Float Injektion* wird zunächst Reinstwasser über

den Detektionspunkt geströmt, danach konstant die Probe. Dies wird hier mit dem relativ konstanten Verlauf einer geringeren Fluoreszenzintensität und den folgenden steilen Anstieg sehr gut deutlich. Vor dem steilen Anstieg der detektierten Fluoreszenz sinkt das Signal zunächst auf ein Minimum. Ursache dafür ist, dass beim vorherigen Load ein kleiner Teil der Probe aus dem Probenreservoir bereits zur Kanalkreuzung diffundiert ist und vom Probenstrom mit zur Detektionsstelle geströmt wird. Die Konzentration der Cofaktoren ist dann im Kanal, welcher zum Probenreservoir führt, gering. Deshalb wird beim Start der Detektion und der damit verbundene Änderung des Volumenstroms zunächst der gering konzentrierte Probenanteil über die Detektionsstelle strömt. Erst danach wird die Detektionsstelle von der Probe in ihrer eigentlichen Konzentration überströmt.

Wie in Tabelle 3 verdeutlicht wird, nimmt die Höhe der detektierten Fluoreszenzintensität zu der geringeren Konzentration hin ab. Außerdem wird die Differenz zwischen der maximalen und minimalen detektierten Fluoreszenz mit geringerer Konzentration tendenziell ebenfalls kleiner.

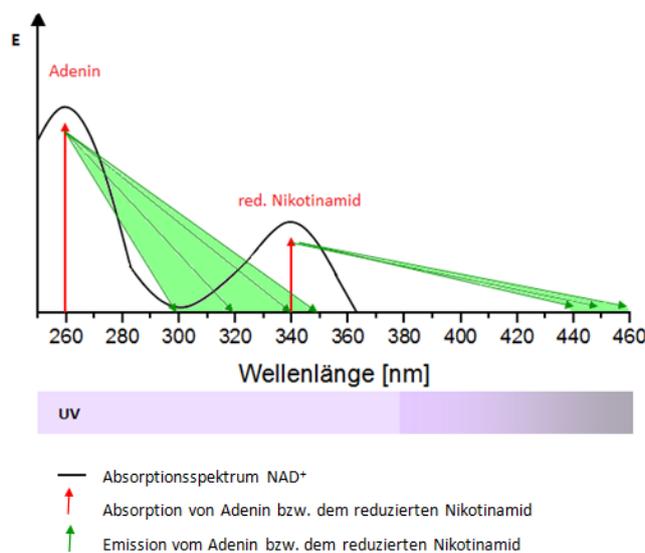
**Tabelle 3:** Es sind die maximalen und minimalen detektierten Fluoreszenzintensitäten der Cofaktoren NAD<sup>+</sup>, NADH, NADP<sup>+</sup> und NADPH in verschiedenen Konzentrationen und die berechnete Differenz aufgelistet. Es handelt sich um eine *Float Injektion*.

Float	Fluoreszenz [Counts/100ms]	NAD <sup>+</sup>	NADH	NADP <sup>+</sup>	NADPH
1,6 mM	~max.	3800	3000	3700	3300
	~min.	2600	1400	1750	(2700)
	Differenz	1200	1600	1950	(600)
0,8 mM	~max.	3300	2900	3300	3100
	~min.	2300	1500	1700	(2600)
	Differenz	1000	1400	1600	(500)
0,4 mM	~max.	3000	2400	3200	2000
	~min.	2250	1600	1800	(1300)
	Differenz	750	800	1400	(700)
0,2 mM	~max.	2300	1800	2900	1400
	~min.	1900	1600	1600	(1300)
	Differenz	400	200	1300	(100)

Die reduzierte Form der Cofaktoren weist im Vergleich zu der oxidierten Form eine geringere Fluoreszenzintensität auf.

Dies kann unter Betrachtung des in Abbildung 32 dargestellten Absorptionsspektrums von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$  erklärt werden. Daraus geht hervor, dass  $\text{NAD}^+$  bei 260 nm ein Absorptionsmaximum besitzt und  $\text{NADH}$  bei 260 nm und 340 nm.  $\text{NADH}$  besitzt also zwei Absorptionsmaxima [11].

