

KAPILLARELEKTROPHORESE
IN
PDMS MIKROFLUIDIK-KANÄLEN

Diplomarbeit

zur Erlangung des Grades einer

Diplom-Physikerin

vorgelegt von

Wibke Hellmich

Fakultät für Physik

Universität Bielefeld

Bielefeld, Juli 2002

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und dabei keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Bielefeld, den 12. Juli 2002

(Hellmich, Wibke)

Gutachter:

Prof. Dr. Dario Anselmetti

Priv.-Doz. Dr. Dirk Feldmann

Abgabedatum der Arbeit: 12. Juli 2002

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Theoretische Grundlagen | 3 |
| 2.1 | Elektrophorese | 3 |
| 2.2 | Elektroosmotischer Fluß | 5 |
| 2.3 | Mikrochipherstellung | 10 |
| 2.4 | Mikrochip-Elektrophorese | 13 |
| 2.4.1 | Injektionsmethoden | 14 |
| 2.4.2 | Effizienz des elektrophoretischen Systems | 16 |
| 2.5 | Fluoreszenz | 20 |
| 2.5.1 | Laser-induzierte Fluoreszenz | 22 |
| 2.6 | Proteine | 22 |
| 3 | Material und Methoden | 25 |
| 3.1 | Material | 25 |
| 3.2 | Fluoreszenzdetektion | 26 |
| 3.3 | Präparation des Mikrochips | 28 |
| 3.4 | Mikrofluidiksteuerung | 30 |
| 3.4.1 | Hochspannungssteuerung | 30 |
| 3.4.2 | Injektion | 31 |
| 3.5 | Bestimmung des elektroosmotischen Flusses | 32 |
| 4 | Ergebnisse und Diskussion | 33 |
| 4.1 | Messung der elektroosmotischen Mobilität | 33 |
| 4.2 | Injektion von fluoreszierenden Analyten | 35 |
| 4.2.1 | Injektion von FITC | 35 |
| 4.2.2 | Injektion von IgG | 38 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.3 | Vergleich der Anregungsquellen | 40 |
| 4.4 | Gegenüberstellung von pinched und floating Methode | 42 |
| 4.5 | Anwendung auf analytische Problemstellungen | 45 |
| 4.5.1 | Trennung von FITC und Fluorescein | 45 |
| 4.5.2 | Nachweis von IgG und Avidin | 47 |
| 4.6 | Detektion geringer Konzentrationen | 48 |
| 5 | Zusammenfassung & Ausblick | 53 |
| 6 | Danksagung | 55 |
| A | Anhang | 57 |
| A.1 | Elektroosmotischer Fluß | 57 |
| | Literaturverzeichnis | 60 |

1 Einleitung

Seit der weitestgehenden Entschlüsselung des Genoms gilt das Interesse der Lebenswissenschaften der Proteomik. Speziell die Proteinanalytik spielt dabei eine entscheidene Rolle. Die Erforschung dieses Gebiets erfordert Analysetechniken, die schnelle Informationen reproduzierbar, kostengünstig und mit geringem Verbrauch an Probensubstanzen liefern [1]. Miniaturisierte Analyseeinheiten, auch unter dem Namen μ -TAS (micro total analysis system) bekannt, erfüllen diese Anforderungen [2]. Hierunter versteht man Mikrochip-Systeme, auf denen Injektion, Analysebereich und Detektion integriert sind. Aus der Miniaturisierung ergeben sich kurze Analysezeiten und die Verwendung geringer Probenmengen. Zusätzlich tragen diese Aspekte neben der günstigen Herstellung aus Polymermaterialien zur Kostenersparnis bei. Die Entwicklung der Analysysteme begann bereits 1975 mit der Realisierung eines auf einem Siliziumwafer integrierten Gaschromatographen von Terry et al. [3]. Dieser Veröffentlichung wurde jedoch lange Zeit keine Beachtung geschänkt. Erst 1990, mit den Veröffentlichungen von Manz et al. [4, 5], setzte die rasante Entwicklung auf diesem Gebiet ein. Die häufigste in solchen Systemen integrierte Analysetechnik stellt die Kapillarelektrophorese dar, da elektrokinetische Effekte Transportmechanismen und die Kontrolle des Flüssigkeitsflusses ermöglichen [6]. Die erste Auftrennung auf einem Glasschip gelang Manz et al. 1992 mit der Trennung von Fluorescein und Calcein innerhalb von 5 min [7, 8]. Seitdem ist von vielen Auftrennungen in Mikrochips berichtet worden, dazu gehören die Trennungen von Farbstoffen [9–11] sowie fluoreszenzmarkierten Aminosäuren [11–13]. 1997 zeigten Colyer et al. [14] eine Trennung von menschlichen Serumproteinen auf einem Chip, wobei die Fluoreszenzmarkierung der Proteine nach der Auftrennung durchgeführt worden war.

In dieser Arbeit wurde der Aufbau der Fluoreszenzdetektion für ein Mikrokanalsystem aus Polydimethylsiloxan realisiert sowie die Einflüsse von Puffersystemen und verschiedenen Oberflächenbehandlungen der Mikrokanäle untersucht. Für die Optimierung der Mikrochip-Elektrophorese wurden die Injektions- und Separationsspannungen an die jeweiligen Systeme angepaßt. Mit den so optimierten Parametern wurde eine Auftren-

nung von Farbstoffen und fluoreszenzmarkierten Proteinen durchgeführt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit beinhaltete die Detektion geringster Konzentrationen elektrokinetisch injizierter Farbstoffe.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Elektrophorese

Unter Elektrophorese versteht man die Bewegung von Ionen einer Elektrolytlösung in einem elektrischen Feld. Die Migrationsrichtung der Teilchen ist abhängig vom Vorzeichen ihrer Ladung. Die positiven Ionen bewegen sich beim Anlegen einer Spannung zur Kathode, die negativen zur Anode. Unterschiedliche Nettoladungen und Größen bewirken eine unterschiedliche Beweglichkeit der Ionen, so daß eine Auftrennung der Ionen unterschiedlicher Mobilität im elektrischen Feld ermöglicht wird.

Im elektrischen Feld erfährt ein Ion eine beschleunigende Kraft \vec{F}_e entlang der Feldlinien:

$$\vec{F}_e = ze\vec{E} \quad (2.1)$$

z = Valenz des Ions

e = Elementarladung

\vec{E} = elektrische Feldstärke

Dieser Kraft entgegengesetzt wirkt die Reibungskraft \vec{F}_r auf das Ion.

$$\vec{F}_r = -f\vec{v}_{ep} \quad (2.2)$$

f = Reibungskoeffizient

\vec{v}_{ep} = elektrophoretische Geschwindigkeit

Im Fall eines sphärischen Teilchens kann der Reibungskoeffizient durch $f = 6\pi\eta r$ ersetzt werden (Stokes Gesetz), so daß sich für die Reibungskraft der folgende Ausdruck ergibt:

$$\vec{F}_r = 6\pi r\eta\vec{v}_{ep} \quad (2.3)$$

$$\begin{aligned}\eta &= \text{Viskosität} \\ r &= \text{Stokes'scher Radius}\end{aligned}$$

Im Gleichgewicht bewegt sich das Teilchen mit der konstanten elektrophoretischen Geschwindigkeit \vec{v}_{ep} :

$$\vec{v}_{ep} = \frac{ze\vec{E}}{6\pi r\eta} \quad (2.4)$$

Normiert man die elektrophoretische Geschwindigkeit auf das elektrische Feld, so erhält man als Ausdruck für die Mobilität μ_{ep} :

$$\mu_{ep} = \frac{|\vec{v}_{ep}|}{|\vec{E}|} \quad (2.5)$$

$$= \frac{ze}{6\pi r\eta} \quad (2.6)$$

Ein Zusammenhang zwischen der elektrophoretischen Mobilität und der Masse m ergibt sich, wenn man den Stokes'schen Radius mit $r = \sqrt[3]{\frac{3m}{4\rho\pi}}$ ersetzt:

$$\mu_{ep} = \frac{ze}{6\pi\eta} \left(\sqrt[3]{\frac{4\rho\pi}{3m}} \right) \quad \text{mit } \rho = \text{Dichte} \quad (2.7)$$

Die elektrophoretische Mobilität ist eine charakteristische Größe für das betreffende Ion, da sie von der Ladung des Teilchens und der Größe abhängt. Auch die Eigenschaften des Trennmediums (Viskosität, pH-Wert, Konzentration, ...) beeinflussen die Beweglichkeit. Zum Beispiel bewirkt die Wahl des pH-Wertes bei Proteinen eine Änderung der Nettoladung des Teilchens (siehe Kapitel 2.6).

Die Abbildung 2.1 veranschaulicht exemplarisch die Migration von Ionen im elektrischen Feld. Für die Beschreibung der Teilchenbewegung ist vereinfacht angenommen worden, daß es zu keiner Wechselwirkung zwischen den geladenen Teilchen und den Ionen des Elektrolyts kommt.

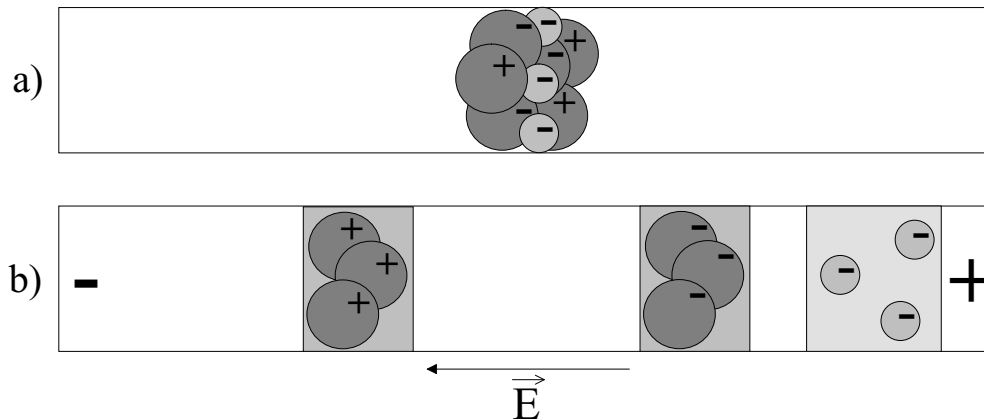


Abbildung 2.1: Trennung durch Elektrophorese

Die negativen Ionen werden unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes \vec{E} zur Anode hin beschleunigt, die positiven zur Kathode. Aufgrund ihrer geringeren Masse besitzen die kleineren Ionen eine höhere elektrophoretische Geschwindigkeit als die größeren.

2.2 Elektroosmotischer Fluß

Die von einem elektrischen Feld hervorgerufene Bewegung von Elektrolyten relativ zur geladenen Oberfläche bezeichnet man als elektroosmotischen Fluß (EOF). Dieses Phänomen ist in der Kapillar- und Mikrochip-Elektrophorese von großer Bedeutung, seitdem Jorgenson et al. 1981 den Nutzen des EOFs als Transportmöglichkeit einer Lösung, d.h., ohne die Verwendung von Pumpen und Ventilen, demonstrierten [15–17]. In den Anfängen der Kapillarelektrophorese hatte man sich noch bemüht, den elektroosmotischen Fluß zu unterbinden, da man in ihm den Grund für schlechtere Auflösung sah [18].

Die Größe und Richtung des resultierenden EOFs hängt vom Mikrochip Material bzw. der Oberfläche sowie der Zusammensetzung der Elektrolytlösung ab. Die in dieser Arbeit verwendeten Mikrochips werden aus Polydimethylsiloxan und Glas hergestellt (siehe Kapitel 2.3). Für beide Materialien kommt es bei Kontakt mit einer Elektrolytlösung zu einer Ionisation der Silanolgruppen an der Oberfläche. Abhängig vom pH-Wert der Elektrolytlösung ergeben sich positiv geladene $SiOH_2^+$, neutrale $SiOH$ oder negativ geladene SiO^- -Gruppen an der Kanalinnenwand des Mikrochips. Ab einem pH-Wert größer als 2

liegt eine negative Oberflächenladung vor [18]. Die Ionen der Elektrolytlösung werden elektrostatisch von dieser geladenen Oberfläche angezogen. Es bildet sich eine elektrochemische Doppelschicht aus. Abbildung 2.2 zeigt die Ladungsverteilung im Bereich der Innenseite des Kanals. Die dargestellte Doppelschicht setzt sich nach dem Stern-Modell

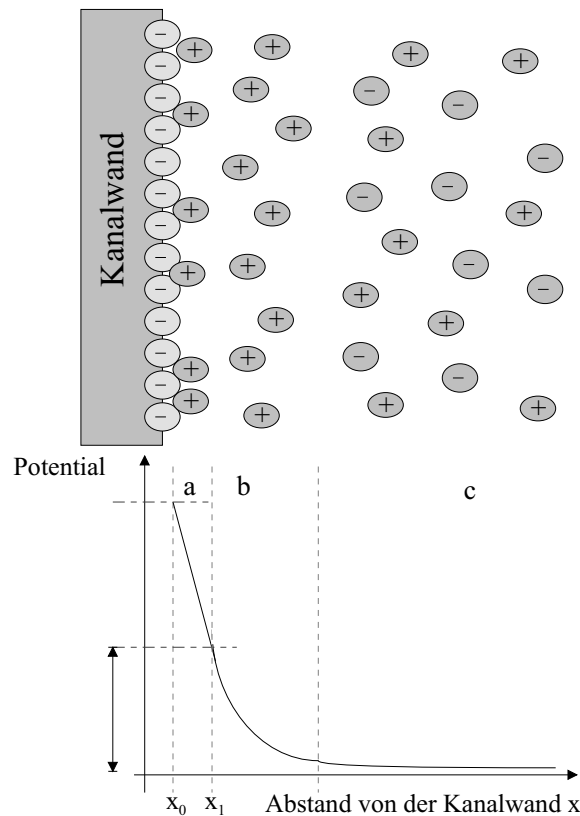


Abbildung 2.2: Stern-Modell der Doppelschicht an einer geladenen Grenzfläche

Die durch Dissoziation der Silanolgruppen entstandenen negativen Oberflächenladungen an der Mikrochipwand bewirken das Ausbilden einer Doppelschicht. Diese Doppelschicht unterteilt sich in eine starre (a) und diffuse Schicht (b). In der starren Schicht ergibt sich ein linearer Potentialabfall, in der diffusen ein exponentieller.

aus einer starren und einer diffusen Schicht zusammen. Die starre Schicht (a), direkt an der Oberfläche, besteht aus den adsorbierten positiven Ionen der Elektrolytlösung, die die negative Oberflächenladung auf der Lösungsseite teilweise neutralisieren. Der resultierende Potentialabfall ist linear. Die Dicke der Schicht liegt in der Größenordnung

der adsorbierten Ionen. An die starre Schicht schließt sich die diffuse Schicht (b) an. In ihr können sich die positiven Gegenionen thermisch bewegen. Das elektrische Potential direkt an der Grenzfläche zwischen starrer Schicht und diffuser Schicht bezeichnet man als ζ -Potential. Innerhalb der diffusen Schicht fällt das Potential exponentiell ab. Die Doppelschicht besitzt abhängig vom Elektrolyten und dessen Konzentration eine Breite von wenigen nm (z.B. 3.04 nm für eine 10 mM symmetrische Lösung $[1Z^+:1Z^-]$) [19]. Der Bereich (c) außerhalb der Doppelschicht der Elektrolytlösung ist beinahe potentialfrei.

Legt man ein elektrisches Feld parallel zur geladenen Oberfläche an, so bewegen sich die positiven Ionen der diffusen Doppelschicht entlang der Feldlinien. Durch Impulsübertragungen in der laminar strömenden Flüssigkeit ergibt sich ein Fluß der gesamten Lösung in Richtung der Kathode. Die Geschwindigkeit \vec{v}_{eof} dieses Flusses ist proportional zur elektrischen Feldstärke \vec{E} :

$$\vec{v}_{eof} = \mu_{eof} \vec{E} \quad (2.8)$$

Die elektroosmotische Mobilität μ_{eof} ergibt sich als Proportionalitätsfaktor, für den sich folgende Beziehung aufstellen läßt (Herleitung dieses Ausdruckes im Anhang A.1):

$$\mu_{eof} = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \quad (2.9)$$

Die elektroosmotische Mobilität μ_{eof} hängt demnach vom ζ -Potential, der Dielektrizitätskonstante ε und der Viskosität η der Lösung ab. Veränderungen des pH-Wertes und der Ionenkonzentration der Lösung beeinflussen das ζ -Potential und somit auch die elektroosmotische Mobilität.

Eine Erhöhung des pH-Wertes der Elektrolytlösung läßt die Anzahl der dissoziierten Silanolmoleküle auf der Oberfläche ansteigen. Die Nettoladung vergrößert sich und infolgedessen das ζ -Potential. Verwendet man eine hohe Ionenkonzentration, so verringert sich das ζ -Potential, da eine größere Anzahl von Gegenionen zum Ausgleich der negativen Oberflächenladung zur Verfügung steht.

Neben dem Flüssigkeitstransport hat der EOF den Vorteil, daß er ein stempelförmiges Geschwindigkeitsprofil aufweist, da die elektroosmotische Geschwindigkeit bis auf den Bereich der diffusen Schicht über den gesamten Querschnitt des Mikrokanals konstant ist. Die mathematische Formulierung dieses Zusammenhanges ist detaillierter im Anhang A.1 dargestellt. Abbildung 2.3 zeigt das stempelförmige Profil des EOFs im Vergleich zum parabelförmigen Profil des hydrodynamischen Flusses. Der Vorteil des stempelförmigen Profils liegt in der geringen Dispersion der Probe. Die Gruppe um

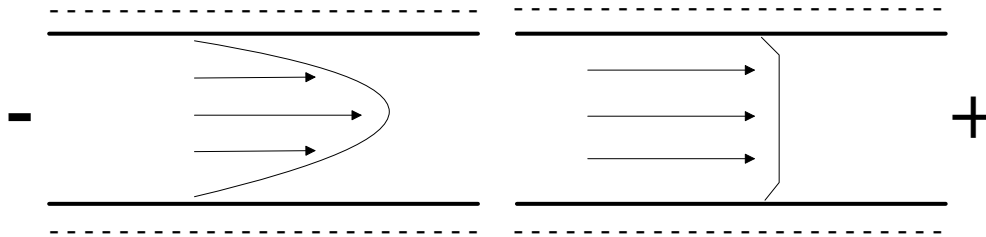


Abbildung 2.3: Vergleich zweier verschiedener Strömungsprofile

(a) parabelförmiges Flußprofil des hydrodynamischen Flusses; (b) stempelförmiges Flußprofil des elektroosmotischen Flusses

Locascio bestätigte diese Aussage durch Visualisierung des elektroosmotischen und hydrodynamischen Flußprofils mit „gecageten“ Fluoreszenzfarbstoffen [20, 21].

Aufgrund der essentiellen Rolle des elektroosmotischen Flusses in der Mikrochip-Elektrophorese ist es wichtig, die elektroosmotische Mobilität von Pufferlösungen messen zu können. Dazu existieren verschiedene Möglichkeiten, die im Folgenden kurz skizziert werden.

Im Fall der Neutralmarker Methode basiert die Ermittlung von μ_{eof} auf der Messung der Migrationszeit eines ungeladenen Moleküls (Aceton, Benzol). Jenes wandert im elektrischen Feld auf Grund seiner Neutralität direkt mit der elektroosmotischen Geschwindigkeit. Ein Problem dieser Methode liegt in der möglichen Adsorption des Neutralmarkers [22]. Langsame Mobilitäten lassen sich durch eine Kombination der Neutralmarker Methode mit einer druckgetriebenen Mobilisierung messen [23].

Bei einer anderen Methode wird der durch den elektroosmotischen Fluß verursachte Flüssigkeitsmengenunterschied in einem der Pufferreservoirs mit Hilfe einer Waage registriert und darüber die Mobilität bestimmt [24]. Der Nachteil dieser Methode liegt in dem für die technische Umsetzung erforderlichen Aufwand.

Die in dieser Arbeit verwendete Methode von Huang et al. [25] beruht auf der Aufnahme der Stromkennlinie, während eine Pufferlösung elektroosmotisch durch den Kanal gepumpt wird.

Zunächst wird ein Mikrokanal per Kapillarkraft mit einer Pufferlösung der Konzentration c_0 gefüllt. Anschließend wird eine Spannung an die Reservoirs angelegt und die Stromkennlinie aufgenommen. Diese entspricht einer Horizontalen, da bei gleicher Ionen-

konzentration (c_0) im Kanal beim Anlegen einer Spannung der Strom konstant bleibt. In Reservoir 1 wird nun die Pufferlösung gegen eine schwächer konzentrierte Lösung $c_1 = 0,9 \cdot c_0$ ausgetauscht. Aufgrund der negativen Ladung der Mikrokanalwände führt eine positive Spannung an Reservoir 1 zu einem elektroosmotischen Fluß Richtung Reservoir 2. Die schwächer konzentrierte Pufferlösung migriert daher unter Einfluß des elektrischen Feldes in den Kanal hinein und verdrängt die höher konzentrierte. Die Folge ist eine Änderung des Gesamtwiderstands des Kanals. Dieses spiegelt sich im zeitlichen Verlauf der Stromstärke als Abfall wieder (siehe Abb. 2.4). Ist der gesamte Kanal mit der niedrigeren Pufferlösung c_1 gefüllt, bleibt die Stromstärke konstant.

