

Herstellung und Anwendung eines 3D-Mikrofluidiksystems zur kontinuierlichen elektrodenlosen Manipulation von Nanoobjekten

Diplomarbeit

zur

**Erlangung des Grades eines
Diplomphysikers**

vorgelegt von

**Jörg Käsewieter
Fakultät für Physik**



Bielefeld, Juli 2009

Jeder, der Physik studiert, „möchte Physik verstehen, und er möchte Physik handhaben lernen. Versucht er, alles zu verstehen, so kommt er nie dazu, es zu handhaben; beschränkt er sich auf das zweite, so versteht er die Dinge nicht ganz, mit denen er umgeht.“

Friedrich Hund

Eidesstattliche Erklärung

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

Bielefeld, den 31.7.2009

(Jörg Käsewieter)

Gutachter:

Prof. Dr. Dario Anselmetti

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Andreas Hütten

Abgabedatum der Arbeit: 31.07.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	4
2.1	Proteine	4
2.2	Mikrofluidiksysteme.....	6
2.2.1	Hydrodynamik.....	6
2.2.1.1	Viskosität.....	7
2.2.1.2	Reynoldszahl und Strömungsverhalten.....	7
2.2.1.3	Hydrodynamischer Fluss.....	8
2.2.2	Elektrodynamik	9
2.2.2.1	Elektrostatik.....	9
2.2.2.2	Elektrische Doppelschicht	10
2.2.2.3	Elektrophorese und Elektroosmose	13
2.2.2.4	Dielektrophorese	16
2.2.3	Statistische Effekte	19
2.2.3.1	Diffusion	19
2.2.3.2	Kramers Rate	21
2.3	Elektrochemie des Wassers	21
2.4	Fluoreszenz	23
3	Materialien und Methoden	26
3.1	Verwendete Materialien	26
3.2	Multi-Schicht (3D) lithographische Waferherstellung	27
3.3	Chipherstellung.....	30
3.4	Messablauf	34
3.5	AFM-Abbildung von Polystyrenpartikeln	35
3.6	Fluoreszenzmikroskopie	36

4	Messergebnisse und Diskussion	38
4.1	3D-Masterwaferherstellung und Abformung	38
4.1.1	Erzeugung einer Barriere im Mikrofluidikkanal.....	38
4.1.2	Abformung mit PDMS	39
4.2	Experimentelle und theoretische Charakterisierung des Mikrofluidiksystem..	42
4.3	Kontinuierliche Trennung von 24 und 36 nm Partikeln.....	47
4.3.1	Partikeleigenschaften.....	47
4.3.2	Manipulation von Nanopartikeln.....	50
4.3.2.1	Konzentrationspolarisation	56
4.3.2.2	Dämpfende Effekte der Konzentrationspolarisation	65
4.3.2.3	Auswirkungen der Konzentrationspolarisation auf Nanopartikel .	66
4.3.3	Trennung von Nanopartikeln.....	67
4.3.3.1	Trennungskriterium	68
4.3.3.2	Trennergebnis	69
4.4	Fangen von Proteinen.....	72
4.4.1	Eigenschaften der Proteine.....	72
4.4.2	Räumliche Manipulation.....	72
5	Zusammenfassung und Ausblick	76
6	Appendix	80
6.1	Profilometeraufnahmen der SU-8-Schichten	80
6.2	36 nm Polystyrenpartikel.....	81
6.3	ImageJ Makro zur Fluoreszenzintensitätsauswertung	82
	Abbildungs- und Variablenverzeichnis.....	83
	Tabellen- und Literaturverzeichnis	89
	Danksagung	95

1 Einleitung

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, eine 3D-Kanalstruktur herzustellen mit der es möglich ist, Nanopartikel in einem Durchflussexperiment aufzutrennen. Als Vorbild dienen dabei Strukturen, wie sie bereits für Polystyrenkügelchen im μm -Bereich [1] erfolgreich verwendet wurden.

In einem Mikrofluidikkanal soll an einer Barriere (siehe Abbildung 1) ein Gemisch aus verschiedenen Nanopartikeln mittels Dielektrophorese kontinuierlich aufgetrennt werden.

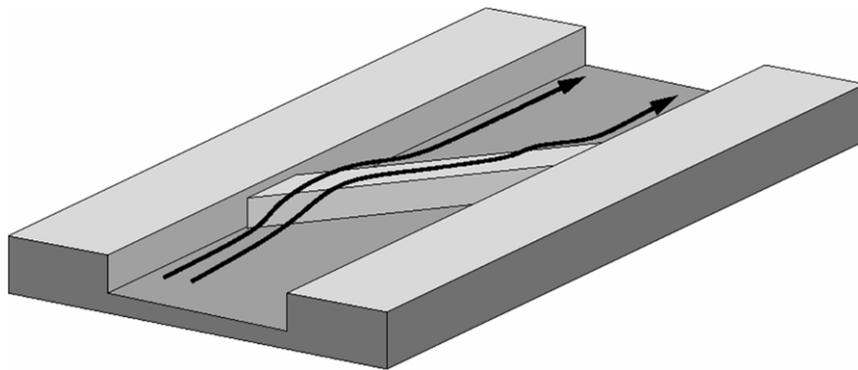


Abbildung 1: Mikrofluidikdesign zur Auftrennung von Nanopartikeln

Eine Partikelsorte soll die Barriere auf der ursprünglichen Kanalseite unbeeinflusst überqueren können, während die zweite auf die andere Seite abgelenkt wird. Zur biophysikalischen Anwendung soll die Übertragung dieses Prinzips auf Proteine als biologische Nanopartikel gezeigt werden.

Die Entwicklung im Bereich der Mikrofluidiksysteme hat in den vergangenen 20 Jahren enorme Fortschritte gemacht. Sowohl die Geschwindigkeit von Analysen, die Sensitivität bei Auftrennungen und der Automatisierungsgrad vieler Vorgänge konnte stark gesteigert werden [2–4]. Dabei haben sich Mikrofluidikchips als ideales Werkzeug für den Umgang mit kleinen Probenvolumina, wie z.B. Proteinlösungen, etabliert. Außerdem sind sie aufgrund ihrer geringen Größe gut für den mobilen Einsatz direkt vor Ort geeignet. In solchen Systemen können verschiedenste Abläufe, u.a. Injektion, Mischung, Fluoreszenzmarkierung, Trennung und Detektion, realisiert werden [3–5].

Ein Problem der Auftrennung in der Mikrofluidik stellt dabei der diskontinuierliche Ablauf der üblichen Prozesse dar. Es müssen immer wieder einzeln kleinste Mengen des Analyten (einige Nanoliter oder weniger) exakt in den Separationskanal eingebracht werden um anschließend getrennt werden zu können. Dies ist zeitlich (diskontinuierlich) als auch experimentell (exaktes Handling kleinster Volumina) sehr aufwendig.

Deshalb ist die Entwicklung kontinuierlicher Methoden in der Mikrofluidik zu einem wichtigen Forschungszweig geworden. Die Probe wird dabei durch einen Kraftanteil senkrecht zur Flussrichtung je nach Beeinflussbarkeit abgelenkt.

Durch diese Methode bieten sich viele Vorteile. Der kontinuierliche Ablauf ermöglicht ein großes Zeitsparpotential. Weiterhin entfällt die Notwendigkeit der Injizierung exakter Volumina. Durch die Ablenkung senkrecht zur Flussrichtung ergibt sich eine räumliche Auftrennung, die es erlaubt die getrennten Substanzen direkt weiter zu verarbeiten. Dadurch kann die Effizienz der Auftrennung ständig überwacht und die Trennparameter gegebenenfalls angepasst werden. Als weiterer Vorteil ist noch zu nennen, dass die Proben für die Auftrennung nicht markiert werden müssen, da unterschiedliche Probeneigenschaften, wie z.B. ihre Größe, Ladung oder Polarisierbarkeit ausgenutzt werden können.

Für diese kontinuierliche Auftrennung stehen eine Vielzahl unterschiedlicher Kräfte zur Verfügung, wie z.B. elektrische, magnetische oder mechanische. Einige Anwendungen dieser Kräfte sind miniaturisierte Formen bereits existierender makroskopischer Verfahren in Kombination mit den Vorteilen der Mikrofluidik. Andere Auftrennungsmethoden sind hingegen nur in der Mikrofluidik möglich.

Viele Gruppen nutzen geometrische Eigenschaften zur Trennung. Yamada et al. nutzen in ihrem Versuch [6] unterschiedliche Größen von Partikeln im Mikrometerbereich. Die Partikel folgen verschiedenen Stromlinien des Flusses aufgrund unterschiedlicher Positionen ihrer Schwerpunkte. Nach einer Aufweitung erhält man so unterschiedliche Probenbanden. Diese Methode ist durch die thermische Bewegung begrenzt, die bei kleineren Partikeln dominiert. Yang et al. konnten in ihrer Veröffentlichung [7] zeigen, dass Blutplasma in einem kontinuierlichen Fluss aufgetrennt werden kann. Dabei wird ausgenutzt, dass sich die roten Blutkörperchen in Richtung höherer Fließgeschwindigkeiten bewegen. Ebenso sind kontinuierliche Filtrationsmethoden für Blutplasma bekannt [8].

Eine weitere Methode besteht in der Verwendung von Pfosten, die je nach Anordnung eine Auftrennung entsprechend der Größe ermöglichen [9]. Diese Methode ist ebenfalls durch den Einfluss der Diffusion begrenzt. Es gibt aber auch Anordnungen, die anhand des Diffusionskoeffizienten DNA auftrennen, sogenannte Brown'sche Ratschen [10].

Auch elektrische Felder bieten eine Vielzahl an Möglichkeiten um Analyten aufzutrennen. Huang et al. nutzen in ihrem „DNA-Prisma“ [11] aus, dass längere DNA-Stränge unter dem Einfluss elektrischer Felder andere Pfade einschlagen als kürzere. Entropisches Fangen von DNA konnte außerdem von einem diskontinuierlichen Experiment auf ein kontinuierliches übertragen werden [12].

Wird senkrecht zu dem Analytenfluss ein elektrisches Feld angelegt, kann sowohl eine Auftrennung entsprechend der Ladung der Analyten [13] oder eine isoelektrische Fokussierung [14] erfolgen. Mit dieser Methode lassen sich auch Proteine auftrennen.

Mit Hilfe von magnetischen Feldern können ebenfalls unterschiedliche magnetische Eigenschaften zur Auftrennung genutzt werden [15].

Auch durch Schallwellen [16], optische Kräfte aufgrund unterschiedlicher Brechungsindizes [17] und Schwerkraft [18] lässt sich eine Auftrennung erreichen.

Die meisten Methoden sind für Partikel im Mikrometerbereich gut geeignet, doch je kleiner die zu trennenden Partikel werden, desto weniger Methoden stehen zur Verfügung. Darum soll in dieser Arbeit eine Methode vorgestellt werden mit der auch Nanopartikel, insbesondere Proteine, aufgetrennt werden können.

2 Theoretische Grundlagen

Als Trennmechanismus soll die elektrodenlose Dielektrophorese dienen, die an der Barriere in Abbildung 1 erwartet wird. Ein elektrisches Feld soll durch die Barriere verformt werden und dadurch wiederum eine Kraft auf einen Dipol (Polystyrenpartikel, Protein) ausüben. Diese dielektrophoretische Kraft soll so sensitiv steuerbar sein, dass im Durchflusseexperiment ein Gemisch aus zwei verschieden großen Nanopartikelsorten aufgetrennt werden kann.

2.1 Proteine

Proteine können mit Durchmessern von maximal 20 nm als biologische Nanopartikel betrachtet werden. Sie sind bei allen Vorgängen des Lebens als Katalysatoren, molekulare Motoren, Botenstoffe, strukturbildende Stoffe oder Transporter von entscheidender Rolle [19].

Alle Proteine besitzen denselben systematisch gegliederten Aufbau aus drei oder vier Strukturstufen. Die erste Strukturstufe bildet die Primärstruktur, welche aus unterschiedlich vielen der 20 verschiedenen Aminosäuren und diversen Abwandlungen von ihnen mittels Peptidbindungen (siehe Abbildung 2) zusammengesetzt ist.

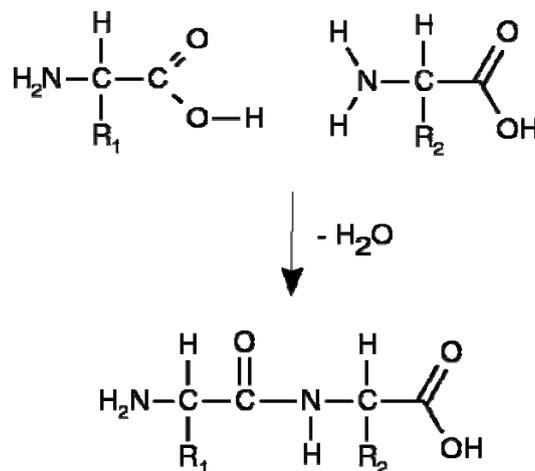


Abbildung 2: Bildung einer Peptidbindung aus zwei verschiedenen Aminosäuren [20]

Jede Aminosäure besteht aus einer Aminogruppe (H_2N-), einer Carboxylgruppe ($-COOH$) und einem der mehr als 20 verschiedenen Reste ($-R_i$). Die Peptidbindung bildet sich jeweils zwischen einer Amino- und einer Carboxylgruppe zweier Aminosäuren unter Abspaltung von Wasser aus. So werden unterschiedlich lange Ketten gebildet. Bei weniger als 100 verknüpften Aminosäuren spricht man nicht von einem Protein, sondern von einem Peptid.

Diese Kette bildet nun in einzelnen Bereichen Konformationen aus, die u.a. durch Wasserstoffbrückenbindungen und Disulfidbrücken stabilisiert sind.

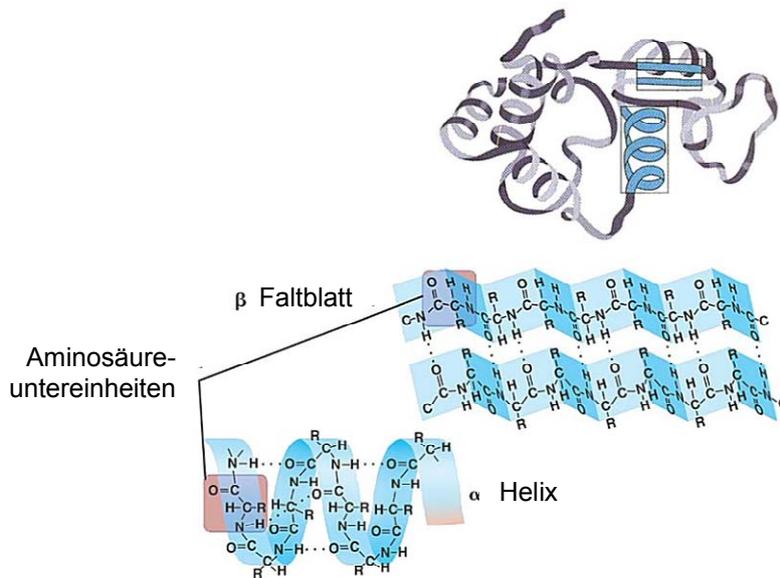


Abbildung 3: Darstellung der Sekundär- (unten) und der Tertiärstruktur (oben) [21]

Typische Sekundärkonformationen sind dabei die α -Helix und das β -Faltblatt (siehe Abbildung 3, unten), sowie Schleifen. Diese Strukturen bilden in der übergeordneten dreidimensional gefalteten Konformation die so genannte Tertiärstruktur (siehe Abbildung 3, oben). Diese Struktur ist für die biologische Funktion des Proteins zuständig. Treten dort Fehler auf, kann häufig die ursprüngliche Funktion nicht mehr erfüllt werden [22].

Besteht ein Protein aus mehr als nur einer Polypeptidkette, bilden diese durch nicht kovalente Wechselwirkungen Komplexe, die so genannte Quartärstruktur (siehe Abbildung 4).

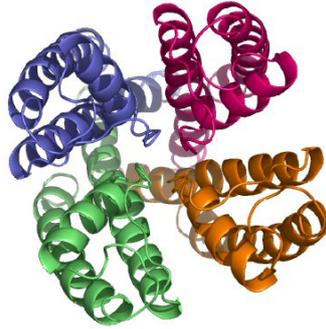


Abbildung 4: Protein, bestehend aus vier Polypeptidketten (unterschiedlich gefärbt)

Mit diesen Strukturstufen bilden die Proteine dabei grundsätzlich zwei Formen aus, globuläre, die nahezu kugelförmig sind und fibrilläre, die eine faserige oder fadenförmige Struktur aufweisen. Für die Versuche in dieser Arbeit werden nur globuläre Proteine verwendet.

2.2 Mikrofluidiksysteme

Um verbesserte Analyseverfahren mit Hilfe von Mikrofluidiksystemen entwickeln zu können, sind detaillierte Kenntnisse der Hydro- und Elektrodynamik in diesen Systemen nötig. Im Gegensatz zu makroskopischen Erfahrungen dominieren bei diesen Größenordnungen andere physikalische Effekte das Verhalten. Zum Beispiel gibt es aufgrund eines enorm gestiegenen Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen in Mikrofluidikkanälen praktisch keine Trägheit der Kanalbefüllung. Stattdessen bestimmen Randeffekte, wie z.B. Reibung, dessen Eigenschaften. Dieses Zusammenspiel mikroskopisch dominierender Effekte wird in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

2.2.1 Hydrodynamik

Die Hydrodynamik behandelt als Teilgebiet der Strömungslehre das Verhalten von bewegten Flüssigkeiten und Gasen und ermöglicht somit auch eine Beschreibung des Strömungsverhaltens in Mikrofluidikkanälen.

2.2.1.1 Viskosität

Alle auftretenden hydrodynamischen Effekte werden durch die innere Reibung des Flüssigkeitsmediums beeinflusst. Dabei ist die Viskosität η ein Maß dafür und gibt an, wie gut Scherkräfte innerhalb eines Fluids übertragen werden.

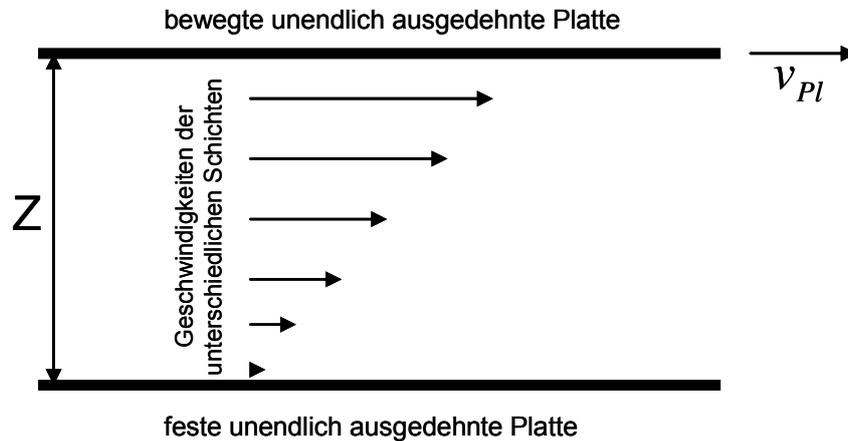


Abbildung 5: Veranschaulichung der Viskosität [23]

Zur Veranschaulichung zeigt **Abbildung 5** einen experimentellen Aufbau zur Messung der Viskosität. Im Abstand Z zu einer stationären Platte wird eine zweite Platte mit der Fläche A parallel zur ersten mit der Geschwindigkeit v_{Pl} bewegt, zwischen beiden befindet sich die viskose Flüssigkeit. Die dafür benötigte Kraft $|\vec{F}|$ berechnet sich zu [24]:

$$|\vec{F}| = \eta A \frac{dv_{Pl}}{dZ}. \quad (2.1)$$

Je größer also die Viskosität ist, desto mehr Kraft muss aufgebracht werden, um die Platte mit gleicher Geschwindigkeit bewegen zu können.

2.2.1.2 Reynoldszahl und Strömungsverhalten

Als dimensionslose Größe zur Charakterisierung von Flüssigkeitsströmungen gibt die Reynoldszahl das Verhältnis zwischen Trägheitskraft- und viskoser Kraft (siehe 2.2.1.1) an. In einer Kapillare mit dem Durchmesser d_{Kap} beispielsweise ist die Reynoldszahl definiert als [24]:

$$\text{Re} = \frac{\rho |\vec{v}| d_{\text{Kap}}}{\eta} . \quad (2.2)$$

Dabei ist ρ die Dichte der viskosen Flüssigkeit und $|\vec{v}|$ die mittlere Geschwindigkeit. Für kleine Reynoldszahlen (<2300) [25] ergibt sich eine wirbelfreie, so genannte laminare Strömung, bei größeren eine turbulente.

Mikrofluidikkanäle besitzen herstellungsbedingt jedoch keinen runden, sondern einen rechteckigen Querschnitt. Deshalb wird der hydraulische Durchmesser D_h anstatt des Kapillardurchmessers d_{Kap} verwendet [26]:

$$D_h = \frac{4A_K}{U_K} . \quad (2.3)$$

A_K und U_K sind dabei Querschnittsfläche und Umfang des Kanals. Bei einem rechteckigen Kanal der Breite b und der Höhe h ergibt sich somit die Reynoldszahl zu:

$$\text{Re} = \frac{2\rho vbh}{\eta(b+h)} . \quad (2.4)$$

Für einen mit Wasser ($\rho = 998 \text{ kg/m}^3$ und $\eta = 1 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) gefüllten Kanal mit den Abmessungen $200 \times 6 \text{ }\mu\text{m}^2$ und einer Strömungsgeschwindigkeit von $v = 100 \text{ }\mu\text{m/s}$ ergibt sich eine Reynoldszahl von $\text{Re} = 0,001$. Die viskose Kraft überwiegt also im Gegensatz zu makroskopischen Erfahrungen und somit ist die Strömung stets laminar.

2.2.1.3 Hydrodynamischer Fluss

Erzeugt man an den Enden eines Mikrofluidikkanals einen Druckunterschied Δp , so bildet sich eine laminare Strömung aus (siehe 2.2.1.2). Diese lässt sich mittels der Navier-Stokes Gleichung beschreiben. Mit deren Lösung und unter der Annahme einer ruhenden Flüssigkeitsschicht direkt am Rand aufgrund viskoser Haftung (siehe 2.2.1.1), der so genannten no-slip Randbedingung [27], wird diese stationäre und divergenzfreie Strömung auch als Hagen-Poiseuille'scher Fluss bezeichnet. Da $b \gg h$ ist kann man für die Geschwindigkeitsverteilung näherungsweise annehmen,

dass der Kanal seitlich nicht begrenzt ist, der Fluss also zwischen zwei unendlich ausgedehnten Platten stattfindet. Für die Geschwindigkeit ergibt sich dann folgender Ausdruck in Abhängigkeit von der z -Position im Kanal [27]:

$$v(z) = \frac{\Delta p}{2\eta L} z(h-z). \quad (2.5)$$

L steht dabei für die Kanallänge, an der der Druckunterschied anliegt. Zur Veranschaulichung des parabelförmigen Flussprofils in diesem System bei Normaldruck p_0 dient Abbildung 6.

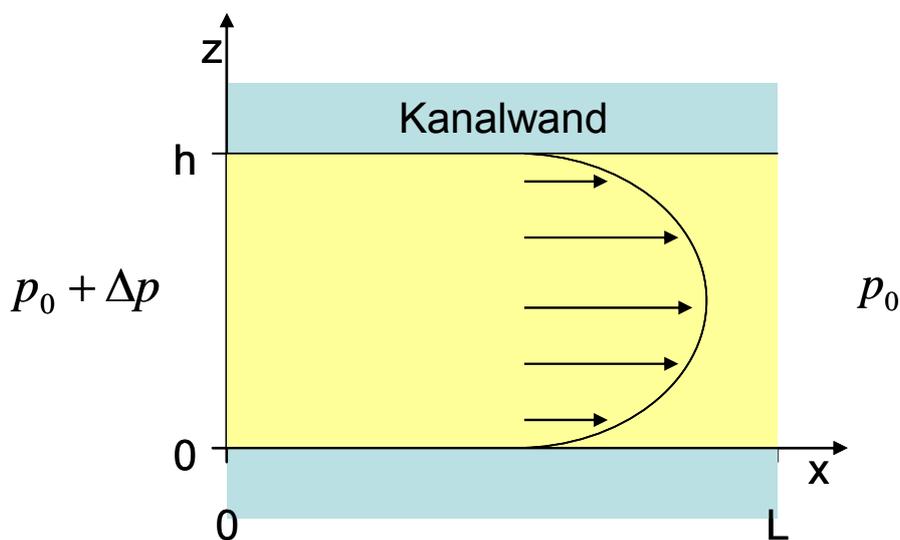


Abbildung 6: Hagen-Poiseuille Profil zwischen zwei unendliche ausgedehnten parallelen Platten

2.2.2 Elektrodynamik

Zusätzlich zu hydrodynamischen Transportvorgängen können auch elektrische Felder Transportphänomene hervorrufen. Die für diese Arbeit relevanten Effekte werden im Folgenden näher erläutert.

2.2.2.1 Elektrostatik

Das von einer Punktladung q hervorgerufene elektrische Potential ϕ ergibt sich im Abstand s zur Ladung zu:

$$\phi(s) = -\frac{q}{4\pi\epsilon_0\epsilon_m s}. \quad (2.6)$$

Dabei ist π die Kreiszahl und ε_0 und ε_m stehen für die Dielektrizitätskonstante des Vakuums und die relative Dielektrizitätskonstante des Mediums. Die elektrische Energie E_{el} einer zweiten Punktladung q' in diesem Potential berechnet sich dann zu:

$$E_{el}(s) = -\frac{q \cdot q'}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_m s}. \quad (2.7)$$

Schließlich ergibt sich die auf q' wirkende elektrische Kraft \vec{F}_{el} , die parallel zur Verbindungsachse beider Ladungen gerichtet ist, aus der Ortsableitung von E_{el} :

$$\vec{F}_{el}(s) = \frac{q \cdot q'}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_m s^2}. \quad (2.8)$$

2.2.2.2 Elektrische Doppelschicht

Bestimmte Kanalstrukturen, z.B. aus Polydimethylsiloxan (PDMS) bestehende, besitzen bei Kontakt mit Elektrolytlösungen eine geladene Oberfläche, welche auf einer Deprotonierung von (SiOH)-Gruppen beruht, die ab einem pH-Wert der Elektrolytlösung von > 2 stattfindet [28]. Dadurch kommt es zwischen den Ionen der Lösung und den Kanalwänden zu elektrostatischen Wechselwirkungen. Nach der Debye-Theorie lagern sich so lange Gegenionen an die Kanalwand an, bis die Ladung nach außen kompensiert ist. Der Potentialverlauf $\phi(r)$ in Abhängigkeit vom Abstand r zu einer geladenen Oberfläche mit dem Potential ϕ_0 kann mit dem Stern-Modell (siehe Abbildung 7) beschrieben werden.

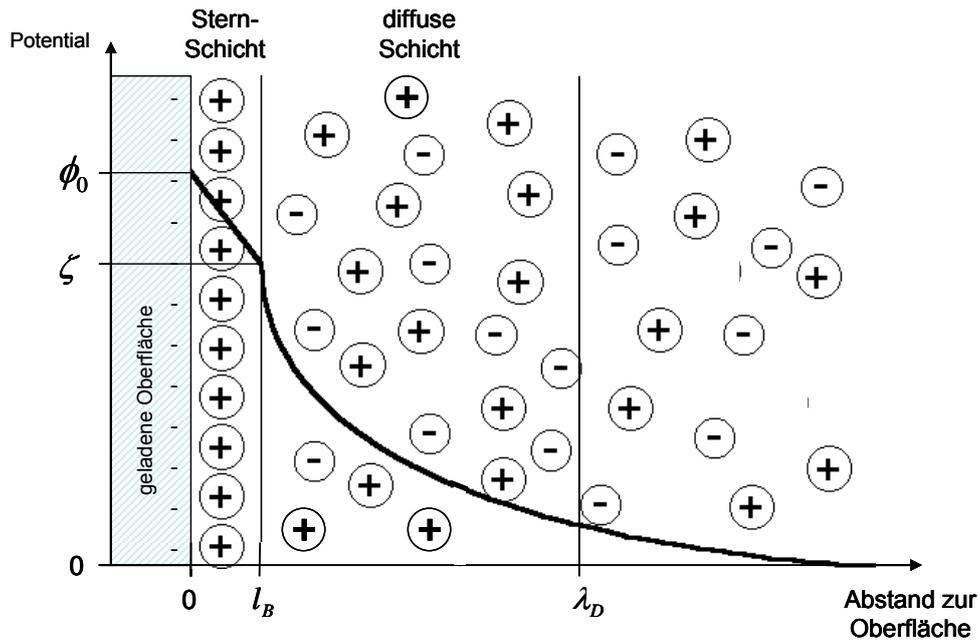


Abbildung 7: Potentialverlauf an geladener Oberfläche

Gegenionen des Elektrolyten sind direkt an der Oberfläche, in der so genannten Stern-Schicht, fest gebunden, weshalb eine etwas abgeschirmte neue effektive Oberfläche angenommen werden kann. Die Dicke dieser Schicht l_B , die Bjerrum-Länge, entspricht in ihren Ausmaßen in etwa der Größe der Ionen [29]. Darauf folgt die diffuse Schicht mit einer erhöhten Konzentration an Gegenionen. In ihr können sich die Ionen aufgrund der schwächeren elektrostatischen Wechselwirkungen thermisch bewegen (siehe 2.2.3.1). Außerhalb dieser Schicht ist die Konzentration von Kationen und Anionen wieder nahezu gleich. Der Potentialverlauf dieses Doppelschichtsystems kann wie folgt beschrieben werden [30]:

$$\phi(r) = \zeta \cdot \exp\left(-\frac{r}{\lambda_D}\right). \quad (2.9)$$

Das ζ -Potential ergibt sich dabei aus dem linearen Abfall des Oberflächenpotentials innerhalb der Sternschicht. Die Debyelänge λ_D beschreibt als charakteristische Größe den Abstand zur effektiven Oberfläche, bei dem das Oberflächenpotential auf den $1/e$ -Teil des ursprünglichen Wertes abgesunken ist, wobei e für die Euler'sche Konstante steht.

Ab einem Abstand größer als der Debyelänge ist das Potential annähernd null und die Elektrolytlösung verspürt keinerlei elektrostatische Effekte der Oberfläche mehr.

Die Dicke der diffusen Schicht ist dabei u.a. von der Ionenstärke I der Elektrolytlösung abhängig [31]:

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_m k_B T}{2 N_A e_{\pm}^2 I}}. \quad (2.10)$$

Hier steht k_B für die Boltzmann-Konstante, T für die Temperatur, N_A für die Avogadro-Konstante und e_{\pm} für die Elementarladung. Diese Gleichung ist nur gültig, solange keine Überlagerung zweier Debyeschichten stattfindet. Die Ionenstärke wiederum lässt sich aus den Konzentrationen der Ionen im Elektrolyten berechnen:

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

M_i steht für die jeweilige Stoffmengenkonzentration des entsprechenden Ions und z_i für dessen Wertigkeit. Je geringer die Ionenkonzentration in einem Elektrolyten ist, desto größer ist die Debyelänge an einer geladenen Oberfläche. Die Ionenkonzentration lässt sich schließlich aus der Leitfähigkeit χ des Analyten gewinnen:

$$\chi = F \sum_i M_i z_i \mu_i. \quad (2.12)$$

Dabei bezeichnet F die Faraday-Konstante und μ_i die Mobilität der einzelnen Ionenarten im Elektrolyten. Die Leitfähigkeit ist indirekt proportional zum elektrischen Widerstand R_{el} :

$$R_{el} = \frac{1}{\chi}. \quad (2.13)$$

Im Falle zweier paralleler gleichgeladener Oberflächen, deren Abstand kleiner als das 20fache ihrer Debyelängen ist, kann der Potentialverlauf nicht mehr mit Gleichung (2.9) angenähert werden, sondern muss als Kosinus Hyperbolicus, wie in Abbildung 8, abgeschätzt werden [31].

