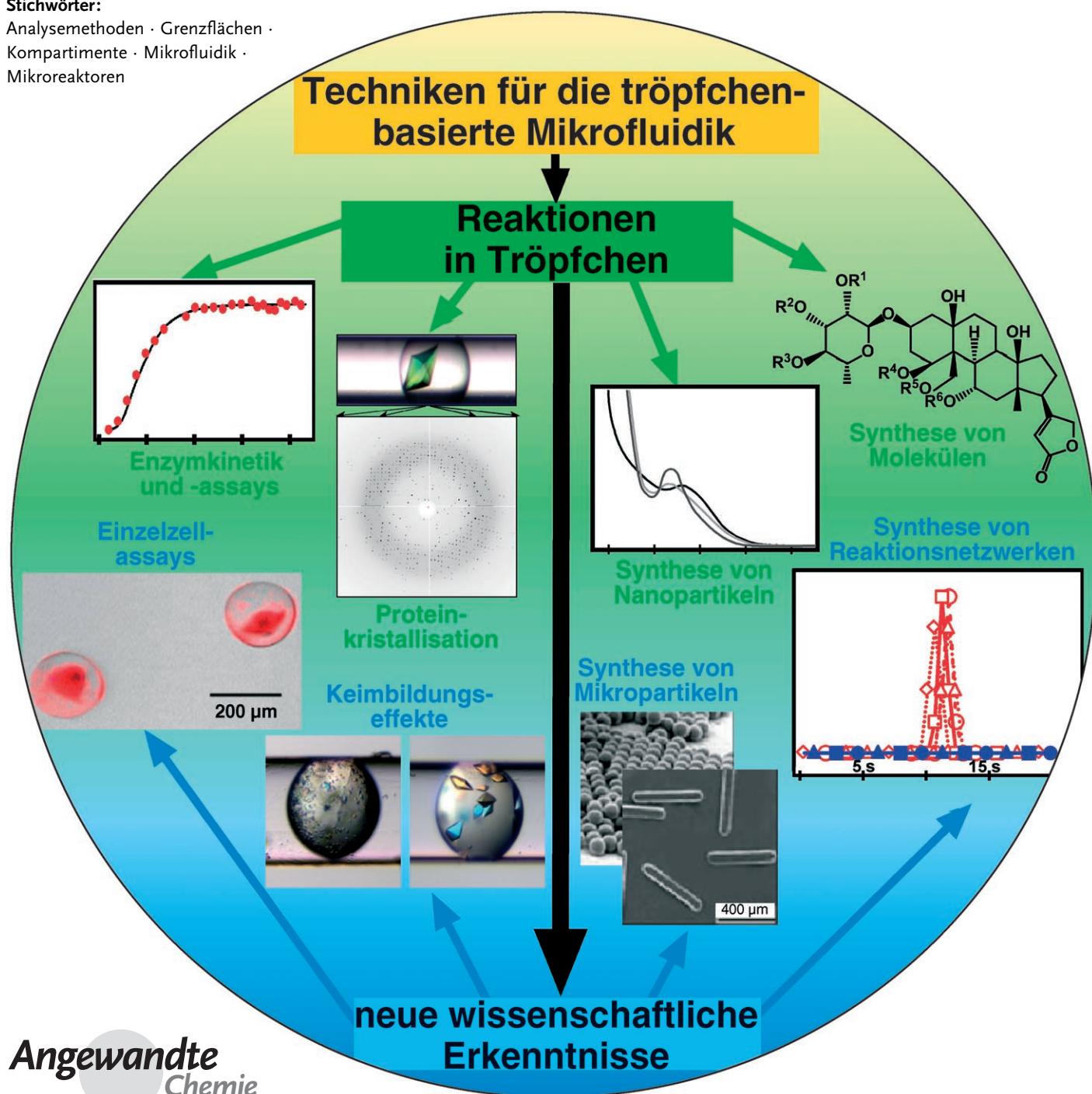


Reaktionen in Mikrofluidiktröpfchen

Helen Song, Delai L. Chen und Rustem F. Ismagilov*

Stichwörter:

Analysemethoden · Grenzflächen ·
Kompartimente · Mikrofluidik ·
Mikroreaktoren



Tröpfchenbasierte Mikrofluidiksysteme bieten in der Chemie und Biologie ausgezeichnete experimentelle Möglichkeiten für die Grundlagenforschung und angewandte Forschung. Sie ermöglichen die Miniaturisierung von Reaktionen, indem Reaktionsvolumina in femto- bis mikrolitergroßen Tröpfchen kompartimentiert werden. Die Kompartimentierung in Tröpfchen ermöglicht die schnelle Durchmischung der Reagentien, die zeitliche Steuerung der Reaktionen im Bereich von Millisekunden bis zu Monaten, die Steuerung von Grenzflächeneigenschaften und die Synthese und den Transport von festen Reagentien und Produkten. Mithilfe von tröpfchenbasierten Mikrofluidiksystemen können Anwendungen im Bereich des chemischen und biologischen Screenings, der Proteinkristallisation und der Enzymkinetik verbessert und beschleunigt werden. Darüber hinaus bietet die mögliche Steuerung von Tröpfchen in Mikrofluidikeinheiten Aussichten auf neue wissenschaftliche Methoden und Erkenntnisse.

1. Einleitung: Reaktionen in Tröpfchen

Mithilfe von Tröpfchen in Mikrofluidikkanälen als chemischen Mikroreaktoren können Reaktionen im Mikromausstab ausgeführt werden (Abbildung 1).^[1] Allgemeine Mikro-

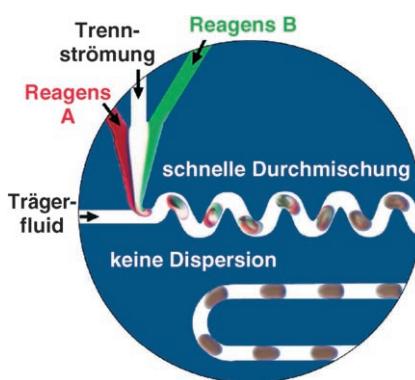


Abbildung 1. In Mikrofluidikkanälen erzeugte Tröpfchen können als Mikroreaktoren eingesetzt werden. Die Reaktionen können z. B. in wässrigen Tröpfchen ablaufen, die die Reagentien A und B und eine trennende Pufferlösung enthalten. Die Tröpfchen werden mit einer Schicht einer z. B. fluorierten Transportflüssigkeit umschlossen und durch die Mikrokanäle transportiert. Wiedergabe aus Lit. [1].

reaktoren^[2] und micellare Systeme^[3] waren bereits Gegenstand aktueller Aufsätze in der *Angewandten Chemie* und werden hier deshalb nicht behandelt. Wir beschreiben vornehmlich neue Techniken, die zur Ausführung chemischer Reaktionen in Tröpfchen entwickelt wurden, und gehen auf einige Prozesse ein, die mit diesen Techniken untersucht worden sind. Darüber hinaus diskutieren wir, wie die tröpfchenbasierte Mikrofluidik zu neuen wissenschaftlichen Methoden und Erkenntnissen führt.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung: Reaktionen in Tröpfchen	7495
2. Voraussetzungen für Reaktionen in Tröpfchen	7498
3. Anwendungen von Mikrofluidiktröpfchen	7504
4. Schlussfolgerungen und Ausblick	7512

1.1. Reaktionsführung im Hochdurchsatz

Viele Anwendungen z.B. in der Wirkstoffentwicklung, der Genexpressionsanalyse und in Hochdurchsatz-Assays erfordern eine parallele Reaktionsführung. Aus praktischen Gründen können solche Reaktionen nur im Mikromausstab ausgeführt werden, da die Reagentien teuer oder nur in geringen Mengen vorhanden sind. In anderen Fällen ist eine große Zahl von Reaktionen notwendig, um stochastische Prozesse wie die Keimbildung von Kristallen zu charakterisieren.

Die Mikrofluidik ermöglicht die Handhabung kleiner Flüssigkeitsvolumina und deren Verwendung als Mikroreaktoren.^[2,4,5] Zu den Vorteilen einer Miniaturisierung gehören der geringe Reagensverbrauch sowie die Möglichkeit, sehr viele Funktionseinheiten schnell anfertigen zu können. Zum Beispiel ist die weichlithographische Bearbeitung von Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) eine schnelle und billige Methode zur Herstellung^[6,7] und Modifizierung^[8–10] von Funktionseinheiten.

