

Untersuchung neuartiger Mikrofluidik-Strukturen

für die Analyse des Quorum Sensing
des *Sinorhizobium meliloti* auf Einzelzellniveau

Bachelor-Arbeit

zur Erlangung des Grades eines
Bachelor of Science

vorgelegt von

Lukas Galla

Fakultät für Physik
Fachbereich Biophysik und angewandte Nanowissenschaften
Universität Bielefeld

September 2008

Erklärung

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

Bielefeld, den 15.09.2008

(Lukas Galla)

Gutachter

Dr. Jan Regtmeier

Prof. Dr. Andreas Huetten

Datum des Einreichens der Arbeit: 15.09.2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Motivation	1
2	Theoretische Grundlagen	4
2.1	Erdbodenbakterium <i>Sinorhizobium meliloti</i>	4
2.2	Hydrodynamische Effekte in Mikrofluidik-Systemen	6
2.2.1	Viskosität	6
2.2.2	Reynoldszahl und laminare Strömung	7
2.2.3	Druckgetriebene Strömungen	8
2.3	Elektrokinetische Effekte	9
2.3.1	Elektroosmose	10
2.3.2	Elektrophorese	12
2.3.3	Dielektrophorese	14
2.3.4	Erzeugung räumlich inhomogener elektrischer Felder	18
3	Materialien und Methode	20
3.1	Materialien und Chemikalien	20
3.2	Chip Design	21
3.3	Herstellung des Masterwafers	24
3.4	Produktion und Präparation der PDMS-Chips	26
3.5	Experimenteller Aufbau	27
3.6	Präparation der Mikroorganismen	28
4	Ergebnisse und Diskussion	30
4.1	Charakterisierung der hergestellten Mikrofluidik-Chips	30
4.2	Hydrodynamisches Fangen von Beads	33
4.3	Hydrodynamisches Fangen von Rm1021(<i>pHC60</i>)	38
4.4	Dielektrophoretisches Fangen von Rm1021(<i>pHC60</i>)	40
5	Zusammenfassung und Ausblick	47
	Literatur	49
	Danksagung	54

Abkürzungsverzeichnis

AC	Wechselspannung
AHL	<i>N-Acyl-Homoserinlacton</i>
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAD	Computer aided design
CML	<i>carboxylate modified latex</i>
d.h.	das heißt
DC	Gleichspannung
DDM	Dodecyl Maltosid
DEP	Dielektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EOF	elektroosmotischer Fluss
EP	Elektrophorese
EPS	<i>Exopolisacherid</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
MC	Methyl Cellulose
PDMS	<i>Poly(dimethylsiloxan)</i>
<i>S.meliloti</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung und Motivation

Der permanente Fortschritt in der Biologie, der Chemie und der Physik, und deren interdisziplinäre Zusammenarbeit ermöglichen ein immer tieferes Verständnis der grundlegenden Zusammenhänge des Lebens. Ein jeder Forschungszweig versucht dabei sowohl Grundlagenforschung zu betreiben, als auch mit diesem Wissen sinnvolle, hilfreiche und potentiell kommerzielle Anwendungen zu entwickeln. Hinsichtlich der Erforschung von Mikroorganismen gibt es unter anderem den Ansatz bereits bekannte nützliche Funktionen [1] zu optimieren oder schädliche bakterielle Verhaltensweisen zu unterdrücken [2]. In der vorliegenden Arbeit wird es vornehmlich um Grundlagenforschung gehen, und dabei um die Entwicklung und Anwendung neuartiger Methoden, zur zeitlichen und räumlichen Untersuchung einzelner Bakterien in Mikrofluidik-Systemen.

Lange Zeit bestand in der Forschung die Auffassung, dass Bakterien voneinander unabhängig sind und in strikt solitärer Lebensweise existieren [3]. Doch bereits vor 66 Jahren sind erste Hinweise auf ein multizelluläres Verhalten bei marinen Leuchtbakterien gefunden worden [4]. Eine grundlegende Voraussetzung für eine derartige mikrobielle Organisationsform ist die Fähigkeit zur interzellulären Kommunikation [5]. Diese sogenannte Zell-Zell-Kommunikation wurde erstmals bei dem Gram-positiven Bakterium *Streptococcus pneumoniae* [6] und dem marinen Gram-negativen Bakterium *Vibrio fischeri* (*V.fischeri*) [7] beschrieben. Dabei dienen chemische Signale der Kommunikation und Koordination von Gruppenaktivitäten. Das *V.fischeri* Bakterium stellt hierbei ein anschauliches und gut verstandenes Modellsystem dar. So zeigen einzelne oder einige wenige *V.fischeri*-Zellen keine Biolumineszenz, während eine hohe Zelldichte, z.B. bei der Symbiose mit einigen Meeresfischen [8], zu einer Luminiszenz führt. Im Fall des Tintenfisches *Monocentris japonicus* wird das von den *V.fischeri*-Bakterien produzierte Licht verwendet, um Artgenossen anzulocken [8].

Obwohl inzwischen verschiedene Theorien zu diesem Phänomen entwickelt worden sind, wird dieses Kommunikations-Verhalten auch heute noch meist unter dem Überbegriff *Quorum-Sensing* (engl., QS) zusammengefasst [8], da man ehemals von einer ausschließlich Zelldichte-abhängigen Reaktion der Zellen ausgegangen ist.

Zu Beginn wurde das QS beschrieben durch die Sekretion, Wahrnehmung und Weiterverarbeitung der chemischen Signalmoleküle, die sich per Diffusion fortbewegen und je nach Populationsdichte unterschiedlich hohe Konzentrationen erreichen. Wird dabei eine bestimmte Grenz-Konzentration überschritten, kommt es zu einer Reaktion der Bakterien (im Beispiel des *V.fischeri* zur Biolumineszenz). In der aktuellen Forschung werden neben dem Quorum-Sensing zwei weitere Theorien diskutiert; zum einen das *Diffusion-Sensing* (engl., DS) und das *Efficiency-Sensing* (engl., ES). Die DS-Theorie geht von einem grundsätzlich Zelldichte-unabhängigen System aus, und proklamiert die Sensitivität dieses Systems für Diffusion und die daraus entstehenden Grenzen für einen sinnvollen Signalmolekül-Massen-Transfer. Das QS-System wäre demnach nur ein Nebeneffekt des DS-Systems [9]. Die ES-Theorie hinge-

gen versucht QS und DS zu vereinen, indem hier berücksichtigt wird, dass die Bakterienzellen nicht allein auf die Populationsdichte, die diffusionsbedingte Massen-Transfer-Grenze oder die räumliche Verteilung sensitiv reagieren können, sondern nur auf die jeweilige Kombination dieser drei Faktoren [10].

In den folgenden Kapiteln dieser Arbeit wird das Phänomen der Zell-Zell-Kommunikation trotz dieser Unterschiede weiter unter dem Begriff Quorum-Sensing geführt, da dies in weiten Teilen der Literatur so gehandhabt wird.

Die meisten bisherigen Ergebnisse zu diesem Thema sind bei Untersuchungen entstanden, bei denen sich die Bakterien bereits in Symbiose mit dem Wirt befinden, bzw. bei dem Eindringen der Bakterien in die Wirtspflanze [11]. Das Verhalten bei einer so zustande gekommenen hohen Zelldichte wird dann mit demjenigen bei niedrigen Populationsdichten, bzw. einzelnen Bakterien verglichen. Auch sind die QS-Systeme mit der sogenannten *Quorum-Quenching* Methode untersucht worden, bei der der QS-Signalweg gezielt unterbrochen wird, um Regulationsmechanismen im Detail zu erforschen [12]. Die Problematik, bzw. Schwierigkeit die bei der Arbeit mit hohen Zelldichten entsteht, ist, dass die Ergebnisse (z.B. Reaktionszeiten) lediglich Durchschnittswerte darstellen (*averaging effects*, engl.), und somit keine genauen Aussagen zum Reaktionsverhalten von einzelnen Zellen möglich sind. Auch kann dadurch nicht bestätigt werden, dass zwei einzelne Bakterienzellen grundsätzlich in der Lage sind, über QS zu kommunizieren, oder ob es sich beim OS wirklich um einen reinen Gruppeneffekt handelt, wie ursprünglich angenommen.

Es ergibt sich somit die Frage, in wieweit es möglich ist, eine individuelle QS-bezogene Reaktion eines Bakteriums auf Einzelzellniveau zu dokumentieren und diese Reaktion und deren Eigenschaften anhand genau festgelegter Rahmenbedingungen zu charakterisieren. Des Weiteren wäre es interessant zu beobachten, ab welchen zu überbrückenden Distanzen zwischen zwei einzelnen Bakterien es zu keiner Reaktion der Zelle mehr kommt.

Die sogenannten Lab-on-a-Chip- oder Mikrofluidik-Systeme bieten ideale Voraussetzungen, um diese Fragestellungen zu beantworten [13, 14]. Die mittels Soft-Lithographie [15] herzustellenden Chips besitzen Kanalstrukturen mit einer Dimensionierung auf Zellgröße. Des Weiteren sind sie gaspermeabel [16], biokompatibel [16] und die Versuche darin finden unter definierten chemischen Bedingungen statt. Damit ist eine experimentelle Umgebung gegeben, die ein gezieltes Fangen und Manipulieren einzelner Zellen ermöglicht. Dies ist schon mehrfach unter Beweis gestellt worden, z.B. bei der Erstellung von Protein-Elektropherogrammen einzelner Insektenzellen [17], oder bei der Sortierung von Zellen nach unterschiedlichen Eigenschaften [18]. Die in dieser Arbeit angestrebte Untersuchung von Bakterien stellt aufgrund der geringen Größe noch eine zusätzliche Herausforderung dar.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es Mikrofluidikchips zu erstellen, mit denen es möglich ist Bakterien räumlich selektiv zu fangen. Dafür werden zwei Ansätze gewählt. Zum einen wird versucht gezielt einzelne Bakterien-Zellen hydrodynamisch in den Mikrofluidikkanälen zu fangen. Dazu werden zunächst die Chips hergestellt und mit Latex-Kügelchen, sogenannten Beads, auf ihre Funktionalität überprüft. Anschließend folgen dann Versuche mit den Bakterienzellen. Zum anderen wird in strukturierten Kanälen der Effekt der Dielektrophorese (DEP) ausgenutzt um einzelne Zellen mit Hilfe eines inhomogenen elektrischen Wechselfeldes fest-

zuhalten. Hier kommen als erstes Strukturen zum Einsatz, die in früheren Arbeiten für ein Auftrennen von DNA-Molekülen verwendet wurden [19, 20]. Nach der Verifizierung des dielektrophoretischen Fang-Prinzips von Bakterienzellen, wird dann mittels zweier neuartiger DEP-Strukturen ein gezieltes Fangen einzelner Bakterien angestrebt. Des Weiteren müssen die zu diesem Fangen notwendigen Parameter (z.B. Stärke und Frequenz des elektrischen Feldes) ermittelt und optimiert werden. Die Abstände sowohl der hydrodynamische als auch der dielektrophoretischen Fallen zueinander sind dabei in beiden Ansätzen fest definiert, und bilden mit der chemischen Umgebung geeignete und gleich bleibende Rahmenbedingungen, um das QS zwischen zwei räumlich getrennten Bakterien zu beobachten.

Bei den Bakterien die in dieser Arbeit verwendet werden, handelt es sich um eine Mutante des *Sinorhizobium meliloti* (Rm1021(*pHC60*)), welche freundlicherweise von der Gruppe für *Proteom- und Metabolomforschung* der Universität Bielefeld [21] zur Verfügung gestellt wurde, und sich aufgrund seiner gentechnischen Veränderungen besonders für diese Aufgabe eignet.

In den nun folgenden Kapiteln wird zunächst die notwendige grundlegende Theorie besprochen, gefolgt von einer Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Materialien, Methoden und Arbeitsschritte, die zu einer erfolgreichen Produktion der Mikrofluidikchips führen. Mit diesem Grundwissen ausgestattet werden dann die erzielten Ergebnisse präsentiert und diskutiert. Zum Schluss wird noch ein Ausblick gegeben, wie die Experimente optimiert werden können, bzw. welche Schritte notwendig sind, um dieses Projekt erfolgreich weiterzuführen. Damit werden in dieser Arbeit die Grundlagen für eine aussichtsreiche Analyse des Quorum Sensing von Bakterien auf Einzelzellniveau geschaffen.

2. Theoretische Grundlagen

In den folgenden Kapiteln werden die theoretischen Grundlagen gelegt, die zum Verständnis der Experimente dieser Arbeit wichtig sind. Zum einen wird auf den biologischen Hintergrund des verwendeten Erdbodenbakteriums *Sinorhizobium meliloti* eingegangen, und zum anderen auf die physikalischen Grundlagen, die für den Umgang mit Mikrofluidik-Systemen wesentlich sind. Hierzu gehören hydrodynamische und elektrokinetische Effekte.

2.1. Erdbodenbakterium *Sinorhizobium meliloti*

Das Erdbodenbakterium *Sinorhizobium meliloti* (*S.meliloti*) gehört taxonomisch gesehen zu der Familie der *Rhizobiaceae* und darin zu der Klasse der Alphaproteobacteria. Es besitzt wie alle Bakterien dieser Familie die Fähigkeit eine Symbiose mit Leguminosen (Hülsenfrüchten) einzugehen und molekularen Stickstoff zu fixieren. Zu der Gruppe der Rhizobien gehören die Genera *Asorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* und *Sinorhizobium*. Die Bakterien der jeweiligen Genera sind streng aerob, chemotroph, Gram-negativ und ihre Form ist stäbchenförmig (vgl. Abbildung 2.1) [22]. Unter den Rhizobien variieren die Wirtsbereiche stark, d.h. jede dieser Spezies besitzt ein eigenes Wirtsspektrum. Im Fall des *Sinorhizobium meliloti* sind dies die drei Leguminose-Gattungen *Medicago*, *Melilotus* und *Trigonella* [1]. Während dieser Symbiose besiedeln die Bakterien Wurzelstrukturen der Wirtspflanze und differenzieren in den Pflanzenzellen zu Bakteroiden. Dies ist ein nicht mehr teilungsfähiges

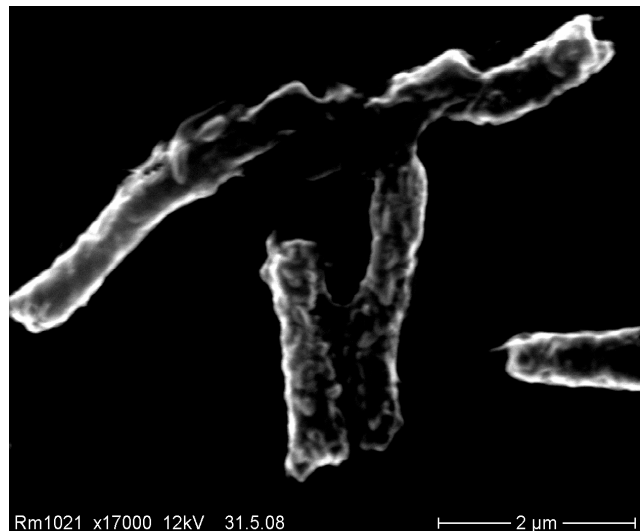


Abbildung 2.1

Aufnahme mehrerer Rm1021(pHC60)-Bakterien mittels eines Rasterelektronenmikroskops.

Zellstadium. Erst in diesem Stadium sind die *S.meliloti* in der Lage Stickstoff zu fixieren. In einer komplexen und energieaufwändigen Reaktion wird hierbei atmosphärischer Stickstoff (N_2) zu Ammonium (NH_4^+) umgewandelt. Als Gegenleistung versorgen die Pflanzen die Bakterien mit Kohlenstoffverbindungen. Durch diese Symbiose besitzen die Leguminosen einen entscheidenden Vorteil gegenüber denjenigen Pflanzen, die nicht zu einer endosymbiotischen Stickstofffixierung fähig sind. Letzteres ist auch der Grund für die wichtige ökologische und ökonomische Bedeutung dieser Symbiose, da man davon ausgehen kann, dass eine Leguminose pro Jahr und Hektar 250kg Stickstoff fixieren kann [23].

Der in dieser Arbeit verwendete und gut charakterisierte *S.meliloti* Stamm Rm1021 verfügt über mindestens zwei verschiedene Quorum-Sensing-Systeme [24]. Das sogenannte Sin System induziert über langkettige *N-Acyl-Homoserinlactone* (kurz AHL's) spezifisch die Ex-

pression der exp-Gene und verursacht somit die Produktion des Exopolysaccharids EPSII, dass an der Wurzelknöllchenbesiedelung (Symbiose) beteiligt ist [25]. Die genaue Funktion des zweiten Systems (Mel System), dass die Synthese von kurzkettigen AHL's kontrolliert, ist hingegen noch nicht bekannt [24]. Es gibt allerdings Anzeichen dafür, dass es hinsichtlich der Nodulation (Wurzelknöllchenbildung) und dem Eindringen der Rm1021 in die Wirtspflanze eine Rolle spielt [26]. Insgesamt sind bislang mindestens sechs verschiedene AHL-Signalmoleküle und ebenso viele AHL-Rezeptoren des *S.meliloti* bekannt [27].

Der gewöhnliche Ablauf eines QS-Signalwegs lässt sich wie folgt gliedern. Zunächst werden die AHL's auf einem gleich bleibend niedrigen Grundniveau synthetisiert. Erst wenn eine bestimmte Konzentration an Signalmolekülen in der Umgebung der Zelle überschritten wird (induziert durch z.B. hohe Zelldichten), binden diese AHL's an bestimmte Rezeptorproteine. Diese wiederum binden an speziellen Promotorregionen und bewirken somit einerseits die Expression von für die Symbiose relevanten Molekülen (*effectors*, engl.) und andererseits eine zusätzliche Synthese von AHL's. Somit induzieren die Signalmoleküle ihre eigene Synthese (*autoinducing*, engl.) und der daraus resultierende Anstieg der Autoinducerkonzentration führt sowohl zu einer positiven Rückkopplung, als auch zu einem Anstieg der Konzentration an Effektormolekülen.

Das in der Einleitung angesprochene Fernziel, charakteristische Parameter bezüglich des Quorum Sensing von Bakterien auf Einzelzellniveau zu bestimmen, soll nun mit diesem *S.meliloti* erreicht werden. Um dies zu realisieren stehen zwei verschiedene Mutanten des Wildtypstamms *S.meliloti* Rm1021 zur Verfügung, die zusammen ein idealisiertes Sender-Empfänger-System bilden. Diese Sender-, bzw. Empfänger-Bakterien sind gentechnisch verändert worden, um später im Experiment verifizieren zu können, dass es zu einem ‚Kontakt‘ über QS-Signalmoleküle gekommen ist. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick darüber gegeben, wie diese Modifikationen funktionieren:

Beim Sender-Bakterium ist auf einem Plasmid die Gen-Sequenz die für die Erkennung der QS-Signalmoleküle genau vor einem Gen, das für die Expression eines grün fluoreszierenden Proteins (GFP) verantwortlich ist, integriert worden. Somit wird GFP produziert, sobald eine bestimmte Konzentration von AHL's erreicht wird. Die Synthese der Signalmoleküle ist dabei auf ein solches Niveau angehoben worden, dass es zu einer dauerhaften Überschreitung der kritischen Konzentrationsgrenze von AHL's kommt. Das Autoinducing unterstützt und verstärkt diesen Effekt noch, so dass auch ein einzelnes Bakterium genügend GFP produziert. Letzteres ermöglicht ein vereinfachtes Beobachten und Manipulieren der Bakterien in den Mikrofluidikkanälen, da sie dauerhaft fluoreszieren.

Die gentechnischen Modifikationen des Empfänger-Bakteriums unterscheiden sich nur hinsichtlich der Signalmolekül-Produktion von denen des Sender-Bakteriums. Das Plasmid mit den relevanten Promotorregionen für die AHL-Erkennung und die GFP-Synthese sind hier auch vorhanden. Allerdings ist die Empfangszelle nicht mehr in der Lage eigenständig AHL's zu produzieren. Damit ist ausgeschlossen, dass es zu einem Autoinducing kommt und die Empfänger-Bakterien eigenständig GFP produzieren. Diese Mutante kann somit nur dann

Fluoreszenz zeigen, wenn zuvor eine ausreichende Konzentration an QS-Signalmolekülen per Diffusion vom Sender-Bakterium zu diesem Empfänger-Bakterium gelangt ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine weitere gentechnisch veränderte *S.meliloti* Rm1021 Mutante verwendet, die die Bezeichnung Rm1021(*pHC60*) trägt. Dieses Bakterium trägt ein Plasmid, das permanent und in hohen Konzentrationen GFP produziert [28]. Diese Produktion ist im Vergleich zu den Sender-/Empfänger-Bakterien nicht von der AHL-Konzentration abhängig, und zudem um ein Vielfaches stärker. Da es zunächst vordergründig um die erfolgreiche Herstellung und die Untersuchung der Funktionalität der Mikrofluidikchips geht, ist das Rm1021(*pHC60*)-Bakterium aufgrund seiner hohen Fluoreszenzintensität für diese Aufgabe geeigneter, als das eigentliche Sender-Bakterium.

Für ein Verständnis der späteren Experimente ist eine Charakterisierung der durchschnittlichen Größen der Rm1021(*pHC60*) wichtig. Diese lässt sich mittels Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen dieser Bakterien abschätzen, welche über ein schonendes Austrocknungsverfahren [22] von D. Greif [29] präpariert wurden. In Abbildung 2.1 sind mehrere Rm1021(*pHC60*) bei 7000facher Vergrößerung zu erkennen. Diese Stäbchen haben eine durchschnittliche Länge von ca. $3\mu\text{m}$ und einen Durchmesser von ca. $0,5\mu\text{m}$.

2.2. Hydrodynamische Effekte in Mikrofluidik-Systemen

Ein grundlegendes Verständnis der Hydrodynamik ist wichtig, um die in einem Mikrofluidik-System verwendeten kleinsten Flüssigkeitsmengen erfolgreich kontrollieren zu können. Dabei treten, aufgrund der Verkleinerung von Kanalstrukturen in den Mikrometerbereich, einige Effekte deutlicher in den Vordergrund als auf makroskopischer Ebene [30]. Dadurch entstehen neue Möglichkeiten die Flüssigkeiten in dem Kanal und darin enthaltene Partikel zu transportieren und zu manipulieren [31,32]. Charakteristisch für ein solches System sind sehr kleine Reynoldszahlen, damit einhergehende laminare Strömungen und das Dominieren von Oberflächeneffekten. Diese Eigenschaften und Effekte werden im Folgenden diskutiert.

2.2.1. Viskosität

Die Viskosität ist ein Maß dafür, inwieweit eine Flüssigkeit fähig ist, Scherkräfte weiterzugeben.

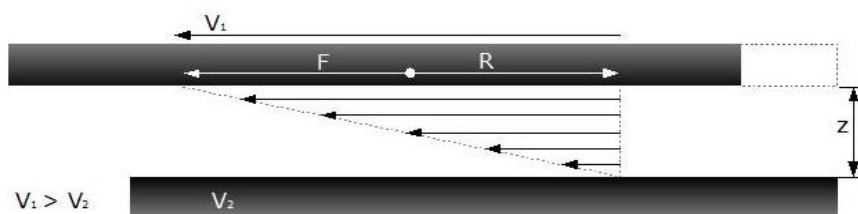


Abbildung 2.2

Schema zur Entstehung eines Geschwindigkeitsgradienten in einer Flüssigkeit zwischen zwei Platten mit dem Abstand z , die sich mit unterschiedlicher Geschwindigkeit $v_1 > v_2$ bewegen. Dabei ist F die wirkende Kraft und R die Reibungskraft.

Geht man beispielsweise davon aus, dass die Geschwindigkeit einer Flüssigkeit an der Grenzfläche zu einer Platte genauso groß ist wie die der Platte (sogenante *no-slip* Randbedingung [33]), dann folgt daraus, dass sich in einer Flüssigkeit zwischen zwei sich unterschiedlich schnell bewegendenden Platten ein Geschwindigkeitsgradient ausbildet. Dieses Verhalten ist schematisch in Abbildung 2.2 illustriert.

Innerhalb der Flüssigkeit erzeugt dieser Geschwindigkeitsgradient wiederum Scherkräfte. Der Proportionalitätsfaktor η zwischen der viskosen Schubspannung σ_η und dem Geschwindigkeitsgradienten dv/dz wird als dynamische Viskosität bezeichnet und ist wie folgt definiert [34]:

$$\sigma_\eta = \eta \frac{dv}{dz} . \quad (2.1)$$

Um druck- und spannungsgetriebene Strömungen in Mikrofluidikkanälen beschreiben und charakterisieren zu können, ist das oben beschriebene Verhalten von viskosen Flüssigkeiten ein wichtiger Bestandteil.