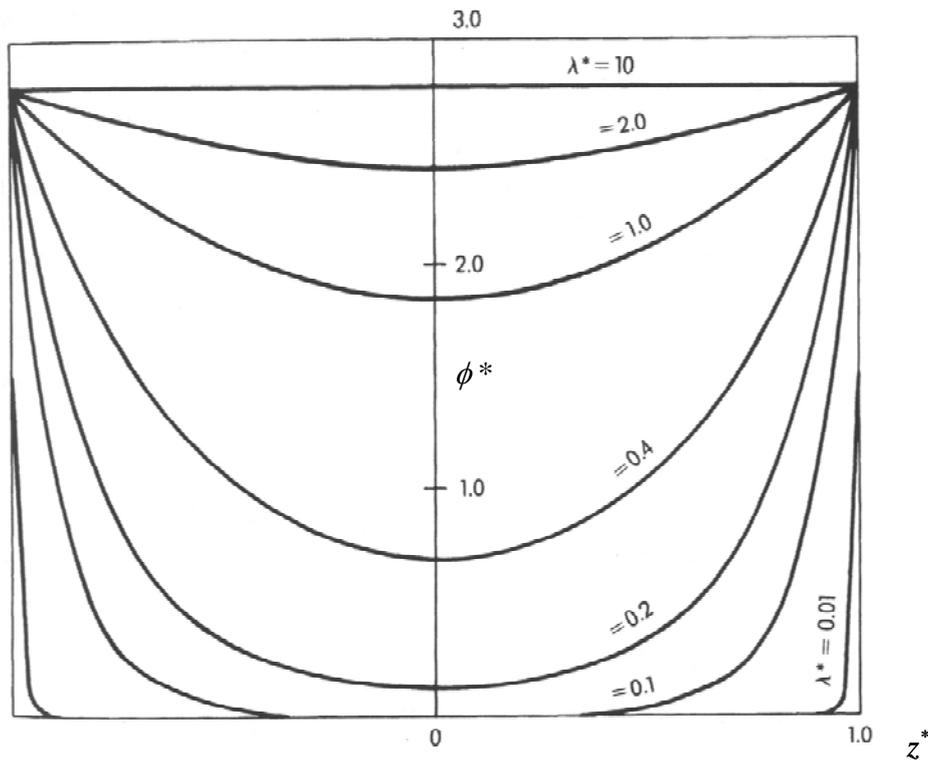


Abbildung 8: Potentialverlauf zwischen zwei geladenen Wänden, deren Debyeschichten sich gegenseitig überlagern [31]

Aus Symmetriegründen wird die Position z im Kanal der Höhe h im Intervall $-h/2 \leq z \leq +h/2$ angegeben, wobei die Position $z=0$ genau in der Mitte zwischen beiden Kanalwänden liegt. Die Variablen mit $*$ sind auf typische Dimensionen normiert. $\lambda^* = 2\lambda_D/h$, $z^* = 2z/h$ und $\phi^* = zF\phi/R_{(\text{molar gas})}T$, wobei $R_{(\text{molar gas})}$ der molaren Gaskonstante entspricht. In Abbildung 8 wurde $\phi^* = 2,79$ angenommen. Mit einem beliebigen elektrischen Potential lässt sich die Verteilung der Ionenkonzentration M_{\pm} wie folgt berechnen [31]:

$$M_{\pm}(x) = M_{\pm_0} \cdot \exp\left(\mp \frac{zF\phi(x)}{R_{(\text{molar gas})}T}\right). \quad (2.14)$$

M_{\pm_0} ist dabei die Gleichgewichtskonzentration ohne elektrisches Potential.

2.2.2.3 Elektrophorese und Elektroosmose

Legt man an einen Elektrolyten ein elektrisches Feld \vec{E} an, wirkt eine elektrophoretische Kraft auf die Ladungsträger und diese bewegen sich entsprechend

$$\vec{F}_{ep} = q\vec{E} \quad (2.15)$$

relativ zu der restlichen Flüssigkeit, wobei q für die Ladung der einzelnen Ionen steht. Dies bezeichnet man als Elektrophorese (EP). Die aus dieser Kraft resultierende Geschwindigkeit \vec{v}_{ep} der Ionen

$$\vec{v}_{ep} = \mu_{ep}\vec{E} \quad (2.16)$$

ist lediglich vom elektrischen Feld und der elektrophoretischen Mobilität μ_{ep} abhängig. Auf die bewegten Ionen wirkt aber gleichzeitig die Stokes'sche Reibungskraft \vec{F}_r . Diese ist definiert als [32]

$$\vec{F}_r = -f_r\vec{v} \quad (2.17)$$

und wirkt entgegen der Bewegungsrichtung. f_r ist dabei der Reibungskoeffizient und \vec{v} die Geschwindigkeit des Teilchens, auf das die Reibung wirkt. Setzt man nun die Gleichungen (2.15 - 17) ineinander ein, erhält man für die elektrophoretische Mobilität folgenden Zusammenhang:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{f_r}. \quad (2.18)$$

Betrachtet man den einfachsten 3-dimensionalen Fall einer Kugel unter der Annahme viskoser Reibung (nicht zu große Körper, die sich nicht zu schnell durch ein Fluid bewegen), hat der Reibungskoeffizient den Wert [24]:

$$f_r = 6\pi\eta r_s, \quad (2.19)$$

wobei r_s den Sphärenradius und π die Kreiszahl bezeichnet.

Dies sind ideale Annahmen, welche im Experiment nicht vorliegen. Aufgrund einer Ionenhülle um jedes geladene Teilchen in einer Elektrolytlösung treten zwei weitere nicht zu vernachlässigende Kräfte auf, die die Bewegung hemmen. Zum einen bedingt die elektrokinetische Anziehung der Gegenionen innerhalb der diffusen Schicht eine Retardationskraft und zum anderen verursacht die Deformation der Ionenhülle aufgrund der Bewegung des Teilchens eine elektrische Relaxationskraft.

In Mikrofluidikkanälen mit geladenen Oberflächen (siehe 2.2.2.2) gibt es einen weiteren Effekt, den man Elektroosmose nennt. Wird an einen Mikrofluidikkanal mit einer elektrischen Doppelschicht ein äußeres elektrisches Feld angelegt, so bewegen sich die Ionen innerhalb der diffusen Schicht entsprechend Gleichung (2.15). Aufgrund der Viskosität (siehe 2.2.1.1) wird dabei die umgebende Flüssigkeit mitbewegt und der elektroosmotische Fluss (EOF), mit seinem typischen Stempelflussprofil (siehe Abbildung 9, oben), bildet sich aus. Je größer der hydrodynamische Durchmesser ist (siehe 2.2.1.2), desto länger dauert die Ausbildung des Stempelflussprofils. Diese erfolgt innerhalb weniger hundert Mikrosekunden bei Durchmessern von 100 μm [33] bis hin zu 100 Millisekunden bei 3,4 mm [34].

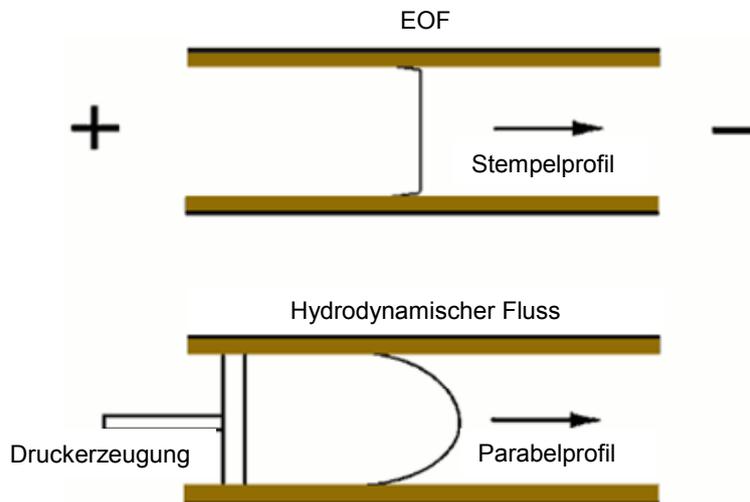


Abbildung 9: Vergleich zwischen einem Flussprofil verursacht durch EOF (oben) und Druckunterschied (unten) [35]

Unter den Annahmen, dass die Debyelänge klein im Vergleich zu den typischen Kanaldimensionen ist und die Ionenverteilung von der Boltzmann-Statistik beschrieben werden kann, ergibt sich folgende elektroosmotische Mobilität μ_{eof} [31]:

$$\mu_{eof} = -\frac{\epsilon_m \zeta}{\eta}. \quad (2.20)$$

Da EP und EOF gleichzeitig in Mikrofluidikkanälen mit geladenen Oberflächen auftreten, ist die absolute Geschwindigkeit \vec{v}_{ges} entscheidend für das Verhalten der Teilchen in diesen. Diese Überlagerung der beiden Effekte wird anhand von Abbildung 10 verdeutlicht.

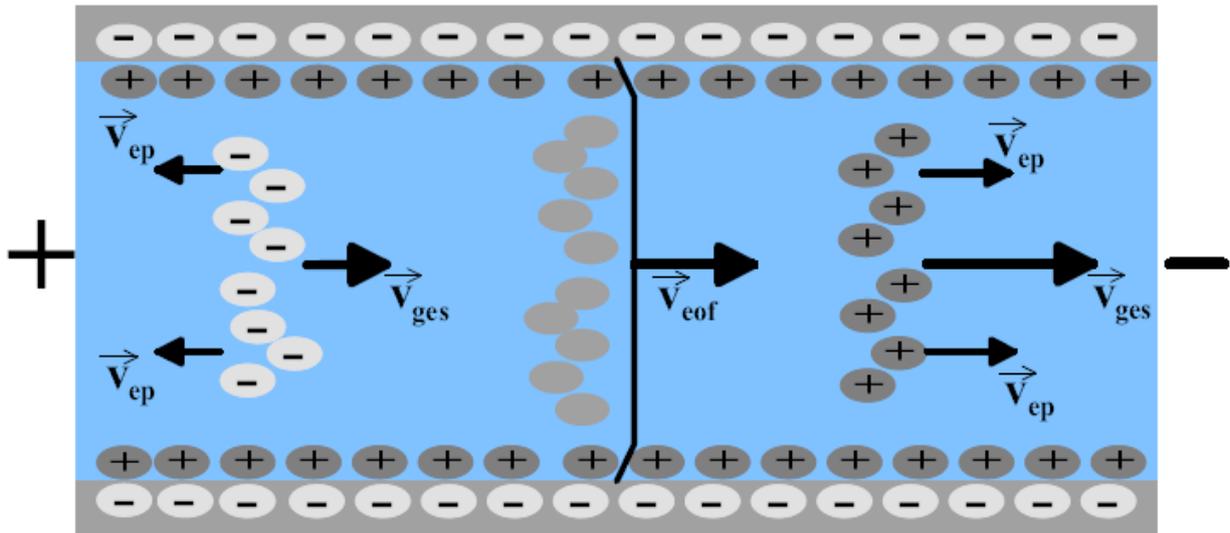


Abbildung 10: Auswirkung eines äußeren elektrischen Feldes auf einen Mikrofluidikkanal mit geladenen Oberflächen [36]

Unter der Voraussetzung der Similitude [37] (konstantes elektrisches Feld, homogene Flüssigkeits- und elektrische Eigenschaften, λ_D (siehe 2.2.2.2) sei klein im Verhältnis zu allen anderen Kanaldimensionen und einem ausgeprägten EOF entsprechend Gleichung (2.20)), ergibt sich aus der Summe beider Einzelmobilitäten:

$$\vec{v}_{ges} = (\mu_{ep} + \mu_{eof}) \vec{E}. \quad (2.21)$$

2.2.2.4 Dielektrophorese

Die Bewegung eines polarisierbaren Teilchens in einem inhomogenen äußeren elektrischen Feld, egal ob Wechsel- oder Gleichspannung, wird als Dielektrophorese (DEP) bezeichnet. Der Unterschied zwischen einer Wechsel- und einer Gleichspannungsdielektrophorese liegt darin, dass bei der Wechselspannung kein Nettotransport von geladenen Teilchen stattfindet. Die Polarisierung kann permanent vorliegen oder, ebenfalls durch ein äußeres elektrisches Feld, von außen induziert werden. So können auch auf ungeladene Teilchen mit Hilfe von elektrischen Feldern dielektrophoretische Kräfte ausgeübt werden. Inhomogene elektrische Felder treten direkt an Elektroden auf (Abbildung 11 a)) oder lassen sich durch Einbringen nicht leitender Barrieren in ein homogenes elektrisches Feld erzeugen (Abbildung 11 b)).

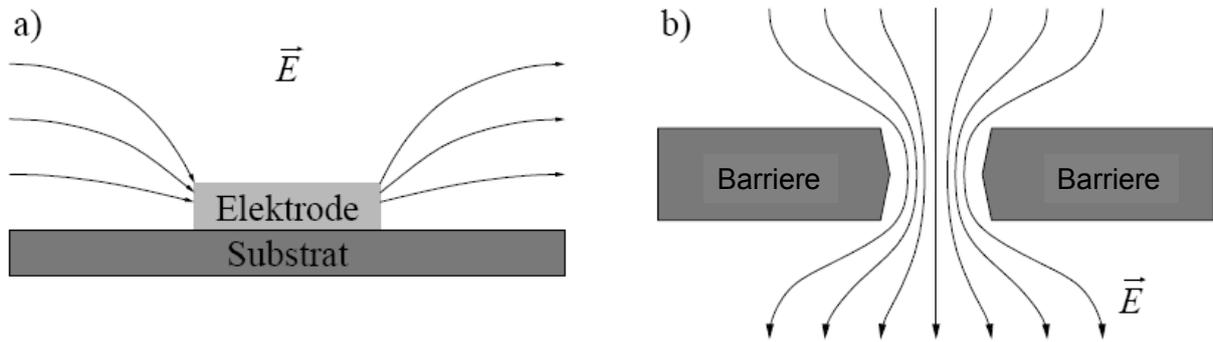


Abbildung 11: Möglichkeiten zur Erzeugung inhomogener elektrischer Felder [38]

Das von einem elektrischen Feld induzierte Dipolmoment \vec{p} eines polarisierbaren Teilchens kann wie folgt berechnet werden [30]:

$$\vec{p} = \alpha(\omega)\vec{E}. \quad (2.22)$$

Dabei ist $\alpha(\omega)$ die frequenzabhängige Polarisierbarkeit des Teilchens. Daraus ergibt sich folgendes dielektrophoretisches Potential W_{DEP} [30]:

$$W_{DEP} = -\vec{p}\vec{E} = -\alpha(\omega)\vec{E}^2. \quad (2.23)$$

Mit Hilfe dieses Potentials lässt sich aus dessen Gradienten die dielektrophoretische Kraft \vec{F}_{DEP} auf ein polarisiertes Teilchen berechnen [30]:

$$\vec{F}_{DEP} = \left(\vec{p} \cdot \nabla\right)\vec{E}. \quad (2.24)$$

Um detaillierte theoretische Beschreibungen der Größe dieser Kraft zu erlauben, kann man von einem sphärischen Teilchen mit homogener Dielektrizität ausgehen, welches zusätzlich eine Ohm'sche Leitfähigkeit ohne dielektrische Verluste aufweist. Dieses befindet sich in einem dielektrischem Medium, das ebenfalls ein Ohm'scher Leiter ohne dielektrische Verluste ist (siehe Abbildung 12, links).

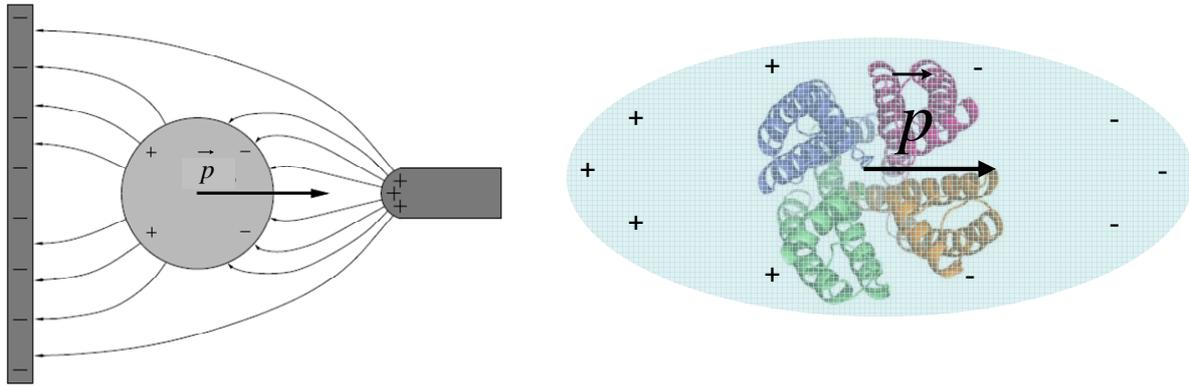


Abbildung 12: Veranschaulichung der Polarisierbarkeit eines Kügelchens (links) und eines Proteins (rechts)

Außerdem muss beachtet werden, dass bei Wechselfeldern den freien Ladungen an der Partikeloberfläche genügend Zeit bleibt, sich entsprechend des Feldes ausrichten zu können [39]. Dies ist vor allem bei der zu erwartenden Polarisation der Ionenhülle des Proteins (siehe Abbildung 12, rechts) von entscheidender Bedeutung, da anzunehmen ist, dass das Protein aufgrund seiner Struktur selber nicht polarisierbar ist (siehe 2.1).

Für eine ideale Kugel lassen sich die Polarisierbarkeit und die dielektrophoretische Kraft wie folgt bestimmen [40–42]:

$$\vec{p} = 4\pi\epsilon_0\epsilon_m r_s^3 K(\omega), \quad (2.25)$$

$$\vec{F}_{DEP} = 2\pi\epsilon_0\epsilon_m r_s^3 K(\omega) \nabla \vec{E}^2. \quad (2.26)$$

$K(\omega)$ steht für den Clausius-Mosotti-Faktor. Aufgrund der Definition von $K(\omega)$ [30]

$$K(\omega) = \frac{\epsilon_p - \epsilon_m}{\epsilon_p + 2\epsilon_m}, \quad (2.27)$$

erkennt man, dass das Vorzeichen der dielektrophoretischen Kraft lediglich durch die Differenz aus der relativen dielektrischen Konstante des Partikels ϵ_p und der des Mediums gegeben ist. Ist $\epsilon_p > \epsilon_m$, so handelt es sich um positive DEP und die polarisierten Partikel werden von Regionen höherer Feldstärken angezogen. Im umgekehrten Fall handelt es sich um negative DEP und die Partikel werden von der gleichen Region abgestoßen.

An Gleichung (2.25) wird deutlich, dass die dielektrophoretische Kraft kubisch mit dem Radius des Partikels ansteigt, worauf sich auch die Auftrennung unterschiedlich großer Polystyrenkügelchen [1, 43] zurückführen lässt.

2.2.3 Statistische Effekte

Mit den hydro- und elektrodynamischen Effekten können sämtliche deterministischen Aspekte des Transports und des Manipulierens von Teilchen nahezu vollständig beschrieben werden. Alle Teilchen würden sich auf vorhersagbaren Bahnen entlang bewegen und, einmal in einer Falle gefangen, niemals entkommen können. Dass dem nicht so ist, kann von diesen Theorien nicht erklärt werden. Den Zugang zu dem beobachteten Verhalten ermöglicht die Wahrscheinlichkeitstheorie, die mit statistischen Mitteln Aussagen über ein Ensemble von Teilchen treffen kann. Die Diffusion von Teilchen z.B. kann so verstanden werden.

2.2.3.1 Diffusion

Diffusion ist die thermisch getriebene Eigenbewegung beweglicher Teilchen in einem Medium. Diese thermische Energie resultiert aus der ungerichteten kinetischen Energie E_{kin} vieler Teilchen, die miteinander ständig Stöße vollziehen. Die kinetische Energie ergibt sich dabei direkt aus der Temperatur des jeweiligen Teilchens [24]:

$$E_{kin} = \frac{3}{2} k_B T . \quad (2.28)$$

Andererseits gilt für die kinetische Energie weiterhin der Zusammenhang [24]

$$E_{kin} = \frac{1}{2} m v^2 , \quad (2.29)$$

wobei m für die Masse steht. Führt man diese beiden Formeln zusammen, so erhält man einen Ausdruck für die ungerichtete thermische Geschwindigkeit \vec{v}_{th} eines Teilchens in Abhängigkeit von seiner Masse und seiner Temperatur:

$$|\vec{v}_{th}| = \sqrt{\frac{3k_B T}{m}} . \quad (2.30)$$

Es ist aber keine Aussage über die Bewegungsrichtung eines einzelnen Teilchens möglich. Lediglich über ein ausreichend großes Ensemble gleicher Teilchen und bei keiner weiteren äußeren Einwirkung, kann die Aussage getroffen werden, dass sich der über alle i Teilchen gemittelte ($\langle \rangle$) Schwerpunkt $\langle \vec{x}_i(t) \rangle$ mit Fortschreiten der Zeit dt nicht ändert. Dabei ist $\vec{x}_i(t)$ die 3-dimensionale Raumkoordinate eines jeden Teilchens zur Zeit t . An Gleichung (2.30) erkennt man leicht, dass die thermische Geschwindigkeit nur für sehr leichte und somit kleine Teilchen von Bedeutung ist. Diese thermische Bewegung führt zu einer völligen Gleichverteilung (siehe Abbildung 13) in einem zuvor geordneten System.

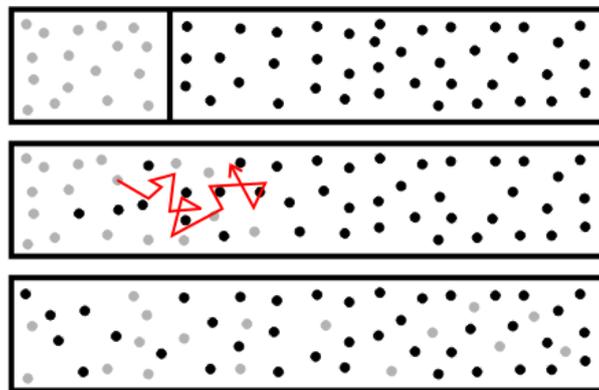


Abbildung 13: Veranschaulichung der Gleichverteilung unterschiedlicher Partikel: unterschiedliche Partikel werden durch eine Wand getrennt (oben), nachdem die Wand entfernt wurde beginnen die unterschiedlichen Teilchen sich miteinander zu vermischen (mitte) und nach theoretisch unendlich langer Zeit ist das Teilchengemisch vollkommen homogen in seiner Verteilung (unten) [44]

Dieser Prozess der Gleichverteilung wird als Diffusion bezeichnet und kann mit der Diffusionskonstante D für ein Kügelchen wie folgt beschrieben werden:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} . \quad (2.31)$$

Der Nenner aus Gleichung (2.31) ergibt sich dabei wiederum aus der viskosen Reibung der Teilchen (siehe Gleichung (2.19)). Ein Kügelchen mit 100 nm Durchmesser hat bei Raumtemperatur beispielsweise einen Diffusionskoeffizienten von $D = 2 \mu\text{m}^2 / \text{s}$ [45]. Mit Hilfe dieser Konstanten lässt sich dann der in der Zeit dt zurückgelegte Weg eines Teilchens statistisch abschätzen. In 1-dimensionaler Form berechnet sich dieser zu:

$$x(t + dt) - x(t) = \sqrt{2D \cdot dt} . \quad (2.32)$$

2.2.3.2 Kramers Rate

Der Begriff Kramers Rate stammt aus der Reaktionsratentheorie und beschreibt die Wahrscheinlichkeit eines in einer Potentialmulde gefangenen Teilchens aufgrund seiner thermischen Energie zu entkommen. Als einfachen Ansatz für solch eine Potentialmulde nähert man ein stückweise harmonisches Potential an (siehe Abbildung 14).

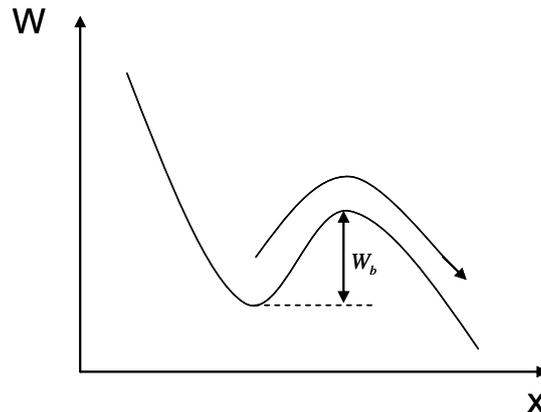


Abbildung 14: Veranschaulichung eines statistischen Entkommens aus einer Potentialmulde

Dabei entkommt das Teilchen aus der Mulde, wenn es durch thermische Anregung die Potentialbarriere W_b überwindet [46–49]. Die Rate für das Entkommen kann mittels der Kramers Rate:

$$k_{Kramer} \propto \exp\left(-\frac{W_b}{k_B T}\right) \quad (2.33)$$

beschrieben werden. Die Aufenthaltszeit in der Potentialmulde ist dabei invers proportional zur Kramers Rate.

2.3 Elektrochemie des Wassers

Wasser besitzt viele Eigenschaften, die zum Verständnis von diversen Vorgängen in wässriger Lösung näher betrachtet werden müssen. Ein Wassermolekül besteht aus einem Sauerstoff- und zwei kovalent gebundenen Wasserstoffatomen (siehe Abbildung 15).

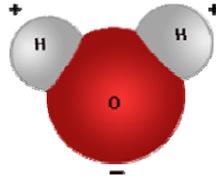


Abbildung 15: schematische Darstellung eines Wassermoleküls [50]

Das Sauerstoffatom bindet dabei die mit den Wasserstoffatomen gemeinsamen Bindungselektronenpaare stärker an sich, weshalb es partiell negativ geladen ist. Die Wasserstoffatome sind entsprechend partiell positiv geladen. Wegen dieser partiellen Ladungen bilden die Moleküle untereinander so genannte Wasserstoffbrückenbindungen aus, die in Abbildung 16 durch gepunktete Linien symbolisiert sind.

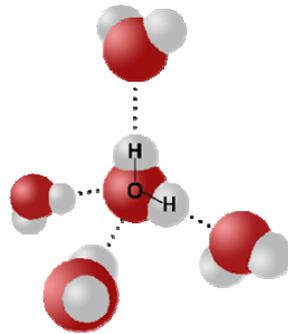


Abbildung 16: Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wassermolekülen [50]

Diese Wasserstoffbrückenbindungen liegen zwischen allen Molekülen eines Wasservolumens vor, weshalb diese ein Netzwerk ausbilden.

Als Ampholyt kann das Wassermolekül sowohl ein Wasserstoffion aufnehmen als auch abgeben. Dabei entsteht entweder ein positiv geladenes Hydronium- oder ein negativ geladenes Hydroxidion. Beide Ionen können gleichzeitig bei der Reaktion zweier Wassermoleküle miteinander gebildet werden (siehe Abbildung 17).

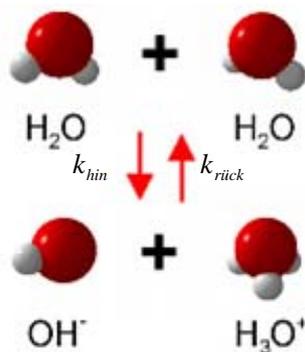


Abbildung 17: Autoprotolysereaktion des Wassers

Dieser Prozess heißt Autoprotolysereaktion des Wassers. In reinem Wasser findet diese Reaktion ständig in beide Richtungen statt und unterliegt dabei einem gewissen Gleichgewicht. Mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes kann dieses über die beiden Einzelreaktionsgeschwindigkeiten v_{hin} und $v_{rück}$ beschrieben werden [51]:

$$v_{hin} = k_{hin}(T) \cdot [H_2O]^2, \quad (2.34)$$

$$v_{rück} = k_{rück}(T) \cdot [H_3O^+] \cdot [OH^-]. \quad (2.35)$$

Dabei stehen die eckigen Klammern für die Konzentration in *mol/l* des jeweiligen Stoffes, $k_{hin}(T)$ und $k_{rück}(T)$ sind die temperaturabhängigen Reaktionsraten. Ein *mol* sind dabei N_A Teilchen eines Stoffes. Im Gleichgewichtszustand sind beide Reaktionsgeschwindigkeiten gleich und die Gleichgewichtskonstante beträgt bei 25° C [51]:

$$\kappa = \frac{k_{hin}}{k_{rück}} = \frac{[H_3O^+] \cdot [OH^-]}{[H_2O]^2} = 3,08025 \cdot 10^{-11}. \quad (2.36)$$

Dieser geringe Wert zeigt, dass die Konzentration der Ionen deutlich geringer ist als die der Wassermoleküle. Stellt man Gleichung (2.36) nach dem Produkt der Ionenkonzentrationen um, so erhält man das Ionenprodukt k_{wH_2O} des Wassers, das im Gleichgewicht stets konstant ist [51]:

$$k_{wH_2O} = \kappa \cdot [H_2O]^2. \quad (2.37)$$

2.4 Fluoreszenz

Als Methode Nanoobjekte in Echtzeit zu detektieren, hat sich die optische Fluoreszenzmikroskopie bewährt. Dabei können mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen auch Objekte unter dem optischen Auflösungslimit detektiert werden.

Elektronen dieser Farbstoffe werden durch Absorption von Licht bestimmter Wellenlängen λ vom Grundzustand S_0 in ein höheres Energieniveau S_{0+i} angeregt (siehe Abbildung 18, links).

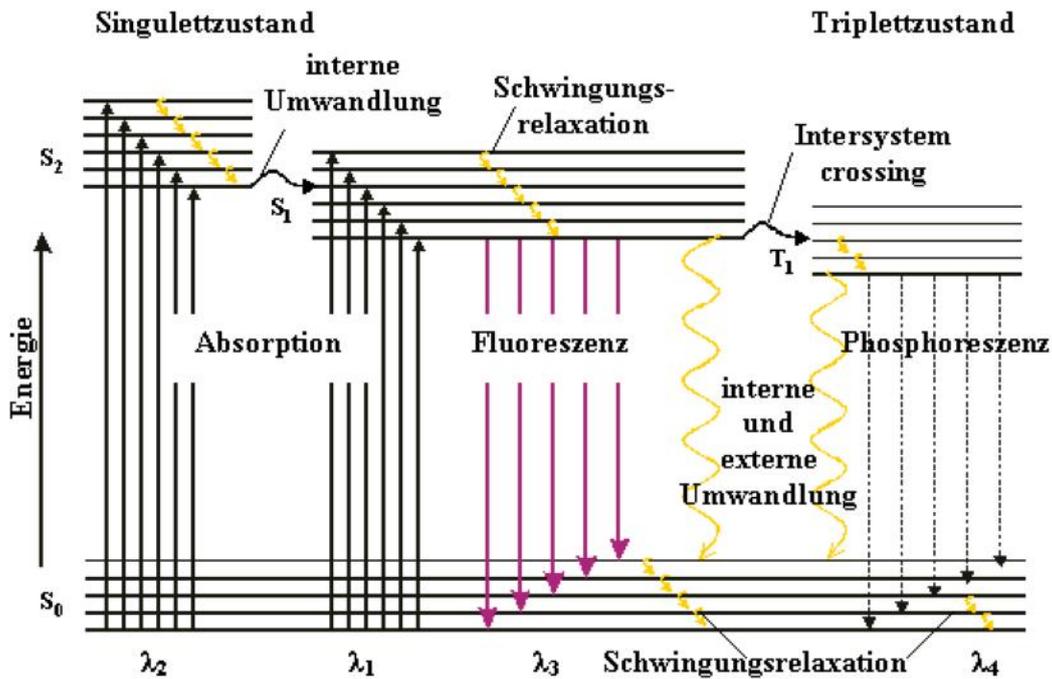


Abbildung 18: Jablonski-Diagramm zur Erläuterung der Fluoreszenz [52]

Nach der Anregung erfolgt ein Energieverlust bedingt durch eine strahlungslose Schwingungsrelaxation und einer eventuellen internen Umwandlung. Danach befindet sich das angeregte Elektron des Farbstoffes in dem niedrigsten Schwingungszustand des angeregten S_1 - Niveaus. Nach ca. 10^{-8} s kommt es anschließend zur Relaxation in den Grundzustand, wobei das Fluoreszenzlicht abgegeben wird. Dieses hat meist eine größere Wellenlänge als das anregende Licht ($\lambda_1 \leq \lambda_3$), wie man an Abbildung 18 und dem Zusammenhang zwischen Wellenlänge und zugehöriger Energie

$$\lambda = \frac{h_{pl}c}{E} \quad (2.38)$$

erkennen kann. Hier steht h_{pl} für das Planck'sche Wirkungsquantum und c für die Lichtgeschwindigkeit. Die durch den Energieverlust bedingte Vergrößerung der Wellenlänge wird als Stokes Verschiebung [24, 53, 54] bezeichnet (siehe Abbildung 19).