Die Absorption von  $\text{NAD}^+$  ist bei einer Wellenlänge von 260 nm maximal. Die Fluoreszenz geht dabei von dem Adenin und dem Nikotinamidring aus. Die Emission von Adenin findet im Wellenlängenbereich von 300-350 nm statt [24].

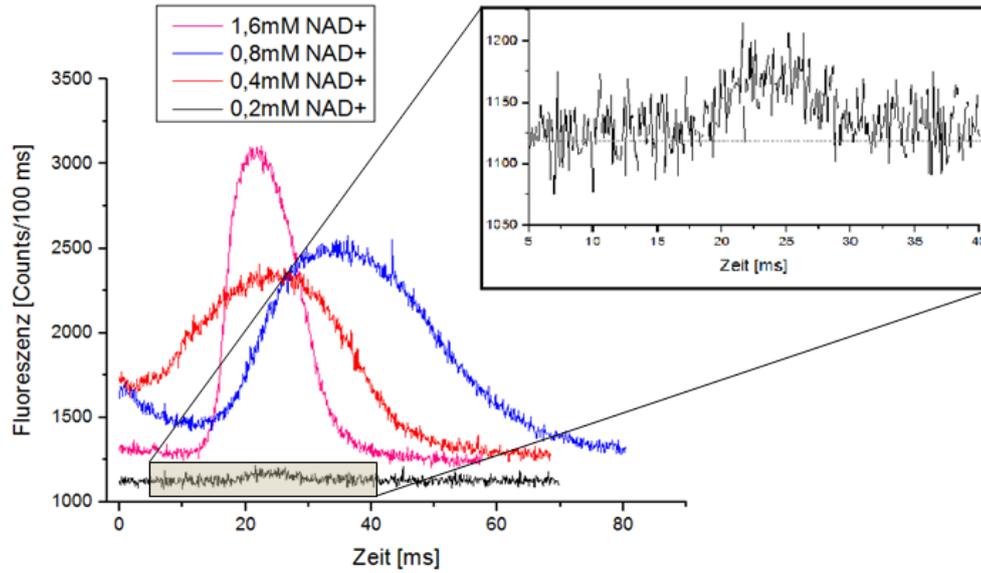


**Abbildung 32:** Absorptionsspektrum von  $\text{NAD}^+$  (in schwarz und die Maxima in rot) mit zusätzlich eingezeichneter Emission des Adenin bei 300-350 nm und des Nikotinamids im Bereich von 450 nm.