2.2.2. Reynoldszahl und laminare Strömung

Die Reynoldszahl Re ist eine der wichtigsten Größen um Strömungen aller Art zu charakterisieren. Sie ist dimensionslos, beschreibt das Verhältnis von Trägheitskraft zur viskosen Kraft und ist folgendermaßen dargestellt [34, 35]:

$$Re = \frac{\rho v r_{Kap}}{\eta} . \quad (2.2)$$

Dabei ist ρ die Dichte der Flüssigkeit, v deren Geschwindigkeit, r_{Kap} der Radius der Kapillare und η die dynamische Viskosität. Abhängig von der Größe der Reynoldszahl unterscheidet man verschiedene Strömungsarten. Für Re kleiner als 2300 ist die Strömung laminar, wohingegen sie bei Re größer als 2300 als turbulent bezeichnet wird [36]. Da in Mikrofluidik-Systemen die Kanäle keine radiale Geometrie aufweisen, sondern rechteckig sind, muss der Radius r gegen den hydraulischen Parameter D_h ersetzt werden. Dieser ist wie folgt durch den Umfang U_h und die Querschnittsfläche A_h gegeben [35, 33]:

$$D_h = \frac{4A_h}{U_h} . \quad (2.3)$$

Drückt man des Weiteren U_h und A_h durch die Höhe h und Breite b des rechteckigen Kanals aus, ergibt sich für den hydraulischen Parameter [35]:

$$D_h = \frac{2bh}{b+h} . \quad (2.4)$$

Somit erhält man aus Gleichung (2.1) und Gleichung (2.3) für die Reynoldszahl Re in Mikrofluidikkanälen:

$$Re = \frac{2\rho v b h}{\eta(b+h)} . \quad (2.5)$$

Für die später in dieser Arbeit verwendeten Strukturen mit einer konstanten Kanalhöhe von $h=3\mu\text{m}$, einer mittleren Kanalbreite von $b=100\mu\text{m}$, einer Geschwindigkeit von $v=1000\mu\text{m/s}$ und der Dichte $\rho=9,88\cdot 10^2\text{kgm}^{-3}$ und Viskosität $\eta=1\cdot 10^{-3}\text{kgcm}^{-1}\text{s}^{-1}$ von Wasser bei 20°C , ergibt sich für die Reynoldszahl ein Wert von $Re=5,76\cdot 10^{-3}$. Somit sind die Strömungen in Mikrofluidikkanälen mit den hier verwendeten Abmessungen selbst bei der sehr hohen angenommenen Geschwindigkeit stets laminar.

2.2.3. Druckgetriebene Strömungen

Hydrostatische und druckgetriebene Effekte treten besonders in kleinen Kapillaren oder Kanälen auf. Dies wird zum einen hinsichtlich der Befüllung der Mikrofluidikkanäle mit einer Flüssigkeit ausgenutzt und zum anderen, um diese im Verlauf des Experiments gezielt kontrollieren und manipulieren zu können.

Einen sehr wichtigen Beitrag liefert dabei die Oberflächenspannung σ . Sie entsteht dadurch, dass die Moleküle im Inneren der Flüssigkeit und diejenigen an der Grenzfläche zu einem anderen Medium (z.B. Glas oder Luft) eine unterschiedliche Energie aufweisen. Während die Moleküle im Inneren der Flüssigkeit sich mittels attraktiver Wechselwirkungen gegenseitig anziehen, fehlt den Molekülen an der Grenzfläche der Wechselwirkungspartner. Somit spüren Letztere eine nach innen gerichtete Kraft, wodurch die Oberfläche der Flüssigkeit minimiert und eine Kugelform angestrebt wird, da diese im dreidimensionalen Raum das kleinste Oberflächen zu Volumen Verhältnis besitzt. Den daraus resultierenden Innendruck Δp beschreibt Formel 2.6, mit r_{Kug} als Krümmungsradius der Kugel [34]. Die allgemein durch einen Tensor beschriebene Oberflächenspannung σ wird dabei durch die Annahme eines homogenen Mediums und der kugelsymmetrischen Geometrie zu einem Skalar vereinfacht.

$$\Delta p = \frac{2\sigma}{r_{Kug}} . \quad (2.6)$$

Dieser Innendruck liegt z.B. vor, wenn ein Flüssigkeitsreservoir nicht nur bis zur Oberkante befüllt ist, sondern noch darüber hinaus mit einem weiteren Tropfen bedeckt wird. Ein weiterer Druckeffekt tritt auf, wenn zwei durch einen Mikrokanal verbundene Reservoirs unterschiedlich hoch befüllt sind. Der daraus resultierende Druckunterschied wird durch die folgende Formel beschrieben [37]:

$$\Delta p = \rho g \Delta h . \quad (2.7)$$

Dabei bezeichnet g die Erdbeschleunigung, ρ die Dichte der Flüssigkeit und Δh den Füllhöhenunterschied der Reservoirs.

Diese beiden beschriebenen hydrostatischen Effekte können in den Kanälen eines Mikrofluidik-Systems einen Druckgradienten verursachen, der anschaulich zu einer Bewegung der Flüssigkeit, einem Fluss, führt. Für die Geschwindigkeit v dieses hydrodynamischen Flusses, bzw. dieser laminaren Strömung (vgl. Kapitel 2.2.2) gilt näherungsweise [37]:

$$v = \frac{h^2}{3\eta} \left(-\frac{\Delta p}{L} \right). \quad (2.8)$$

Hierbei ist h die Höhe des Kanals, η die dynamische Viskosität und Δp die Druckdifferenz über eine Länge L .

Vergleicht man die beiden möglichen Ursachen für einen Druckunterschied, also die Oberflächenspannung eines Tropfens und den Füllhöhenunterschied, miteinander, so fällt auf, dass sich die Erstgenannte viel stärker auf den hydrodynamischen Fluss auswirkt, als Letztere. So erzeugt zum Beispiel ein Wassertropfen mit einem Radius von 1mm einen Druck von 73Pa, was unter der Annahme der Viskosität und Oberflächenspannung von Wasser und einem 3µm hohen und 10mm langen Kanal, zu einer Flussgeschwindigkeit von 44µm/s führt. Um diesen Druck und die daraus resultierende Geschwindigkeit mittels eines Füllhöhenunterschiedes in den Reservoiren zu erzeugen, müsste dieser 15mm betragen.

Der hydrodynamische Fluss zeichnet sich des Weiteren durch ein parabelförmiges Geschwindigkeitsprofil aus [34], was durch die bereits diskutierten Viskositätseigenschaften und die no-slip Randbedingung begründet ist (siehe Abbildung 2.3):

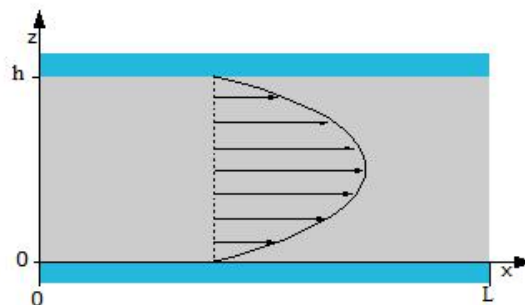


Abbildung 2.3 Schema des parabolischen Geschwindigkeitsprofils des hydrodynamischen Flusses. In der Mitte des Kanals erreicht die Geschwindigkeit ihr Maximum, und an den Kanalwänden (blau) verschwindet sie.

Da im späteren Experiment die Tropfengröße über den Reservoiren und der damit erzeugte Druck nicht gut kontrollier- und reproduzierbar ist, wird die Steuerung der Flussgeschwindigkeiten in den Mirkokanälen allein durch die Füllhöhenunterschiede vorgenommen.

2.3. Elektrokinetische Effekte

Nach Diskussion der hydrodynamischen Effekte in Mikrofluidikkanälen wird in diesem Kapitel nun ein Überblick darüber gegeben, welche elektrokinetischen Effekte hinsichtlich der Realisierung der Experimente eine wichtige Rolle spielen. Dabei wird zuerst auf die Elektroosmose und den darin begründeten elektroosmotischen Fluss eingegangen. Anschließend wird die

Elektrophorese, die Dielektrophorese und die für letzteres Phänomen notwendige Erzeugung von räumlich inhomogenen elektrischen Feldern besprochen.

2.3.1. Elektroosmose

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikrofluidikchips aus *Poly(dimethylsiloxan)* (PDMS) und die Flüssigkeitslösung mit denen diese befüllt sind, können als ein Zwei-Phasen-System betrachtet werden. Nach von *Helmholtz* bildet sich an der Grenzfläche zwischen zwei Phasen dieser Art eine elektrische Doppelschicht aus [38]. In diesem Fall, weil die Silanolgruppen ($-\text{SiOH}$) der Kanaloberfläche teilweise deprotoniert werden, sobald der Chip mit einer Elektrolytlösung ($\text{pH} \geq 2$; z.B. Puffer) befüllt wird [31]. Dadurch entsteht eine negative Oberflächenladung der Kanalwand, wobei die Ladungsdichte vom pH-Wert abhängt [31]. Zur Abschirmung dieser Kanalwand-Ladung bildet sich dann in der Flüssigkeit aufgrund der *Coulomb*-Wechselwirkung direkt an der Grenzfläche eine Schicht aus Gegenionen (siehe Abbildung 2.4). Diese starre Schicht aus unbeweglichen positiven Ladungen wird *Stern*-Schicht genannt. Sie wird durch ein linear abfallendes Potential charakterisiert und ihre Dicke kann durch die *Bjerrum*-Länge l_B abgeschätzt werden und entspricht in etwa der Dicke der einzelnen Ionen [39, 40]:

$$l_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon\epsilon_o kT} . \quad (2.9)$$

Dabei ist ϵ die Dielektrizitätskonstante der Lösung, k die *Boltzmann*-Konstante, T die Temperatur und e die Elementarladung. An diese starre Stern-Schicht schließt sich dann innerhalb des Kanals die diffuse *Gouy-Chapman*-Schicht an. Diese besteht aus thermisch beweglichen, schwach gebundenen Gegenionen. Das dazugehörige Potential nimmt mit dem Abstand zur geladenen Kanaloberfläche exponentiell ab. Der Potentialwert an der Grenze zwischen diesen beiden Schichten wird als ζ -Potential und dasjenige zwischen der Oberfläche und der Sternschicht als ψ_o bezeichnet (siehe Abbildung 2.4).

Sobald das Potential auf das $1/e$ -fache des Ausgangswertes gefallen ist, entspricht der Abstand der sogenannten *Debye*-Länge λ_D . Diese kann unter Annahme einer wässrigen Lösung bei Raumtemperatur wie folgt angenähert werden [33]:

$$\lambda_D = \frac{9,61 \cdot 10^{-9} \text{ m}}{\sqrt{I}} . \quad (2.10)$$

Hierbei entspricht I der Ionenstärke, die folgendermaßen über die Valenz der entsprechenden Ionen z_i und deren Konzentration c_i definiert ist:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 c_i . \quad (2.11)$$

Die Stern-Schicht und die Gouy-Chapman-Schicht bilden zusammen die sogenannte elektrische Doppelschicht [41], wie sie in der folgenden Abbildung 2.4 dargestellt ist.

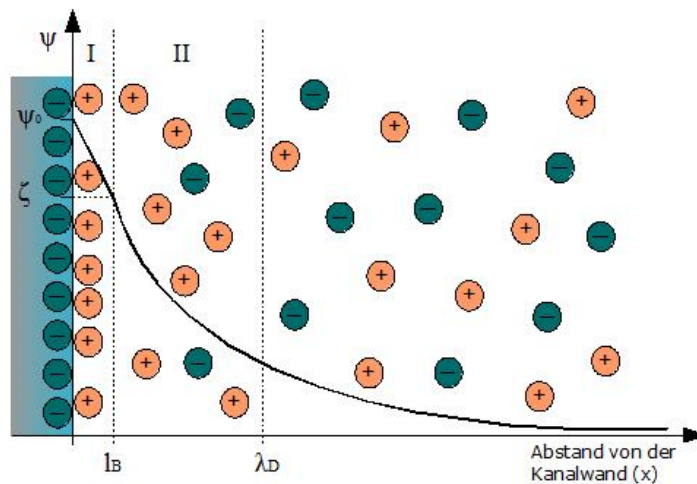


Abbildung 2.4 Die elektrische Doppelschicht: Sobald die Kanaloberfläche aus PDMS mit einer Elektrolytlösung ($\text{pH} \geq 2$) in Kontakt kommt, wird diese negativ geladen, und es bildet sich an dieser Grenzfläche auf Seiten der Flüssigkeit die starre Stern-Schicht aus Gegenionen mit einem linear abfallenden Potential (I). Dieser folgt die diffuse Gouy-Chapman-Schicht mit einem exponentiell abnehmenden Potential (II).

Elektroosmotischer Fluss

Wenn nach Ausbildung der gerade diskutierten Schichten, ein E-Feld angelegt wird, das parallel zu der geladenen Kanaloberfläche ausgerichtet ist, dann werden die schwach gebundenen Ionen der Gouy-Chapman-Schicht entsprechend ihrer Ladung beschleunigt. Diese ziehen dann die oberflächennahen Flüssigkeitsschichten mit, und durch die daraus entstehenden Scherkräfte, die kleinen Kanalabmessungen und die Viskosität (vgl. 2.2.1), wird auch die restliche Flüssigkeit mit beschleunigt. Den daraus resultierenden Fluss in den Mikrokanälen nennt man elektroosmotischen Fluss (EOF). Begründet in seiner Entstehung hat er ein stempelförmiges Geschwindigkeitsprofil, wie es in Abbildung 2.5 zu sehen ist [42, 43].

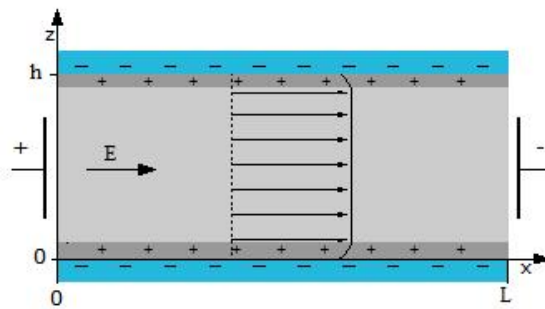


Abbildung 2.5 a) Schema des stempelförmigen Geschwindigkeitsprofils des elektroosmotischen Flusses (EOF). Die Kanalwände (blau) sind negativ geladen und die positiven Gegenionen der diffusen Gouy-Chapman-Schicht (dunkelgrau) werden bei anliegendem elektrischen Feld E in Richtung der Kathode beschleunigt.

Ein Vergleich von experimentellen Aufnahmen zeigt in Abbildung 2.6 zur Verdeutlichung den klaren Unterschied zwischen einem hydrodynamisch und einem elektroosmotisch verursachten Strömungsprofil [31].

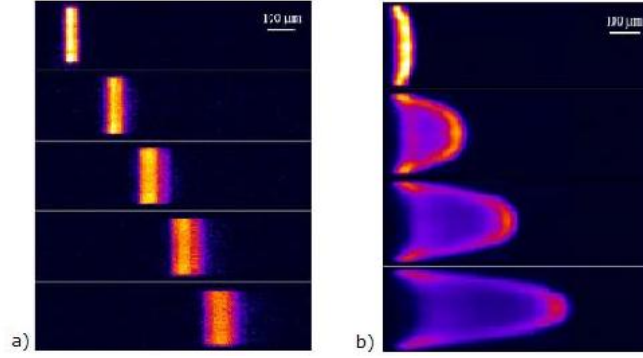


Abbildung 2.6 Experimenteller Vergleich des Flussprofils des EOF mit dem des hydrodynamischen Flusses [31]. Wie man deutlich erkennt, zeigt der EOF ein stempelartiges (a), und der hydrodynamische Fluss ein parabelförmiges Geschwindigkeitsprofil (b).

Für Versuche bei denen eine hohe örtliche, bzw. zeitliche Auflösung eine Rolle spielt und Dispersion unerwünscht ist (z.B. *Chromatographie*), ist damit der EOF vorzuziehen.

In Abhängigkeit vom Abstand zur Kanalwand lässt sich die Flussgeschwindigkeit $v(z)$ des EOF parallel zur Kanaloberfläche wie folgt eindimensional ausdrücken [33]:

$$v(z) = -\frac{E\varepsilon\psi_0}{\eta} \left[1 - \exp\left(-\frac{z}{\lambda_D}\right) \right]. \quad (2.12)$$

Hier bezeichnet E die Stärke des elektrischen Feldes, ψ_0 das Potential direkt an der Kanaloberfläche und z den Abstand zur Kanalwand. Das Potential ψ_0 kann nun durch das ζ -Potential angenähert werden, da bezüglich der no-slip Randbedingung nicht das Potential der Kanalwand sondern an der mobilen Grenzschicht zwischen starrer und diffuser Schicht relevant ist. Die Exponentialfunktion kann vernachlässigt werden, falls $z \gg \lambda_D$. Dies ist bei einem, unter diesen Bedingungen typischen, Wert von $\lambda_D \approx 3\text{nm}$ gewährleistet, und damit ergibt sich [33]:

$$v_{eo} \approx -\frac{E\varepsilon\zeta}{\eta}. \quad (2.13)$$

Aus dieser Gleichung kann man ableiten, welche Möglichkeiten es neben der Änderung des elektrischen Feldes gibt, um den EOF zu kontrollieren. Zum einen nimmt die Geschwindigkeit des EOF mit zunehmender Viskosität ab, und zum anderen kann das ζ -Potential durch Veränderung der Ionenkonzentration, bzw. des pH-Wertes der Flüssigkeit manipuliert werden [44, 45].

2.3.2. Elektrophorese

Neben dem EOF beschreibt die Elektrophorese (EP) ein weiteres elektrokinetisches Transportphänomen. Bei dieser Methode wird nicht die gesamte Flüssigkeit mitsamt der Partikel darin bewegt, sondern nur der Partikel selbst. Voraussetzung dafür ist, dass die Partikel geladen sind und ein elektrisches Feld anliegt.

Anschaulich kann man von folgendem Beispiel ausgehen. Auf einen n -fach negativ geladenen sphärischen Partikel mit dem Radius R , der sich in destilliertem Wasser befindet, wirkt in einem elektrischen Feld E eine Kraft F_{EP} , die parallel zu den Feldlinien ausgerichtet ist und auf die Anode zeigt (Abbildung 2.7). Es wird im Folgenden nur mit Beträgen gerechnet, und es gilt somit:

$$F_{EP} = neE \quad . \quad (2.14)$$

Bei Bewegung des Teilchens durch die Flüssigkeit erfährt dieses zusätzlich die F_{EP} entgegengerichtete Stokes'sche Reibungskraft F_R :

$$F_R = 6\pi\eta R v_P(t) \quad . \quad (2.15)$$

Aus Gleichung 2.14 und 2.15 ergibt sich nach Newton dann folgende Differentialgleichung:

$$neE - 6\pi\eta R v_P(t) = m \frac{dv_P(t)}{dt} \quad . \quad (2.16)$$

Dieses System kann nun als stark überdämpft betrachtet werden, da Trägheitskräfte in guter Näherung vernachlässigt werden können [46]. Wenn man nun annimmt, dass die Geschwindigkeit des Partikels beim Einschalten des elektrischen Feldes E verschwindet, bekommt man als Lösung dieser Differentialgleichung folgendes Ergebnis [47]:

$$v_P(t) = \frac{neE}{6\pi\eta R} \left[1 - \exp\left(-\frac{6\pi\eta R}{m} t\right) \right] \quad . \quad (2.17)$$

Da für große Laufzeiten t und die schon erwähnten kleinen Massen m die Exponentialfunktion schnell verschwindet, kann man nach einer sehr kurzen Beschleunigungsphase von einer konstanten Geschwindigkeit der Teilchen ausgehen:

$$v_P = \frac{neE}{6\pi\eta R} \quad . \quad (2.18)$$

Es sei noch angemerkt, dass es sich bei den vorangegangenen Überlegungen um einen idealisierten Fall handelt. Da im Experiment ein geladenes Teilchen in einer Elektrolytlösung von einer Ionenhülle umgeben wird, treten neben den beschriebenen Kräften F_{EP} und F_R noch zwei weitere Kräfte auf. Während die elektrische Relaxationskraft F_{Rel} von der Deformation der Ionenhülle hervorgerufen wird, ergibt sich die Retardationskraft F_{Ret} aus der elektrokinetischen Bewegung der Gegenionen innerhalb der diffusen Schicht um das Partikel. Sowohl F_{Rel} als auch F_{Ret} sind der elektrophoretischen Kraft F_{EP} entgegengerichtet und hier nicht berücksichtigt worden [43].

Damit ist es mittels der Elektrophorese nicht nur möglich, die Partikel aufgrund ihrer Polarität (Migration Richtung Kathode, bzw. Anode) zu trennen, sondern ebenfalls einzelne geladene Teilchen gezielt durch einen Mikrokanal zu transportieren. Dabei ist das anliegende elektrische Feld zum einen kein Wechselfeld, da es sonst im hier betrachteten Fall in der

Summe zu keiner Bewegung in eine bestimmte Richtung kommen würde (abgesehen vom Modell der Ratsche [20]). Zum anderen sollte das Feld homogen sein, damit eine gleichmäßige Flussgeschwindigkeit der Teilchen und somit eine Vergleichbarkeit dieser Partikel untereinander gewährleistet werden kann (wichtig z.B. in der Kapillar-Elektrophorese [48]).

2.3.3. Dielektrophorese

Im Gegensatz zur Elektrophorese beschreibt die Dielektrophorese (DEP) auch die Bewegung von neutralen, und somit nicht geladenen Teilchen in inhomogenen elektrischen Feldern aufgrund von Polarisierungseffekten [49]. Dabei kann dieser Effekt genutzt werden um jedes polarisierbare oder bereits geladene Objekt [50] zu manipulieren. Dazu gehören sowohl Latex-Kügelchen (sogenannte Beads) [51] und Carbon-Nanotubes [52], als auch biologische Partikel wie Zellen [53, 49], Viren [54] oder auch Proteine [55].

Um das Phänomen der DEP im Rahmen dieser Arbeit zu erläutern, wird dieser elektrokinetische Effekt zunächst anhand eines sphärischen dielektrischen Partikels beschrieben. Nach dem dieses Modell dann auf biologische Zellen übertragen worden ist, werden abschließend dabei auftretende mögliche Probleme und Lösungsansätze diskutiert.

Befindet sich der dielektrische Partikel in einem E-Feld $\vec{E}$, so wird dieser polarisiert und bildet einen Dipol aus. Das dazugehörige Dipolmoment $\vec{p}$ ist wie folgt definiert [49]:

$$\vec{p} = \alpha(\omega)\vec{E} . \quad (2.19)$$

Dabei ist $\alpha(\omega)$ die frequenzabhängige Polarisierbarkeit. Aufgrund der Ausbildung eines Dipols wirkt nun die dielektrophoretische Kraft $\vec{F}_{DEP}$ auf den Partikel [49]:

$$\vec{F}_{DEP} = (\vec{p} \cdot \nabla)\vec{E} . \quad (2.20)$$

Wie man erkennen kann, muss der Feldgradient $\nabla\vec{E}$ von Null verschieden sein, damit die Kraft ungleich Null ist. Dies kann mit Hilfe von Abbildung 2.7 veranschaulicht werden. Befindet sich ein Partikel in einem homogenen elektrischen Feld (Abbildung 2.7 b), dann spürt dieser keine Netto-Kraft, da sich die beiden entgegengerichteten Kräfte $\vec{F}_+$ und $\vec{F}_-$ aufheben [56]. Dies ändert sich, sobald sich der Dipol in einem räumlich inhomogenen elektrischen Feld befindet, und somit die beiden Hälften jeweils einem, anschaulich gesprochen, unterschiedlich dichten Feldlinienbereich ausgesetzt sind (Abbildung 2.7 c). Damit ist in diesem Fall die Netto-Kraft ungleich Null, und der polarisierte Partikel bewegt sich entlang des Feldgradienten. In diesem Beispiel migriert er in Richtung von Bereichen mit einer hohen Feldstärke (positive Dielektrophorese). Bei der negativen Dielektrophorese ist es genau umgekehrt, und der Partikel migriert in Bereiche niedriger Feldstärke. Der Grund für dieses unterschiedliche Verhalten wird später noch explizit erläutert.

Auch eine Umkehr der in Abbildung 2.7 c) eingezeichneten Elektroden-Polarität würde nichts an dem gerade beschriebenen Verhalten ändern [49]. Somit funktioniert der Effekt der

DEP sowohl mit DC-Feldern, als auch mit AC-Feldern, wobei typischerweise AC-Felder bevorzugt werden, um EP-induzierte Bewegungen zu unterdrücken [56]. Die in dieser Arbeit verwendeten elektrischen Wechselfelder basieren auf einer sinusförmigen Wechselspannung (womit auch das dazu proportionale AC-Feld einen sinusförmigen Charakter erhält).

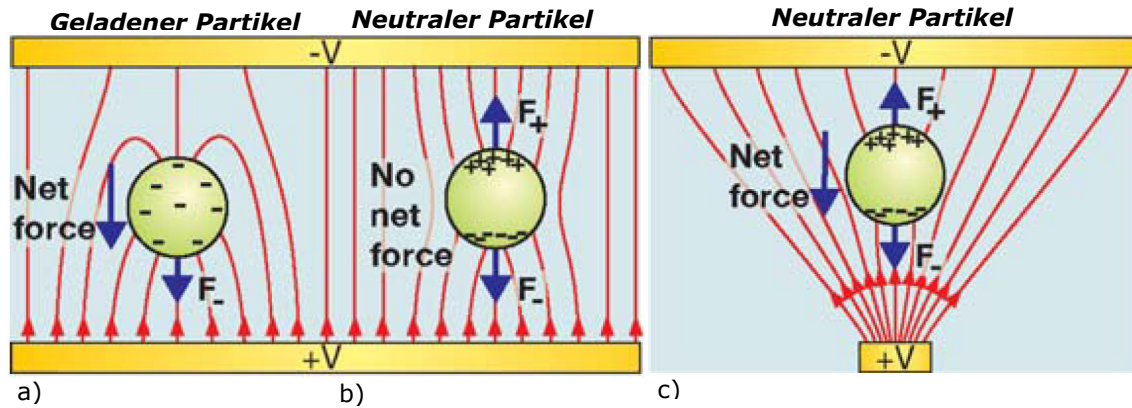


Abbildung 2.7 Schematische Skizze zur Entstehung der elektro- und dielektrophoretischen Kraft [56]: a) In einem homogenen E-Feld wirkt auf einen negativ geladenen Partikel eine Kraft, die in Richtung der Anode zeigt. b) Der insgesamt neutrale aber polarisierte Partikel verspürt keine Netto-Kraft in Richtung einer Elektrode, da die entgegengesetzten Kräfte im homogenen E-Feld vom Betrag gleich sind, und sich somit aufheben. c) Hier befindet sich der Partikel in einem inhomogenen E-Feld, und deshalb ergibt sich aus den beiden entgegengesetzten Kräften eine Netto-Kraft, die in Richtung des dichten Feldlinienbereichs zeigt. Der Partikel bewegt sich hier somit Richtung Anode, was als positive Dielektrophorese bezeichnet wird.