1.2. Parallele oder serielle Kompartimentierung mehrerer Reaktionen

Eine Reaktionsführung im Hochdurchsatz verlangt, dass jede Reaktionsbedingung individuell adressierbar oder indiziert sein muss. Die Reaktionen können indiziert werden, indem jede Reaktionsbedingung entweder parallel oder se-

[*] H. Song, D. L. Chen, Prof. Dr. R. F. Ismagilov
Department of Chemistry and Institute for Biophysical Dynamics
The University of Chicago
5735 South Ellis Avenue, Chicago, IL 60637 (USA)
Fax: (+1) 773-702-0805
E-Mail: r-ismagilov@uchicago.edu
Homepage: <http://ismagilovlab.uchicago.edu/>

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Videos zur Tröpfchenbildung und Durchmischung in Mikrofluidikkanälen sowie zur Durchmischung von Knetmasse durch chaotische Advektion) sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

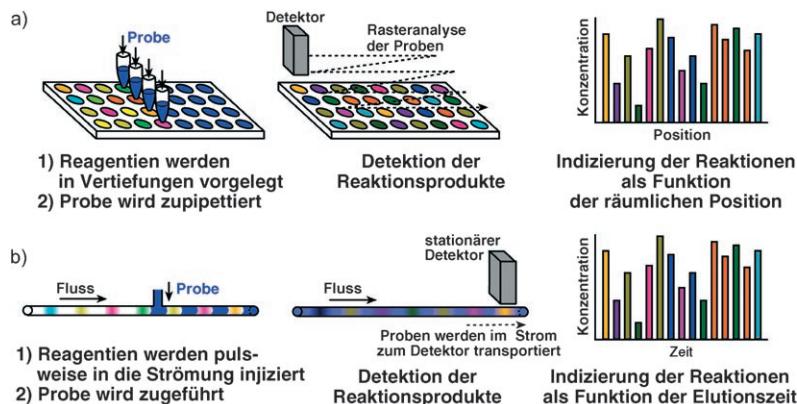


Abbildung 2. Vergleich zwischen parallel und seriell kompartimentierten Reaktionen.
a) Paralleler Reaktionsverlauf mithilfe von Mikrotiterplatten: Die Reagenzien werden in den Mikrovertiefungen vorgelegt, und die Probe wird mit einem Mehrfachpipettierer zugegeben. Die einzelnen Reaktionsprodukte werden nacheinander bestimmt, und jede Reaktion wird als Funktion der räumlichen Position der Mikrovertiefung indiziert. b) Serieller Reaktionsverlauf mithilfe einer Strömung: Die Reagenzien werden pulsweise vorgelegt und sind durch eine Pufferlösung voneinander getrennt. Die Strömung transportiert die Pulse durch die Reaktionskapillare, und die Probe wird zugesetzt. Die Reaktionsprodukte werden mit einem stationären Detektor bestimmt, an dem die Pulse durch die Strömung vorbeitransportiert werden. Die Reaktionen werden als Funktion der Elutionszeit indiziert.

riell kompartimentiert wird (Abbildung 2).^[11] Zur parallelen Kompartimentierung der Reaktionsbedingungen werden Mikrotiterplatten eingesetzt (Abbildung 2a), und das Resultat einer Reaktion wird als Funktion der räumlichen Position der Mikrovertiefung indiziert.^[12–14] Bei der Fließinjektionsanalyse können Reaktionsbedingungen seriell kompartimentiert werden (Abbildung 2b), wobei das Resultat einer Reaktion in diesem Fall als Funktion der Elutionszeit indiziert wird. In der kombinatorischen Chemie dienen auch Molekülmarker,^[15] markierte Kugelchen^[16,17] und codierte Partikel^[18,19] zur Indizierung.

1.3. Steuerung der Kompartimentierung

Bei einer parallelen Reaktionsführung ist es erforderlich, die Handhabung der Flüssigkeiten und die Verdampfung in den Kompartimenten zu kontrollieren. Eine Möglichkeit bieten PDMS-Funktionseinheiten mit integrierten Kammern und Ventilen, die eine Reaktionsführung im Multiplexverfahren zulassen.^[20–23] Dieses Verfahren wurde zur Protein-

kristallisation,^[24–26] chemostatischen Bakterienkultur^[27] und Synthese isotopenmarkierter Sonden^[22] eingesetzt. Die Ventile, die zur Steuerung der Flüssigkeiten verwendet werden, werden durch ein Multischichtverfahren hergestellt. Ein Problem besteht darin, dass PDMS für Dämpfe organischer und wässriger Lösungen durchlässig ist, sodass es zu Verdampfungsverlusten kommen kann. Allerdings konnte diese Durchlässigkeit auch für einige Anwendungen gezielt genutzt werden,^[28] z.B. zum Befüllen von Sackgassenkanälen.^[25]

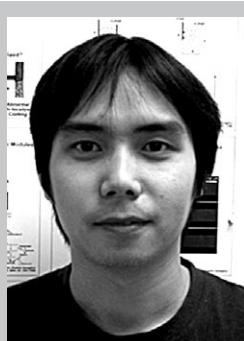
Bei der seriellen Reaktionsführung in einphasiger Strömung kann es durch Dispersion zur Querkontamination zwischen den Reaktionsbedingungen und somit zu Probendilution kommen. Die druckgetriebene Strömung einer einphasigen Lösung durch einen Mikrokanal ist laminar und weist ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil auf.^[29,30] Wegen dieses parabolischen Strömungsprofils werden die Reagenzien in Mikrokanälen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten transportiert. Die Taylor-Dispersion beschreibt den Transport und die Verbreiterung eines Konzentrationspulses eines gelösten Stoffes in einer durch ein Strömungsrohr fließenden Lösung.^[29,30] Die Lokalisierung der Reaktion und die genaue Steuerung der Reaktionszeit sind wegen der Dispersion schwierig. Zwischen Pulsen unterschiedlicher Reagenzien, die sich durch dasselbe Strömungsrohr bewegen, kann Querkontamination auftreten. Außerdem sind die Reagenzien in direktem Kontakt mit der festen Wand des Mikrokanals, weshalb auch die chemischen Oberflächeneigenschaften der Wand kontrolliert werden müssen. Besonders bei Funktionseinheiten, die das Problem der Taylor-Dispersion durch die Anwendung einer elektroosmotischen Strömung lösen, ist die Kontrolle der Oberflächeneigenschaften wichtig.^[31,32] Ferner kann durch Diffusion in der einphasigen Strömung eine Verdünnung der Probenlösung auftreten, besonders bei längeren Inkubationszeiten. Eine solche Verbreiterung der Konzentrationspulse tritt sowohl bei druckgetriebenen als auch bei elektroosmotisch gelenkten Flüssen auf.

1.4. Kompartimentierung in nanolitergroßen Tröpfchen

Nanolitergroße Tröpfchen lassen sich in großer Zahl als Kompartimente nutzen, wobei jedes Tröpfchen eine Reakti-



Helen Song studierte Chemie an der Universität Chicago (M.Sc. 2002). Im Rahmen ihrer Promotion, die sie unter der Leitung von Prof. Rustem Ismagilov anfertigte und 2005 abschloss, beschäftigte sie sich mit der Entwicklung von Techniken für die tropfenbasierte Mikrofluidik und deren Anwendung in der Enzymkinetik.