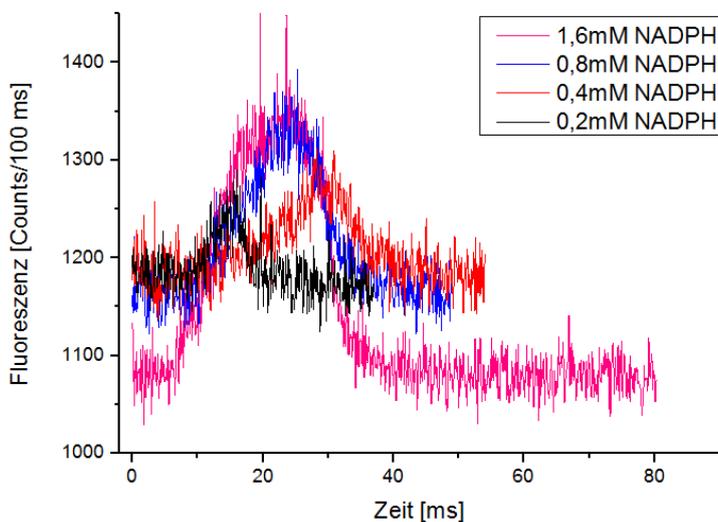
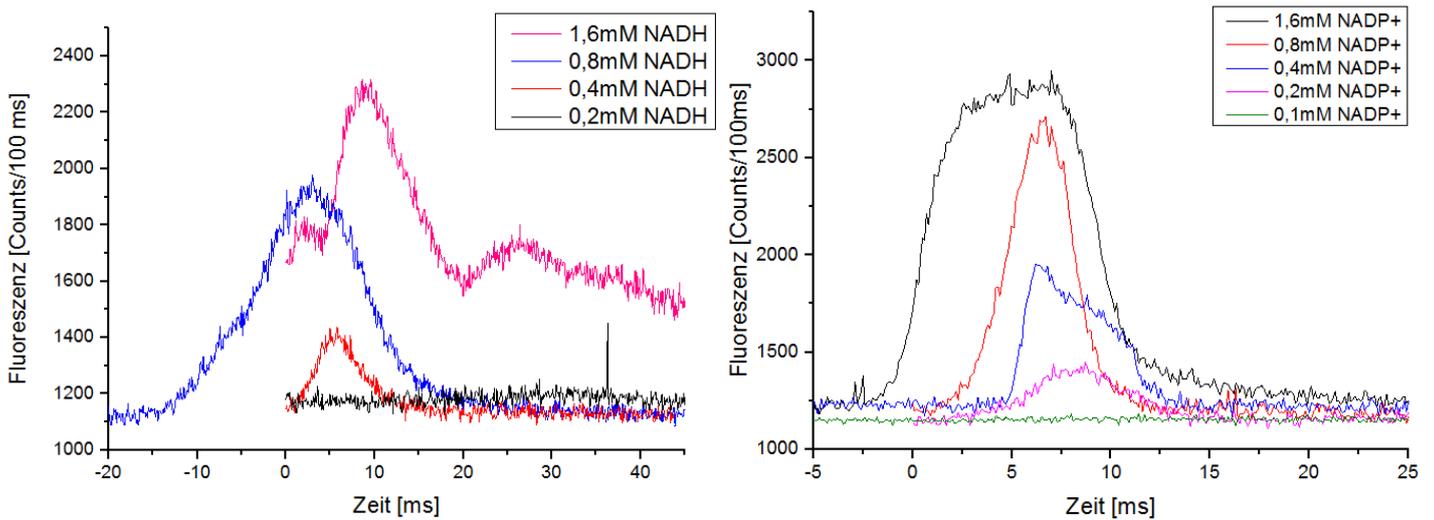
Da Nikotinamid im Bereich von 340 nm das Absorptionsmaximum besitzt [24], führt die Emission des Adenin (300-350 nm) zu einer Anregung des Nikotinamids. Die darauf folgende Emission findet bei 450 nm statt [24]. Auf Grund dieser Absorption des vom Adenin emittierten Lichts mit der Wellenlänge von 300-350 nm ist die detektierte Intensität der UV-Strahlung geringer (Stokes' Shift). Deshalb weisen die reduzierten Cofaktoren eine geringere detektierte Intensität im Ultravioletten Bereich auf als die oxidierten Cofaktoren.

Bei den reduzierten Cofaktoren ist dabei die in Abbildung 35 – 36 dargestellt Detektion der Intensität im sichtbaren Bereich möglich.

Um die Probe über die Detektionsstelle zu strömen, kann außerdem eine weitere Injektionsmethode, die *Pinched Injektion*, angewendet werden. Die detektierte Fluoreszenzintensität ist für diesen Fall in den folgenden Abbildungen aufgetragen.



**Abbildung 33:** Detektierte Fluoreszenzintensität von NAD<sup>+</sup> bei einer Anregung von 266 nm. Es handelt sich um eine *Pinched Injektion*.



**Abbildung 34:** Detektion der Fluoreszenzintensität der oxidierten und reduzierten Formen des Cofaktor NADP<sup>+</sup> und der reduzierte Cofaktor NADH in verschiedenen Konzentrationen im UV-Bereich bei einer Anregung von 266 nm. Es handelt sich um eine *Pinched Injektion*.

Die maximale und minimale Fluoreszenzintensität der verschiedenen Konzentrationen der einzelnen Cofaktoren sind für die *Pinched Injektion* in der folgenden Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 4:** Es sind die maximalen und minimalen detektierten Fluoreszenzintensitäten der Cofaktoren NAD<sup>+</sup>, NADH, NADP<sup>+</sup> und NADPH in verschiedenen Konzentrationen und der berechnete Differenz aufgelistet. Es handelt sich um eine *Pinched Injektion*.