Falls der Dipol nicht bereits entlang des Feldes ausgerichtet sein sollte, wirkt zusätzlich noch ein Drehmoment, was zu einer Rotation der Partikel führt (sogenannte Elektrorotation [57]).

Um ein besseres Verständnis dafür zu bekommen, welche Parameter eine wichtige Rolle für die dielektrophoretische Kraft spielen, kann mit Hilfe mehrerer Annahmen und Näherungen ein aussagekräftigerer Ausdruck für die Polarisierbarkeit, bzw. das Dipolmoment gefunden werden. Es wird dabei angenommen, dass der Partikel ein homogener, dielektrischer Partikel mit *ohmscher* Leitfähigkeit und keinem dielektrischen Verlust ist. Des Weiteren ist der Partikel in einer dielektrischen Lösung suspendiert, welche *Jouleschen* Wärmeverlust aufweist [58]. Zum anderen muss die Zeitspanne, in der das elektrische Feld wirkt, viel größer sein als die Zeitkonstante, die die Akkumulation der freien Ladung auf der Partikeloberfläche beschreibt.

Damit ergibt sich für das Dipolmoment [59, 60]:

$$\vec{p} = 4\pi\epsilon_m \operatorname{Re}[f_{CM}(\omega)] R^3 \vec{E} . \quad (2.21)$$

Hierbei ist R der Radius des Partikels, ϵ_m die relative Permittivität des umgebenden Mediums und $\operatorname{Re}[f_{CM}(\omega)]$ der Realteil des sogenannten *Clausius-Mosotti*-Faktors. Auf Letzteren wird aufgrund seiner entscheidenden Bedeutung hinsichtlich positiver oder negativer Dielektrophorese später noch genauer eingegangen.

Somit ergibt sich mit den bereits aufgeführten Annahmen und unter Vernachlässigung der Polarisation der Ionenwolke um den Partikel folgende Gleichung für die dielektrophoretische Kraft [49, 58]:

$$\vec{F}_{DEP} = 2\pi\epsilon_m R^3 \operatorname{Re}[f_{CM}(\omega)] \nabla \vec{E}^2 . \quad (2.22)$$

Dabei beschreibt $\vec{E}^2$ die Intensität des lokalen elektrischen Feldes [61]. Neben der Abhängigkeit vom Partikelvolumen ist die Kraft auch mit der Winkelfrequenz des angelegten E-Feldes verknüpft. Dies ist in der nachfolgenden Definition des Clausius-Mosotti-Faktors begründet [61, 49, 58]:

$$f_{CM}(\omega) = \frac{\epsilon_p^*(\omega) - \epsilon_m^*(\omega)}{\epsilon_p^*(\omega) + 2\epsilon_m^*(\omega)} . \quad (2.23)$$

Hier beschreiben $\epsilon_p^*(\omega)$ und $\epsilon_m^*(\omega)$ die komplexe Permittivität des Partikels, bzw. des umgebenden Mediums. Diese sind wiederum von der Winkelfrequenz $\omega = 2\pi f$ des E-Feldes und von der jeweiligen realen Leitfähigkeit σ_p und σ_m , und den realen Permittivitäten $\epsilon_p(\omega)$ und $\epsilon_m(\omega)$ abhängig, und mit $i = \sqrt{-1}$ wie folgt definiert [61, 51]:

$$\epsilon_p^*(\omega) = \epsilon_p - i \frac{\sigma_p}{\omega} . \quad (2.24)$$

$$\epsilon_m^*(\omega) = \epsilon_m - i \frac{\sigma_m}{\omega} . \quad (2.25)$$

Das Vorzeichen des Clausius-Mosotti-Faktors, und somit das Verhältnis von ϵ_p zu ϵ_m hat entscheidenden Einfluss darauf, in welche Richtung die dielektrophoretische Kraft zeigt. Wenn $\epsilon_p > \epsilon_m$, dann ist der f_{CM} -Faktor positiv und der betrachtete Partikel zeigt positive DEP, und falls $\epsilon_p < \epsilon_m$, dann ist der f_{CM} -Faktor negativ und der Partikel zeigt dementsprechend negative DEP [56].

In vielen experimentell verwendeten Systemen, bei angelegten Frequenzen unter 100kHz, kann der Clausius-Mosotti-Faktor auch mit den realen Leitfähigkeiten von Partikel und Medium approximiert werden [61]:

$$f_{CM}(\omega) = \frac{\sigma_p - \sigma_m}{\sigma_p + 2\sigma_m} . \quad (2.26)$$

Dies kann nützlich sein, um abzuschätzen, ob der betrachtete Partikel (z.B. ein Bakterium) in dem verwendeten Medium positive oder negative Dielektrophorese zeigen sollte.

Dielektrophorese von Zellen

Die gewonnenen Erkenntnisse über die Dielektrophorese von sphärischen Partikeln lassen sich nicht direkt auf das dielektrophoretische Verhalten von Zellen übertragen, da hierbei eine Vielzahl von Faktoren zu beachten ist.

Zum einen unterscheiden sich die Form und der reale Aufbau einer lebenden Zelle deutlich von dem bisher angenommenen idealen Partikel. Wie in Kapitel 2.1 gesehen, sind die hier verwendeten Bakterien stäbchen- und nicht kugelförmig. Auch kann man bei einer Zelle nicht von einem homogenen Dielektrikum ausgehen. Bakterien sind vielschichtige Objekte, die viele Bereiche mit unterschiedlichen (elektrischen) Eigenschaften aufweisen. Hierbei sind

vor allem die Zellmembran und das Zytoplasma zu nennen [58]. So kann beispielsweise die Leitfähigkeit des Zellinneren Werte bis zu $1 \cdot 10^3 \mu\text{S/mm}$ annehmen, da sie eine Vielzahl von Ionen und geladenen Partikeln enthält, während die Leitfähigkeit von Zellmembranen meist bei etwa $1 \cdot 10^{-4} \mu\text{S/mm}$ liegt [61].

Des Weiteren spielt die direkte, bzw. indirekte Interaktion zwischen dem elektrischen Feld und der Zelle eine wichtige Rolle. Der indirekte Effekt erfolgt über das im Versuch verwendete leitfähige Flüssigkeitsmedium. Ein angelegtes Feld erzeugt nun einen Stromfluss in diesem und resultiert in einer Erhöhung der Temperatur des Mediums und somit der Zellen, was zu einer Veränderung der Zellphysiologie führen kann [56]. Des Weiteren hat das von außen angelegte elektrische Feld einen direkten Einfluss auf das Zellmembran-Potential. Dort werden transmembrane Spannungen generiert, worauf wiederum spannungs-sensitive Proteine (z.B. Ionenkanäle [62]) reagieren. Wenn diese zelleigenen elektrischen Potentiale verändert werden, kann dies die elektrischen Eigenschaften der Zelle beeinflussen [56].

Die Eigenschaften der Membran bestimmen weiterhin ganz wesentlich, inwiefern das elektrische Feld überhaupt in die Zelle eindringen kann. Während bei hohen Frequenzen ($>100\text{kHz}$) das E-Feld durch die Zellmembran in das Zellinnere eindringen kann, ist dies bei niedrigen Frequenzen ($<100\text{kHz}$) nicht möglich [61].

Ein weiterer noch nicht berücksichtigter Umstand ist, dass im Allgemeinen in Zellen nicht nur Dipole, sondern auch Quadrupole und Multipole mit noch höherer Ordnung induziert werden können [63, 56].

Alle diese genannten Faktoren beeinflussen unweigerlich die Zelle und führen zu komplizierteren Ausdrücken in der Beschreibung der DEP, ändern aber nichts an ihrem fundamentalen physikalischen Funktionsprinzip [56]. Deshalb wird im Folgenden versucht eine Prognose hinsichtlich des dielektrophoretischen Reaktionsverhaltens der in dieser Arbeit gebrauchten Bakterien zu erstellen.

Wie schon in Kapitel 2.1 erwähnt, ist das Bakterium *Sinorhizobium meliloti* gramnegativ. Dies ist ein erster Indikator dafür, dass diese Bakterien später negative Dielektrophorese zeigen werden, da in mehreren anderen Studien gezeigt werden konnte, dass in vielen Fällen gramnegative Bakterien stärker zu negativer DEP tendieren, als grampositive [64].

Ein weiteres Indiz erhält man unter Anwendung des angenäherten Clausius-Mosotti-Faktors (Gleichung 2.26). Für die reale Leitfähigkeit des im Experiment verwendeten Kultur-Mediums LB Broth kann man $220 \mu\text{S/mm}$ annehmen [65], und die Leitfähigkeit des Rm1021(*pHC60*), durch diejenige des E.coli-Bakteriums abschätzen, da dieses ebenfalls gramnegativ ist und die gleiche Größe von ca. $1\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$ hat. Die Leitfähigkeit beträgt hier $1 \cdot 10^{-4} \mu\text{S/mm}$ für die Membran einer lebenden E.coli-Zelle [61]. In diesem Fall erhält man einen negativen f_{CM} -Faktor, und selbst wenn man davon ausgeht, dass das E-Feld in die Zelle eindringt bleibt dieser mit $41,2 \mu\text{S/mm}$ für das Zytoplasma negativ. Demnach müsste auf die Rm1021(*pHC60*)-Zellen bei Anliegen eines räumlich inhomogenen elektrischen Wechselfeldes eine negative dielektrophoretische Kraft wirken.

2.3.4. Erzeugung räumlich inhomogener elektrischer Felder

Generell gibt es zwei verschiedene Varianten um räumlich inhomogene elektrische Felder zu erzeugen. Bei der direkten Version (*internal electrodes*, engl.) entsteht das E-Feld mittels Mikroelektroden, die direkt in den Mikrofluidikkanälen integriert werden. An Elektrodenecken bildet sich dabei der größte Feldgradient. Je nach Anwendung gibt es hinsichtlich der Größe, Form und Anordnung der Elektroden viele verschiedene Ansätze und Designs [54, 65]. In Abbildung 2.8 a) ist eine Vierfach-Elektrode skizziert, die sowohl positive als auch negative DEP-Fallen ausbildet [54].

Bei der indirekten Variante (*external electrodes*, engl.) werden die Gradientenfelder mittels nichtleitender Hindernisse (Isolatoren) erzeugt, die sich im Mikrofluidikkanal befinden. Deshalb wird dieses auch in der vorliegenden Arbeit verwendete Prinzip *elektrodenlose Dielektrophorese* genannt [66]. Bei den Ecken der rechteckigen Pfosten, bzw. denen der dreieckigen Hindernisse entstehen nun Bereiche mit einem starken Gradienten des E-Feldes (siehe Abbildung 2.8 b) und c), so dass die elektrischen Feldlinien anschaulich zwischen den Pfosten eingeengt, bzw. um ein dreieckiges Hindernis vorbeigeführt werden. An diesen Bereichen werden dann Partikel mittels positiver Dielektrophorese gefangen. In den Bereichen vertikal vor den jeweiligen Hindernissen in b) und c) hingegen ist die Stärke des E-Feldes wesentlich geringer. Deshalb agieren diese Bereiche als Fallen für Objekte, die negative Dielektrophorese zeigen.

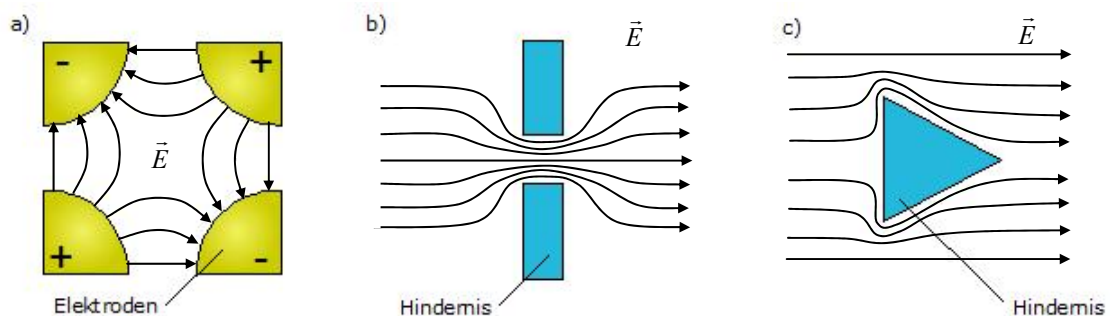


Abbildung 2.8

Schema zur Entstehung der Feldgradienten: a) Beispiel einer Vierfach-Mikroelektrode. Die Polaritäten der gegenüberliegenden Elektroden ist dabei immer dieselbe, und die zum nächsten Nachbarn unterschiedlich. So entsteht ein inhomogenes E-Feld mit positiven DEP-Fallen in den Bereichen mit kleinstem Elektrodenabstand, und eine negative DEP-Falle in der Mitte der Elektrodenanordnung. In b) und c) ist das elektrodenlose DEP-Prinzip skizziert. An den Hindernisecken entstehen Bereiche mit einem starken Feldgradienten, weshalb dort eine positive DEP-Falle entsteht. In den Bereichen flach vor den Hindernissen in b) und c) ist die Feldstärke am geringsten, weshalb dort eine negative DEP-Falle erzeugt wird.

Vergleicht man die beiden Varianten hinsichtlich der in dieser Arbeit angestrebten Anwendung, dann besitzt die elektrodenlose Dielektrophorese mehrere Vorteile. Zum einen ist die Herstellung wesentlich einfacher und kostengünstiger, da die nichtleitenden Pfosten aus demselben Material (PDMS) sind wie der Chip selbst und somit in einem Produktionsschritt hergestellt werden können. Des Weiteren werden die zur Erzeugung des E-Feldes benötigten Elektroden in den Reservoirs am Anfang und am Ende eines Kanals platziert (vgl. Abbildung 3.4). Damit wird gewährleistet, dass in den Bereichen in denen Partikel (Beads oder Zellen) dielektrisch gefangen werden sollen, die Probenlösung nur mit inertem Material (PDMS) in Verbindung kommt, und somit die an den Elektroden auftretenden elektrochemischen Reaktionen aus dem Kanalsystem in die Reservoirs verlagert wird. Ein anderer Vorteil

liegt darin, dass der Feldgradient über die gesamte Kanalhöhe erhalten bleibt, während bei der direkten Variante ein starker Feldgradient nur im Bereich direkt über den Elektroden erzeugt wird.

Ein Nachteil des elektrodenlosen Ansatzes liegt allerdings in der viel größeren Spannung die angelegt werden muss, um vergleichbare Feldstärken wie die der direkten Methode zu erzeugen. Die Ursache dafür liegt in dem viel größeren Elektrodenabstand.

3. Materialien und Methoden

Dieses Kapitel beinhaltet eine Auflistung aller gebrauchten Chemikalien, Materialien und Geräte. Des Weiteren wird ein Überblick über den Produktionsprozess vom geplanten Layout, über die Strukturierung des Masterwafers und die Herstellung der Mikrofluidik-Chips bis hin zu deren Verwendung im Messaufbau gegeben. Abschließend werden noch (die strukturspezifische Kontrolle der Chips und) die Handhabung der Mikroorganismen beschrieben.

3.1. Materialien und Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Chemikalien sind in der nachfolgenden Tabelle 3.1 aufgelistet.

Name	Hersteller	Bemerkung
Aceton	Riedel-de-Haen, D	
Beads 0,5µm	Invitrogen, USA	FluoSpheres® ; CML; gelb-grün fluoreszierend
Beads 1,9µm	Interfacial Dynamics Corporation, USA	CML; gelb-grün fluoreszierend
Beads 3,0µm	Interfacial Dynamics Corporation, USA	CML; gelb-grün fluoreszierend
Ethanol p.A.	Roth, D	
Glutaraldehyd Lösung	Sigma-Alderich, D	25% in H ₂ O
Isopropanol	Merk, D	
LB-Broth	Sigma-Alderich, D	Kultur-Medium
Mikroklemmen	Conrad Elektronik, D	
MilliQ-Wasser	Millipore, USA	Biocel Anlage
Objektträger	Menzel Gläser, D	
PBS (phoshat buffered saline)	Fluka, D	10mM Phosphat, 8mM KCl, 137mM NaCl; pH 7,5
Platindraht	VWR, D	Durchmesser: 0,4mm
Pluronic F108	BASF, D	Poly(ethylenglycol)132-poly(propylenglycol)52-poly(ethylenglycol)132
Polydimethylsiloxane (PDMS)	Dow Corning, D	Sylgard 184
Schwefelsäure	Merck, D	
Silizium-Wafer	CrysTec, D	5 Zoll
SU-8 (2) Photolack	MicroChem, USA	
SU-8 Entwickler: XP SU-8 und mr-Dev 600	micro resist technology, Deutschland	
SU-8 Verdünner GBL	MicroChem, USA	
Tridecafluor-1,1,2,2-tetra-hydrooctyl-trichlorsolan (TDTS)	ABCR, D	
Wasserstoffperoxid	Merck, D	30%

Tabelle 3.1: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Materialien

3.2. Chip Design

Im Folgenden wird das geplante Design der verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten Strukturen vorgestellt. Die Skizzen und dazugehörigen Größenangaben beziehen sich dabei auf den konkreten Maskenentwurf und wurden im Original mit einem CAD-Programm (CleWin 2.88, Delta Mask, Niederlande) gezeichnet.

Die von D. Greif [29] entwickelten Strukturen der Mikrofluidik-Chips lassen sich nach ihrer intendierten Art der Verwendung in zwei Typen aufteilen. Zum einen gibt es den Typ für das hydrodynamische Fangen von Zellen oder Beads an schmalen Übergängen (Hydrodynamik-Struktur), und zum anderen den für das dielektrophoretische Fangen an Hindernissen (Dielektrophorese-Struktur). Zu beiden Klassen gibt es jeweils mehrere Untervarianten, die sich zwar im konkreten Chipdesign unterscheiden, aber nicht im wesentlichen Funktionsprinzip.

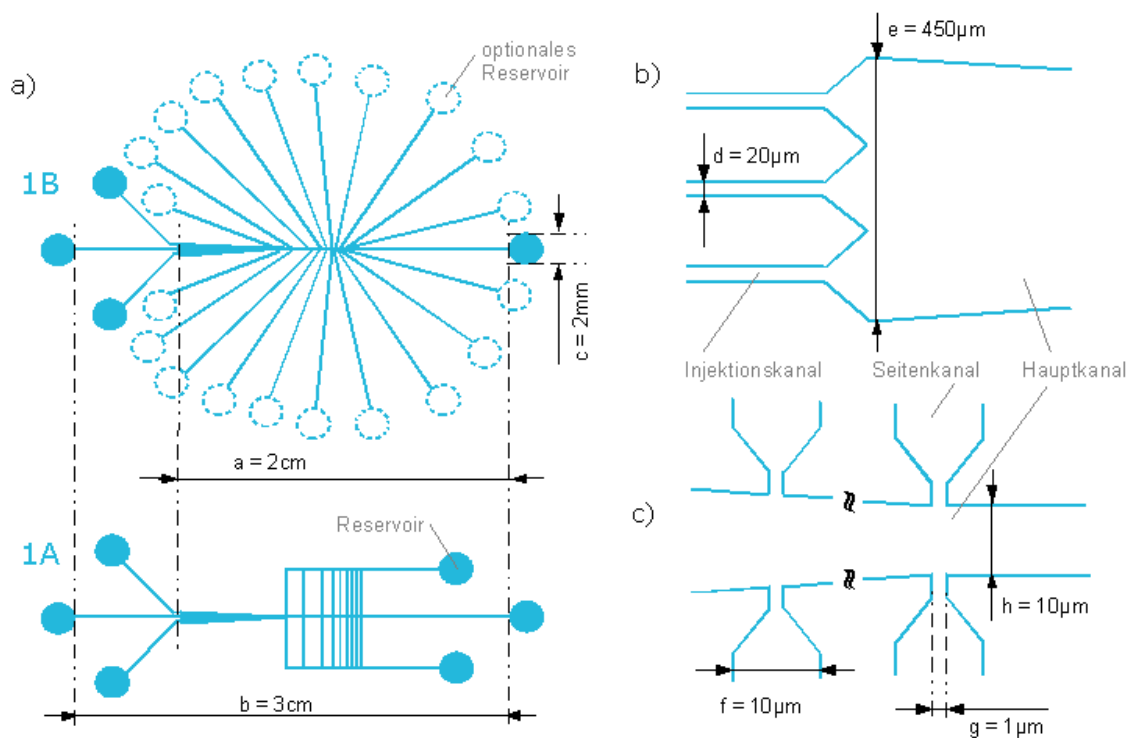


Abbildung 3.1: a) Schematische Übersichtsdarstellung der Hydrodynamik-Strukturen 1A und 1B. b) Beide Strukturen verfügen über die gleichen Eingangsstruktur mit drei voneinander getrennten Injektionskanälen (Breite: $d = 20\text{ }\mu\text{m}$), die zusammen in den Hauptkanal (Gesamtlänge: $a = 2\text{ cm}$) übergehen. Die Breite dieses Hauptkanals verjüngt sich auf einer Strecke von 1 cm kontinuierlich von $e = 450\text{ }\mu\text{m}$ auf $h = 10\text{ }\mu\text{m}$, und verläuft dann mit dieser konstanten Breite bis zu einem Reservoir (Durchmesser $c = 2\text{ mm}$). c) Die orthogonal zum Hauptkanal angeordneten Mikro-Übergänge (Breite: $g = 1\text{ }\mu\text{m}$) verbinden den Hauptkanal mit den seitlich davon abgehenden Seitenkanälen (Breite: $f = 10\text{ }\mu\text{m}$). Sämtliche Strukturen haben eine Höhe von $3\text{ }\mu\text{m}$.

In Abbildung 3.1 a) sind die Hydrodynamik-Strukturen 1A und 1B skizziert. Jede Struktur hat drei Injektionskanäle mit einer Breite von $20\text{ }\mu\text{m}$, die jeweils von einem Reservoir ausgehen. Diese Kanäle enden in dem eigentlichen Hauptkanal, der sich von anfangs $450\text{ }\mu\text{m}$ auf $10\text{ }\mu\text{m}$ verjüngt und dann mit dieser konstanten Breite bis zu einem Reservoir mit einem Durchmesser von 2 mm führt (Abbildung 3.1 b). Die Seitenkanäle, die entweder orthogonal (Struktur 1A), bzw. strahlenförmig (Struktur 1B) vom Hauptkanal abgehen, haben jeweils

eine Breite von $10\mu\text{m}$. An der Stelle ihres Übergangs zum Hauptkanal (Mikro-Übergang) sieht das Chip-Design eine Breite von $1\mu\text{m}$ vor (Abbildung 3.1 c). Die vertikalenⁱ Abstände der Mikro-Übergänge zueinander variieren von $10\mu\text{m}$ bis $200\mu\text{m}$, wobei diese Distanz immer kleiner ist, als die Abstände zu den benachbarten Mikro-Übergängen in der Horizontalenⁱⁱ. Während diese Seitenkanäle in der Struktur 1A auf der jeweiligen Seite des Hauptkanals zusammengeführt werden und somit in einem gemeinsamen Reservoir enden, besteht bei der Struktur 1B die Möglichkeit jeden einzelnen Seitenkanal in einem eigenen Reservoir enden zu lassen.

Die Dielektrophorese-Strukturen unterscheiden sich untereinander in der Form, Größe und der Anordnung der Pfosten im Hauptkanal. Zum einen gibt es Strukturen mit $2\mu\text{m} \times 6\mu\text{m}$, bzw. $2\mu\text{m} \times 8\mu\text{m}$ großen rechteckförmigen Hindernissen. Die horizontalen Abstände dieser zueinander variieren von $40\mu\text{m}$ bis $390\mu\text{m}$ und die Vertikalen von $8\mu\text{m}$ bis $130\mu\text{m}$ (Abbildung 3.2). Dabei ist der vertikale Abstand zwischen zwei Hindernissen immer kleiner als der horizontale Abstand zum benachbarten Hindernis, wobei ein Fang- und Untersuchungs-Paar durch den kleineren Abstand definiert ist. Die Entfernung zwischen zwei Pfosten-Paaren ist somit groß gewählt, um im späteren Experiment eine unbeabsichtigte Induktion durch den daraus resultierenden größeren Diffusionsweg zu vermeiden.