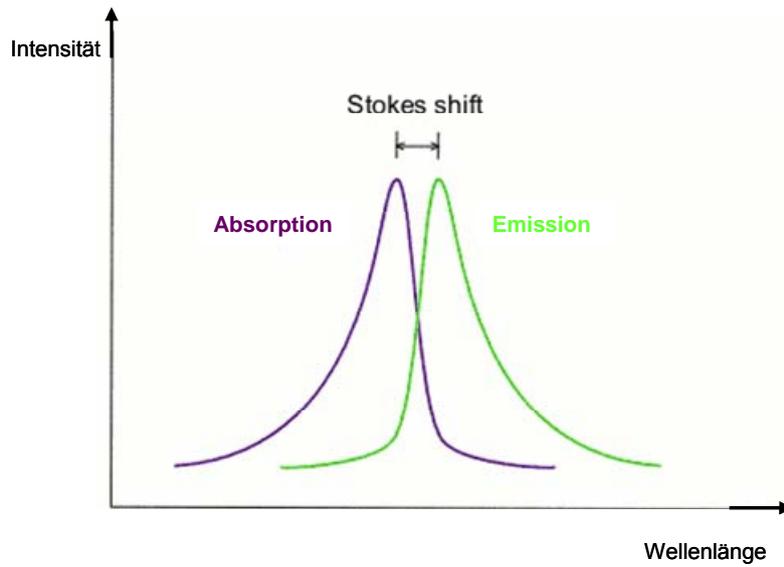


Abbildung 19: Veranschaulichung der Stokes Verschiebung [55]

Bei Fluorophoren sind konkurrierende Prozesse, wie Intersystem Crossing oder interne und externe strahlungslose Umwandlung (siehe Abbildung 18, rechts), sehr unwahrscheinlich, weshalb eine sehr hohe Fluoreszenzausbeute möglich ist.

3 Materialien und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

Zur Übersicht sämtlicher verwendeter Chemikalien und Geräte in dieser Arbeit sind diese in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: verwendete Materialien und deren Hersteller

Materialbezeichnung	Hersteller, Stammsitz
Siliziumwafer, 100 mm	CrysTec, Deutschland
konz. Schwefelsäure p.A. H_2SO_4	Merck, Deutschland
Wasserstoffperoxid p.A. H_2O_2	Merck, Deutschland
MilliQ-Wasser	Millipore, USA (Anlagenlieferant)
SU-8(50) Negativphotolack	Microresist, USA
GBL Thinner	MicroChem, USA
Entwickler MR-DEV 600	Microresist, USA
Aceton p.A.	Riedel de Haan, Deutschland
Isopropanol p.A.	Merck, Deutschland
Ethanol p.A.	Merck, Deutschland
Tesafilm	Beiersdorf AG, Deutschland
Tridecafluor-1,1,2,2-tetra-hydrooctyltrichlorsilan (TDS)	Merck, Deutschland
Vinylmethylsiloxan-dimethylsiloxan trimethylsiloxo terminiertes Kopolymer	ABCR GmbH & Co KG, Deutschland
Platin-divinyltetramethylsiloxan Komplex	ABCR GmbH & Co KG, Deutschland
2,4,6,8-Tetramethyl-2,4,6,8-tetravinylcyclotetrasiloxan (TMTVS)	Sigma-Aldrich, Deutschland
(25-35% Methylhydrosiloxane)-dimethylsiloxane Kopolymer (h-PDMS Linker)	ABCR GmbH & Co KG, Deutschland
Polydimethylsiloxan (PDMS) Sylgard 184	Dow Corning GmbH, Deutschland
Silicone Elastomer Curing Agent (PDMS-Linker)	Dow Corning GmbH, Deutschland
Deckgläser, 24mm x 60 mm	Menzel-Gläser, Deutschland
Stickstoff, reinst	Linde, Deutschland
Sauerstoff, reinst	Linde, Deutschland
N-Dodecyl β -D-Maltosid (DDM)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Methyl Cellulose (MC)	Sigma-Aldrich, Deutschland
FluoSpheres carboxylatmodified microspheres, 0.02 μ m, red fluorescent (580/605) (0.024 μ m)	Invitrogen, USA
FluoSpheres carboxylatmodified microspheres, 0.1 μ m, red fluorescent (580/605)	Invitrogen, USA
FluoSpheres carboxylatmodified microspheres, 0.04 μ m, yellow-green fluorescent (505/515) (0.036 μ m)	Invitrogen, USA
FluoSpheres carboxylatmodified microspheres, 0.5 μ m, yellow-green fluorescent (505/515)	Invitrogen, USA
Platindraht, d = 0,4 mm, reinst	VWR, Deutschland
Epoxy Kleber 5 min.	Toolcraft, Deutschland
Streptavidin Alexa Fluor 532 conjugate (from <i>S. Avidinii</i>)	Invitrogen, USA

Materialien und Methoden

R-Phycoerythrin (<i>from Gracilaria chilensis</i>)	Invitrogen, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Invitrogen, USA
Gerätebezeichnung	
Zentrifuge Delta 10	Ble-Labratory Equipment GmbH, Deutschland
Spincoater ST147	Convac, Deutschland
manuelle Heizplatte HAT-303D	ATV-Technologie München, Deutschland
programmierbare Heizplatte PR 5 SR	Detlef Gestigkeit, Deutschland
4'' Chrom-Photomaske	Delta Mask, Niederlande
Maskaligner MJB3	Süss MicroTec, Deutschland
DekTak-Profilometer 3030 ST	Stanford Nanofabrication Facility Equipment, USA
Ultraschallbad T490DA	Elma, Deutschland
Sauerstoff-Plasmaanlage	Eigenfabrikat, siehe [56]
Plexiglas(PMMA)-Halter	Eigenfabrikat, siehe Abbildung 26
Silikonschlauch d = 3mm	Festo, Deutschland
Proportionaldruckminderer Airfit Tecno PRE-U	Hoerbiger, Deutschland
Digitalventile MHA2-MS1H3/2GK-2-K-196121	Festo, Deutschland
invertiertes Mikroskop Axiovert 200	Zeiss, Deutschland
100x Ölimmersionsobjektiv PLAN Neofluar, NA 1.3	Zeiss, Deutschland
xy-Stage 399S008	Ludl Electronic Products, USA
CCD-Kamera Imager 3LS	LaVision GmbH, Deutschland
SensiCam PCI interface board	PCO, Deutschland
Davis 6.2 Software	LaVision GmbH, Deutschland
Funktionsgenerator DS 345	Stanford Research Systems, USA
Hochspannungsverstärker AMS-1B30	Matsusada Precision, Japan
Quecksilberdampf Lampe HBO50	Zeiss, Deutschland
Fluoreszenzfiltersatz 10 (BP 450-490, BP 515-565 und FT-510) → grüner Filter	Zeiss, Deutschland
Fluoreszenzfiltersatz 53 (BP 514/10, BP 575/50 und FT 540) → Streptavidin	Zeiss, Deutschland
Fluoreszenzfiltersatz 20 (BP 546/12, BP 575-640 und FT 560) → roter Filter	Zeiss, Deutschland

3.2 Multi-Schicht (3D) lithographische Waferherstellung

Im folgendem sind sämtliche Teilschritte chronologisch geordnet.

1. SU-8(50) Photolackverdünnung

Das Braunglas wird gründlich mit Caro'scher Säure (Schwefelsäure: Wasserstoffperoxid = 3:1) und MilliQ-Wasser gereinigt. Die zuvor berechneten Volumina an SU-8(50) Lack (69% Feststoffanteil) und Verdünner werden für einen Lack mit 13%, 18% und 52% Feststoffanteil in jeweils ein Braunglas gegeben und gut verrührt. Die berechneten Volumina für die Verdünnungen sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2: Volumina an SU-8(50) und Verdünner für die jeweiligen Feststoffanteile

Feststoffanteil [%]	SU-8(50) [ml]	Verdünner [ml]
13	100,0	18,8
18	100,0	26,1
52	100,0	75,4

2. Reinigung des Wafers

Der Wafer wird für 5 Minuten (min) in Caro'sche Säure in eine Kristallisationsschale gelegt, anschließend mit einer Pinzette entnommen und mit MilliQ-Wasser gründlich abgespült. Danach wird er erneut für 5 min in eine Kristallisationsschale mit frisch angesetzter Caro'scher Säure gelegt. Die Säure wird abgegossen und der Wafer in der Kristallisationsschale für 5 min gründlich mit MilliQ-Wasser aus einem Brausenkopf von Rückständen befreit. Mit dem Spincoater wird der Wafer trocken geschleudert (30 Sekunden (s) bei 3000 U/min) und anschließend für 20 min bei 200° C auf der manuellen Heizplatte ausgeheizt.

3. Aufbringung der dünnen Lackschicht (siehe Abbildung 20).

Der gereinigte Wafer wird im Spincoater platziert und der Photolack (13% bzw. 18% Feststoffanteil) mittig aufgegossen. Anschließend wird er für 5 s bei 500 U/min und danach für 30 s bei 1000 U/min gespinncoated und anschließend für 1 min bei 95° C auf der manuellen Heizplatte gebacken (Softbake, SB). Danach wird der Wafer im Maskaligner unter der ersten Photomaske für 2 s belichtet und bei 95° C für 1 min erneut auf die Heizplatte gelegt (Post Exposure Bake, PEB). Der Wafer wird für 1 min in eine Kristallisationsschale mit Entwickler gegeben und anschließend vorsichtig zuerst mit Aceton und danach mit Isopropanol abgespült und mit Stickstoff trocken gepustet.

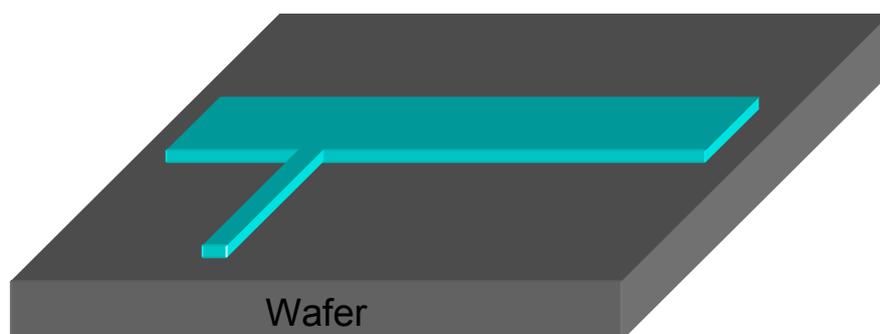


Abbildung 20: Wafer mit erster dünner Lackschicht

4. Schichtdickenbestimmung

Die Schichtdicken der so entstandenen Lackschichten sind in Abhängigkeit von Feststoffanteil und Umdrehungszahl beim Spincoaten in Tabelle 3 erfasst. Alle Schichten wurden dabei für eine Dauer von 30 s gespincoatet.

Tabelle 3: SU-8-Schichtdicken in Abhängigkeit von Feststoffanteil und Umdrehungszahl

Feststoffanteil [%]	Umdrehungszahl [U/min]	Schichtdicke [nm]
13	3000	70 ± 10
13	500	480 ± 15
18	3000	260 ± 15
18	1000	525 ± 15

Sämtliche Schichtdicken wurden mit dem DekTak Profilometer bestimmt (siehe Abbildung 21).



Abbildung 21: 70 nm SU-8-Schicht

Die restlichen Aufnahmen sind im Appendix zu finden (siehe 6.1).

5. Aufbringung der dickeren Lackschicht (siehe Abbildung 22).

Dazu werden als erstes die Positionierungskreuze auf dem Wafer mit Tesafilm abgeklebt. Dann wird der Wafer wiederum im Spincoater ausgerichtet und der SU-8 Lack mit 52% Feststoffanteil mittig aufgegossen. Zu erst wird dieser für 5 s bei 500 U/min, danach 30 s bei 3000 U/min gespincoatet. Der SB erfolgt auf der programmierbaren Heizplatte für 1 min bei 65° C und danach für 3 min bei 95° C. Der Tesafilm wird anschließend entfernt und der Wafer entsprechend der

Positionierungskreuze unter der zweiten Photomaske im Maskaligner für ca. 8 s belichtet. Der PEB ist analog zum vorherigen SB. Dann folgen wiederum das Entwicklerbad und die Reinigung mit Aceton und Isopropanol. Mit dem Profilometer kann jetzt eine Schichtdicke von 6 μm gemessen werden.

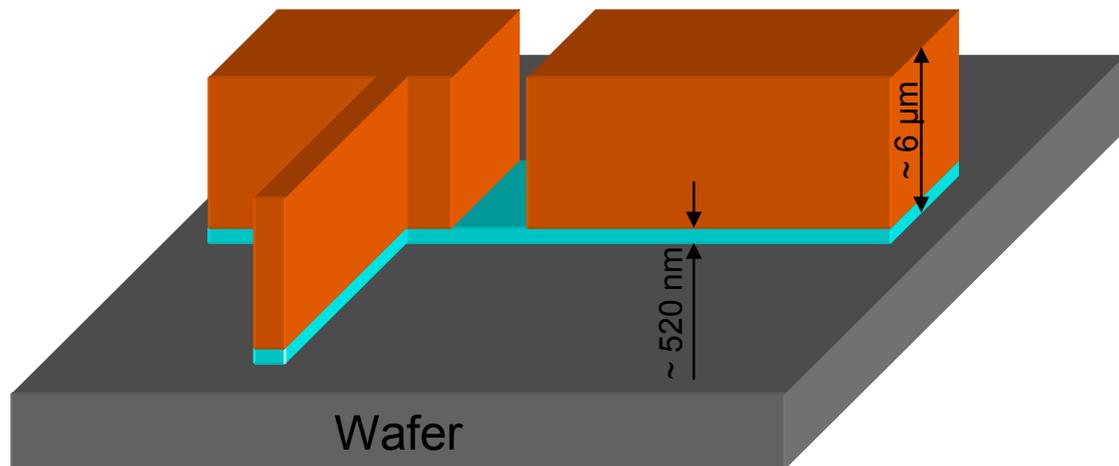


Abbildung 22: Wafer mit zweiter Lackschicht, die die Aussparung für die Barriere enthält

6. Vorbereitung auf PDMS-Abformung

Der Wafer wird für 20 min bei 200° C auf die manuelle Heizplatte gelegt (Hardbake, HB) und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wird er silanisiert. Der Wafer wird zusammen mit TDS auf einem Urglas in einen Exsikkator für 30 min evakuiert und noch einmal für 30 min bei abgestellter Pumpe im Vakuum gelassen. Zuletzt wird der Exsikkator belüftet und der Masterwafer ist bereit für die Abformung.

3.3 Chipherstellung

Auch hier sind sämtliche Teilschritte chronologisch geordnet.

1. Beschichtung der Deckgläschen

Dafür werden die Deckgläser im Ultraschallbad nacheinander in Aceton, Ethanol und MilliQ-Wasser für je 30 s gereinigt. Im Spincoater werden sie mit 1 ml fertig angemischtem Sylgard 184 PDMS (Polymer : Linker = 10:1) (im folgenden nur PDMS

genannt) bei 1000 U/min für 30 s gespincoated und anschließend für 30 min bei 65° C auf der manuellen Heizplatte gebacken.

2. Abguss des Wafers

Auf einer Feinwaage werden mit einer Einwegspritze (2 ml) 3,4 g Kopolymer für das h-PDMS in eine Petrischale (5,5 cm) gegeben. Danach wird mit einer Einwegspritze (1 ml) ein Tropfen TMTVS hinzugegeben, 18 µl Platin-Komplex hinzupipettiert [57] und alles miteinander vermischt. In einer zweiten Petrischale (9 cm) werden 7 g Sylgard 184 Polymer zusammen mit 0,7 g Linker abgewogen, ebenfalls gut vermischt und anschließend im Exsikkator für 15 min evakuiert. Dann wird der Masterwafer im Spincoater platziert, zu der h-PDMS Mischung wird mit einer Einwegspritze (1 ml) 1 ml h-PDMS Linker gegeben, zügig verrührt und mittig auf den Wafer gegossen. Dieser wird nun für 5 s bei 500 U/min. und danach für 30 s bei 1000 U/min. gespincoated. Anschließend wird er bei 65° C für 1 min auf die manuelle Heizplatte gelegt, das PDMS darüber gegossen und für weitere 30 min auf der Heizplatte gebacken.

3. Vorbereitung des PDMS-Chips auf den Zusammenbau

Von dem noch warmen Masterwafer wird vorsichtig die h-PDMS/PDMS-Doppelschicht unter kleinem Winkel abgelöst und zur Aufbewahrung, mit den Strukturen nach unten, in eine Petrischale gelegt. Nun werden die Kanalstrukturen mit einem Skalpell ausgeschnitten (siehe Abbildung 23) und mit dem Stanzaufbau (siehe Abbildung 24) die Reservoir gestanzt. Nach einer Reinigung im Ultraschallbad, analog zu den Deckgläsern unter 1., werden die Chips mit der Struktur nach oben auf einen Aluminiumteller gelegt. Die mit PDMS beschichteten Deckgläser werden genauso gereinigt und mit der PDMS-Seite nach oben auf den Teller gelegt.

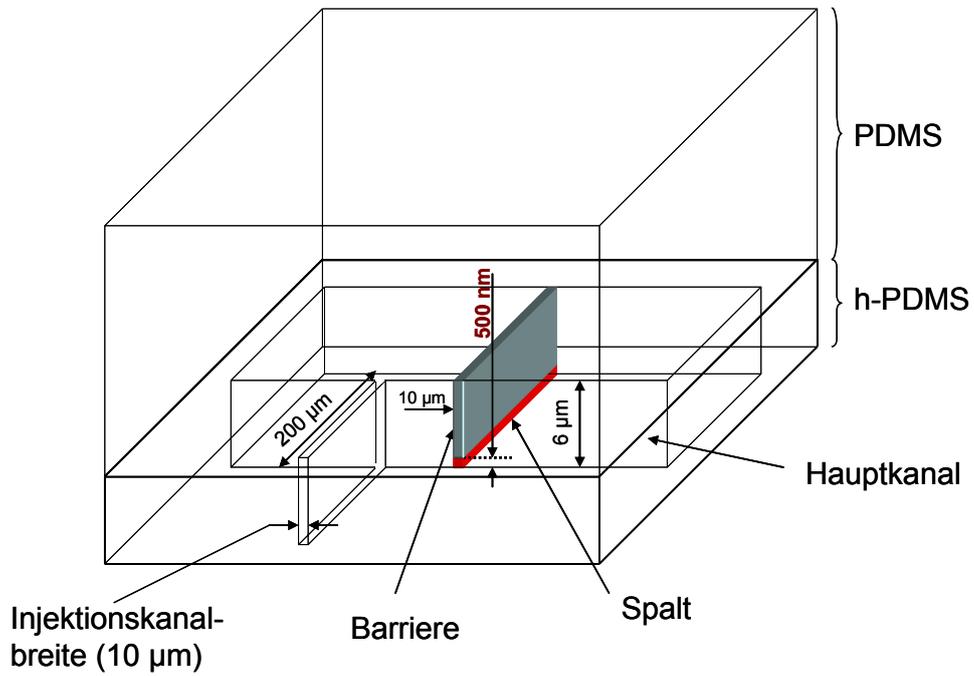


Abbildung 23: Skizze der Kanalstruktur mit Benennung der einzelnen Strukturbestandteile

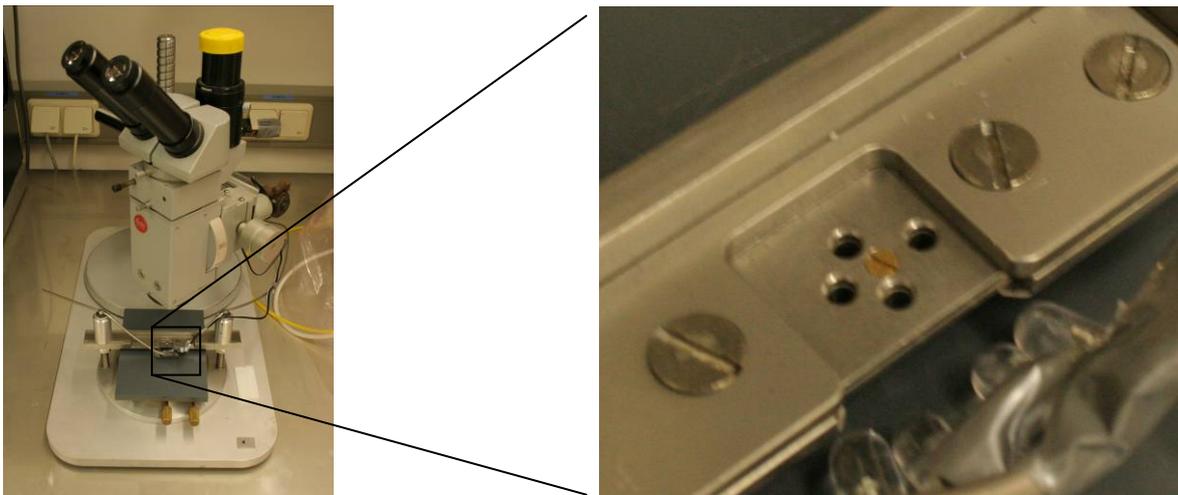


Abbildung 24: Stanzaufbau (links) mit Stanzmaske (rechts)

Die Funktionsweise des Stanzaufbaus wird in einer Skizze in Abbildung 25 verdeutlicht.

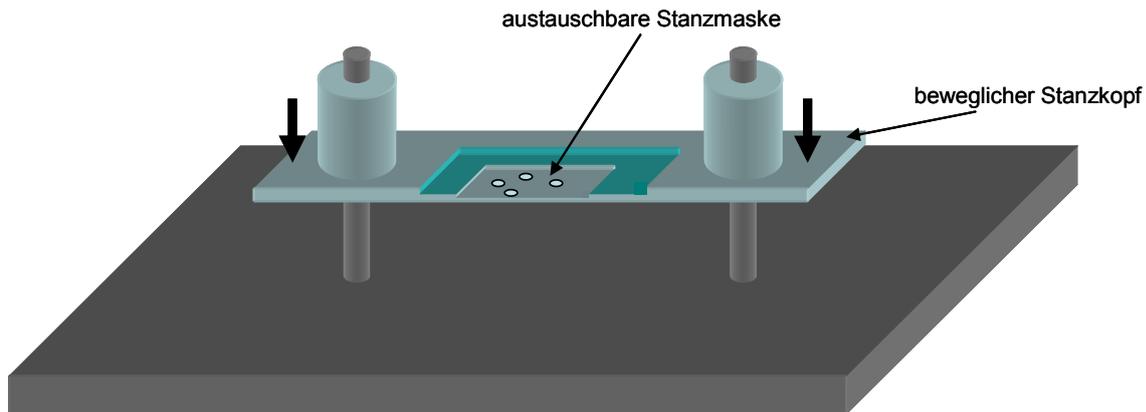


Abbildung 25: Skizze zur Veranschaulichung des Stanzapparaturprinzips

4. Zusammenbau des PDMS-Chips.

Der Aluminiumteller mit den gereinigten Chipbestandteilen wird in die Plasmaanlage gelegt und diese bis zu einem Druck von 10^{-3} mbar evakuiert. Dann wird Sauerstoff bis zu einem Druck von 10^{-2} mbar eingelassen und die Teslaspule für 20 s gezündet (50 kV bei 500 kHz und einem Elektrodenabstand von 6,15 cm). Danach werden Sauerstoffzufuhr und Vakuumpumpe abgestellt und die Anlage mit Stickstoff belüftet. Die Chips werden nun zügig mit der Kanalstruktur nach unten auf die Deckgläser gelegt um innerhalb von 20 min eine kovalente Verbindung zwischen den beiden Schichten auszubilden.

5. Kanalbeschichtung (dynamisches Coating)

Hierfür werden in 10 ml MilliQ-Wasser 25 μ l DDM und 3 mg MC gelöst. Dieses dynamische Coating wird, 20 min nach dem Zusammenbau, in die gestanzten Reservoirs injiziert, bis der Chip für die Messung gebraucht wird.

6. PMMA-Halterung

Die PDMS-Chips werden per Adhäsion unter eine PMMA-Halterung (siehe Abbildung 26) geklebt. Diese ermöglicht größere Reservoirs und den Anschluss von Druckschläuchen. Zusätzlich integrierte Platinelektroden an jedem Reservoir bieten die Möglichkeit der elektronischen Kontaktierung.



Abbildung 26: Skizze der PMMA-Halterung

3.4 Messablauf

1. Chip mit Probe präparieren

Dafür wird das Coating aus den Reservoirs wieder entfernt. Danach wird die PMMA-Halterung (siehe 3.3) entsprechend den Reservoirs auf den Chip aufgesetzt und anschließend zuerst das Coating (siehe 3.3) in die Reservoirs 1 und 3 (siehe Abbildung 27) und zum Schluss die zu untersuchende Probe, ebenfalls in Coating gelöst, in Reservoir 2 pipettiert.

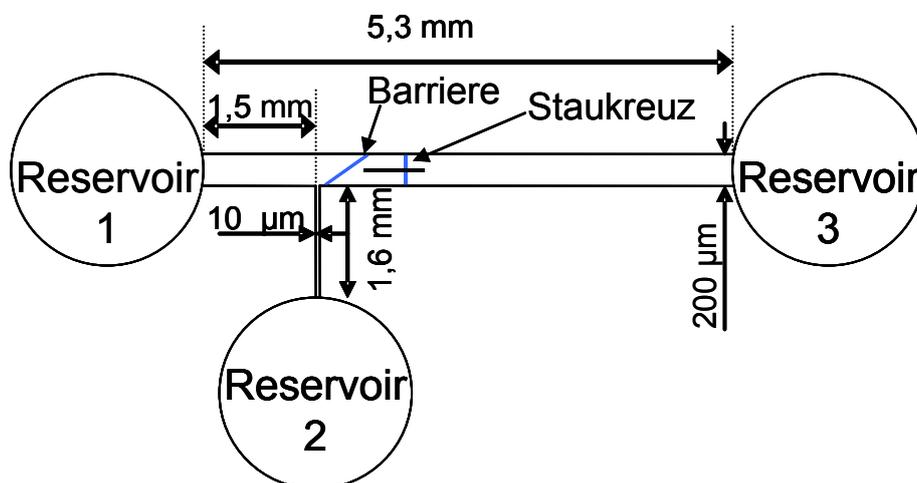


Abbildung 27: Skizze in Aufsicht zur Veranschaulichung der Reservoirs im Chip

Der Chip besteht aus einem $200\ \mu\text{m}$ breiten und $5,3\ \text{mm}$ langen Hauptkanal zwischen Reservoir 1 und 3. An diesen führt in ca. $1,5\ \text{mm}$ Entfernung zu Reservoir 1 ein $10\ \mu\text{m}$ breiter und ca. $1,6\ \text{mm}$ langer Injektionskanal von Reservoir 2. Das gesamte Kanalsystem hat eine Höhe von $6\ \mu\text{m}$, lediglich die blau dargestellten

Bereiche der Barriere (siehe Abbildung 27) und des Staukreuzes haben eine Spalthöhe von ca. 520 nm.

2. Einsetzen der PMMA-Halterung in den Versuchsaufbau (siehe Abbildung 28)

Nachdem die PMMA-Halterung (siehe 3.3) eingespannt und sämtliche Versorgungsleitungen angebracht sind, kann die Messung erfolgen. Dabei werden Drücke im Bereich von 0 bis 0,3 mbar und Spannungen von +1 bis +50 V als typischer Arbeitsbereich verwendet. Reservoir 1 und 2 sind geerdet, während an Reservoir 3 der Hochspannungsgenerator angeschlossen ist. Außerdem sind an Reservoir 1 und 2 Druckschläuche angebracht.



Abbildung 28: Versuchsaufbau mit Fluoreszenzmikroskop (links) und Messaufbau (rechts)

3.5 AFM-Abbildung von Polystyrenpartikeln

Die Größenbestimmung von Nanometerpartikeln aus Polystyren erfolgt nach der Methode von H. Frey [58]. Die Deckgläschen werden gereinigt (siehe 3.3) und

danach für 2 min in der Plasmaanlage behandelt. Anschließend werden 40 µl einer 0,5 mg/ml konzentrierten BSA-Lösung für 2 min aufgebracht und das Deckgläschen mit Stickstoff trocken geblasen. Danach wird die auf 0,2 % Feststoffanteile verdünnte Polystyrenpartikellösung dünn auf das Deckgläschen gegeben und nach 1 min erneut trocken geblasen. Die so präparierte Deckgläschenoberfläche kann anschließend mit einem AFM abgebildet und das Höhenprofil der Partikel ermittelt werden.

3.6 Fluoreszenzmikroskopie

In dem Fluoreszenzmikroskop wird das zu beobachtende Objekt durch das Objektiv mit einer Quecksilberdampfampe beleuchtet (siehe Abbildung 29).

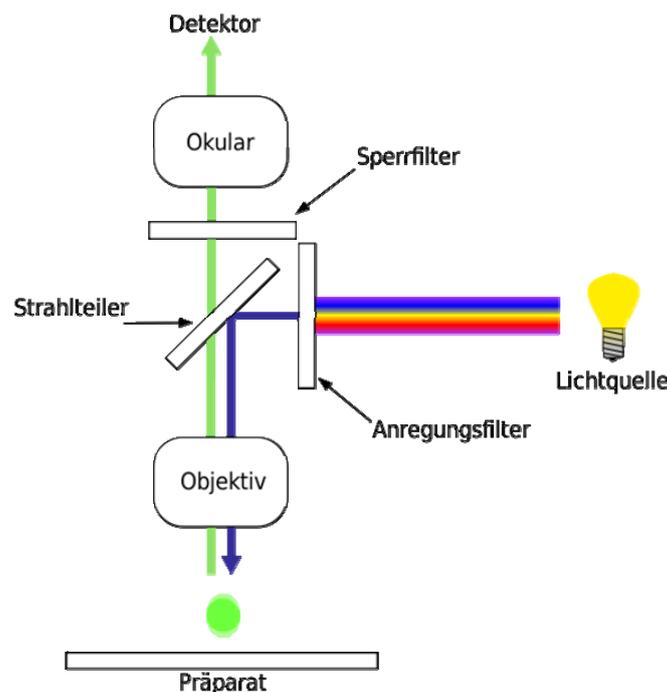


Abbildung 29: Veranschaulichung des Prinzips eines Fluoreszenzmikroskops [59]

Dafür wird vorher mittels eines Anregungsfilters eine bestimmte Wellenlänge aus dem Anregungslicht herausgefiltert und an einem Strahlteiler zum Objektiv reflektiert. Nachdem das Präparat angeregt und das Fluoreszenzlicht emittiert wurde, wird dieses mit dem Objektiv aufgefangen und erneut zum Strahlteiler geleitet. Da das emittierte Licht aber energieärmer ist und somit eine größere Wellenlänge hat (siehe 2.4), kann es, bei passender Strahlteilerwahl, diesen ungehindert passieren. Nach

dem Durchlaufen des Sperrfilters, welcher lediglich die zu erwartende Fluoreszenzwellenlänge transmittieren lässt, wird das vom Präparat emittierte Licht entweder durch das Okular fokussiert und mit dem Auge betrachtet oder, bei sehr lichtschwachen Objekten, mittels einer hochempfindlichen CCD-Kamera detektiert. Anschließend kann die Auswertung mit der Software Davis 6.2 erfolgen. Durch intensive Fluorophore lassen sich so auch Objekte weit unter der Auflösungsgrenze eines Lichtmikroskops in Echtzeit detektieren.

4 Messergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse dargestellt und anschließend diskutiert werden.

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Realisierung eines 3D-Mikrofluidikkanaldesigns (siehe Abbildung 1). Damit sollen Proteine im kontinuierlichen Durchflussexperiment durch elektrodenlose Dielektrophorese (siehe 2.2.2.4) beeinflusst werden.

Um solch ein Kanaldesign zu ermöglichen, muss zuerst ein Masterwafer mit der entsprechenden dreidimensionalen Negativstruktur mittels Softlithographie (siehe 3.2) hergestellt werden (siehe 3.3).

4.1 3D-Masterwaferherstellung und Abformung

Die benötigte 3-dimensionale Barriere im Mikrofluidikkanal wird durch einen zweistufigen Lithographieprozess erzeugt (siehe 3.2).

Um Proteine mit wenigen Nanometern Durchmesser (siehe 2.1) ausreichend stark dielektrophoretisch manipulieren zu können (siehe 2.2.2.4), muss das elektrische Feld im Mikrofluidikkanal an der erzeugten Barriere (siehe Abbildung 23) stark genug verformt werden (siehe Abbildung 11 b)). Dazu ist eine möglichst geringe ($< 1 \mu\text{m}$) Spalthöhe (siehe Abbildung 23) nötig.