Pinched	Fluoreszenz [Counts/100ms]	NAD <sup>+</sup>	NADH	NADP <sup>+</sup>	NADPH
1,6 mM	~max.	3100	3100	2800	1350
	~min.	1200	1300	1200	1100
	Differenz	1900	1800	1600	250
0,8 mM	~max.	2500	1900	2600	1300
	~min.	1200	1100	1100	1100
	Differenz	1300	800	1500	200
0,4 mM	~max.	2300	1400	1900	1250
	~min.	1200	1100	1200	1200
	Differenz	1100	300	700	50
0,2 mM	~max.	1200	1100	1400	1200
	~min.	1100	1000	1100	1100
	Differenz	100	100	300	100

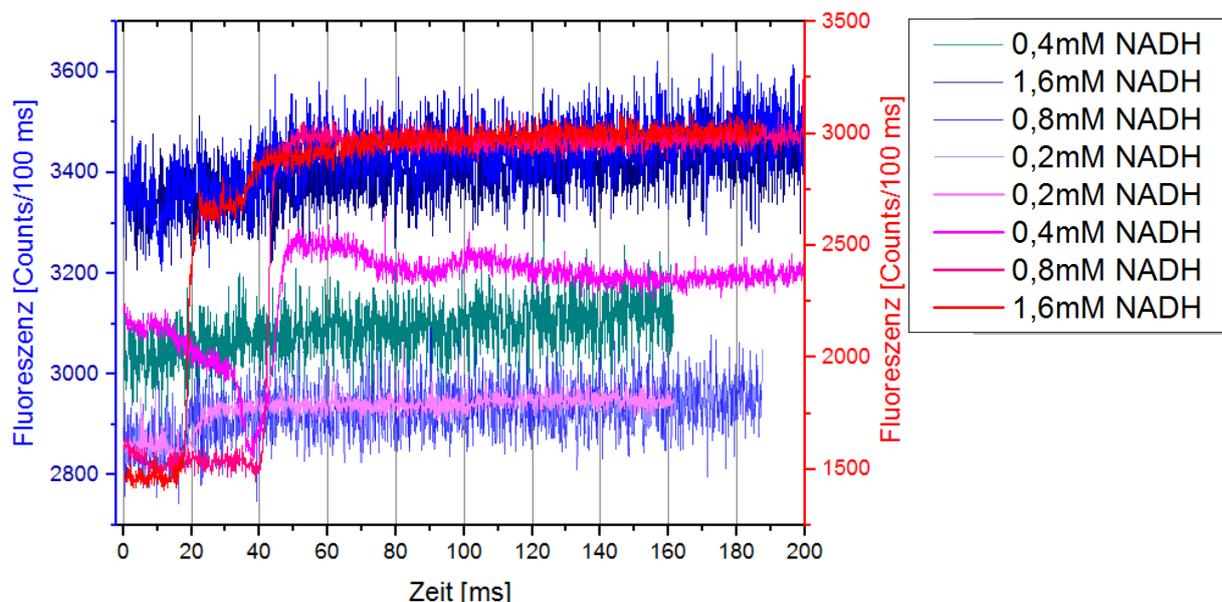
Die Peaks der Fluoreszenzintensität sind bei der *Pinched Injektion* sehr ungleichmäßig scharf. Dies scheint auf die Spannung beim *Dispose* zurück zu führen zu sein. An den Probenkanal (3) und dem gegenüber liegenden (während des *Loads* mit Probe eingeströmten) Kanal (2) wurde für die Detektion keine Spannung angelegt. Dadurch schienen ein Nachfließen der Probe und eine Verbreiterung des Peaks möglich zu sein. Ein schärferer Verlauf des Peaks ist mit einer negativen Spannung an den mit Probe gefüllten Kanälen (3)(2) zu erreichen, da somit das Nachströmen der Probe verhindert wird.

Auch unter Verwendung der *Pinched Injektion* weist die oxidierte Form eine höhere Fluoreszenzintensität auf als die reduzierte Form. Dabei ist die Differenz der maximal gemessenen Fluoreszenzintensität der reduzierten und oxidierten Form bei der *Pinched Injektion* höher als bei der *Float Injektion*.