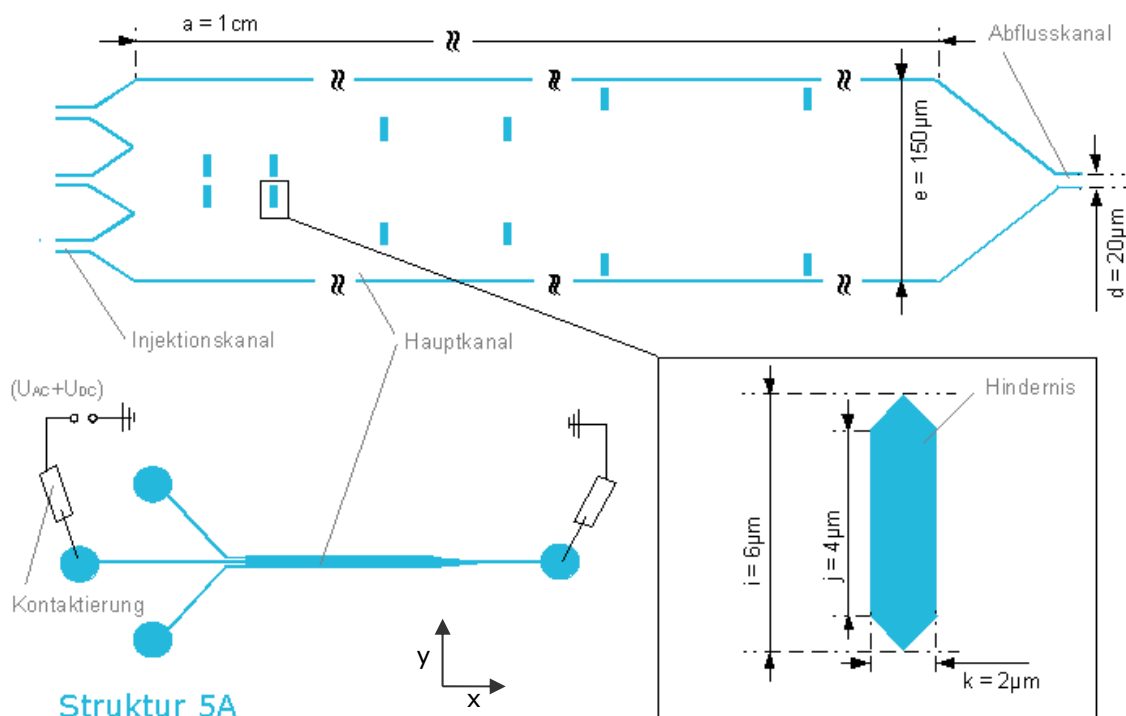


Abbildung 3.2: Skizze der Dielektrophorese-Struktur 5A. Die Eingangsstruktur besitzt drei Injektionskanäle (Breite: $d=20\mu\text{m}$) die zusammen in den Hauptkanal (Breite: $e=150\mu\text{m}$, Länge: $a=1\text{cm}$) übergehen. An Letzteren schließt sich der Abflusskanal an (Breite $d=20\mu\text{m}$). Die in der Vergrößerung dargestellten Hindernisse sind $2\mu\text{m} \times 6\mu\text{m}$ groß. Die vertikalen Abstände dieser Hindernisse zueinander variieren von $8\mu\text{m}$ bis $130\mu\text{m}$ und die Horizontalen von $40\mu\text{m}$ bis $390\mu\text{m}$.

ⁱ vertikal: entspricht der Ordinate (y-Achse) im zweidimensionalen kartesischen Koordinatensystem
ⁱⁱ horizontal: entspricht der Abzisse (x-Achse) im zweidimensionalen kartesischen Koordinatensystem

Die Eingangsstruktur gleicht derjenigen der Hydrodynamik-Strukturen, allerdings hat der Hauptkanal hier eine Breite von $150\mu\text{m}$ und die drei Injektionskanäle, bzw. der Abflusskanal eine Breite von $20\mu\text{m}$.

Des Weiteren gibt es DEP-Strukturen mit dreieckigen Hindernissen als Grundform (genauer Entwurf siehe Abbildung 4.2) die eine Größe von $6\mu\text{m} \times 8\mu\text{m}$ haben, bzw. $7\mu\text{m} \times 7\mu\text{m}$ groß sind (Abbildung 3.3). Hier bilden jeweils zwei gleichschenklige Dreiecke ein Paar und zeigen mit ihren Grundseiten zueinander. Der Abstand zwischen den Grundseiten eines Paares variiert von $10\mu\text{m}$ bis $200\mu\text{m}$ und ist immer kleiner als der Abstand zu den nächstliegenden Hindernissen, wodurch eine ungewollte Induktion vermieden werden soll. Die Dreieckform bietet gegenüber den rechteckförmigen Strukturen den Vorteil, dass die Grundseiten im Experiment eine Vorzugsposition beim Fangen von Zellen mittels negativer DEP darstellen. Außerdem besteht bei der in Abbildung 3.3 gezeigten Struktur 3C die Möglichkeit von beiden Seiten aus zu injizieren, da es an beiden Enden des Hauptkanals einen dreifachen Injektions-Eingangsbereich gibt.

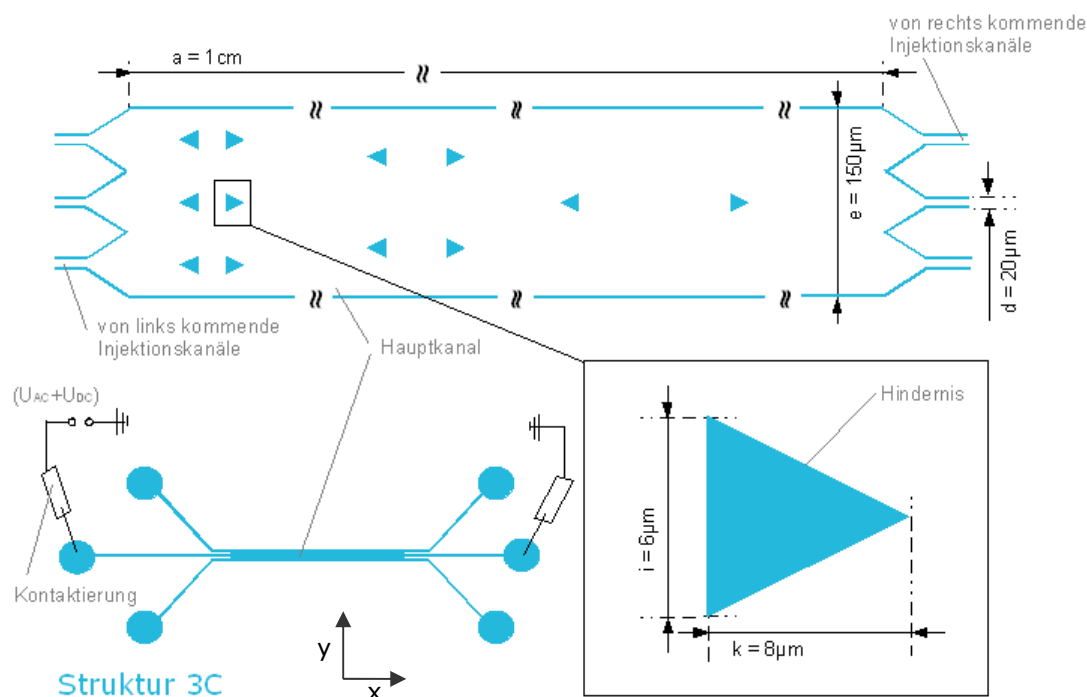


Abbildung 3.3: Skizze der Dielektrophorese-Struktur 3C. Sowohl die rechte als auch die linke Eingangsstruktur weisen drei voneinander getrennte Injektionskanäle (Breite: $d=20\mu\text{m}$) auf, die dann jeweils zusammen in dem Hauptkanal (Breite: $e=150\mu\text{m}$, Länge: $a=1\text{cm}$) enden. Die Hindernisse haben hier die Form von gleichschenkligen Dreiecken, und eine Größe von $6\mu\text{m} \times 8\mu\text{m}$. Zwei mit den Grundseiten aufeinander zeigende Dreiecke bilden zusammen ein Paar. Die horizontalen Abstände eines Dreieckepaares variieren von $10\mu\text{m}$ bis $200\mu\text{m}$, und die Vertikalen von $40\mu\text{m}$ bis $60\mu\text{m}$.

Sowohl die Hydrodynamik- als auch die bis hierhin gezeigten Dielektrophorese-Kanäle haben alle eine einheitliche Höhe von $3\mu\text{m}$.

Neben diesen beiden Dielektrophorese-Strukturen wurden zudem Strukturen verwendet, die ursprünglich für ein dielektrophoretisches Auftrennen von DNA-Molekülen konzipiert waren [19, 20]. In Abbildung 3.4 wird ein Überblick über die wichtigsten Parameter des von

Regtmeier et al. entwickelten Chiplayouts [47] gegeben. Im Gegensatz zu den beiden vorangegangenen Dielektrophorese-Strukturen besitzt diese Struktur ein viel größeres Pfostenfeld. Die Abstände zu den vertikal benachbarten Pfosten beträgt immer $1\mu\text{m}$ und die zu den horizontalen benachbarten immer $20\mu\text{m}$. Die Hindernisse selbst haben eine Größe von $3\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$. Die Kanalhöhe beträgt $6\mu\text{m}$.

Hintergrund der Verwendung dieser DNA-Dielektrophorese-Struktur ist die Durchführung der ersten *proof-of-principle* (engl.) Versuche, um geeignete Parameter zu ermitteln, die ein anschließendes Experimentieren mit den neuen Strukturen erleichtern.

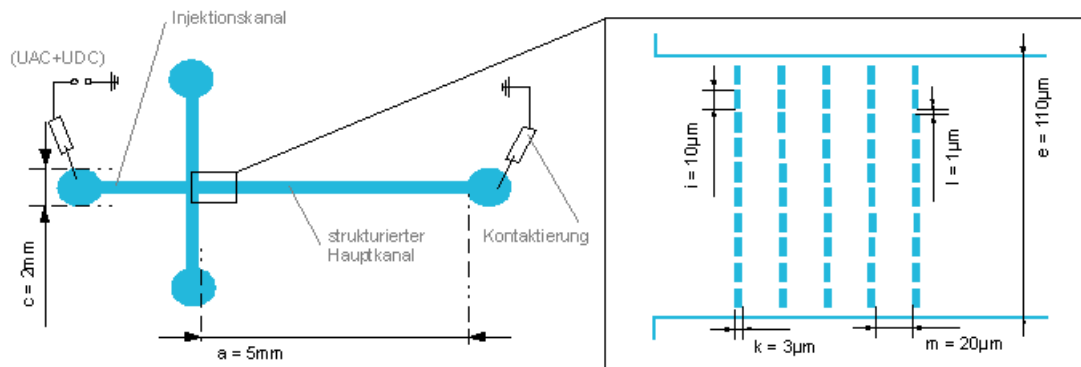


Abbildung 3.4

Skizze der DNA-Dielektrophorese-Struktur mit einem Kreuzungsinjektor. Der Hauptkanal (Breite: $110\mu\text{m}$, Länge: 5mm) ist mit Pfosten der Größe: $3\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ ausgestattet. Diese sind in 180 Reihen mit jeweils 10 Hindernissen angeordnet. Der horizontale Abstand zwischen den Reihen beträgt $m=20\mu\text{m}$ und der vertikale Abstand zwischen den Pfosten $l=1\mu\text{m}$. Sämtliche Kanäle haben eine Höhe von $6\mu\text{m}$, und die Reservoirs einen Durchmesser von 2mm .

3.3. Herstellung des Masterwafers

Die Herstellung eines Masterwafers ist die Grundlage für eine erfolgreiche Produktion der PDMS-Chips. Dazu wird im Reinraum mittels Kontakt-Photolithographie das negative Relief der gewünschten Strukturen hergestellt.

Zunächst wird ein 5-Zoll-Wafer für zweimal 5min in einem Bad aus *Caro'scher* Säure (Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid in einem Verhältnis von 3:1) gereinigt, anschließend zwei Mal gründlich mit Wasser abgespült und wieder für jeweils 5min in ein Wasserbad gegeben, um Reste der *Caro'schen* Säure zu entfernen. In einer Zentrifuge (Delta 10, BLE-Laboratory Equipment, Deutschland) wird der Wafer dann für zunächst 15sec bei 500rpm und anschließend für 30sec bei 3000rpm trocken geschleudert. Die nun noch vorhandene Restfeuchtigkeit wird dem Wafer auf einer Heizplatte (HT-303D, AVT-Technologie, Deutschland) für 20min bei mindestens 200°C entzogen.

Nachdem der Wafer auf unter 100°C abgekühlt ist, wird er auf einer Halterung in der Spincoating-Anlage (ST147, Convac, Deutschland) zentriert und 2-3ml des Photolacks mittig auf ihn gegeben. Ein kurzes Andrehen von 500rpm für 5sec bewirkt eine gleichmäßige Verteilung des Lackes auf der Waferoberfläche. Die gewünschte Schichtdickeneinstellung erfolgt direkt nach dem Andrehen mit einer höheren Umdrehungszahl pro Minute (siehe Tabelle 3.1).

Nach dem Spincoating wird der Lack auf einer programmierbaren Heizplatte vorgehärtet (*Soft-Bake*, engl.). Dazu wird der Wafer erst in 5min auf 40°C, dann in 10min auf 60°C und abschließend in 15min auf 90°C hochgeheizt. Nach Erreichen der jeweiligen Temperatur wird diese für 5min gehalten. Anschließend wird eine Chrommaskeⁱ (Delta Mask, Niederlande) mit den herzustellenden Strukturen über den beschichteten Wafer mit direktem Kontakt zu diesem eingespannt. In einem Parallelbelichter (Modell 8011, Oriel Corporation, USA) wird der Lack für wenige Sekunden mit der i-Linie der Quecksilberdampflampe belichtet (siehe Abbildung 3.5 a). Je nach dem welche Strukturen hergestellt werden sollen, variieren die verwendeten Belichtungszeiten von 8sec bis 14sec (siehe Tabelle 3.2).

Um die belichteten Strukturen im Lack zu vernetzen und auszuhärten erfolgt ein *Post-Exposure-Bake* (engl.) mit denselben Erhitzungs-Phasen wie bei dem *Soft-Bake*.

Nach dem Aushärten erfolgt die Entwicklung des Photolackes in einem Entwicklerbad für bis zu 120sec (siehe Tabelle 3.2), wobei die nicht belichteten Lackbereiche von der Waferoberfläche gelöst werden. Anschließend werden die noch vorhandenen Lackreste mit Aceton und Isopropanol entfernt. Nachdem die Flüssigkeitsreste mit reinem Stickstoff abgeblasen wurden, erfolgt eine letzte Erhitzungsphase (*Hard-Bake*) bei mindestens 200°C für 20min, wodurch die teilweise noch vorhandenen Mikrorisse in den SU-8-Stegen ausheilen können. Anschließend lässt man den Wafer langsam auf Raumtemperatur abgekühlen.

Die erreichte Höhe der SU-8-Strukturen kann mit einem Profilometer (DEKTAK 3030 ST, Sloan, USA) überprüft werden.

Um im späteren Fabrikationsprozess ein leichteres Ablösen des ausgehärteten PDMS zu garantieren, wird der Masterwafer mit TDS silanisiert. Dazu wird der Wafer zusammen mit einem mit wenigen Tropfen benetzten Uhrglas in einen Exsikkator gestellt und dieser für mindestens 30min evakuiert. Dabei verdampft das TDS und es lagert sich eine wenige nm dicke Silanschicht auf dem Wafer ab (siehe Abbildung 3.5 b). Nach dem Abschalten der Vakuumpumpe wird der Wafer für weitere 30min im Exsikkator stehen gelassen und dann entnommen.

Wafer	Spincoating	Belichtungszeit	Entwicklungszeit	Relief-Höhe
W1	SU-8 (2): 5sec bei 500rpm + 30sec bei 1250rpm	12sec	30sec	3,2µm
W2	SU-8 (2): 5sec bei 500rpm + 30sec bei 1250rpm	12sec	20sec	3,4µm
W3	SU-8 (2): 5sec bei 500rpm + 30sec bei 1250rpm	14sec	20sec	3,2µm
W4	SU-8 (5): 5sec bei 500rpm + 10sec bei 3000rpm + 30sec bei 4500rpm	8sec	120sec	3,2µm

Tabelle 3.2 Auflistung der genauen Parameter der verwendeten Wafer

ⁱ auf der mit Chrom beschichteten Seite der Glasmasken sind die gewünschten Strukturen eingeschrieben

3.4. Produktion und Präparation der PDMS-Chips

Nach dem Silanisieren ist der Masterwafer insoweit vorbereitet, dass man die gewünschten Kanalstrukturen viele Male mittels sog. Soft-Lithographie [16] abformen kann. In dieser Arbeit wird für das Abformen *Poly(dimethylsiloxan)* verwendet, welches im Verhältnis von 10:1 des Basispolymers und des Vernetzers angemischt wird. Um einen kompletten Wafer mit einer ca. 1mm dicken PDMS-Schicht zu bedecken, werden 20g des Polymers mit 2g des Vernetzers für 5min verrührt. Anschließend wird das PDMS über den Wafer gegossen. Nach einer Wartezeit von weiteren 30min werden die restlichen noch vorhandenen Luftbläschen mit Hilfe eines Luftstoßes aus einer Pasteurpipette beseitigt. Nach 4,5h Backzeit bei 85°C ist das PDMS ausgehärtet (siehe Abbildung 3.5 c).

Nach dem Abkühlen kann das PDMS vom Masterwafer abgezogen und mit einem Skalpell die gewünschten Strukturen herausgeschnitten werden. In diesen strukturierten PDMS-Chip werden dann die Reservoirs mit einem Durchmesser von 2mm gestanzt. Die Stanzapparatur ist dabei in ein Mikroskop integriert, die eine Genauigkeit der Reservoir-Positionierung von 100µm ermöglicht. Die PDMS-Stücke und die für den späteren Zusammenbau benötigten Deckgläser werden zuerst in Aceton, dann in Ethanol und abschließend in Wasser im Ultraschallbad gereinigt. Danach erfolgt die Trocknung durch Abpusten mit Stickstoff.

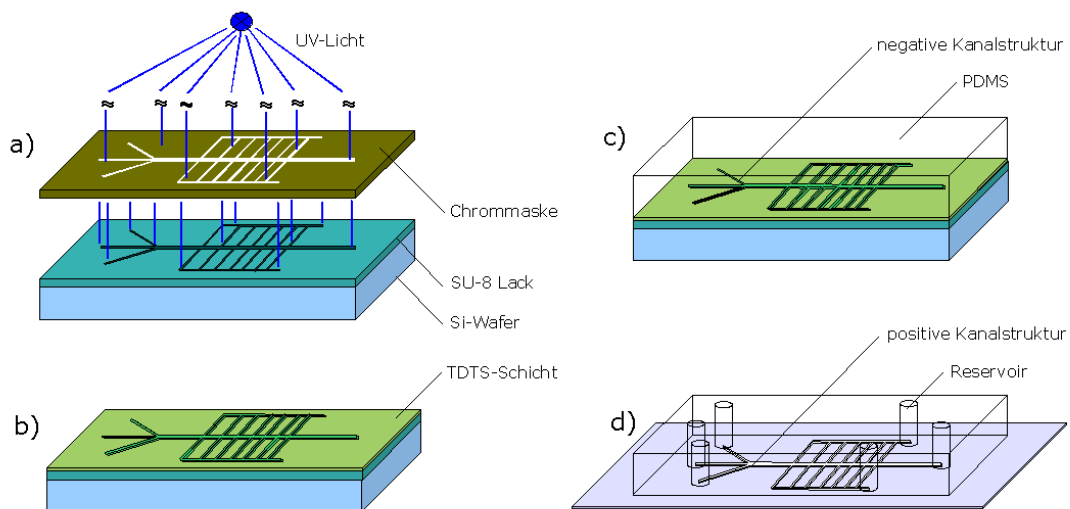


Abbildung 3.5

Produktion der PDMS-Chips: a) Erst wird die gewünschte Struktur auf dem Photolack durch eine Chrommaske belichtet. Nach Aushärtung und Entwicklung des Lacks bleibt die negative Kanalstruktur auf der Waferoberfläche übrig. b) Anschließend wird der Wafer einmalig mit einer wenige nm dicken TDS-Schicht bedampft (silanisiert). c) Um die PDMS-Chips herzustellen wird der Wafer nun mit PDMS, im Verhältnis von 10:1 von Polymer zu Vernetzer, übergossen und nachfolgend 4,5h bei 85°C ausgebacken. d) Schließlich wird das PDMS abgezogen, die zu untersuchenden Strukturen ausgeschnitten und am jeweiligen Kanalende ein Reservoir gestanzt. Nach einer Sauerstoff-Plasmabehandlung des Chips und eines Deckglases werden diese aufeinander gelegt.

Sowohl die strukturierte Seite des PDMS-Chips als auch die später dem Chip zugewandte Seite des Deckglases werden vor dem Zusammenbau noch in einer selbstgebauten Plasma-Oxidationsanlage [67], die mit der in [68] beschriebenen Apparatur vergleichbar ist, behandelt. Dabei werden beide Oberflächen für 20sec in einer Kammer mit einem Sauerstoffdruck

von 0,1mbar einem Sauerstoffplasma ausgesetzt (bei angelegter Spannung von 50kV, 500kHz und einem Elektrodenabstand von 6,15cm). Anschließend werden die so behandelten Seiten in Kontakt gebracht (siehe Abbildung 3.5 d).

Um eine kovalente Verbindung von PDMS und Glas sicherzustellen, werden die Chips nach einer weiteren Wartezeit von mindestens 30min mit einer 3 μ M F108-Lösung in PBS befüllt. Dies führt zu einer Beschichtung der Kanalwände, um unspezifische Adsorption und den EOF zu vermindern [69, 70]. Da zuerst nur ein Reservoir der Injektionskanäle befüllt wird, wird die F108-Lösung durch hydrodynamische Druckdifferenzen zwischen diesem und den restlichen Reservoirs vollständig durch alle Kanäle gespült. Anschließend werden auch die anderen Reservoirs mit derselben Menge an Lösung befüllt. Nach einer erneuten Einwirkzeit von 20h kann die F108-Lösung gegen den PBS-Puffer (bei Experimenten mit Beads), bzw. gegen LB-Medium (Experimente mit Rm1021(*pHC60*)) ausgetauscht werden. Damit die nun gefüllten Kanäle bei zeitlich nicht direkt anschließender Verwendung nicht austrocknen und damit unbrauchbar werden, werden die Chips in einer Petrischale *über Wasser* gelagert.

Um die Sensibilität der später im Experiment nötigen Flussgeschwindigkeits-Steuerung zu erhöhen, können noch PDMS-Stücke mit gestanzten Löchern auf dem Chip aufgebracht werden. Diese dienen der Erweiterung der schon vorhandenen Reservoirs und garantieren eine höhere mögliche Füllhöhe.

Vor dem Plasma-Oxidations-Schritt besteht des Weiteren die Möglichkeit die Qualität der bis dahin produzierten PDMS-Chips zu kontrollieren. Dazu wird die strukturierte Seite des Chips mit einer 20nm dicken Goldschicht besputtert (MCS 010, Bal-Tec, Liechtenstein) und dann in einem Rasterelektronenmikroskop (JSM-880, Joel, Großbritannien) untersucht. Die charakteristischen Größen können nun mittels einer dazugehörigen Software (WinDISS, point electronic GmbH, Deutschland) vermessen werden.

3.5. Experimenteller Aufbau

Der experimentelle Aufbau, der in dieser Arbeit verwendet wurde, ist schematisch in Abbildung 3.6 skizziert. Als Grundlage dient ein Inversions-Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200, Zeiss, Deutschland) mit einer Quecksilber-Kurzbogenlampe (HBO, Zeiss) als Lichtquelle und einer motorisierten x/y-Stage (99S008, Ludl Electronics, USA) die über einen Joystick steuerbar ist. Die CCD-Kamera (Imager 3LS mit SensiCam CCD-Chip, LaVision, Deutschland) ist über den Kameraport des Mikroskops angeschlossen. Des Weiteren ist das Mikroskop mit einem Anregungsfilter (BP 450-490, Zeiss), einem Sperrfilter (BP 515-565, Zeiss) und einem Dichroitsspiegel (FT-510, Zeiss) ausgestattet. Neben dem 20fach Objektiv (LD ACHRO PLAN 20x/0,40Korr, Zeiss) wurde außerdem ein 100fach Ölimmersionsobjektiv (Plan Neofluar NA 1.3, Zeiss) verwendet.

Die Kameraaufnahmen werden über die im ersten Computer installierte Video-Grabber-Karte (SensiCam PCI Interface-Board, PCO, Deutschland) in Kombination mit der LaVision-Software Davis 6.2 aufgezeichnet und gespeichert. Die spätere Auswertung der aufgenom-

menen Bilder wird mit Hilfe des Programms ImageJ 1.40f (National Institute of Health, USA) vorgenommen, und diese zur besseren Visualisierung mit Falschfarben dargestellt.

Die für die dielektrischen Messungen erforderlichen elektrischen Felder werden über ein auf dem zweiten Computer installiertes LabView-Programm gesteuert. An den Kontakt am Injektions-Reservoir (siehe Abbildung 3.2 oder Abbildung 3.3) wird eine sinusförmige Wechselspannung U_{AC} angelegt. Ein Funktionsgenerator (DS345, Stanford Research, USA) steuert dabei den Spannungsverlauf, und der zusätzlich angeschlossene Hochspannungsverstärker (AMS-1B30, Matsusa Precision, Japan) verstärkt die Spannung einhundertfach bis zu einem Maximalspannungswert von 1.000V. Der Kontakt am Abfluss-Reservoir wird immer an die Masse angeschlossen.

