

Integrierte Mikrofluidsysteme**

Rustem F. Ismagilov*

Stichwörter:

Analytische Methoden · Enzyme · Microfluidics ·
Mikroreaktoren · Proteinstrukturen

Mikrofluidsysteme nutzen Netzwerke von Kanälen, die dünner als das menschliche Haar sind, zur Handhabung von Reagentien in Nanolitervolumina. Das Ziel von Microfluidics ist herausfordernd: auf einem Chip kleiner als eine Kreditkarte all jene Operationen zu integrieren, die gewöhnlich in einem chemischen oder medizinischen Labor durchgeführt werden. Synthese, Aufreinigung, Analyse und Diagnostik ließen sich mit einem solchen „lab on a chip“ schnell, ökonomisch und mit winzigen Probevolumina ausführen. Dieser Scale-down-Ansatz wurde oft mit dem Miniaturisierungsprozess in der Computerindustrie verglichen, an dessen Erfolg er sich orientiert. Hier führte die Miniaturisierung und Integration tausender Transistoren auf einem Siliciumchip zum schnellen Zuwachs der Leistungsfähigkeit und zur Verbilligung von Computern. Dieses Highlight beschreibt zwei signifikante Schritte hin zu diesen ehrgeizigen Zielen.

Mehrstufige katalytische Reaktionen mit Mikroperlen

Seong und Crooks^[1] berichteten über ein Mikrofluidsystem aus mikroskopischen Perlen in Mikrofluidkanälen zur Ausführung sequenzieller katalytischer Reaktionen. Bemerkenswert daran ist, dass die Mikroperlen zwei Funktionen zugleich erfüllen: Sie bewirken eine schnelle Durchmischung der Reagentien (Abbildung 1) und dienen als Träger für immobilisierte enzymatische Katalysatoren (Abbildung 2).

Das Durchmischen von Lösungen in Mikrofluidkanälen ist ein schwieriger Prozess – zwei Ströme, die in einen Mikrokanal injiziert werden, fließen zunächst parallel und mischen sich, ausschließlich durch Diffusion, nur langsam. Eine effiziente Durchmischung wird dann erzielt, wenn die Ströme in dünne Teilströme (Laminae) geteilt und anschließend so rekombiniert werden, dass die Laminae der beiden unterschiedlichen Flüssigkeiten in Kontakt kommen. Die Durchmischung wird durch die schnelle Diffusion in die dicken Laminae, die über eine große Gesamtoberfläche austauschen, beschleunigt. Dieses Teilen und Rekombinieren eines Stroms, das sich nicht in der einfachen Geometrie eines gleichmäßig laminaren Flusses vollzieht, wird durch unterschiedliche Methoden erreicht. Eine dreidimensionale Mikrovor-

richtung wurde beispielsweise zur direkten multilaminaren Durchmischung^[2] oder zur Auslösung einer chaotischen Advektion eingesetzt,^[3] wobei wiederholt die Ströme geteilt und rekombiniert und so stetig dünner werdende Laminae erzeugt werden.^[4,5] Alternativ kann die Zeit als dritte Dimension genutzt werden.^[3] In diesem Fall basiert die chaotische Advektion auf instationären, zeitlich periodischen Flüssen in Tröpfchen, die sich durch Kanäle bewegen, die mit herkömmlichen zweidimensionalen Methoden gefertigt wurden.^[6]

Seong und Crooks berichteten über die außergewöhnliche Beobachtung, dass ein solches Teilen und Rekombinieren („distributives Mischen“) einfach beim Fluss einer Lösung durch eine Packung von Mikroperlen in einem Mikrofluidkanal auftritt (Abbildung 1); die Perlen sind nur etwa zehnmal kleiner als der Kanal. Der Fluss um eine einzelne große Perle in einem Kanal kann leicht simuliert werden. Aus dem Modell geht nicht hervor, dass eine einzelne Perle eine signifikante Durchmischung bewirkt. Der Fluss durch einen Kanal, der tausende perfekt ge-