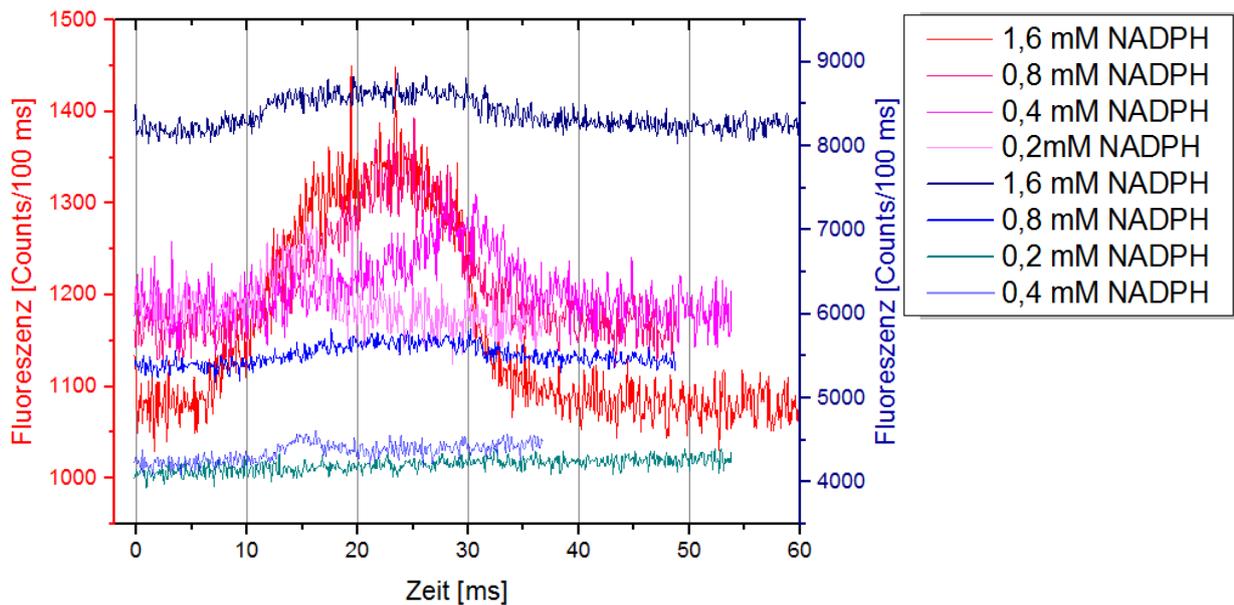
Die Fluoreszenzintensität der Cofaktoren wurde bisher im UV-Bereich detektiert. Die Detektion im sichtbaren Bereich kann bei den reduzierten Cofaktoren eine gute Ergänzung darstellen [11].

In den folgenden Abbildungen 35 - 36 wird der Zusammenhang zwischen der Detektion im UV- und visuellen Bereich hervorgehoben.

Mit dem Anstieg der im UV-Bereich gemessenen Fluoreszenzintensität ist auch ein Anstieg des VIS-Signals zu erkennen. Dieser Anstieg ist dabei nicht so stark wie im UV-Bereich, da die Absorption des reduzierten Nikotinamidrings bei 340 nm somit geringer ist, als die Absorption des Adenins bei 266nm [11]. Das Licht welches vom Adenin absorbiert und dann emittiert wurde wird auf Grund der verschobenen Wellenlänge vom Nikotinamid absorbiert. Dieses wird vom Nikotinamid emittiert, was dem im VIS-Bereich detektierten Licht entspricht. Daher wird am Detektor weniger Licht detektiert, was sich auch in den Abbildungen 35-36 an dem geringeren Anstieg des detektierten VIS-Signals zeigt.



**Abbildung 35:** Es sind die Messwerte der Fluoreszenzintensität (UV in rot, VIS in blau) von NADH in den verschiedenen Konzentrationen dargestellt. Es handelt sich um eine *Float Injektion*.



**Abbildung 36:** Es sind die Messwerte der Fluoreszenzintensität (UV in rot, VIS in blau) von NADH in den verschiedenen Konzentrationen dargestellt. Es handelt sich um eine *Pinched Injektion*.