4.1.1 Erzeugung einer Barriere im Mikrofluidikkanal

Zur Realisierung solch geringer Spalthöhen muss zuerst eine möglichst dünne Lackschicht erzeugt werden. Da der Lieferant des SU-8-Lackes jedoch nur minimale Schichtdicken mit SU-8 von $1,5 \mu\text{m}$ vorsieht [60], muss zuvor ein verdünnter Lack hergestellt werden (siehe Tabelle 2). Wird z.B. versucht durch höhere Drehzahlen beim Spincoating eine Schicht $< 1 \mu\text{m}$ mit dem dünnsten SU-8(2)-Lack zu erzeugen, so führt dies lediglich zum Reißen des Lacks während des Spincoatings.

Die hergestellten SU-8-Verdünnungen (siehe Tabelle 2) erwiesen sich als so dünn, dass die auf den Wafer gespincoatete Schicht den Wafer nicht permanent

gleichmäßig benetzen kann, sondern sich von den Rändern her zusammenzieht. Dies kann verhindert werden, indem der Wafer mit dem SU-8-Lack nach dem Spincoating sofort dem Softbake (siehe 3.2) unterzogen wird.

Die erhaltenen Strukturen mit Schichtdicken um 70 nm (siehe Abbildung 21) sind so bisher einmalig in der Mikro- bzw. Nanofluidik. Bis zum Abgabetermin dieser Arbeit konnte lediglich eine Veröffentlichung mit solch einer SU-8-Schichtdicke gefunden werden [61]. Dort werden zwar SU-8-Schichtdicken von 70 nm erzeugt, aber nicht strukturiert, sondern als unstrukturierte mechanische und thermische Dämmschicht verwendet.

Um die Barriere nach der Abformung zu erhalten, muss die zweite SU-8-Schicht mit einer entsprechenden Aussparung über der ersten platziert werden (siehe Abbildung 22). Gießt man jedoch den SU-8-Lack direkt auf den Wafer mit den fertigen dünnen Strukturen, sind diese optisch nicht mehr erkennbar und eine Ausrichtung der zweiten Maske ist mit dem Maskaligner nicht möglich.

Durch Abkleben der Positionierungskreuze mit Tesafilm kann das verhindert werden. Erst dann wird die zweite SU-8-Schicht aufgebracht und mittels Softbake (SB) fixiert. Wird der Tesafilm mit der darüber befindlichen SU-8-Schicht abgezogen sind die Positionierungskreuze wieder sichtbar.

4.1.2 Abformung mit PDMS

Der Abguss dieser Strukturen (siehe Abbildung 22) mit handelsüblichem PDMS erzeugt keine stabilen Mikrofluidikkanäle, da die Barriere während des Zusammenbaus mit dem beschichteten Deckgläschen fast immer dicht abschließt. Unter einem optischen Mikroskop kann dies bei einer Spalthöhe von 270 nm beobachtet werden (siehe Abbildung 30).

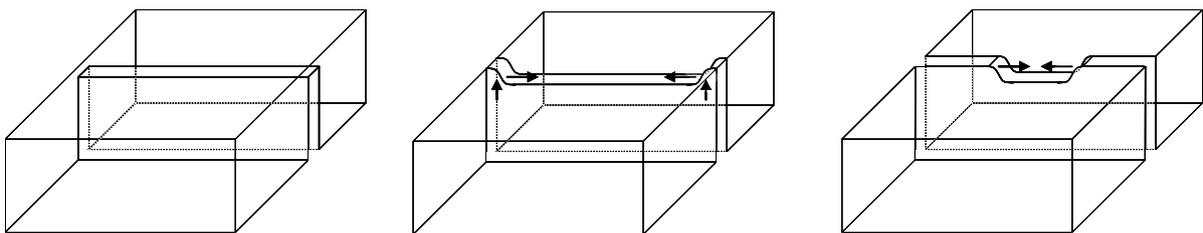


Abbildung 30: Skizze des Verlaufs des Kanalverschlusses

Idealerweise soll die Barriere wie in Abbildung 30 (links) aussehen. Aufgrund der dünnen SU-8-Schicht entstehen am Rand der Barriere Unregelmäßigkeiten, die, zusammen mit der Adhäsion zwischen dem PDMS des Deckgläschens (oben) und dem des Kanals (unten), zu einem Kontakt zwischen Barrierenoberseite und dem Deckgläschen-PDMS führen (siehe Abbildung 30 (mitte)). Wegen der Adhäsion reicht dieser anfängliche Kontakt aus, um diesen Kontakt weiter zur Barrierenmitte laufen zu lassen (siehe Abbildung 30 (rechts)), bis schließlich die gesamte Barriere verschlossen ist [62].

Die Elastizität des PDMS ist für solche Strukturen also zu groß und es muss ein anderes Material gefunden werden.

Unter diesem Gesichtspunkt hat sich im Vergleich zu handelsüblichem PDMS so genanntes h-PDMS als viel versprechend erwiesen [63]. Mit Hilfe der Anleitung zur Herstellung einer Doppelschicht aus beiden PDMS-Varianten [57] wurde eine erneute Abformung der Strukturen versucht. Eine Abformung mit einer reinen h-PDMS-Schicht ist dabei nicht möglich, da diese zu porös ist. Auch in der h-PDMS/PDMS-Doppelschicht neigt das h-PDMS zu Rissen, weshalb es im warmen Zustand und unter kleinem Winkel zum Masterwafer (siehe 3.3) abgelöst werden muss (siehe Abbildung 32).

Erneut kollabierten die Kanalstrukturen unterhalb einer Spalthöhe von 500 nm wie in Abbildung 30. Lediglich die Struktur mit 525 nm Spalthöhe blieb stabil. Somit konnte bei einer Kanalbreite von 200 μm eine diagonal angeordnete frei schwebende Barriere einen ca. 520 nm kleinen Spalt erzeugen, was ein Verhältnis von Spalllänge zu -breite von über 540:1 ergibt. Dies ist extrem hoch im Vergleich zu anderen Gruppen. Mao hat z.B. in seiner Arbeit über den Vergleich von PDMS und h-PDMS in Bezug auf die Erzeugung möglichst großer Verhältnisse lediglich einen Wert von 85:1 realisieren können [64]. Auch er konnte zeigen, dass handelsübliches PDMS im Vergleich zu h-PDMS nur noch kleinere Verhältnisse ermöglicht (siehe Abbildung 31).

Messergebnisse und Diskussion

Nanofluidic channels	Aspect Ratio ^c	Sylgard 184 PDMS	h-PDMS	
			Before filling	After filling
30 μm wide, depth larger than 600 nm ^a	~50	Survive	Survive	Survive
30 μm wide, 500 nm deep ^a	~60	Collapse	Survive	Survive
30 μm wide, 350 nm deep ^a	~85	Collapse	Survive	Collapse
3 μm wide, 350 nm deep ^a	~8.5	Collapse	Survive	Survive
3 μm wide, 225 nm deep ^a	~13	Collapse	Survive	Collapse
3 μm wide, 225 nm deep ^b	~13	Collapse	Survive	Survive
3 μm wide, 110 nm deep ^b	~27	Collapse	Survive	Collapse
3 μm wide, 100 nm deep ^b	~30	Collapse	Collapse	Collapse

^a Flat channels; ^b Alternative thin and thick channels. The given depth is the thickness of thin channels. The depth of thick channels is 1.4 μm . ^c The aspect ratio is defined as the ratio of the width to depth of the pattern.

Abbildung 31: Ergebnisse des Vergleichs von PDMS und h-PDMS [64]

Zwar konnte Mao geringere Kanalhöhen realisieren, dies jedoch nur über eine weitaus geringere Länge.

Die unterschiedlichen Eigenschaften der h-PDMS/PDMS-Doppelschicht sind in Abbildung 32, einer lichtmikroskopischen Aufnahme mit 20facher Vergrößerung, zu erkennen.



Abbildung 32: PDMS-Doppelschicht

Das h-PDMS befindet sich unter- und das handelsübliche PDMS oberhalb. In der oberen Schicht erkennt man die gleichmäßigen Schnittlinien des Skalpells, lediglich im unteren Bereich ist eine stark gesplitterte Schicht zu erkennen. Dies zeigt, dass das h-PDMS spröder als das handelsübliche PDMS ist. Außerdem ist es fester [63].

Obwohl der Spalt nicht kollabiert, erzeugt das Verkleben von h-PDMS-Kanal mit dem PDMS des Deckgläschen (siehe 3.3) einen dichten Chip.

4.2 Experimentelle und theoretische Charakterisierung des Mikrofluidiksystem

Nach erfolgtem Zusammenbau können die Reservoirs (siehe Abbildung 27) befüllt werden.

Da Nanopartikel, insbesondere Proteine (siehe 2.1), stark zu einer Adsorption an die Oberfläche der Kanalwand neigen [56], soll dies durch das verwendete dynamische Coating (siehe 3.3) verhindert werden. Alle verwendeten Analyten, Proteine und Polystyrenpartikel werden darin verdünnt. Außerdem reduziert das Coating gleichzeitig den elektroosmotischen Fluss sehr stark [65]. Dies ermöglicht eine Reduzierung der Beeinflussung des Partikelstroms aufgrund des EOF.

Um zu kontrollieren, welche Größe der Spalt im Mikrofluidikkanal (siehe Abbildung 23) nach der Befüllung mit dem Coating hat, wurden Durchflussexperimente mit fluoreszierenden Partikeln verschiedener Größe (100 und 500 nm) gemacht. Diese wurden elektrophoretisch angetrieben (siehe 2.2.2.3). Während die 100 nm Partikel den Spalt ohne Probleme passieren können, wird die Bewegung der 500 nm Partikel an ihm deutlich verzögert.

Daraus lässt sich schließen, dass die Spalthöhe in etwa dem Durchmesser der 500 nm Partikel entspricht. Dies stimmt sehr gut mit den Dimensionen des Masterwafers (siehe Abbildung 22) überein. Trotz der Verzögerung am Spalt können die 500 nm Partikel diesen auf voller Kanalbreite passieren. Obwohl ein extrem hohes Breite-zu-Höhe-Verhältnis von 540:1 (siehe 4.1.1) vorliegt, scheint die Barriere auf der gesamten Breite nicht durchzuhängen.

Da sowohl der elektrophoretische Antrieb als auch die zu erwartende DEP stark von den elektrischen Feldstärken in den verschiedenen Abschnitten des Mikrofluidikkanals abhängig sind (siehe Gleichung (2.16) und (2.24)), müssen diese abgeschätzt werden. Dazu wird das zugehörige Ersatzschaltbild berechnet. Dafür

wird von der Kanalvariante in Abbildung 33 und einem üblichen Gleichspannungswert von 10 V (siehe 3.4) ausgegangen. Außerdem muss beim Ersatzschaltbild eine zweite Barriere am rechten Hauptkanalende berücksichtigt werden, die von anderen Versuchen herrührt.

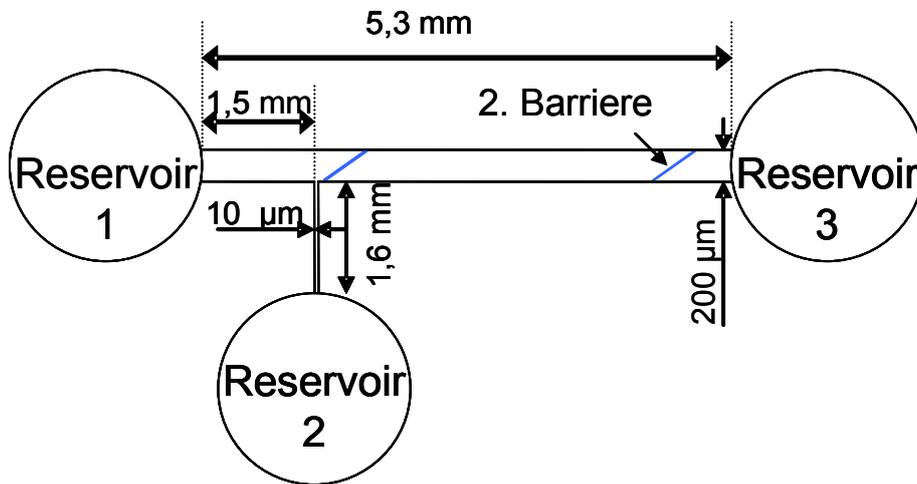


Abbildung 33: Kanaldesign für Ersatzschaltbild

Das Ersatzschaltbild für dieses Design ist folgendes:

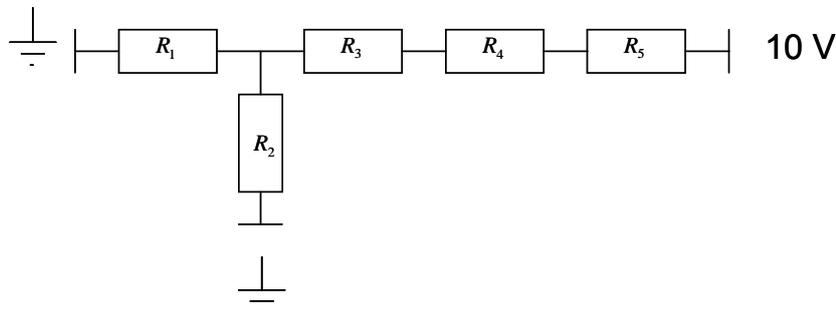


Abbildung 34: Ersatzschaltbild des Kanals aus Abbildung 33

Dabei ist R_1 der Widerstand des 1,5 mm langen Hauptkanalabschnitts, R_2 der des 1,6 mm langen schmalen Injektionskanals, R_3 und R_5 die der beiden Spalte unter den Barrieren und R_4 der Widerstand des verbleibenden längsten Kanalstücks. R_3 und R_5 sind gleich groß. Da die beiden Spalten diagonal im Kanal stehen, werden sie zur Vereinfachung der Widerstandsberechnung auf senkrecht im Kanal stehende projiziert. Somit vergrößert sich die ursprüngliche Barrierenbreite von $10\ \mu\text{m}$ um den Faktor $\sqrt{2}$, während die Projektionslänge der Kanalbreite entspricht.

Der Widerstand im Ersatzschaltbild wird dabei durch die Querschnittsfläche $b \cdot h$ und Länge l eines Kanalsegments abgeschätzt. Hierbei nimmt der Widerstand linear mit

der Segmentlänge zu und mit zunehmender Querschnittsfläche ab, also ist der Ersatzwiderstand:

$$R = \frac{l}{b \cdot h} . \quad (4.1)$$

Da nur das Verhältnis der einzelnen Widerstände wichtig ist, ist der spezifische Widerstand irrelevant. Die Werte für die verschiedenen Widerstände können Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 4: Werte der fünf Widerstände

Nr.	l [μm]	$b \cdot h$ [μm^2]	R [$1/\mu\text{m}$]
1	1500	1200	1,250
2	1600	60	26,667
3	14	100	0,140
4	3810	1200	3,175
5	14	100	0,140

Daraus ergibt sich der Gesamtwiderstand R_G des Systems zu $R_G = 4,649 \mu\text{m}^{-1}$. Somit kann man den Spannungsabfall U über jedes beliebige Kanalsegment entsprechend den Kirchhoff'schen Regeln berechnen.

Für ein Kanalsegment der Länge $l = 300 \mu\text{m}$ mit einer vertikalen Barriere lässt sich so bei einer Gesamtspannung von $U_g = 10 \text{ V}$ ein Spannungsabfall von ca. $U = 0,8 \text{ V}$ abschätzen. Mit diesem Wert kann mit Hilfe einer Comsol-Simulation (Version 3.5) (siehe Abbildung 35) das elektrische Feld in einem $6 \mu\text{m}$ hohen Kanal an einer Barriere mit 520 nm Spalthöhe simuliert werden. Der Einfachheit halber wird hier lediglich die Seitenansicht auf die vergrößert dargestellte Barriere gezeigt.

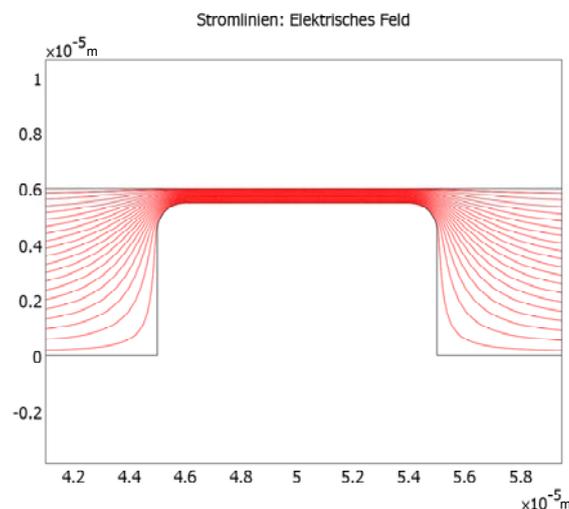


Abbildung 35: durch eine Barriere deformierte Feldlinien in einem Mikrofluidikkanal

Man erkennt sowohl Regionen niedrigerer Stromliniendichte an den unteren, als auch Regionen höherer Dichte an den oberen Enden der Barriere. Eine hohe Stromliniendichte bedeutet dabei eine hohe Feldstärke und umgekehrt. Mit Hilfe des Ersatzschaltbildes lässt sich das elektrische Feld im Spalt mit 21,5 kV/m abschätzen, während es im 6 μm hohen Bereich ca. 1,9 kV/m beträgt.

Ebenfalls mit Hilfe von Comsol kann nun der Gradient des quadrierten elektrischen Feldes simuliert werden (siehe Abbildung 36), der für die Berechnung der dielektrophoretischen Kraft benötigt wird (siehe Gleichung (2.24)).

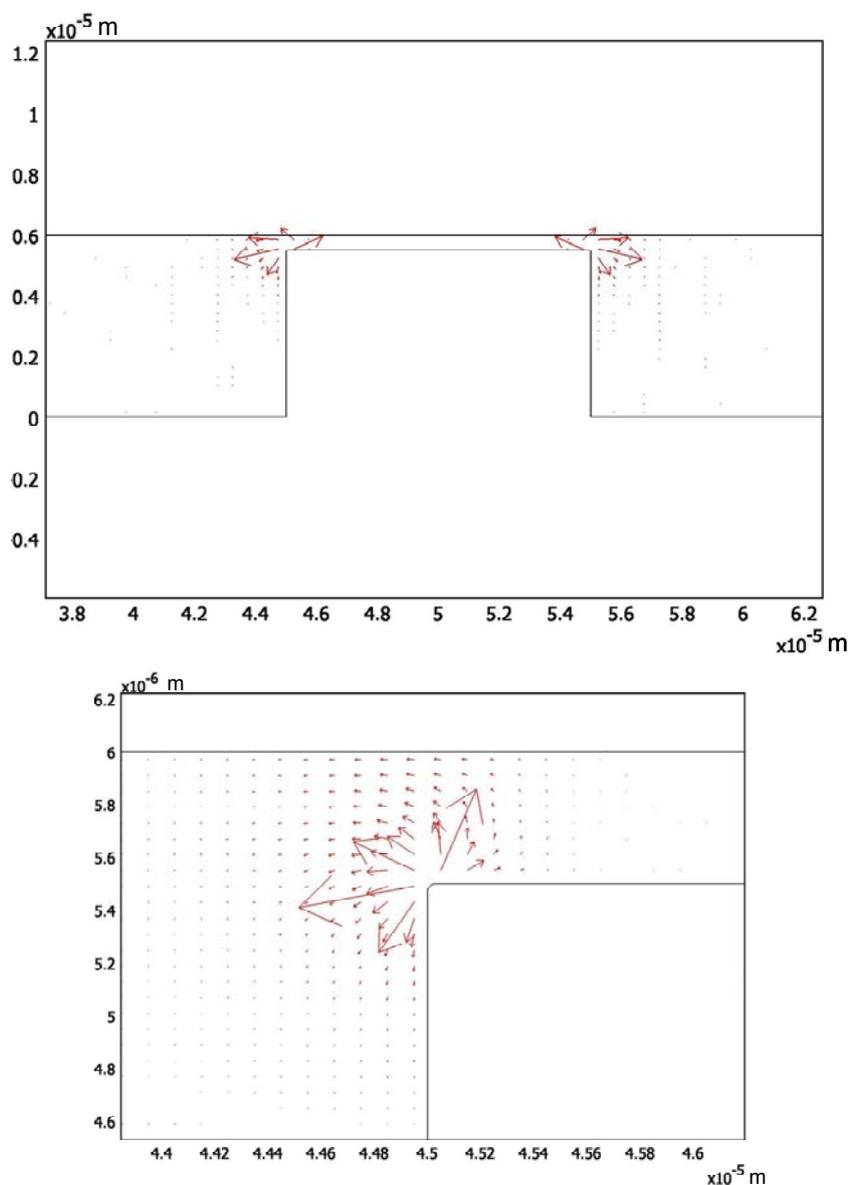


Abbildung 36: Simulation des negativen Gradienten des quadrierten elektrischen Feldes am Spalt (oben) und einer vergrößerten Darstellung des Bereiches mit dem größten Gradientenfeld (unten)

Man erkennt deutlich, dass lediglich an den oberen Barrierenecken ein nennenswerter Gradient auftritt, welcher bewirkt, dass bei positiver DEP die Partikel zur Kante hin gezogen und bei negativer (wie bei dem negativen Gradienten in Abbildung 36 dargestellt) von der Kante abgestoßen werden (siehe 2.2.2.4).

Wird der Verlauf des elektrischen Feldes entlang der Barriere simuliert und senkrecht von oben betrachtet, erhält man folgendes Bild:

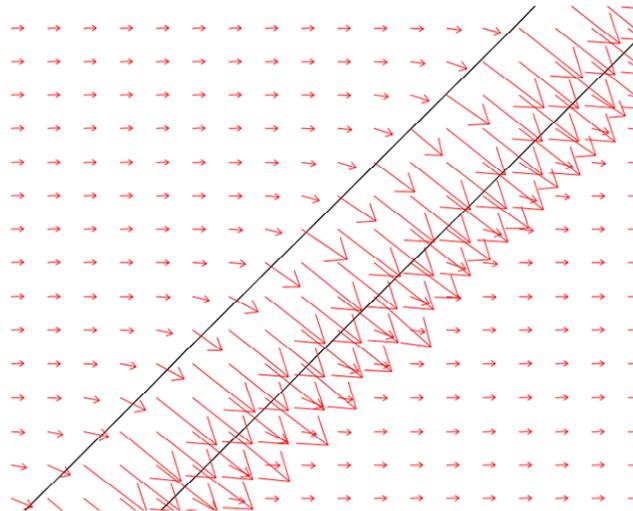


Abbildung 37: Verlauf der elektrischen Feldlinien im Bereich des Spaltes in Aufsicht

Man erkennt eindeutig, dass die Feldlinien kurz vor dem Spalt nicht orthogonal zum Barrierenverlauf sind, somit existiert eine Feldkomponente parallel zum Spalt. Somit kann eine elektrophoretische Ablenkung parallel zur Barriere erfolgen (siehe Abbildung 38).

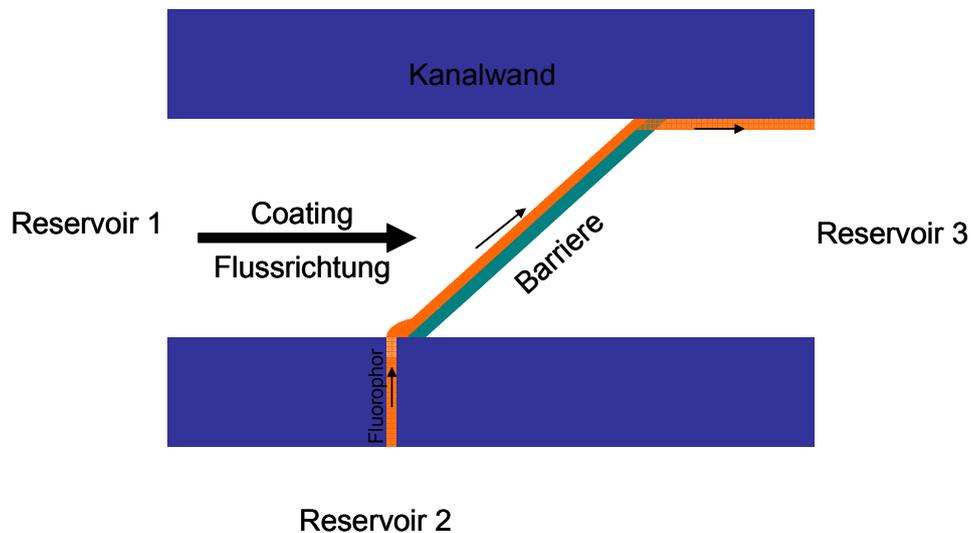


Abbildung 38: Ablenkung parallel zur Barriere bei Anlegen eines äußeren elektrischen Feldes

4.3 Kontinuierliche Trennung von 24 und 36 nm Partikeln

Zunächst werden für die Experimente Nanopartikel verwendet, welche ungefähr im Größenbereich der Proteine (siehe 2.1) liegen, aber einfacher zu beschreiben und zu charakterisieren sind (siehe 2.2.2.4). Es werden zwei verschiedene Größen (24 und 36 nm Durchmesser) verwendet.

4.3.1 Partikeleigenschaften

Die Durchmesser der Polystyrenpartikel werden mit 24 und 36 nm von Invitrogen angegeben. Dies wird mit AFM-Aufnahmen überprüft (siehe 3.5).

24 nm Partikel

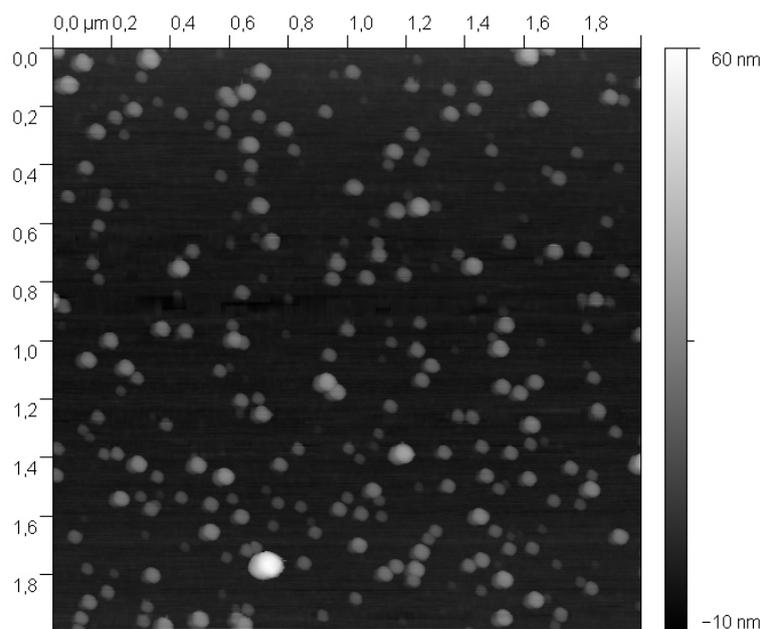


Abbildung 39: AFM-Aufnahme der 24 nm Partikel

Man erkennt in Abbildung 39 mit bloßem Auge sofort eine sehr unterschiedliche Größenverteilung. Die Auswertung der maximalen Höhen mit der Software Gwyddion (Version 2.15) in einem Histogramm bestätigt den optischen Eindruck einer nicht monodispersen Verteilung (siehe Abbildung 40). Der obere Schwellwert für die automatische Partikelhöhenenerkennung in Gwyddion beträgt 56,94 nm und der untere 3,42 nm.

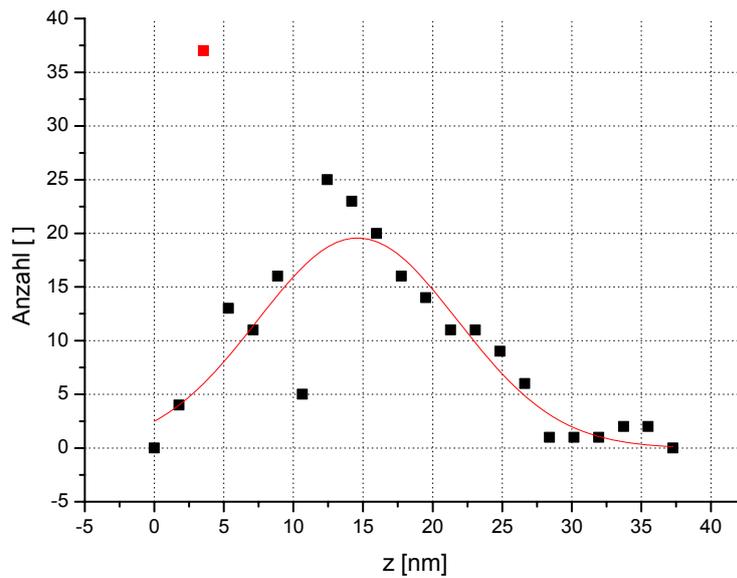


Abbildung 40: Größenverteilung der 24 nm Partikel

Die 24 nm Partikel haben eine sehr breite und inhomogene Größenverteilung die wahrscheinlich bimodal ist, mit einem Maximum bei 4 nm und einem bei 12 nm. Ein bimodaler Fit mit dem Extremalwert bei 4 nm erwies sich als nicht konvergent. Um dennoch eine statistische Erfassung zu ermöglichen, werden die Datenpunkte ohne den 4 nm-Wert mit einer Gaußfunktion angeffitet. Das Maximum dieser Gaußfunktion liegt bei 14,6 nm und hat eine Standardabweichung von $\sigma = 7,2 \text{ nm}$. Die volle Breite auf der Höhe des halben Maximums (FWHM) beträgt 17,0 nm. Zusammen mit einem Korrelationskoeffizienten von $R^2 = 0,78$ wird klar, dass dieser Fit nur eine schlechte Näherung ist.

Die Verteilung ist also sehr breit ($14,6 \pm 7,2 \text{ nm}$), was den optischen Eindruck bestätigt.

36 nm Partikel

Die 36 nm Partikel zeigen bei der Präparation für die AFM-Abbildung (siehe 3.5) eine starke Neigung zur Aggregatbildung (siehe Abbildung 41), was auch durch eine Behandlung der Probenlösung zuvor in einem Ultraschallbad nicht verhindert werden konnte.

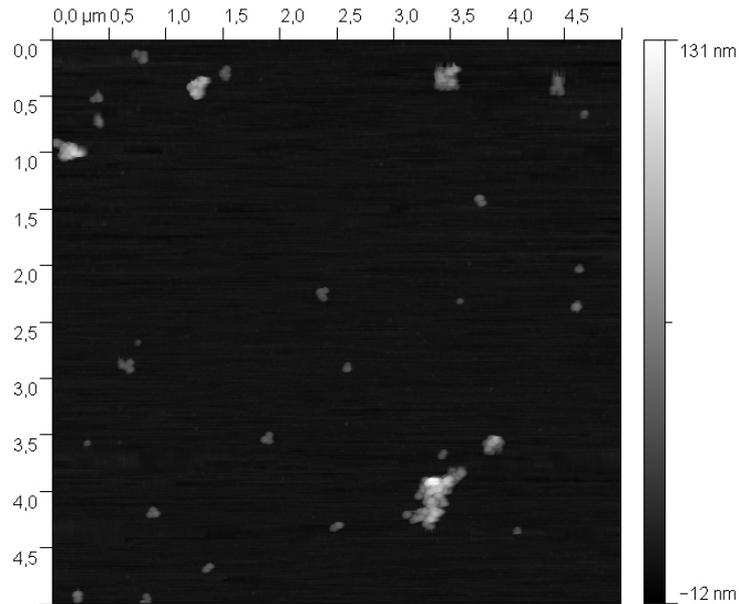


Abbildung 41: AFM-Aufnahme der 36 nm Partikel

Deshalb kann kein Histogramm der Höhenverteilung angegeben werden. Stattdessen werden aus fünf verschiedenen Aufnahmen (siehe 6.2) die maximalen Höhen von 30 einzeln liegenden Partikel per Hand ermittelt (siehe Tabelle 7) und anschließend in ein Histogramm mit der Intervallbreite 4 nm eingetragen (siehe Abbildung 42).