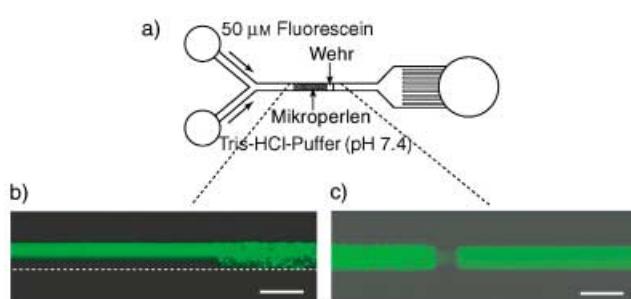


Abbildung 1. Mischung zweier laminarer Ströme durch Mikroperlen in einem Mikrofluidkanal.^[1] a) Schema des Mikrofluidelements; b) Mikrofluoreszenzaufnahme von getrennten laminaren Strömen von Fluorescein- und Pufferlösung beim Eintritt in den gepackten Bereich des Mikrokanals; c) Mikrofluoreszenzaufnahme, die die vollständige Durchmischung der beiden Ströme nach Verlassen des gepackten Bereichs illustriert. Längenmaßstab: 200 μm. Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [1].

packte Perlen enthält, kann durch Mean-Field-Näherungen simuliert werden. Auch in diesem Fall wird keine effiziente Durchmischung erwartet. Der von Seong und Crooks beschriebene Zwischenbereich, mit nur einigen Perlen über die Breite des Kanals, ist vom theoretischen Standpunkt aus besonders herausfordernd, da das Fließmuster stark von Packungsdefekten abhängen dürfte. Diese treten zwangsläufig auf, wenn rechteckige Kanäle mit kugelförmigen Perlen mittlerer Größe gepackt werden (insbesondere wenn die Perlen nicht einheitlich sind). Ein dreidimensionales Netz solcher Defekte könnte Flüsse wirksam teilen und rekombinieren, und der Prozess sollte durch gezielte Steuerung der Defekte optimierbar sein. Diese Ergebnisse geben sicher Anstoß zu weiteren theoretischen und experimentellen Arbeiten und sind ein interessantes Beispiel dafür, wie neue Entwicklungen in der Chemie neue Fragen in der Physik aufwerfen können.

Mikroperlen, die immobilisierte Enzyme^[7] und heterogene Katalysatoren tragen,^[8] stellen das für effiziente heterogene Reaktionen erforderliche hohe Oberfläche-Volumen-Verhältnis bereit.^[8] Ein herausragendes Merkmal des von Seong und Crooks beschriebenen Systems ist dessen Fähigkeit, mehrstufige Umwandlungen durchzuführen. Um die Anwendungsauglichkeit zu de-

monstrieren, wurden Mikrofluidkanäle mit zwei unterschiedlich gepackten Bereichen gefertigt. Eingesetzt wurden Trägerperlen mit 1) immobilisierter Glucoseoxidase und 2) immobilisierter Meerrettichperoxidase (HRP, Abbildung 2). Beim Fluss einer Glucoselösung durch die Kanäle wurde Glucose durch Glucoseoxidase unter Bildung von H_2O_2 katalytisch oxidiert. Eine Lösung des nichtfluoreszierenden Farbstoffs Amplex Red wurde stromabwärts der ersten Packung von Mikroperlen injiziert. Die auf der zweiten Packung von Perlen immobilisierte Meerrettichperoxidase nutzte das in der ersten Reaktion freigesetzte H_2O_2 zur katalytischen Oxidation von Amplex Red zu rot fluoreszierendem Resorufin. Dem System dürften sich viele Anwendungsmöglichkeiten in der biochemischen Analyse und Synthese mehrstufiger katalytischer Reaktionen bieten.