Delai Chen studierte Chemie an der Universität Peking (B.Sc.) und an der Universität Chicago (M.Sc.). Unter der Anleitung von Prof. Rustem Ismagilov forscht er seit 2004 über die Anwendung der tropfenbasierten Mikrofluidik zur Untersuchung stochastischer Prozesse bei der Proteinkristallisation und zur Optimierung der Reaktionsbedingungen organischer Reaktionen.

onsbedingung trägt. Wenn mehrphasige Systeme aus nichtmischbaren Flüssigkeiten eingesetzt werden, um die Tröpfchen in den Mikrofluidikanälen zu erzeugen, lassen sich Probleme wie Verdampfung, komplizierte Fluid-Handhabung, Dispersion und Diffusion vermeiden (Abbildung 1).^[1] Die Verdampfung bei Experimenten mit langer Inkubationszeit lässt sich kontrollieren, indem die Tröpfchen in Glaskapillaren transportiert werden.^[33,34] Eine komplizierte Handhabung der Flüssigkeiten entfällt, da sich gleichmäßig große Tröpfchen spontan bilden, wenn die Strömungen zweier nichtmischbarer Flüssigkeiten in einer geeigneten Kreuzung zusammengeführt werden.^[1,35–39] Mithilfe der Strömung der Flüssigkeiten in den Mikrokanälen lassen sich die Tröpfchen und die Tröpfchenarrays gezielt manipulieren.^[1,37,38,40–42] Da die Reagentien in den Tröpfchen eingeschlossen sind, tritt keine Dispersion durch Konvektion oder Diffusion auf. Darüber hinaus kann die Flüssig-flüssig-Grenzfläche zwischen den nichtmischbaren Phasen der Reagens- und der Transportflüssigkeit leicht kontrolliert werden.^[43] Eine Durchmischung innerhalb der Tröpfchen lässt sich mit chaotischer Advektion erreichen.^[1,37,40,44,45]

Um stationäre Kompartimente zu erhalten (analog zu Mikrotiterplatten), können die Tröpfchen in Kapillaren transportiert und bis zu einem Jahr lang inkubiert werden. Bewegliche Kompartimente (analog zur Fließinjektionsanalyse) lassen sich mit Tröpfchen realisieren, die durch Strömung kontinuierlich durch die Mikrokanäle in der Funktionseinheit transportiert werden. Der Einsatz von Mikrofluidiktröpfchen ermöglicht sowohl die Kompartimentierung von Reaktionen als auch die genaue Steuerung der Reaktionszeit.

1.5. Thema des Aufsatzes

Wir diskutieren in diesem Aufsatz Reaktionen, die in segmentierten Strömungen in Mikrofluidiksystemen ablaufen. Eine segmentierte Strömung besteht aus mindestens zwei nichtmischbaren Phasen, einer dispersen und einer kontinuierlichen Phase. Die Tröpfchen bestehen aus der dispersen Phase, während die kontinuierliche Phase vorzugsweise die Oberfläche des Mikrokanals benetzt oder beschichtet und die Tröpfchen umschließt.

Wir betrachten zwei Arten segmentierter Strömungen, die sich durch die Phase unterscheiden, in der die Reaktion stattfindet. Bei der ersten Art sind die einzelnen Flüssigkeitströpfchen von einer Transportflüssigkeit umschlossen,

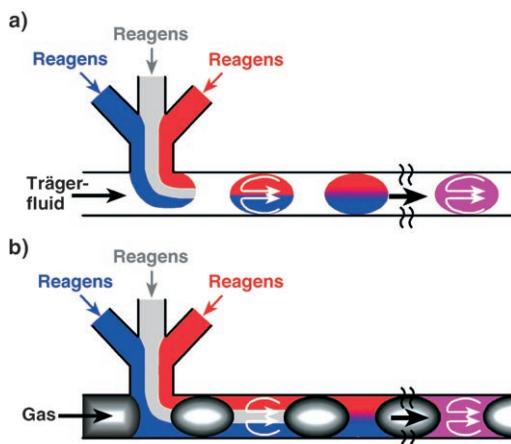


Abbildung 3. Bei Reaktionen in Mikrofluidikanälen werden zwei Arten segmentierter Strömungen unterschieden. a) Einzelne ovale Flüssigkeitspropfen werden durch eine nichtmischbare kontinuierliche Phase (z. B. einen Fluorkohlenwasserstoff) kompartimentiert. Die Reaktionen laufen in der dispersen Phase, d. h. den ovalen Propfen ab. Aufgrund der oberflächenchemischen Eigenschaften der Mikrokanalwände werden die Wände bevorzugt von der kontinuierlichen Phase benetzt. b) Im zweiten Fall werden zylindrische Propfen erzeugt, indem die kontinuierliche Phase durch eine zweite nichtmischbare Phase (z. B. einzelne Gasblasen) kompartimentiert wird. Die Reaktionen laufen in der kontinuierlichen Phase, d. h. den zylindrischen Propfen ab.

die den Mikrokanal benetzt (Abbildung 3a).^[1] Diese ovalen Propfen („plugs“) bilden die disperse Phase, in der die Reaktionen ablaufen. Von den segmentierten Fließinjektionssystemen unterscheiden sich die Propfekompartimentsysteme dahingehend, dass die Reagentien nicht mit der Mikrokanalwand in Kontakt kommen und dispersionsfrei transportiert werden. Bei der zweiten Art segmentierter Strömung werden zylindrische Propfen („slugs“) erzeugt, die durch einzelne Gasblasen voneinander getrennt sind (Abbildung 3b).^[46–51] In diesem Fall finden die Reaktionen in der kontinuierlichen Phase statt. Die Reagentien kommen mit den Kanalwänden in Kontakt, und es tritt eine charakteristische Dispersion auf. Dieses zweite System ähnelt den segmentierten Fließinjektionssystemen.^[52–56] Im Folgenden werden wir die Bezeichnungen Oval- und Zylinderkompartimente („plugs and slugs“) zur Unterscheidung dieser beiden Arten segmentierter Strömung verwenden.

Nicht Gegenstand dieses Aufsatzes sind Reaktionen in makroskopischen Flüssigkeitssystemen aus nichtmischbaren Phasen, z. B. micellaren Systemen und Emulsionen. Emulsionen bieten sehr viel geringere Möglichkeiten zur räumlichen Steuerung als Kompartimentsysteme. Reaktionen in micellaren^[3] und kolloidalen Systemen,^[57,58] in Miniemulsionen^[59] und in Multischichtmikrokapseln^[60] wurden bereits in ausführlichen Übersichtsartikeln behandelt. Emulsionen und Vesikel wurden zur In-vitro-Kompartimentierung eingesetzt,^[61,62] wobei Vesikelreaktoren auch als synthetische Zellen verwendet wurden.^[63–65] Durch Mikrofluidik hergestellte Emulsionen^[66–68] wurden zur Synthese von permeablen Kolloiden^[69] und von monodispersen Kapseln mithilfe konstanter koaxialer Flüssigkeitsstrahlen eingesetzt.^[70]

Ebenfalls nicht behandelt wird der Bereich der digitalen Mikrofluidik, bei der die Tröpfchen nicht durch eine konti-



Rustum Ismagilov promovierte 1998 an der Universität Wisconsin in Madison bei Prof. Stephen F. Nelsen. Nach einem Postdoc-Aufenthalt an der Harvard University bei Prof. George M. Whitesides begann er im Jahr 2001 mit eigenen Forschungen an der Universität Chicago, wo er 2005 zum Associate Professor ernannt wurde. Seine gegenwärtigen Forschungen gelten der Anwendung der Mikrofluidik zur räumlichen und zeitlichen Steuerung komplexer chemischer und biologischer Systeme.

nuierliche Strömung („passive Steuerung“), sondern durch eine Anordnung von Elektroden („aktive Steuerung“) gelenkt werden.^[71–75] Die auf der Elektrobenetzung beruhenden Methoden zur Steuerung der Tröpfchen und die Automatisierung dieser Techniken wurden bereits in Übersichtsartikeln beschrieben.^[76–78] Digitale Mikrofluidik wurde für eine Reihe von Aufgaben eingesetzt: zur Analyse von Proteinen und Peptiden durch matrixunterstützte Laser-Desorptionsionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS),^[79,80] zur Ausführung von Polymerasekettenreaktionen mit optischer Detektion,^[81] zur Messung der Glucosekonzentration in Tröpfchen durch optische Detektion^[82] sowie in Luciferase-Assays^[83] und zur Synthese anisotroper Partikel.^[84]

Mikrofluidiksysteme, die zwar mit mehrphasigen Strömungen arbeiten, in denen aber keine Reaktionen ablaufen, werden wir ebenfalls nicht im Detail diskutieren. Wir definieren „Reaktion“ in einem umfassenden Sinne, der auch die gegenseitige Umwandlung chemischer Spezies^[85] und Phasenübergänge wie Kristallisation oder die Bildung von festen Teilchen einschließt. Es werden fortlaufend Methoden zur Herstellung und Manipulation von Tröpfchen entwickelt, die auf neuartigen physikalischen Konzepten beruhen: Elektrobenetzung,^[86–88] magnetische Felder,^[89,90] optisch induzierte Marangoni-Effekte,^[91,92] akustische Wellen^[93] und Oberflächenchemie.^[94,95] Zu den aktuellen Neuerungen bei der Erzeugung von Gasbläschen in Mikrofluidiksystemen gehören die Anwendung segmentierter Strömungen in Mikrokanälen als mehrphasige Monolithreaktoren,^[96] die Herstellung monodisperser Gasbläschen durch Strömungsfokussierung,^[97,98] die Untersuchung der nichtlinearen Dynamik eines strömungsfokussierenden Bläschengenerators^[99] und die Charakterisierung des Transports von Bläschen in Kanälen mit quadratischem Querschnitt.^[100]

Eine Strömung nichtmischbarer Flüssigkeiten kann in Mikrokanälen anstelle der Bildung von Tröpfchen auch zu einer kontinuierlichen laminaren Strömung der Flüssigkeiten führen.^[101] Derartige Systeme, die für Bioassays^[102–104] sowie zur Strukturierung und Mikrofabrikation in Mikrokanälen^[105,106] genutzt wurden, sind ebenfalls nicht Gegenstand dieses Aufsatzes.