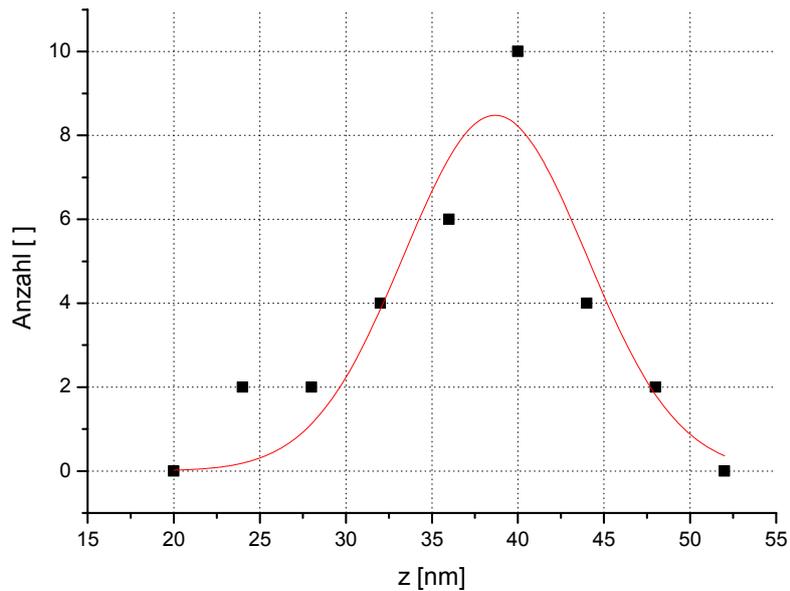


Abbildung 42: Größenverteilung der 36 nm Partikel

Trotz der geringeren Anzahl an Datenpunkten ist im Gegensatz zu den 24 nm Partikeln eine deutlich engere Größenverteilung mit einem deutlichen Peak bei 40 nm erkennbar. Der Gaußfit ergibt hier ein Maximum bei 38,7 nm mit einer Standardabweichung von $\sigma = 5,31 \text{ nm}$ und einer Breite von 12,5 nm auf der Höhe des halben Maximums.

Um zu untersuchen, ob die 36 nm Partikel bei 1000fach stärkerer Verdünnung bei den Trennexperimenten in den Mikrofluidikkanälen zu einer ähnlich starken Aggregatbildung neigen, werden später Fluoreszenzaufnahmen ausgewertet (siehe 4.3.2).

Um die Nanopartikel in einem Gemisch voneinander unterscheiden zu können, werden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe und -filter verwendet. Die entsprechenden Transmissionsspektren können den Herstellerangaben entnommen werden.

Die beiden Polystyrenpartikelsorten sind jeweils nur in einem Filter gut sichtbar, die 24 nm Partikel im roten Filtersatz und die 36 nm Partikel im grünen.

4.3.2 Manipulation von Nanopartikeln

Zuerst werden die beiden Partikelsorten einzeln auf ihr Verhalten in dem Mikrofluidikkanal getestet. Dazu werden die Reservoirs entsprechend befüllt (siehe 3.4) und anschließend hydrodynamisch angetrieben.

Um die zu erwartende Ablenkung der Partikel an der Barriere (siehe Abbildung 38) optimal beobachten zu können, ist eine möglichst schmalbandige Injektion an der unteren Kanalwand vor der Barriere von Vorteil, um später eine gute räumliche Auftrennung ermöglichen zu können. Das Injektionsverhalten beider Partikelsorten ist dabei in Abbildung 43 zu erkennen.

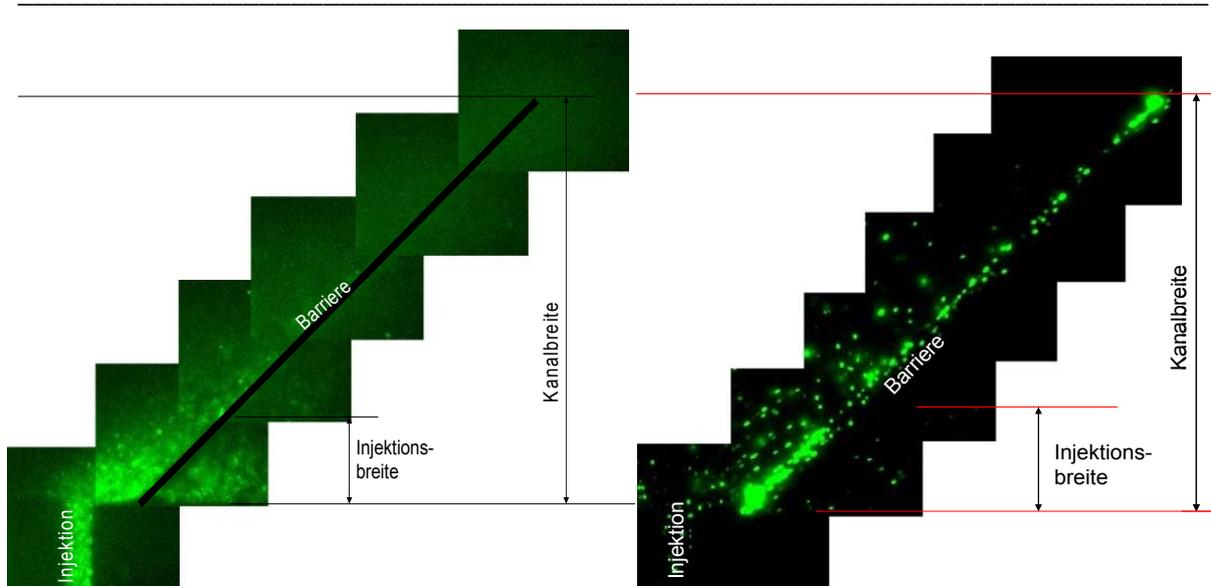


Abbildung 43: Injektionsverhalten der 24 nm (links) und der 36 nm Partikel (rechts)
 (links: 0,15 mbar an Reservoir 1 und 0,23 mbar an Reservoir 2;
 rechts: 0,26 mbar an Reservoir 1 und 0,45 mbar an Reservoir 2)

In Abbildung 43 (links) erkennt man rechts des Spaltes einen schmalen Streifen der 24 nm Partikel an der unteren Kanalwand. Die 36 nm Partikel neigen zu einer starken Adhäsion an den Kanalwänden, weshalb bereits Fluoreszenzsignal auf der gesamten Kanalbreite zu erkennen ist. Beim hydrodynamischen Befüllen des Kanals verteilen sich die 36 nm Partikel anfangs über die gesamte Kanalbreite, ehe der Fluss entsprechend justiert werden kann. Deshalb sind die 36 nm Partikel hinter der Barriere nicht so deutlich zu erkennen wie die 24 nm Partikel.

Das Ziel einer schmalbandigen Injektion der Partikel in den Hauptkanal ist, wie in Abbildung 43 zu erkennen, erreicht. Die Partikel können auf weniger als einem Viertel der Kanalbreite ($< 50 \mu\text{m}$) dem Spalt zu- bzw. vom Spalt abgeführt werden.

Als Indiz, ob die Partikel im Kanal aggregiert sind, insbesondere die 36 nm Partikel, kann die Fluoreszenzintensität einzelner Leuchtpunkte in derselben Fokusebene dienen. Da diese alle annähernd gleich hell sind (siehe Abbildung 43 (rechts)), kann man von einem nicht aggregierten Zustand der Partikel ausgehen. Im Falle einer Partikelaggregation wären deutliche Intensitätsunterschiede zu erwarten.

Obwohl die 36 nm Partikel bei der AFM-Aufnahme (siehe Abbildung 41) stark aggregiert vorliegen, kann somit eine Aggregation bei mindestens 1000fach stärkerer Verdünnung (siehe Abbildung 43) in den Mikrofluidikversuchen weitestgehend ausgeschlossen werden.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Partikel einzeln und schmalbandig in den Hauptkanal injiziert werden können, wird ein Potential an Reservoir 3, welches eine Gleichspannung hervorruft, und gleichzeitig ein Druck von 0,15 mbar an Reservoir 1 und 0,24 mbar an Reservoir 2 (siehe Abbildung 27) angelegt. Die Auswirkung auf die 24 nm Partikel am Spalt (siehe Abbildung 23) sind in Abbildung 44 zu erkennen.

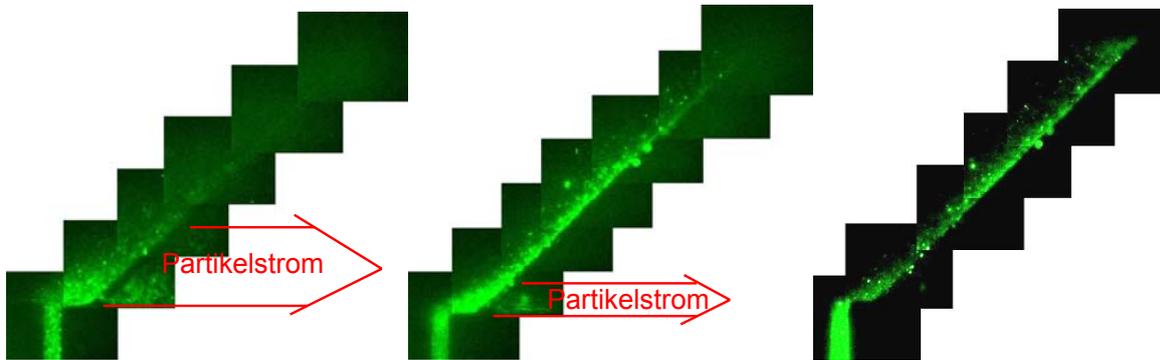


Abbildung 44: Ablenkung der 24 nm Partikel bei 5 V (links), 20 V (mitte) und 40 V (rechts) angelegter Gleichspannung an Reservoir 3 (siehe Abbildung 27), an Reservoir 1 liegen 0,15 mbar an und 0,23 mbar an Reservoir 2

Man erkennt, dass die Partikel bei einer Gleichspannung von 5V den Spalt an der unteren Kanalwand passieren können, während nur wenige parallel zur Barriere abgelenkt werden. Dieser Unterschied ist dabei auf die stark schwankende Größenverteilung zurückzuführen (siehe Abbildung 40). Aufgrund der größenabhängigen dielektrophoretischen Kraft (siehe Gleichung (2.26)) ist anzunehmen, dass die kleineren 24 nm Partikel den Spalt unbeeinflusst passieren können, während die verhältnismäßig wenigen größeren bereits an der Barriere abgelenkt werden. Wird die Gleichspannung erhöht, werden die Partikel zunehmend vor der Barriere aufkonzentriert, dies lässt auf negative DEP schließen. Während dieses Aufkonzentrierens bewirkt die zur Barriere tangentielle Komponente des elektrischen Feldes (siehe Abbildung 37) die Ablenkung parallel zu dieser (siehe Abbildung 38). Bei höheren Spannungen werden zunehmend immer kleinere der 24 nm Partikel zusätzlich mit abgelenkt und die helle Bande parallel zum unteren Kanalrand wird entsprechend kleiner (siehe Abbildung 44). Schließlich erkennt man bei 40 V Gleichspannung die Ablenkung aller Partikel entlang der Barriere. Das zugehörige Potentialbild ist in Abbildung 46 skizziert.

Werden die Partikel ohne hydrodynamischen Antrieb vor der Barriere abgelenkt, kann es vereinzelt passieren, dass sie direkt hinter der Barriere wieder in die entgegen gesetzte Richtung zurück abgelenkt werden (siehe Abbildung 45).

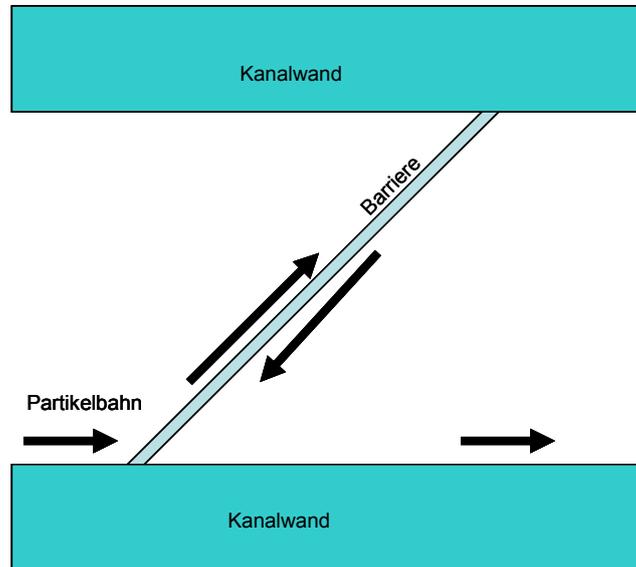


Abbildung 45: Veranschaulichung des Zurücklaufens des Analyten hinter der Barriere

Dieser Effekt konnte mittels einer Abstimmung des Druckes und des elektrischen Feldes minimiert werden.

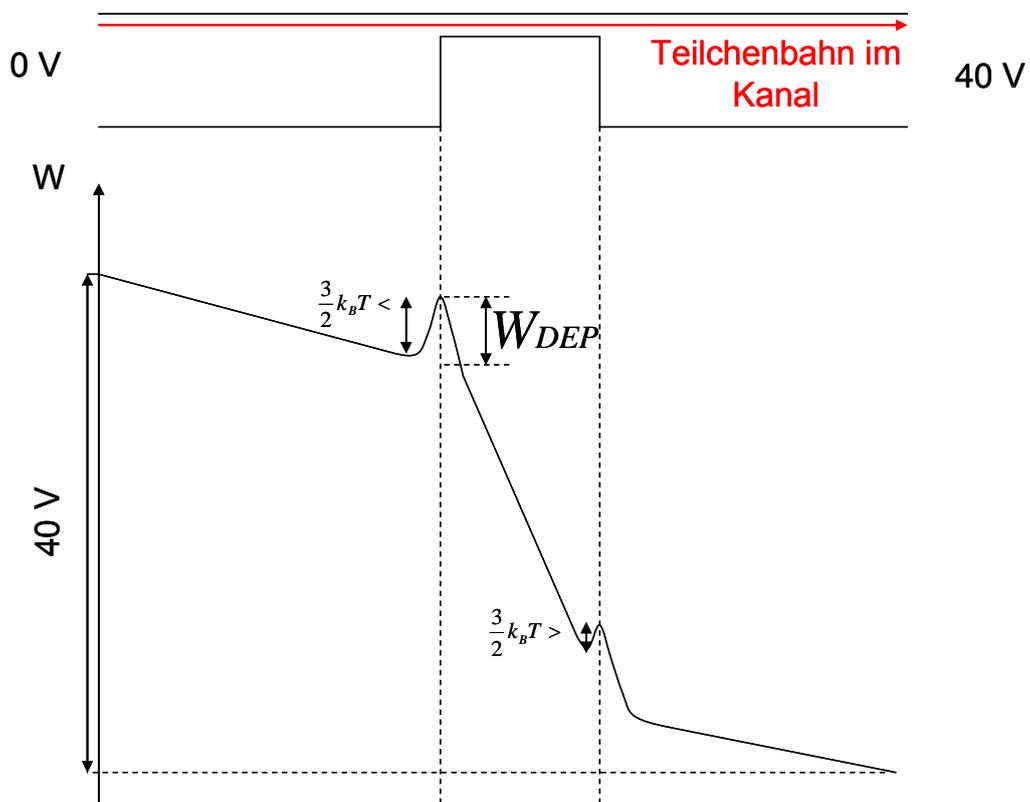


Abbildung 46: Potentialverlauf entlang der Teilchenbahn bei negativer DEP

An der linken Potentialbarriere werden die Partikel durch negative DEP aufgehalten (siehe 2.2.2.4). Solange sie diese nicht passieren können (siehe 2.2.3.2), werden sie parallel zur Barriere abgelenkt (siehe Abbildung 38). Je höher die Gleichspannung, desto höher ist die Potentialbarriere für die Partikel (siehe 2.2.2.4) und je länger verbleiben die Partikel in der Potentialmulde (siehe 2.2.3.2). Dadurch bleibt mehr Zeit für eine zur Barriere parallele Ablenkung. Aufgrund einer ca. 12mal höheren elektrischen Feldstärke im Spaltbereich (siehe 4.2) besitzen die Partikel eine entsprechend höhere potentielle Energie (siehe Gleichung (2.23)) als vor der ersten Potentialbarriere. Entsprechend der Kramers Rate (siehe 2.2.3.2) kann das Entkommen aus der linken Potentialmulde als statistischer Prozess beschrieben werden, während die rechte Potentialmulde nicht tief genug ist und die thermische Energie ein erneutes Aufstauen verhindert.

Für die 36 nm Partikel ist ein ähnliches Verhalten zu beobachten.

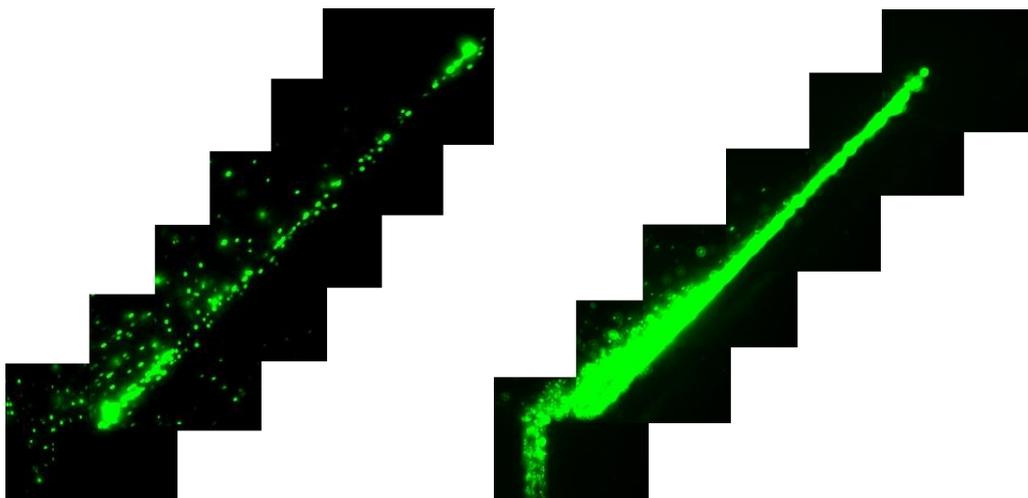


Abbildung 47: Vergleich der 36 nm Partikel bei 0 V (links) und 30 V (rechts) angelegter Gleichspannung an Reservoir 3, 0,26 mbar an Reservoir 1 und 0,45 mbar an Reservoir 2

Vernachlässigt man die an der Kanaloberfläche haftenden Partikel, so erkennt man bei 30 V Gleichspannung in Abbildung 47 (rechts), dass die Partikel im Vergleich zu 0 V (links) deutlich vor der Barriere aufkonzentriert und abgelenkt werden. Somit zeigen die 36 nm Partikel ebenfalls negative DEP (siehe 2.2.2.4). Auch die 36 nm Partikel werden mit steigender Gleichspannung stärker abgelenkt.

Mit Hilfe der Gleichung (2.26) lässt sich die maximal abstoßende dielektrophoretische Kraft auf ein polarisierbares Polystyrenkugelchen ($\epsilon_p \approx 2,5$) mit 36 nm Durchmesser

in Wasser ($\varepsilon_m \approx 80,0$) an der oberen Barrierenkante (siehe Abbildung 36) bei einem maximalen Gradienten des quadrierten elektrischen Feldes (aus Comsol-Simulation) von $\left| \vec{\nabla} E^2 \right| = 2,321 \cdot 10^{15} \text{ V}^2 / \text{m}^3$ mit $F_{DEP} = 40aN = 4,0 \cdot 10^{-17} \text{ N}$ abschätzen. Übliche dielektrophoretische Kräfte liegen aber im Größenbereich von einigen Femtonewton (10^{-15} N) [42]. Die hier zu erwartende maximale dielektrophoretische Kraft ist also um einen Faktor 100 kleiner als üblich (für kleinere Kügelchen und weiter von der oberen Ecke entfernte entsprechend Gleichung (2.26) noch kleiner), weshalb keine merkliche dielektrophoretische Auswirkung auf die Polystyrenpartikel zu beobachten sein dürfte. DEP durch den Gradienten der quadrierten elektrischen Feldstärke (siehe 2.2.2.4) alleine kann die Ablenkung an der Barriere (siehe Abbildung 38) somit nicht erklären.

Dies wird durch eine Abschätzung der Potentialhöhen am Spalt in Abbildung 46 weiter verdeutlicht. Sämtliche Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und die angelegten Spannungen führten zu keiner signifikanten Temperaturerhöhung im Kanalsystem [66]. Die thermische Energie der Partikel muss also bei einer minimalen Temperatur von 20° C mit mindestens $3/2 \cdot k_B T = 6,07 \cdot 10^{-21} \text{ J}$ (siehe Gleichung (2.28)) abgeschätzt werden.

Die dielektrophoretische Potentialhöhe kann bei elektrischen Feldstärken von bis zu 650 V/cm (siehe Abbildung 47) und Partikeln mit 36 nm Durchmesser mit maximal $W_{DEP} = 1,05 \cdot 10^{-22} \text{ J}$ (siehe Gleichung (2.23)) angenommen werden. Dies gilt jedoch nur für die größten Kügelchen bei den höchsten verwendeten Feldstärken und der geringsten anzunehmenden Raumtemperatur. Deshalb ist zu vermuten, dass die thermische Energie mindestens um einen Faktor 60 höher als die Potentialbarriere ist. Das deckt sich sehr gut mit der theoretischen Betrachtung der auftretenden Kräfte am Spalt. Somit dürfte keine DEP im Experiment zu beobachten sein, da die Potentialbarrierenhöhe zu gering ist.

Da dies trotzdem auftritt, müssen weitere Effekte als bisher angenommen für die Aufkonzentration der Partikel verantwortlich sein.

4.3.2.1 Konzentrationspolarisation

Da dem verwendeten Coating aus MilliQ-Wasser, DDM und MC (siehe 3.3) keinerlei Ionen zugesetzt wurden, ist von einer sehr geringen Ionenkonzentration bei den Experimenten auszugehen. Dies führt zu einer größeren Debyelänge (siehe Gleichung (2.10)) an der negativ geladenen PDMS-Oberfläche (siehe 2.2.2.2), was wiederum zu Überlappungseffekten im Spalt führen kann.

Die Debyelänge wurde mittels einer Widerstandsmessung des DDM-MC-Coatings (siehe 3.3) abgeschätzt (siehe 2.2.2.2). Der Widerstand wurde bei Raumtemperatur mit $R_{el} = 54 \text{ k}\Omega / \text{cm}$ gemessen. Bei den Ionen im Coating muss es sich größtenteils um die Produkte der Eigendissoziation des Wassers handeln ($H_2O \leftrightarrow H^+ + OH^-$) (siehe 2.3). Verunreinigungen oder Pufferionen der Nanopartikel liegen durch die extremen Verdünnungen (5% Feststoffanteil wurde 1:25.000 verdünnt) sämtlicher Lösungen nur noch in unbedeutender Konzentration vor. Mit dieser Annahme lässt sich die Konzentration M der Ionen nach Gleichung (2.12) mit den Mobilitäten der Ionen von $\mu_{H^+} = 33,0 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 / \text{Vs}$ und $\mu_{OH^-} = 18,2 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 / \text{Vs}$ bei $T = 18,2^\circ \text{ C}$ [24] auf $M = 3,75 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l} = 375 \text{ nM}$ abschätzen. Die Konzentration von Wasser beträgt $55,5 \text{ mol/l}$. In reinem Wasser ergibt sich mit Gleichung (2.37) ein Ionenprodukt von $k_{W_{H_2O}} = 10^{-14} \text{ mol}^2 / \text{l}^2$. Für das Coating beträgt, analog zu dieser Gleichung, das Ionenprodukt im Gleichgewicht $k_{W_{Coating}} = 1,40625 \cdot 10^{-13} \text{ mol}^2 / \text{l}^2$. Die Abweichung zum Ionenprodukt des reinen Wassers kann dabei durch den Zusatz von DDM und MC erklärt werden, wodurch sich die Wasserkonzentration geringfügig verringert. Die Debyelänge kann anschließend mit Gleichung (2.10) auf $\lambda_D = 496 \text{ nm}$ abgeschätzt werden.

Das entspricht in etwa der Spalthöhe, weshalb eine Überlagerung der Debyeschichten berücksichtigt werden muss. Weiterhin sind die Gleichungen (2.9) und (2.10) bei einer Überlagerung der Debyeschichten nicht mehr gültig (siehe 2.2.2.2) und der Potentialverlauf zwischen den beiden geladenen Oberflächen muss mit dem Kosinus Hyperbolicus abgeschätzt werden (siehe Abbildung 8)[31].

Laut Abbildung 8 erzeugt ein Elektrolyt, dessen Ionenkonzentration an einem Potential einer geladenen Oberfläche eine Debyeschicht von 500 nm hervorrufen würde (siehe Gleichung (2.10)), in einem Kanal der selben Höhe mit zwei gleichen

Wandpotentialen den Wert $\lambda^* = 2$. Unter der Annahme eines ζ -Potentialen von $\zeta = -100 \text{ mV}$ [67] kann so das Potential an jeder Stelle im 500 nm hohen Kanal bestimmt werden:

$$\phi_{500 \text{ nm}} = \zeta \cdot \cosh(x) / \cosh(250 \text{ nm}). \quad (4.2)$$

Ebenso ermöglicht diese Näherung eine Berechnung des Potentials in einem 6 μm hohen Kanal:

$$\phi_{6 \mu\text{m}} = \zeta \cdot \cosh(x) / \cosh(3000 \text{ nm}). \quad (4.3)$$

Zum Vergleich sind beide Verläufe in Abbildung 48 dargestellt.

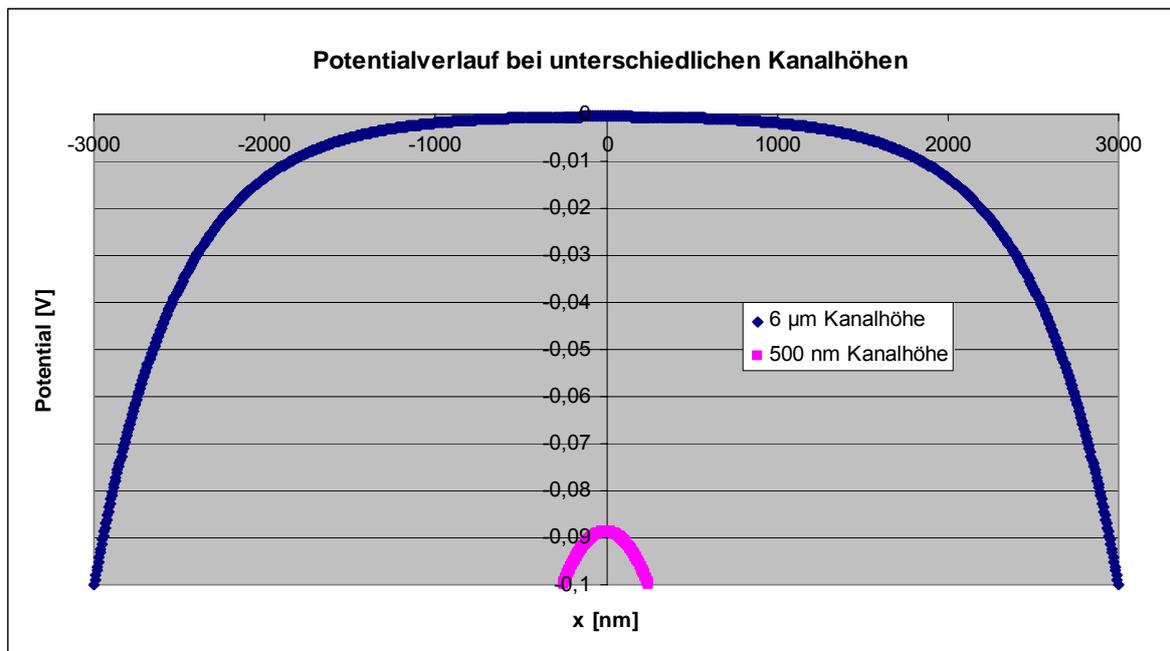


Abbildung 48: Potentialverläufe bei unterschiedlichen Kanalhöhen

Man erkennt in Abbildung 48, dass bei einem Übergang von einem 500 nm hohen Kanal zu einem 6 μm hohen (siehe Abbildung 23) eine starke Potentialänderung stattfindet. Diese erzeugt wiederum ein inhomogenes elektrisches Feld an dem Übergang, welches sowohl eine elektrostatische Auswirkung (siehe 2.2.2.3) auf geladene und/oder eine dielektrophoretische Kraft auf polarisierbare Partikel (siehe 2.2.2.4) haben könnte. Da die negativ geladenen Polystyrenpartikel bei rein hydrodynamischem Antrieb den Spalt ohne eine merkliche Ablenkung passieren können (siehe Abbildung 43), wirkt sich das durch dieses inhomogene elektrische

Potential verursachte elektrische Feld weder elektrostatisch noch dielektrophoretisch merklich auf die Partikelbewegung aus.

Mit Hilfe der Potentialkurven für beide Kanalhöhen und Gleichung (2.14) können die Konzentrationsverläufe beider Ionensorten zwischen den geladenen Oberflächen bei Raumtemperatur berechnet werden (siehe Abbildung 49).

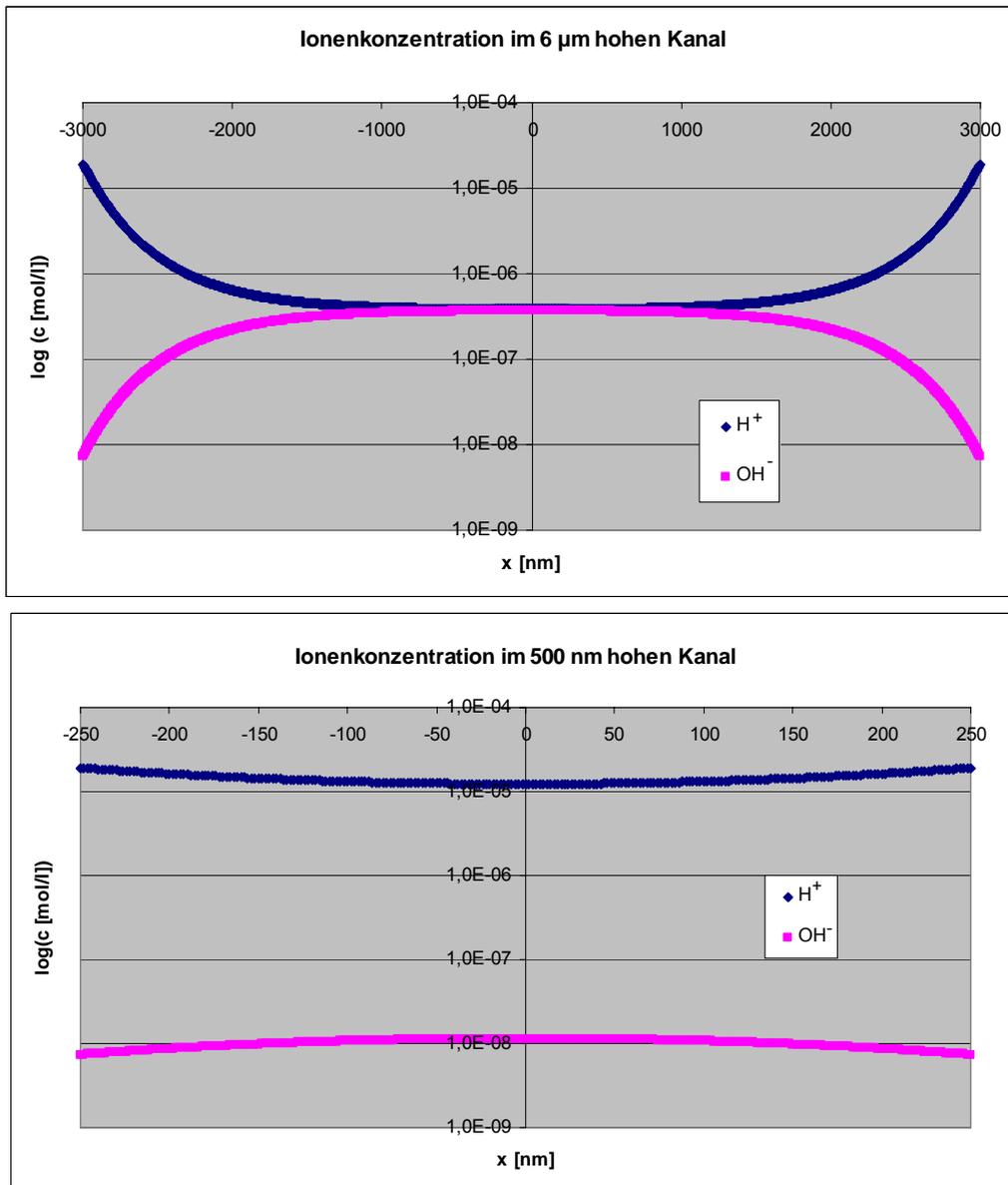


Abbildung 49: Ionenkonzentrationen in Abhängigkeit von Kanalhöhe und Position im Kanal

Man erkennt in Abbildung 49 bei beiden Kanalhöhen einen Überschuss der Gegenionen. Dieser ist jedoch in den 500 nm hohen Kanälen deutlich ausgeprägter. Da die Potentialverläufe (siehe Abbildung 48) und die daraus resultierenden Ionenkonzentrationen (siehe Abbildung 49) jedoch nur im thermischen Gleichgewicht gültig sind, sind nach Hinzuschalten des äußeren elektrischen Feldes

Abschätzungen für die Größe der Debyeschicht fern von diesem nötig. Rubinstein et al. haben in ihrer Veröffentlichung [68] einen Zusammenhang zwischen der Debyelänge und dem angelegten elektrischen Feld aufgestellt. Dieser besagt, dass die Debyelänge um einen Faktor proportional zu

$$\lambda_D \sqrt{\frac{|\vec{E}| \cdot F}{R_{(molar)gas} T}} \quad (4.4)$$

anwächst. Somit ergibt sich eine nichtgleichgewichts Debyelänge

$$\lambda_D^{neq} = \lambda_D \left(1 + a \cdot \sqrt{\frac{|\vec{E}| \cdot F}{R_{(molar)gas} T}} \right) \quad (4.5)$$

mit dem Proportionalitätsfaktor a . Dies würde einen weiteren Konzentrationsanstieg der Gegenionen bzw. –abfall der Koionen im Nanokanal bewirken und so die Konzentrationsunterschiede noch weiter verstärken. Die Asymmetrie der Ionenkonzentrationsverteilung (siehe Abbildung 49) im Gleichgewichtszustand genügt jedoch bereits, um die Auswirkung nach dem Anlegen eines elektrischen Feldes zu verstehen.