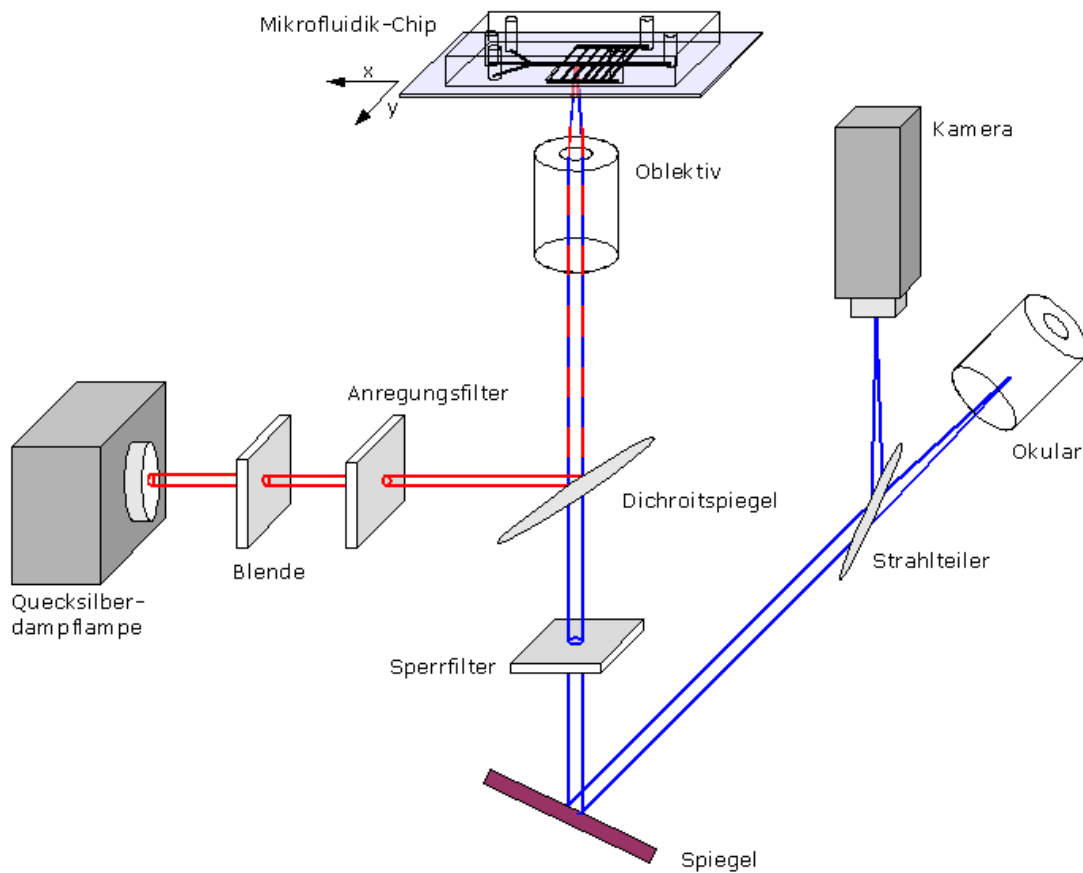


Abbildung 3.6 Schematische Skizze der optischen Komponenten des experimentellen Versuchsaufbaus.

3.6. Präparation der Mikroorganismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Rm1021(*pHC60*)-Bakterien werden freundlicherweise auf einer Agarplatte von der Gruppe Proteom- und Metabolomforschung der Universität Bielefeld zur Verfügung gestellt und bei 4°C gelagert [21].

Um eine frische Bakterienlösung für einen Versuch herzustellen, wird eine Suspensionskultur (1ml) mit Kolonien von der Agarplatte in vorgewärmtem LB-Medium angelegt. Anschließend wird diese Lösung für 10min bei 5000rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in frischem LB-Medium resuspendiert.

Mit dem Fluoreszenz-Mikroskop wird ein Tropfen der Suspensionskultur auf Beweglichkeit und Konzentration der Bakterien untersucht. Bei zu hoher Konzentration wird die Lösung weiter mit Medium verdünnt.

Die Injektionsreservoirs des Mikrofluidikchips werden immer erst unmittelbar direkt vor der jeweiligen Messung mit der Bakterien-Lösung befüllt.

4. Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden die erzielten Ergebnisse beschrieben und diskutiert. Zunächst wird dabei auf die Qualität der produzierten Mikrofluidik-Chips und auf Ursachen von möglichen Abweichungen eingegangen. Anschließend folgt eine Analyse und Auswertung der experimentell aufgenommenen Daten. Diese Daten beinhalten sowohl Aufnahmen zu dem hydrodynamischen Fangen von Beads und Bakterienzellen, als auch zu dem dielektrophoretischen Fangen der Rm1021(*pHC60*)-Bakterien.

4.1. Charakterisierung der hergestellten Mikrofluidik-Chips

Die Qualitätskontrolle der in Kapitel 3.2 vorgestellten und wie in Kapitel 3.3 und 3.4 hergestellten Strukturen wird mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) durchgeführt. Damit werden für die jeweilige Struktur funktional wichtige und charakteristische Merkmale untersucht. Da es im gesamten Herstellungsprozess viele mögliche voneinander unabhängige Fehlerquellen gibt, sind diese hier in einem kurzen Überblick noch einmal zusammengefasst:

Produktionsschritt	
▪ genaues Layout der Struktur (mit dem CAD-Programm) [29]	
▪ Herstellung der Chrommaske	→ Abweichung 1. Art
▪ SU-8-Relief per Photolithographie	→ Abweichung 2. Art
▪ Abformung per Soft-Lithographie	→ Abweichung 3. Art
▪ Präparation zur rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung	→ Abweichung 4. Art

Die von Delta Mask produzierte Chrommaske spiegelt nicht in allen Bereichen die genauen Abmessungen und Größenverhältnisse der in Kapitel 3.2 vorgestellten Struktur-Layouts wieder. Nach einer Untersuchung mittels eines Auflichtmikroskops mit einer 100fachen Vergrößerung wurde ersichtlich, dass auf der einen Seite die Mikro-Übergänge zwar sehr gut ausgebildet sind und den vorgegebenen Maßen entsprechen, auf der anderen Seite aber die Hindernisse der beiden Dielektrophorese-Strukturen bereits Abweichungen von 0,5µm bis 1µm aufzeigen (Abweichung 1. Art).

Ein weiterer Fehler, der nicht die im Experiment verwendeten Chips betrifft, sondern nur die mit dem REM aufgenommenen Bilder, liegt in der Probenpräparation mittels Sputtern und der Befestigung der untersuchten Chips auf dem Probenteller (Abweichung 4. Art).

In Abbildung 4.1 a) ist ein Teil der Hydrodynamik-Struktur 1B zu sehen (vgl. Abbildung 3.1). Vergleicht man die Breite der abgebildeten Seitenkanäle (10,9µm) und des Hauptkanals (10,4µm) mit den entsprechenden Vorgaben (vgl. Kapitel 3.2), so ist eine Abweichung von 9%, bzw. 4% zu erkennen. Allerdings sind diese Größen und somit auch ihre Abweichungen nicht von wesentlicher Bedeutung für die Funktionalität dieser Struktur. In Abbildung 4.1 b)

hingegen erkennt man einen Mikro-Übergang der eine reale Breite von $3,1\mu\text{m}$ hat, und somit um einen Faktor von 3,1 größer als die Vorgabe ist. Ein möglicher Grund für diese Abweichungen könnte im Photolithographieschritt liegen (Abweichung 2. Art). Dabei besteht die Möglichkeit, dass durch Beugungs- und Reflexionseffekte zwischen belacktem Wafer und Maske Fehler entstehen, die durch nicht perfekten Kontakt dieser beiden Medien, bzw. durch eine zu lange Belichtung noch verstärkt werden können.

Des Weiteren sind in den Abbildung 4.1 c) und d) Artefakte zu erkennen, die die Ecken des Mikro-Übergangs, bzw. den Kanalboden betreffen. Der Übergang in Abbildung 4.1c) ist mit einer Breite von $2,1\mu\text{m}$ (Abweichungsfaktor von 2,1) zwar schmaler als derjenige aus Abbildung 4.1 b), hat allerdings durch das Fehlen der Ecke, bzw. durch die zusätzliche Einbuchtung an der Seite zum Hauptkanal einen vergrößerten Eingang mit einer Breite von $3,2\mu\text{m}$.

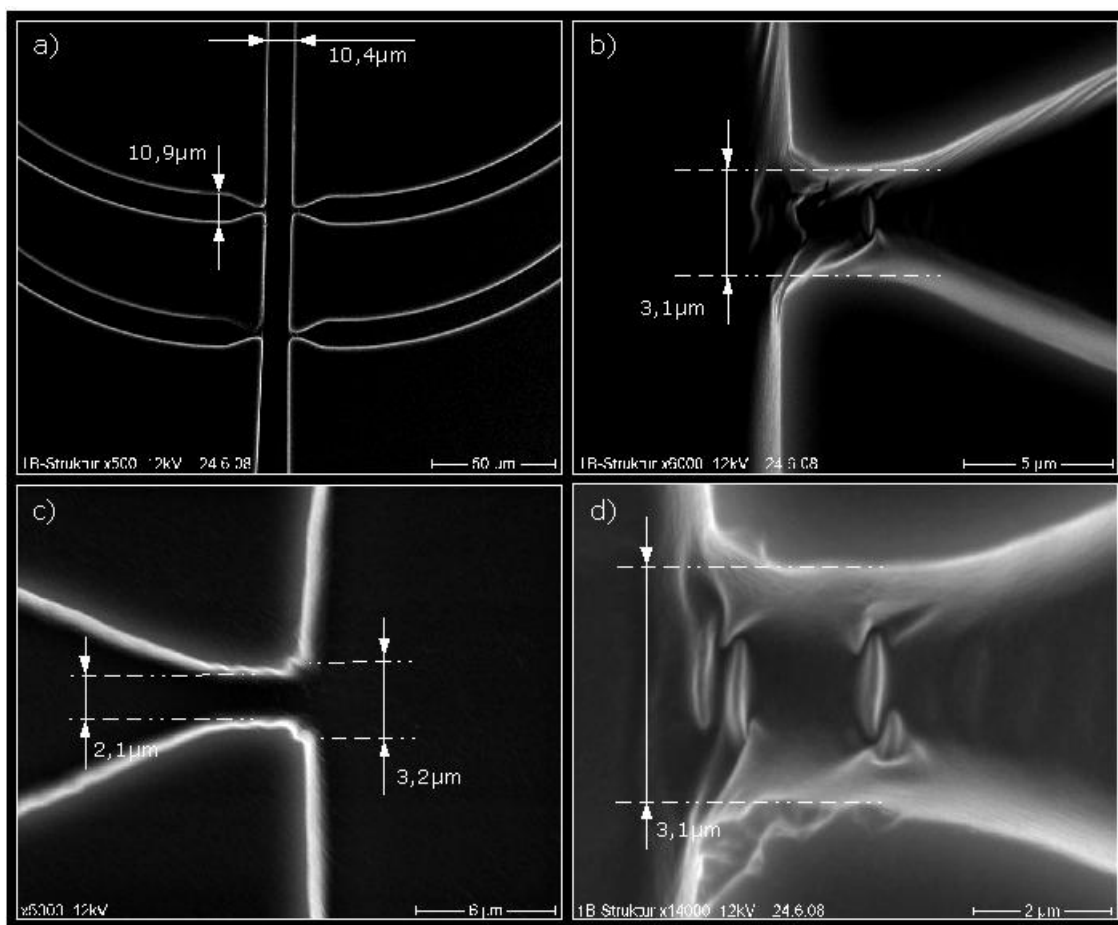


Abbildung 4.1 Bilder der Hydrodynamik-Struktur 1B auf dem Wafer W1 aufgenommen mit dem Rasterelektronenmikroskop: a) 500fach vergrößerter Bildausschnitt mit Hauptkanal und vier davon abgehenden Seitenkanälen. b) 5000fache Vergrößerung eines Mikro-Übergangs mit einer realen Breite von $3,1\mu\text{m}$. c) 9000fache Vergrößerung eines Mikro-Übergangs mit einem typischen Artefakt an den Ecken des Eingangs und einer Breite von $2,1\mu\text{m}$. d) 14000fache Vergrößerung mit am Kanalboden zu erkennenden Artefakten im Mikro-Übergang mit einer Breite von $3,1\mu\text{m}$.

Die Ursache des Eckkanten-Artefaktes ist vermutlich wie zuvor einer Abweichung 2. Art zuzuschreiben. Das Auftreten des Artefaktes am Kanalboden direkt im $1\mu\text{m}$ -Übergang allerdings hängt anscheinend mit dem Sputtervorgang zusammen (Abweichung 4. Art), da es un-

ter einem Lichtmikroskop weder im unbehandelten PDMS noch auf der Chrommaske oder im SU-8-Relief zu erkennen war. Durch die beim Sputtern entstehende Hitze könnten Spannungen, die schon im PDMS vorliegen, zu Verformungen der Oberflächenstruktur am Kanalboden geführt haben.

Das Layout der anvisierten Dielektrophorese-Strukturen ist im Detail in Abbildung 4.2 c) gezeigt. Vergleicht man diese dreieckförmigen Hindernisse mit den dazugehörigen mit dem Rasterelektronenmikroskop aufgenommenen und experimentell hergestellten Strukturen fällt auf, dass die Größe Letzterer deutlich von den vorgegebenen Maßen abweicht. Während die horizontale Breite um ca. 30% abnimmt, verringert sich die vertikale Höhe um ca. 50%. Der Grund liegt zum einen in der eingangs erwähnten Abweichung 1. Art und zum anderen wahrscheinlich wie bei den Hydrodynamik-Strukturen in einer Abweichung 2. Art mit den bereits diskutierten Argumenten.

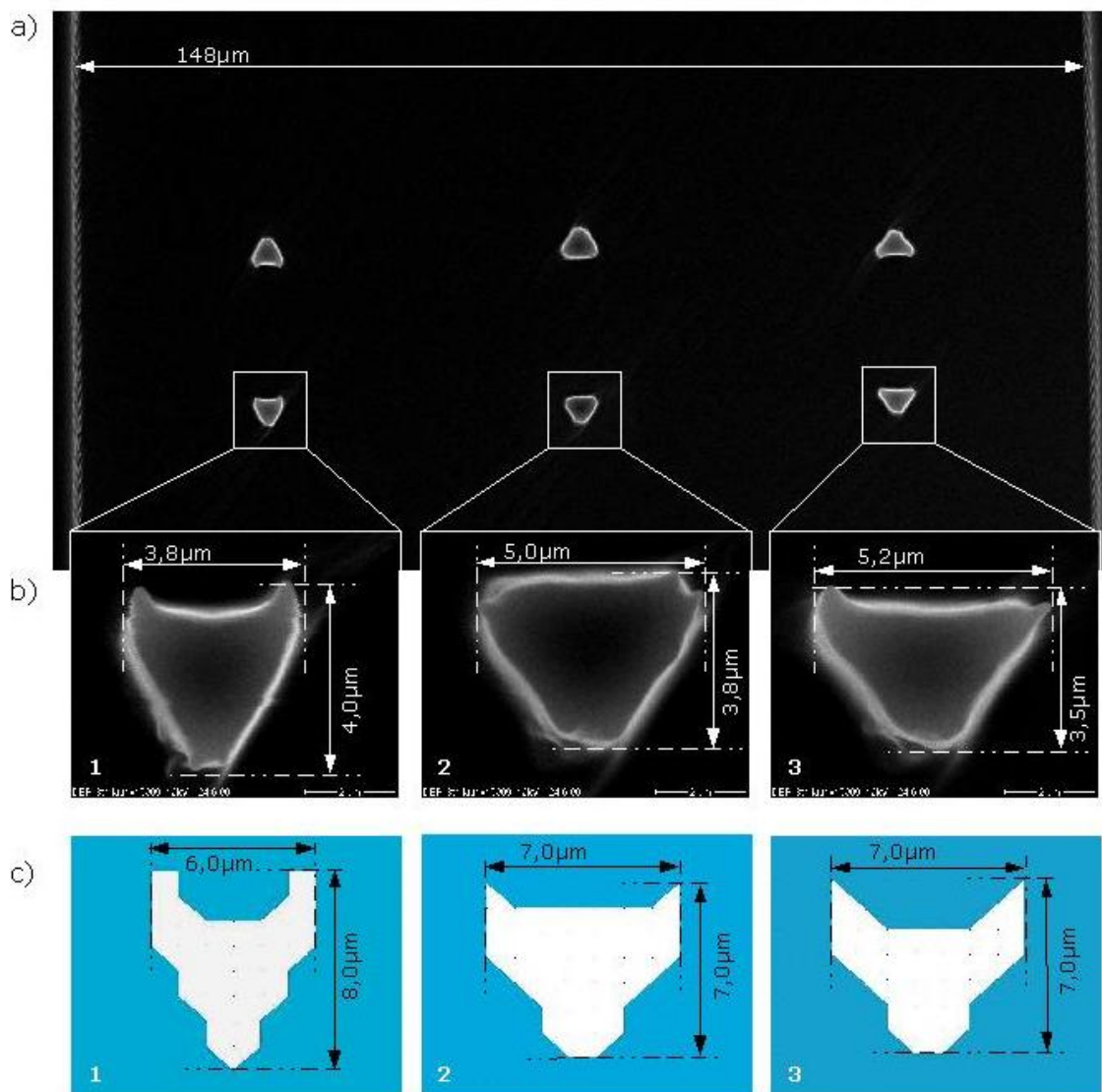


Abbildung 4.2 a) und b) sind Rasterelektronenmikroskopaufnahmen der Dielektrophorese-Struktur 3C auf dem Wafer W3. a) 700fach vergrößerter Bildausschnitt der ersten beiden Hindernis-Reihen. b) Jeweils 15000fache Vergrößerung der unteren drei Dreieck-Strukturen. c) Detaillierte Zeichnungen [29] der geplanten dreieckförmigen Hindernisse (jeweils zugehörig zu der darüber liegenden rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme unter b)).

Trotz offensichtlicher Verkleinerung der Strukturen ist die spezielle Formgebung der einzelnen dreieckförmigen Hindernisse allerdings erhalten geblieben ist. Die in Abbildung 4.2 c) dargestellten zusätzlichen Kanten und Ecken (Hörner) der Vorlage sind in ihrer Charakteristik auch in den mit PDMS abgeformten Strukturen gut zu erkennen. Diese Abänderung der einfachen Dreieckform sollte zum einen dazu dienen, dass die Bakterienzellen wenn sie einmal dielektrophoretisch an den Pfosten gefangen sind, diese Falle nicht so schnell wieder verlassen können. Zum anderen diene sie der Überprüfung inwieweit sich solch filigrane Konturen noch akzeptabel mittels Photo- und Soft-Lithographie produzieren lassen können. Dass die Hörner bei dem mittleren (2) und dem rechten (3) Pfosten leicht verschoben sind (siehe Abbildung 4.2 b), könnte zum einen an der letzten Ausheizphase (vgl. Kapitel 3.3), und einem damit verbundenen leichten Verlaufen des SU-8-Lackes liegen, oder wieder ein Belichtungs-Artefakt sein (Abweichung 2. Art).

Die in den Abbildung 4.1 und Abbildung 4.2 gezeigten Strukturen gehören zu den besseren bis dahin produzierten Strukturen die auf den Wafern W1 und W3 sind. Von den rechteckförmigen Strukturen wurden keine Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop gemacht, da diese Hindernisse im PDMS weder klare Konturen besaßen, noch komplett vom Boden bis zur Decke des Kanals gingen und somit unbrauchbar für eine experimentelle Verwendung waren. Bei diesen Artefakten handelt es sich wahrscheinlich um eine Kombination von Abweichungen 1. und 2. Art.

Als letzter experimenteller Teil für diese Arbeit wurde noch einmal eine Testreihe zur Optimierung der Masterwaferherstellung unternommen, um die Hindernisse der Dielektrophorese-Strukturen hinsichtlich der Größe und der Konturschärfe zu verbessern. Es konnte dabei eine erhebliche Verbesserung erzielt werden (siehe W4 in Tabelle 3.2). Die Mikro-Übergänge zeigten unter dem Lichtmikroskop sowohl im negativen SU-8-Relief als auch in den davon abgeformten PDMS-Stücken die gleichen Abmessungen wie die Strukturen auf der Chrommaske. Auch beim Größenverhältnis der Dielektrophorese-Pfosten auf diesem Wafer W4 (sowohl dreieck- als auch rechteckförmige) zeigten sich große Fortschritte. So konnten noch PDMS-Chips produziert werden, die Strukturgrößen aufweisen wie diejenigen auf der Chrommaske.

4.2. Hydrodynamisches Fangen von Beads

Um die Funktionalität und Verwendbarkeit der Hydrodynamik-Strukturen zu prüfen, werden diese zuerst mit Beads getestet. Da die später zu untersuchenden Bakterien-Zellen eine durchschnittliche Größe von ca. $3\mu\text{m} \times 0,5\mu\text{m}$ aufweisen, finden Beads mit einem Durchmesser von $0,5\mu\text{m}$, $1,9\mu\text{m}$ und $3,0\mu\text{m}$ Verwendung. Das Flussverhalten der Partikel und der vorherige Injektionsvorgang dieser in den Hauptkanal werden nur über den Füllhöhenunterschied der einzelnen Reservoirs (mindestens sechs) gesteuert (vgl. Abbildung 3.1). Dabei ist der Fluss immer von den mehr befüllten zu den weniger befüllten Reservoirs gerichtet. Ein Ausgleich bedeutet in diesem Zusammenhang, dass alle Reservoirs mit derselben Menge an Flüssigkeit befüllt sind, und diese in den Kanälen optimalerweise ruht.

Versuche mit 0,5 μ m-Beads

Als erstes werden die 0,5 μ m-Beads verwendet, um sicherzustellen, dass das hydrodynamische Fallenprinzip in sofern funktioniert, dass die Partikel eine Kraft in Richtung der Seitenkanäle verspüren. Andererseits, falls Letzteres zutrifft und die Beads die Mikro-Übergänge passieren und in den Seitenkanal fließen, lässt sich damit verifizieren, dass diese Übergänge zumindest groß genug und nicht verstopft sind. In der Bilderreihe in Abbildung 4.3 ist dieses Verhalten dokumentiert. Während sich der im jeweiligen Bild untere 0,5 μ m-Bead erst immer mehr in Richtung Kanalwand und dem dortigen Seitenkanal bewegt a) bis c), hat er bei d) schon den 1 μ m-Übergang durchquert und fließt dann im Seitenkanal weiter.

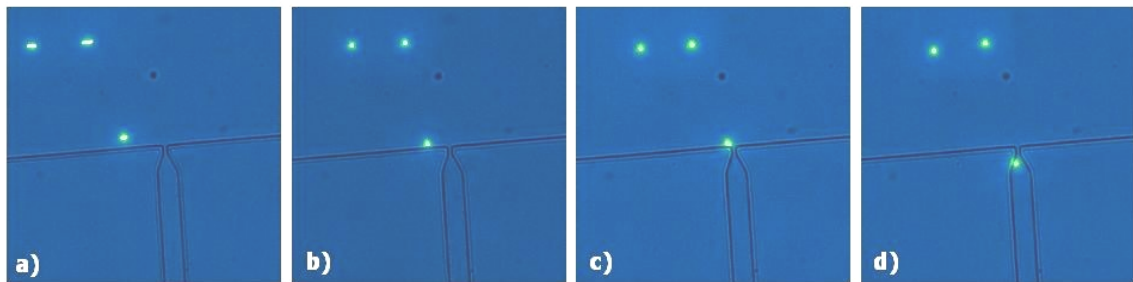


Abbildung 4.3 Bilderreihe über das Passieren eines Mikro-Übergangs von einem 0,5 μ m-Bead in der Struktur 1A vom Wafer W3: In a) bis c) nähert sich der Bead immer mehr der Kanalwand des Hauptkanals wo der Seitenkanal lokalisiert ist. In d) hat er den Mikro-Übergang bereits durchquert und befindet sich im Seitenkanal.

Ein Fangen und Festhalten an den hydrodynamischen Fallen ist mit den 0,5 μ m-Beads nicht beobachtet worden. Teilweise kommt es bei längeren Versuchszeiten zur Adsorption der Partikel am Kanalboden.

Versuche mit 1,9 μ m-Beads

Als nächstes werden die Strukturen 1A und 1B mit den 1,9 μ m-Beads getestet. Bei diesen Versuchen sind erfolgreich und mehrfach einzelne 1,9 μ m-Beads an den Mikro-Übergängen festgehalten worden. Bei genauer Beobachtung dieser Fangvorgänge in den Abbildung 4.4 und Abbildung 4.5 kann man sogar ein qualitatives Unterscheidungsmerkmal unter den funktionierenden hydrodynamischen Fallen ausmachen.

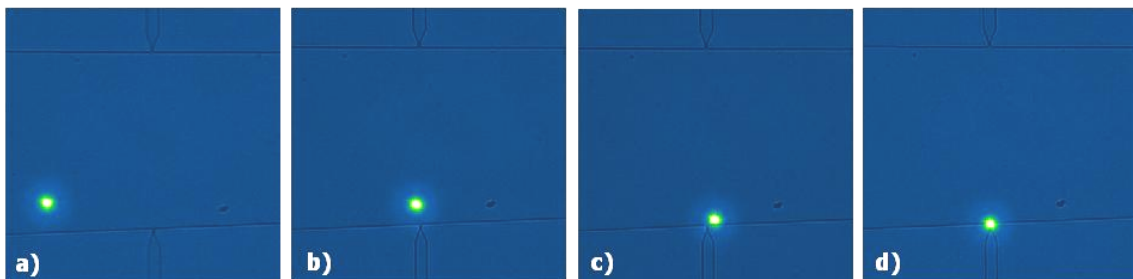


Abbildung 4.4 Bildfolge vom Fangen eines 1,9 μ m-Beads am unteren Mikro-Übergang eines Seitenkanals der Struktur 1A vom Wafer W1: In a) bis c) kommt der Partikel dem aktiv Eingang immer näher, und wird in c) schließlich dort sicher festgehalten.

Bei den besonders guten Fallen können die Beads selbst dann noch gefangen werden, wenn die Flusslinie auf der sie sich bewegen bis zu 10 μ m in der Vertikalen von der Kanalwand mit den Mikro-Übergängen entfernt ist. Ein Beispiel für ein solches Verhalten ist in

Abbildung 4.4 zu sehen. Hier ist die Falle sogar so stark, dass der Partikel selbst dann noch angesaugt wird, wenn er schon am Seitenkanal vorbei ist (vgl. Abbildung 4.4 c).

Bei den anderen funktionierenden Fallen müssen sich die Beads bei gleicher Strömungsgeschwindigkeit wie vorher schon direkt an der Hauptkanalwand entlang bewegen, um auch sicher gefangen zu werden (vgl. Abbildung 4.5). Sind sie auch nur leicht davon entfernt, werden sie an dem betrachteten Seitenkanal nicht festgehalten, sondern verspüren lediglich eine Kraft, die sie näher an diesen heranbringt. Dieser Näherungsprozess wiederholt sich nun solange, bis der Bead direkt an der Wand entlangläuft, und dann am nächstmöglichen Seitenkanal gefangen wird.