Wir konzentrieren uns auf aktuelle Entwicklungen bei der Verwendung von Tröpfchen in der Mikrofluidik als chemische Reaktoren. Wir stellen die Methoden zur Steuerung von Reaktionen vor und diskutieren Beispiele von Reaktionen in tröpfchenbasierten Mikrofluidiksystemen. Ferner zeigen wir auf, wie die Mikrofluidik zur Erschließung neuer Forschungsbereiche führen kann.

2. Voraussetzungen für Reaktionen in Tröpfchen

Um Reaktionen in Mikrofluidikeinheiten ausführen zu können, sollten zumindest zwei Voraussetzungen erfüllt sein: Erstens sollte die Mikrofluidikeinheit die typischen Arbeitsabläufe ermöglichen, die auch bei Reaktionen im Makromausstab anfallen. Hierzu gehören die kontrollierte Zugabe der Reagentien zur Reaktionsmischung, die gründliche Mischung der Reagentien, die Kontrolle der Reaktionszeit, die Vereinigung und Trennung von Reaktionsgemischen bei

mehrstufigen Reaktionen und die Überwachung des Reaktionsverlaufs. Zweitens sollte der Einsatz der Mikrofluidik irgendeinen charakteristischen Vorteil mit sich bringen, z.B. die Möglichkeit, mehr Reaktionen bei einer größeren Zahl von Reaktionsbedingungen zu testen. Wie bei jedem Hochdurchsatz-Screening muss eine Methode zur Organisation und Indizierung der Reaktionsbedingungen vorhanden sein. Ebenso muss es eine wirksame Methode zur Prüfung von Reaktionsbedingungen und zur Optimierung einer bestimmten Bedingung geben. Diese Methoden sollten skalierbar, direkt und einfach sein. In diesem Abschnitt werden wir Techniken diskutieren, die für die tröpfchenbasierte Mikrofluidik entwickelt wurden, um die oben genannten Kriterien zu erfüllen.

2.1. Erzeugung von Tröpfchen in Mikrofluidikkanälen

Die Tröpfchenerzeugung in zweiphasigen Systemen wurde sowohl für Flüssig-flüssig-^[107–109] als auch für Gas-flüssig-Strömungen^[110] ausführlich untersucht. Während zur Herstellung makroskopischer Emulsionen sehr viele Methoden zur Verfügung stehen, kommen zur Erzeugung von Tröpfchen in Mikrofluidikkanälen im Wesentlichen nur zwei Techniken zum Einsatz: T-Kreuzungen^[1,35–39] und Strömungsfokussierung.^[36,97,98,111–115] Beim Einsatz von T-Kreuzungen werden die disperse Phase und die kontinuierliche Phase in die beiden Einlässe eines T-Stücks geleitet. Die Tröpfchen der dispersen Phase bilden sich aufgrund der Scherkraft und der Grenzflächenspannung an der Flüssig-flüssig-Grenzfläche (Abbildung 4; siehe auch Abbildung 1).

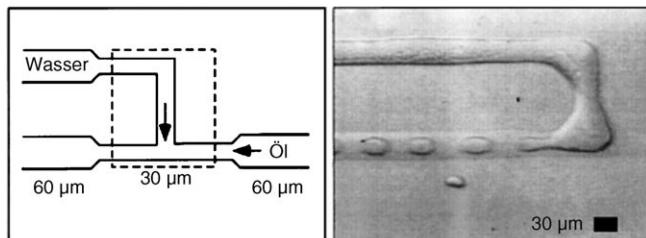


Abbildung 4. Erzeugung von Tröpfchen in der T-Kreuzung einer Mikrofluidikeinheit.^[35] Als Ölphase kann z. B. eine Mischung von Kohlenwasserstoffen und dem Tensid Span80 verwendet werden. Die Kanäle bestehen in diesem Fall aus acryliertem Polyurethan. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [35]. Copyright 2001 American Physical Society.

Die Phase mit der geringeren Grenzflächenspannung zur Kanalwand bildet die kontinuierliche Phase.^[37] Bei der Strömungsfokussierung werden die Tröpfchen erzeugt, indem die kontinuierliche Phase durch zwei äußere Kanäle und die disperse Phase durch einen zentralen Kanal in eine enge Öffnung geleitet werden (Abbildung 5).^[111] Dieser Aufbau ist geringfügig schwieriger zu realisieren als die T-Kreuzung und hat sich besonders bei der Herstellung sehr kleiner oder viskoser Tröpfchen bewährt.^[45,97,111,115–117] Bei beiden Methoden werden der kontinuierlichen Phase häufig Tensidverbindungen zugesetzt, um die Flüssig-flüssig-Grenzflächen der Tröpfchen zu stabilisieren.^[1,35,111] Die Bedingungen, unter

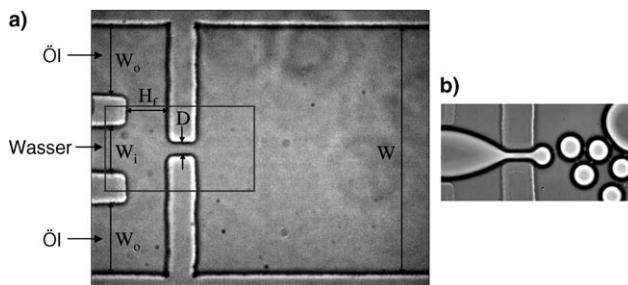


Abbildung 5. Erzeugung von Tröpfchen durch Strömungsfokussierung.^[11] a) Aufbau der Funktionseinheit; b) Ausschnitt mit dem in (a) eingezeichneten Rechteck. Wiedergabe in veränderter Form aus Lit. [11]. Copyright 2003 American Institute of Physics.

denen sich monodisperse Tröpfchen bilden, sind ausführlich beschrieben worden.^[96,118–123] Vor dem allgemeinen Einsatz von Tröpfchen als Mikroreaktoren muss aber ein Weg gefunden werden, wie die Reagentien in Tröpfchen eingebracht werden können.

2.2. Zuführung der Reagentien in die Tröpfchen

Zur Zuführung der Reagentien stehen mehrere Methoden zur Verfügung, die an spezielle Anforderungen tröpfchenbasierter Mikrofluidiksysteme angepasst sind. Beim Hochdurchsatz-Screening wird die Zielprobe unter einer Vielzahl von Reaktionsbedingungen getestet, wobei jede Reaktionsbedingung durch unterschiedliche Reagentien oder unterschiedliche Reagenskombinationen definiert sein kann. Bei kinetischen Messungen oder zur Optimierung von Reaktionsbedingungen werden den Tröpfchen dann nur wenige Reagentien zugesetzt, deren Konzentration aber variiert werden muss. Bei mehrstufigen Reaktionen muss ein Reagens zu einer genau festgelegten Zeit während des Reaktionsverlaufs zugesetzt werden. Jede dieser Anwendungen erfordert eine andere Methode der Reagenszuführung.