Berücksichtigt man beim Anlegen des äußeren elektrischen Feldes an beide Mikrokanalenden das 12mal stärkere elektrische Feld im 500 nm hohen Kanalabschnitt, lassen sich so die theoretischen Ionenströme I_{\pm} kurz nach hinzuschalten eines elektrischen Feldes wie folgt berechnen:

$$I_{\pm} = \mu_{ep} \cdot |\vec{E}| \cdot N_A \cdot 2 \cdot 10^{-4} m \int_{-h/2}^{h/2} c_{\pm}(x). \quad (4.6)$$

Daraus ergeben sich die in Tabelle 5 dargestellten Ströme für ein 200 μm breites Kanalsystem und einem von außen angelegten elektrischen Feld von 10 V/m bei der jeweiligen Höhe.

Tabelle 5: Ionenströme in einem 200 μm breiten Kanalsegment entsprechender Höhe

	Gegenionenstrom [μA]	Koionenstrom [μA]
6 μm Kanalhöhe	11,79	1,26
500 nm Kanalhöhe	275,63	0,11

Während der Gegenionenstrom im 500 nm hohen Kanal im Vergleich zum 6 μm hohen Kanal theoretisch mehr als 20mal höher ist, beträgt der Koionenstrom lediglich noch ein zehntel.

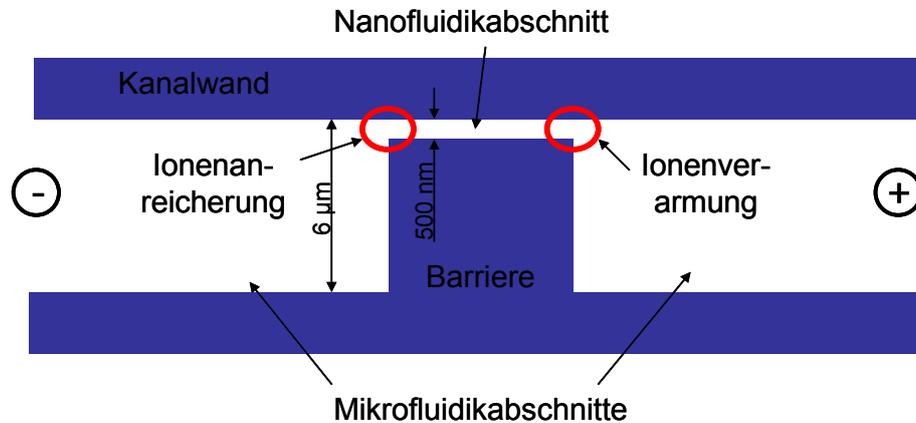


Abbildung 50: Skizze zum Ionenanreicherungseffekt

Durch den Überlapp der Debyeschichten werden auf der Anodenseite des Nanokanals mehr Gegenionen in diesem abgeführt als durch den Mikrofluidikkanal gleichzeitig zur Verfügung gestellt werden können. Es entsteht eine Gegenionenverarmung. Auf der Kathodenseite werden durch den Nanokanal entsprechend mehr Gegenionen zugeführt. Somit entsteht auf dieser Seite eine Gegenionenreicherung.

Ähnlich wirkt sich dies auf die Koionenkonzentration aus. Auf der Anodenseite des Nanokanals werden mehr Koionen durch den Mikrofluidikkanal abgeführt als durch den Nanokanal nachfließen. Genau wie bei den Gegenionen entsteht hier ein Verarmungsgebiet. Auf der Kathodenseite hingegen werden mehr Koionen durch den Mikrokanal zur Verfügung gestellt als durch den Nanokanal abfließen können. Die Koionen werden also wie die Gegenionen auf der Kathodenseite angereichert.

Während für beide Ionensorten auf der Anodenseite des Nanofluidikkanals eine unterschiedlich starke Verarmung stattfindet, wird deren Konzentration auf der Kathodenseite ebenso unterschiedlich gesteigert.

Dieser Effekt der Konzentrationsänderung an Ionen auf den beiden Seiten eines schmalen Kanals (deutlicher Überlapp der Debyeschichten) zwischen zwei größeren Kanälen (kein Überlapp der Debyeschichten) wird als Konzentrationspolarisation bezeichnet.

Verschiedene Gruppen haben diese bereits experimentell beobachtet und teilweise theoretisch erklärt. In der Veröffentlichung von Pu et al. [69] wird ein ähnliches

Verhalten geschildert. Hier wird lediglich im Allgemeinen von einer erhöhten Gegenionenkonzentration im Bereich der überlappenden Debyeschichten ausgegangen und anschließend gezeigt, dass dadurch, nach Anlegen eines elektrischen Feldes, auf der Anodenseite eine Ionenverarmung und auf der Kathodenseite eine Anreicherung entsteht. Ihre Rechnungen sind jedoch nur für den Gleichgewichtszustand gültig, da sie von konstanten Ionenkonzentrationen an den Enden des Nanokanals ausgehen. Da sich diese entsprechend ihrer eigenen Berechnung aber sofort nach Hinzuschalten des Feldes ändern, sind ihre Gleichungen nur eine grobe Näherung.

Die Dynamik solch eines Systems wurde ausführlicher von Kim et al. untersucht [70]. Dabei wurde der Stromfluss durch einen Nanokanal bei verschiedenen angelegten Spannungen gemessen und die Auswirkungen der Konzentrationsänderungen auf GFP (green fluorescent protein) beschrieben.

Beide Gruppen haben viel kleinere Nanokanäle für ihre Experimente benutzt (Pu 60 nm Höhe, Kim 40 nm Höhe). Sie haben aber entsprechend höhere Ionenkonzentrationen verwendet (Pu 200 $\mu\text{mol/l}$, Kim 1 mmol/l). Der Zusammenhang zwischen Kanalhöhe und der verwendeten Ionenkonzentration wird in Abbildung 51 verdeutlicht.

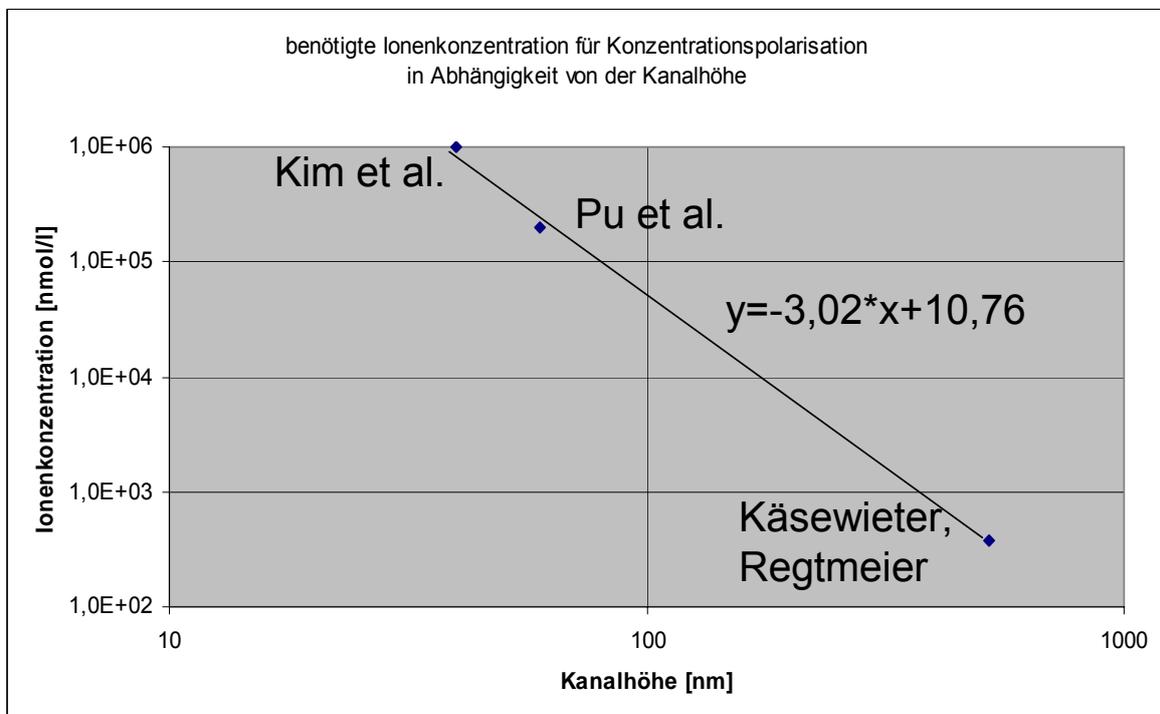


Abbildung 51: Ionenkonzentration der Gruppen in Abhängigkeit von der Kanalhöhe

Man erkennt den linearen Zusammenhang zwischen den logarithmischen Werten der Kanalhöhe und der verwendeten Ionenkonzentration der Gruppen, welcher durch den Korrelationskoeffizienten von $R^2 = 0,9978$ bestätigt wird.

Wird Wasser als Medium bei solchen Experimenten verwendet, ist die geringst mögliche Ionenkonzentration durch die Autoprotolyse des Wassers (siehe 2.3) vorgegeben. Somit stellen Kanalhöhen von $h \approx 500 \text{ nm}$ bei einem Oberflächenpotential von $\zeta = -0,1 \text{ V}$ das obere Limit als Kanalhöhe dar. Je kleiner die Kanäle werden, desto höher kann auch die verwendete Konzentration sein. Dabei sind dann Limitierungen durch das verwendete Kanalmaterial (ca. 5 bis 10 nm) entscheidend. Als kleinst mögliche Spalthöhe sind wiederum Größen im Bereich der Ionen (0,5 nm) denkbar. Bei 10 nm Spalthöhe ist somit eine maximale Ionenkonzentration von $M = 2,3 \mu\text{mol/l}$ möglich.

Kim et al. konnten bei den dynamischen Untersuchungen der Konzentrationspolarisation [70] drei unterschiedliche Bereiche des Stromverhaltens, bei steigender angelegter Spannung, feststellen. Bei niedrigeren Spannungen gibt es einen Ohm'schen Bereich, in dem der Strom linear mit der Spannung ansteigt. Darauf folgt ein limitierender Bereich, in dem der Stromfluss durch die überlappende Debyeschicht begrenzt wird und die Konzentrationspolarisation erstmals auftritt. Wird die Spannung weiter erhöht, beginnt die Ausdehnung des Verarmungsgebietes auf der Kathodenseite. Dieser Strombereich wird von Kim als „over-limiting“-Bereich bezeichnet.

Ein ähnliches Verhalten konnte auch bei den Versuchen mit den Nanopartikeln an dem 500 nm hohen Spalt beobachtet werden. Ab einer gewissen Feldstärke $|\vec{E}_{kr}|$ werden die Nanopartikel ebenfalls abgestoßen, im Gegensatz zu Kim und Pu aber in Richtung der Kathode. Zur Veranschaulichung wird der Abschnitt aus Abbildung 52, nach der Erhöhung der Gleichspannung in einem Schritt, gefilmt und Bildsequenzen der beiden Partikelsorten in einem zeitlichen Abstand von 1 s (siehe Abbildung 53 und Abbildung 54) dargestellt.

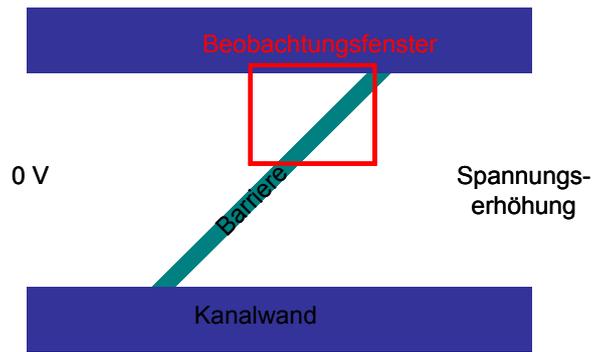


Abbildung 52: Filmausschnitt während der Spannungserhöhung

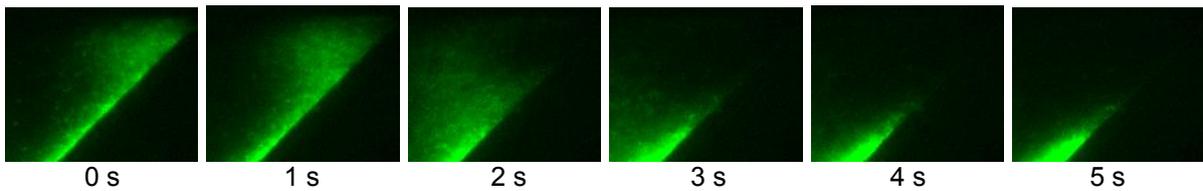


Abbildung 53: Verhalten der 24 nm Partikel am oberen Barrierenabschnitt nach Erhöhung der Gleichspannung von 50 auf 70 V, 0,15 mbar an Reservoir 1 und 0,23 mbar an Reservoir 2 (Bildsequenz von links nach rechts in Zeitschritten von 1 s)

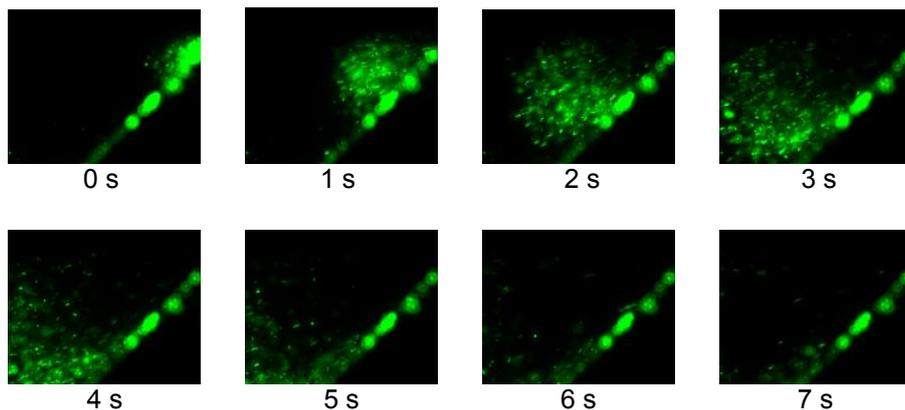


Abbildung 54: Verhalten der 36 nm Partikel am oberen Barrierenabschnitt nach Erhöhung der Gleichspannung von 30 auf 60 V, 0,26 mbar an Reservoir 1 und 0,45 mbar an Reservoir 2 (Bildsequenz von links oben nach rechts unten in Zeitschritten von 1 s)

Während zuvor bei einer Erhöhung der Gleichspannung der Partikelfluss in den Mikrofluidikabschnitten durch die Elektrophorese (siehe 2.2.2.3) zunahm, bewegen sich jetzt beide Partikelsorten ausgehend von der oberen Barrierenecke entgegen der ursprünglichen Elektrophoreserichtung von der Barriere weg. Je weiter der kritische Spannungsschwellwert überschritten wird, desto schneller erfolgt diese Bewegung.

Als mögliche Erklärung warum, in Gegensatz zu Kim [70], eine abstoßende Wirkung in Richtung der Kathoden zu beobachten ist, könnte sein, dass nicht nur eine Ausbreitung des Verarmungsgebietes auf der Anodenseite, sondern auch eine des Anreicherungsgebietes auf der Kathodenseite stattfindet. Diese Anreicherung (siehe

Abbildung 55) könnte wiederum für die Abstoßung der Nanopartikel verantwortlich sein.

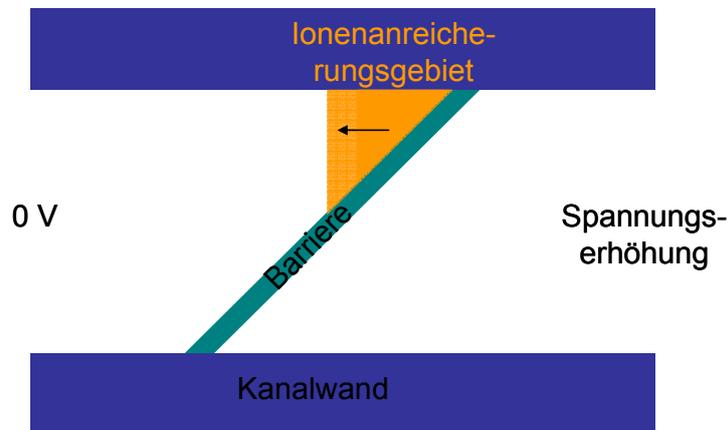


Abbildung 55: Skizze des anzunehmenden Wachstums des Ionenanreicherungsgebietes

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bei hydrodynamischen Antrieb mit zu vernachlässigenden elektrischen Feldstärken keine Beeinflussung der Nanopartikel zu erkennen ist (Ohm'scher Bereich). Anschließend gibt es einen elektrischen Feldstärkebereich, in dem mit zunehmender Feldstärke die Aufkonzentration vor der Barriere ebenfalls immer stärker wird (limitierender Bereich). Ab einem kritischen Feldstärkewert $|\vec{E}_{kr}|$ schlägt dann die Aufkonzentration in eine Abstoßung um („over-limiting“-Bereich) (siehe Abbildung 56).

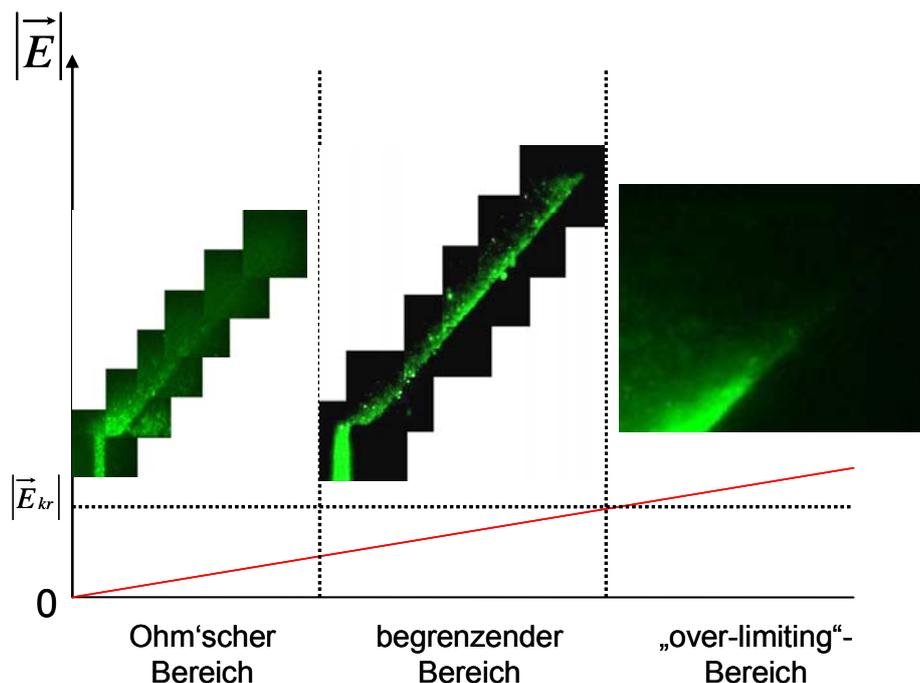


Abbildung 56: experimentelle Beobachtungen in Abhängigkeit von der anliegenden Feldstärke

Wie von Kim [70] beschrieben, handelt es sich bei der Konzentrationspolarisation um einen sich selbst verstärkenden Effekt. Ohne dämpfende Faktoren wäre somit kein stabiles System, wie in den Experimenten beobachtet, denkbar.

4.3.2.2 Dämpfende Effekte der Konzentrationspolarisation

Eine mögliche dämpfende Ursache könnte die Autoprotolyse des Wassers als Lösungsmittel sein. Im Bereich der Ionenverarmung werden durch Dissoziation von Wasser Ionen nachgebildet, da das Ionenprodukt (siehe Gleichung (2.37)) lokal zu klein ist. Wird das Ionenprodukt lokal im Bereich der Anreicherung überschritten, reagieren die Ionen wieder zu neutralem Wasser. In Abbildung 57 ist dies und der daraus resultierende mögliche Ionenstrom skizziert.

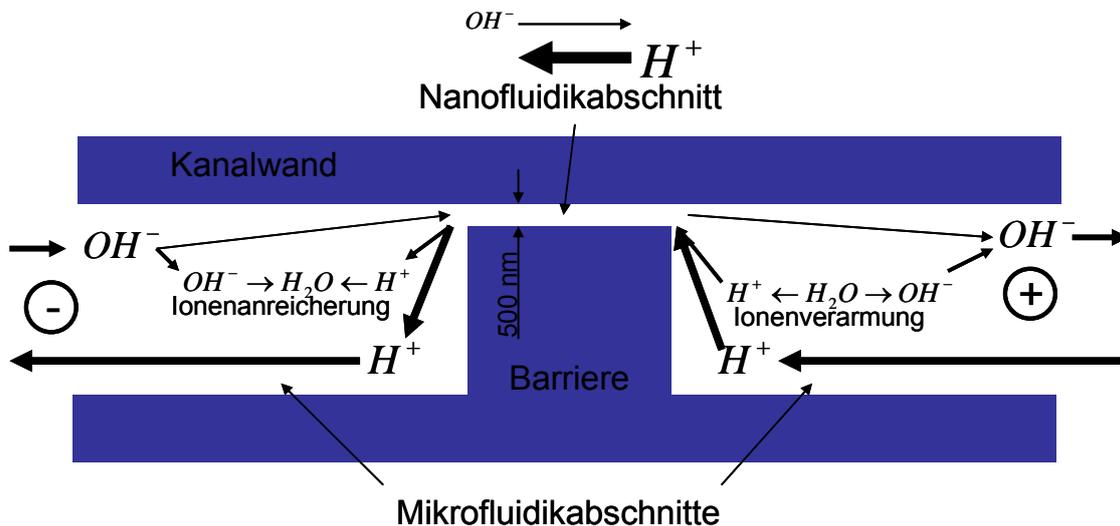


Abbildung 57: Nettoionenströme durch das Kanalsystem

Obwohl im Nanofluidikabschnitt weniger Ko- als Gegenionen transportiert werden, können durch das thermische Gleichgewicht des Ionenproduktes des Coatings (siehe 4.3.2.1) trotzdem effektiv alle Ladungen von Mikrofluidik- zu Mikrofluidikabschnitt transportiert werden. So können dem Bereich überlappender Debyeschichten mehr Ionen zur Verfügung gestellt werden, was deren Anwachsen und somit den positiven Rückkopplungseffekt abschwächt. Da die Autoprotolyse nicht beliebig schnell ablaufen kann, könnte ebenfalls der Übergang zwischen dem begrenzenden und dem „over-limiting“-Strombereich, erklärt werden. Sowie die elektrophoretische Geschwindigkeit der Hydronium- und Hydroxidionen zu groß wird, können diese nicht

mehr ausreichend nachgebildet/neutralisiert werden und fallen deshalb als dämpfender Faktor der Konzentrationspolarisation weg.

Da eine Aufkonzentration von Hydronium- und Hydroxidionen auf Grund elektrostatischer Wechselwirkungen schwer vorstellbar ist, werden dazu einige Abschätzungen gemacht. Im thermischen Gleichgewicht ist durchschnittlich pro Volumen $V_{\text{einzel}} \approx 2,214 \cdot 10^{-21} \text{ m}^3$ jeweils nur ein Ion vorhanden. In einem Würfel ergibt das eine Kantenlänge von ca. 130 nm . Mit diesem Abstand zwischen unterschiedlich geladenen Ionen ergeben sich nach Gleichung (2.7) elektrische Energien von $2 \cdot 1,223 \cdot 10^{-12} \text{ meV}$, während die thermische Energie nach Gleichung (2.28) bei einer Temperatur von 20° C Werte von ca. $37,9 \text{ meV}$ annimmt. Die thermische Energie ist somit um 13 Größenordnungen höher als die elektrostatische, weshalb elektrostatische Wechselwirkungen vernachlässigt werden können.

Durch die fehlenden Ionen aufgrund der geschwindigkeitsbegrenzten Autoprotolyse könnte ein Sprung in der positiven Rückkopplung erfolgen. Diese Theorie wird durch Rubinstein's Veröffentlichung [68] unterstützt. Der Anstieg der Stromstärke im „over-limiting“-Bereich könne nicht durch eine ansteigende Geschwindigkeit der Autoprotolyse erklärt werden.

Rubinstein führt in seiner Arbeit [68] weitere Gründe für eine Dämpfung an. Diese beruhen dabei auf der Annahme einer Durchmischung und einer damit verbundenen Verringerung der Debyeschicht, welche durch unterschiedliche Mechanismen hervorgerufen werden kann. Zu diesen zählt er u.a. die Elektrokonvektion [71] und „bulk electric forces“ [71].

Obwohl die Konzentrationspolarisation im Zusammenhang mit Kanälen mit und ohne überlappenden Debyeschichten bekannt ist, sind die Auswirkungen auf Nanopartikel (Aufkonzentration und Abstoßung) nicht eindeutig geklärt. Deshalb soll eine kurze Diskussion möglicher Ursachen erfolgen.

4.3.2.3 Auswirkungen der Konzentrationspolarisation auf Nanopartikel

Die Konzentrationspolarisation der Ionen bewirkt eine Veränderung der Abschirmlängen von elektrischen Potentialen (siehe 2.2.2.2) und verändert so die Potentiallandschaft ($\phi \sim \lambda_D \sim M$). Dadurch wird die Inhomogenität der elektrischen

Felder ($\vec{E} \sim \vec{\nabla}\phi$) in diesen Bereichen erhöht. Dies kann wiederum verschiedene Auswirkungen haben.

Zum einen kann eine rein elektrostatische Wechselwirkung an den Orten der veränderten Konzentrationen auftreten. Dadurch könnten wiederum Partikel aufkonzentriert und auch abgestoßen werden.

Als zweite mögliche Ursache der Partikelbeeinflussung ist die DEP, in diesem Versuch die negative DEP, denkbar. Durch die veränderten elektrischen Feldstärken durch den Übergang zwischen Nano- und Mikrofluidikkanal und die veränderten Konzentrationen könnte der Gradient des quadrierten elektrischen Feldes ausreichend ansteigen und das dielektrophoretische Potential könnte größer als die thermische Energie werden.

Weiterhin sind aufgrund der veränderten Ionenkonzentrationen auch Umladungseffekte der Partikelhülle möglich [72], was dann wiederum zu elektrostatischen und/oder dielektrophoretischen Wechselwirkungen führen könnte.

Auch der EOF könnte sich auf Grund veränderter Konzentrationen ändern. Da stets eine Überlagerung von EOF und EP vorliegt, ist durch Beobachtung der Nanopartikel nicht eindeutig zu klären, welcher der Effekte sich wie stark ändert.

Das Zusammenspiel zwischen Konzentrationspolarisation und wirkenden Kräften ist hoch komplex und nicht linear, was eine eindeutige Zuordnung der auftretenden Effekte erschwert.

4.3.3 Trennung von Nanopartikeln

Nach den Einzelerperimenten wird nun das Verhalten eines Gemisches aus beiden Partikelsorten im Mikrofluidikkanal untersucht. Drücke und Gleichspannung werden analog zu den Einzelversuchen angelegt. Die Ergebnisse bei unterschiedlichen Spannungen werden diesmal jedoch nicht als Aufnahme der (Ablenkungs-)Barriere (siehe Abbildung 58) aufgeführt, sondern anhand einer Auswertung der Intensitäten am Staukreuz. Dazu wird am Staukreuz, wie in Abbildung 58 zu sehen, mit beiden Filtersätzen (grün \rightarrow G und rot \rightarrow R) die Fluoreszenzintensität gemessen. Die beiden Stauräume sind durch eine Kanalwand von einander getrennt.

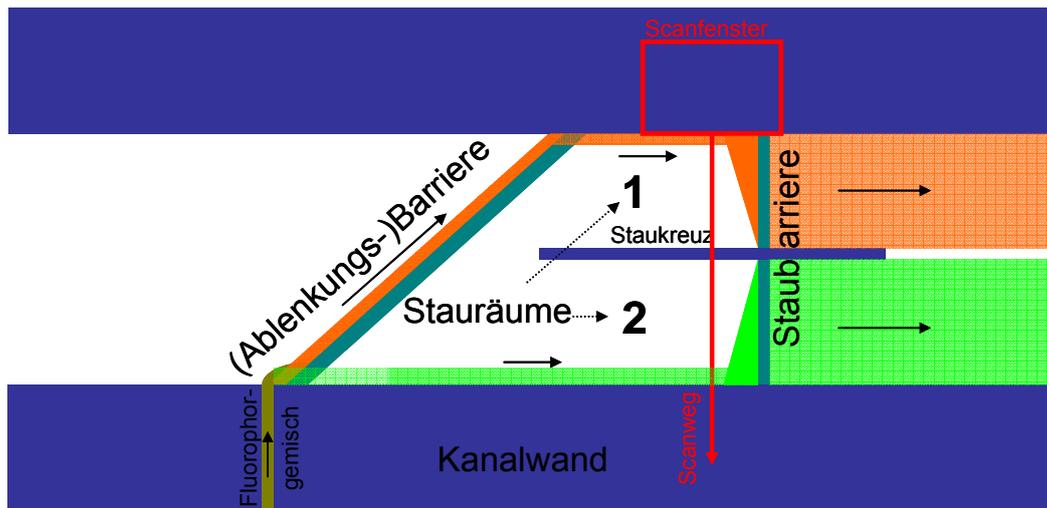


Abbildung 58: Skizze zur Veranschaulichung der Gemischtrennungsauswertung

Nach dem Aufstauen an der Staubbarriere können die Partikel diese in einem statistischen Prozess (siehe 2.2.3.2) überwinden. Die Intensitätsverläufe werden mit einem ImageJ-Makro (siehe 6.3) innerhalb eines schmalen Streifens im Scanfenster parallel zur Flussrichtung ausgewertet und in Abhängigkeit von der Position im Kanal und des verwendeten Filtersatzes dargestellt.

4.3.3.1 Trennungskriterium

Die Ablenkung der jeweiligen Partikelorte in den oberen (1) oder unteren (2) Stauraum (siehe Abbildung 58) wird als relativer Wert angegeben. Dazu wird das Verhältnis aus Gesamtintensität in einem Stauraum zur Gesamtintensität über beide Stauräume im jeweiligen Fluoreszenzfilter gebildet. g_1 steht dabei für die Gesamtintensität in Stauraum 1 im grünen Filter. Der Anteil in Stauraum 1 berechnet sich im grünen Filter wie folgt:

$$G_1 = \frac{g_1}{g_1 + g_2} \quad (4.7)$$

Ist ein Fluorophor lediglich in einem Stauraum, beträgt dieses Verhältnis 1 für diesen Stauraum und 0 für den anderen. Falls beide eine gleiche Ablenkung erfahren, sind diese Verhältnisse für beide Filtersätze im selben Stauraum gleich.