Großintegration von Mikrofluidsystemen

Eine jüngste Entwicklung durch Quake et al.^[9] verdeutlicht eindrucksvoll die Analogie zwischen der Miniaturisierung von Computern und mikroanalytischen Systemen. In dieser Studie wurde eine Lösung für das Problem der Großintegration („large-scale integration“)

„LSI; in der Computerterminologie bezeichnet LSI eine integrierte Schaltung mit mehr als 1000 Transistorsystemen) von Mikrofluidnetzwerken präsentiert. Das größte Problem beim Betreiben eines Chips mit einer Anordnung von Millionen von Transistoren ist die Adressierbarkeit. Ziel ist es, sämtliche Transistoren mit einem Minimum an elektronischen Schnittstellen zur Außenwelt zu adressieren. Da gleiche Problem tritt bei einem Mikrofluidsystem mit Tausenden von mikroskopischen Reaktionsvolumina auf: Diese müssen über ein Minimum an adressierbaren Eintrittskanälen mit den Reagenzien gefüllt werden.

Quake et al. implementierten zunächst ein funktionierendes Mikrofluid-Multiplexing, d.h. die Steuerung eines Flusses durch eine große Zahl von Kanälen (F) mithilfe einer kleinen Zahl an Steuerkanälen (C). Das Steuerungsprinzip beruht auf dem An- und Abschalten des Flusses im Fließkanal mit einem Ventil. Kleine Systeme können durch Einbringen eines Ventils in jeden Fließkanal leicht gesteuert werden. Mit zunehmendem Umfang des Systems wird die Zahl der Steuerungselemente aber inakzeptabel groß.

Quake et al. lösten dieses Problem durch Anwendung von Mikrofluid-Multiplexing, einem eleganten Verfahren, das zum Einsatz von Multiplexern auf Computerchips analog ist. Der Aufbau solcher Systeme beruht entscheidend auf der Möglichkeit, dreidimensionale Strukturen in Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) herzustellen und durch Nutzung der elastomeren Eigenschaften von PDMS Ventile an den Übergängen der Mikrokanäle zu erzeugen.^[10] Das einfache Prinzip von Multiplexing ist in Abbildung 3 für acht Fließkanäle veranschaulicht, die von drei Paaren von Steuerkanälen gesteuert werden. Einer der Steuerkanäle eines Paares öffnet und schließt die eine Hälfte der Ventile (vier von acht), der zweite die verbleibende Hälfte. Genauso wie jede beliebige Zahl von 0 bis 7 durch einen 3-Bit-Binärcode dargestellt werden kann, kann jeder der acht Kanäle durch drei Paare von Steuerkanälen geöffnet, d.h. adressiert werden. Bei kleinen Netzwerken ist die Zahl an Steuerkanälen nur geringfügig kleiner als die Zahl an Fließkanälen. Die erforderliche Zahl