2.2.1. Kartuschentechnik

Zum Screening einer Zielprobe gegen eine Vielzahl von Reaktionsbedingungen lassen sich Kartuschenmodule vorbereiten, in denen ein Array von Ovalkompartimenten gespeichert ist (Abbildung 6a,b).^[42] Jedes Kompartiment definiert eine andere Reaktionsbedingung aus unterschiedlichen Reagentien. Zum Beispiel wurde ein Array von 48 Ovalkompartimenten von jeweils 15 nL Volumen hergestellt, von denen jedes ein anderes Reagens enthielt.^[42] Die Zielprobe kann an einer T-Kreuzung der Mikrokanäle in die vorbereiteten Kompartimente injiziert werden (Abbildung 6c). Reagenskartuschen können in versiegelten Kapillaren mehrere Monate ohne Verdampfung und Kontakt mit der Umgebung aufbewahrt werden.^[42]

Reagenskartuschen werden zum parallelen Screening einer Zielprobe gegen eine große Zahl von Reagentien oder Reaktionsbedingungen eingesetzt. Mithilfe einer Funktioneinheit zur Tröpfchenaufspaltung wurden z.B. 16 Reagens-

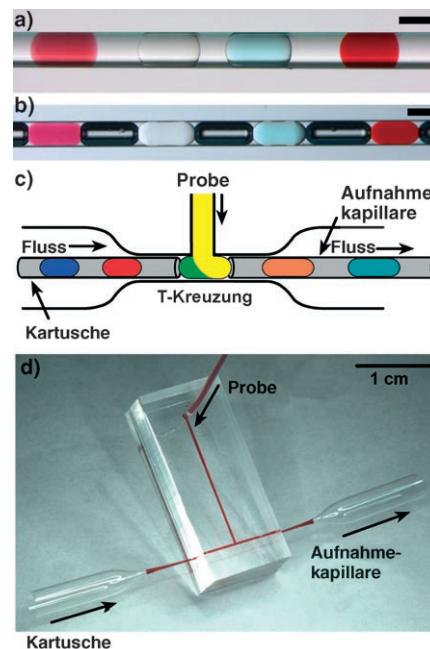


Abbildung 6. Kartuschenmodule mit Ovalkompartimenten ermöglichen das Screening einer Probe gegen vielzählige Reagentien im Submikrolitermaßstab.^[42,124] a, b) Vier unterschiedliche Reagentien sind in einem Array von Ovalkompartimenten in einer Kapillare gespeichert. Die Kompartimente sind von einem Fluorkohlenwasserstoff als Transportflüssigkeit umgeben sowie (unter b) zusätzlich durch Luftbläschen getrennt, um einen Substanzaustausch zwischen den Kompartimenten zu verhindern. Skalierung: 200 µm. c) Probenzuführung zu den Ovalkompartimenten aus einer Kartusche mithilfe einer T-Kreuzung. Die resultierenden Ovalkompartimente werden in eine Aufnahmekapillare transportiert und gesammelt. d) Photographie der T-Kreuzungseinheit. Wiedergabe aus Lit. [42] (a,b) und mit Genehmigung von Elsevier aus Lit. [124].

kartuschen mit Ovalkompartimenten von 20 nL aus einem Array von größeren Tröpfchen (ca. 320 nL) parallel hergestellt.^[125] Eine solche parallele Vorbereitung von Reagenskartuschen ermöglicht ein beschleunigtes Hochdurchsatz-Screening. Reagenskartuschen wurden bereits in einer Reihe von Fällen angewendet: zum Screening von Proteinkristallisationsbedingungen und in Enzymassays,^[42] zum Screening der Reaktionsbedingungen einer organischen Reaktion^[126] und für Immunassays (wobei eine Kartusche mit einem Flüssig-Luft-Zweiphasensystem eingesetzt wurde).^[127]

2.2.2. Variieren der Reagenskonzentration

Für einige Reaktionen wurden Geschwindigkeitskonstanten und optimale Reaktionsbedingungen ermittelt, indem die Reagenskonzentrationen variiert wurden. In einem Fall konnten in einer laminaren Strömung zwei Reagentien in Ovalkompartimenten auf einem Chip verdünnt werden.^[44] Die Kompartimente wurden aus zwei Reagensströmen und einem mittigen Pufferstrom erzeugt, der ein vorzeitiges Mischen der beiden Reagentien verhindert (Abbildung 7). Die Reagenskonzentrationen in den Kompartimenten wurden über die relativen Strömungsgeschwindigkeiten der drei

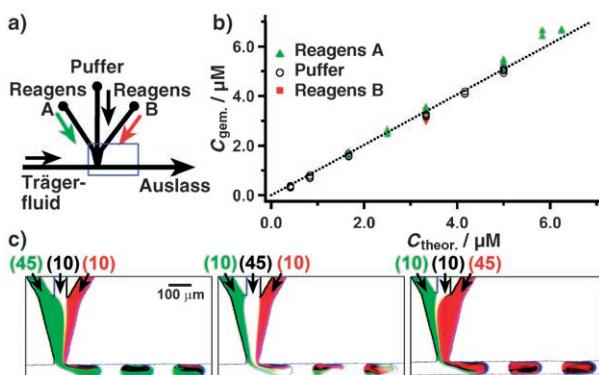


Abbildung 7. Die Reagenskonzentrationen in Ovalkompartimenten können durch On-Chip-Verdünnung eingestellt werden.^[44] a) Experimenteller Aufbau; das blaue Rechteck markiert den Bereich der in (c) gezeigten Mikrophotographien. b) Diagramm zur Quantifizierung der On-Chip-Verdünnung; dargestellt sind die gemessenen Konzentrationen, die sich aus der Fluoreszenzintensität der durch den Mikrokanal transportierten Ovalkompartimente ergeben, als Funktion der theoretischen Konzentrationen, die sich aus den Strömungsgeschwindigkeiten von Reagens A, Reagens B und dem Verdünnungspuffer ergeben. c) Die Konzentrationen der Reagentien werden durch die relativen Geschwindigkeiten der Reagensströme (Werte in Klammern, in nL s^{-1}) eingestellt. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [44]. Copyright 2003 American Chemical Society.

wässrigen Lösungen eingestellt (Abbildung 7c). Beispielsweise führte eine höhere Geschwindigkeit der das Reagens A enthaltenden Strömung (grün; 45 nL s^{-1}) zu einem größeren Anteil dieses Reagens im Ovalkompartiment (Abbildung 7c, links).

Mit dieser Technik wurde auch ein Array von Ovalkompartimenten hergestellt, bei dem jedes Kompartiment vier Reagentien in einem anderen Mischungsverhältnis enthielt.^[128] Das Mischungsverhältnis wurde computergesteuert über die relativen Geschwindigkeiten der Reagensströme eingestellt. Dadurch lassen sich die Reaktionsbedingungen schnell ändern, ohne das Experiment zu stoppen oder Reagentien zu vergeuden. Die Methode ist nicht auf den in Abbildung 7 gezeigten Versuchsaufbau beschränkt, sondern auch mit der Strömungsfokussierungstechnik kompatibel (Abbildung 5).

2.2.3. Direkte Injektion von Reagentien in Tröpfchen

Bei mehrstufigen Reaktionen lässt man die Reaktionsmischung eine bestimmte Zeitdauer reagieren und setzt dann ein weiteres Reagens zu. In der tröpfchenbasierten Mikrofluidik kann die erste Stufe der Reaktion in einem Ovalkompartiment enthalten sein, das durch den Mikrokanal transportiert wird. Auf dem weiteren Weg durch das Mikrokanalnetzwerk kann dann über einen Seitenkanal ein Reagens für die zweite Reaktionsstufe in das Kompartiment injiziert werden.

Mithilfe einer T-Kreuzung kann ein Reagens, das durch einen Seitenkanal transportiert wird, direkt in die Tröpfchen injiziert werden, wie es in Abbildung 6 am Beispiel der Injektion einer Zielprobe in ein Array von Ovalkompartimen-

ten gezeigt ist. Wenn allerdings die T-Kreuzung bevorzugt durch die Transportflüssigkeit benetzt wird (z.B. bei einer hydrophoben Kreuzung und wässrigen Reagentien), ist die Injektion des Reagens in ein Kompartiment nur bei kleinen Werten der Kapillarzahl ($Ca \approx 0.01$) möglich.^[129,130] Bei höheren Ca -Werten (beispielsweise bei höheren Strömungsgeschwindigkeiten) kann die Injektion durch mechanische Bewegung des PDMS-Kanals unterstützt werden.^[129]

Für den Fall, dass der Seitenkanal bevorzugt durch die Reagensflüssigkeit benetzt wird (z.B. bei einem hydrophilen Kanal und wässrigen Reagentien), wurde eine andere Injektionsmethode entwickelt (Abbildung 8a).^[131,132] Wenn die

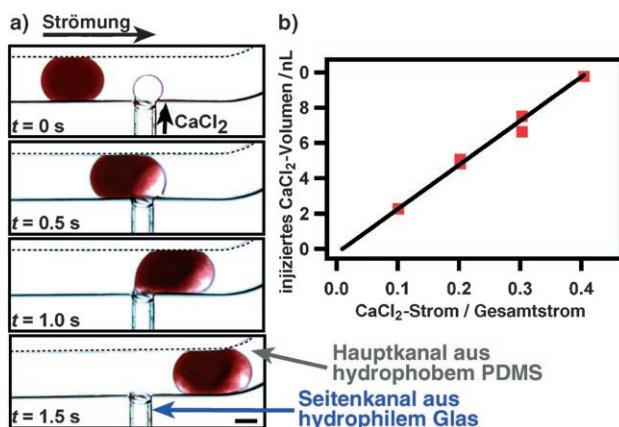


Abbildung 8. Injektion einer CaCl_2 -Lösung in ein Ovalkompartiment (Blut) über einen hydrophilen Seitenkanal.^[132] a) Mikrophotographien, die die zeitliche Abfolge der Injektion zeigen. b) Das injizierte Volumen wird durch die Geschwindigkeit der CaCl_2 -Strömung [$\mu\text{L min}^{-1}$] eingestellt. Jeder Datenpunkt im Diagramm resultiert aus Messungen an zehn Kompartimenten ($y = 24.947x - 0.2312$, $R^2 = 0.9849$). Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [132]. Copyright 2006 American Chemical Society.