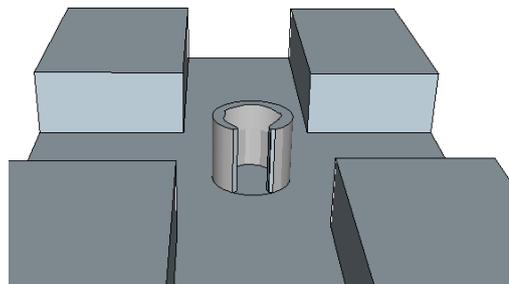
Die Detektion der 0,1 mM Proben ergab kein deutliches Signal und ist mit dem hier verwendeten Aufbau und Kanalkonstruktion nicht möglich. Die Detektionsgrenze aller Cofaktorenproben liegt somit bei 0,2 mM.

Ziel dieser Arbeit ist es u.a. die für die Detektion der Cofaktoren aus *E.coli* benötigte minimale Zellzahl zu bestimmen. Die Gesamtkonzentration der Cofaktoren in *E.coli* beträgt 2,895 mM [23]. Für das Volumen von *E.coli* werden  $2,75 \cdot 10^{-15}$  L [36] angenommen. Für die Detektion würden die Cofaktoren ausgehend von der Zelle, und mit Medium verdünnt zum Detektionspunkt geströmt werden. Als Volumen für die verdünnten Cofaktoren wird ausgehend von der Kanaltiefe (6  $\mu\text{m}$ ), der Kanalbreite (30  $\mu\text{m}$ ) und der Bandenbreite (Länge von *E.coli*: 3  $\mu\text{m}$ ) ein Volumen von  $5,4 \cdot 10^{-16}$  L angenommen. Somit beträgt die Cofaktorkonzentration in der Bande, ausgehend von einer Zelle, 0,0147 mM. Um eine für die Detektion minimale Cofaktorkonzentration von 0,2 mM zu erreichen, werden demnach 13,6 Zellen benötigt.

## 5. Zusammenfassung und Perspektive

In dieser Arbeit wurden *E.coli* im Mikrofluidkanal in Pfostenstrukturen gefangen und Cofaktoren unter der Verwendung zweier Injektionsmethoden eingeströmt und detektiert. Das Fangen der *E.coli* in den zwei verwendeten, unterschiedlichen Pfostenstrukturen wurde verglichen, sodass auf Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse für den weiteren Verlauf des Projekts eine Mikrofluidikstruktur mit verbesserter Pfostenstruktur erstellt werden kann. Die zwei verwendeten Pfostenstrukturen sind der Single und der Multi. Der Single besteht aus mehreren einzelnen, nebeneinander angeordneten Pfosten, die in der Mitte der Kanalkreuzung positioniert sind (Abb.12). Der Multi ist dahingegen eine kreisförmige Struktur die in der Mittel der Kanalkreuzung angeordnet und an drei Seiten geöffnet ist, sodass Zellen einströmen können (Abb. 12-13).

Das Fangen der *E.coli* mit der Multi-Pfostenstruktur war schneller und einfacher möglich als mit der Single-Pfostenstruktur. Daher sollte die neu zu entwickelnde Struktur an dem Multi orientiert sein. In der Arbeit wurde festgestellt, dass die *E.coli* im Single fest gefangen werden können. Dahingegen bieten die seitlichen Öffnungen des Multi zwar eine zusätzliche Strömungskontrolle, sodass die *E.coli* auch innerhalb der Struktur gezielt geströmt werden können, die *E.coli* werden dennoch an diesen Öffnungen leicht hinaus geströmt. Da dies für eine Beobachtung der Zellreaktion von Nachteil ist, sollte dafür eine geschlossene Form der Multi-Pfostenstruktur verwendet werden. Wenn die *E.coli* die im Vergleich zur Kanalwand niedrigen Pfosten überströmen können, ist ein Fangen der *E.coli* kaum möglich. Eine mögliche verbesserte Pfostenstruktur ist daher in der Abbildung 37 dargestellt.