Als quantitatives Trennkriterium lässt sich daraus allgemein formulieren, je besser die Trennung, desto größer ist die Differenz der relativen Intensitäten im selben

Stauraum bei unterschiedlichen Filtersätzen. Somit ergibt sich als ein mögliches Maß für die Güte der Trennung das Trennungskriterium:

$$Tk = |G1 - R1| = |G2 - R2|. \quad (4.8)$$

Tk liegt somit zwischen 0 und 1. Je näher an 0, desto schlechter ist die Trennung und je näher an 1, desto besser.

4.3.3.2 Trennergebnis

Um das Trennergebnis darstellen zu können, werden erneut mehrere Einzelfotos zu einem Gesamtfoto zusammengefügt. Für beide Filtersätze sind diese Fotos in Abbildung 59 zu sehen.

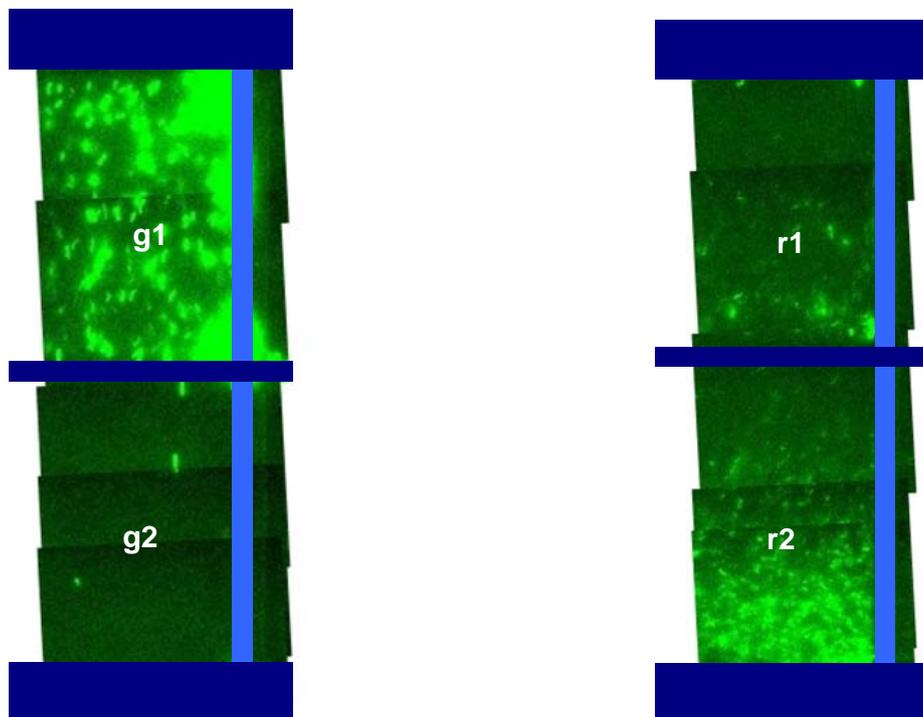


Abbildung 59: Fotomontagen des Scanweges bei gleichen Bedingungen der 36 (links) und 24 nm Partikel (rechts), bei 7 V Gleichspannung und angelegten Drücken von 0,08 mbar an Reservoir 1 und 0,15 mbar an Reservoir 2

Man erkennt, dass sich die 36 nm Partikel im grünen Filtersatz nahezu nur in Stauraum 1 befinden und dort vor der Staubbarriere des Staukreuzes aufgestaut werden. Nur vereinzelt erkennt man wenige in Stauraum 2. Die 24 nm Partikel befinden sich hingegen größtenteils in Stauraum 2, während einige in den oberen (1) abgelenkt werden. In beiden Stauräumen befinden sich die 24 nm Partikel eher im unteren Bereich des jeweiligen Stauraums. Im Zusammenhang mit dem Histogramm

dieser Partikel (siehe Abbildung 40) ist anzunehmen, dass die große Anzahl kleinerer Partikel unbeeinflusst die Barriere passieren und deshalb die hohe Intensität im unteren Bereich von Stauraum 2 erklären. Wenige größere Objekte dieser Partikelsorte werden aber abgelenkt, sodass sie Stauraum 1 im unteren Bereich erreichen können.

An der Staubarriere sind auch die 24 nm Partikel etwas aufkonzentriert, da für eine gute Trennung die Spannung so gewählt werden musste, dass alle Partikel sowohl an der (Ablenkungs-) als auch an der Staubarriere beeinflusst werden.

Die Intensitätsverläufe in Abhängigkeit von der Position im Kanal und dem verwendeten Filtersatz sind in den Diagrammen von Abbildung 60 basislinienkorrigiert dargestellt.

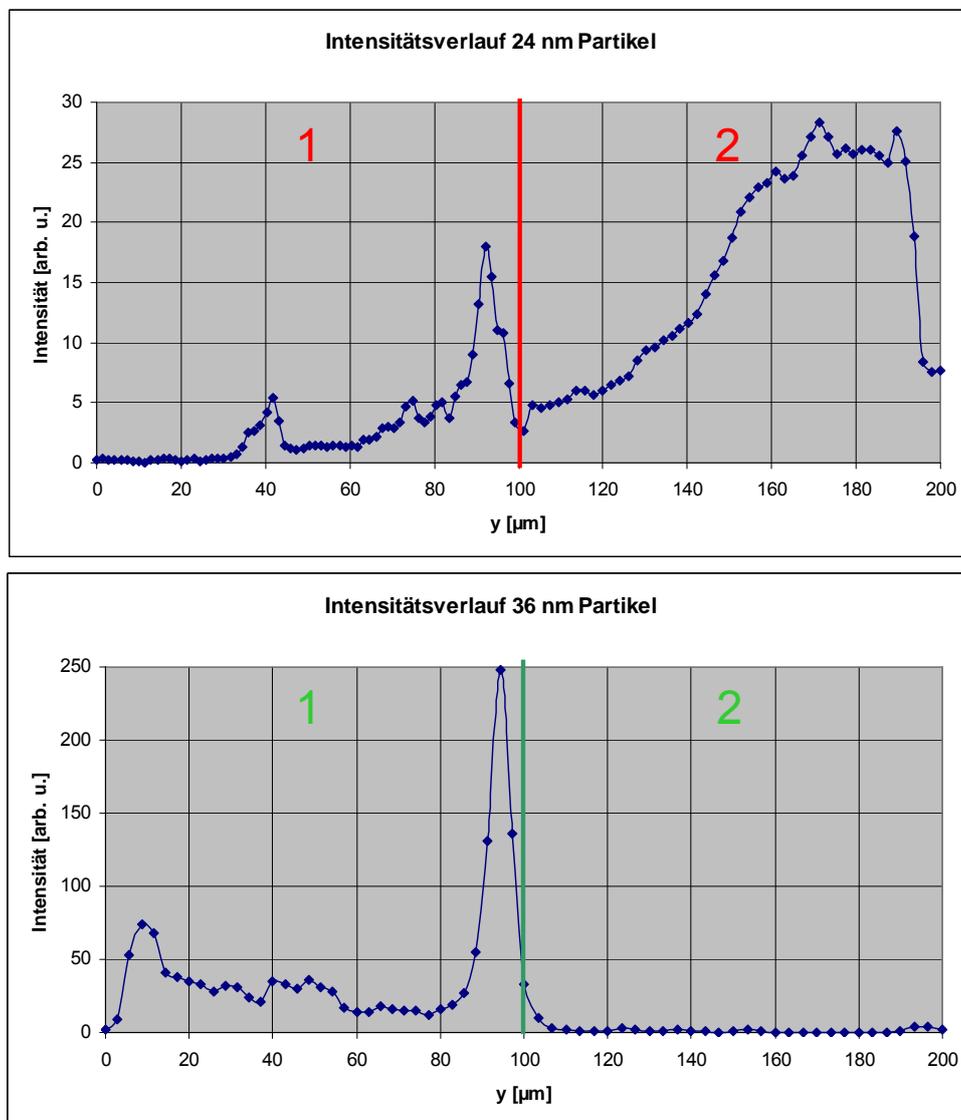


Abbildung 60: Intensitätsverlauf im roten Filtersatz, 24 nm Partikel (oben) und im grünen Filtersatz, 36 nm Partikel (unten)

Ein Gemisch aus diesen beiden Partikelsorten lässt sich entsprechend der zuvor ermittelten Größenverteilungen auftrennen. Die relative Intensität der 36 nm Partikel in Stauraum 2 beträgt 97% ($G1 = 0,97$), während 79% der Intensität der 24 nm Partikel im unteren Stauraum verbleiben ($R2 = 0,79$). Dieses etwas schlechtere Ergebnis bei den 24 nm Partikeln kann mit den sich überlappenden Größen der beiden Partikelsorten erklärt werden.

Bei diesem Trennversuch ergibt sich ein Tk von 0,76. Da 0,00 keine und 1,00 eine perfekte Trennung bedeuten würde, ist ein Wert von mehr als 0,50 als gut einzustufen, mehr als 0,75 als sehr gut. Da ein Wert von 0,76 ohne experimentelle Schwierigkeiten zu realisieren war, ist das Trennergebnis sehr gut.

Die gezielte Ablenkung und Auftrennung solcher kleiner Partikel im Durchflussexperiment konnte bisher von keiner anderen Gruppe gezeigt werden. Mehrere Gruppen können Polystyrenpartikel mit Durchmessern von 0,2 bis 6 μm beeinflussen. Hawkins et al. haben Polystyrenpartikel mit 2 und 3 μm Durchmessern dielektrophoretisch trennen können [1]. Ermolina und Morgan konnten zwar eine dielektrophoretische Beeinflussbarkeit von Polystyrenpartikeln von 44 nm bis 1 μm zeigen, verwendeten dafür jedoch Elektroden und zusätzlich zur Gleichspannung noch Wechselspannungen mit Frequenzen von bis zu 10 MHz [73]. Kang et al. hat ebenfalls eine kontinuierliche Auftrennung von Polystyrenpartikeln zeigen können, jedoch betragen deren Durchmesser 5,7 und 15,7 μm [74]. Cummings und Singh konnten sogar Polystyrenpartikel mit Durchmessern von 200 nm beeinflussen [75]. Jedoch wurden auch hier größere Feldstärken verwendet (80 kV/m) und eine Trennung erfolgte nicht.

Im Vergleich zu anderen Veröffentlichungen konnten hier weitaus kleinere Partikel beeinflusst und sogar erfolgreich getrennt werden. Dies war sogar ohne Wechselspannungen und auch nur mit geringen Gleichspannungswerten (teilweise $<1000 \text{ V/m}$ (siehe Abbildung 59)) möglich.

4.4 Fangen von Proteinen

Um diesen Trennmechanismus auch auf biologische Nanopartikel, wie Proteine, übertragen zu können, soll hier gezeigt werden, dass auch Proteine dielektrophoretisch manipulierbar sind.

4.4.1 Eigenschaften der Proteine

Da vermutet wird, dass die Polarisierbarkeit von der Größe der Proteine abhängig ist, werden zwei verschieden große Proteine verwendet. Dabei werden die Proteine als Quader angenähert und die Kantenlängen a, b, c und das Molgewicht [76] in Tabelle 6 angegeben.

Tabelle 6: Kantenlängen und Molgewichte der verwendeten Proteine

Protein	Molgewicht [kDa]	a [nm]	b [nm]	c [nm]
R-Phycoerythrin	240	18,7	18,7	5,9
Streptavidin	67	5,8	5,8	18,6

Im Gegensatz zu den Polystyrenkügelchen passen die Proteine nicht optimal in die jeweiligen Filtersätze, sondern sind ebenfalls in denen der anderen sichtbar. Dadurch ist eine optische Diskriminierung nicht möglich.

4.4.2 Räumliche Manipulation

Zur Veranschaulichung des Verhaltens der Proteine im Mikrofluidikkanal werden wiederum Aufnahmen des Injektionsverhaltens und des Verhaltens beim Anlegen einer Gleichspannung entlang der Barriere gemacht. Da eine bessere Beeinflussbarkeit bei größerem Protein erwartet wird, wird zu erst R-Phycoerythrin untersucht.

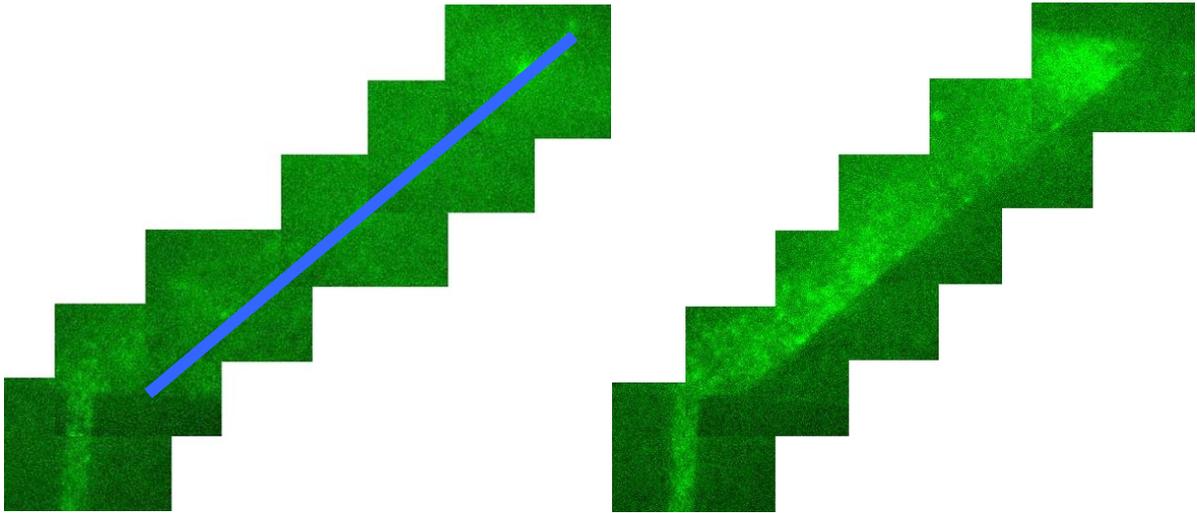


Abbildung 61: Darstellung des Verhaltens von R-Phycoerythrin ohne Gleichspannung (links) und mit 15 V (rechts), an Reservoir 1 liegen 0,13 mbar und an Reservoir 2 0,26 mbar an

Ohne Gleichspannung erkennt man in Abbildung 61 (links) keinerlei Beeinflussung an der Barriere (blau). Nach dem Hinzuschalten einer Gleichspannung von 15 V sieht man eine deutliche Ablenkung vor der Barriere (rechts) zur gegenüberliegenden Kanalseite. Da das R-Phycoerythrin als größeres der beiden Proteine, genau wie die Polystyrenpartikel (siehe 4.3.3.2), vor der Barriere abgelenkt wird, ist auch hier eine Konzentrationspolarisation (siehe 4.3.2.1) zu vermuten.

Da die Proteine im Vergleich zu den Polystyrenpartikeln kaum geladen und kleiner (siehe Tabelle 6) sind, scheiden elektrostatische Abstoßungseffekte am Übergang von Mikro- zu Nanofluidikkanal wahrscheinlich aus. Auch die negative DEP scheint aufgrund der geringeren Größe und Ladung unwahrscheinlich. Somit verbleiben Umladungseffekte der Ionenhülle [72] und z.B. Effekte wie die Elektrokonvektion [68] als mögliche Ursachen für die Aufstauung durch die Konzentrationspolarisation.

Nach Überschreitung eines kritischen Spannungswertes (siehe Abbildung 56), konnte hier ebenfalls die Auswirkung eines expandierenden Ionenanreicherungsgebietes (siehe Abbildung 55) beobachtet werden. Dies stützt sowohl die Vermutung einer Konzentrationspolarisation als auch den Einfluss dämpfender Effekte, die das System ab einem bestimmten Spannungswert im „over-limiting“ Strombereich (siehe Abbildung 56) nicht mehr ausreichend regulieren können.

Als nächstes wird das kleinere Protein Streptavidin untersucht.

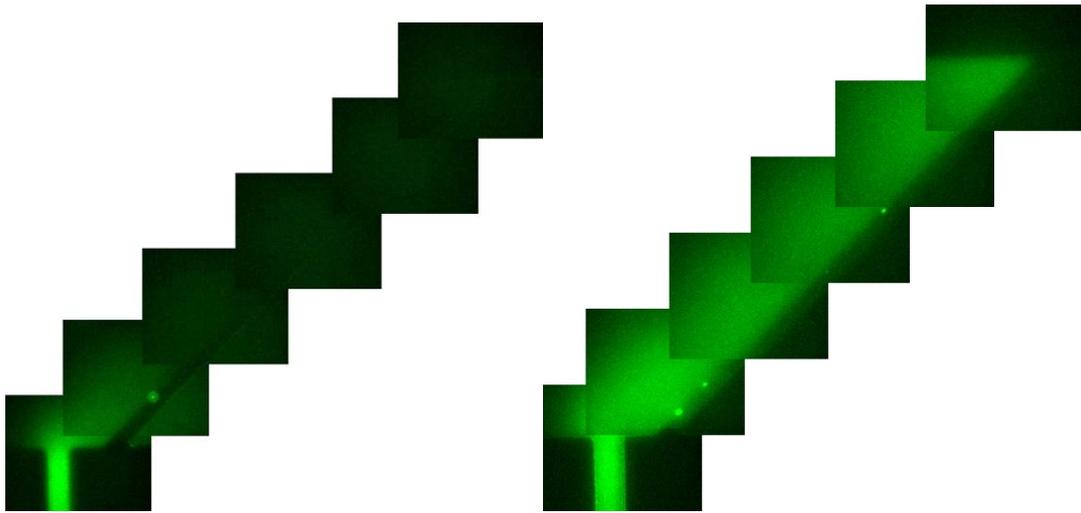


Abbildung 62: Darstellung des Verhaltens von Streptavidin ohne Gleichspannung (links) und mit 4 V (rechts), wobei in beiden Fällen 0,13 mbar an Reservoir 1 und 0,20 mbar an Reservoir 2 anliegen

In Abbildung 62 erkennt man auf der linken Seite das unbeeinflusste Streptavidin, das am unteren Kanalrand den Spalt passiert. Nach dem Anlegen einer 5 V Gleichspannung wird das Protein vor der Barriere, rechts im Bild, parallel zur Barriere abgelenkt. Auch hier bewirkt die Konzentrationspolarisation eine Ablenkung des nahezu ungeladenen Proteins. Da dieses ungefähr 4mal leichter ist als das R-Phycoerythrin (siehe Tabelle 6), scheint die Ablenkung nicht so gröÙenselektiv wie bei den Polystyrenpartikeln (siehe 4.3.3.2) zu sein, was ebenfalls gegen DEP spricht. Der „over-limiting“ Strombereich (siehe Abbildung 56) und das zugehörige expandierende Anreicherungsgebiet (siehe Abbildung 55) mit der verbundenen Abstoßung des Proteins von der Barriere hin zur Kathode ist auch hier zu beobachten.

Lapizco-Encinas et al. konnten in ihrer erst kürzlich publizierten Arbeit mittels nichtleitenden Pfosten BSA dielektrophoretisch fangen [77], jedoch nicht trennen. Dafür wurden Pfosten in 1 cm hohen Kanälen verwendet. Es waren dafür Feldstärken von mindestens 80 kV/m nötig. Gleichzeitig wurden Leitfähigkeiten von ca. $\chi \approx 0,5 \text{ S/cm}$ erreicht, was einem elektrischen Widerstand von $R_{el} \approx 2 \text{ }\Omega/\text{cm}$ entspricht und somit einer viel höheren Ionenkonzentration. Hier verwendete Feldstärken und Ionenkonzentrationen lagen teilweise deutlich darunter (siehe Abbildung 62 und 4.3.2). Damit wird das Problem einer elektrochemischen Erwärmung des gesamten Systems, was zu einer Denaturierung der Proteine führen könnte, vermieden.

Ansonsten sind bisher nur kontinuierliche Proteinauftrennungen durch elektrophoretische Kräfte bekannt. Liu et al. haben in ihrer Veröffentlichung [78] mit Elektrophorese und verschiedenen Mikrofiltern BSA und HBB (Betahämoglobin) voneinander getrennt. Die benötigten Elektroden und Mikrofilter sind jedoch aufwendig in der Herstellung. Neutrale Proteine lassen sich noch durch ihre teilweise unterschiedlichen p_H-Werte auftrennen. Dabei wird ausgenutzt, dass Proteine je nach p_H-Wert eine unterschiedliche Nettoladung haben. Erzeugt man nun in einem Kanal einen p_H-Gradienten und legt ebenfalls ein elektrisches Feld an, kann so ebenfalls eine Auftrennung erfolgen, wie Song [79] und Han [80] in ihren Veröffentlichungen zeigen.

Eine Auftrennung, weder im Einzel- noch im kontinuierlichen Experiment, durch die beschriebene Konzentrationspolarisation (siehe 4.3.2.1) konnte bis zur Abgabe dieser Diplomarbeit in keiner weiteren Publikation gefunden werden. Somit ist das Ergebnis eine neue Methode, um Nanopartikel kontinuierlich und einfach auftrennen zu können.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, eine 3-dimensionale Mikrofluidikstruktur mittels Softlithographie herzustellen (siehe 3.2). Mit dieser sollten anschließend Proteine im Durchflussexperiment manipuliert werden.

Mit Hilfe der beschriebenen Mehrschicht-Lithographie (siehe 3.2) ließ sich eine Kanalgeometrie (siehe Abbildung 23) realisieren, die zur dielektrophoretischen Auftrennung von Nanoobjekten im Durchflussexperiment geeignet ist.

Dabei war die Realisierung einer sehr geringen Durchflusshöhe an einer Barriere in einem Mikrofluidikkanal von entscheidender Bedeutung, um eine Manipulation (siehe 4.3.2, 4.3.3 und 4.4.2) zu ermöglichen. Der Lithographieprozess mit SU-8-Lack ermöglicht dabei Spalthöhen von unter 100 nm (siehe Abbildung 21).

Bedingt durch die limitierende Stabilität des h-PDMS ließ sich eine Durchflusshöhe von 520 nm, bei einer Gesamtstrukturhöhe von 6 μm und einer Kanalbreite von 200 μm (siehe Abbildung 23), frei hängend erzielen. Das ergibt einen bisher in keiner Veröffentlichung gefunden Wert des Breite-zu-Höhe-Verhältnisses von 540:1 (siehe 4.1.1).

Durch das Hindurchpumpen von Polystyrenpartikeln mit 500 nm Durchmesser auf der gesamten Kanalbreite, konnte gezeigt werden, dass trotz des Fehlens von Stützpfeilern, die Barriere nicht nennenswert durchhängt.

Mit diesem Kanaldesign können Polystyrennanopartikel mit Durchmessern von 24 und 36 nm an der Barriere (siehe Abbildung 23) nur durch hydrodynamischen Antrieb und Gleichspannung beeinflusst werden (siehe 4.3). Da die klassisch zu erwartenden dielektrophoretischen Kräfte aber keine Beeinflussung erlauben würden (siehe 4.3.2), musste eine andere Erklärung gefunden werden.

Der physikalische Erklärungsansatz dieser Arbeit (siehe 4.3.2.1) beruht dabei auf vielen Veröffentlichungen, die den Effekt der Konzentrationspolarisation aufgrund überlappender Debyeschichten in kleineren Kanälen ebenfalls beschreiben [69, 70]. Ein Zusammenhang zwischen Kanalhöhe und Ionenkonzentration konnte ebenfalls gezeigt werden (siehe Abbildung 51). Die Ursache der Konzentrationspolarisation konnte dabei theoretisch und anschaulich hergeleitet werden (siehe 4.3.2.1). Nach

dem Erreichen einer gezielten Beeinflussbarkeit der Polystyrenpartikel am Spalt (siehe 4.3.2), konnte ebenfalls eine sehr gute kontinuierliche Trennung eines Gemisches der verschiedenen Polystyrennanopartikel gezeigt werden (siehe 4.3.3.2). In Übereinstimmung mit den Veröffentlichungen zur Konzentrationspolarisation konnte eine Abstoßung der Nanopartikel von der Barriere beim Überschreiten einer kritischen Feldstärke beobachtet werden (siehe Abbildung 55). Zusätzlich wurden verschiedene Möglichkeiten, die die positive Rückkopplung des Systems stabilisieren könnten angeführt und teilweise erklärt (siehe 4.3.2.2). Außerdem wurden die möglicherweise wirkenden Kräfte infolge der Konzentrationspolarisation diskutiert (siehe 4.3.2.3).

Zum Schluss ließ sich die gezielte Beeinflussung auch auf verschiedene Proteine übertragen. Diese konnten durch Anlegen eines elektrischen Gleichspannungsfeldes, vor der Barriere abgelenkt und abgestoßen werden (siehe 4.4.2).

Sowohl die Polystyrenpartikel als auch die Proteine ließen sich mit diesem Kanaldesign gezielt beeinflussen. Mit Hilfe einer optimierten Struktur (siehe Abbildung 63) müsste die Trennung noch besser sein.

Neue Herausforderungen der Nanofluidik

Als zukünftiger Weg ist die Steigerung der Sensibilität der Trennung und Konstanz der Messparameter anzusehen. Mit kleineren Spalthöhen müsste z.B. eine noch bessere Trennung erzielt werden.

Sowohl die Durchflusshöhenbeschränkung durch das PDMS (siehe 3.3), als auch die variierenden Kanaleigenschaften legen einen Wechsel des Kanalmaterials nahe. Dadurch sollten kleinere Spalthöhen und konstantere Kanaleigenschaften realisiert werden können. Kanalstrukturen aus stabileren Materialien könnten kleinere Spalthöhen und konstantere Kanaleigenschaften liefern.

Eine mögliche Methode der Erzeugung solcher kleiner Spalthöhen wird von J. Han et al. gezeigt [81]. Die Kanalstruktur wird mit einem Standard-Photolithographie-Prozess auf einem Siliziumsubstrat erzeugt und mit einem Deckgläschen zur offenen Seite abgeschlossen.

Weiterhin ist eine Optimierung der Barrierenform möglich (siehe Abbildung 63).

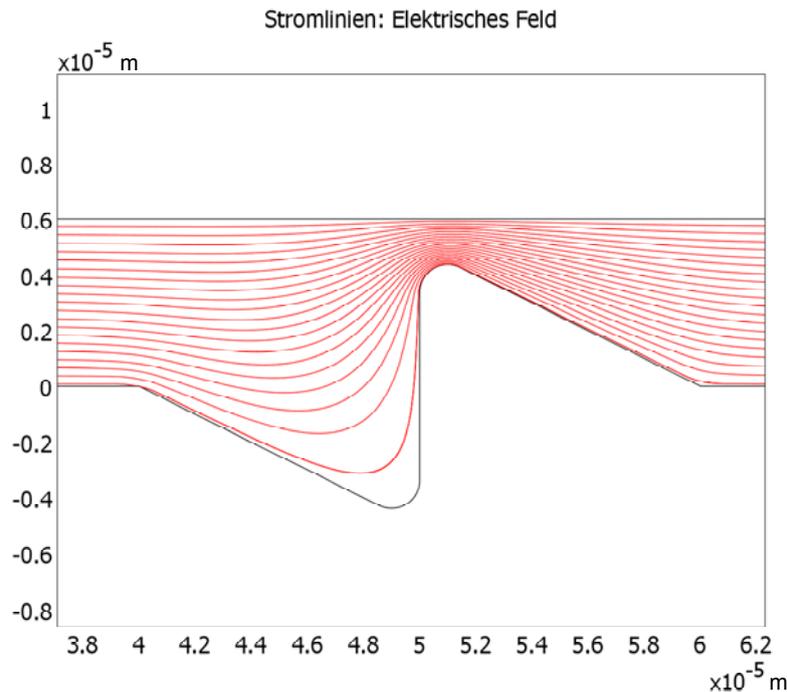


Abbildung 63: verbesserte Barrierenstruktur in der Seitenansicht

Mit Hilfe einer in Flussrichtung asymmetrischen Barrierenform wird ein Zurücklaufen des bereits getrennten Analyten hinter der Barriere verhindert, wie es bei manchen Versuchen zu beobachten war (siehe Abbildung 45). Gleichzeitig wird eine verstärkte dielektrophoretische Kraftwirkung erzielt, deren Auswirkung zur Klärung des eigentlichen Trennmechanismus beitragen kann.

Weiterhin bleibt in zukünftigen Experimenten zu klären, welcher der hier diskutierten Effekte infolge der Konzentrationspolarisation für die Beeinflussung und Trennung verantwortlich ist (siehe 4.3.2.3). Dabei scheint die dämpfende Komponente der Autoprotolyse des Wassers einige Erklärungsansätze zu liefern (siehe 4.3.2.2 und 4.3.2.3).

Dafür sind neue Experimente mit unterschiedlichen Parametern nötig. Zum einen müsste der abstoßende Effekt bei verschiedenen Ionenkonzentrationen weiter untersucht werden. Ob und wie sich dabei die kritische Feldstärke ändert, ist dabei eine zentrale Frage. Gleichzeitig könnte so die dielektrophoretische Auswirkung an der Barriere untersucht werden. Es wäre zu erwarten, dass die Beeinflussbarkeit mit steigender Ionenkonzentration abnimmt, da die Debyelänge des Systems kleiner wird.

Um die Autoprotolyse-Theorie zu überprüfen, wären Farbstoffe denkbar, die auf unterschiedliche Konzentrationen von Hydronium- und Hydroxidionen reagieren.

Diese müssten beim Injizieren in dieses Kanaldesign im Spalt eine erhöhte Hydroniumionenkonzentration nachweisen können.

Falls sich die Unterschiede in der Ionenkonzentration bestätigen (siehe Abbildung 49), sind Kanalstrukturen denkbar, die gezielt Reaktionen katalysieren können, die eine erhöhte Konzentration an Hydroniumionen benötigen. Im Falle einer positiv geladenen Kanaloberfläche könnte entsprechend eine erhöhte Hydroxidionenkonzentration in einem Nanokanal genutzt werden.

Außerdem ist mit dieser Methode eine Mischung verschiedener Nanopartikel vorstellbar, was aufgrund des streng laminaren Verhaltens in Mikrofluidikkanälen (siehe 2.2.1.2), welches Mischen lediglich durch Diffusion (siehe 2.2.3.1) ermöglicht, interessant ist.

Später liegt die Aufgabe darin, dieses Prinzip genau steuerbar auf beliebige beeinflussbare Nanokomponenten anwenden zu können, um u.a. so unter möglichst geringem Material- und Zeitaufwand, Trennungen beliebig beeinflussbarer Komponenten oder Katalysen geeigneter Reaktionen, in ein Nanofluidiksystem zu implementieren.