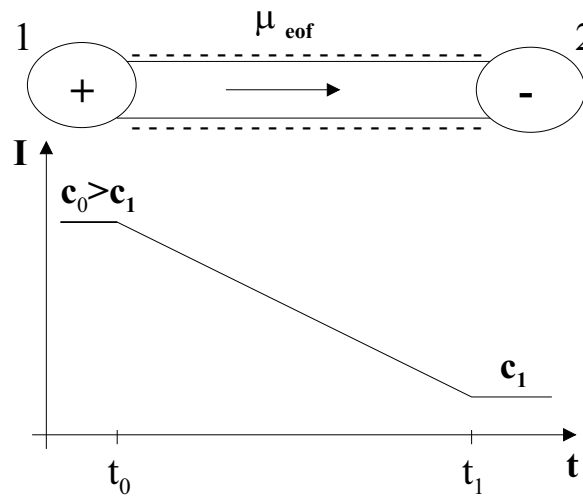


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Stromkennlinien Methode
Bei gleicher Ionenkonzentration (c_0) der Pufferlösung im Kanal bleibt beim Anlegen einer Spannung der Strom konstant. Tauscht man in Reservoir 1 die Ionenkonzentration gegen eine geringer konzentrierte c_1 aus, so sinkt der Strom, bis die Pufferflüssigkeit elektroosmotisch das andere Reservoir erreicht hat. Die Stromstärke bleibt dann unverändert.

Das Zeitintervall $\Delta t = t_1 - t_0$ gibt die Zeit an, die benötigt wird, den gesamten Kanal mit der Pufferlösung der Konzentration c_1 elektroosmotisch zu füllen. Da die Länge L_K des Kanals und die angelegte Spannung U bekannt sind, kann die elektroosmotische Mobilität μ_{eof} mit Hilfe der Beziehungen $\mu_{eof} = v_{eof}/E$ und $v_{eof} = L_K/\Delta t$ bestimmt werden zu:

$$\mu_{eof} = \frac{L_K^2}{U \Delta t} \quad \text{mit } E = \frac{U}{L_K} \quad (2.10)$$

Ein Vergleich der Neutralmarker Methode mit der Stromkennlinien-Methode zeigt, daß es keine signifikanten Unterschiede gibt [25]. Aufgrund ihrer einfachen Ausführung hat sich letztere Methode speziell in der Mikrochip-Elektrophorese etabliert und wird von vielen Gruppen verwendet [26–28].

2.3 Mikrochipherstellung

Für die Herstellung von Mikrochips sind zu Beginn Glas und Quarz als Material verwendet worden, da ein Großteil der Erfahrungen aus der Mikroelektronikindustrie bezüglich Photolithographie und Ätzen auf diese Materialien übertragen werden konnten [8, 29]. Neben den optischen Eigenschaften dieser Mikrochips, die die Nutzung der Laser-induzierten Fluoreszenz als Detektionsmethode ermöglichen, konnten auch die aus der Kapillarelektrophorese gewonnenen Kenntnisse zu den Oberflächeneigenschaften weitestgehend übernommen werden [30]. Als nachteilig erwiesen sich die hohen Herstellungskosten [30, 31]. Alternativ nutzt man daher auch Polymermaterialien zur Herstellung von Mikrochips. Der Vorteil liegt in den geringen Fertigungskosten, die eine einmalige Verwendung sowie die Massenproduktion ermöglichen [30, 31]. Für die Herstellung existieren mittlerweile verschiedene Methoden: *Laserablation* [26], *Spritzguß* [32], *Reliefprägen* [33] und *Abformen* [34, 35].

Bei der Laserablation werden die Mikrostrukturen in den Polymermaterialien durch leistungsstarke Laser erzeugt, allerdings ist dieses Verfahren sehr kostspielig [26, 31]. Die anderen drei Methoden unterscheiden sich nur in der Herstellungsart der Kopien vom Master, der nach den herkömmlichen Photolithographie Methoden angefertigt wird [31]. Bei der Spritzguß-Methode wird das Polymer geschmolzen und in einer Kammer gegen den Master gespritzt [31]. Im Fall des Reliefprägens werden das Polymer und der prägende Master erhitzt und dann zusammengefügt [31]. Für die Abform-Methode wird das Polymer über den Master gegossen und ausgehärtet. Letztere ist die am einfachsten durchführbare Methode, erfordert aber Herstellungszeiten im Bereich von Stunden, während die Spritzguß-Methode und das Reliefprägen im Sekunden- bzw. Minuten-Bereich liegen [31].

In dieser Arbeit ist die Abform-Methode verwendet worden. Als Polymer erweist sich das Polydimethylsiloxan (PDMS) aufgrund seiner Eigenschaften als attraktives Material für diese Zwecke [35–41]. Neben der chemischen Stabilität (Temperaturbereich: -55° bis 200°) und der einfachen Handhabung ist PDMS optisch transparent bis in den UV-Bereich [6, 40]. PDMS ist darüber hinaus chemisch inert, nicht toxisch und

kostengünstig, was den Einsatz in diesem Gebiet begünstigt [6, 40].

PDMS besteht aus einem Siloxan-Oligomer und dem Vernetzer, welche nach Polymerisation das Elastomer bilden. Der Herstellungsprozeß der Mikrostrukturen ist schematisch in Abbildung 2.5 dargestellt. In Teilbild (a) ist der Silizium-Masterwafer, der das invertierte Relief der herzustellenden Mikrostruktur aufweist, zu sehen. Im nächsten Prozeßschritt (b) wird die PDMS-Mischung über den Wafer gegossen. Nach der Aushärtung erfolgt die Ablösung des PDMS vom Masterwafer. Abbildungsausschnitt (c) zeigt die abgeformte Mikrostruktur. Anschließend werden Reservoirlöcher am Ende eines jeden Kanals in das PDMS gestanzt (d). Als Deckplatte zur Verschließung der Kanalstruktur dienen Substrate wie Glas- bzw. Quarzobjektträger und PDMS (e). Über die Reservoirlöcher erfolgt die Flüssigkeitszufuhr zu den Kanälen sowie die elektrische Kontaktierung. Permanente Versiegelung des Substrats mit dem PDMS wird durch Behandlung mit reaktivem Sauerstoff erreicht. Für die Behandlung werden PDMS und Substrat UV-Licht ausgesetzt. Dabei oxidieren die durch UV-Licht erzeugten Sauerstoffradikale die $-OSi(CH_3)_2O$ -Gruppen an der Oberfläche des PDMS zu Silanolgruppen. Im Fall von PDMS und Glas als Deckplattenmaterial geht man davon aus, daß beim Zusammenfügen kovalente Si-O-Si-Bindungen die irreversible Versiegelung zwischen den beiden Bestandteilen verursachen [35]. Zusätzlich reinigt die Behandlung die Oberflächen.

Ohne Verwendung von reaktivem Sauerstoff können PDMS und Substrat wieder voneinander getrennt werden, was die wiederholte Nutzung der Mikrostruktur ermöglicht [35]. Der Nachteil besteht darin, daß häufig Lecks zwischen Substrat und PDMS auftreten. Der enorme Vorteil der Sauerstoffbehandlung von PDMS ist die Bildung einer hydrophilen Oberfläche, welche das einfache Füllen der Kanäle mit Flüssigkeit ermöglicht. Des weiteren tragen die durch Oxidation entstandenen Silanolgruppen zu einer Verstärkung des elektroosmotischen Flusses bei (Kapitel 2.2) [27].

Diese Eigenschaften und die kostengünstige Herstellung der PDMS Kanalsysteme fördern die Etablierung von PDMS gegenüber Glas als Material [9, 27, 34, 35]. Neben dem Einsatz von PDMS in der Mikrochip-Elektrophorese wird das Elastomer auch zur Herstellung von Mikrofluidik-Netzwerken (μFN) eingesetzt [41]. Eine weitere Anwendung findet PDMS in der Softlithographie, z.B. beim Mikrokontakt-Drucken (μCP) [42] oder beim Mikroformen in Kapillaren (MIMIC) [43].

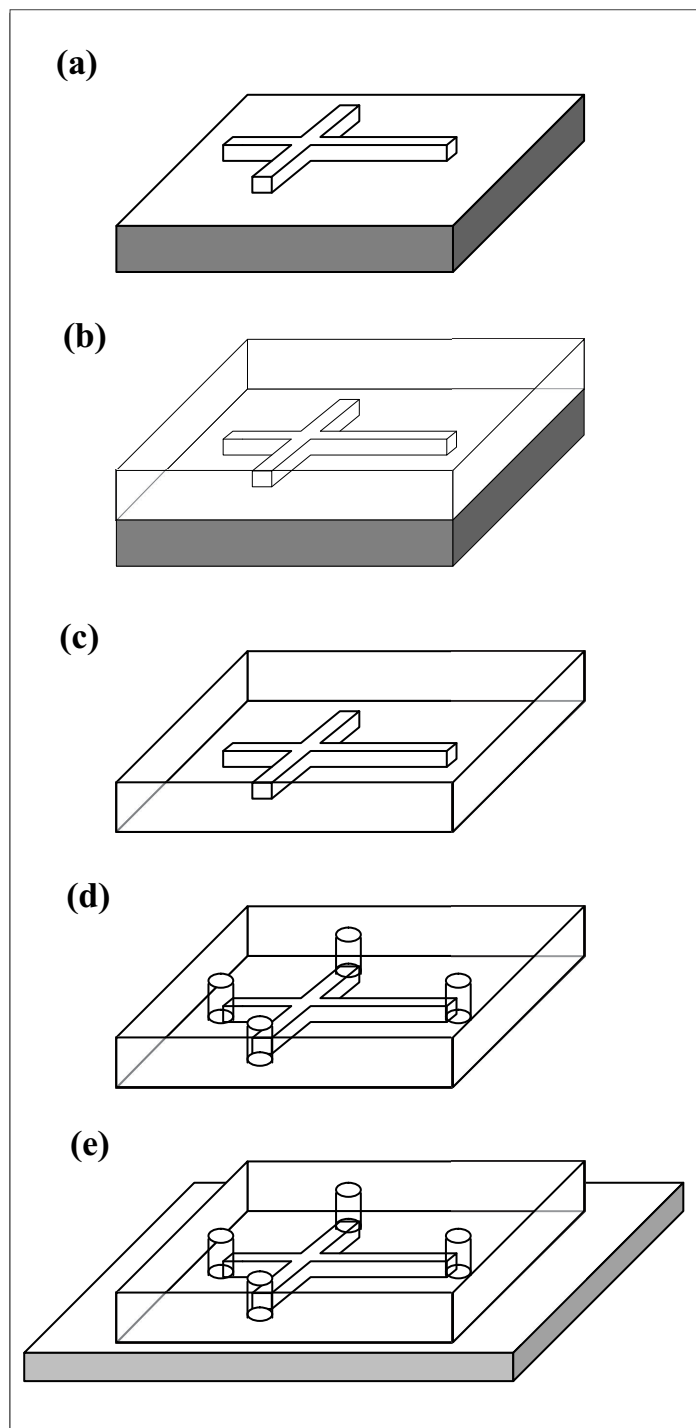


Abbildung 2.5: Einzelne Prozessschritte der Mikrokanalherstellung

(a) Silizium-Wafer mit dem invertierten Relief; (b) mit PDMS übergossene Mikrokanalvorlage; (c) vom Master abgeformte PDMS Mikrokanalstruktur; (d) PDMS Mikrokanalsystem mit den gestanzten Reservoirlöchern; (e) PDMS Mikrochip, bestehend aus dem PDMS Mikrokanal und dem Glasobjektträger

2.4 Mikrochip-Elektrophorese

Bei der Mikrochip-Elektrophorese handelt es sich um eine häufig verwendete Trennmethode [10, 44], da sie neben ihrer leichten Handhabung das Potential zur Weiterentwicklung in Richtung miniaturisierter chemischer Analyseeinheiten (μ -TAS) aufweist [2, 6, 8, 31]. Die Trennmethode basiert auf den unterschiedlichen Mobilitäten der zu untersuchenden Analyten.

Für die Mikrochip-Elektrophorese wird die Mikrostruktur mit einer einheitlichen Elektrolytlösung gefüllt. Diese gewährleistet den Stromtransport in den Kanälen. Unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes tritt in den Mikrokanälen neben der Migration der Ionen eine Bewegung der flüssigen Phase auf. In der Regel überwiegt der elektroosmotische Effekt den elektrophoretischen, so daß die Trennung von neutralen Teilchen und Ionen unterschiedlicher Ladung ermöglicht wird. Die effektive Gesamtgeschwindigkeit \vec{v} der Analyt-Ionen ergibt sich somit aus der Summe der elektrophoretischen \vec{v}_{ep} und elektroosmotischen Geschwindigkeit \vec{v}_{eof} :

$$\begin{aligned}\vec{v} &= \vec{v}_{eof} + \vec{v}_{ep} \\ &= (\mu_{eof} + \mu_{ep})\vec{E}\end{aligned}\tag{2.11}$$

In Abbildung 2.6 ist dieser Zusammenhang dargestellt. Aufgrund der negativen Oberflächenladungen der Mikrokanalwände bewirkt das Anlegen einer Spannung einen elektroosmotischen Fluß Richtung Kathode. Kationen werden daher zuerst vom Detektor registriert, da sich ihre elektrophoretischen und elektroosmotischen Geschwindigkeitskomponenten positiv überlagern. Danach gelangen die ungeladenen Teilchen, die sich mit der elektroosmotischen Geschwindigkeit fortbewegen, zum Detektor. Die Anionen werden zuletzt detektiert, da der elektrophoretische Geschwindigkeitsvektor entgegen dem elektroosmotischen Vektor zeigt.

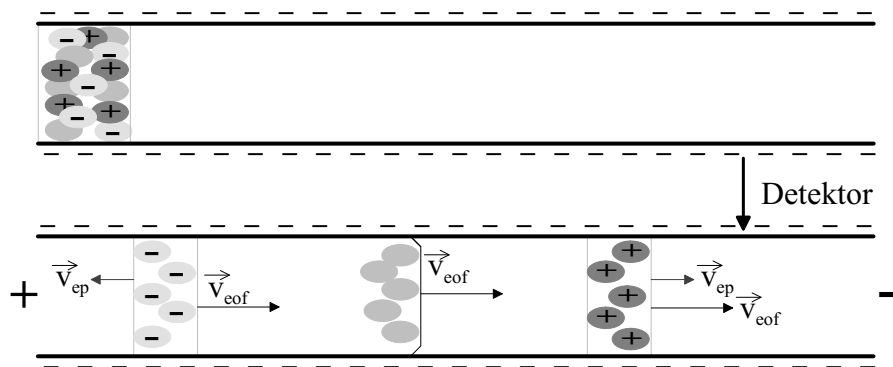


Abbildung 2.6: Auftrennung der Analytprobe in einzelne Migrationszonen
*Bewegung der Ionen und Neutrals im elektrischen Feld aufgrund der Elektro-
 phorese und Elektroosmose*

2.4.1 Injektionsmethoden

Viele Parameter der herkömmlichen Kapillarelektrophorese können trotz der Skalierung auf Mikrochipformat übernommen werden. Dies trifft allerdings nicht für die Injektion zu. Auf Mikrochips wird die Injektion durch ein Kreuzungs-Design erzielt. Ein Kanal fungiert dabei als Zulieferer der Probenflüssigkeit in den Kreuzungsbereich, während entlang des anderen die Trennung nach den verschiedenen Mobilitäten erfolgt. Das Kreuzungs-Design bietet dabei den Vorteil, eine definierte Probenmenge injizieren zu können [9, 45]. Abbildung 2.7 zeigt ein solches Mikrochip-Layout.

Der Mikrochip-Elektrophorese Vorgang ist im einfachsten Fall in zwei Schritte unterteilt: *die Injektion* (a) und *die Trennung* (b). Im Injektionsschritt wird die Probe durch eine angelegte Spannung aus Reservoir 3 bis über den Kreuzungsbereich hinaus in das Reservoir 4 hineingepumpt. Dieser Vorgang erstreckt sich üblicherweise über wenige Sekunden. Ein elektrisches Feld entlang des Trennkanals ermöglicht die Injektion des Kreuzungsvolumens in den Kanal 2 (Trennungsphase). Diese einfache Injektionsmethode wurde in den ersten Mikrochip-Systemen verwendet [12, 13].

Nach kurzer Zeit wurde sie jedoch durch die heute häufig benutzte *pinched* Methode abgelöst [46–49]. Der Vorteil der *pinched* Methode liegt in der Realisierung definierter Probenvolumina im Kreuzungsbereich [9, 44]. Dieses wird durch das Anlegen einer zusätzlichen Spannung an den Reservoirs 1 und 2 im Injektionsvorgang (a) erreicht.

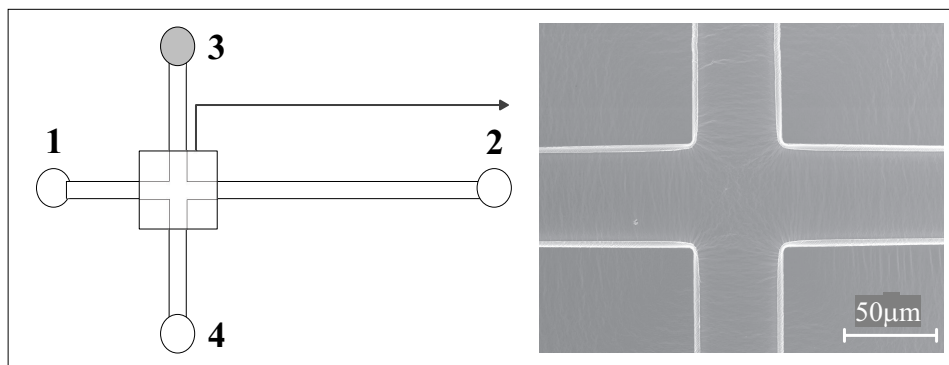


Abbildung 2.7: links: Schema eines Mikrochip-Layouts, rechts: eine Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahme der Kreuzung

Üblicherweise dauert ein solcher Vorgang einige Sekunden (ca. 30s), kann aber auch beliebig verlängert werden. Abbildung 2.8 zeigt schematisch die Injektion nach der *pinched* Methode. Im Trennvorgang (b) wird eine Spannung an Reservoir 1 angelegt, die

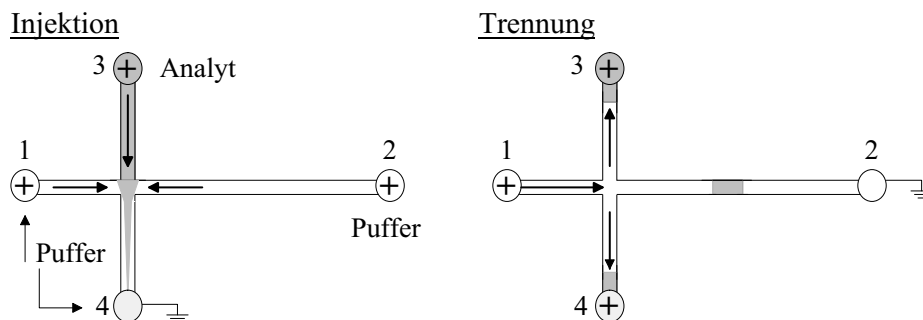


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der *pinched* Methode

Zur Einengung des Probenvolumens im Kreuzungsbereich werden zusätzlich zur Spannung an Reservoir 3 noch Spannungen an 1 und 2 angelegt. Im Trennungsschritt führt ein elektrisches Feld entlang des Trennungskanals zu einer Injektion des Kreuzungsvolumens in Kanal 2. Die Potentiale an Reservoir 3 und 4 verhindern das Nachlaufen der Probe in den Trennkanal. Die Pfeile stellen die Flußrichtung dar.

dazu führt, daß das Injektionsvolumen im Kreuzungsbereich in den Separationskanal 2 injiziert wird. Die Potentiale an Reservoir 3 und 4 verhindern das Nachlaufen der Probenflüssigkeit aus Kanal 3 und 4 in den Trennungskanal [27, 50].

Neben der erwähnten Methode kann auch die *floating* Methode zur Injektion verwendet werden [9, 44, 51, 52]. Im Unterschied zur *pinched* Methode wird bei dieser Methode im Pumpvorgang kein Potential an die Reservoirs 1 und 2 gelegt. Die Analytlösung fließt daher ungehindert in die Kanäle 1 und 2, siehe Abb. 2.9. Die Injektionszeit beträgt üblicherweise nur wenige Sekunden (≤ 10 s). Der Trennvorgang dieser Injektionsmethode ist äquivalent zur *pinched* Methode.

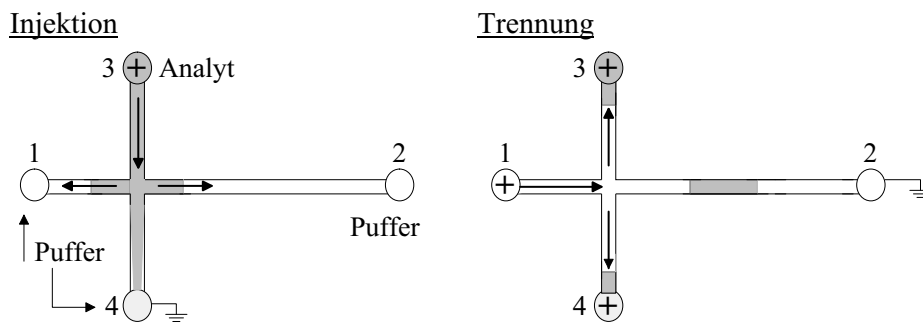


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der *floating* Methode

Im Injektionsschritt wird nur Spannung an Reservoir 3 angelegt. Die Probenflüssigkeit fließt daher auch in die Kanäle 1 und 2. Der Trennvorgang ist identisch mit dem der *pinched* Methode. Die Pfeile stellen die Flußrichtung dar.