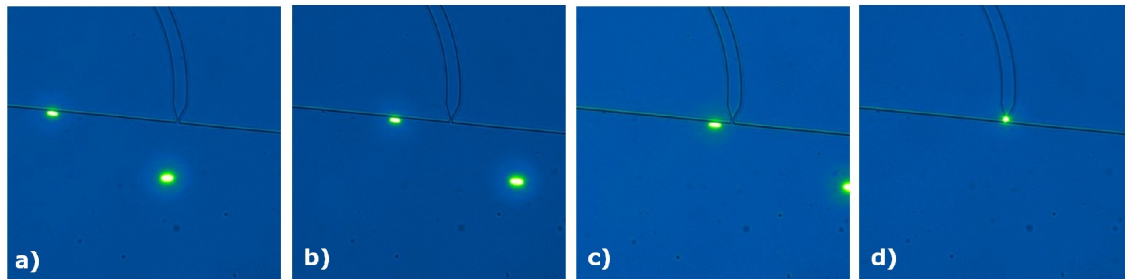


Abbildung 4.5 Bildfolge wie ein $1,9\mu\text{m}$ -Bead am Mikro-Übergang der Struktur 1B vom Wafer W1 gefangen wird: Hier bewegt sich der Partikel schon in a) bis c) direkt an der Wand des Hauptkanals entlang, bis er in der hydrodynamischen Falle fest gehalten wird.

Das gerade beschriebene Fangen von einzelnen Beads funktioniert sowohl bei der Struktur 1A, bei der alle Seitenkanal-Eingänge potentielle hydrodynamische Fallen bilden, als auch bei der Struktur 1B, bei der nur die mit einem Reservoir ausgestatteten Seitenkanäle effektiv als Fallen auftreten sollten. Im Laufe der Versuche kommt es aber auch vor, dass die Beads auf die nicht mit einem Reservoir versehenen Seitenkanäle reagiert haben. Die Ursache dafür könnte darin liegen, dass die Flüssigkeit in den Seitenkanälen aufgrund der Permeabilität von PDMS [16] verdunstet und somit ein nicht erwünschter Unterdruck in diesen entsteht. Dass die Seitenkanäle ohne Reservoir an ihrem Ende überhaupt mit Flüssigkeit befüllt sind, liegt wahrscheinlich an der Oberflächenbehandlung mit einem Sauerstoff-Plasma, wodurch die Kanalwände besonders hydrophil sind. Vor Beginn einer Messung ist dieser Befüllungszustand auch kontrolliert worden.

Da sich das Injektionsverhalten der Partikel von Chip zu Chip unterschiedlich gestaltet, kommt es aber auch vor, dass bei manchen Experimenten zu viele $1,9\mu\text{m}$ -Beads auf einmal vom Reservoir über den Injektionskanal in den Hauptkanal geschleust werden. Dies resultiert dann in teilweise verstopften Mikro-Übergängen. In Abbildung 4.6 ist so ein Seitenkanal-Eingang, mit ca. 20 davor angelagerten Beads zu sehen.

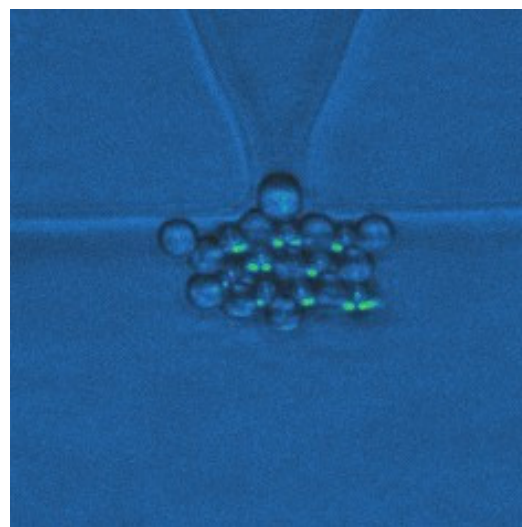


Abbildung 4.6 Aufnahme eines mit $1,9\mu\text{m}$ -Beads verstopften Mikro-Übergangs mit 100facher Vergrößerung.

Die Aufnahme einer solchen Ansammlung von Beads mit 100facher Vergrößerung darf dabei nur mit dem Auflicht gemacht werden, da ansonsten das von diesen abgegebene Fluoreszenzlicht zu einer Überblendung führt (vgl. Abbildung 4.8). Wie man erkennt ist in dem Übergang auch nur ein $1,9\mu\text{m}$ -Bead, und die Übrigen haben sich davor auf der Seite des Hauptkanals aufgestaut.

In den bis hier beschriebenen Fällen wurde darauf geachtet, dass die $1,9\mu\text{m}$ -Beads immer fest gefangen werden. Des Weiteren wurde nun getestet, ob die Beads, wenn sie einmal gefangen sind auch wieder von den Seitenkanal-Eingängen gelöst werden können. Dies wird erreicht, indem der Füllhöhenunterschied zwischen den Reservoirs in sofern variiert wird, dass das Reservoir in dem der Seitenkanal mit dem gefangenen Bead endet, etwas mehr (ca. $1\mu\text{L}$) Flüssigkeitsvolumen enthält, als die Übrigen. In Abbildung 4.7 ist sichtbar, wie sich der Partikel von dem Mikro-Übergang löst.

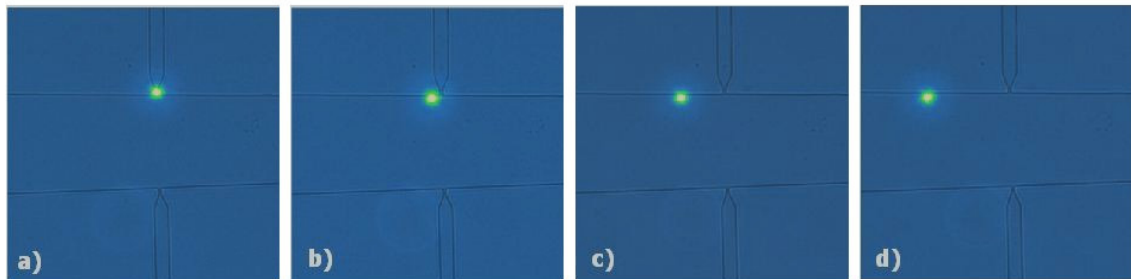


Abbildung 4.7 Bilderreihe von einer Ablösung des zuvor gefangenen $1,9\mu\text{m}$ -Bead von dem Mikro-Übergang der Struktur 1A vom Wafer W1: In a) wird der Partikel noch am Seitenkanal-Eingang festgehalten. In b) bis d) bewegt er sich nach einer Variation der Füllhöhe des Reservoirs immer weiter vom Übergang weg

Bei einem bloßen Füllhöhenausgleich ist dies nicht geschehen, obwohl damit die hydrodynamische Falle nicht mehr aktiv sein sollte. Dies könnte daran liegen, dass der Fluss im Hauptkanal zwar idealerweise ruht und somit der Bead im Puffer frei diffundieren könnte, aber die Adsorption des Partikels an der Kanaloberfläche des Mikro-Übergangs zu stark ist, um sich davon loszulösen. Dazu wird eine zusätzliche Kraft benötigt, die dann von dem erhöhten Flüssigkeitsvolumen aufgebracht werden muss.

Von den Seitenkanälen loslösen lassen sich aber nicht nur einzelne Beads, sondern auch große Ansammlungen wie sie in Abbildung 4.6 gezeigt worden sind.

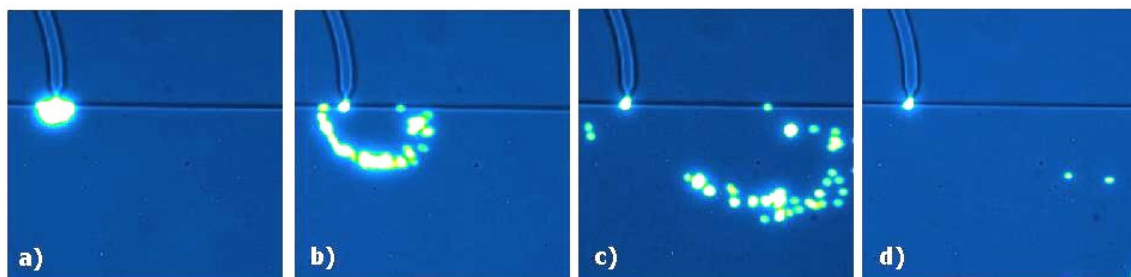


Abbildung 4.8 Bildsequenz einer Gruppen-Ablösung eines mit $1,9\mu\text{m}$ -Beads verstopften Mikro-Übergangs der Struktur 1B vom Wafer W1: In a) werden noch alle Beads am Übergang gefangen. Nach Manipulation der Füllhöhe im Reservoir wird der Großteil der Beads in b) bis d) weggespült. Nur ein oder zwei Beads verbleiben am Übergang.

Der dazugehörige Ablösevorgang ist in einer Bildsequenz in Abbildung 4.8 zu sehen. Was dabei auffällt, ist, dass sich ein oder zwei Beads in dem Mikro-Übergang nicht ablösen. Dies könnte an der im vorigen Absatz diskutierten Adsorption des Beads an der Kanaloberfläche liegen, die in diesem Fall durch den Druck der zusätzlichen Beads noch stärker ausgeprägt ist. Eine andere Ursache könnte ein einfaches Feststecken des Beads im Übergang sein.

Wie in der Bildsequenz in Abbildung 4.9 zu sehen ist, kommt es aber auch vor, dass die $1,9\mu\text{m}$ -Beads nicht an den hydrodynamischen Fallen gefangen werden, sondern wie schon zuvor bei den $0,5\mu\text{m}$ -Beads, in die Seitenkanäle gelangen. Dies liegt daran, dass die Übergänge von Haupt- zu Seitenkanal nicht die geplante Durchlassbreite von $1\mu\text{m}$ aufweisen (vergleiche Kapitel 4.1), sondern teilweise deutlich breiter sind. Ein weiterer Grund ist, dass auch die Beads leichte Abweichungen in ihrer Größe, bzw. ihrem Durchmesser zeigen, und somit an manchen Mikro-Übergängen einige Beads diese passieren, aber andere, mit eigentlich der gleichen Größe, an ihnen festgehalten werden können.

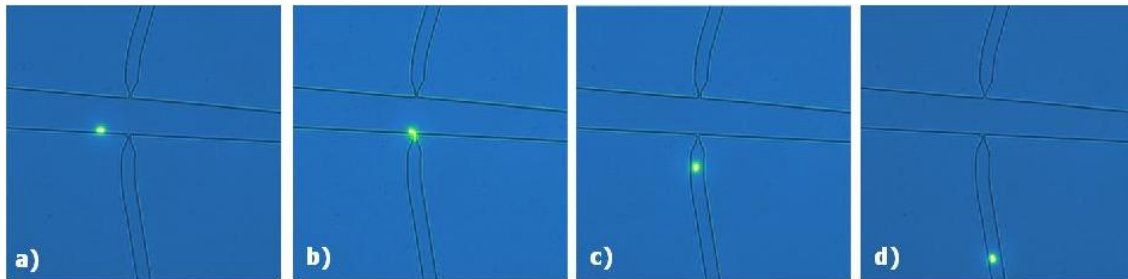


Abbildung 4.9 Bildsequenz wie ein $1,9\mu\text{m}$ -Bead den Mikro-Übergangs durchquert; aufgenommen in der Struktur 1B vom Wafer W1: In a) bewegt sich der Partikel schon nah an der Kanalwand des Hauptkanals entlang, bis er bei b) direkt im Übergang ist, und anschließend in c) und d) immer weiter in den Seitenkanal fließt.

Versuche mit $3,0\mu\text{m}$ -Beads

Bei den Versuchen mit den $3\mu\text{m}$ -Beads sind diese meist gar nicht erst vom Reservoir in den Injektionskanal gelangt, und falls doch, sehr schnell am Kanalboden, bzw. an der Kanaldecke adsorbiert und haben diesen dann verstopft.

Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die Beads, auch wenn sie mit dem Fluss mitgespült werden, leicht Richtung Boden oder Decke diffundieren. Und da der zur Verfügung stehende Spielraum zur ungehinderten Bewegung, bei einer Kanalhöhe von $3,2\mu\text{m}$ bis $3,4\mu\text{m}$, auf der jeweiligen Seite nur $0,1\mu\text{m}$ bis $0,2\mu\text{m}$ beträgt, kommen sie mit der Kanaloberfläche häufig in Kontakt, und adsorbieren somit dort schneller als kleinere Beads.

Ein weiterer genereller Grund für eine schnelle Adsorption könnte auch eine nicht komplette und nicht die gesamte Kanaloberfläche bedeckende F-108-Beschichtung sein. Das heißt, an den Stellen wo die Beschichtung nicht, oder nicht mehr vorhanden wäre, würden die Beads bei einem Kontakt mit der Kanalwand dort sofort adsorbieren.

4.3. Hydrodynamisches Fangen von Rm1021(*pHC60*)

Nachdem die Funktionalität der Hydrodynamik-Strukturen mit den Beads erfolgreich nachgewiesen wurde, wird nun versucht dieses Ergebnis auf die Rm1021(*pHC60*)-Bakterienzellen zu übertragen. Der experimentelle Ablauf und die Steuerung des Flusses in den Kanälen sind äquivalent zu den Versuchen mit den Beads.

Es werden mehrfach einzelne Zellen gezielt an den Mikro-Übergängen gefangen. Dies gelingt vorwiegend mit den größeren in den Hauptkanal injizierten stäbchenförmigen Bakterien, die anhand der Aufnahmen abgeschätzte 0,5µm bis 1µm breit und 4µm bis 5µm lang sind. Das in Kapitel 4.2 beschriebene Qualitätskriterium bzgl. der Effektivität und Stärke der hydrodynamischen Fallen wird auch bei den Versuchen mit den Rm1021(*pHC60*) bestätigt. In einigen Fällen reicht es aus, dass die Zelle in einem Abstand von ca. 5µm bis 10µm von der Hauptkanalwand entfernt entlang fließt, um am nächstmöglichen Seitenkanal gefangen zu werden. In anderen Fällen wiederum muss das Bakterium direkt an der Kanalwand sein, um festgehalten zu werden. Zusätzlich dazu kommt es auch noch darauf an inwiefern die Zelle auf ihrer Flussbahn um sich selbst rotiert, und sich somit quer vor dem 1µm-Übergang, oder längs in Richtung des Seitenkanals zeigend, auf den Eingang zu bewegt. In ersterem Fall kommt es vorwiegend zu einem Fangen (vgl. Abbildung 4.10), und im letzteren wird die Zelle meistens in den Seitenkanal gespült. Trotzdem ist es auch gelungen ein Rm1021(*pHC60*)-Bakterium mit dieser Ausrichtung zu fangen (Abbildung 4.11).

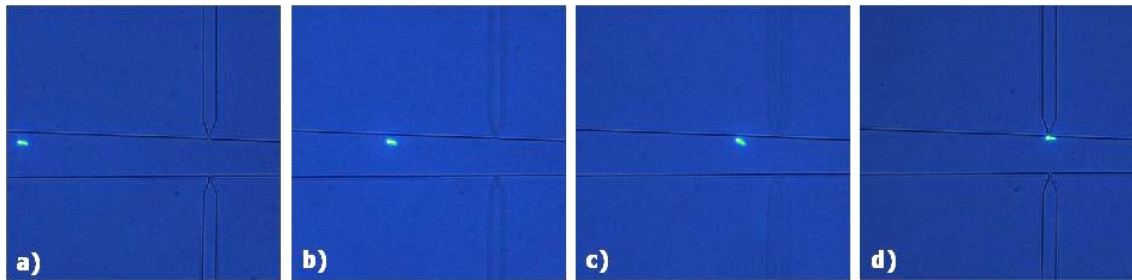


Abbildung 4.10 Bildsequenz wie ein Rm1021(*pHC60*)-Bakterium am Mikro-Übergang der Struktur 1A vom Wafer W3 gefangen wird: In a) bis c) kommt die Zelle dem Seitenkanal-Eingang immer näher, und wird in d) längs davor festgehalten.

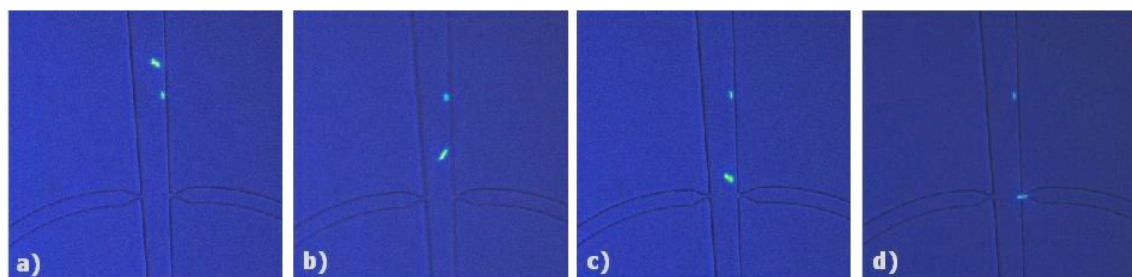


Abbildung 4.11 Bildsequenz vom Fangen einer Zelle am Mikro-Übergang der Struktur 1B vom Wafer W3: Das Bakterium kommt in a) bis c) dem Übergang bei gleichzeitiger Rotation immer näher, und wird dann in d) gefangen, obwohl es mit seiner längeren Seite in Richtung des Seitenkanals zeigt.

Das Fangen war jeweils von Dauer. Ein Ablösen der bereits festgehaltenen Bakterien von den Seitenkanal-Eingängen wie bei den Beads konnte nicht beobachtet werden; weder nach einem reinen Füllhöhenausgleich, noch nach einer zusätzlichen Befüllung des für die entsprechende Falle zuständigen Reservoirs. Dies könnte daran liegen, dass die Zellen, nachdem sie

gefangen wurden, an diesen Stellen an der Kanalwandoberfläche adsorbiert sind, oder dass sie den Seitenkanal bei einer Ausrichtung wie in Abbildung 4.11 insoweit verstopft haben und darin feststeckten, dass der Ausgleich keine Wirkung zeigen konnte.

Wie in den bisherigen Abbildungen zu sehen, ist es wiederholt gelungen nur einzelne Rm1021(*pHC60*)-Bakterien-Zellen in den Hauptkanal zu schleusen. Dies ist keine Selbstverständlichkeit, wie man in Abbildung 4.12 erkennen kann. Dort ist ein Einspülvorgang von Bakterien-Zellen vom Injektions-Reservoir in den Injektionskanal zu sehen. In der abgebildeten Darstellung ist die Konzentration an Bakterien im Reservoir zum Beispiel ein wenig zu hoch für eine kontrollierte Einspülung von einzelnen Zellen. Somit werden zu viele Rm1021(*pHC60*)-Bakterien in den Hauptkanal injiziert. Dies kann in vielen Fällen direkt durch ein angepasstes Verhältnis der Reservoir-Füllhöhen zueinander ausgeglichen werden. Falls dieser Ausgleich allerdings zu spät oder gar nicht erfolgt, hat dies zur Folge, dass der Injektionskanal teilweise verstopft (siehe

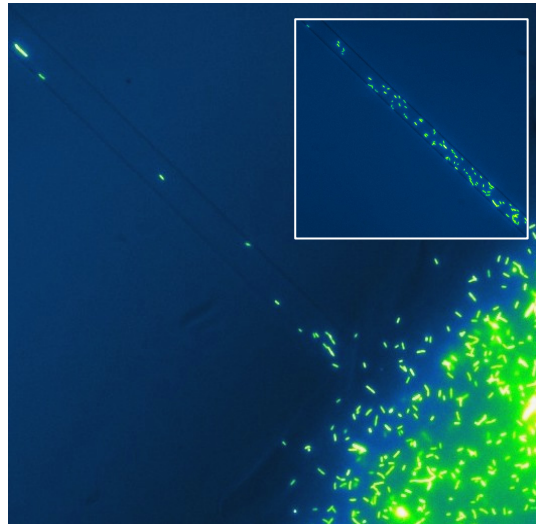


Abbildung 4.12 Groß: Aufnahme eines befüllten Injektions-Reservoirs. Klein: Bild eines verstopften Injektionskanals.

Kasten in Abbildung 4.12), und somit ein weiteres Einspülen von Zellen nicht mehr realisiert werden kann. Mit einer geeigneten Konzentration (ca. 100-1000 Bakterien pro 1 μ L) von Zellen im Medium und einem angepassten Füllhöhenverhältnis ist jedoch ein erfolgreiches Injizieren einzelner Bakterien realisiert worden.

Beim Versuch die Rm1021(*pHC60*)-Bakterien zu fangen ist es allerdings in mehreren Fällen geschehen, dass die Zellen, wie schon bei den Versuchen mit den Beads, nicht am Mikro-Übergang festgehalten werden konnten. In Abbildung 4.13 kann man erkennen, dass selbst größere Bakterien an den Mikro-Übergängen vorbei in den Seitenkanal gelangen können. Die Ursache hierfür liegt anscheinend wieder in den zu breiten Übergängen.

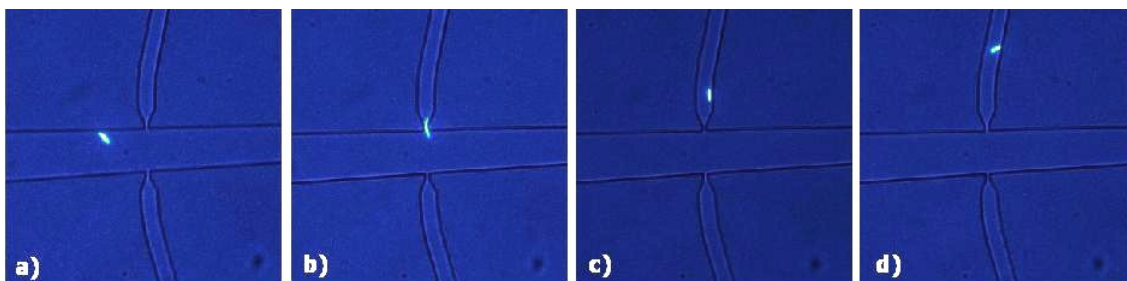


Abbildung 4.13 Bilderreihe wie eine längliche Zelle am Mikro-Übergang vorbei in den Seitenkanal gelangt; aufgenommen in der Struktur 1B vom Wafer W3: In a) ist das Bakterium noch im Hauptkanal, in b) schon im Übergang und in c) und d) bewegt es sich weiter in den Seitenkanal.

4.4. Dielektrophoretisches Fangen von Rm1021(*pHC60*)

Eine weitere Möglichkeit Bakterienzellen zu fangen bietet die Dielektrophorese. Zunächst werden mit den DNA-Dielektrophorese-Strukturen (siehe Kapitel 3.2, Abbildung 3.4) erste Tests durchgeführt, inwiefern diese Methode für ein effektives Fangen geeignet ist. Danach schließen sich die Experimente mit den neuartigen Dielektrophorese-Strukturen an (siehe Kapitel 3.2, Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3). Diese sind aufgrund der Dimensionierung und Pfostenanordnung speziell für ein Fangen von Bakterien-Zellen entwickelt worden.

Das experimentelle Vorgehen ist bei den unterschiedlichen Dielektrophorese-Strukturen immer das Gleiche. Erst wird das Injektions-Reservoir wieder mit der Bakterien-Lösung befüllt und die Übrigen mit der gleichen Menge an Medium. Durch diesen Füllhöhenausgleich zu Beginn einer Messung soll der hydrodynamisch verursachte Fluss in den Kanälen verhindert werden. Anschließend werden das Injektions-Reservoir und das diesem gegenüberliegende Abflussreservoir mit den Platinelektroden kontaktiert. Diese Elektroden haben bei den DNA-Dielektrophorese-Strukturen einen Abstand von 7mm und bei den dreieckförmigen, bzw. rechteckförmigen Dielektrophorese-Strukturen einen Abstand von 3cm.

Über das LabView-Programm können die zwischen diesen beiden Kontakten anliegende Gleichspannung (U_{DC}) und gleichzeitig die Wechselspannung (U_{AC}) mit der dazugehörigen Frequenz (f_{AC}) kontrolliert werden. Mit einer Gleichspannung die bei allen Experimenten zwischen 10V und 50V liegt, werden die Rm1021(*pHC60*)-Bakterien mittels des EOF in den Hauptkanal gespült. Damit wird ein langsames gleichmäßiges und bei Bedarf schnell variierbares Fließverhalten garantiert.

DNA-Dielektrophorese-Strukturen

Die Versuche mit diesen Strukturen zeigen, dass es möglich ist, Bakterien-Zellen mittels negativer Dielektrophorese zu fangen. Dieser Fangprozess erfolgt kontrolliert, und nur bei Anliegen eines inhomogenen elektrischen Wechselfeldes in einem bestimmten Amplituden- und Frequenzbereich. Sobald einer dieser Parameter (U_{AC} oder f_{AC}) nicht mehr in diesem Bereich liegt, zeigen die Zellen keine, bzw. eine zu schwache Reaktion auf das Feld und werden somit nicht mehr erfolgreich gefangen, bzw. festgehalten. In Abbildung 4.14 ist zu sehen, wie ein einzelnes Rm1021(*pHC60*)-Bakterium zweimal hintereinander gezielt gefangen wird.