**Abbildung 37:** Eine mögliche verbesserte Pfostenstruktur zum Fangen von *E.coli*.

In der Arbeit wurden außerdem zwei Cofaktoren, jeweils in der reduzierten und oxidierten Form, im Mikrofluidkanal unter Verwendung zweier verschiedener Injektionsmethoden detektiert. Dabei wurde eine Detektionsgrenze von 0,2 mM bestimmt. Weiterführende Themen werden die Optimierung der Struktur und die Detektion geleachter Cofaktoren sein. Dafür werden *E.coli* in Pfostenstrukturen gefangen, kultiviert und möglichen Stressoren ausgesetzt. Wenn die Stressoren die Permeabilität der Zellwand bewirken, gelangen

Stoffwechselprodukte der Zelle (u.a. die in dieser Arbeit untersuchten Cofaktoren) in den Mikrofluidkanal und können detektiert werden. Dabei ist von einer Verdünnung der Cofaktoren im Mikrofluidkanal auszugehen. Mit der hier bestimmten Detektionsgrenze konnte, unter Berücksichtigung der Verdünnung im Kanal, die für die Detektion der Cofaktoren aus *E.coli*, minimal benötigte Zellzahl von 14 Zellen bestimmt werden. Dies kann auch bei der Konstruktion einer verbesserten Pfostenstruktur berücksichtigt werden. Die Größe der Pfostenstruktur könnte demnach auf das Volumen der benötigten Zellzahl angepasst werden. Eine Möglichkeit das Fangen der Zellen zu erleichtern ist das Volumen innerhalb der Pfostenstruktur auf das Gesamtvolumen der minimal benötigten Zellzahl zu begrenzen. Da die Chips im Single-Use verwendet werden, kann dadurch auch bei der Verwendung eines neuen Chips eine ungefähr gleiche Zellzahl gefangen werden. Somit würden reproduzierbare Bedingungen geschaffen werden.

Eine weitere Möglichkeit um die Anzahl gefangener Zellen zu regulieren ist die Verengung des Eingangs der Pfostenstruktur. Wo sonst nur kleine *E.coli* Konzentrationen verwendet werden können, erlaubt diese Struktur die Verwendung von höheren Konzentrationen, da das Einströmen der *E.coli* in die Pfostenstruktur erschwert ist. Ein Ausströmen der Zellen aus der Pfostenstruktur ist auf Grund des entgegengesetzten Volumenstroms und der zusätzlich verengten Öffnung unwahrscheinlich.

Das Fangen der *E.coli* kann durch eine Optimierung der Pfostenstrukturen erleichtert, verkürzt und zudem reproduzierbar gemacht werden. Auf Grund des schnelleren Fangens würde die Beeinflussung der Detektion durch die sich entwickelnde Opazität (als Folge der Wechselwirkung des PDMS mit dem Pepton als Medienbestandteil) als geringer vermutet werden. Dies und eine Mediumoptimierung sollten in weiteren Forschungsansätzen geprüft werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] S.L.Faley et al., *Microfluidic single cell arrays to interrogate signalling dynamics of individual, patient-derived hematopoietic stem cell*, **2009**
- [2] D.G. Robertson et al., *Metabolomics in toxicology: preclinical and clinical applications*, **2011**
- [3] 14 Christopher Probst et al, *Polydimethylsiloxane (PDMS) Sub-Micron-Traps for single-cell analysis of bacteria*, **2013**
- [4] R.M. Johann, *Cell trapping in microfluidic chips*, **2006**
- [5] K.Ramser, D. Hanstorp, *Optical manipulation for single cell studies*, **2010**
- [6] W.Hellmich et al, *Single cell manipulation, analytics, and label-free protein detection in microfluidic devices for systems nanobiology*, **2005**
- [7] A. Ros et al., *Microfluidic single-cell analysis of intracellular compounds*, **2008**
- [8] S.Faley et al., *Microfluidic platform for real time signal analysis of multiple single t cells in parallel*, **2008**
- [9] . Kim et al., *Programmed trapping of individual bacteria using micrometre.cize-sieves*, **2011**
- [10] F.Lottspeicher, H.Zorbas, *Bioanalytik*, Spektrum, **1998**
- [11] Campbell, *Biology*, **2009**
- [12] L. Galla, D. Greif, J. Regtmeier and D. Anselmetti, *Microfluidic carbon-blackened polydimethylsiloxane device with reduced ultra violet background fluorescence for simultaneous two-color ultra violet/visible-laser induced fluorescence detection in single cell analysis*, **2012**
- [13] P. Tebeling, *Introduction to Microfluidics*, Oxford, **2005**
- [14] [elveflow.com/microfluidic-tutorials/cell-biology-imagingg-reviews-and-tutorials/microfluidics-for-cell-biology/concepts-and-methodologies/](http://elveflow.com/microfluidic-tutorials/cell-biology-imagingg-reviews-and-tutorials/microfluidics-for-cell-biology/concepts-and-methodologies/) **Stand: 17.07.2016**
- [15] Aigars Piruska, et all, *The autofluorescence of plastic materials and chips measured under laser Irradiation*, **2005**
- [16] O.Geschke, H.Klank, P. Tellemann, *Microsystem Engineering of Lab-on-a-Chip Devices*,
- [17] Tom A. Waigh, *Applied Biophysics-A molecular Approach for Physical Scientists*, Wiley, **2007**
- [18] J. Berthier, P. Silberzan, *Microfluidics for Biotechnology*, Artech House, **2006**