Durch die Einengung der Probenflüssigkeit auf den Kreuzungsbereich garantiert die *pinched* Methode zum einen eine hohe Reproduzierbarkeit und zum anderen ein kleines Probenvolumen, was sich positiv auf die Effizienz der Messung auswirkt (siehe Kapitel 2.4.2; Gleichung (2.20)). Darüberhinaus ermöglicht sie aufgrund der variablen Injektionszeit die Untersuchung zweier Analyten mit großem Mobilitätsunterschied. Als Nachteil erweist sich die dadurch entstehende Verlängerung der gesamten Analysezeit (= Injektions- und Trennungszeit). Des weiteren wird für diese Methode nur ein geringes Fluoreszenzsignal durch die Injektion des kleinen Probenvolumens erreicht. Bei der *floating* Methode erhält man dagegen ein höheres Signal, was aber mit einem Verlust der Auflösung einhergeht. Aufgrund der kurzen Injektionszeiten ist die Analysezeit in diesem Fall gering [9, 44].

2.4.2 Effizienz des elektrophoretischen Systems

Die Integration der Kapillarelektrophorese auf Mikrochips hat zu einer Verbesserung der Trenneffizienz geführt. Für eine Quantifizierung dieser Aussage ist es erforderlich, Kriterien zu definieren, die die Effizienz des Mikrochip-Elektrophorese Systems darlegen. Bei der Wahl dieser Kriterien bedient man sich einiger Konzepte aus der Chromatographie [18].

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

$$N = \frac{L_D^2}{\sigma_T^2} \quad (2.12)$$

wobei L_D die Länge vom Injektions- bis zum Detektionspunkt darstellt. Die Effizienz der Messung wird durch mehrere Faktoren beeinflusst, die zu einer Verbreiterung der Signale führen. Diese Verbreiterung der gaußförmigen Signale wird durch die Varianz σ_T^2 beschrieben.

Effekte wie Diffusion, Injektion und Länge des Detektorfensters gehen in die Vergrößerung der Signalbreite ein, so daß sich σ_T^2 ergibt als:

$$\sigma_T^2 = \sigma_{diff}^2 + \sigma_{inj}^2 + \sigma_{det}^2 \quad (2.13)$$

Der Term σ_{diff}^2 beschreibt den Beitrag der molekularen Diffusion zur Gesamtvarianz. Der Ausdruck für σ_{diff}^2 lautet (Einstein-Gleichung) [18]:

$$\sigma_{diff}^2 = 2Dt \quad (2.14)$$

mit D = Diffusionskoeffizient und t = Migrationszeit vom Zeitpunkt der Injektion in den Separationskanal bis zur Detektion.

Die Varianz σ_{inj}^2 hängt von der Länge l_{inj} des in die Kreuzung injizierten Probenvolumens ab, da der Probenbereich eine endliche Länge besitzt [19]. Zusätzlich ergibt sich innerhalb der Injektionszeit t_{inj} durch Diffusion ein Beitrag zur Vergrößerung des Probenvolumens:

$$\sigma_{inj}^2 = \frac{l_{inj}^2}{12} + 2Dt_{inj} \quad (2.15)$$

Der Beitrag der Länge l_{det} des Detektionsvolumens zur Varianz lautet [19]:

$$\sigma_{det}^2 = \frac{l_{det}^2}{12} \quad (2.16)$$

In beiden Fällen, σ_{inj}^2 und σ_{det}^2 , wird angenommen, daß Injektions- und Detektionsvolumen jeweils ein rechteckiges Profil besitzen.

Insgesamt ergibt sich für die theoretische Plattenzahl N der nachfolgende Ausdruck [11, 44, 45, 53]:

$$\begin{aligned}
 N &= \frac{L_D^2}{\sigma_T^2} \\
 &= \frac{L_D^2}{\sigma_{diff}^2 + \sigma_{inj}^2 + \sigma_{det}^2} \\
 &= \frac{L_D^2}{2Dt + l_{inj}^2/12 + 2Dt_{inj} + l_{det}^2/12} \\
 &= \frac{L_D^2}{2D(t + t_{inj}) + (l_{inj}^2 + l_{det}^2)/12} \tag{2.17}
 \end{aligned}$$

Diese für die theoretische Plattenzahl N gewonnene Gleichung kann noch weiter umgeformt werden. Für die Migrationszeit t gilt:

$$t = \frac{L_D}{v} \tag{2.18}$$

Die Variable v beschreibt die Geschwindigkeit des Probenvolumens, d.h., die Überlagerung aus elektrophoretischer v_{ep} und elektroosmotischer Geschwindigkeit v_{eof} . Mit den Beziehungen $v = \mu E$ und $E = U/L_K$ ergibt sich für t :

$$t = \frac{L_D L_K}{\mu U} \quad \text{mit } \mu = \mu_{ep} + \mu_{eof} \tag{2.19}$$

mit L_K = Länge des Trennungskanals und U = an den Trennungskanal angelegte Spannung. Für die theoretische Plattenzahl N erhält man so:

$$N = L_D^2 \cdot \left[2D \left(\frac{L_D L_K}{\mu U} + t_{inj} \right) + (l_{inj}^2 + l_{det}^2) / 12 \right]^{-1} \tag{2.20}$$

Eine Erhöhung der Spannung U führt zu einem Anstieg der theoretischen Plattenzahl N und damit zu einer verbesserten Effizienz des Systems. Durch die Miniaturisierung, d.h. Kanalgrößen im μm -Bereich, ist es, bei Ausschluß von Signalverarbeitung durch Joulesche Wärme, möglich, hohe Spannungen zu verwenden und damit die Effizienz zu steigern [10]. Wie bereits bei den Injektionsmethoden erwähnt, wirkt sich eine kurze Länge l_{inj} des Injektionsvolumens positiv auf die theoretische Plattenzahl aus. Eine Erhöhung der elektroosmotischen Mobilität $\mu_{eof} = \mu - \mu_{ep}$ ist nur begrenzt förderlich, da die Auflösung dadurch limitiert wird [19].

Experimentell kann die theoretische Plattenzahl durch die folgende Beziehung ermittelt werden:

$$N = 5.54 \left(\frac{t}{w} \right)^2 \tag{2.21}$$

mit w = Halbwertsbreite des Signals [15, 18].

Alternativ zur theoretischen Plattenzahl N wird oftmals die Plattenhöhe H verwendet:

$$H = \frac{L_D}{N} \quad (2.22)$$

Die Qualität einer Trennung wird mittels der Auflösung R bestimmt. Die Auflösung ist ein Maß dafür, ob sich zwei ähnlich bewegende Analyten i und j soweit voneinander trennen lassen, daß sich keine Überschneidung der Signale ergibt:

$$R = \frac{x_i - x_j}{\frac{1}{2}(b_i + b_j)} \quad (2.23)$$

mit $x_{i,j}$ = Position der Signalmitten und $b_{i,j}$ = Breite des Signals an der Basislinie.

Ersetzt man $x_{i,j}$ durch $x_{i,j} = v_{i,j}t = \mu_{i,j}Et$ und nimmt die Beziehung $b_{i,j} = 4\sigma_{i,j}$ als Zusammenhang zwischen Breite und Varianz an, so ergibt sich für die Auflösung der Ausdruck:

$$R = \frac{(\mu_i - \mu_j)E\sqrt{t}}{2\sqrt{2}(\sqrt{D_i} + \sqrt{D_j})} \quad \text{mit } \mu_{i,j} = \mu_{i,j,ep} + \mu_{i,j,eof} \quad (2.24)$$

Dabei ist die Verbreiterung des Signals nur durch molekulare Diffusion hervorgerufen worden, d.h. $\sigma^2 = 2D_{i,j}t$. Untersucht man zwei Analyten vergleichbarer Diffusionskoeffizienten und Mobilitäten, so kann man den Diffusionskoeffizienten $D_{i,j}$ durch einen mittleren Diffusionskoeffizienten D_m ersetzen. Für die Auflösung R erhält man dann:

$$R = \frac{(\mu_i - \mu_j)E\sqrt{t}}{4\sqrt{2D_m}} \quad (2.25)$$

Ausschließlich ausgehend von molekularer Diffusion als Ursache für die Verbreiterung, kann für die theoretische Plattenzahl N der folgende Ausdruck formuliert werden:

$$\begin{aligned} N &= \frac{L_D^2}{\sigma_{diff}^2} && \text{mit } \sigma_{diff}^2 = 2Dt \\ &= \frac{L_D^2}{2Dt} && \text{mit } L_D = v_m t = \mu_m Et \\ &= \frac{\mu_m^2 E^2 t}{2D} \end{aligned} \quad (2.26)$$

wobei v_m bzw. μ_m eine mittlere Geschwindigkeit bzw. mittlere Mobilität beschreiben. Formt man letzteren zu einem Ausdruck für den mittleren Diffusionskoeffizienten D_m um und ersetzt D_m in Gleichung (2.25), so ergibt sich für die Auflösung R :

$$R = \frac{1}{4} \frac{(\mu_i - \mu_j)}{\mu_m} N^{1/2} \quad (2.27)$$

Bei ausschließlicher Berücksichtigung der molekularen Diffusion reduziert sich der Ausdruck (2.20) für die theoretische Plattenzahl N auf $N = \left(\frac{L_D \mu_m U}{2D_m L_K}\right)$. Substituiert man diesen Ausdruck in Gleichung (2.27), so erhält man für die Auflösung R :

$$R = \frac{1}{2} \left(\frac{\mu_i - \mu_j}{\mu_i + \mu_j} \cdot \sqrt{\frac{\mu_m}{2D_m L_K}} \right) \sqrt{L_D U} \quad (2.28)$$

mit $\mu_m = (\mu_i + \mu_j)/2$. Die Mobilitäten μ_i , μ_j , μ_m , der Diffusionskoeffizient D_m sowie die Kanallänge L_K sind Konstanten, so daß aus Gleichung (2.28) folgt, daß eine höhere Spannung U sowie eine größere Entfernung L_D zu einer verbesserten Auflösung führen. Eine zu starke Erhöhung der Mobilität hingegen verringert die Auflösung, da die Zeit für eine räumliche Trennung der Analyten zu kurz wird [19].

2.5 Fluoreszenz

Für die Detektion wird die durch Licht einer bestimmten Wellenlänge induzierte Emission betrachtet. Abbildung 2.10 zeigt das Jablonski-Diagramm, welches die Relaxationsprozesse aus einem elektronisch angeregten Zustand veranschaulicht.

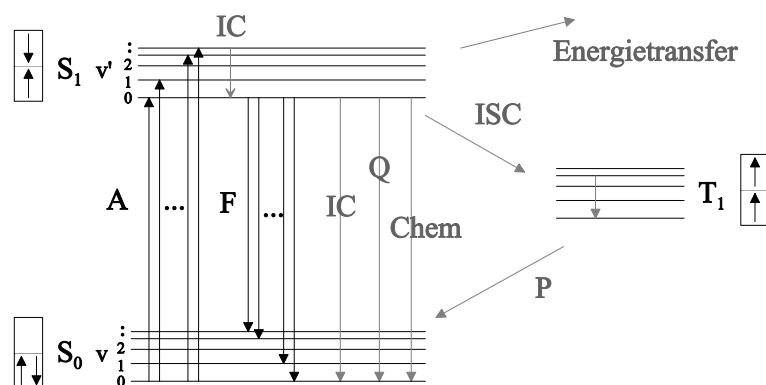


Abbildung 2.10: Darstellung des Jablonski-Diagramms

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

Vor seiner Anregung befindet sich das Molekül im Schwingungsgrundzustand S_0 ($v = 0$),

der mit zwei Elektronen mit antiparallelem Spin besetzt ist. Durch die Absorption eines Photons wird es in einen der Schwingungszustände v' des ersten angeregten elektronischen Zustandes S_1 (oder höher liegende S_i , $i \geq 2$) angehoben, wobei der Absorptionsprozeß im Mittel nur 10^{-15} s dauert. Die Auswahl der Schwingungszustände folgt dem Franck-Condon Prinzip. Aus diesen Zuständen gelangt das angeregte Molekül innerhalb von Picosekunden durch Stöße mit anderen Teilchen in das Schwingungsgrundniveau des ersten angeregten Zustandes S_1 (innere Umwandlung, engl. Internal Conversion). Von dort aus kehrt es unter Emission eines Photons in die Schwingungsniveaus des elektronischen Grundzustandes S_0 zurück, wobei die Besetzung der Schwingungszustände abhängig vom Franck-Condon Faktor unterschiedlich wahrscheinlich ist. Für die in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore Fluorescein und Fluoresceinisothiocyanat (FITC) liegt die Fluoreszenzlebensdauer im ns-Bereich [54]. Das emittierte Photon besitzt eine größere Wellenlänge als das absorbierte, was zu einer Rotverschiebung der Emissionslinie führt (Stokes-Shift). Neben der Aussendung eines Photons existieren noch weitere Relaxationsprozesse wie die innere Umwandlung (IC), die Energieübertragung auf andere Moleküle durch Stöße (Quenchen), der Energietransfer zwischen Molekülen (Förster-Transfer) und chemische Reaktionen. In manchen Fällen kommt es zu einem strahlungslosen Übergang aus dem angeregten Singulettzustand S_1 in Schwingungsniveaus des metastabilen Triplettzustandes T_1 (Interkombination, engl. Intersystem Crossing). Dieser Vorgang geht mit einer Spinumkehr des angeregten Elektrons einher. Durch eine erneute Spinumkehr gelangt das Molekül unter Emission eines Photons in den Grundzustand S_0 . Diesen Vorgang bezeichnet man als Phosphoreszenz [54, 55].

Die Möglichkeit der Anregung von Farbstoffen wie Fluorescein und FITC im UV/VIS Bereich basiert auf der Existenz aromatischer Ringstrukturen. Abbildung 2.11 zeigt die chemische Struktur von Fluorescein und FITC. Die Molekülorbitale von aromati-

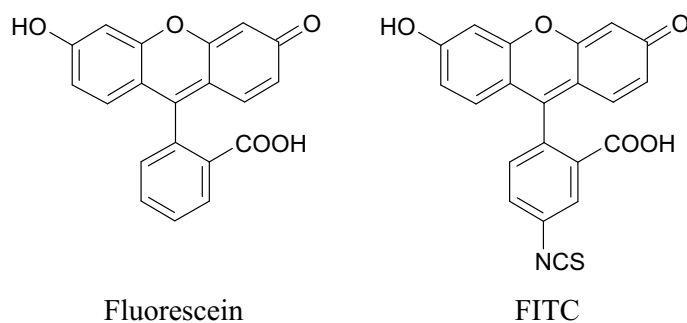


Abbildung 2.11: Strukturformel von Fluorescein und FITC

schen Ringsystemen erhält man durch Linearkombination der beteiligten Atomorbitale. Es resultieren σ - und π -Bindungen. Die σ -Bindungen bestehen aus sp^2 -Molekülorbitalbindungen, während die π -Bindungen eine Überlappung der p_z -Wellenfunktionen der C-Atome darstellen. Die elektronische Ladung der π -Orbitale konzentriert sich oberhalb und unterhalb der σ -Bindungsebene. Im Gegensatz zu den zwischen den Atomen lokalisierten σ -Elektronen besitzen die π -Elektronen eine hohe Beweglichkeit, die sich über das gesamte aromatische Ringsystem erstreckt (Delokalisierung). Der geringe Energieabstand zwischen π -Grundzustand (HOMO) und dem ersten angeregten Zustand (LUMO) ermöglicht eine Anregung durch sichtbare und UV-Strahlung. Durch Bindungen weiterer Atom- und Molekülgruppen ändert sich die elektronische Struktur des Rings und damit auch das Absorptions- und Emissionsverhalten [54, 56].

Die Quanteneffizienz eines Fluoreszenz-Farbstoffs ist definiert als das Verhältnis aus der Anzahl der emittierten Photonen I_E zu der Anzahl der absorbierten I_A :

$$Q = \frac{I_E}{I_A} \quad (2.29)$$

Für FITC und Fluorescein ergibt sich eine Quanteneffizienz von 0.3 – 0.85 [54].

2.5.1 Laser-induzierte Fluoreszenz

Die Verwendung geringer Probenvolumina zur Analyse ist aufgrund der Ersparnis von Material und Kosten von großem Interesse. Mit der Miniaturisierung der Analyse-Systeme hat man dieses Ziel weitestgehend erreicht. Typischerweise werden Probenmengen im Bereich nL bis pL verwendet, wobei die Konzentration von μM bis fM reichen. Zur Detektion der geringen Anzahl von Molekülen benötigt man eine empfindliche Methode. Die Laser-induzierte Fluoreszenz (LIF) erfüllt diese Forderung nach Sensitivität. Zusätzlich ermöglicht die Fokussierung des Lasers auf den Kanalbereich von einigen μm die durch den Detektor hervorgerufene Verbreiterung des Signals zu minimieren [57]. Des weiteren verlangt die Nutzung keine weitere Modifizierung des Chip Systems. Die LIF wird daher von vielen Gruppen als Detektionsmethode verwendet [7, 10, 58].

2.6 Proteine

Proteine erfüllen eine Vielzahl von Funktionen wie z.B. enzymatische Katalyse, Immunabwehr oder Transport in biologischen Systemen. Daher ist die Analyse von Proteinen zum Verständnis dieser Prozesse von großem Interesse.

Die Primärstruktur der Proteine besteht aus einer Kette von Aminosäuren. Eine Aminosäure ist eine Carbonsäure mit einer Aminogruppe sowie einem Rest R am α -C-Atom. Es existieren 22 natürliche Aminosäuren, deren Reste sich in ihrer Größe, Gestalt, Ladung und chemischen Reaktivität unterscheiden. In Lösung liegen die Aminogruppe bzw. die Carboxylgruppe der Aminosäure abhängig vom pH-Wert ionisiert vor. Bei saurem pH-Wert ist die Aminogruppe in den überwiegenden Fällen protoniert (NH_3^+), während in einer alkalischen Lösung die Carboxylgruppe dissoziiert ist (COO^-). Als dipolares Ion oder Zwitterion liegen Aminosäuren bei neutralem pH-Wert vor, da in diesem Fall beide Gruppen ionisiert sind (Abb. 2.12). Neben diesen beiden Gruppen

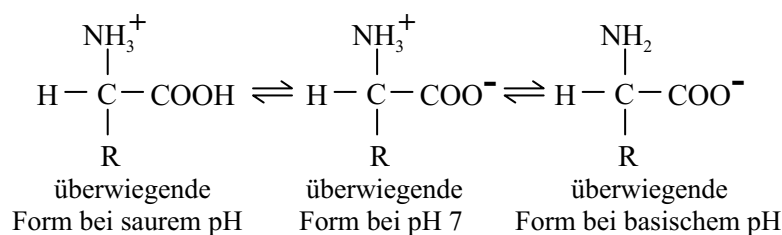


Abbildung 2.12: Ladungszustand einer Aminosäure in Abhängigkeit vom pH-Wert

hängt der Nettoladungszustand einer Aminosäure bei einem bestimmten pH-Wert auch von dem Ionisationsverhalten und -grad der Seitenkette ab. Lysin und Arginin haben z. B. basische Seitenketten, d.h., bei neutralem pH-Wert sind sie positiv geladen. Saure Seitenketten besitzen die Aminosäuren Asparaginsäure (Asp) und Glutaminsäure (Glu). Ihr Ladungszustand bei neutralem pH-Wert ist negativ.

Durch Kondensation der Aminogruppe einer Aminosäure mit der Carboxylgruppe einer anderen entsteht unter Wasserabspaltung eine Peptidbindung. Eine Kette von über Peptidbindungen verknüpften Aminosäuren bezeichnet man als Peptid ($N < 100$) oder Protein ($N \geq 100$). N beschreibt hier die Anzahl der Aminosäuren. Die Nettoladung von Proteinen hängt demnach von den Seitenketten der Aminosäuren sowie den endständigen α -Aminogruppen und -Carboxylgruppen ab. Die Abhängigkeit des Ladungszustandes vom pH-Wert, auch als amphoterer Zustand bezeichnet, ist charakteristisch für ein Protein. Der isoelektrische Punkt (pI) gibt den Zustand eines Proteins an, an dem sich positive und negative Ladungen kompensieren. Abbildung 2.13 zeigt zwei Proteine A und B, deren pI-Werte verschieden sind. Der Unterschied im pI-Wert resultiert aus einer unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung. Protein A besitzt einen pI-Wert ≤ 6 , so

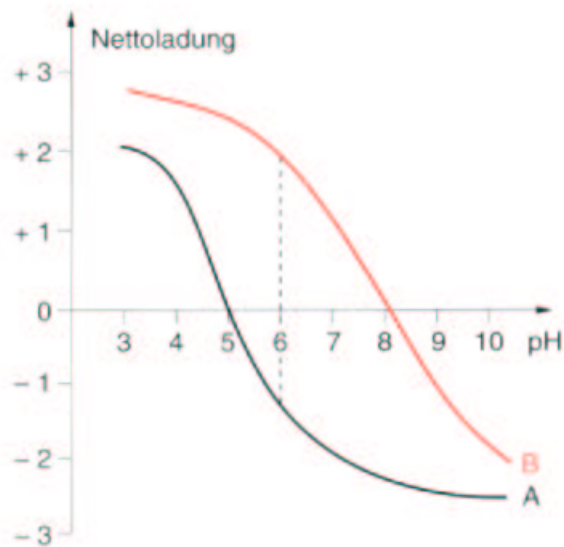


Abbildung 2.13: Nettoladung zweier Proteine A und B [59]

Der isoelektrische Punkt liegt für Protein A bei $pI=5$, für Protein B bei ungefähr $pI=8$. Für pH -Werte kleiner als der pI -Wert zeigen die Proteine ein kationisches Verhalten, während sie für größere Werte ein anionisches Verhalten aufweisen.

daß bei neutralem pH -Wert die negativ geladenen Aminosäureseiten­gruppen überwiegen. Solche Proteine bezeichnet man als saure Proteine. Bei pI -Werten ≥ 8 spricht man von basischen Proteinen. Verringert man den pH -Wert der Lösung, in dem sich die Proteine befinden, auf Werte kleiner als der pI -Wert, so sind die Proteine positiv geladen. Für pH -Werte größer als der pI -Wert besitzen die Proteine eine negative Nettoladung. Neben dem pH -Wert der Aminosäure-Ketten gibt es aber noch weitere Faktoren wie z.B. die Tertiärstruktur oder die Seitenketten-Phosphorylierung, die die Ladung eines Proteins beeinflussen können.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Fluorescein sowie FITC-Avidin wurden von Sigma-Aldrich (Deutschland) bezogen. Das mit FITC markierte Immunglobulin G (IgG) wurde von Dianova (Deutschland) erhalten. Von Fluka (Schweiz) wurde das Rinderserum (engl. Bovine Serum Albumine, BSA) erworben.