Reagensflüssigkeit aus dem Seiten- in den Hauptkanal eintritt, bildet sich ein Tröpfchen, das sich wegen der Benetzung des Seitenkanals erst dann löst, wenn ein Ovalkompartiment die Kreuzung passiert; dabei wird das Tröpfchen in das Kompartiment aufgenommen.^[131] Bei dieser Injektionsmethode nimmt das Volumen des in das Kompartiment injizierten Reagens linear mit der Geschwindigkeit der Reagensströmung im Seitenkanal zu (Abbildung 8b).^[132] Mithilfe von Fluoreszenzmessungen wurde gezeigt, dass die Querkontamination zwischen den Ovalkompartimenten an der T-Kreuzung minimal war.^[131]

Bei Gas-flüssig-Systemen mit Zylinderkompartimenten müssen die Reagentien der kontinuierlichen Phase zugeführt werden, da dort die Reaktion stattfindet. Eine solche Injektion ist recht einfach, da die kontinuierliche Phase immer mit der Mikrokanalwand in Kontakt ist. Allerdings kann, besonders bei rechteckigen Mikrokanälen, eine Kontaminierung zwischen den Kompartimenten auftreten. Für Zylinderkompartimente wurde gezeigt, dass die kontinuierliche Phase in Mikrokanälen mit Tracer-Farbstoffen versetzt werden kann.^[48]

2.3. Steuerung der Durchmischung durch chaotische Advektion

Bei chemischen Reaktionen und autokatalytischen Prozessen in Mikrokanälen ist es wichtig, die Durchmischung zu steuern.^[133,134] Eine schnelle Durchmischung der Reagentien ist notwendig, um die Startzeit einer Reaktion genau festlegen zu können. Die Tröpfchenbasierte Mikrofluidik ermöglicht eine schnelle Durchmischung, und der Mischungsgrad kann quantitativ erfasst werden.^[1,40,135] Für eine einphasige mikrofluidische Strömung wurde aufgezeigt, dass ein Reagens durch hydrodynamische Fokussierung mit einem großen Überschuss eines zweiten Reagens bei Mischzeiten von nur 10 µs gemischt werden kann.^[136] Der Mischvorgang lief so schnell ab, dass die Zeitauflösung kinetischer Messungen durch die Dispersion und nicht durch die Durchmischung begrenzt war. Durch chaotische Advektion mithilfe von gestaffelten Mischungseinheiten, deren Kanalwände mit Zickzackstrukturen versehen waren, gelang eine vollständige Durchmischung von zwei Reagentien im Millisekundenbereich bei verringriger Dispersion.^[137] Die Technik der chaotischen Advektion (siehe Abbildung 9 sowie ein Video in den

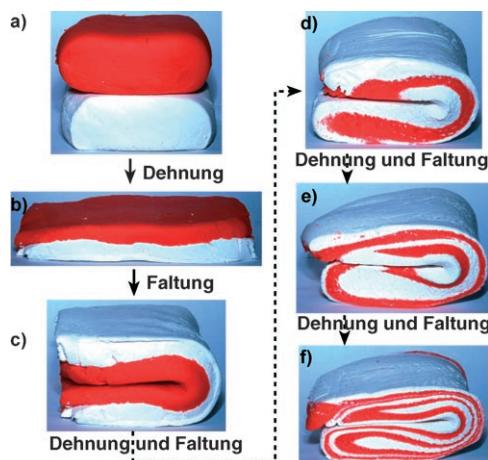


Abbildung 9. Modell für die Durchmischung zweier Reagentien durch chaotische Advektion bei kleinen Reynolds-Zahlen; Photographien von zwei Schichten Knetmasse, die abwechselnd gedehnt und gefaltet werden. Die Bilder wurden freundlicherweise von Joshua D. Tice zur Verfügung gestellt.

Hintergrundinformationen) wurde auch auf Tröpfchen angewendet.^[1,40,46] Das Prinzip der chaotischen Advektion^[137–139] besteht in der wiederholten Faltung und Dehnung der beiden Flüssigkeitsphasen, wobei eine alternierende Schichtung erhalten wird. Die Dicke der einzelnen Schichten nimmt exponentiell ab (Abbildung 9), sodass schließlich eine schnelle Vermischung durch Diffusion eintritt. In Tröpfchen kann durch chaotische Advektion eine schnelle Vermischung im Submillisekundenbereich^[40] erzielt werden, ohne dass Dispersion auftritt; dies ist besonders nützlich, wenn einerseits eine schnelle Durchmischung erforderlich ist und andererseits die Dispersion über einen längeren Zeitraum kontrolliert werden muss.

In Tröpfchen, die durch Mikrokanäle transportiert werden, existiert eine interne Zirkulation, die zur Verbesserung

der Durchmischung in Oval-^[37,140–143] und Zylinderkompartimenten^[46,50,144–146] genutzt wurde. In geraden Kanälen treten in der linken und rechten Hälfte eines Ovalkompartiments zwei symmetrische Wirbel auf (in der Bewegungsrichtung des Kompartiments, Abbildung 3). Die Durchmischung erfolgt durch Konvektion in jeder Hälfte des Kompartiments und hauptsächlich durch Diffusion zwischen den beiden Hälften. In gewundene Kanälen kommt es bei jeder Richtungsänderung zu einer Umorientierung der Grenzfläche zwischen den beiden Hälften des Ovalkompartiments, und die nachfolgende Zirkulation führt dann zur Dehnung und Faltung der Grenzfläche (Abbildung 10). Diese

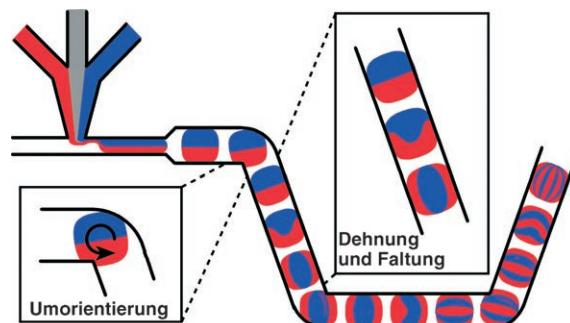


Abbildung 10. Durchmischung durch chaotische Advektion in einem Ovalkompartiment, das durch einen gewundenen Kanal strömt. Bei der Bewegung des Kompartiments durch die Kurven und geraden Abschnitte des Kanals werden die Grenzflächen zwischen roten und blauen Flüssigkeiten umorientiert, gedeckt und gefaltet. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [40]. Copyright 2003 American Institute of Physics.

Technik ermöglicht eine stark verbesserte Durchmischung (siehe zwei Videos in den Hintergrundinformationen, in denen die Durchmischung in geraden und gewundenen Kanälen verglichen wird).