6 Appendix

6.1 Profilometeraufnahmen der SU-8-Schichten

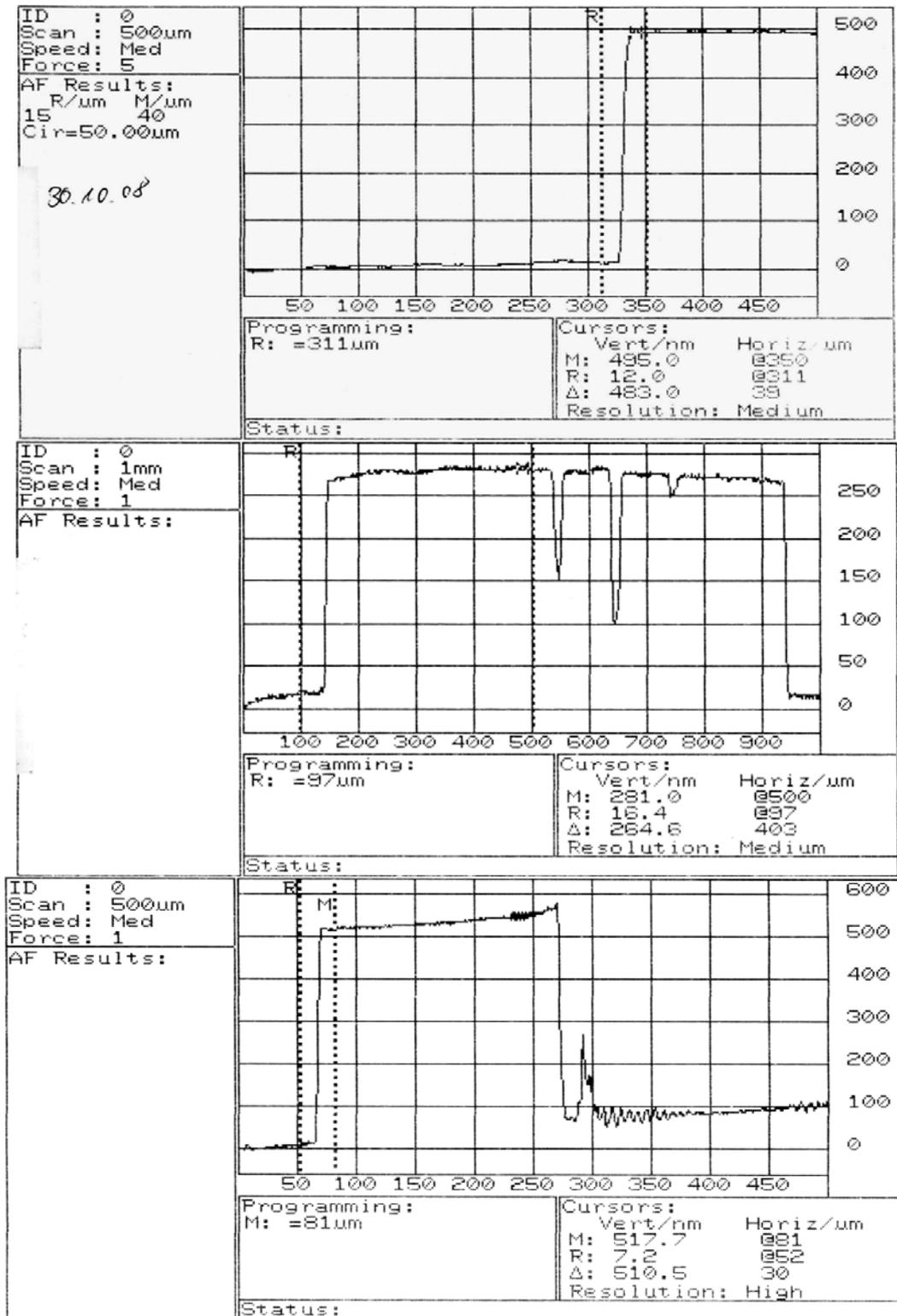


Abbildung 64: Profilometeraufnahmen der SU-8-Schichten, 480 nm (oben), 260 nm (mitte) und 525 nm (unten)

6.2 36 nm Polystyrenpartikel

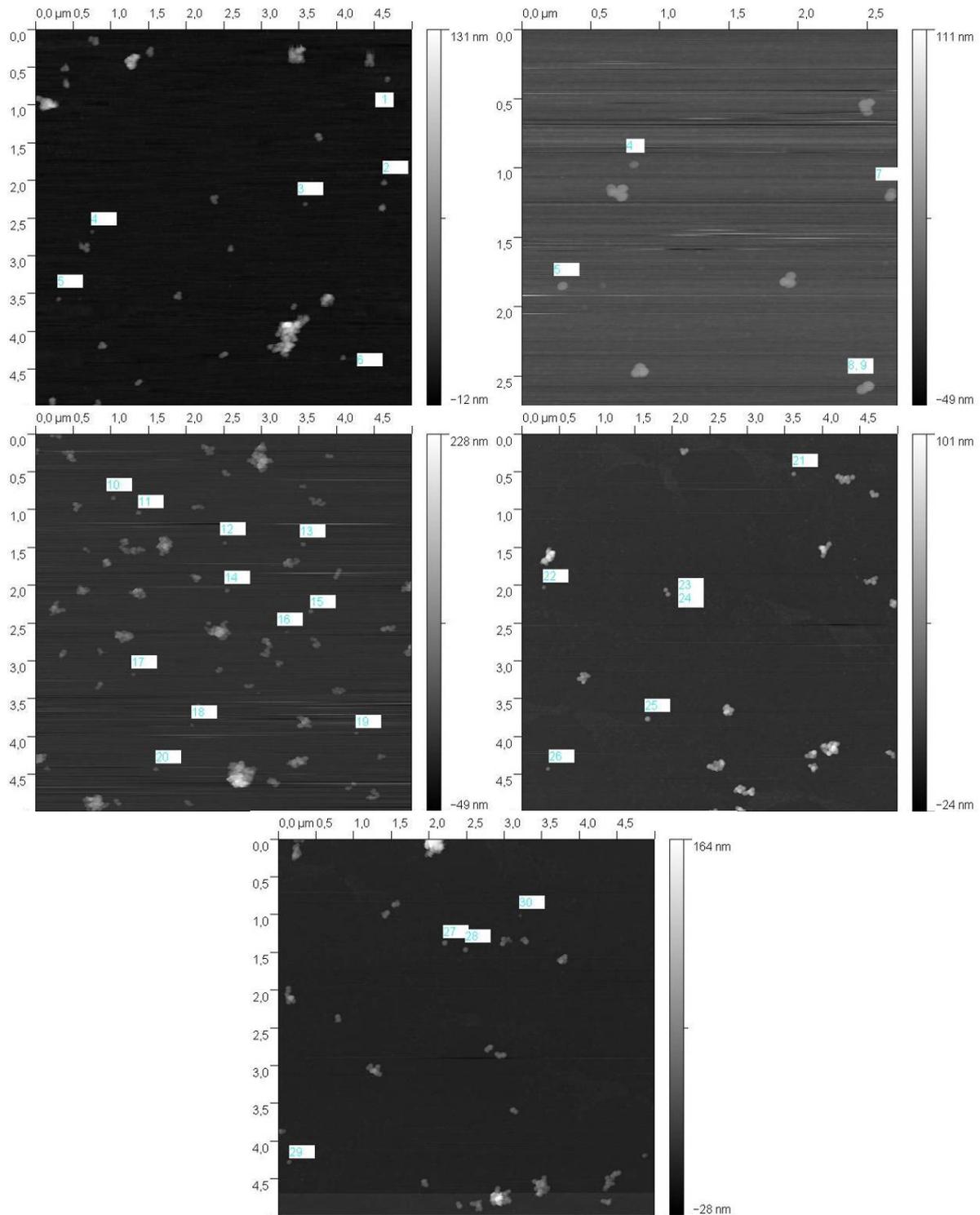


Abbildung 65: AFM-Aufnahmen der 36 nm Partikel mit Markierung der vermessenen Partikel

Tabelle 7: Partikelhöhen aus den Aufnahmen in Abbildung 65

Partikelnr.	Höhe [nm]	Partikelnr.	Höhe [nm]
1	37,5	16	31
2	38	17	31
3	29	18	30
4	26	19	40
5	35	20	42
6	36	21	36
7	39	22	28
8	36	23	38
9	40	24	41
10	40	25	49
11	47	26	32
12	38	27	44
13	39	28	43
14	39	29	35
15	45	30	23

6.3 ImageJ Makro zur Fluoreszenzintensitätsauswertung

```

run("Clear Results");
list = #Bildanzahl#;
makeRectangle(0, 118, 160, 10);
run("Set Measurements...", " mean redirect=None decimal=6");
for (i=0; i<list; i++)
    {run("Measure");
    run("Next Slice [>]");
    }
run("Input/Output...", "jpeg=75 file=.dat");
saveAs("Measurements", "#Ausgabepfad#.dat");

```

Die in # eingefassten Abschnitte sind dabei anzupassende Werte.

Abbildungs- und Variablenverzeichnis

Mikrofluidikdesign zur Auftrennung von Nanopartikeln	1
Bildung einer Peptidbindung aus zwei verschiedenen Aminosäuren [20].....	4
Darstellung der Sekundär- (unten) und der Tertiärstruktur (oben) [21].....	5
Protein, bestehend aus vier Polypeptidketten.....	6
Veranschaulichung der Viskosität [23].....	7
Hagen-Poiseuille Profil zwischen zwei parallelen Platten.....	9
Potentialverlauf an geladener Oberfläche	11
Potentialverlauf zwischen zwei geladenen Wänden	13
Vergleich zwischen Flussprofil verursacht durch EOF und Druckunterschied [35] ...	15
Auswirkung eines äußeren elektrischen Feldes auf einen Mikrofluidikkanal [36]	16
Möglichkeiten zur Erzeugung inhomogener elektrischer Felder [38]	17
Veranschaulichung der Polarisierbarkeit eines Kügelchens und eines Proteins.....	18
Veranschaulichung der Gleichverteilung unterschiedlicher Partikel [44]	20
Veranschaulichung eines statistischen Entkommens aus einer Potentialmulde.....	21
schematische Darstellung eines Wassermoleküls [50].....	22
Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wassermolekülen [50]	22
Autoprotolysereaktion des Wassers	22
Jablonski-Diagramm zur Erläuterung der Fluoreszenz [52]	24
Veranschaulichung der Stokes Verschiebung [55]	25
Wafer mit erster dünner Lackschicht	28
70 nm SU-8-Schicht	29
Wafer mit zweiter Lackschicht, die die Aussparung für die Barriere enthält	30
Skizze der Kanalstruktur mit Benennung der einzelnen Strukturbestandteile.....	32
Stanzaufbau mit Stanzmaske	32
Skizze zur Veranschaulichung des Stanzapparaturprinzips	33
Skizze der PMMA-Halterung	34
Skizze in Aufsicht zur Veranschaulichung der Reservoirs im Chip.....	34
Versuchsaufbau mit Fluoreszenzmikroskop und Messaufbau.....	35
Veranschaulichung des Prinzips eines Fluoreszenzmikroskops [59].....	36
Skizze des Verlaufs des Kanalverschlusses.....	39
Ergebnisse des Vergleichs von PDMS und h-PDMS [64].....	41
PDMS-Doppelschicht	41

Kanaldesign für Ersatzschaltbild.....	43
Ersatzschaltbild des Kanals aus Abbildung 33	43
durch eine Barriere deformierte Feldlinien in einem Mikrofluidikkanal	44
Simulation des negativen Gradienten des quadrierten elektrischen Feldes	45
Verlauf der elektrischen Feldlinien im Bereich des Spaltes in Draufsicht	46
Ablenkung parallel zur Barriere bei Anliegen eines äußeren elektrischen Feldes	46
AFM-Aufnahme der 24 nm Partikel	47
Größenverteilung der 24 nm Partikel.....	48
AFM-Aufnahme der 36 nm Partikel	49
Größenverteilung der 36 nm Partikel.....	49
Injektionsverhalten der 24 nm und der 36 nm Partikel.....	51
Ablenkung der 24 nm Partikel.....	52
Veranschaulichung des Zurücklaufens des Analyten hinter der Barriere	53
Potentialverlauf entlang der Teilchenbahn bei negativer DEP	53
Vergleich der 36 nm Partikel bei angelegter Gleichspannung	54
Potentialverläufe bei unterschiedlichen Kanalhöhen	57
Ionenkonzentrationen in Abhängigkeit von Kanalhöhe und Position im Kanal	58
Skizze zum Ionenanreicherungseffekt.....	60
Ionenkonzentration der Gruppen in Abhängigkeit von der Kanalhöhe.....	61
Filmausschnitt während der Spannungserhöhung.....	63
Verhalten der 24 nm Partikel nach Erhöhung der Gleichspannung	63
Verhalten der 36 nm Partikel nach Erhöhung der Gleichspannung	63
Skizze des anzunehmenden Wachstums des Ionenanreicherungsgebietes	64
experimentelle Beobachtungen in Abhängigkeit von der anliegenden Feldstärke....	64
Nettoionenströme durch das Kanalsystem	65
Skizze zur Veranschaulichung der Gemischtrennungsauswertung	68
Fotomontagen des Scanweges bei 7 V Gleichspannung	69
Intensitätsverlauf im roten und im grünen Filtersatz	70
Darstellung des Verhaltens von R-Phycoerythrin	73
Darstellung des Verhaltens von Streptavidin	74
verbesserte Barrierenstruktur in der Seitenansicht.....	78
Profilometeraufnahmen der SU-8-Schichten	80
AFM-Aufnahmen der 36 nm Partikel mit Markierung der vermessenen	81

Abbildungs- und Variablenverzeichnis

Tabelle 8: verwendete Variablen

a	Proportionalitätsfaktor
A	Plattenfläche
A_K	Kanalquerschnittsfläche
b	Kanalbreite
c	Lichtgeschwindigkeit
d_{Kap}	Kapillardurchmesser
dt	Zeitintervall
D	Diffusionskonstante
D_h	hydraulischer Durchmesser
e	Euler'sche Konstante
e_{\pm}	Elementarladung
E	Energie
E_{el}	Elektrische Energie
E_{kin}	Kinetische Energie
\vec{E}	Elektrisches Feld
f_r	Reibungskoeffizient
F	Faradaykonstante
\vec{F}	Kraftbetrag
\vec{F}_{DEP}	Dielektrophoretische Kraft
\vec{F}_{el}	Elektrostatistische Kraft
\vec{F}_{ep}	Elektrophoretische Kraft
\vec{F}_r	Stokes'sche Reibungskraft
h	Kanalhöhe
h_{Pl}	Planck'sches Wirkungsquantum
I	Ionenstärke
I_{\pm}	Ionenströme
l_B	Bjerrumlänge
k_B	Boltzmann-Konstante
$k_{hin/rück}(T)$	Reaktionsrate
$k_{w_{H_2O}}$	Ionenprodukt des Wassers
k_{Kramer}	Kramers Rate

Abbildungs- und Variablenverzeichnis

$K(\omega)$	Clausius-Mosotti-Faktor
l	Kanalsegmentlänge
L	Kanallänge
m	Masse
M_i	Stoffmengenkonzentration
M_{\pm_0}	Gleichgewichtskonzentration
N_A	Avogadro-Konstante
p_0	Normaldruck
Δp	Druckunterschied
\vec{p}	Dipolmoment
q	Punktladung
q'	Zweite Punktladung
r	Abstand zu Oberfläche
r_s	Sphärenradius
R_{el}	Elektrischer Widerstand
R_G	Gesamtwiderstand
$R_{(molar\ gas)}$	Molare Gaskonstante
R^2	Korrelationskoeffizient
Re	Reynoldszahl
s	Abstand zur Ladung
S_0	Grundenergieniveau
S_{0+i}	Angeregtes Energieniveau
t	Zeit
T	Temperatur
Tr	Trennungskriterium
U	Spannungsabfall
U_g	Gesamtspannung
\vec{v}	Geschwindigkeit
\vec{v}_{eof}	Elektroosmotische Geschwindigkeit
\vec{v}_{ep}	Elektrophoretische Geschwindigkeit
\vec{v}_{ges}	Absolute Geschwindigkeit

Abbildungs- und Variablenverzeichnis

$U_{hin/rück}$	Reaktionsgeschwindigkeit
v_{Pl}	Geschwindigkeit einer Platte
\vec{v}_{th}	Thermische Geschwindigkeit
U_K	Kanalumfang
W_b	Potentialbarriere
W_{DEP}	Dielektrophoretisches Potential
$\vec{x}_i(t)$	Raumkoordinate
z	Position im Kanal
z_i	Ionenwertigkeit
Z	Plattenabstand
Griechische Symbole	
α	Polarisierbarkeit
χ	Leitfähigkeit
ϵ_0	Vakuumdielektrizitätskonstante
ϵ_m	Relative Dielektrizitätskonstante des Mediums
ϵ_p	Relative Dielektrizitätskonstante des Partikels
ϕ	Elektrisches Potential
ϕ_0	Oberflächenpotential
η	Viskosität
κ	Chemischer Gleichgewichtskonstante
λ	Wellenlänge
λ_D	Debyelänge
λ_D^{neq}	Nichtgleichgewichts Debyelänge
μ_{eof}	Elektroosmotische Mobilität
μ_{ep}	Elektrophoretische Mobilität
μ_i	Ionenmobilität
π	Kreiszahl
ρ	Dichte
σ	Standardabweichung
ω	Frequenz
ζ	Zetapential

Abbildungs- und Variablenverzeichnis

Symbole	
∇	Divergenz
$\vec{\nabla}$	Gradient
	Betragszeichen
\int	Integral
$\langle \rangle$	Mittelwert
[]	Konzentration

Tabellen- und Literaturverzeichnis

verwendete Materialien und deren Hersteller	26
Volumina an SU-8(50) und Verdünner für die jeweiligen Feststoffanteile.....	28
SU-8-Schichtdicken in Abhängigkeit von Feststoffanteil und Umdrehungszahl.....	29
Werte der fünf Widerstände.....	44
Ionenströme in einem 200 µm breiten Kanalsegment entsprechender Höhe	59
Kantenlängen und Molgewichte der verwendeten Proteine.....	72
Partikelhöhen aus den Aufnahmen in Abbildung 65	82
verwendete Variablen.....	85

- [1] B.G. Hawkins, A.E. Smith, Y.A. Syed, B.J. Kirby: *Analytical Chemistry* 79, 19 (2007).
- [2] G.M. Whitesides: *Nature* 442, 7101, doi:10.1038/nature05058 (2006).
- [3] D.R. Reyes, D. Iossifidis, P.-A. Auroux, A. Manz: *Anal. Chem.* 74, 12 (2002).
- [4] P.-A. Auroux, D. Iossifidis, D.R. Reyes, A. Manz: *Anal. Chem.* 74, 12 (2002).
- [5] N. Lion, F. Reymond, H.H. Girault, J.S. Rossier: *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 1, doi:10.1016/j.copbio.2004.01.001 (2004).
- [6] M. Yamada, M. Nakashima, M. Seki: *Anal. Chem.* 76, 18, doi:10.1021/ac049863r (2004).
- [7] S. Yang, A. Undar, J.D. Zahn: *Lab on a chip* 6, 7, doi:10.1039/b516401j (2006).
- [8] P. Sethu, A. Sin, M. Toner: *Lab on a chip* 6, 1, doi:10.1039/b512049g (2006).
- [9] L.R. Huang, E.C. Cox, R.H. Austin, J.C. Sturm: *Science* 304, 5673, doi:10.1126/science.1094567 (2004).
- [10] C.F. Chou, O. Bakajin, S.W. Turner, T.A. Duke, S.S. Chan, E.C. Cox, H.G. Craighead, R.H. Austin: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 24 (1999).
- [11] L.R. Huang, J.O. Tegenfeldt, J.J. Kraeft, J.C. Sturm, R.H. Austin, E.C. Cox: *Nat. Biotechnol.* 20, 10, doi:10.1038/nbt733 (2002).
- [12] J. Fu, R.B. Schoch, A.L. Stevens, S.R. Tannenbaum, J. Han: *Nature nanotechnology* 2, 2, doi:10.1038/nnano.2006.206 (2007).
- [13] L. Krivánková, P. Bocek: *Electrophoresis* 19, 7, doi:10.1002/elps.1150190704 (1998).

- [14] M. Mazereeuw, C.M. de Best, U.R. Tjaden, H. Irth, J. van der Greef: Anal. Chem. 72, 16 (2000).
- [15] R. Hartig, M. Hausmann, J. Schmitt, D.B. Herrmann, M. Riedmiller, C. Cremer: Electrophoresis 13, 9-10.
- [16] W.T. Coakley: Trends Biotechnol. 15, 12 (1997).
- [17] M.P. MacDonald, G.C. Spalding, K. Dholakia: Nature 426, 6965, doi:10.1038/nature02144 (2003).
- [18] D. Huh, J.H. Bahng, Y. Ling, H.-H. Wei, O.D. Kripfgans, J.B. Fowlkes, J.B. Grotberg, S. Takayama: Anal. Chem. 79, 4, doi:10.1021/ac061542n (2007).
- [19] ChemgaPedia. Aufgaben der Proteine, http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/proteine/strukturproteine.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/proteine/aminos_u_einleit/einleitunglang.vscml.html (2009).
- [20] K. Reinert. Peptidbindung, <http://www.mpi-inf.mpg.de/departments/d1/projects/CompBio/vorlesungk/node3.html> (1998).
- [21] T. Gallant. Sekundär und Tertiärstruktur, http://kvhs.nbed.nb.ca/gallant/biology/secondary_structure.jpg.
- [22] R. Wagner. Proteinfehlfaltung, <http://www.physik.uni-osnabrueck.de/doc/ProteinfaltungundKrankheiten.ppt> (2009).
- [23] A. Dorsey. Viskositätsbild, <http://galileo.phys.virginia.edu/classes/311/notes/fluids2/node2.html>.
- [24] C. Gerthsen, D. Meschede (eds): Gerthsen Physik (Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio 2004).
- [25] D.J. Beebe, G.A. Mensing, G.M. Walker: Annual review of biomedical engineering 4, doi:10.1146/annurev.bioeng.4.112601.125916 (2002).
- [26] N.-T. Nguyen, S.T. Wereley: Fundamentals and applications of microfluidics (Artech House, Boston [u.a.] 2002).
- [27] H.A. Stone, A.D. Stroock, A. Ajdari: Annual Review of Fluid Mechanics 36, 1, <http://arjournals.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.fluid.36.050802.122124> (2004).
- [28] R. Kuhn: Capillary electrophoresis. Principles and practice (Springer, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest 1993).

- [29] P.D. Grossman, J.C. Colburn: Academic Press (1992).
- [30] H. Bruus: Theoretical microfluidics. Lecture Notes (2004).
- [31] R.F. Probstein: Physicochemical hydrodynamics. An introduction (Wiley-Interscience, New York [u.a.] 2003).
- [32] L.D. Landau, E.M. Lifsic: Hydrodynamik (Deutsch, Frankfurt am Main 2007).
- [33] C.-H. Lin, L.-M. Fu, Y.-S. Chien: Anal. Chem. 76, 18, doi:10.1021/ac0494782 (2004).
- [34] B. Manz, P. Stilbs, B. Joensson, O. Soederman, P.T. Callaghan: The Journal of Physical Chemistry 99, 29, <http://dx.doi.org/10.1021/j100029a001> (1995/).
- [35] Vergleichsbild von Stempel- und Parabelprofil,
http://www.unimicrotech.com/products_CEC_applicationnote.htm.
- [36] W. Hellmich: Einzelzellanalytik in Mikrofluidik-Systemen (2006).
- [37] E.B. Cummings, S.K. Griffiths, R.H. Nilson, P.H. Paul: Analytical Chemistry 72, 11, <http://dx.doi.org/10.1021/ac991165x> (2000/).
- [38] J. Regtmeier, T.T. Duong, R. Eichhorn, D. Anselmetti, A. Ros: Anal. Chem. 79, 10, doi:10.1021/ac062431r (2007).
- [39] A.D. Goater, R. Pethig: Parasitology 117 Suppl (1998).
- [40] H.A. Pohl: Dielectrophoresis. The behavior of neutral matter in nonuniform electric fields (Cambridge University Press, Cambridge, New York 1978).
- [41] M. Castellarnau, A. Errachid, C. Madrid, A. Juárez, J. Samitier: Biophys. J. 91, 10, doi:10.1529/biophysj.106.088534 (2006).
- [42] C.-F. Chou, J.O. Tegenfeldt, O. Bakajin, S.S. Chan, E.C. Cox, N. Darnton, T. Duke, R.H. Austin: Biophys. J. 83, 4, doi:10.1016/S0006-3495(02)73977-5 (2002).
- [43] S. Choi, J.-K. Park: Lab on a chip 5, 10, doi:10.1039/b505088j (2005).
- [44] wikimedia. Diffusion,
[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ad/Diffusion_\(1\).png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ad/Diffusion_(1).png).
- [45] T.M. Squires, S.R. Quake: Reviews of Modern Physics 77, 3,
<http://dx.doi.org/10.1103/RevModPhys.77.977> (2005).
- [46] H.A. Kramers: Physica 7, 4,
<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6X42-4CB752H-3G/2/18dd09fed8a9142aed637597660731c5> (1940/4//).
- [47] P. Jun Park, W. Sung: \jcp 111 (1999).
- [48] P. Reimann: Phys. Rev. Lett. 86, 22 (2001).

- [49] P. Reimann: Physics Reports 361, 2-4 (2002/4).
- [50] Universität Düsseldorf. Wassermoleküle, http://www.uni-duesseldorf.de/MathNat/Biologie/Didaktik/Wasserhaushalt/dateien/3_transp/3_wasser/dateien/1_wasser.html.
- [51] R. Erbrecht (ed): Das große Tafelwerk. Ein Tabellen- und Formelwerk für den mathematisch-naturwissenschaftlichen Unterricht bis zum Abitur ; [Formelsammlung für die Sekundarstufe I und II] (Cornelsen Volk-und-Wissen-Verl., Berlin 2008).
- [52] M. Kothe: Protokoll: Fluoreszenzspektroskopie (2008).
- [53] R. Winter: Methoden der biophysikalischen Chemie (Teubner, Stuttgart 1998).
- [54] J. R. Lakowicz (ed): Principles of Fluorescence Spectroscopy (Springer US, Berlin 1999).
- [55] wikimedia. Stokesverschiebung, http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/a/af/Stokes_shift.png (2009).
- [56] W. Hellmich, J. Regtmeier, T.T. Duong, R. Ros, D. Anselmetti, A. Ros: Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids 21, 16, doi:10.1021/la0510432 (2005).
- [57] T.W. Odom, J.C. Love, D.B. Wolfe, K.E. Paul, G.M. Whitesides: Langmuir 18, 13 (2002).
- [58] H.G. Frey: Eine hochauflösende optische Nahfeld-Sonde für Fluoreszenzmessungen an biologischen Proben, Dissertation: Fakultät für Physik, Technische Universität München (2004).
- [59] wikimedia. Fluoreszenzmikroskopie Prinzip, http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Fluoreszenzmikroskopie_2008-09-28.svg&filetimestamp=20081118163714 (2008).
- [60] MichroChem. SU-8-Anleitung, http://www.microchem.com/products/pdf/SU8_2-25.pdf (2009).
- [61] B. Bhushan: Springer Handbook of Nanotechnology, <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-29857-1> (2007).
- [62] D. Huh, K.L. Mills, X. Zhu, M.A. Burns, M.D. Thouless, S. Takayama: Nature materials 6, 6, doi:10.1038/nmat1907 (2007).
- [63] K.M. Choi, J.A. Rogers: J. Am. Chem. Soc. 125, 14, doi:10.1021/ja029973k (2003).

- [64] P. Mao: Fabrication and characterization of nanofluidic channels for studying molecular dynamics in confined environments, <http://dspace.mit.edu/bitstream/handle/1721.1/34152/69018170.pdf?sequence=1> (2005).
- [65] M. Everwand: Statische und dynamische Oberflächenbeschichtungen in Poly(dimethylsiloxan)- und Quarz-Mikrofluidikkanälen, Bachelorarbeit: Fakultät für Physik, Universität Bielefeld (2007).
- [66] L.-M. Fu, J.-H. Wang, W.-B. Luo, C.-H. Lin: *Microfluidics and Nanofluidics* 6, 4, <http://dx.doi.org/10.1007/s10404-008-0328-y> (2009/).
- [67] Gea O. F. Parikesit, Anton P. Markesteyn, Oana M. Piciu, Andre Bossche, Jerry Westerweel, Ian T. Young, Yuval Garini: *Biomicrofluidics* 2, 2, <http://link.aip.org/link/?BMF/2/024103/1> / <http://dx.doi.org/10.1063/1.2930817> (2008).
- [68] I. Rubinstein, B. Zaltzman, O. Kedem: *Journal of Membrane Science* 125, 1, <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TGK-3ST1VSP-3/2/0a9cc058c6e23fea5956f322bcb52be2> (1997/3/5/).
- [69] Q. Pu, J. Yun, H. Temkin, S. Liu: *Nano Letters* 4, 6, <http://dx.doi.org/10.1021/nl0494811> (2004/).
- [70] S.J. Kim, Y.-C. Wang, J.H. Lee, H. Jang, J. Han: *Physical Review Letters* 99, 4, <http://link.aps.org/abstract/PRL/v99/e044501> / <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevLett.99.044501> (2007).
- [71] T. Pundik, I. Rubinstein, B. Zaltzman: *Phys. Rev. E* 72, 6, <http://link.aps.org/abstract/PRE/v72/e061502> (2005/).
- [72] M. Quesada-Pérez, E. González-Tovar, A. Martín-Molina, M. Lozada-Cassou, R. Hidalgo-Alvarez: *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* 4, 3, doi:10.1002/cphc.200390040 (2003).
- [73] I. Ermolina, H. Morgan: *Journal of colloid and interface science* 285, 1, doi:10.1016/j.jcis.2004.11.003 (2005).
- [74] K.H. Kang, Y. Kang, X. Xuan, D. Li: *ELECTROPHORESIS* 27, 3, <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200500558> (2006).
- [75] E.B. Cummings, A.K. Singh: *Anal. Chem.* 75, 18 (2003).
- [76] ProteinDataBase.
- [77] B.H. Lapidco-Encinas, S. Ozuna-Chacón, M. Rito-Palomares: *Journal of Chromatography A* 1206, 1,

- <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TG8-4SMNXVD-1/2/658d739ce34cdcf3fec7c3478a70398b> (2008/10/3/).
- [78] Z. Liu, J. Wang, J. Luo, F. Ding, N. Yuan: *J. Mol. Recognit.* 11, 1-6, doi:10.1002/(SICI)1099-1352(199812)11:1/6<149::AID-JMR411>3.0.CO;2-N (1998).
- [79] Y.-A. Song, S. Hsu, A.L. Stevens, J. Han: *Anal. Chem.* 78, 11, doi:10.1021/ac052156t (2006).
- [80] B. Han, P. Wang, G. Zhu, L. Zhang, F. Qu, Y. Deng, Y. Zhang: *Journal of separation science* 32, 8, doi:10.1002/jssc.200800572 (2009).
- [81] J. Han, S.W. Turner, H.G. Craighead: *Phys. Rev. Lett.* 83, 8, <http://link.aps.org/abstract/PRL/v83/p1688> (1999).

Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Hilfe und Unterstützung einer Vielzahl von Personen nicht möglich gewesen. Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Ermöglichung dieser Diplomarbeit bedanken.

Ein ganz besonders großer Dank geht an den Betreuer meiner Diplomarbeit, Dr. Jan Regtmeier. Er war es, der mir das Thema vorgeschlagen und in unzähligen Gesprächen wertvolle Hinweise und Ansichten geliefert hat. Dank der großzügigen finanziellen Unterstützung aus dem D2-Projekt des SFB 613 war die Umsetzung der Arbeit nur möglich. Er hat einige Stunden in meine experimentelle Unterweisung und unzählige in die Optimierung dieser Arbeit investiert.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Andreas Hütten recht herzlich für seine Bereitschaft danken, dass Zweitgutachten zu erstellen.

Dank der theoretischen Vorleistungen von Dr. Ralf Eichhorn ist die Idee für dieses Thema überhaupt erst entstanden.

Für die Zusammenarbeit und große Unterstützung bei der Beseitigung vieler kleiner Probleme im Laboralltag, den wunderbaren Versuchsaufbau und das Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich ebenfalls Lukas Bogunovic recht herzlich danken.

Sebastian Horstmeier, Sebastian Zünkeler, André Körnig, Volker Walhorn und Sören Grannemann verdanke ich dabei die recht schwierig zu messenden AFM-Aufnahmen dieser Arbeit.

Christoph Nottbohm aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Armin Gölzhäuser möchte ich besonders für die Einweisung in den von mir dringend benötigten Mask-Aligner danken, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Für viele fachliche Hinweise möchte ich auch Dominik Greif, Alex Harder und Lukas Galla danken. Letzterem noch einmal besonders für die Korrekturlesung der Arbeit.

Die Vorarbeit von Martina Everwand in Bezug auf die Kanalbeschichtung und der Erfahrungsaustausch über das Verhalten der Kanalstrukturen haben ebenfalls sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Für die technische Unterstützung bedarf es bei dem Chief Engineer der Etage Christoph Pelargus einen großen Dank.

Natürlich will ich auch allen anderen Etagenmitgliedern für die schöne Zeit danken, die die unzähligen Labortage zu einem wertvollen Erlebnis für mich gemacht haben.

Danksagung

Privat gilt mein allergrößter Dank meinen Eltern Bara und Fred Käsewieter, die mir bei jedem Problem zur Seite standen, mein naturwissenschaftliches Interesse bereits in frühen Jahren gefördert und mir das Physikstudium ermöglicht haben.

Außerdem muss ich meinem ehemaligen Physiklehrer Herrn Klaus Neeve dafür danken, dass er mein Interesse an einem Physikstudium geweckt hat, das mir so viel Freude durch ein tieferes Verständnis vieler Zusammenhänge bereitet hat.

Als aller wichtigstem Teil meines Lebens möchte ich meiner Verlobten Karoline Möhler für ihre Unterstützung und Geduld in der gegen Ende teilweise recht hektischen Zeit meiner Diplomphase danken.