Zur Herstellung des TRIS-Puffers wurde Tris(hydroxymethyl)aminomethan von Fluka und Salzsäure von Novartis (Schweiz) verwendet. Die für den Phosphatpuffer benötigten Chemikalien Kaliumdihydrogenphosphat und Natronlauge wurden von J. T. Baker (Holland) bzw. Novartis erstanden.

Bei dem verwendeten Wasser handelte es sich um Reinst-Wasser von Milli-Q (Millipore, USA). Das zur Reinigung benutzte Ethanol stammte von Roth (Deutschland).

Für die elektrophoretischen Messungen wurden als Ausgangslösungen $100\mu\text{M}$ Farbstofflösungen (Fluorescein bzw. FITC) im jeweiligen Puffersystem (10mM Phosphatpuffer pH 7 oder 10mM TRIS-Puffer pH 8.2) hergestellt. Im Fall von FITC-IgG (3.5mol FITC pro 1mol IgG) wurde eine Ausgangslösung von $10\mu\text{M}$ in 10mM Phosphatpuffer angesetzt. Die Herstellung der Ausgangslösung für Avidin (3.2mol FITC pro 1mol Avidin) erfolgte entsprechend. Für die jeweiligen Messungen wurden die Ausgangslösungen in das verwendete Puffersystem umgepuffert und die erforderlichen Konzentrationen durch Verdünnung erzielt. Für die Beschichtung der Kanäle wurden 50mg BSA auf 1ml des jeweiligen Puffersystems gelöst. Zur Vermeidung von Verstopfungen der Kanäle mit Verunreinigungen sind alle Lösungen mit sterilen Filtern (Porengröße: $0,22\mu\text{m}$; Millipore) gefiltert worden.

3.2 Fluoreszenzdetektion

Abbildung 3.1 stellt den schematischen Aufbau des Anregungs- und LIF-Detektionssystems, welches auf einem invertierten Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Deutschland) realisiert wurde, dar. Für den Argon-Ionenlaser¹ (161C-010, Spectra Physics, Deutschland) bzw. die Quecksilberdampfampe (HBO 50W, Zeiss) als Anregungslichtquelle wird die Auflichteinheit des Axiovert 100 verwendet. Alternativ wird bei Gebrauch des Argon-Ionenlasers² von LaVision (532-MA-A01, Deutschland) ein Linsensystem, welches aus einer Zerstreuungs- und Sammellinse (Quarz Linsen: plankonkav $f = -50\text{ mm}$ und plankonvex $f = 50\text{ mm}$, Thorlabs, USA) besteht, benutzt. Die Kombination aus dem als Teleobjektiv fungierenden Linsensystem und dem Objektiv (LD Achromat 20x Korr, Zeiss) verringert den Laserpunktdurchmesser auf die Größe des Mikrokanals ($50\ \mu\text{m}$). Im Fall des Argon-Ionenlasers (Spectra Physics) und der Quecksilberdampfampe läßt sich das durch das Objektiv auf den Mikrochip fallende Anregungslicht durch eine Feldblende, integriert in der Auflichteinheit, auf die Maße des Mikrokanals verkleinern. Vor dem Objektiv befinden sich noch ein Anregungsfilter (BP 450-490nm, Zeiss), der nur den Wellenlängenbereich 450-490nm transmittiert, und ein das Anregungslicht umlenkender dichroitischer Spiegel. Der x-y-Tisch ermöglicht die manuelle Auswahl eines beliebigen Punktes der Mikrokanalstruktur als Detektionsfenster. Die emittierte Fluoreszenz wird durch das Objektiv gesammelt und fällt durch den dichroitischen Spiegel (FT 510, Zeiss), der das anregende Laserlicht blockiert, sowie einem Emissionsfilter (LP 520nm, Zeiss) auf den Photomultiplier (H6240, Hamamatsu, Japan). Die Tubuslinse dient der Fokussierung der Fluoreszenz auf den Detektor, während die Lochblende ($200\ \mu\text{m}$) den Streulichtanteil am Untergrundsignal verringert. Zur Optimierung der Fluoreszenzausbeute wird der Photomultiplier (PM) mittels x-y-Verstellschrauben ausgerichtet. Der Strahlteiler vor dem Okular bietet die Möglichkeit der Beobachtung und der Kontrolle des Vorganges mit einer Kamera (CCD-DMK 3002-IR, The Imaging Source, Deutschland oder Imager3, LaVision) oder dem Auge. Über die Platinelektroden erfolgt die Spannungsversorgung des Mikrokanalsystems.

Die Detektion der Photonen wird mit einem Photomultiplier und einer externen Photonenzähleinheit (C3866, Hamamatsu) durchgeführt. Jeweils zehn Pulse werden in der Zählereinheit zusammengefaßt. Die Erfassung der Daten erfolgt mittels eines Labview Programmes (National Instruments, USA). Dieses zählt die Pulse, welche die externe Photonenzähleinheit während eines variablen Zeitfensters liefert. Die in der Zählereinheit

¹488 nm, 2-20 mW

²457-514 nm, 25-500 nm

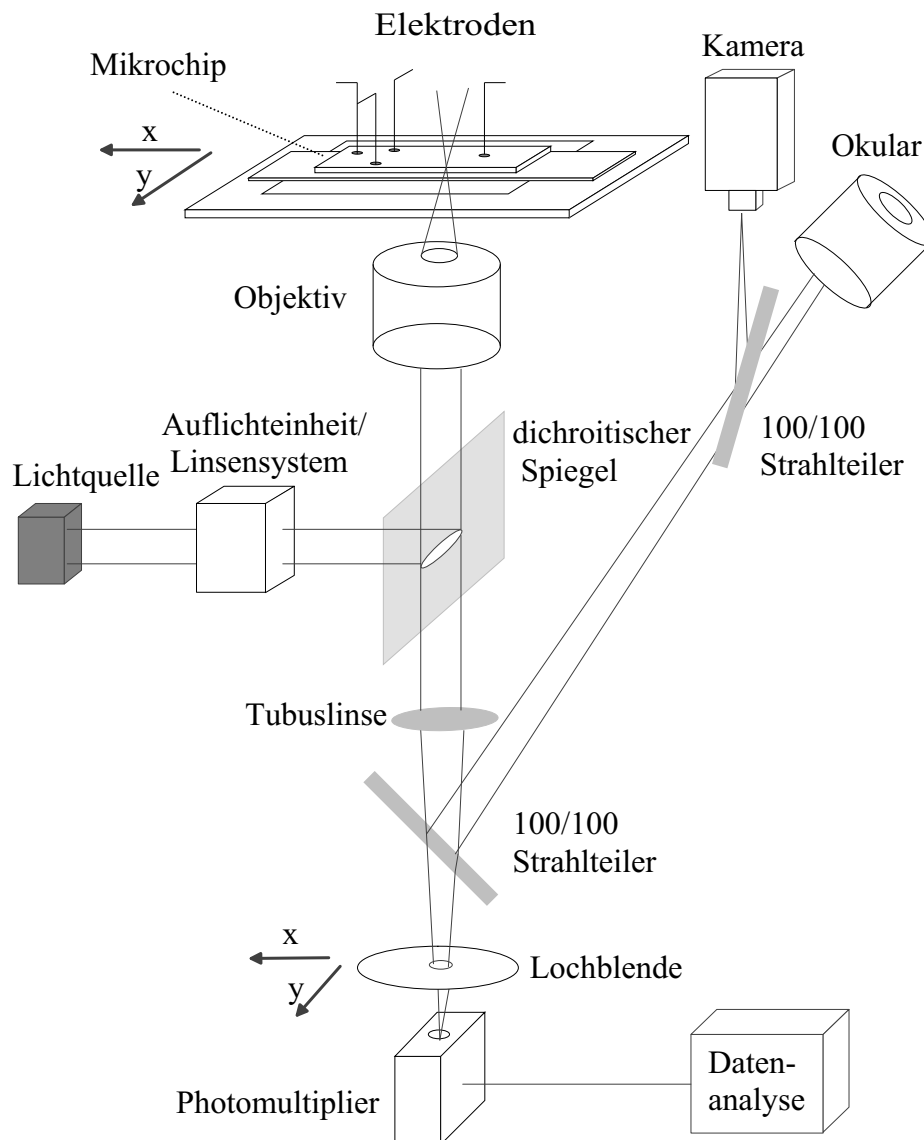


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau des Anregungs- und Detektionssystems

Das Anregungslicht gelangt über den dichroitischen Spiegel und das Objektiv in den PDMS Mikrochip. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt mittels eines Photomultipliers (genauere Details im Text).

entstandene Zusammenfassung der Pulse wird durch eine Multiplikation mit 10 korrigiert.

In Abbildung 3.2 ist der experimentelle Aufbau des gesamten Meßsystems gezeigt. Auf

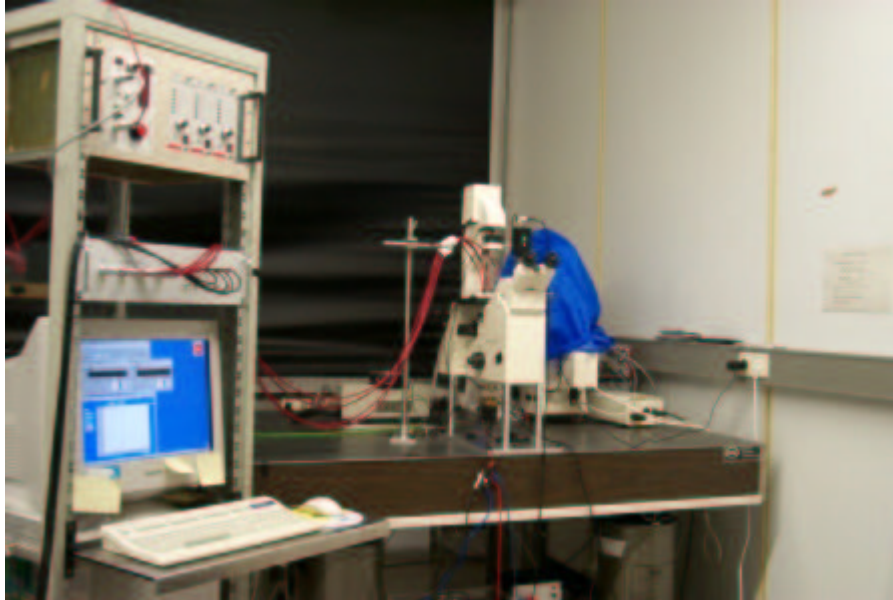


Abbildung 3.2: Experimenteller Gesamtaufbau

Die Fluoreszenzdetektionseinheit sowie der über Spiegel eingekoppelte Argon-Ionenlaser befinden sich auf dem passiv gedämpften Tisch. Die Mikrofluidiksteuerung und die Datenerfassung sind vorne links gezeigt.

der linken Seite ist die Mikrofluidiksteuerung und Datenerfassung zu sehen. Eine detailliertere Erläuterung dazu erfolgt in Kapitel 3.4.1. Auf dem passiv gedämpften Tisch befinden sich die Fluoreszenzdetektionseinheit sowie der Argon-Ionenlaser, der über zwei Spiegel (Modell 5108, [ν] New Focus, USA) eingekoppelt wird.

3.3 Präparation des Mikrochips

Zur Herstellung der für die Messungen verwendeten Mikrochips werden die im Grundlagenteil (Kapitel 2.3, Abbildung 2.5) erläuterten Schritte durchgeführt.

Zunächst wird das Siloxan-Oligomer mit dem Katalysator im Verhältnis 10:1 gemischt. Die Mischung wird dann über den Silizium-Wafer gegossen. Nach 2 Stunden ist das Elastomer bei 60° ausgehärtet und kann vom Masterwafer abgelöst werden. Die Mikro-

kanäle haben eine Breite von $50\ \mu\text{m}$ und eine Tiefe von $6.5\ \mu\text{m}$. Das Abformen sowie das Stanzen der Reservoirlöcher mit einem 2mm-Stanzer geschieht zur Vermeidung von Verschmutzung im Reinraum. Die PDMS Mikrostruktur wird dann mit Wasser abgespült und mit Stickstoff trocken geblasen. Die als Deckplatte dienenden Glasobjektträger (76x26mm, Menzel, Deutschland) werden zunächst mit Ethanol und Wasser gesäubert und anschließend mit einem staubfreien Tuch abgerieben. Im Ultraschallbad erfolgt nun für jeweils drei Minuten die abschließende Reinigung in Ethanol und Wasser. Danach wird der Objektträger ebenfalls mit Stickstoff trocken geblasen. Zur permanenten Versiegelung der PDMS Struktur mit dem Glasobjektträger werden beide Komponenten für drei Minuten im UV-Ozon-Reiniger (Modell 42-220, Jelight Company Inc., Kanada) behandelt. Im Anschluß daran werden beide sofort zusammengefügt. Danach werden einige μL Pufferlösung in eines der Reservoirs gegeben, wonach sich die Kanäle per Kapillarkraft füllen. Ein umgehendes Füllen der Kanäle mit der Pufferlösung gewährleistet den Erhalt der Hydrophilie des oxidierten PDMS [27, 35, 38, 41]. Erfolgt kein unmittelbares Füllen per Kapillarkraft, ist einer der Kanäle verstopft oder nicht ausreichend geschlossen.

Zur Vermeidung der unspezifischen Proteinadsorption an die Oberfläche des Mikrochips werden die Kanäle mit BSA behandelt. Die BSA-Lösung wird nach der UV-Ozon-Behandlung anstelle des Puffers in die Kanäle gefüllt. Nach einer Einwirkzeit von einer Viertelstunde wird die BSA-Lösung durch Anlegen von Unterdruck bzw. durch elektrokinetisches Pumpen aus den Kanälen entfernt. Anschließend werden die Mikrokanäle mit einer Pufferlösung gefüllt.

Abbildung 3.3 zeigt einen fertigen Mikrochip, der zur Visualisierung der Mikrometer großen Kanäle mit Eosin gefüllt ist.

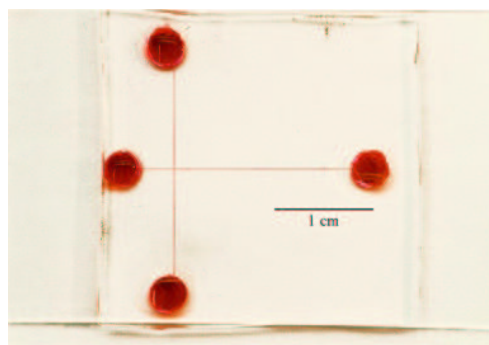


Abbildung 3.3: Ein mit Eosin gefüllter PDMS Mikrochip auf einem Glasobjektträger

3.4 Mikrofluidiksteuerung

3.4.1 Hochspannungssteuerung

Die Spannungsversorgung des Mikrochips erfolgt durch Hochspannungsverstärker (HCN 14-12500 und HCN 7E-12500, FUG, Deutschland), welche Spannungen im Bereich von 0-12.5kV liefern. Die in der hiesigen Elektronikwerkstatt angefertigte Relaisschaltung ermöglicht die Regelung dieser Versorgung. Wie in Abb. 3.4, Ausschnitt (a) gezeigt wird, ist jeder Hochspannungsverstärker mit je einer Relaiseinheit, bestehend aus zwei Hochspannungs-Reedrelais (3392-5272-6, Günther GmbH, Deutschland), gekoppelt. In

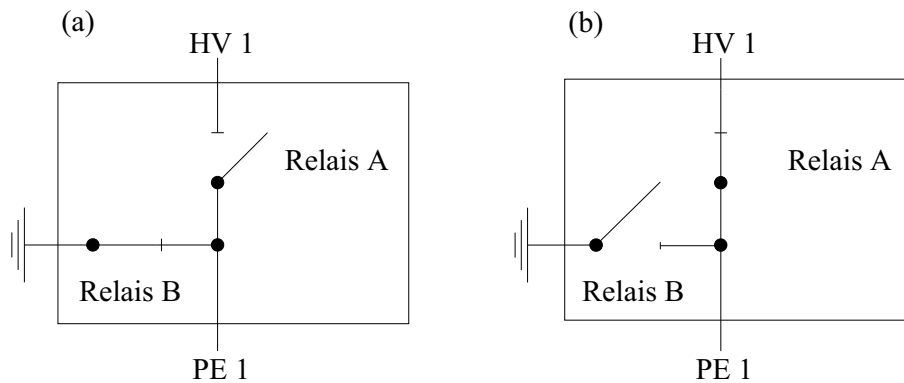


Abbildung 3.4: Darstellung der beiden Relaiseinstellungen

a) keine Spannungsversorgung b) Spannungsversorgung der Platinelektroden (PE);
 HV: Hochspannungsverstärker

Stellung (a) ist Relais B geschlossen, so daß die Platinelektroden (PE) geerdet sind. Für die Spannungsversorgung wird 1 ms nach dem Impuls für den Hochspannungsverstärker Relais B geöffnet und mit einer Verzögerung von 2ms Relais A geschlossen, Stellung (b). An die Platinelektroden kann nun eine Spannung angelegt werden.

Die Steuerung der Injektion erfolgt mittels eines Labview Programmes. Entsprechend den zwei Vorgängen Injektion und Trennung, ist das Programm in zwei Prozesse, *load* und *dispose*, unterteilt. Das Labview Programm zur Datenaufnahme des Photomultipliersignals ist mit in das Steuerungsprogramm integriert, so daß ein gleichzeitiger Start des Trennvorganges und der Registrierung der PM-Daten erfolgen kann.

3.4.2 Injektion

Zum besseren Verständnis der nachfolgenden Angaben ist in Abbildung 3.5 nochmals der Mikrochip mit seinen Bezeichnungen dargestellt. Wie bereits erwähnt, sind die Kanäle

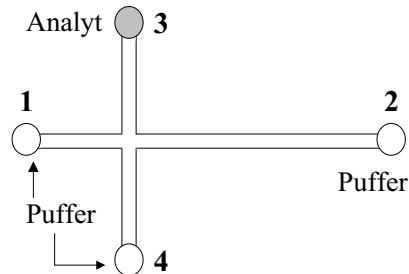


Abbildung 3.5: Schema des Mikrochips mit den für die Reservoirs verwendeten Bezeichnungen

zum Erhalt der Hydrophilie mit Puffer gefüllt. Die Pufferlösung in Reservoir 3 wird nun gegen die zu untersuchende Analytlösung ausgetauscht. Zur Sicherung eines konstanten Volumens aller Reservoirs werden die anderen Reservoirs ebenfalls ausgetauscht und mit neuem Puffer gefüllt, da sonst der durch Verdunstung verursachte Unterschied in der Flüssigkeitsmenge zu hydrostatischen Effekten führen würde [11, 60]. In jedem Reservoir befindet sich eine Flüssigkeitsmenge von $25 \mu\text{L}$.

Für den Transport der Analytlösung zur Kreuzung wird in der *pinched* Methode für 30–50s eine Spannung von typischerweise 1000V an Reservoir 3 angelegt. Die Einingangung der Probe auf den Kreuzungsbereich verlangt eine individuelle Anpassung der Spannungswerte für jeden Mikrochip. Die Spannungswerte liegen dabei im Bereich von 600–800V. Das Gelingen der *pinched* Methode wird bei ausreichend hoher Fluorophorkonzentration visuell überprüft.

Im Fall der *floating* Methode wird eine Spannung von 1000–1400V für einen kleineren Zeitraum (10–20s) an Reservoir 3 angelegt. Die Analytlösung gelangt so in den Kreuzungsbereich und breitet sich zusätzlich in Kanal 1 und 2 aus.