Das Ausmaß der Durchmischung hängt von der Zahl der Kurven ab und lässt sich mithilfe von Fluoreszenzbildern quantitativ bestimmen (Abbildung 11). Durch den Einsatz

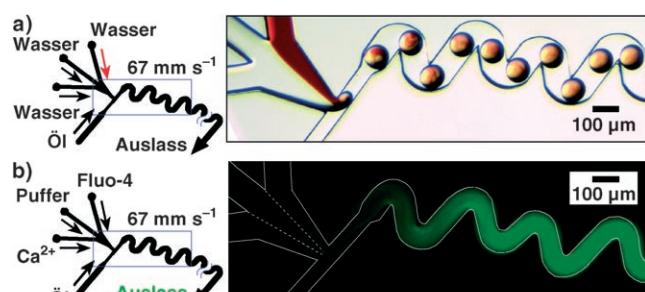


Abbildung 11. Schnelle Durchmischung in Tröpfchen durch chaotische Advektion.^[40] Links: Schema des Mikrofluidiksystems; rechts: a) Hellfeld- und b) Fluoreszenzmikroskopie-Bilder von Ovalkompartimenten, die durch gewundene Kanäle transportiert werden. Die Fluoreszenz entspricht dem zeitlichen Mittel der Fluoreszenzintensität von vielen Ovalkompartimenten, die innerhalb der Belichtungszeit von zwei Sekunden das Blickfeld passieren. Die Durchmischung wurde mithilfe eines fluorogenen Substrats (Fluo-4) visualisiert, dessen Fluoreszenz bei Bindung von Ca^{2+} -Ionen ansteigt. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [40]. Copyright 2003 American Institute of Physics.

eines Schlaglochmischers („bumpy mixer“) (Abbildung 12) lassen sich oszillierende Scherkräfte zwischen den Ovalkompartimenten erzeugen; dadurch konnten sogar viskose biologische Proben mit hohen Konzentrationen von Rinderserumalbumin oder Hämoglobin innerhalb von Millisekunden durchmischt werden.^[45] Die bei diesem Mischer beobachtete Schichtung (Abbildung 12 c) ähnelt stark der Schichtung bei chaotischer Advektion (Abbildungen 9 und 10).

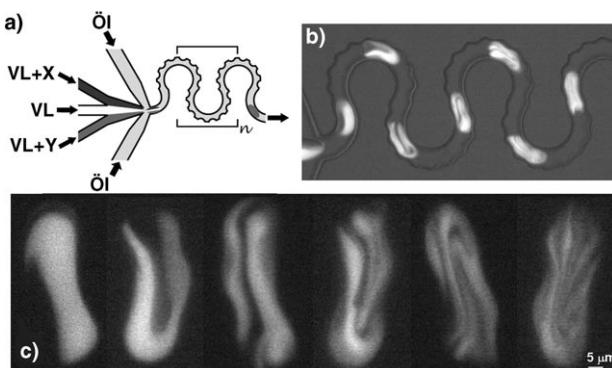


Abbildung 12. Durchmischung von viskosen Lösungen in Ovalkompartimenten mithilfe eines Schlaglochmischers.^[45] a) Schematischer Aufbau des Schlaglochmischers mit Kanalwindungen; VL: viskose Lösungen, X und Y: Reagentien. b) Durchmischung von Ovalkompartimenten einer Lösung von Rinderserumalbumin (BSA) (200 mg mL⁻¹) und einem Calceinfarbstoff. c) Schichtbildung in Ovalkompartimenten bei der Durchmischung einer Hämoglobin- (300 mg mL⁻¹) mit einer BSA-Lösung (260 mg mL⁻¹ mit 5 mM Calcein). Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [45]. Copyright 2006 American Chemical Society.

2.4. Steuerung der Grenzflächenchemie

In der Mikrofluidik spielen Oberflächeneffekte wegen des hohen Oberfläche-Volumen-Verhältnisses eine wichtige Rolle. Oberflächeneffekte können an der Grenzfläche zwischen der festen Wand des Mikrokanals und der Flüssigkeit (fest-flüssig) oder an der Grenzfläche zwischen den beiden nichtmischbaren Flüssigkeiten im Mikrokanal (flüssig-flüssig) auftreten. Für ein Molekül in einem Tröpfchen werden die Wechselwirkungen an der Flüssig-flüssig-Grenzfläche besonders relevant, wenn sich die Größe des Tröpfchens dem Quotienten Γ_{\max}/C_0 annähert; hier ist Γ_{\max} [mol m⁻²] die maximale Oberflächenbedeckung, die sich an der Grenzfläche bei der Sättigungskonzentration der Moleküle einstellt, und C_0 [mol m⁻³] ist die anfängliche Konzentration der Moleküle. In einem neueren Aufsatz wird beschrieben, wie sich Grenzflächen zwischen Flüssigkeiten und Wechselwirkungen in Flüssigkeiten mithilfe der Mikrofluidik kontrollieren lassen.^[119] Diese Wechselwirkungen können dazu eingesetzt werden, gelöste Stoffe in den Tröpfchen anzureichern,^[147] die Aktivität von Katalysatoren auf den Mikrokanalwänden zu maximieren^[104] und beschichtete Partikel mithilfe von Grenzflächenreaktionen zu synthetisieren.^[112, 117] Das hohe Oberfläche-Volumen-Verhältnis stellt einen schnellen Wärmeaustausch zwischen den Ovalkompartimenten und der Transportflüssigkeit sicher und ermöglicht schnelle Temperaturwechsel. Ein schneller Temperaturwechsel ist entschei-

dend für Anwendungen wie DNA-Amplifikation,^[148] In-vitro-Expression von Proteinen in Ovalkompartimenten^[149] und DNA-Analyse.^[51]

Die Wechselwirkungen an Fest-flüssig- und Flüssig-flüssig-Grenzflächen in Mikrokanälen können für bestimmte Anwendungen von Vorteil sein, in anderen Fällen aber auch stören. Es ist deshalb wichtig, diese Wechselwirkungen beherrschen zu können. Bei Ovalkompartimenten laufen Reaktionen in der dispersen Phase ab, die nicht mit der festen Wand des Mikrokanals in Kontakt kommt, sondern von einer Schicht der Transportflüssigkeit umschlossen ist. Reaktionen in Ovalkompartimenten werden daher vom Oberflächenverhalten der Flüssig-flüssig-Grenzfläche beeinflusst. Bei Zylinderkompartimenten laufen Reaktionen dagegen in der kontinuierlichen Phase ab, die sowohl mit der Mikrokanalwand als auch mit der dispersen Phase in Kontakt ist. Reaktionen in Zylinderkompartimenten werden daher durch das Oberflächenverhalten sowohl der Fest-flüssig- als auch der Flüssig-gasförmig-Grenzfläche beeinflusst.

Damit in den Mikrokanälen Ovalkompartimente erzeugt werden können, sollten die Kanalwände so behandelt werden, dass sie bevorzugt von der Transportflüssigkeit und nicht von der wässrigen Phase benetzt werden. Die Oberflächenspannung zwischen der wässrigen Phase und der Transportflüssigkeit sollte geringer sein als die zwischen der wässrigen Phase und der Kanalwand. Durch Tenside in der Transportflüssigkeit lässt sich die Oberflächenspannung an der Grenzfläche zwischen der wässrigen Phase und der Transportflüssigkeit verringern. Allerdings sollte die Oberflächenspannung nicht zu klein werden, denn die Kapillarzahl Ca der Strömung muss einen kleinen Wert haben, damit sich Ovalkompartimente bilden können.^[38] Die Kapillarzahl ist definiert als $Ca = \mu U/\gamma$, wobei μ [kg m⁻¹ s⁻¹] die Viskosität der Flüssigkeit, U [m s⁻¹] die Strömungsgeschwindigkeit und γ [N m⁻¹] die Grenzflächenspannung zwischen der wässrigen Phase und der Transportflüssigkeit ist.

Perfluorierte Kohlenwasserstoffe sind optimale Transportflüssigkeiten für die Erzeugung von Ovalkompartimenten. Sie gelten als chemisch und biologisch inert und wurden als Blutersatzstoffe,^[150] zur Flüssigkeitsbeatmung von Feten,^[151] zur diagnostischen Ultraschall-Bildgebung,^[152] für Zellkulturen^[153, 154] und zum Wirkstofftransport eingesetzt.^[155] Viele Arten von Fluorkohlenwasserstoffen und fluorierten Tensiden sind kommerziell erhältlich (aktuelle Ergebnisse zeigen allerdings, dass sich einige fluorierte Tenside in Geweben anreichern;^[156, 157] diese Tenside müssen daher vorsichtig gehandhabt werden). Des Weiteren sind Fluorkohlenwasserstoffe und fluorierte Tenside chemisch orthogonal zu Reaktionen in organischen Phasen.^[158]

Fluorierte Tenside lassen sich zur Kontrolle der Oberflächenelemente an der Flüssig-flüssig-Grenzfläche zwischen der wässrigen und der fluorierten Phase einsetzen,^[43] ähnlich wie Kohlenwasserstofftenside genutzt werden, um Adsorption an Grenzflächen zwischen wässriger und Kohlenwasserstoffphasen zu blockieren.^[159–161] Fluorierte Tenside sind in der wässrigen Phase unlöslich und reichern sich an der Grenzfläche zwischen wässriger und fluoriger Phase an. Da die Ovalkompartimente von einer dünnen Schicht der Transportflüssigkeit umschlossen sind, lässt sich das Oberflächen-

verhalten variieren, indem man, anstatt die Mikrokanalwand zu funktionalisieren, einfach das Tensid in der fluorierten Transportflüssigkeit wechselt. Mit dieser Methode wurde die Adsorption von Fibrinogen in einem Ovalkompartiment gelenkt (Abbildung 13). Ein mit einer Carbonsäuregruppe ausgestattetes Tensid führte zur Adsorption von Fibrinogen an der Grenzfläche (Abbildung 13a), während ein Tensid mit Oligoethylenglycol-Kopfgruppe die Adsorption an der Grenzfläche verhinderte (Abbildung 13b).