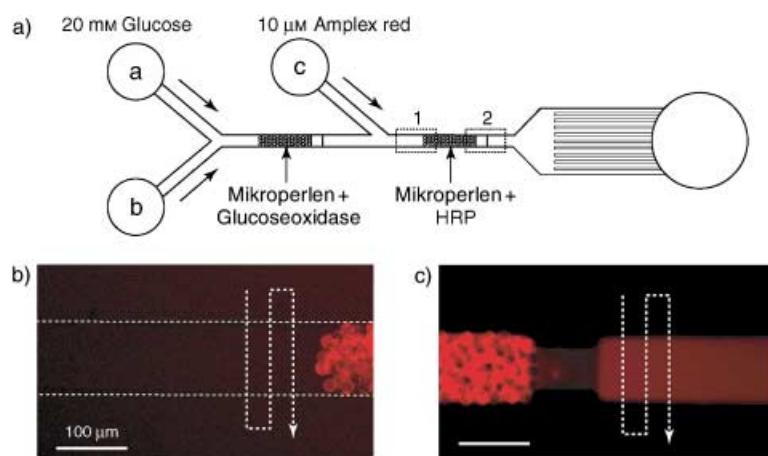


Abbildung 2. Zweistufige chemische Umwandlung unter Einsatz von katalysatorbelegten Mikroperlen in einem Mikrofluidkanal.^[1] a) Schema des Mikrofluidelements; b) Mikrofluoreszenzaufnahme der Flüssigkeit beim Eintritt in den zweiten gepackten Bereich des Mikrokanals (Rechteck 1 in a); c) Mikrofluoreszenzaufnahme der leuchtend fluoreszierenden Flüssigkeit beim Verlassen des zweiten gepackten Bereichs (Rechteck 2 in a). Fluoreszierendes Resorufin wurde durch Enzym-katalysierte Oxidation von Amplex Red durch H_2O_2 gebildet, das seinerseits durch Glucoseoxidase entsteht, die im ersten gepackten Bereich immobilisiert ist. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [1].

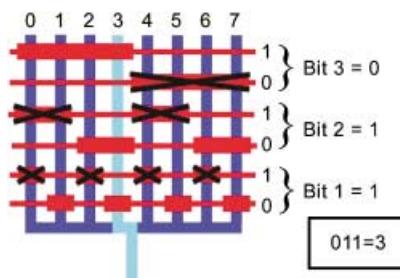


Abbildung 3. Prinzip des Mikrofluid-Multiplexing.^[9] Die Flüssigkeit, die durch die acht vertikalen Fließkanäle strömt, wird durch drei Paare von horizontalen Steuerkanälen gesteuert. Die geweiteten Bereiche der Steuerkanäle entsprechen Ventilen, die die Fließkanäle öffnen und schließen. Jedes Paar von Steuerkanälen kann als ein Binärbit beschrieben werden, und jede binäre 3-Bit-Zahl entspricht dem geöffneten Zustand einer der acht Fließkanäle. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [9].

an Steuerelementen beträgt $C = 2 \log_2 F$, sodass bei acht Fließkanälen sechs Steuerkanäle notwendig sind. Bei größeren Netzwerken ist die „Ersparnis“ wesentlich höher: Für 1024 Fließkanäle z. B. werden nur 20 Steuerkanäle benötigt.

Um die Funktionalität ihres Systems zu demonstrieren, fertigten die Autoren eine Anordnung von 256 individuell adressierbaren Mikroreaktoren an. Wie in Abbildung 4 gezeigt, kann jeder Mikroreaktor mit zwei unterschiedlichen Lösungen gefüllt werden, die sich durch-

mischen und reagieren können. Die Produkte werden danach selektiv isoliert. Dieses System wurde zur Hochdurchsatzdetektion von einzelnen bakteriellen Zellen genutzt, die rekombinante Cytochrom-C-Peroxidase exprimieren.

In einer weiterführenden Studie^[11] wendeten Quake et al. diese Methode zum Screening von Kristallisationsbedingungen für Proteine an, ein gleichermaßen schwieriges und wichtiges Problem. Screeningprozesse werden bei der Kristallisation von Proteinen häufig angewendet, erfordern aber entweder eine teure Automatisierung oder aufwändige manuelle Arbeit. Darüber hinaus müssen inakzeptabel große Volumina konzentrierter Proteinlösungen eingesetzt werden. Mikrofluidsysteme haben das Potenzial, diese Probleme auf einen Schlag zu lösen: Sie sind preiswert, können automatisiert werden und verbrauchen minimale Mengen an Proteinen. Mit dem in Abbildung 4 dargestellten Mikrofluid-Chip gelang z. B. die Parallelführung von 144 Einzeltests, von denen jeder nur 10 nL der Proteinlösung erforderte. Manuelles Dosieren hätte ungefähr eine 100-mal größere Proteinmenge erfordert. Die Lösungen des Proteins und eines Fällungsmittels wurden in jedem Kompartiment dieses Chips vereinigt, und die Kristalle bildeten sich durch langsame Flüssig-flüssig-Diffusion der beiden Lösungen. Herausragend ist, dass bis dahin eine Kristallisation durch Flüssig-flüssig-Diffusion im Schwerefeld der Erde nicht möglich war.

ten sich durch langsame Flüssig-flüssig-Diffusion der beiden Lösungen. Herausragend ist, dass bis dahin eine Kristallisation durch Flüssig-flüssig-Diffusion im Schwerefeld der Erde nicht möglich war.