Im für beide Methoden übereinstimmenden Trennvorgang wird an Reservoir 1 zur Injektion des Kreuzungsvolumens eine Trennspannung von 1500–3000V angelegt. Um eine gute Trennung des injizierten Probenvolumens vom Analytfluß in Kanal 3 zu erzielen, werden an Reservoir 3 und 4 Spannungen von ca. 500V gegeben. Neben der Hauptflußrichtung entlang des Separationskanals (Kanal 1) existieren somit auch Ströme in Kanal 3 und 4, die eventuelles Nachlaufen der Analytlösung in Kanal 2 verhindern. Die exak-

ten Parameter sind für jeden Mikrochip-Elektrophorese Vorgang individuell optimiert worden und werden in der Diskussion explizit aufgeführt.

3.5 Bestimmung des elektroosmotischen Flusses

Zur Ermittlung des elektroosmotischen Flusses in Mikrokanälen wird die Methode von Huang et al. verwendet [25].

Zunächst ist ein linearer Mikrokanal der Länge $L_K = 2\text{ cm}$ mit einer $c_0 = 20\text{ mM}$ Pufferlösung gefüllt. Über die Platinelektroden wird eine Spannung von $U = 1000\text{ V}$ an die Reservoirs angelegt. Nach kurzer Zeit pendelt sich der Strom auf einen konstanten Wert ein. Die Pufferlösung in Reservoir 1 wird dann gegen eine $c_1 = 18\text{ mM}$ Pufferlösung ausgetauscht. Zur Vermeidung hydrostatischer Effekte werden die Pufferlösungen beider Reservoirs ausgewechselt. Um zusätzliche Verfälschungen der Messergebnisse durch Diffusion der 18 mM Lösung in den Kanal zu vermeiden, wird zuerst Reservoir 2 mit der 20 mM Pufferlösung gefüllt und dann Reservoir 1 mit der 18 mM . Für einen Zeitraum von 40 s wird dann eine Spannung von 1000 V an Reservoir 1 angelegt, die die elektroosmotische Migration der 18 mM Lösung in den Kanal hervorruft. Mittels eines Labview Programms erfolgt die Aufnahme der Daten. Für die Berechnung der elektroosmotischen Mobilität μ_{eof} ist es erforderlich, die Zeitdifferenz $\Delta t = t_1 - t_0$ aus den aufgenommenen Daten zu bestimmen. Die anderen Größen der Gleichung,

$$\mu_{eof} = \frac{L_K^2}{U\Delta t} \quad (3.1)$$

die Länge des Kanals und die Spannung, betragen $L_K = 2\text{ cm}$ und $U = 1000\text{ V}$. Der Zeitpunkt t_1 wird graphisch aus dem Schnittpunkt zweier Geraden bestimmt (Abb. 3.6).

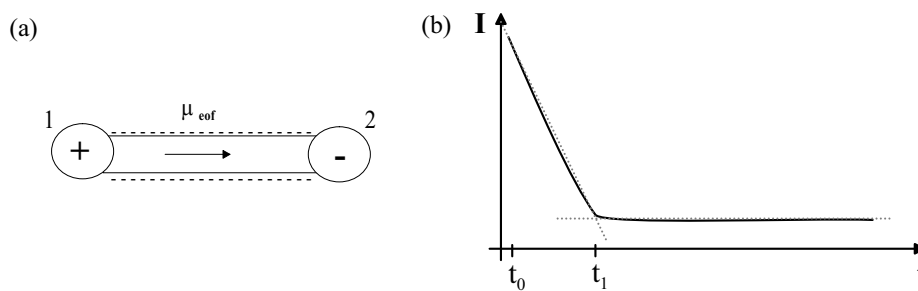


Abbildung 3.6: (a) Kanal mit den verwendeten Bezeichnungen
(b) Bestimmung der Zeitpunkte t_0 und t_1

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Messung der elektroosmotischen Mobilität

Nach der Stromkennlinien-Methode von Huang et al. [25] sind die in Tabelle 4.1 aufgeführten elektroosmotischen Mobilitätswerte bestimmt worden. Im Grundlagenteil 3.5 ist die Durchführung der Methode bereits beschrieben worden. Untersucht wurde der Einfluß der Oberflächenladung sowie die Auswirkung des pH-Wertes auf die Mobilität. Dabei wurde die Mobilität in nativen, oxidierten und in mit BSA beschichteten PDMS Kanälen sowie in jeweils zwei verschiedenen Puffersystemen (10 mM Phosphatpuffer pH 7 und 10 mM TRIS-Puffer pH 8.3) bestimmt.

| | Mobilität $\mu_{eof} \cdot 10^{-4} [cm^2/Vs]$ 10mM Phosphatpuffer pH 7 | Mobilität $\mu_{eof} \cdot 10^{-4} [cm^2/Vs]$ 10mM TRIS-Puffer pH 8.3 |
|---|--|---|
| natives PDMS unbeschichtet | 2.24 ± 0.13 | 4.34 ± 0.37 |
| oxidiertes PDMS unbeschichtet | 2.68 ± 0.21 | 4.53 ± 0.34 |
| oxidiertes PDMS mit BSA Beschichtung | 1.85 ± 0.19 | 2.83 ± 0.21 |

Tabelle 4.1: Mit der Stromkennlinien-Methode ermittelte elektroosmotische Mobilitäten

Nach Tabelle 4.1 erhält man für natives PDMS eine Mobilität von $\mu_{eof} = (2.24 \pm 0.13) \cdot 10^{-4} cm^2/Vs$ für das Phosphatpuffersystem und $\mu_{eof} = (4.34 \pm 0.37) \cdot 10^{-4} cm^2/Vs$ für das TRIS-Puffersystem. Die Durchführung dieser Messung ist aufgrund der reversiblen Verbindung des PDMS mit dem Glasobjektträger erschwert, da durch Lecks Puffer zwischen PDMS und Objektträger fließen kann.

Für oxidiertes PDMS wird durch die kovalente Bindung von PDMS und Objektträger eine bessere Reproduzierbarkeit der Messdaten erzielt. Dabei wurde für das Phosphatpuffersystem eine Mobilität von $\mu_{eof} = (2.68 \pm 0.21) \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/Vs$ bzw. $\mu_{eof} = (4.53 \pm 0.34) \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/Vs$ für das TRIS-System gemessen. Die Behandlung mit reaktivem Sauerstoff erzielt demnach einen Anstieg der Mobilität für beide Puffersysteme. Im Fall des Phosphatpuffers ergibt sich ein Anstieg von 20%. Die Erhöhung der Mobilität durch die Oxidation erklärt sich mit der wachsenden Anzahl von Silanolgruppen auf der Oberfläche. Bei Kontakt mit der Lösung deprotonieren diese und führen so zu einem Anstieg des ζ -Potentials und damit der Mobilität. Henry et al. [30] ermittelten für natives und oxidiertes PDMS eine im Vergleich zu den hier gewonnenen Meßwerten um 79% bzw. 60% höhere Mobilität für ein 10mM Phosphatpuffersystem (pH 7). Für die Erhöhung der Mobilität durch Oxidation des PDMS erhielten sie nur einen Unterschied von 7%. Die Diskrepanz in den Mobilitätswerten dieser Arbeit und der von Henry et al. [30] ergibt sich aus der leicht abgewandelten Durchführung der Stromkennlinien-Methode sowie der Verwendung eines Sauerstoffplasmas anstelle von einem UV-Ozon Reinigers für die Behandlung mit reaktivem Sauerstoff.

Die Beschichtung mit BSA zur Vermeidung unspezifischer Adsorption von Proteinen an die Kanalwände verringert die elektroosmotische Mobilität für oxidierte Kanäle. Sie sinkt auf einen Wert von $\mu_{eof} = (1.85 \pm 0.19) \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/Vs$ für das Phosphatsystem und auf $\mu_{eof} = (2.83 \pm 0.21) \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/Vs$ für das TRIS-System. Dieses entspricht einem Abfall von 31% bzw. 38%. Ein Vergleich der Mobilitäten zeigt, daß die Werte geringer als die für natives PDMS sind. Die Gruppe um Roberts et al. [26] stellte durch Beschichtung mit BSA eine Reduzierung der elektroosmotischen Mobilität von 44% in ihren photoablatierten Polymerkanälen fest. Ihrer Meinung nach resultiert aus der Wechselwirkung mit der photoablatierten Oberfläche eine Denaturierung von BSA, die dazu führt, daß die hydrophoben Regionen nach außen gekehrt sind. Die Folge ist die Abschirmung der geladenen Oberfläche durch das BSA und damit eine Verminderung der Mobilität [26].

Der Wechsel zu einem höheren pH-Wert führt in allen drei Fällen (nativ, oxidiert und BSA beschichtet) zu einem Anstieg der Mobilität. Bei oxidiertem PDMS wurde z.B. eine Mobilität von $\mu_{eof} = (2.68 \pm 0.21) \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/Vs$ für den pH-Wert 7 (Phosphatpuffersystem) bzw. $\mu_{eof} = (4.53 \pm 0.34) \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/Vs$ für den pH 8.3 (TRIS-Puffer) gemessen. Dieses entspricht einer Erhöhung der Mobilität um 69% bei einem Anstieg des pH-Wertes. Für mit BSA beschichtetes, oxidiertes PDMS vergrößert sich die Mobilität auf 53%. Die Erhöhung mit steigendem pH-Wert ist auf die Zunahme der ionisierten Silanol-

gruppen an der Oberfläche zurückzuführen, was eine Vergrößerung des ζ -Potentials und damit der Mobilität zur Folge hat. Dies stimmt mit Daten von Ocvirk et al. [27] überein, die eine Titrationskurve von nativem PDMS (Sylgard 184) für einen pH-Bereich von 2 bis 11 aufgenommen haben (Puffersystem: 1 mM Phosphat, 10 mM KCl). Die elektroosmotische Mobilität stieg in dieser Messung bis auf einen minimalen Einbruch im Bereich pH 8-9 mit wachsendem pH-Wert an.

Die Untersuchungen der Mobilitäten haben bestätigt, daß elektroosmotischer Fluß auch in PDMS Kanälen auftritt. Ein Anstieg der Mobilität kann durch reaktive Sauerstoffbehandlung sowie durch eine Erhöhung des pH-Wertes erreicht werden. Die Existenz von EOF in BSA beschichteten Kanälen zeigt die Möglichkeit des elektroosmotischen Pumpens und damit die Eignung von PDMS Mikrochips für die Mikrochip-Elektrophorese mit Proteinen. Abschließend kann gesagt werden, daß die herkömmlichen Methoden der Kapillarelektrophorese zur Variation des EOFs ebenfalls auf PDMS-Mikrochips angewendet werden können.

Für die weiteren Messungen wurde das TRIS-Puffersystem als Trennpuffer verwendet und das PDMS und die Glasobjektträger stets im UV-Ozon Reiniger oxidiert. Bei Abweichungen hiervon wird dies explizit erwähnt.

4.2 Injektion von fluoreszierenden Analyten

Für die im folgenden Kapitel 4.2.1 und 4.2.2 beschriebenen Ergebnisse wurde der experimentelle Aufbau mit der Quecksilberdampfampe als Anregungsquelle benutzt. In diesem Fall erfolgte die Fluoreszenzdetektion mit der Imager3 Kamera, in allen anderen Fällen wurde der Photomultiplier verwendet.

4.2.1 Injektion von FITC

In Abbildung 4.1 sind vier, mit der Imager3 Kamera in 4 mm und 10 mm Entfernung von der Kreuzung aufgenommene, FITC-Elektropherogramme zu sehen. Nach der *pinched* Methode wurde die Farbstofflösung, angesetzt in einem Phosphatpuffersystem, mit einer Spannung von 620 V entlang Kanal 3 gepumpt und durch 500 V an Reservoir 1 bzw. 610 V an Reservoir 2 auf den Kreuzungsbereich eingengt. Als Separationsspannung diente eine Spannung von 550 V bzw. 650 V.

Vergleicht man die für die zwei verschiedenen Entfernungen erhaltenen Elektropherogramme, so erkennt man die durch Diffusion hervorgerufene Verbreiterung der Signale

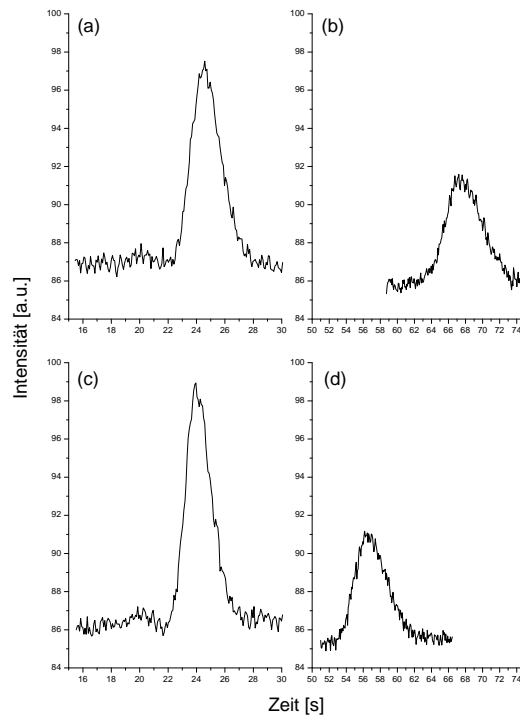


Abbildung 4.1: Elektropherogramme von FITC

(a) und (b) Detektion von FITC in Entfernungen 4 mm und 10 mm. Die Injektion erfolgte mit einer Separationsspannung von 550 V; (c) und (d) Detektion von FITC in den Entfernungen 4 mm und 10 mm. Eine Separationsspannung von 650 V wurde in diesem Fall für die Injektion verwendet.

mit zunehmender Migrationszeit t . Aus den Messungen läßt sich der Diffusionskoeffizient D für FITC mit Hilfe der folgenden Gleichung, die sich durch Umstellen der Formel (2.20) des Grundlagenteils 2.4.2 ergibt, bestimmen:

$$D = \frac{L_D^2}{2Nt} - \frac{l_{inj}^2}{24t} - \frac{l_{det}^2}{24t} \quad (4.1)$$

Ersetzt man die theoretische Plattenzahl N durch den Ausdruck $N = 5.54 \cdot \frac{t^2}{w^2}$, so ergibt sich:

$$D = \frac{w^2 L_D^2}{11.08 t^3} - \frac{l_{inj}^2}{24t} - \frac{l_{det}^2}{24t} \quad (4.2)$$

Die Migrationszeit t und die volle Halbwertsbreite w erhält man mittels eines Gaussfits an die Messkurven. Durch die Spannungen an Reservoir 1 bzw. 2 ist das Probenvolumen

auf den Kreuzungsbereich, d.h., die Maße des Kanals, eingeengt, so daß sich die Länge l_{inj} des Injektionsvolumens zu $50\ \mu m$ ergibt. Dies wurde durch Fluoreszenzmikroskopie des Kreuzungsbereichs visuell kontrolliert. Die Länge l_{det} des Detektionsfensters verringert sich durch die Verwendung einer Feldblende auf die Kanalbreite von $50\ \mu m$. Da l_{inj} und l_{det} in ihrer Größe übereinstimmen, reduziert sich der zweite und dritte Term der Gleichung (4.2) auf den Ausdruck $(l^2/12t)$ mit $l = l_{inj} = l_{det}$.

Aus den vier Messungen ergibt sich somit für den Farbstoff FITC ein mittlerer Diffusionskoeffizient von $D = (6.63 \pm 2.13) \cdot 10^{-6}\ cm^2/s$. Die Abweichung von ± 2.13 basiert auf dem großen Fehler für den Abstand zwischen Kreuzung und Detektor L_D . Die Entfernungsmarkierung erfolgte manuell auf dem Mikrochip, so daß ein Fehler von 1 mm angenommen wurde. Auf dem zukünftigen Masterwafer wird eine Skaleneinheit eine einfachere Positionierung ermöglichen und damit zur Verringerung des Fehlers beitragen. Der von anderen Gruppen mittels Polarographie bestimmte Diffusionskoeffizient für Fluorescein liegt bei $D = (3.4 \pm 0.3) \cdot 10^{-6}\ cm^2/s^{(1)}$ [7]. Da Fluorescein und FITC sich nur durch die funktionelle NCS-Gruppe unterscheiden, siehe Abb. 2.11, Kapitel 2.5, kann für FITC von demselben Diffusionskoeffizienten ausgegangen werden. Vergleicht man den hier über Elektropherogramme bestimmten Diffusionskoeffizienten von $D = (6.63 \pm 2.13) \cdot 10^{-6}\ cm^2/s$ mit den Werten anderer Gruppen, so liegt er im Rahmen der experimentell ermittelten Werte. Jacobsen et al. [10] erhielten aus ihren Messungen abhängig vom Kreuzungs-Detektor Abstand L_D einen Diffusionskoeffizienten von $D = 1.2 \cdot 10^{-5}\ cm^2/s$ für $L_D = 1.6\ mm$ und $D = 7.8 \cdot 10^{-6}\ cm^2/s$ für $L_D = 11.1\ mm^{(2)}$. Eine sehr gute Übereinstimmung mit dem aus der Polarographie bestimmten Wert erzielte Harrison et al. [7] mit $D = (3.3 \pm 0.2) \cdot 10^{-6}\ cm^2/s^{(3)}$. In weiteren Messungen fanden Fan und Harrison [45] einen Wert von $D = (4.5 \pm 0.2) \cdot 10^{-6}\ cm^2/s^{(4)}$. Gründe für die Abweichungen können sich durch Adsorption an die Kanalwand, Leitfähigkeitsunterschiede, Kanalgeometrie und mögliche hydrodynamische Effekte aufgrund unterschiedlicher Flüssigkeitsniveaus auf den Reservoirs ergeben. Prinzipiell scheint es also schwierig, mit Mikrochip-Elektrophorese Messungen eine Aussage über den Diffusionskoeffizienten zu machen.

¹50 mM TRIS/Borat-Puffer pH 8.5

²20 μM Fluorescein, Natrium-Tetra-Borat-Puffer pH 9.2

³20 μM Fluorescein, TRIS/Borat-Puffer pH 8.5

⁴50 μM Fluorescein, TRIS/Borat-Puffer pH 8

Mit Hilfe der Beziehungen $v = L_D/t$ und $E = U/L_K$ läßt sich die Gesamtmobilität $\mu = v/E$ als folgender Ausdruck schreiben:

$$\mu = \frac{L_D L_K}{Ut} \quad (4.3)$$

Bei einer Kanallänge L_K von 2 cm, einer Separationsspannung von 550 V bzw. 650 V an Reservoir 1 und einer Kreuzungs-Detektor Entfernung von $L_D = 4$ mm bzw. 10 mm ergibt sich für FITC eine Gesamtmobilität von $\mu = (0.55 \pm 0.1) \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$. Mit der in Kapitel 4.1 für oxidiertes PDMS bestimmten elektroosmotischen Mobilität $\mu_{eof} = (2.68 \pm 0.21) \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ errechnet sich für das bei einem pH-Wert von 7 negativ geladene FITC ein Wert von $\mu_{ep} = (-2.13 \pm 0.31) \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ für die spezifische elektrophoretische Mobilität. Der Vergleich beider Mobilitäten zeigt ein Überwiegen der elektroosmotischen Mobilität gegenüber der elektrophoretischen. Die Richtung der effektiven Gesamtgeschwindigkeit $\vec{v}^{(5)}$ ist demnach durch den elektroosmotischen Geschwindigkeitsvektor gegeben. Da dieser aufgrund der negativen Oberflächenladung zur Kathode hinweist, erfolgt die Injektion der Farbstofflösung Richtung Kathode. Die Detektion der Farbstoffmoleküle kurz vor der Kathode bestätigt dies.

In BSA beschichteten Kanälen verringert sich die elektroosmotische Mobilität auf einen Wert von $\mu_{eof} = (1.85 \pm 0.19) \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$. Vergleicht man diesen mit dem für FITC bestimmten elektrophoretischen Mobilitätswert von $\mu_{ep} = (-2.13 \pm 0.31) \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$, so ist in diesem Fall die elektrophoretische Mobilität und damit der Geschwindigkeitsvektor \vec{v}_{ep} ausschlaggebend für die Richtung der Injektion. Aufgrund der negativen Nettoladung des FITC im pH-Bereich 7 migrieren die Farbstoffmoleküle zur Anode. Experimentell konnte in BSA beschichteten PDMS Kanälen eine Gesamtmobilität zur Anode beobachtet werden.

4.2.2 Injektion von IgG

Die Elektropherogramme von FITC markiertem IgG sind in Abbildung 4.2 für die Entfernungen 2 mm, 5 mm, 8 mm, 10 mm und 13 mm von der Kreuzung zu sehen. Die Injektion erfolgte nach der *pinched* Methode mit einer Injektionsspannung von 650 V. Die Einengung auf den Kreuzungsbereich wurde mit Spannungen von 470 V an Reservoir 1 bzw. 560 V an Reservoir 2 erreicht. Die Separationsspannung betrug 500 V.