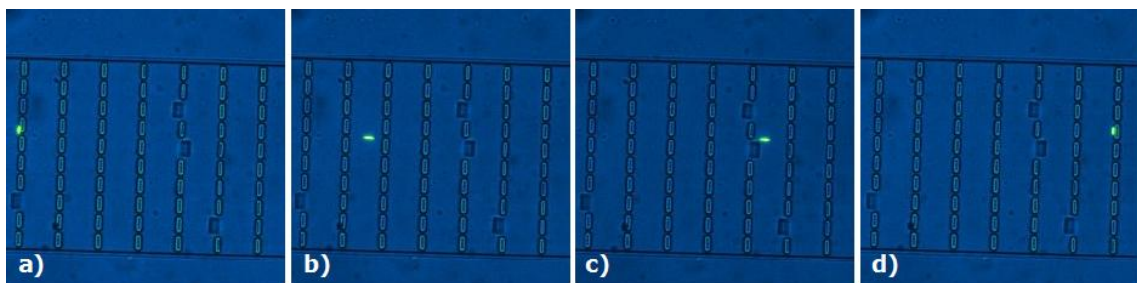


Abbildung 4.14 Bildsequenz über das Fangen eines Bakteriums mittels negativer DEP bei einer Wechselspannung von 500V und einer Frequenz von 300Hz: In a) ist das Bakterium quer vor einem Hindernis gefangen. Nach Änderung der Frequenz des inhomogenen elektrischen Wechselfeldes auf $f_{AC} < 270\text{Hz}$ bewegt sich das Bakterium in b) und c) wieder mit dem EOF. Mit einer Frequenz von wieder $f_{AC} = 300\text{Hz}$ wird es in d) nochmals quer und mittig vor einem Pfosten festgehalten.

Dabei legt es sich in den Bildern a) und d) bei einem anliegenden Feld von $U_{AC}=500V$ mit $f_{AC}=300Hz$ quer vor den jeweiligen Pfosten, bzw. den Bereich mit einer niedrigen elektrischen Feldstärke, und zeigt somit eindeutig negative Dielektrophorese. Sobald die Frequenz auf kleiner 200Hz eingestellt wird, wird die Zelle wieder mit dem EOF mitgespült (b, c).

Des Weiteren sind auch kleinere Gruppen der Rm1021(*pHC60*)-Bakterien mittels negativer Dielektrophorese manipuliert worden. Wie in Abbildung 4.15 zu erkennen, reagieren alle Zellen auf das Wechselfeld ($U_{AC}=500V$, $f_{AC}=300Hz$) gleich, und legen sich so lange vor die Hindernisse (a), bis dieses wieder ausgeschaltet wird (b, c). Bei erneutem Einschalten bei vorheriger Frequenz werden dann wieder alle Bakterien vor dem jeweils nächsten Pfosten festgehalten (d). Dass an diesem grundlegenden Verhalten auch eine sehr große Anzahl von Bakterien nichts ändert, ist in Abbildung 4.16 gezeigt. In a) sind die Zellen bei $U_{AC}=500V$ und $f_{AC}=300Hz$ gefangen worden, und in c) auch bei $f_{AC}=60kHz$. Der Großteil der Zellen, die sich sowohl in a) als auch in c) noch zwischen den Hindernisreihen befinden und sich nicht an die Pfosten anlagern, zeigen keine Reaktion auf das Wechselfeld, bzw. den EOF, weil sie an der Kanaloberfläche adsorbiert sind.

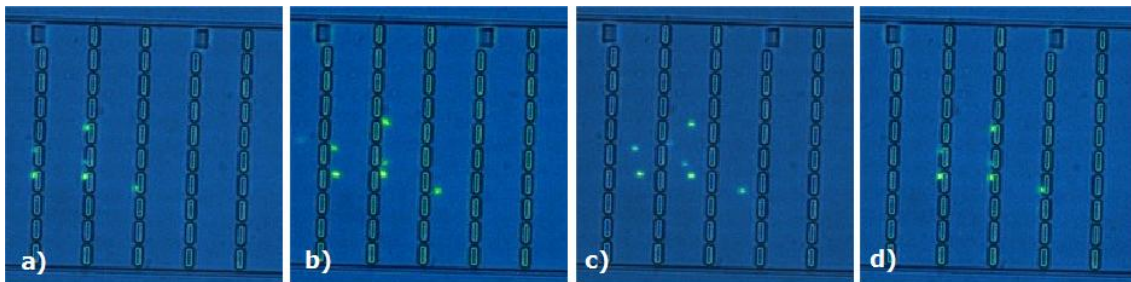


Abbildung 4.15 Bilderreihe wie mehrerer Rm1021(*pHC60*)-Bakterien mittels negativer DEP bei einer Wechselspannung von $U_{AC}=500V$ und $f_{AC}=300Hz$ festgehalten werden: In a) und d) sind die Zellen an den Hindernissen gefangen. Bei keiner anliegenden Wechselspannung ($U_{AC}=0V$) werden sie in b) und c) ungehindert weitergespült.

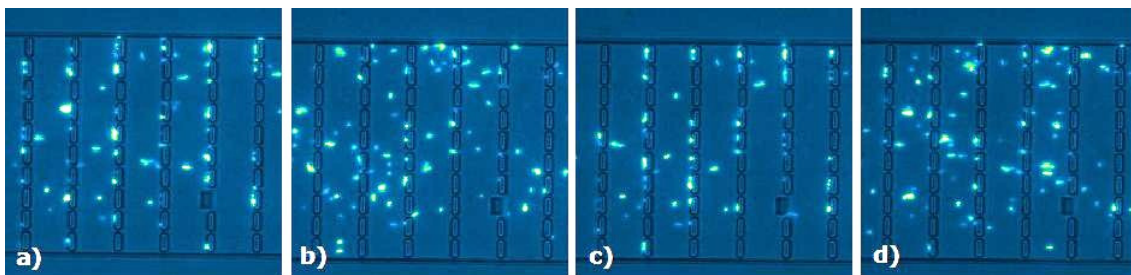


Abbildung 4.16 Bildsequenz wie eine sehr große Gruppe von Bakterien durch negative DEP bei $U_{AC}=500V$ gefangen wird: In b) und d) liegt jeweils kein Wechselfeld vor, und die Zellen werden im Hauptkanal weitergespült. In a) bei $f_{AC}=300Hz$ und in c) bei $60kHz$ hingegen legen sie sich vor die Pfosten und werden dort gefangen.

Da bei der Dielektrophorese das Verhältnis der Permittivität, bzw. Leitfähigkeit von Medium und Zelle zueinander entscheidend ist, dient der zuletzt erwähnte Test dazu, herauszufinden, inwiefern eine hohe Konzentration von Bakterien die Reaktion auf ein äußeres inhomogenes elektrisches Wechselfeld beeinflussen kann. Dies könnte möglich sein, da ein ständiger Stoffaustausch zwischen Bakterium und Medium stattfindet, d.h. die Zelle aus dem Medium Nährstoffe aufnimmt, und Stoffwechselprodukte wieder ausscheidet. Bei einer großen Anzahl von Bakterien könnte sich dieser Austausch bzgl. des Permittivitäts- oder Leitfä-

higkeitsverhältnisses bemerkbar machen. Allerdings ist kein Anzeichen für eine Veränderung der Reaktionen im Vergleich zu den Versuchen mit einzelnen Zellen gefunden worden.

In allen drei gezeigten Fällen von negativer Dielektrophorese werden die Zellen nicht nur bei $U_{AC}=500V$ sondern auch bei 400V gefangen. Bei 300V reagiert noch etwa die Hälfte der Bakterien, vorzugsweise die Größeren, wohingegen bei 200V keine Zelle mehr gehalten wird.

Neben diesen sehr erfolgreichen Experimenten mittels der negativen Dielektrophorese für die Rm1021(*pHC60*)-Bakterienzellen, ist aber auch beobachtet worden, dass einige Bakterien entgegen der Erwartung auch positive Dielektrophorese zeigen. Ein solches Verhalten ist in Abbildung 4.17 zu sehen. Hier bewegen sich zwei Bakterien-Zellen bei einem angelegten Feld von $U_{AC}=500V$ bei $f_{AC}=30Hz$ nicht auf die Bereiche mit geringer elektrischer Feldstärke zu, sondern auf diejenigen Orte mit einer besonders hohen Feldliniendichte. Diese befinden sich jeweils zwischen zwei Hindernisse in derselben Reihe. Wieder zeigen beide Bakterien das gleiche Verhalten und dies mehrfach wiederholt, sodass ein Zufall ausgeschlossen werden kann.

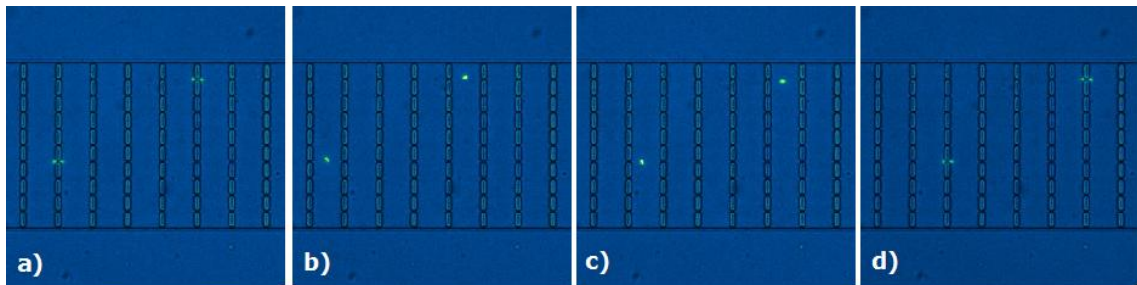


Abbildung 4.17 Bilderserie vom Fangen zweier Rm1021(*pHC60*)-Bakterien mittels positiver DEP bei $U_{AC}=500V$ und $f_{AC}=30Hz$: In a) und d) werden sie jeweils zwischen zwei Pfosten in derselben Reihe gefangen, und in b) und c) bei keinem angelegtem Feld mit dem EOF mitgespült.

Des Weiteren kann man erkennen, dass sich die Zellen im Gegensatz zu der negativen Dielektrophorese parallel zum Hauptkanal ausrichten. Dazu kommt, dass die Länge der Bakterien im gefangenen Zustand (a, d) länger erscheint als im nicht-gefangenen Zustand (b, c). Dies liegt vermutlich daran, dass die gefangenen Zellen nicht in der Lücke zwischen den Pfosten ruhen, sondern mit der angelegten Frequenz von $f_{AC}=30Hz$ hin und her schwingen, wie es in Abbildung 4.18 angedeutet ist. Da die Belichtungszeit in der Regel 200ms betrug, sind somit auf einem Bild sechs Schwingungen festgehalten. Dies resultiert dann in einer scheinbaren Verlängerung der Bakterien.

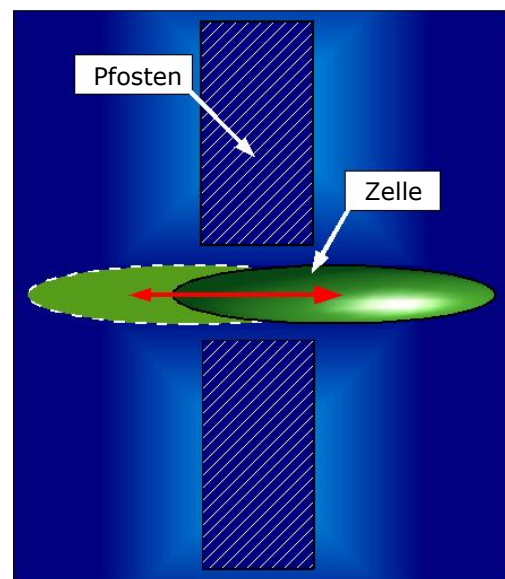


Abbildung 4.18 Schemaskizze, wie die Zellen der angelegten Frequenz folgen.

Aber es gibt neben diesen bisher gezeigten Messungen mit entweder negativer oder positiver Dielektrophorese auch mehrere Fälle bei denen im gleichen Versuch ein Wechsel von negativer auf positive Dielektrophorese, bzw. umgekehrt beobachtet werden konnte. Eine solche Verhaltensweise ist in Abbildung 4.19 zu erkennen. Zuerst wird das Bakterium mittels positiver Dielektrophorese zwischen zwei Pfosten festgehalten (a, b). Aber direkt nachdem die Frequenz auf $f_{AC}=300\text{Hz}$ eingestellt wird, ändert sich dessen Ausrichtung (c), und es lagert sich quer vor das Hindernis (d) und zeigt somit negative Dielektrophorese.

Dieses Wechselspiel von positiver nach negativer Dielektrophorese als direkte Folge der Frequenzänderung konnte anschließend noch mehrfach mit anderen *Rm1021(pHC60)*-Bakterien beobachtet werden. Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 4.20 zu sehen. Hier reagieren gleich sechs Zellen gleichzeitig auf das Ändern der Frequenz von 300Hz auf 30Hz. Damit ist bestätigt, dass nicht nur die Stärke der dielektrophoretischen Kraft frequenzabhängig ist, sondern auch der Typ der Dielektrophorese (positiv oder negativ). Dies ist kein unbekanntes Phänomen in der Mikrofluidik, und wurde unter anderem bereits bei der menschlichen *HL-60* Krebszell-Linie [71] und dem Virus *HSV-1* [54] beobachtet.

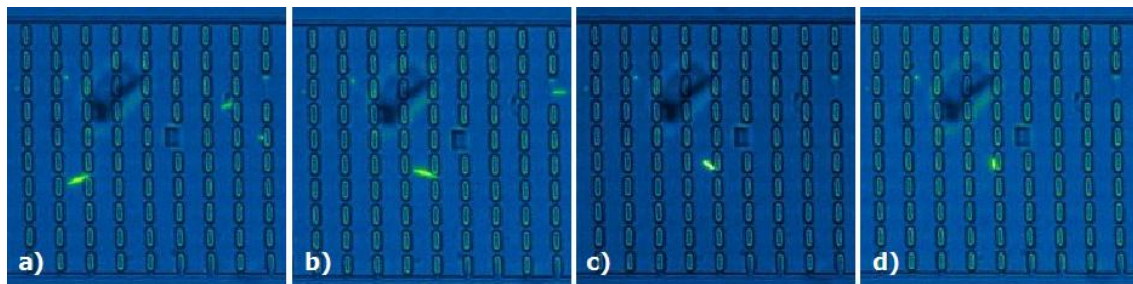


Abbildung 4.19 Bilderreihe über das Fangen eines einzelnen *Rm1021(pHC60)*-Bakteriums mittels positiver DEP und einen anschließenden Wechsel zu negativer DEP: In a) wird die Zelle bei $U_{AC}=500\text{V}$ und $f_{AC}=30\text{Hz}$ gefangen. Nach Aus- und wieder Einschalten des elektrischen Wechselfeldes wird sie in b) wieder per positiver DEP zwischen zwei Pfosten gehalten. Nach einer Frequenzänderung auf $f_{AC}=300\text{Hz}$ in c) lagert sie sich in d) quer vor einem Hindernis an, und wird dort mittels negativer DEP festgehalten.

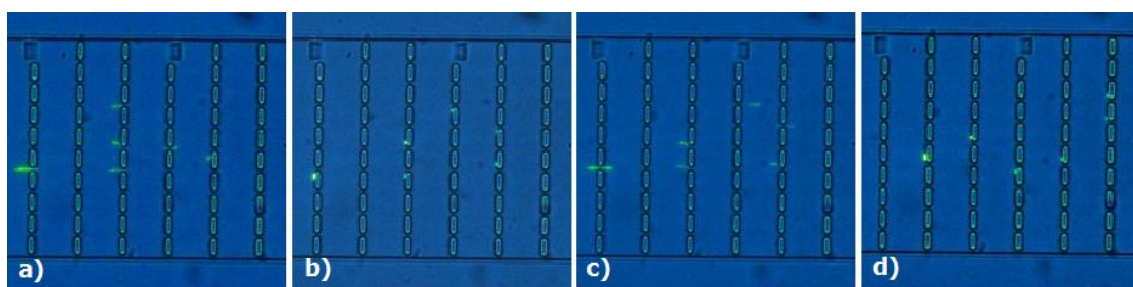


Abbildung 4.20 Bilderserie über den Wechsel mehrerer Bakterien von positiver nach negativer DEP bei einer Frequenzänderung bei unveränderten $U_{AC}=500\text{V}$: In a) und c) werden die Zellen bei $f_{AC}=300\text{Hz}$ mit positiver DEP gefangen, und in b) und d) bei $f_{AC}=30\text{Hz}$ mit negativer DEP.

Ein Überblick über alle Versuchsdaten ergibt Folgendes: Die Frequenz bei den Experimenten, wo ein Wechsel des DEP-Typs beobachtet werden konnte, liegt bei ca. 30Hz (positive DEP) und ca 300Hz (negative DEP). Des Weiteren zeigte sich, dass positive DEP vorwiegend in einem Frequenzbereich von 20Hz bis 250Hz auftritt, und negative meist bei 300Hz bis 60kHz (Normalfall). Allerdings fallen einzelne Messungen aus diesem Schema heraus; so zeigte sich vereinzelt auch bei 25Hz negative DEP und bei 60kHz positive DEP. Diese Aus-

nahmen sind vereinzelt aufgetreten, und nicht zeitgleich zu den normalen Reaktionen, so dass negative und positive DEP nicht bei derselben Frequenz beobachtet worden ist. Leichte Unterschiede im Medium (z.B. Temperatur), oder in der Zellpräparation könnten dafür verantwortlich sein. Der Zellzyklus und die Vitalität der Zellen während des Experiments sind weitere mögliche Faktoren für unterschiedliche Reaktionen.

Die Wechsellspannung beträgt bei fast allen Messungen 500V. Damit sind die Rm1021(*pHC60*)-Bakterien gut und auf Dauer gefangen worden. Je niedriger diese allerdings gewesen ist, desto schlechter haben die Fallen beim Einfangen und Festhalten funktioniert. Bei 200V ist meist keine Reaktion mehr hinsichtlich des Fangens beobachtet worden, bzw. die Zellen haben sich dann von den Hindernissen gelöst.

Bei den meisten Versuchen ist es auch vorgekommen, dass vereinzelte Bakterien sowohl bei positiver als auch bei negativer DEP gar nicht, oder schwächer festgehalten werden konnten. Eine mögliche Ursache für dieses Verhalten liegt in der bereits gut charakterisierten Unterscheidung in der Leitfähigkeit von lebenden und toten Zellen. So zeigen zum Beispiel lebende *E.coli*-Bakterien stärkere negative DEP als tote *E.coli*-Zellen [61].

Dreieckförmige Dielektrophorese-Struktur

Nachdem die Versuche mit den DNA-Dielektrophorese-Strukturen gut funktioniert haben, sind auch die neuartigen Strukturen getestet worden.

Auch mit diesen Strukturen sind die Rm1021(*pHC60*)-Bakterien mittels negativer Dielektrophorese gefangen worden. In Abbildung 4.21 sieht man, wie eine kleine Bakterien-Zelle (markiert durch den roten Pfeil) erst an einem dreieckförmigen Pfosten gefangen wird (b) und dann solange festgehalten wird (c), bis sie bei Änderung der Frequenz wieder weitergespült wird (d). Der grüne Pfeil zeigt auf ein anderes Bakterium das nicht gefangen wird, und dient zur Orientierung um die Stärke des EOF abzuschätzen. Das elektrische Wechselfeld bei diesem Fangvorgang beträgt $U_{AC}=500V$ und die dazugehörige Frequenz $f_{AC}=15kHz$.

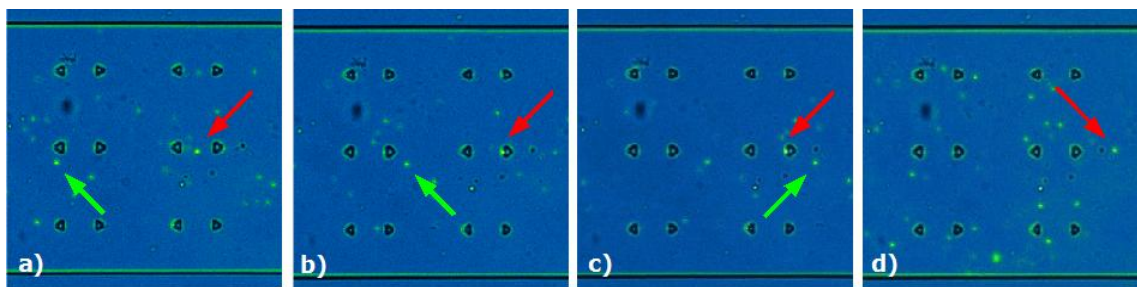


Abbildung 4.21 Bildsequenz über das Fangen eines einzelnen Rm1021(*pHC60*)-Bakteriums mittels negativer DEP in der Struktur 3A auf dem Wafer W1: Der rote Pfeil markiert das festgehaltene Bakterium und der grüne Pfeil eine Referenz-Zelle. In a) wird das Bakterium noch mit dem EOF mitgespült. In b) und c) ist es bei $U_{AC}=500V$ und $f_{AC}=15kHz$ an der Grundseite des dreieckigen Pfostens gefangen. Und wird bei Abschalten des Wechselfeldes wieder weitergespült.

Dadurch, dass die dreieckigen Pfosten schlecht ausgebildet und deutlich zu klein gewesen sind (vgl. Kapitel 4.1), war dies lange die einzige aufgezeichnete Reaktion von den Rm1021(*pHC60*)-Bakterien auf diese Hindernis-Form. Und obwohl die Pfosten nicht die gewünschten Abmessungen aufgewiesen haben, ist es nochmals gelungen, ein einzelnes Bakterium einzufangen. Die dazugehörigen Bilder sind in Abbildung 4.22 zu sehen. Wieder wird es eindeutig mittels negativer Dielektrophorese festgehalten, da es sich quer vor die Grundseite

des betrachteten Pfostens legt. Des Weiteren bestätigt eine genaue Betrachtung dieser Aufnahme die Vermutung, dass nur die Bakterien eine Chance haben gefangen zu werden, deren Strömungslinie, auf der sie sich bewegen, genau mittig auf den Pfosten zuläuft. Ansonsten ist bei dieser Hindernisgröße der elektrische Feldgradient zu gering, um die Zellen dennoch festzuhalten.

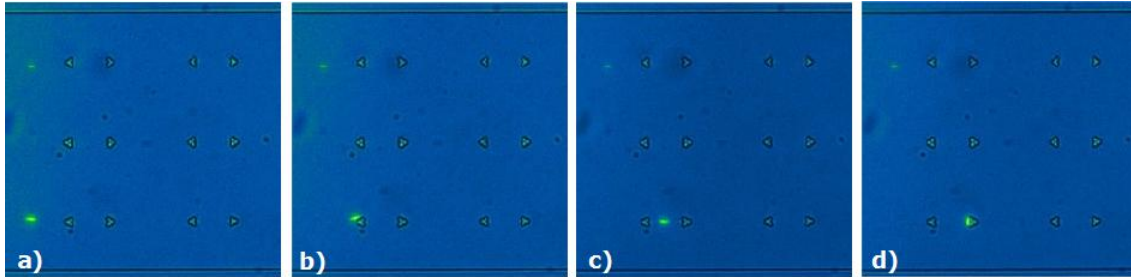


Abbildung 4.22 Bilderreihe wie ein einzelnes Bakterium mittels negativer DEP in der Struktur 3A auf dem Wafer W3 bei $U_{AC}=500V$ und $f_{AC}=10kHz$ gefangen wird: Erst kommt die Zelle dem Pfosten in a) bis c) immer näher, und wird dort in d) schließlich gefangen und festgehalten.

Die Rm1021(*pHC60*)-Bakterien haben in diesen Strukturen auch nicht genau in demselben Frequenzbereich auf das inhomogene elektrische Wechselfeld reagiert, wie in den DNA-Dielektrophorese-Strukturen. Dies ist zwar aufgrund der kleineren Form der Pfosten, der geringeren Anzahl und dem daraus resultierenden größeren Abstand zwischen ihnen, erwartet worden, aber dass nur bei 10kHz und 15kHz und nicht auch unter 1kHz eine Reaktion zu beobachten gewesen ist, ist überraschend. Daher liegt es nahe, dass diese Struktur mit dieser Pfostengröße für ein Fangen der Rm1021(*pHC60*)-Bakterien noch zu optimieren ist.

Bakterien die positive Dielektrophorese zeigen, oder ein frequenzabhängiger Wechsel zwischen negativer und positiver Dielektrophorese konnte mit diesen Strukturen nicht beobachtet werden.

Rechteckförmige Dielektrophorese-Struktur

Mit der Struktur 5A sind auch Rm1021(*pHC60*)-Bakterien mit den rechteckförmigen Hindernissen mittels negativer Dielektrophorese gefangen worden. Zwei dieser Fangvorgänge sind in Abbildung 4.23 zu sehen. Sie sind in den 5B-Strukturen auf dem zuletzt produzierten Wafer W4 aufgenommen worden. Das jeweils betrachtete Bakterium ist zur eindeutigen Identifizierung jeweils wieder mit einem roten Pfeil markiert worden. Die Pfosten sind auf den Bildern nicht so gut zu erkennen, weswegen ihre Position mit einem grauen Pfeil gekennzeichnet sind. Zu-erst sieht man in a) und e) wie sie mit dem EOF mitgespült werden, und dann am oberen (b), bzw. unteren (f) Hindernis bei einer Wechselspannung von 500V und 60Hz gefangen werden. Nach kurzzeitigem Ausschalten der Spannung fließen sie in c) und g) weiter mit dem Hauptstrom, und werden dann in d) und h) direkt am nächsten Pfosten bei wieder eingeschalteter Spannung erneut festgehalten.

Die in Abbildung 4.23 zu erkennenden Hindernisse von dem Wafer W4 sind deutlich größer als diejenigen von den Wafern W1, W2 und W3 (vgl. Kapitel 4.1). Da die dielektrophoretischen Fallen von den letztgenannten Wafern nicht funktioniert haben, bzw. keine Reaktion der Rm1021(*pHC60*)-Bakterien auf das Anlegen eines inhomogenes elektrisches Feld zu beobachten gewesen ist, lässt sich daraus ableiten, dass die Größe der Pfosten zumindest einer

der entscheidenden Faktoren gewesen ist, ob ein Fangversuch gelingt oder nicht. Ein weiterer Faktor ist mit Sicherheit wieder das gerichtete Fließverhalten der Zellen auf die Mitte des jeweiligen Pfostens.