Ausblick

Microfluidics ist ein vielversprechendes interdisziplinäres Aufgabenfeld, in dem Chemie, Biologie, Physik und Technik produktiv ineinander greifen. Die hier vorgestellten Studien verdeutlichen, wie das Konzept von Miniaturisierung und Integration in die Praxis umgesetzt werden kann. Der Anwendung von Microfluidics bietet sich eine Vielfalt von Perspektiven – von der Steuerung der Oberflächenchemie und der Entwicklung neuer Materialien bis hin zu neuen analytischen und synthetischen Methoden. Und als Clou schafft Microfluidics die Grundlage einer neuen, bislang völlig unbekannten Chemie.

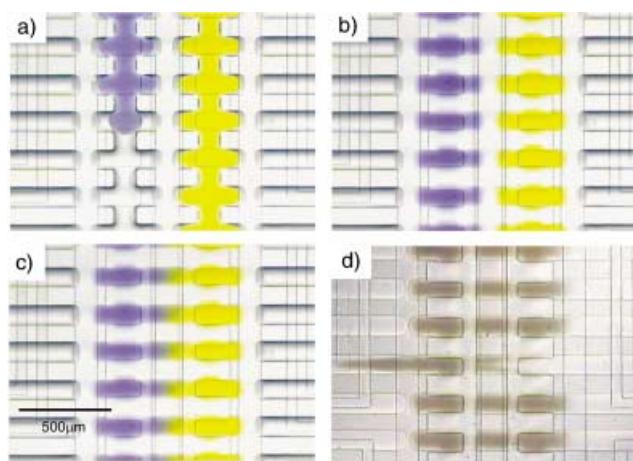


Abbildung 4. Komplexe Behandlung von Lösungen auf einem Mikrofluid-Chip durch Mikrofluid-Multiplexing.^[9] Hunderte von Proben können eingefüllt (a) und kompartimentiert werden (b), sich mischen und reagieren (c). Anschließend können individuelle Proben zur weiteren Analyse isoliert werden (d). Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [9].

- [1] G. H. Seong, R. M. Crooks, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13360–13361.
- [2] F. G. Bessoth, A. J. deMello, A. Manz, *Anal. Commun.* **1999**, *36*, 213–215.
- [3] J. M. Ottino, *The Kinematics of Mixing: Stretching, Chaos, and Transport*, Cambridge University Press, Cambridge, **1989**.
- [4] R. H. Liu, M. A. Stremler, K. V. Sharp, M. G. Olsen, J. G. Santiago, R. J. Adrian, H. Aref, D. J. Beebe, *J. Microelectromech. Syst.* **2000**, *9*, 190–197.
- [5] A. D. Stroock, S. K. W. Dertinger, A. Ajdari, I. Mezić, H. A. Stone, G. M. Whitesides, *Science* **2002**, *295*, 647–651.
- [6] H. Song, J. D. Tice, R. F. Ismagilov, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 792–796; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 768–772.
- [7] T. Richter, L. L. Shultz-Lockyear, R. D. Oleschuk, U. Bilitewski, D. J. Harrison, *Sens. Actuators B* **2002**, *81*, 369–376.
- [8] M. W. Losey, M. A. Schmidt, K. F. Jensen, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2001**, *40*, 2555–2562.
- [9] T. Thorsen, S. J. Maerkl, S. R. Quake, *Science* **2002**, *298*, 580–584.
- [10] M. A. Unger, H. P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, S. R. Quake, *Science* **2000**, *288*, 113–116.
- [11] C. L. Hansen, E. Skordalakes, J. M. Berger, S. R. Quake, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16531–16536.