In Abbildung 4.2 ist die Verbreiterung der Signale durch Diffusion mit zunehmender Entfernung von der Kreuzung zu sehen. Deutlich wird auch die damit einhergehende Verringerung der Signalhöhe des Fluoreszenzsignals.

$${}^5\vec{v} = \vec{v}_{eof} + \vec{v}_{ep} = (\mu_{eof} + \mu_{ep})\vec{E}$$

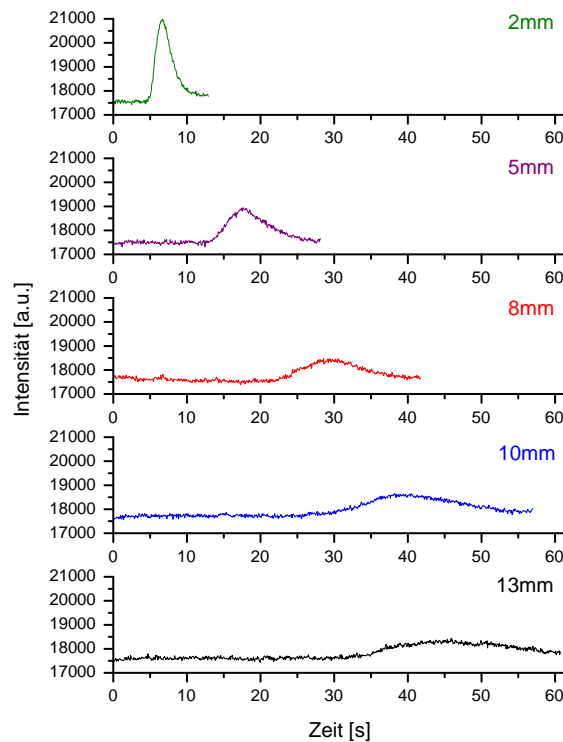


Abbildung 4.2: Elektropherogramme von IgG für verschiedene Entfernungen

Nach Grossmann [19] besitzen 100kDa-Moleküle einen Diffusionskoeffizienten von $D = 0.5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. Da das Molekulargewicht von IgG bei 100-150kDa liegt, kann auf diesen Diffusionskoeffizienten für das IgG zurückgegriffen werden. Die experimentell ermittelten Werte für die verschiedenen Entfernungen weichen um das 100-fache von diesem Wert ab. Die Bestimmung eines mittleren Diffusionskoeffizienten aus den Messungen erweist sich als schwierig, da die für die verschiedenen Entfernungen ermittelten Koeffizienten stark voneinander abweichen. Diese Differenz in den Diffusionskoeffizienten für unterschiedliche Entfernungen wurde auch von Jacobson et al. [10] festgestellt. Gründe für die Abweichungen können in der Wechselwirkung mit den BSA beschichteten Kanälen, Veränderungen im Strömungsverhalten durch Verschmutzungen, möglichen hydrodynamischen Effekten aufgrund unterschiedlicher Flüssigkeitsniveaus auf den Reservoirs und unspezifischer Adsorption liegen.

4.3 Vergleich der Anregungsquellen

Für die vorangegangenen Messungen ist eine Quecksilberdampflampe als Anregungsquelle verwendet worden. In diesem Abschnitt werden die Vorteile des Wechsels zum Laser für die Anregung der Farbstoffe diskutiert. Abbildung 4.3 zeigt den Vergleich beider Anregungsquellen anhand zweier Elektropherogramme von $25\ \mu\text{M}$ Fluorescein. Bei

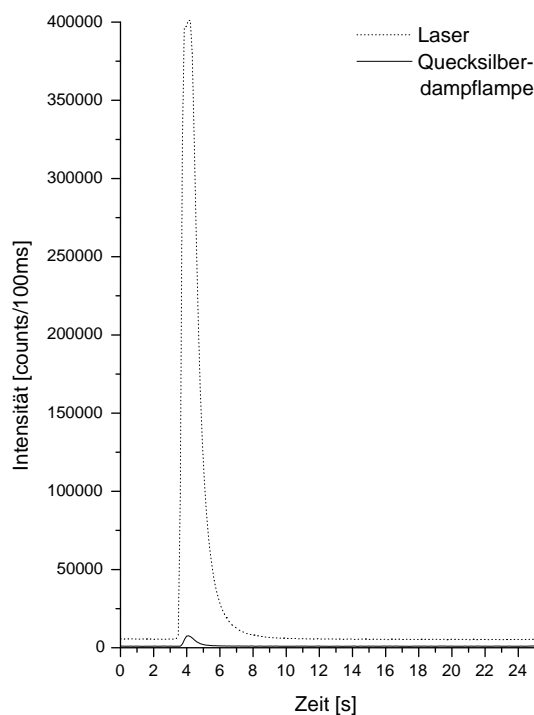


Abbildung 4.3: Vergleich der Anregungsquellen

Elektropherogramme von $25\ \mu\text{M}$ Fluorescein: Das gestrichelte Signal entspricht der Anregung der Farbstoffmoleküle mit dem Laser, das durchgezogene der mit der Quecksilberdampflampe.

dem verwendeten Laser handelte es sich um den Argon-Ionenlaser (Spectra Physics), der auf eine Leistung von 2 mW eingestellt war. Für den Vergleich wurden die Injektionsparameter für beide Messungen gleich gewählt. In den Kreuzungsbereich wurde die Farbstofflösung innerhalb von 8 s mit einer Spannung von 1000 V gepumpt. Die Injektion in den Separationskanal erfolgte mit einer Spannung von 2000 V. Das Nachlaufen in Kanal 2 wurde durch Spannungen von 700 V an den Reservoirs 3 und 4 verhindert. Die

Detektion fand in 9 mm Entfernung statt.

In Abbildung 4.3 ist zu sehen, daß für den Laser ein wesentlich höheres Signal erreicht wurde. Die Signalhöhe beträgt 396400 counts/100ms, während mit der Quecksilberdampfampe nur 6600 counts/100ms erzielt wurden. Das (S/N)-Verhältnis für die Anregung mit dem Laser ergibt sich zu 2640, während das der Quecksilberdampfampe bei 110 liegt. Der Vergleich zeigt, daß die Anregung der Farbstoffmoleküle durch den Laser effektiver ist. Die höhere Sensitivität des Lasers erklärt sich durch die Fokussierung des Laserstrahls auf den Kanalbereich sowie die höhere Intensität. Im Fall der Quecksilberdampfampe wurde das Anregungsfenster durch eine Feldblende eingeschränkt. Die Variation der Blendengröße ermöglichte die Ausleuchtung des gesamten Kreuzungsausschnitts, was sich zu Beginn speziell für die Optimierung der Injektionsparameter der *pinched* Methode als hilfreich erwies. Anschließend wurde aus den oben aufgeführten Gründen auf den Laser als Anregungsquelle gewechselt.

In Tabelle 4.2 ist für die FITC Konzentrationen 4pM, 20 pM und 100pM das (S/N)-Verhältnis für verschiedene Laserleistungen des Argon-Ionenlasers zu sehen. Ein Ver-

| Leistung | (S/N)-Verhältnis | | |
|----------|------------------|------|-------|
| | 4pM | 20pM | 100pM |
| 5 mW | 14 | 20 | 24 |
| 10 mW | 17 | 25 | 29 |
| 15 mW | 16 | 22 | 31 |
| 20 mW | 13 | 16 | 30 |

Tabelle 4.2: (S/N)-Verhältnisse verschiedener Laserleistungen

gleich der Werte zeigt, daß das (S/N)-Verhältnis für Leistungen ab 10mW nicht mehr ansteigt. Dies läßt sich auf eine Sättigung der Fluoreszenzausbeute bei gleichzeitigem Anstieg des Hintergrundrauschens zurückführen. Aus der Tabelle kann ebenfalls entnommen werden, daß für größere Konzentrationen ein höheres (S/N)-Verhältnis erreicht wird. Aufgrund dieser Aspekte wurden für die folgenden Messungen nur Leistungen bis 10mW verwendet.

4.4 Gegenüberstellung von *pinched* und *floating* Methode

Methode

In den beiden nachfolgenden Abbildungen 4.4 und 4.5 ist ein Injektionsablauf einer Fluoresceinlösung mit der *pinched* und *floating* Methode zu sehen. Abbildung (4.4b)

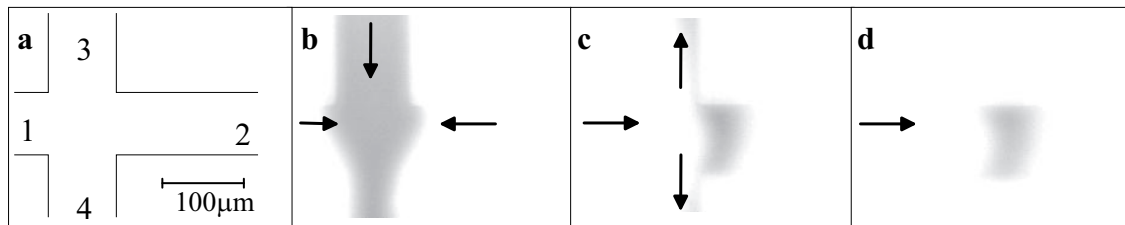
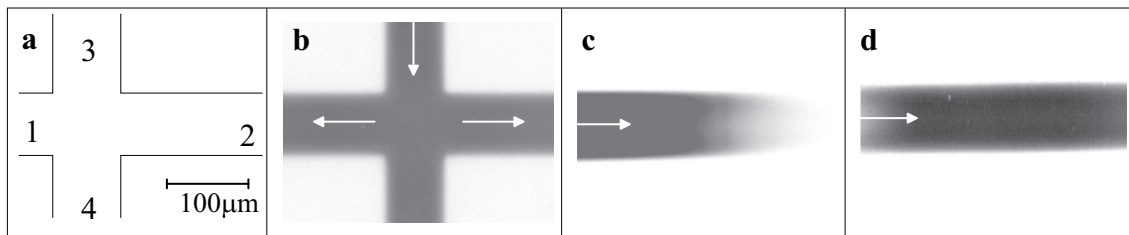


Abbildung 4.4: Injektion nach der *pinched* Methode

(a) Schematische Darstellung des Kreuzungsbereichs; (b) das v-förmige Probenvolumenprofil im Injektionsschritt; (c) Injektion des Probenvolumens in den Kanal 2; (d) das Probenvolumen einige ms nach der Injektion; die Pfeile geben die Flußrichtung an.

zeigt, die für die *pinched* Methode charakteristische Ausbildung des v-förmigen Probenvolumenprofils im Kreuzungsbereich. Dieser Effekt wurde durch Gegenspannungen an Reservoir 1 und Reservoir 2 erzielt. Im nächsten Schritt (Abb. 4.4c) wurde eine Separationsspannung an Reservoir 1 angelegt, was zu einer Injektion des Probenvolumens im Kreuzungsbereich in Kanal 2 führt. Deutlich zu erkennen ist, wie sich durch die geringen positiven Spannungen an Reservoir 3 und 4 die Probenlösung auch in die Kanäle 3 und 4 zurückzieht. Im letzten Bild (4.4d) ist das Probenvolumen, wenige ms nach der erfolgten Injektion, gezeigt. Das Strömungsprofil der Farbstofflösung ändert sich zwischen den Bildern (4.4c) und (4.4d) kaum, was auf ein durch den EOF geprägtes stempelförmiges Strömungsprofil zurückzuführen ist.

Die Bildserie in Abbildung 4.5 zeigt den Injektionsvorgang nach der *floating* Methode. In Abbildung (4.5b) ist die durch die Spannung an Reservoir 3 in den Kreuzungsbereich gepumpte Fluoresceinlösung zu sehen. Ohne die Gegenspannung an Reservoir 1 und 2 fließt die Lösung in die Kanäle 1 und 2, was zu einer erheblichen Vergrößerung des Probenvolumens führt. Die Länge des Injektionsvolumens ist bereits so groß, daß der abgebildete Kreuzungsbereich von ungefähr $250\ \mu\text{m} \times 180\ \mu\text{m}$ vollständig ausgefüllt ist. Abbildung (4.5c) zeigt den vorderen Teil des durch Spannung an Reservoir 1 injizierten Probenvolumens in 3 mm Entfernung von der Kreuzung. Im letzten Bild (4.5d) ist der

Abbildung 4.5: Injektion nach der *floating* Methode

(a) Schematische Darstellung des Kreuzungsbereichs; (b) die Ausbreitung der Farbstofflösung im Kreuzungsbereich; (c) der vordere Teil des in Kanal 2 injizierten Probenvolumens; (d) der hintere Teil des in Kanal 2 injizierten Probenvolumens; die Pfeile geben die Flußrichtung an.

an derselben Stelle aufgenommene hintere Teil des Probenvolumens zu sehen. Für die beiden Bildserien wurden verschiedene Fluoresceinkonzentrationen verwendet. Abbildung 4.6 stellt einen Vergleich zwischen den beiden Injektionsmethoden anhand von zwei $25\mu\text{M}$ Fluorescein-Elektropherogrammen dar. Das gestrichelte Signal entspricht der Injektion der Fluoresceinlösung nach der *floating* Methode. Die Lösung wurde mit einer Spannung von 1000V innerhalb von 8s in den Kreuzungsbereich gepumpt. Im Fall der *pinched* Methode kam zu der Injektionsspannung von 1000V noch die Gegenspannung von 680V bzw. 770V an Reservoir 1 bzw. Reservoir 2 hinzu. Der Injektionsvorgang dauerte bei der *pinched* Methode 20s . Für die Injektion in den Separationskanal wurden in beiden Fällen eine Spannung von 2000V an Reservoir 1 sowie zur Vermeidung des Nachlaufens in Kanal 2 eine Spannung von 700V an die Reservoirs 3 und 4 angelegt. Der scharfe Peak in Abbildung 4.6 spiegelt die Injektion eines definierten Probenvolumens (ca. 16pL) wieder, die in der *pinched* Methode durch das Einengen der Lösung auf den Kreuzungsbereich erzielt wird. Als Nachteil der Einengung erweist sich die geringere Sensitivität, was sich in der kleineren Amplitude im Vergleich zur *floating* Methode zeigt. Das um 75% höhere Fluoreszenzsignal für die *floating* Methode ist auf ein größeres Probenvolumen (ca. 980pL) im Kreuzungsbereich zurückzuführen. Im Vergleich zur *pinched* Methode entspricht dies einer 60-fachen Vergrößerung des Injektionsvolumens. Mit dem Sensitivitätsgewinn bei der *floating* Methode geht aber eine Verbreiterung des Signals einher, die sich negativ auf die theoretische Plattenzahl N auswirkt. Für das *floating*-Signal erhält man eine theoretische Plattenzahl von $N = 105 \pm 5.72$, während sich für das nach der *pinched* Methode injizierte Signal eine Plattenzahl von $N = 4694 \pm 4.27$ ergibt. Letztere liegt in der Größenordnung der von Zhang et al. [9] für

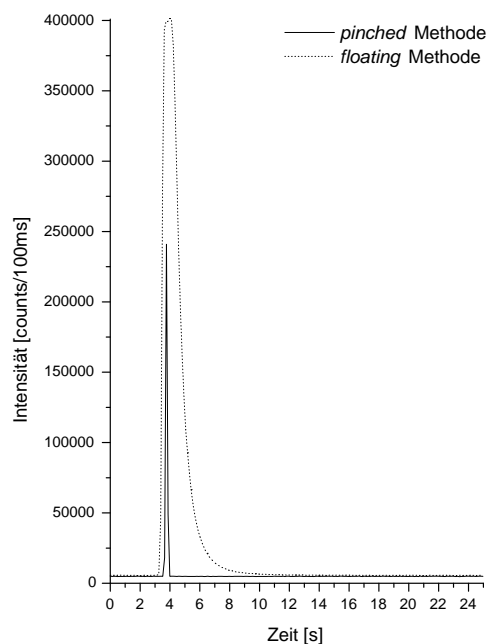


Abbildung 4.6: Vergleich der verwendeten Injektionsmethoden

Das gestrichelte Signal stellt die Injektion einer $25\ \mu\text{M}$ Fluoresceinlösung nach der floating Methode, das durchgezogene die Injektion nach der pinched Methode dar.

FITC ermittelten theoretischen Plattenzahlen von $7590^{(6)}$. Für einen exakten Vergleich müßten die experimentellen Bedingungen der Mikrochip-Injektion übereinstimmen, da die Größe der Injektionsspannung sowie die Länge der Injektionszeit Einfluß auf das Signal haben. Eine Erhöhung der Plattenzahl N für den Fall der *floating* Methode läßt sich durch eine kürzere Injektionszeit bzw. höhere Spannungen im Injektions- und Trennvorgang erreichen. Zhang et al. [9] zeigten, daß bei geeigneter Wahl dieser Parameter für beide Injektionsmethoden vergleichbare theoretische Plattenzahlen ermittelt werden können. Dieser Aspekt sowie die Schwierigkeit der experimentellen Handhabung⁽⁷⁾ der *pinched* Methode sprechen für die Verwendung der *floating* Methode als Injektionsmethode. Ein weiterer Vorteil der *floating Methode* sind die kurzen Analysezeiten, die im Bereich von 20s-30s liegen. Außerdem ist die für die *pinched* Methode notwendige

⁶ $12.8\ \mu\text{M}$ FITC, TRIS/Borat-Puffer pH 8.8

⁷ Die Qualität der Injektion muß generell visuell kontrolliert werden, da die Injektionsparameter aufgrund kleiner Fertigungsunterschiede (wie z.B. der Abstand der Reservoirs von der Kreuzung) nicht von Chip zu Chip übertragbar sind.

visuelle Einstellung der Spannungswerte für das v-förmige Profil im Kreuzungsbereich für niedrige Konzentrationen nicht durchführbar, da die Beobachtung des Injektionsablaufes mit der Kamera aufgrund der geringen Konzentration nicht möglich ist. Die *floating* Methode wurde aufgrund dieser Aspekte für die nachfolgenden Messungen als Injektionsmethode verwendet.

4.5 Anwendung auf analytische Problemstellungen

4.5.1 Trennung von FITC und Fluorescein

In Abbildung 4.7 ist eine Auftrennung von Fluorescein und FITC nach 13mm Trennstrecke zu sehen. Das 5 nM-Gemisch wurde mit einer Spannung von 1200 V innerhalb von 12 s in den Kreuzungsbereich gepumpt. Die Injektion in den Separationskanal erfolgte mit einer Spannung von 3000 V an Reservoir 1. Zur Anregung der Farbstoffmoleküle wurde der Argon-Ionenlaser mit einer Leistung von 5 mW verwendet.

Aus vorangegangenen Messungen der einzelnen Komponenten kann das erste Signal bei $t = 6.92\text{ s}$ als Fluorescein-Peak und das zweite bei $t = 13\text{ s}$ als FITC-Peak identifiziert werden. Bei einer Trennstrecke von 13 mm resultiert daraus nach Gleichung (2.19), Kapitel 2.4.2, eine Gesamtmobilität von $\mu = (1.25 \pm 0.12) \cdot 10^{-4}\text{ cm}^2/\text{Vs}$ für Fluorescein bzw. $\mu = (0.67 \pm 0.06) \cdot 10^{-4}\text{ cm}^2/\text{Vs}$ für FITC. Für Fluorescein haben andere Gruppen vergleichbare Mobilitäten erzielt. Harrison et al. [7] erhielten ⁽⁸⁾ eine Mobilität von $\mu = (1.21 \pm 0.06) \cdot 10^{-4}\text{ cm}^2/\text{Vs}$, während von Liang et al. [58] ⁽⁹⁾ eine Mobilität von $\mu = 1.09 \cdot 10^{-4}\text{ cm}^2/\text{Vs}$ gemessen wurde. Der von Seiler et al. [11] aus einer Trennung von Fluorescein und Fluorescein-5-sulfonat⁽¹⁰⁾ erhaltene Mobilitätswert beträgt dagegen $\mu = (1.93 \pm 0.06) \cdot 10^{-4}\text{ cm}^2/\text{Vs}$. Es zeigt sich, daß aufgrund von Faktoren wie pH-Wert, Puffersystem und Mikrochipmaterial die Mobilitäten stark variieren.

Der Unterschied in der Signalthöhe der beiden Fluoreszenzsignale ist auf die schlechte Löslichkeit von FITC in TRIS-Puffer und der möglichen Degradierung zurückzuführen. Eine Aussage über die Güte der Auftrennung beider Farbstoffe läßt sich mit Hilfe der Auflösung R machen. Nach Gleichung (2.27) ergibt sich eine Auflösung von $R = 2.92 \pm 0.7$. Die Abweichung von ± 0.7 ist größtenteils durch den für den Kreuzungsdetektor Abstand L_D angenommenen Fehler gegeben. Zhang et al. [9] ermittelten für

⁸20 μM Fluorescein, TRIS/Borat-Puffer pH 8.5

⁹50 μM Fluorescein, TRIS/Borat-Puffer pH 9

¹⁰10 μM Fluorescein, TRIS/Borat-Puffer pH 8

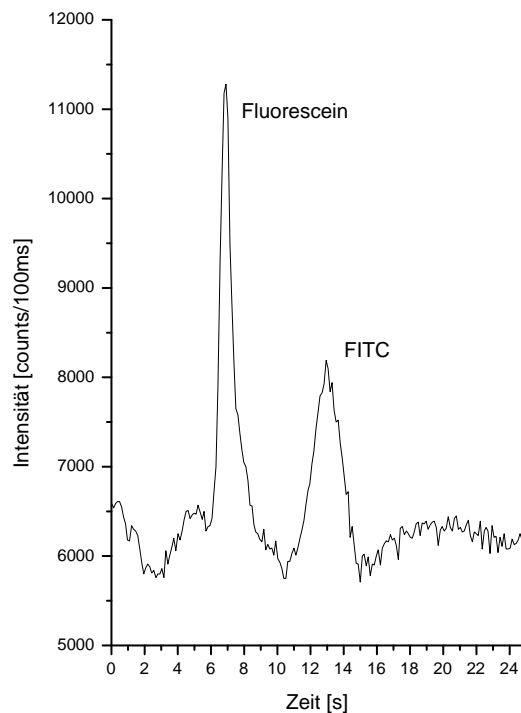


Abbildung 4.7: Auftrennung von Fluorescein und FITC

Für die Auftrennung wurde das 5 nM-Gemisch mit einer Spannung von 3000 V in den Detektionskanal injiziert. Der Abstand zum Detektor betrug 13 mm.

die Auftrennung von Fluorescein und FITC eine Auflösung von $R = 1.55^{(11)}$. Nach Gleichung (2.28), Kapitel 2.4.2, hängt die Auflösung vom Kreuzungs-Detektor Abstand L_D und der Spannung U ab. Da Zhang et al. [9] andere Parameter verwendeten ist ein direkter Vergleich nicht sinnvoll. Sie zeigten bereits in ihrer Veröffentlichung, daß eine Variation der Injektionszeit von $t_{inj} = 15\text{ s}$ auf $t_{inj} = 20\text{ s}$ zu einer Verschlechterung der Auflösung um 12% führt. Vergleicht man die Parameter und zieht deren Einfluß auf die Auflösung in Betracht, so müßte der in dieser Arbeit gemessene Wert geringer bzw. aufgrund der kürzeren Injektionszeit $t_{inj} = 12\text{ s}$ ähnlich sein. Abschließend läßt sich demnach sagen, daß mit dem hier verwendeten Aufbau eine höhere Auflösung als bei Zhang et al. [9] erzielt wurde.