- [19] P.D.Grossman, J.C. Colburn, *Capillary Electrophoresis-Theory and Practice*, Academic Press
- [20] B. J. Kirby, *Micro- and Nanoscale Fluid Mechanics. Transport in Microfluidic Devices*, **2010**
- [21] myfluidics.com
- [22] Prashanta Dutta, *Electroosmotic Flow Control in Complex Microgeometries*, **2002**
- [23] Bennett, Kimball, et al, *Absolute metabolic and implied enzyme active site occupancy in Escherichia coli*, **2009**
- [24] Joseph R. Lacowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer Science, **1999**
- [25] Martin Heitmann, *Vergleichende Untersuchung des Wachstums und des Metabolismus bei CHO-Zellen in Kultivierung bei niedrig bis hohen Zelldichten*, Bielefelder Schriften Zellkulturtechnik
- [26] Jennifer Sporty, *Quantitation of NAD<sup>+</sup> biosynthesis from the salvage pathway in Saccharomyces cerevisiae*, **2009**
- [27] aquacare.de
- [28] Shelley D. Minteer, *Microfluidic Techniques*, Human Press, **2006**
- [29] [jove.com/video/50560/microfluidic-picoliter-bioreactor-for-microbial-single-cell-analysis](http://jove.com/video/50560/microfluidic-picoliter-bioreactor-for-microbial-single-cell-analysis)
- [30] Lukas Galla, *Single cell protein analysis via two-color UV/VIS laser induced fluorescence detection in microfluidic devices*, **2012**
- [31] Anna Van Schepdael, *Microchip Capillary Elektrophoresis Protocols*, Springer, **2015**
- [32] Carola Essö, *Modifying Polydimethylsiloxane (PDMS) surfaces*, **2007**
- [33] K C Tang, E. Liao, W L Ong et al *Evaluation of bonding between oxygen plasma treated polydimethyl siloxane and passivated silicon*, **2006**
- [34] Paul C. Li, *Microfluidics and Lab on a Chip for biological analysis and discovery*, CRC Press, **2010**
- [35] J. Regtmeier, T.T. Duong, R. Eichhorn, D.n Anselmetti, A. Ros, *Dielectrophoretic manipulation of DNA*, **2007**
- [36] [bionumbers.hms.harvard.edu/KeyNumbers.aspx](http://bionumbers.hms.harvard.edu/KeyNumbers.aspx)
- [37] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C600003>
- [38] Carine Robichon, *Engineering Escherichia coli BL21(DE3) Derivative Strains To Minimize E. coli Protein Contamination after Purification by Immobilized Metal Affinity Chromatography*, **2011**

- [39] Angelika Murr, *Herstellung und Charakterisierung von Polymer-Mikroelektroden-Arrays*, TU Kaiserslautern Diplomarbeit, **2007**
- [40] Markus Sauer, Johann Hofkerns, Jörg Enderlein, *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging: From Ensemble to Single Molecules*, WILEY, **2011**
- [41] Than Tu Duong, *Neue Migrations- und Separationsmechanismen in strukturierten Mikrofluidik-Systemen*, **2006**