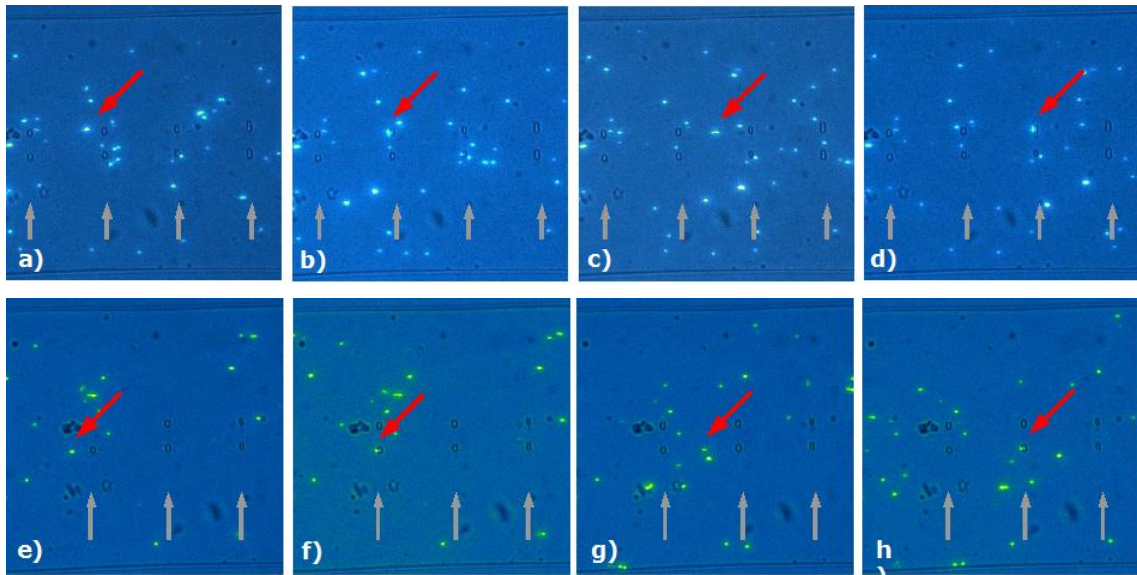


Abbildung 4.23 Zwei Bildsequenzen über das Fangen eines Bakteriums (roter Pfeil) mittels negativer DEP in der Struktur 5B vom Wafer W4: In a) und c), bzw. e) und g) wird die jeweilige Zelle mit dem EOF mitgespült, da $U_{AC}=0V$. In b) und d), bzw. f) und h) allerdings liegt ein elektrisches Wechselfeld mit $U_{AC}=500V$ und $f_{AC}=50Hz$ vor, wodurch die Bakterien jeweils gefangen werden. Die grauen Pfeile markieren aus Sichtbarkeitsgründen die Positionen, wo die Pfosten stehen.

Auch mit diesen rechteckförmigen Strukturen haben die Rm1021(*pHC60*)-Bakterien keine positive Dielektrophorese, sondern nur die zu erwartende negative DEP gezeigt.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Das in der Einleitung beschriebene Ziel dieser Arbeit war es Mikrofluidik-Chips herzustellen, und mit diesen Chips auf zwei verschiedene Arten einzelne Bakterien zu fangen, bzw. räumlich zu lokalisieren.

Die Fabrikation der Mikrofluidik-Strukturen über die Photokontakt- bzw. Soft-Lithographie ist erfolgreich verlaufen und hat zu funktionsfähigen Chips geführt, die dafür geeignet sind Experimente auf Einzelzellniveau durchzuführen, und somit einzelne Bakterien gezielt an fest definierten Positionen reversibel zu fangen. So konnten mit den Hydrodynamik-Chips zunächst mehrfach einzelne $1,9\mu\text{m}$ -Beads an den Mikro-Übergängen hydrodynamisch gefangen und festgehalten werden. Auch ein Wiederablösen nach einem Fangvorgang konnte realisiert werden. Diese viel versprechenden Ergebnisse konnten anschließend durch Experimente mit den Rm1021(*pHC60*)-Bakterien bestätigt werden, denn auch hier ist es wiederholt gelungen einzelne Bakterien an den hydrodynamischen Fallen festzuhalten. Anschließend konnte gezeigt werden, dass mittels der bereits vorhandenen DNA-Dielektrophorese-Strukturen, die über ein dichtes Pfostenfeld verfügen, sowohl große und kleine Bakterien-Gruppen, als auch einzelne Zellen an den energetischen Fallen gefangen werden können. Sie haben dabei überwiegend die theoretisch erwartete negative DEP gezeigt, wenn ein elektrisches Wechselfeld mit $U_{AC} \approx 300\text{V}-500\text{V}$ und einer Frequenz von $f_{AC} \geq 300\text{Hz}$ angelegt wurde. Falls die Frequenz jedoch in einem Bereich von $f_{AC} \approx 20-250\text{Hz}$ lag, wurde bei den Bakterien ebenso positive DEP beobachtet. Dieses überraschende Phänomen, dass in dem hier verwendeten Versuchssystem (ein Zusammenspiel der jeweiligen Eigenschaften des Mediums und der Rm1021(*pHC60*)-Bakterien) nicht nur die Stärke sondern auch der Typ der Dielektrophorese frequenzabhängig ist, konnte durch wiederholte Messungen bestätigt werden. An diese, aufgrund des dichten Hindernisfeldes nicht gezielten dielektrophoretischen Fangvorgänge haben sich dann weitere Experimente mit einzeln platzierten rechteck- und dreieckförmigen Strukturen angeschlossen. Diese stellen mit ihrer auf die Bakterien angepassten Dimensionierung und den mit deutlichem räumlichen Abstand voneinander positionierten Pfosten eine wesentliche Optimierung im Vergleich zu den DNA-DEP-Chips dar. Die dreieckförmigen Strukturen besitzen zudem den Vorteil, dass es mit der vertikalen Grundseite des Dreiecks (vgl. Abbildung 3.3) eine Vorzugsposition für das Fangen mittels negativer DEP gibt. Auch mit diesen Strukturen ist es gelungen einzelne Rm1021(*pHC60*)-Bakterien mittels negativer DEP reversibel zu fangen. Der Frequenz-abhängige Wechsel des DEP-Typs konnte mit diesen Strukturen nicht beobachtet werden.

Mit diesen Ergebnissen sind die eingangs gestellten Vorgaben erfüllt worden. Darauf lässt sich nun aufbauen, um das erklärte Fernziel zu erreichen, das Quorum Sensing bei Bakterien auf Einzelzellniveau zu untersuchen. Um diesen Weg erfolgreich und effizient zu gestalten, sollten mehrere Aspekte beachtet werden.

Es bieten sich in der Herstellung der Chips und hinsichtlich des experimentellen Setups mehrere Optimierungsmöglichkeiten an. Bei den Hydrodynamik-Strukturen können die feinen Mikro-Übergänge bezüglich ihrer Durchlassbreite noch verkleinert werden. Zusätzlich besteht

die Möglichkeit die Effizienz und die Handhabung dieser Strukturen zu verbessern, bzw. zu vereinfachen, wenn zum einen an den Enden der Seitenkanäle nicht einfach ‚offene‘ Reservoir vorliegen, sondern mittels einer Pumpe aktiv ein Unterdruck daran angelegt wird. Zum anderen könnte man die gesamte Fluss-Steuerung mittels eines pneumatischen Präzisions-pumpensystems realisieren. Während die Produktion der PDMS-Chips von den bereits für die DNA-Trennung verwendeten DNA-Dielektrophorese-Strukturen gut funktioniert hat, hat es bei der Herstellung der rechteck- und dreieckförmigen Strukturen zunächst deutliche Abweichungen der Pfostenform und -größe verglichen zu dem geplanten Layout gegeben. Die Gründe dafür konnten jedoch im Herstellungsprozess des Masterwafers ausfindig gemacht werden, so dass kurz vor Abschluss der experimentellen Arbeit, nach Anpassung der Belichtungsparameter, noch eine entscheidende Verbesserung der Hindernisgröße (sowie auch der Mikro-Übergänge) erreicht werden konnte. Die so auf dem Wafer W4 hergestellten Strukturen besitzen aber weiterhin noch Optimierungspotential, bezogen auf ihre Größe und Form, um stärkere und noch effektivere energetische Fallen auszubilden.

Auch sollte erprobt werden, in welcher Hinsicht eine Verbesserung der Kanaloberflächenbeschichtung, bisher F108, erreicht werden kann. Dazu könnten sogenannte dynamische Beschichtungen hilfreich sein, wie DDM-MC (Dodecyl Maltosid und Methyl Cellulose), die direkt in dem während der Messung verwendeten Medium vorliegen und somit eine stabilere und reproduzierbarere Beschichtung ermöglichen würde [72]. Allerdings muss hierbei getestet werden, in wiefern sich DDM-MC toxisch oder Permittivitäts-verändernd auf die Rm1021(*pHC60*)-Bakterien auswirkt.

Ein weiterer Gesichtspunkt besteht in einer genaueren theoretischen Untersuchung und Charakterisierung des dielektrophoretischen Verhaltens der Rm1021(*pHC60*)-Bakterien in dem hier realisierten Versuchssystem und der chemischen Umgebung. Zum einen sollte versucht werden mögliche Ursachen für den Dielektrophorese-Typ-Wechsel von positiv nach negativ bei verschiedenen Frequenzen zu finden, bzw. in welchem Bereich diese Wechselfrequenz liegt. Dies könnte wiederum zu einem verbesserten Versuchsablauf und neuen Anwendungsmöglichkeiten führen.

Neben diesen beiden genannten Aspekten gilt es die Experimente in der Hinsicht weiterzuführen, dass in kommenden Versuchen nicht mehr die Rm1021(*pHC60*)-Bakterien zum Einsatz kommen, sondern die in Kapitel 2.1 schon vorgestellten Sender- und Empfänger-Bakterien. Eine weitere Möglichkeit die Handhabung und Beobachtung dieser Zellen in den Mikrofluidikkanälen zu erleichtern, wäre, wenn diese beiden Bakterien unterschiedliche Fluoreszenzproteine exprimieren würden.

Literatur

- [1] P. VAN RHIJN AND J. VANDERLEYEN: The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* 59:124-142, 1995.
- [2] L.-P. PARTIDA-MARTINEZ, S. MONAJEMBASHI, K.-O GREULICH AND C. HERTWECK: Endosymbiont-dependent host reproduction maintains bacterial-fungal mutualism. *Current Biology* 17:773-777, 2007.
- [3] P. ORSZAG: Untersuchungen zum Quorum Sensing (QS) cyanobakterieller Begleitbakterien und des Cyanobakteriums Stamm Flo 1., Universität Bremen, *Disseratation*, 2008.
- [4] M. DOUDOROFF: Studies of the luminouse bacteria: I. Nutritional requirements of some species, with special reference to *methionine*. *J. Bacteriol.* 44(4):451-459, 1942.
- [5] E.B. JACOB, I. BECKER, Y. SHAPIRA AND H. LEVINE: Bacterial linguistic communication and social intelligence. *Trends in Microbiol.* 12(8):366-372, 2004.
- [6] A. TOMASZ: Control of the competent state in *pneumococcus* by a hormone-like cell product: an example for a new type of regulatory mechanism in bacteria. *Nature* 208:155-159, 1965.
- [7] K.H. NEALSON, T. PLATT AND I. HASTINGS: Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminiscent system. *J. Bacteriol.* 104(1):313-322, 1970.
- [8] M.B. MILLER AND B.L. BASSLER: Quorum Sensing in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:165-199, 2001.
- [9] R.J. REDFIELD: Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends in Microbiol.* 10(8):365-370, 2002.
- [10] B.A. HENSE, C. KUTTLER, J. MÜLLER, M. ROTHBALLER, A. HARTMANN AND J.-U. KREFT: Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nature Rev. Microbiol.* 5:230-239, 2007.
- [11] H.-P. CHENG AND G. WALKER: *Succinoglycan* is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of *Alfalfa* by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 180(19):5183-5191, 1998.
- [12] Y.-H. DONG AND L.-H. ZHANG: Quorum sensing and quorum quenching enzymes. *J. Bacteriol.* 43(S):101-109, 2005.
- [13] D.J. HARRISON, A. MANZ, Z. FAN, H. LÜDI AND H.M. WIDMER: Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on al planar glass chip. *Anal. Chem.* 64:1926-1932, 1992.
- [14] D. REYES, D. IOSSIFIDIS, P. AUROUX AND A. MANZ: Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory and technology. *Anal. Chem.* 72:2623-2636, 2002.
- [15] Y. XIA AND G. WHITESIDES: Soft lithography. *Annu. Rev. Mater. Sci.* 28:153-184, 1998.
- [16] J.M.K. NG, I. GITLIN, A.D. STROOCK AND M. WHITESIDES: Components for integrated *poly(dimethylsiloxane)* microfluidic systems. *Electroph. Rev.* 23:3461.3473, 2002.

- [17] D. GREIF, L. GALLA, A. ROS AND D. ANSELMETTI: Single cell analysis in full body quartz glass chips with native UV laser-induced fluoreszenz detection. *J. Chromatogr. A* 1206:83-88, 2008.
- [18] T. MULLER, A. PFENNIG, P. KLEIN, M. JAGER AND T. SCHNELLE: The potential of dielectrophoresis für single-cell experiments. *IEEE Engeneering in Medicine and Biology Magazine* 22(6):61-61, 2003.
- [19] J. REGTMEIER, T.T. DUONG, R. EICHHORN, D. ANSELMETTI AND A. ROS: Dielectrophoretic manipulation of DNA: Separation and polarizability. *Anal. Chem.* 79:3925–3932, 2007.
- [20] J. REGTMEIER: Non-equilibrium migration mechanisms for microfluidic bioanalysis, Universität Bielefeld, *Dissertation*, 2007.
- [21] Arbeitsgruppe der *Proteom- und Metabolomforschung* von PROF. K. NIEHAUS, Universität Bielefeld.
- [22] D. GREIF: Untersuchung zum Einfluss des Im- und Exports von HSL auf das Quorum Sensing beim Bakterium *Sinorhizobium meliloti*. Universität Bielefeld, *Diplomarbeit*, 2006.
- [23] D. WERNER: Stickstoff (N₂-Fixierung und Produktionsbiologie). *Angew. Botanik* 45:67-75, 1987.
- [24] M.M. MARKETON AND J.E.GONZÁLES: Identification of two quorum-sensing systems in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 184(13):3466-3475, 2002.
- [25] M.M. MARKETON, S.A. GLENN, AN EBERHARD AND J.E. GONZÁLES: Quorum sensing controls *exopolysaccharide* production in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 185(1):325-331, 2003.
- [26] H.H. HOANG, A. BECKER AND J.E. GONZÉLES: The LuxR homolog ExpR, in combination with the *sin* quorum sensing system, plays a central role in *Sinorhizobium meliloti* gene expression. *J. Bacteriol.* 186(16):5460-5472, 2004.
- [27] M. GAO, H. CHEN, A. EBERHARD, M.R. GRONQUIST, J.B. ROBINSON, B.G. ROLFE AND D. BAUER: *sinI*- and *expR*-dependent quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 187(23):7931-7944, 2005.
- [28] H.-P. CHENG AND G.C. WALKER: Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of *alfalfa* by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 180(19):5183-5191, 1998.
- [29] D. GREIF, Doktorand in der Gruppe für *Biophysik und angewandte Nanowissenschaften*, Universität Bielefeld.
- [30] H. STONE, S. KIM: Microfluidics: Basic issues, applications and challenges. *AIChE*, 47(6):1250-1254, 2001.
- [31] K.S. BREUER: Micro- and nano-scale diagnostic techniques. *Springer*, New York, 2003.
- [32] P. TABELING: Introduction to microfluidics. *Oxford University Press*, 2005.
- [33] R.F. PROBSTEIN: Physicochemical Hydrodynamics. 2. Auflage. *Wiley*, 2003.
- [34] D. MESCHEDE: Gerthsen Physik. *Springer*, 2002.

- [35] O. GESCHKE, H. KLANK, P. TELLEMANN: *Microsystem Engineering of Lab-on-a-Chip Devices*, Wiley-VCH, 2004.
- [36] T. DORFMÜLER, W.T. HERING UND K. STIERSTADT: Bergmann Schaefer: *Lehrbuch der Experimentalphysik*, Band I, 11. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, 1998.
- [37] R.B. BIRD, W.E. STEWART, E.N. LIGHTFOOT: *Transport Phenomena*. John Wiley, New York, 1960.
- [38] H. VON HELMHOLTZ: Studien über elektrische Grenzschichten, *Annalen der Physik und Chemie* 7:338-382, 1879.
- [39] P.D. GROSSMANN, J.C. COLBURN: *Capillary Electrophoresis - Theory and Practice*. Academic Press, San Diego, 1992.
- [40] J. VOIVY: Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: physical mechanisms. *Reviews of Modern Physics* 72(3):813-872, 2000.
- [41] D. LI: *Electrokinetics in microfluidics*. Elsevier Academic Press, 2004.
- [42] H. HÖFEMANN: Separation von DNA mittels Dielektrophorese in Mikrofluidiksystemen. Universität Bielefeld, *Diplomarbeit*, 2007.
- [43] R. KUHN AND S. HOFFSTETTER-KUHN: *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*. Springer, 1993.
- [44] B. KIRBY, E. HASSELBRINK: Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separation. *Electrophoresis*, 25:187-202, 2004.
- [45] B. KIRBY, E. HASSELBRINK: Zeta potential of microfluidic substrates: 2. Data for polymers. *Electrophoresis*, 25:203-213, 2004.
- [46] E.M. PURCELL: Life at low Reynolds numbers. *AM. J. Phys.* 45(1):3-11, 1977.
- [47] L. BOGUNOVIC: Einflüsse der Ionenkonzentration und von Fluorophoren auf die Polarisierbarkeit von linearer DNA in Mikrofluidiksystemen, Universität Bielefeld, *Bachelor-Arbeit*, 2007.
- [48] P.D. GROSSMAN AND J.C. COLBURN: *Capillary Electrophoresis – Theory and Practice*. Academic Press, San Diego, 1992.
- [49] H.A. POHL: *Dielectrophoresis: The behavior of neutral matter in nonuniform electric fields*. Cambridge University Press, 1978.
- [50] P. GASCOYNE AND D. VYKOUKAL: Partikel separation by dielectrophoresis. *Electrophoresis*, 23:1973-1983, 2002.
- [51] J.G. KRALJ, M.T.W. LIS, M.A. SCHMIDT AND K.F. JENSEN: Continuous dielectrophoretic size-based particle sorting. *Anal. Chem.* 78:5019-5025, 2006.
- [52] M. DIMAKI AND P. BOEGGILD: Investigation of parameters controlling the dielectrophoretic assembly of carbon nanotubes on microelectrodes. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 8(4):1973-1978, 2008.

- [53] M. KIRSCHBAUM, M.S. JAEGER, T. SCHENKEL, T. BREINIG, A. MAYERHANS AND C. SUSCHL: T cell activation on a single-cell level in dielectrophoretic-based microfluidic devices. *J. Chromatogr. A*, 1202(1):83-89, 2008.
- [54] M.P. HUGHES, H. MORGAN, F.J. RIXON, J.P.H. BURT AND R. PETHING: Manipulation of herpes simplex virus type 1 by dielectrophoresis. *BBA* 1425(1):119-126, 1998.
- [55] B.H. LAPIZCO-ENCINAS, S. OZUNA-CHACÓN AND M. RITO-PALOMARES: Protein manipulation with insulator-based dielectrophoresis and direct current electric fields. *J. Chromatogr. A* 1260(1):45-51, 2008.
- [56] J. VOLDMANN: Electrical forces for microscale cell manipulation. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8:425-454, 2006.
- [57] K.R. FOSTER, F.A. SAUER AND H.P. SCHWAN: Electroration and levitation of cells and colloidal particles. *Biophys. J.* 63:180-190, 1992.
- [58] T.B. JONES: Electromechanics of particles. *Cambridge University Press*, 1995.
- [59] J.D. JACKSON: Klassische Elektrodynamik. *De Gruyter*, 1983.
- [60] T.B. JONES: Basic theory of dielectrophoresis and electroration. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine* (November/December):33-42, 2003.
- [61] B.H. LAPIZCO-ENCINAS, B.A. SIMMONS, E.B. CUMMINGS AND Y. FINTSCHENKO: Dielectrophoretic concentration and separation of live and dead bacteria in an array of insulators. *Anal. Chem.* 76:1571-1579, 2004.
- [62] W.A. CATTERNALL: Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu. Rev. Biochem.* 64:493-531, 1995.
- [63] T.B. JONES AND M. WASHIZU: Multipolar dielectrophoretic and electroration theory. *J. Electrostat.* 37:121-134, 1996.
- [64] B.H. LAPIZCO-ENCINAS, B.A. SIMMONS, E.B. CUMMINGS AND Y. FINTSCHENKO: Insulator-based dielectrophoresis for the selective concentration and separation of live bacteria in water. *Electrophoresis* 25:1695-1704, 2004.
- [65] R. GÓMEZ-SJÖBERG, D.T. MORISETTE AND R. BASHIR: Impedance microbiology-on-a-chip: Microfluidic bioprocessor for rapid detection of bacterial metabolism. *JMEMS* 14(4):829-838, 2005.
- [66] C.F. CHOU, F. ZENHAUSERN: Electrodeless dielectrophoresis for micro total analysis systems. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine* 22(6):62-67, 2003.
- [67] W. HELLMICH: Einzelzellanalytik in Mikrofluidik-Systemen, Universität Bielefeld, *Dissertation*, 2006.
- [68] U. AEBI AND T.D. POLLARD: A Glow discharge Unit to Render Electron Microscope Grids and Other Surfaces Hydrophilic. *Journal of Electron Microscope Technique* 7:29-33, 1987.
- [69] C. NG, H. LEE AND S. LI: Prevention of protein adsorption on surfaces by *polyethylene oxide-polypropylene oxide-polyethylen oxide triblock* copolymers in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 659:427-434, 1994.

- [70] W. HELLMICH, J. REGTMEIER, T. DUONG, D. ANSELMETTI AND A. ROS: *Poly(ethyleneoxide)* based surface coatings for *poly(dimethylsiloxane)* microchannels. *Langmuir* 21:7551-7557, 2004.
- [71] K. RATANACHOO, P.R.C. GASCOYNE AND M. RUCHIRAWAT: Detection of cellular response to toxicants by dielectrophoresis. *BBA* 1564:449-458, 2002.
- [72] M. EVERWAND: Oberflächenbeschichtungen in Poly(dimethylsiloxan)- und Quarz-Mikrofluidikkanälen. Universität Bielefeld, *Bachelor-Arbeit*, 2007.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während meiner ersten wissenschaftlichen Arbeit unterstützt haben und somit wesentlich zum Gelingen beigetragen haben. Als erstes bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe *Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften* und das entgegengebrachte Vertrauen meine Arbeit in dieser Gruppe schreiben zu dürfen.

Des weiteren gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Alexandra Ros, die es mir mittels einer Stelle als studentische Hilfskraft ermöglichte, einen guten Eindruck von der alltäglichen Arbeit auf dem Gebiet der Mikrofluidik zu erhalten.

Herrn Prof. Dr. Andreas Hütten danke ich für die bereitwillige Erstellung des Zweitgutachtens.

Ganz besonders möchte ich mich bei den Herren Dr. Jan Regmeier und Dipl. Biotech. Dominik Greif bedanken. Sie waren es, die mich während eines einwöchigen Laborpraktikums mit dem Thema Mikrofluidik fasziniert und infiziert haben. Dr. Jan Regtmeier danke ich zutiefst für die Bereitschaft diese Bachelor-Arbeit sogar während seiner Elternzeit zu betreuen und die vielen konstruktiven Gespräche und Korrekturvorschläge. Hinsichtlich der experimentellen Betreuung bin ich Dipl. Biotech. Dominik Greif zu großem Dank verpflichtet. Unter seiner Führung habe ich zunächst als SHK das technisch grundlegende Handwerk für ein erfolgreiches Experimentieren mit Mikrofluidik-Strukturen erlernt. Des Weiteren stand er mir während dieser Arbeit bei fachlichen Fragen und dem Korrekturlesen stets hilfreich und kompetent zur Seite.

Neben Herrn Greif, gilt mein herzlicher Dank dem Rest unserer fröhlichen Büro-Gemeinschaft. Die Herren Sven Proppert und B. Sc. Lukas Bogunovic haben mich sowohl mit dem Korrekturlesen als auch mit vielen Diskussionen unterstützt. Ich bin froh in diesem Büro nicht nur Kollegen, sondern auch Freunde gefunden zu haben, mit denen man auch während der Arbeit eine Menge Spaß haben kann.

Außerdem möchte ich mich bei allen anderen Mitgliedern dieser Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken, da man bei Problemen stets ein offenes Ohr gefunden hat. Frau Dr. Katja Tönsing hat mir bei Fragen der Chemie und Organisatorischem weitergeholfen, bei technischen Fragen ist Herr Dipl. Ing. Christoph Pelargus die erste Ansprechstation gewesen, Dipl. Phys. Sebastian Horstmeier wies mich in die Geheimnisse des Sputterns ein und Frau Gabi Krome konnte mir in bürokratischen Angelegenheiten immer erklärend zur Seite stehen. Es hat mir Spaß und Freude bereitet mit den aufgeführten und allen anderen Kollegen zusammengearbeitet zu haben.

Bezüglich meiner grundlegenden Ausbildung danke ich recht herzlich meinem ehemaligen Physiklehrer Herrn Rainer Menze. Er hat mein großes Interesse an Themen der Physik und dem damit verbundenen Physik-Studium „verschuldet“. Vielleicht werde ich ja eines Tages wirklich noch Physiklehrer, wie er es mir vorhergesagt hat.

Abschließend möchte ich mich natürlich ganz besonders bei meinen Eltern und meinen beiden Brüdern bedanken, die mich stets auf meinem Weg unterstützt und mir den Rücken freigehalten haben. Nur durch sie war es mir möglich meiner Schullaufbahn und dem sich anschließenden Studium so zielstrebig nachzugehen, ohne den Spaß und die Freude am Leben zu vernachlässigen.