Die Berechnung der Plattenhöhe H nach Gleichung (2.22), Kapitel 2.4.2, liefert für FITC einen Wert von $H = (34.6 \pm 5)\text{ }\mu\text{m}$. Zhang et al. [9] erzielten für FITC eine Plattenhöhe

¹¹3 μM Fluorescein, 12.8 μM FITC, TRIS/TAPS-Puffer pH 8.8

von $H = 4.93\ \mu\text{m}$. Die Abweichung erklärt sich durch die Differenz in der theoretischen Plattenzahl N . Während Zhang et al. eine Plattenzahl von $N = 4190$ erhielten, ergab sich aus den hier durchgeführten Messungen eine Plattenzahl von $N = 376$. Trotz der geringen Plattenzahl wurde im Vergleich zu Zhang et al. [9] eine höhere Auflösung erreicht.

4.5.2 Nachweis von IgG und Avidin

Die Elektropherogramme zweier Proteine, IgG und Avidin, sind in der nachfolgenden Abbildung 4.8 gezeigt. Die Konzentration der Lösungen ist so gewählt, daß die Konzentration der an das Protein gebundenen Farbstoffmoleküle jeweils 300nM beträgt. Dies entspricht einer 100nM Proteinlösung. Die Injektion von Avidin in den Kreuzungsbereich erfolgte innerhalb von 10s mit einer Spannung von 2500 V, während für IgG nur eine Spannung von 1000 V verwendet wurde. In den Detektionskanal wurde in beiden Fällen mit einer Spannung von 3000 V injiziert. Der Abstand zum Detektor betrug 6 mm.

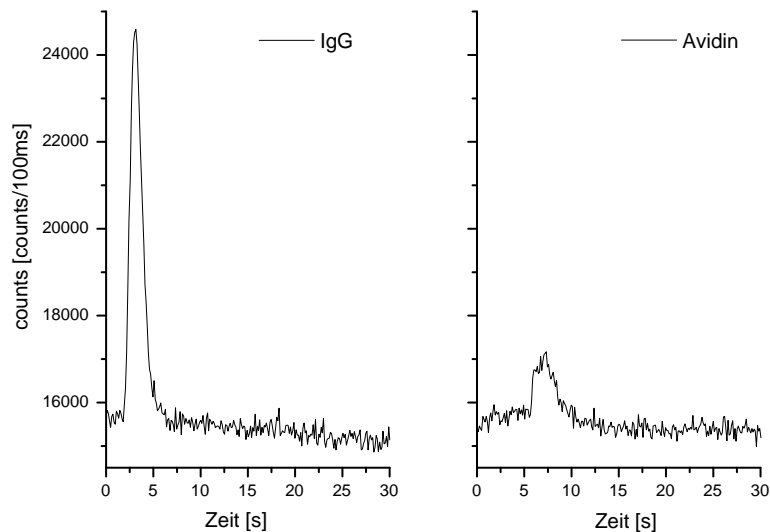


Abbildung 4.8: Elektropherogramme von IgG und Avidin

Die Injektion der Proteine in den Detektionskanal wurde in beiden Fällen mit einer Spannung von 3000 V erzielt. Die Detektion erfolgte in einem Abstand von 6 mm von der Kreuzung.

Für Avidin ergibt sich eine Signalhöhe von 1330 counts/100ms, während IgG eine Amplitudenhöhe von 9060 counts/100ms besitzt. Die Differenz in der Amplitudenhöhen der beiden Fluoreszenzsignale kann auf Quenching-Effekte zurückgeführt werden. Denn abhängig von der Bindungsstelle des Farbstoffmoleküls an das Protein sind die FITC-Moleküle entweder der wässrigen Lösung ausgesetzt oder im Innern der Tertiärstruktur des Proteins verborgen und damit von der wässrigen Umgebung abgeschirmt. Farbstoffmoleküle, die aufgrund ihrer Position mit der wässrigen Umgebung wechselwirken, weisen eine Verschiebung ihrer Emissionswellenlänge sowie eine Verringerung der Quantenausbeute auf [54].

Aufgrund der benötigten Injektionsspannungen von 2500 V für Avidin mußten die beiden Fluoreszenzsignale getrennt voneinander aufgenommen werden. Generell werden für den Transport der Flüssigkeit in den Kreuzungsbereich Spannungen im Bereich von 1000 V bis maximal 2000 V an Reservoir 3 angelegt. Das Resultat einer Injektion von IgG mit so hohen Spannungen wäre ein großes, mehrere mm des Mikrochips einnehmendes Probenvolumen und infolgedessen eine starke Verbreiterung des Signals. Für das hier gezeigte Elektropherogramm wurde daher im Fall von IgG eine Injektionsspannung von 1000 V verwendet. Der hohe Hintergrund resultiert aus dem Einsatz des 25 mW-Argon-Ionenlasers, der den sich in Reparatur befindenden leistungsschwächeren Argon-Ionenlaser ersetzt hatte.

Betrachtet man die Migrationszeiten der Proteine in den BSA beschichteten Kanälen, so benötigt IgG für eine Strecke von 6 mm eine Zeit von $t = 3.2 \text{ s}$ und Avidin für dieselbe Distanz $t = 7.1 \text{ s}$. Die Trennung dieser beiden Proteine sollte somit möglich sein. Allerdings müssen die Injektionsparameter aufgrund der oben erwähnten Aspekte entsprechend angepasst werden, um eine gleichzeitige Injektion der beiden Proteine zu ermöglichen. Mit der Verwendung eines anderen pH-Wertes oder eines anderen Puffersystems könnte man die Nettoladung der Proteine so ändern, daß sich deren Injektionseigenschaften einander annähern. Die Beschichtung der Kanäle mit BSA könnte ebenfalls einen Einfluß auf die Injektion der Proteine haben. Der Einsatz anderer Methoden (zwitterionischer Puffer [61], dynamisches Beschichten der Oberfläche [62]) zur Vermeidung der unspezifischen Adsorption an die Oberflächen könnte demnach auch zur Ermöglichung der Trennung beitragen.

4.6 Detektion geringer Konzentrationen

In Abbildung 4.9 sind die Fluoreszenzsignalhöhen für drei verschiedene FITC-Konzentrationen zu sehen. Die Injektion in den Kreuzungsbereich fand mit einer Spannung von

1000 V innerhalb von 15 s statt, während mit einer Spannung von 2500 V in Kanal 2 injiziert wurde. Die Detektion fand in 5 mm Entfernung statt.

Für beide Laserleistungen zeigt sich ein Anstieg der Signalhöhe mit erhöhter Konzentration. Das (S/N)-Verhältnis für die 4 pM FITC-Lösung (10 mW) liegt bei 17 siehe 4.3, so daß die Detektion von geringeren Konzentrationen möglich sein sollte.

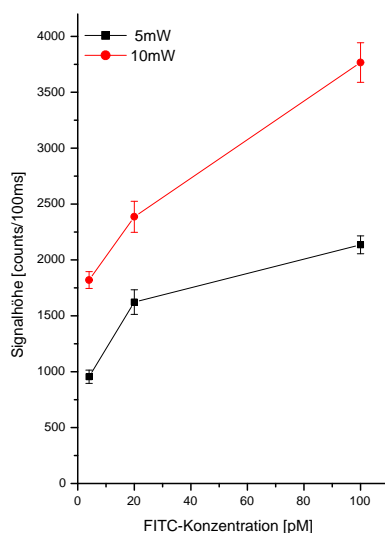


Abbildung 4.9: Vergleich der Signalhöhen für verschiedene FITC-Konzentrationen

Die Injektionsspannung in Kanal 2 betrug 2500 V für alle Messpunkte bis auf den Wert 100 pM, 10 mW (1800 V).

Die Elektropherogramme von 1 pM und 500 fM Fluorescein sind in Abbildung 4.10 gezeigt. Die Farbstofflösung wurde in beiden Fällen mit einer Spannung von 1000 V innerhalb von 14 s in den Kreuzungsbereich gepumpt. Die Injektion in Kanal 2 erfolgte mit einer Spannung von 2000 V. Für die Fluoreszenzanregung wurde der Argon-Ionenlaser mit einer Leistung von 10 mW verwendet. Der Abstand zum Detektor L_D betrug 10 mm.

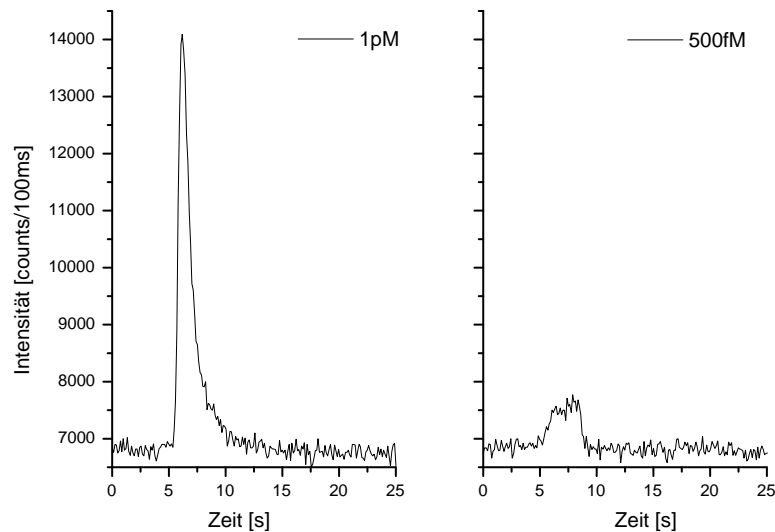


Abbildung 4.10: Elektropherogramme von 1 pM und 500 fM Fluorescein
 Die Injektion der Lösung in den Kreuzungsbereich wurde mit einer Spannung von 1000 V (14s) erreicht, während die in den Kanal 2 mit 2000 V durchgeführt wurde. Die Entfernung zum Detektor beträgt 10 mm. Die Anregung der Farbstoffmoleküle erfolgte durch den Argon-Ionenlaser mit einer Leistung von 10 mW.

In Tabelle 4.3 sind die theoretische Plattenzahl N und die Plattenhöhe H für die beiden Elektropherogramme aufgeführt.

| Konz. | N | H [μm] | l_{inj} [mm] | V_{inj} [pL] | Molekülanzahl |
|--------|--------------|-----------------------|-----------------|----------------|---------------|
| 1 pM | 162 ± 10 | 62 ± 7 | 2.69 ± 0.01 | 874 ± 14 | 5261 ± 8 |
| 500 fM | 37 ± 4 | 269 ± 38 | 5.67 ± 0.04 | 1840 ± 31 | 555 ± 9 |

Tabelle 4.3: Experimentell bestimmte Plattenzahlen für verschiedene Konzentrationen

Es zeigt sich eine Verringerung der theoretischen Plattenzahl mit sinkender Konzentration. Aufgrund der Beziehung $H = L_D/N$ ergibt sich entsprechend ein Anstieg der Plattenhöhe. Die Länge des Probenvolumens l_{inj} im Kreuzungsbereich läßt sich nach Gleichung (2.17), Kapitel 2.4.2, aus den experimentell gewonnenen Daten bestimmen. Eine visuelle Abschätzung der Länge ist aufgrund der geringen Konzentration nicht

möglich. Für das 1 pM-Signal läßt sich eine Länge von $l_{inj} = (2.69 \pm 0.01)$ mm ermitteln, während für das 500 fM-Signal die Länge (5.67 ± 0.04) mm beträgt. Für dieselben Injektionsparameter, wie in diesem Fall, würde man eigentlich die gleiche Volumenlänge erwarten. Solche Abweichungen können Effekten wie Adsorption an Glas im Präparationsgefäß und Detektionssystem, Verunreinigungen in der Lösung und statistische Fluktuationen der Molekülanzahl bei niedrigen Konzentrationen zu gewiesen werden [63].

Aus den Maßen des Mikrochip-Kanals (Breite: $50 \mu m$, Tiefe: $6.5 \mu m$) läßt sich mit der Volumenlänge l_{inj} das Injektionsvolumen berechnen. Die Anzahl der Moleküle im Injektionsvolumen ergibt sich aus der Fluoreszenzkonzentration. Für das 1 pM Fluoreszenzsignal ermittelt man so eine Anzahl von 5261 Molekülen. Im Fall des 500 fM Fluoreszenzsignal erhält man 555 Moleküle.

Für einen Vergleich der erwarteten mit der experimentell ermittelten Signalthöhe muß die Anzahl der Moleküle im Detektorvolumen bestimmt werden. Das Detektorvolumen berechnet sich aus dem Anregungsfenster ($50 \mu m \times 50 \mu m$) und der Kanaltiefe ($6.5 \mu m$) zu 16.25 pL. In diesem Volumen befinden sich bei einer Konzentration von 500 fM fünf Moleküle. Aus dem Abstand $L_D = 10 mm$ und der Migrationszeit $t = 7.25 s$ läßt sich die Geschwindigkeit des Injektionsvolumens zu $v = 1.38 mm/s$ bestimmen. Mit der Länge des Detektionsfensters $l_{det} = 50 \mu m$ berechnet sich für die fünf Moleküle eine Verweildauer von $t = 36 ms$ im Detektorvolumen. In einer Integrationszeit von 100 ms werden demnach 14 Moleküle detektiert. Geht man von der Möglichkeit der 10^5 -fachen Anregung der Moleküle aus sowie einer Quanteneffizienz von 0.5, so erhält man 700000 Photonen. Berücksichtigt man die Quanteneffizienz des PMs (15%) und die Verluste durch optische Komponenten (0.8%), errechnet sich eine Photonenzahl von 840. Aus Abbildung (4.10) läßt sich mittels eines Gaussfits eine Signalthöhe von 820 Photonen bestimmen. Die rechnerisch ermittelte Signalthöhe stimmt gut mit der experimentell erhaltenen überein.

Nach der Detektion von 500 fM Fluorescein ist es ebenso gelungen, 100 fM Fluorescein in Mikrochips zu detektieren. Abbildung 4.11 zeigt das Elektropherogramm von 100 fM Fluorescein. Führt man für diese Konzentration eine Abschätzung der detektierten Moleküle durch, so erhält man innerhalb der Integrationszeit von 200 ms im Detektorvolumen zwei Moleküle. Bei einer Breite des Fluoreszenzsignals⁽¹²⁾ von 6 s entspricht das einer Detektion von 60 Molekülen. Die geringste Konzentration, die Ocvirik et al. [63] elektrokinetisch injizieren konnten, lag bei 1 pM⁽¹³⁾. Mit der Durchfluß-Methode,

¹²siehe Abbildung 4.11

¹³Fluorescein, TRIS/Borat-Puffer pH 9

d.h., kontinuierlicher Fluß der Fluoresceinlösung durch den Kanal, demonstrierten sie des weiteren die Detektion eines $300\text{fM}^{(14)}$ Fluoresceinsignals. Die Detektion der 100fM und 500fM Fluoresceinlösung entspricht daher der bis dahin geringsten elektrokinetisch injizierten Farbstoffkonzentration in Mikrofluidik-Kanälen.

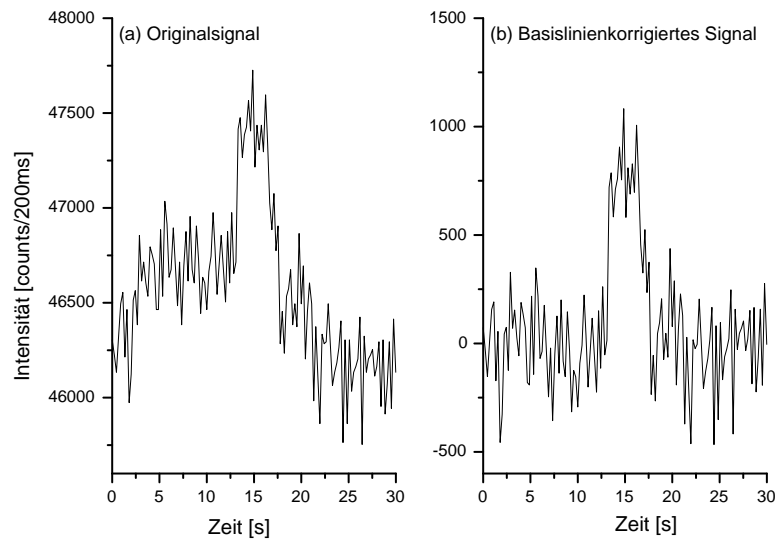


Abbildung 4.11: Elektropherogramm von 100fM Fluorescein

Die Farbstofflösung wurde innerhalb von 20s mit einer Spannung von 1600 V in den Kreuzungsbereich gepumpt und in Kanal 2 mit einer Spannung von 2500 V injiziert. Der Abstand des Detektors betrug 8mm. Die Anregung erfolgte mit dem LaVision Argon-Ionenlaser mit einer Leistung von 25 mW (Integrationszeit 0.2s).

¹⁴TRIS/Borat-Puffer pH 9

5 Zusammenfassung & Ausblick

In dieser Arbeit wurde der Aufbau eines Fluoreszenzdetektionssystems für PDMS Mikrochips auf einem Epifluoreszenzmikroskop realisiert. Es wurde demonstriert, daß der elektroosmotische Fluß in PDMS Mikrokanälen als Transportmechanismus verwendet werden kann. Die Untersuchung verschiedener Einflüsse auf die Mobilität zeigen, daß eine bessere Reproduzierbarkeit der Mobilität mit oxidierten PDMS Kanälen erreicht wird und die Verwendung eines höheren pH-Wertes einen Anstieg der Mobilität bewirkt. Mit einer hohen Auflösung gelang es, innerhalb von 16 Sekunden eine Basislinien-Auftrennung der Farbstoffe FITC und Fluorescein zu erzielen. Die Trennstrecke betrug dabei 13mm. Die Trennung der Proteine IgG und Avidin konnte aufgrund von Quenching-Effekten und Pumpschwierigkeiten der Avidinlösung im verwendeten Puffersystem nicht erreicht werden. Der Vergleich der separat aufgenommenen Elektropherogramme demonstriert jedoch, daß die beiden Proteine im gleichen Puffersystem unterschiedliche Migrationszeiten aufweisen und somit eine Auftrennung möglich sein sollte. Durch Verwendung eines anderen pH-Wertes sowie eines anderen Puffersystems kann die Nettoladung der Proteine dahingehend verändert werden, daß gleichzeitige Injektion möglich wird. Die bisher verwendete Beschichtung zur Vermeidung unspezifischer Adsorption der Proteine kann durch eine alternative Methode wie dynamisches Beschichten oder der Verwendung zwitterionischer Puffer ersetzt werden, um eine Trennung zu verbessern.

Mit den gewonnenen Ergebnissen im sichtbaren Bereich wird es möglich sein, zur Detektion im ultravioletten Spektralbereich überzugehen. Die Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin weisen Anregungswellenlängen im ultravioletten Spektralbereich auf. Diese intrinsischen Fluoreszenzeigenschaften können zur Detektion von Proteinen genutzt werden. Die Notwendigkeit der umständlichen und störenden Fluoreszenzmarkierung der Proteine mit Farbstoffen entfällt damit.

Zusätzlich gelang es, elektrokinetisch injizierte 100fM und 500fM Fluoresceinlösungen in Mikrofluidik-Kanälen zu detektieren. Diese Konzentrationen stellen die bisher ge-

ringsten detektierten Mengen in Mikrochips dar. Die (S/N)-Verhältnisse, speziell des 100fM Fluoreszenzsignals, könnte durch eine weitere Optimierung in der Justage des Systems vergrößert werden. Des weiteren ist es für eine Erhöhung des Kontrasts wichtig, den Streulichtanteil des Signals zu verringern. Die Verwendung eines Detektors mit einem höheren Wirkungsgrad ($> 15\%$) böte die Möglichkeit, geringere Laserleistungen zu nutzen. Weiterhin kann der Streulichtanteil durch ein definiertes Anregungsvolumen gesenkt werden. Ein evaneszentes Wellenfeld kann diese lokalisierte Anregung erzielen. Die Zwei-Photonen Anregung wäre eine weitere Option dafür.

6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben. Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Diplomarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Ebenso danke ich ihm für sein entgegengebrachtes Vertrauen, sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit sowie seinen ansteckenden Optimismus.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Alexandra Ros für die Betreuung der Arbeit, ihre Ratschläge sowie ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, was wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Dr. Robert Ros danke ich für sein Interesse an der Arbeit, seine Unterstützung und Aufmunterungen, die aufkommenden Pessimismus schnellstens zu verdrängen halfen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Christoph Pelargus für die Hilfe bei technischen Problemen und die tatkräftige Unterstützung bei der Realisierung des experimentellen Aufbaus.

Des weiteren gilt mein Dank Frau Dr. Katja Tönsing für die Beantwortung vieler chemischer Fragen unabhängig ihres Schwierigkeitsgrads.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe *Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaft* danke ich für die angenehme und lockere Arbeitsatmosphäre. Dabei danke ich Thanh Tu Duong ganz besonders für seine Unterstützung. Ohne ihn hätte es nicht so viele lustige Stunden und wertvolle Diskussionen über unser Arbeitsgebiet gegeben. Weiterhin möchte ich mich bedanken bei Carola Haumann für die seelische Unterstützung und das Korrekturlesen ungezählter Versionen, bei Rainer Eckel für die ernsthaften Feierabenddiskussion über Zukunftspläne und die Mentalität der Deutschen, bei Hermann Kleine für die morgendlichen Kartengrüße und die „süßen“ Aufmunterungen sowie bei Antonija Cvitkovic für die Versorgung mit Nervennahrung.

Bei den Mitarbeitern der Mechanik- und Elektrotechnik-Werkstatt bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern danken, die mit ihrer Unterstützung und ihrer Geduld, die sie während jeder Prüfungsphase aufbrachten, das Studium erst ermöglichten. Meinen Freunden, speziell Claudia Fischer und Volker Höink, danke ich für das Korrekturlesen und die Abwechslung vom Uni-Alltag.

A Anhang

A.1 Elektroosmotischer Fluß

Zur Ergänzung des Grundlagenteils 2.2 erfolgt hier die Herleitung der elektroosmotischen Mobilität $\mu_{eof} = \frac{\epsilon \zeta}{\eta}$. Für die quantitative Beschreibung des elektroosmotischen Flusses muß zunächst ein Ausdruck für die Ladungsdichte der an der Kanalwand adsorbierten Ionen der Lösung gefunden werden. Die folgende Gleichung liefert den Zusammenhang zwischen der Ladungsdichte $\rho_e(x)$ im Abstand x von der Oberfläche und der Ionenkonzentration der Elektrolytlösung:

$$\rho_e(x) = \sum_i z_i e n_i(x) \quad (\text{A.1})$$

z_i = Valenz des Ions i

e = Elementarladung

n_i = Ionenkonzentration des Typs i

Für die Bestimmung von $\rho_e(x)$ ist es erforderlich, die Ionenkonzentration $n_i(x)$ zu kennen. Die Ionen der Elektrolytlösung werden entsprechend ihrer Ladung von der Oberfläche angezogen oder abgestoßen. Diese elektrostatische Wechselwirkung zusammen mit der Brownschen Molekularbewegung ergibt die Verteilung der Ionen entlang einer geladenen Oberfläche. Debye und Hückel faßten dies in der Form einer Boltzmann Verteilung zusammen:

$$\frac{n_i(x)}{n_{i0}} = \exp\left(\frac{-z_i e \Psi(x)}{kT}\right) \quad (\text{A.2})$$

wobei n_{i0} die Ionendichte ohne Einfluß eines elektrischen Potentials, $\Psi(x)$ das elektrische Potential an der Stelle x , k der Boltzmann Faktor und T die absolute Temperatur beschreiben. Ersetzt man nun die Ionendichte $n_i(x)$ in Gleichung (A.1), so erhält man den folgenden Ausdruck für $\rho_e(x)$:

$$\rho_e(x) = \sum_i z_i e n_{i0} \exp\left(\frac{-z_i e \Psi(x)}{kT}\right) \quad (\text{A.3})$$

Für den nächsten Schritt wird zur Vereinfachung die sog. Debye-Hückel-Approximation ($z_i e \Psi(x) \leq kT$) durchgeführt. Diese Näherung ermöglicht das Ersetzen des Exponentialterms der obigen Gleichung mit $\exp(x) \approx (1 + x)$ wie folgt:

$$\rho_e(x) = \sum_i \left(z_i e n_{i0} - \frac{z_i^2 e^2 n_{i0} \Psi(x)}{kT} \right) \quad (\text{A.4})$$

Da Elektoneutralität gewährleistet sein muss, entfällt der Term $\sum_i z_i e n_{i0}$, und die Gleichung reduziert sich zu:

$$\rho_e(x) = - \sum_i \frac{z_i^2 e^2 n_{i0}}{kT} \Psi(x) \quad (\text{A.5})$$

Die Poisson-Gleichung liefert den Zusammenhang zwischen der Ladungsdichte $\rho_e(x)$ und dem elektrischen Potential $\Psi(x)$:

$$\frac{d^2 \Psi}{dx^2} = - \frac{\rho_e(x)}{\varepsilon} \quad \text{mit } \varepsilon = \text{Dielektrizitätskonstante} \quad (\text{A.6})$$

Durch Substitution von $\rho_e(x)$ durch Ausdruck (A.5) ergibt sich die folgende Gleichung:

$$\frac{d^2 \Psi}{dx^2} = \sum_i \frac{z_i^2 e^2 n_{i0}}{\varepsilon kT} \Psi(x) \quad (\text{A.7})$$

Diese Gleichung läßt sich durch Zusammenfassen der Konstanten vereinfachen zu:

$$\frac{d^2 \Psi}{dx^2} = \kappa^2 \Psi(x) \quad \text{mit } \kappa^2 = e^2 \sum_i \frac{z_i^2 n_{i0}}{\varepsilon kT} \quad (\text{A.8})$$

Durch zweifache Integration und Berücksichtigung der Integrationsgrenzen; $\Psi = \Psi_0$ für $x = 0$ (Grenze zwischen Kanalwand und Lösung) und $\Psi = 0$ für $x = \infty$; erhält man für das elektrische Potential:

$$\Psi(x) = \Psi_0 \exp(-\kappa x) \quad (\text{A.9})$$

Mit der Entfernung von der Kanalwand nimmt das elektrische Potential $\Psi(x)$ exponentiell ab (vergleiche den Potentialverlauf im Bereich (b) und (c), Abbildung (2.2), Kapitel 2.2). Da der Exponent der e-Funktion dimensionslos sein muß, besitzt κ^{-1} die Dimension einer Länge. κ^{-1} bezeichnet man daher auch als Doppelschichtdicke oder Debye-Länge. Für eine 0.01 molare, symmetrische Elektrolytlösung [$1Z^+ : 1Z^-$] beträgt die Dicke 3.04 nm [19]. Für den Abstand $x = \kappa^{-1}$ von der Kanalwand ist die Exponentialfunktion auf $1/e$ des elektrischen Potentials Ψ_0 abgefallen.

Einen Ausdruck für die Ladungsdichte $\rho_e(x)$ erhält man durch Substitution von Gleichung (A.9) in Gleichung (A.6).

$$\rho_e(x) = -\varepsilon \kappa^2 \Psi_0 \exp(-\kappa x) \quad (\text{A.10})$$

Die Ladungsdichte zeigt also eine Abhängigkeit von dem elektrischen Potential Ψ_0 an der Kanalwand und der Elektrolytlösung, da κ durch die Konzentration und den pH-Wert der Lösung beeinflussbar ist. Mit dem Ausdruck für ρ_e läßt sich nun das Geschwindigkeitsprofil des elektroosmotischen Flusses ermitteln. Die Geschwindigkeit $v(x)$ einer Newtonschen Flüssigkeit ergibt sich aus der Summe der auf ein Volumenelement der Ladungsdichte $\rho_e(x)$ wirkenden Reibungskräfte und der durch ein elektrisches Feld hervorgerufenen elektrischen Kraft. Die Bewegungsgleichung dieser Lösung entlang einer flachen, geladenen Oberfläche unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes E lautet daher:

$$\eta \frac{d^2 v_z(x)}{dx^2} = E_z \rho_e(x) \quad (\text{A.11})$$

wobei η die Viskosität der Lösung und v_z die Geschwindigkeit in Richtung des elektrischen Feldes (in z -Richtung) beschreibt. Zweifache Integration unter Berücksichtigung der Integrationsgrenzen; $dv/dx = 0$ bei $x = \infty$ und $v = 0$ bei $x = x_1$; ergibt als Resultat:

$$v_z(x) = \frac{E_z \varepsilon \zeta}{\eta} (1 - \exp(-\kappa x)) \quad (\text{A.12})$$

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

$$v_z(x) \approx v_\infty = \frac{E_z \varepsilon \zeta}{\eta} \quad (\text{A.13})$$

Normiert auf das elektrische Feld liefert das den Ausdruck für die elektroosmotische Mobilität:

$$\mu_{eof} = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \quad (\text{A.14})$$

Wie bereits im theoretischen Teil erwähnt, hängt die elektroosmotische Geschwindigkeit nicht vom Querschnitt des Kanals ab (bis auf den Bereich der diffusen Schicht), was die Bildung eines stempelförmigen Strömungsprofils zur Folge hat. Die mathematische Darstellung zum elektroosmotischen Fluß folgt den Ausführungen von Grossmann [19].

Literaturverzeichnis

- [1] G. H. W. Sanders and A. Manz. Chip-based microsystems for genomic and proteomic analysis. *trends in analytical chemistry*, 19(6):364–378, 2000.
- [2] H. Becker and C. Gärtner. Mikrosystemtechnik in den Life Sciences. *Physikalische Blätter*, 55(6):51–53, 1999.
- [3] S. C. Terry, J. H. Jerman, and J. B. Angell. A gas chromatographic air analyzer fabricated silicon wafer. *IEEE Trans. Electron. Device*, 26:1880, 1979.
- [4] A. Manz, N. Graber, and H. M. Widmer. Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B*, B1:244–248, 1990.
- [5] A. Manz, Y. Miyahara, J. Miura, Y. Watanabe, H. Miyagi, and K. Sato. Design of an open-tubular column liquid chromatograph using silicon chip technology. *Sensors and Actuators B*, B1:249–255, 1990.
- [6] S. C. Jakeway, A. J. De Mello, and E. L. Russell. Miniaturized total analysis systems for biological analysis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366:525–539, 2000.
- [7] D. J. Harrison, A. Manz, Z. Fan, H. Lüdi, and H. M. Widmer. Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip. *Analytical Chemistry*, 64:1926–1932, 1992.
- [8] A. Manz, D. J. Harrison, E. Verpoorte, J. C. Fettinger, A. Paulus, H. Lüdi, and H. M. Widmer. Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems: Capillary electrophoresis on a chip. *Journal of Chromatography*, 593:253–258, 1992.

-
- [9] C. X. Zhang and A. Manz. Narrow sample channel injectors for capillary electrophoresis on microchips. *Analytical Chemistry*, 73:2656–2662, 2001.
- [10] S. C. Jacobson, R. Hergenröder, L. B. Koutny, and J. M. Ramsey. High speed separation on a microchip. *Analytical Chemistry*, 66:1114–1118, 1994.
- [11] K. Seiler, D. J. Harrison, and A. Manz. Planar glass chips for capillary electrophoresis: Repetitive sample injection, quantitation, and separation efficiency. *Analytical Chemistry*, 65:1481–1488, 1993.
- [12] C. S. Effenhauser, A. Manz, and H. M. Widmer. Glass chips for high-speed capillary electrophoresis separations with submicrometer plate heights. *Analytical Chemistry*, 65:2637–2642, 1993.
- [13] D. J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler, Z. Fan, C. S. Effenhauser, and A. Manz. Micro-machining a miniaturized capillary electrophoresis-based chemical analysis system on a chip. *Science*, 261:895–897, 1993.
- [14] C. I. Colyer, S. D. Mangru, and D. J. Harrison. Microchip-based capillary electrophoresis of human serum proteins. *Journal of Chromatography A*, 781:271–276, 1997.
- [15] J. W. Jorgenson and K. Lukacs. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Analytical Chemistry*, 53:1298–1302, 1981.
- [16] J. W. Jorgenson and K. Lukacs. High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis. *Journal of Chromatography*, 218:209–216, 1981.
- [17] S. C. Jacobson, R. Hergenröder, L. B. Koutny, and J. M. Ramsey. Open channel electrochromatography on a microchip. *Analytical Chemistry*, 66:2369–2373, 1994.
- [18] R. Kuhn and S. Hoffstetter-Kuhn. *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*. Springer Verlag, 1993.
- [19] P. D. Grossman and J. C. Colburn. *Capillary Electrophoresis- Theory and Practice*. Academic Press, 1992.
- [20] D. Ross, T. J. Johnson, and L. E. Locascio. Imaging of electroosmotic flow in plastic microchannels. *Analytical Chemistry*, 73:2509–2515, 2001.

- [21] P. H. Paul, M. G. Garguilo, and D. J. Rakestraw. Imaging of pressure- and electrokinetically driven flows through open capillaries. *Analytical Chemistry*, 70:2459–2467, 1998.
- [22] S. F. Y. Liu. *Capillary Electrophoresis: principles, practice and applications*. Elsevier Science Publisher, 1993.
- [23] J. E. Sandoval and S.-M. Chen. Method for the accelerated measurement of electroosmosis in chemically modified tubes for capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 68:2771–2775, 1996.
- [24] B. J. Wander, A. A. A. M. van de Goor, and F. M. Everaerts. Methods for on-line determination and control of electroendosmosis in capillary electrochromatography and electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 470:89–93, 1989.
- [25] X. Huang, M. J. Gordon, and R. N. Zare. Current-monitoring method for measuring the electroosmotic flow rate in capillary zone electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 60:1837–1838, 1988.
- [26] M. A. Roberts, J. S. Rossier, P. Bercier, and H. H. Girault. UV laser machined polymer substrates for the development of microdiagnostic systems. *Analytical Chemistry*, 69(11):2035–2042, 1997.
- [27] G. Ocvirk, M. Munroe, T. Thompson, R. Oleschuk, K. Westra, and D. J. Harrison. Electrokinetic control of fluid flow in native poly(dimethylsiloxane) capillary electrophoresis devices. *Electrophoresis*, 21:107–115, 2000.
- [28] L. E. Locascio, C. E. Perso, and C. S. Lee. Measurement of electroosmotic flow in plastic imprinted microfluid devices and the effect of protein adsorption on flow rate. *Journal of Chromatography A*, 857:257–284, 1999.
- [29] A. Manz, D. J. Harrison, E. Verpoorte, and H. M. Widmer. Planar chips technology for miniaturization of separation systems: A developing perspective in chemical monitoring. *Advanced Chromatograph*, 33:1–66, 1993.
- [30] Y. Liu, J. C. Fanguy, J. M. Bledsoe, and C. S. Henry. Dynamic coating using polyelectrolyte multilayers for chemical control of electroosmotic flow in capillary electrophoresis microchips. *Analytical Chemistry*, 72:5939–5944, 2000.
- [31] V. Dolnik, S. Liu, and S. Jovanovich. Capillary electrophoresis on a microchip. *Electrophoresis*, 21:41–54, 2000.

-
- [32] R. M. McCormick, R. J. Nelson, M. G. Alonso-Amigo, D. J. Benvegno, and H. H. Hooper. Microchannel electrophoretic separations of DNA in injection-molded plastic substrates. *Analytical Chemistry*, 69:2626–2630, 1997.
- [33] L. Martynova, L. E. Locascio, M. Gaitan, G. W. Kramer, R. G. Christensen, and W. A. MacCrehan. Fabrication of plastic microfluid channels by imprinting methods. *Analytical Chemistry*, 69:4783–4789, 1997.
- [34] C. S. Effenhauser, G. J. M. Bruin, A. Paulus, and M. Ehrat. Integrated capillary electrophoresis on flexible silicone microdevices: Analysis of DNA restriction fragments and detection of single DNA molecules on microchips. *Analytical Chemistry*, 69:3451–3457, 1997.
- [35] D. C. Duffy, J. Cooper McDonald, O. J. A. Schueller, and G. M. Whitesides. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry*, 70:4974–4984, 1998.
- [36] P. Linderholm and P. Asberg. 3d/multi-layered PDMS microfluidic systems. *project report (IFM)*, 2000.
- [37] B. A. Grzybowski, R. Haag, N. Bowden, and G. M. Whitesides. Generation of micrometer-sized patterns for microanalytical applications using a laser direct-write method and microcontact printing. *Analytical Chemistry*, 70:4645–4652, 2002.
- [38] E. Delamarche, A. Bernard, H. Schmid, A. Bietsch, B. Michel, and H. Biebuyck. Microfluidic networks for chemical patterning of substrates: Design and application to bioassays. *Journal of American Chemical Society*, 120:500–508, 1998.
- [39] E. Delamarche, H. Schmid, B. Michel, and H. Biebuyck. Stability of molded polydimethylsiloxane microstructures. *Advanced Materials*, 9(9):741–746, 1997.
- [40] Y. Xia and G. M. Whitesides. Softlithographie. *Angewandte Chemie*, 110:568–594, 1998.
- [41] E. Delamarche, A. Bernard, H. Schmid, B. Michel, and H. Biebuyck. Patterned delivery of immunoglobulins to surfaces using microfluidic networks. *Science*, 276:779–781, 1997.
- [42] A. Kumar and G. M. Whitesides. Features of gold having micrometer and centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an

- elastomeric stamp and an alkanethiol ink followed by chemical etching. *Applied Physics Letters*, 63(14):2002–2004, 1993.
- [43] E. Kim, Y. Xia, and G. M. Whitesides. Polymer microstructures formed by moulding in capillaries. *Nature*, 376:581–584, 1995.
- [44] S. C. Jacobson, R. Hergenröder, L. B. Koutny, R. J. Warmack, and J. M. Ramsey. Effects of injection schemes and column geometry on the performance of microchip electrophoresis devices. *Analytical Chemistry*, 66:1107–1113, 1994.
- [45] Z. Fan and D. J. Harrison. Micromachining of capillary electrophoresis injectors and separators on glass chips and evaluation of flow at capillary intersections. *Analytical Chemistry*, 66:177–184, 1994.
- [46] S. Liu, Y. Shi, W. W. Ja, and R. A. Mathies. Optimization of high-speed DNA sequencing on microfabricated capillary electrophoresis channels. *Analytical Chemistry*, 71:566–573, 1999.
- [47] S. Wallenborg and C. G. Bailey. Separation and detection of explosives on a microchip using micellar electrokinetic chromatography and indirect laser-induced fluorescence. *Analytical Chemistry*, 72:1872–1878, 2000.
- [48] L. D. Hutt, D. P. Glavin, J. L. Bada, and R. A. Mathies. Microfabricated capillary electrophoresis amino acid chirality analyzer for extraterrestrial exploration. *Analytical Chemistry*, 71:4000–4006, 1999.
- [49] M. Hashimoto, K. Tsukagoshi, R. Nakajima, K. Kondo, and A. Arai. Microchip capillary electrophoresis using on-line chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A*, 867:271–279, 2000.
- [50] K. Seiler, Z. Fan, K. Fluri, and D. J. Harrison. Electroosmotic pumping and valveless control of fluid flow within a manifold of capillaries on a glass chip. *Analytical Chemistry*, 66:3485–3491, 1994.
- [51] J. Khandurina, T. E. McKnight, S. C. Jacobson, L. C. Waters, R. S. Foote, and J. M. Ramsey. Integrated system for rapid PCR-based DNA analysis in microfluidic devices. *Analytical Chemistry*, 72:2995–3000, 2000.
- [52] O. Salas-Solano, D. Schmalzing, L. Koutny, S. Buonocore, A. Adourian, P. Matsudaira, and D. Ehrlich. Optimization of high-performance DNA sequencing on short microfabricated electrophoretic devices. *Analytical Chemistry*, 72:3129–3137, 2000.

-
- [53] S. L. Delinger and J. M. Davis. Influence of analyte plug width on plate number in capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 64:1947–1959, 1992.
- [54] J. R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Kluwer Academic/ Plenum Publisher, 2nd edition edition, 1999.
- [55] R. Winter and F. Noll. *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Teubner Studienbücher Chemie, 1998.
- [56] M. Alonso and E. J. Finn. *Physik 3 - Quantenphysik und statistische Physik*. Inter European Editions, 1974.
- [57] R. T. Kennedy. Bioanalytical applications of fast capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 400:163–180, 1999.
- [58] Z. Liang, N. Chiem, G. Ocvirk, T. Tang, K. Fluri, and D. J. Harrison. Microfabrication of a planar absorbance and fluorescence cell for integrated capillary electrophoresis devices. *Analytical Chemistry*, 68:1040–1046, 1996.
- [59] F. Lottspeich and H. Zorbas. *Bioanalytik*. Spectrum Akademischer Verlag, 1998.
- [60] H. J. Crabtree, E. C. S. Cheong, D. A. Tilroe, and C. J. Backhouse. Microchip injectors and separation anomalies to pressure effects. *Analytical Chemistry*, 73:4079–4086, 2001.
- [61] Y. Liu, R. S. Foote, C. T. Culbertson, S. C. Jacobson, R. S. Ramsey, and J. M. Ramsey. Electrophoretic separation of proteins on a microchip. *Journal of Microcolumn Separations*, 12(7):407–411, 2000.
- [62] N. Chiem and D. J. Harrison. Microchip-based capillary electrophoresis for immunoassays-Analysis of monoclonal antibodies and theophylline. *Analytical Chemistry*, 69:373–378, 1997.
- [63] G. Ocvirk, T. Thompson, and D. J. Harrison. Optimization of confocal epifluorescence microscopy for microchip-based miniaturized total analysis systems. *The Analyst*, 123:1429–1434, 1998.