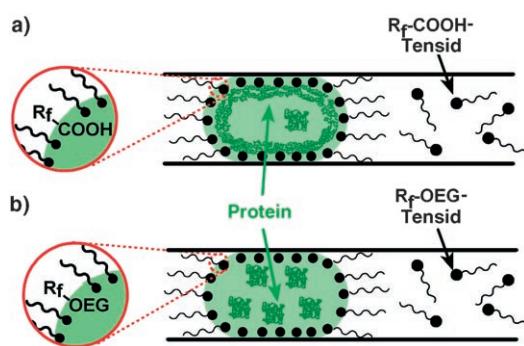


Abbildung 13. Steuerung des Oberflächenverhaltens von Ovalkompartimenten mithilfe von Tensiden an der Grenzfläche zwischen der wässrigen und der fluorinen Phase. a) Ein COOH-Tensid mit fluorierter Seitenkette (R_f) erzeugt eine nichthydrophile Grenzfläche, an der Proteine adsorbieren. b) Ein Tensid mit fluorierter Seitenkette und einer polaren Oligoethylenglycol(OEG)-Kopfgruppe erzeugt eine hydrophile Grenzfläche. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [43]. Copyright 2005 American Chemical Society.

2.5. Vereinigen und Aufspalten von Tröpfchen

Bei mehrstufigen Reaktionen ist es notwendig, Reaktionsmischungen zu vereinigen und wieder aufzuspalten. Die tröpfchenbasierte Mikrofluidik ermöglicht die zeitliche Steuerung von Wechselwirkungen zwischen Reaktionen.^[1] Reaktionen lassen sich vereinigen, indem man die reagenshaltigen Tröpfchen miteinander vereinigt, und sie lassen sich auftrennen, indem man ein Tröpfchen in zwei kleinere Tröpfchen aufteilt (Abbildung 14).^[1,162]

Zum Vereinigen und Aufspalten von Tröpfchen wurden etliche Methoden entwickelt. Um zwei parallele Reaktionen zu kombinieren, kann man zwei Gruppen von Tröpfchen in zwei parallelen Mikrokanälen erzeugen, die sich zu einem Hauptkanal vereinigen. Die Tröpfchen der beiden Gruppen werden sich im Hauptkanal vereinigen, wenn die Tröpfchenfrequenzen aufeinander abgestimmt sind und die Tröpfchen unterschiedliche Größen haben (Abbildung 14a).^[1] Die Vereinigung von mehreren kleinen Tröpfchen mit einem einzelnen größeren Tröpfchen^[163] sowie von zwei gleich großen Tröpfchen^[164] wurde ebenfalls beschrieben. Die Aufspaltung von Tröpfchen wurde an sich verengenden T-Kreuzungen (Abbildung 14b)^[1,125] und an isolierten Hindernissen untersucht.^[165]

Zahlreiche Studien beschäftigten sich mit der Steuerung und Handhabung von Tröpfchen in Mikrokanälen;^[166] zu den

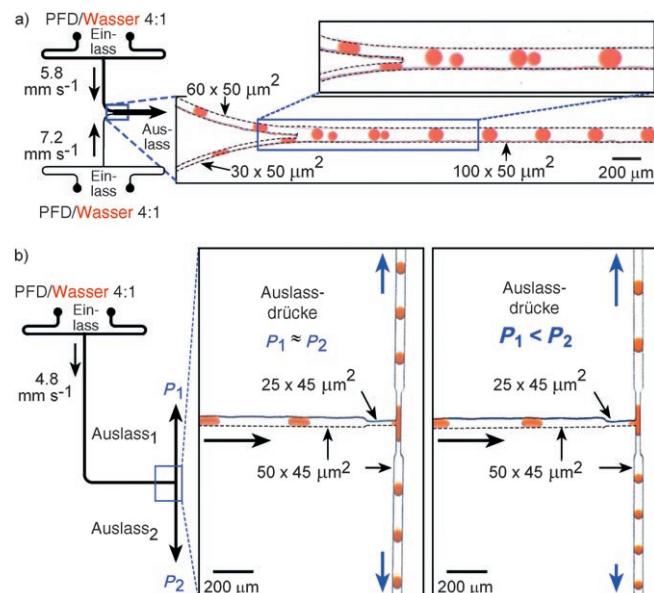


Abbildung 14. Vereinigen und Aufspalten von Tröpfchen in Mikrokanälen.^[1] Links: Aufbau des Mikrofluidiksystems; rechts: Mikrophotographien von Ovalkompartimenten, die durch die Mikrokanäle transportiert werden. a) Spontane Vereinigung von Ovalkompartimentpaaren zu einem einzelnen Ovalkompartiment im Hauptmikrokanal. b) Spontane Aufspaltung von Ovalkompartimenten an einer Mikrokanalverzweigung. Bei gleichen Drücken in den Auslasskanälen spalten sich die ursprünglichen Ovalkompartimente in etwa gleich große Tröpfchen auf (Mitte). Bei unterschiedlichen Drücken in den Auslasskanälen kommt es zu einer unsymmetrischen Aufspaltung (rechts). Als Transportflüssigkeit diente Perfluordecalin (PFD). Wiedergabe aus Lit. [1].

Beispielen gehören das Sortieren von Tröpfchen mithilfe elektrophoretischer Kräfte,^[167] Steuerung des Tröpfchenvolumens, der chemischen Konzentration und der Tröpfchen-Sortierung^[168] sowie numerische Studien zu Deformation, Zerfall und Koaleszenz von Tröpfchen.^[110,130,169] Vor kurzem wurde eine Methode entwickelt, um Tröpfchen in Mikrokanälen mithilfe elektrischer Kräfte zu vereinigen und aufzuspalten. Hierbei wurden zwei Gruppen von Tröpfchen erzeugt und die Grenzflächen zwischen Transportflüssigkeit und wässriger Phase mit entgegengesetzten elektrostatischen Ladungen versehen (Abbildung 15). Die beiden Tröpfchenströme wurden synchronisiert und vereinigten sich beim Zusammenfluss vollständig im Verhältnis 1:1.^[170a] Die neutralen Tröpfchen ließen sich wieder in zwei entgegengesetzt geladene Tröpfchen aufspalten,^[170a] die außerdem mithilfe elektrischer Wechselwirkungen sortiert werden konnten.^[170a] Eine weitere Methode steuerte die Koaleszenz von Propfen durch Wechselstromfelder.^[170b] Diese Techniken sollten für die Entwicklung von automatisierten Funktionseinheiten für die tröpfchenbasierte Mikrofluidik nützlich sein.

2.6. Indizierung von Reaktionsbedingungen mithilfe von Tröpfchenpaaren

Bei Systemen mit einer großen Zahl von Tröpfchen, die unterschiedliche Reaktanten enthalten, ist eine Indizierung der Tröpfchen wichtig. Eine Möglichkeit besteht in der

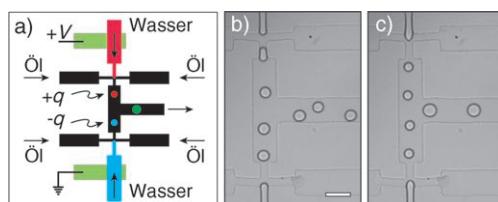


Abbildung 15. Vereinigen von Tröpfchen mithilfe elektrischer Kräfte.^[170a]
a) Durch Anlegen einer elektrischen Spannung an die beiden wässrigen Strömungen werden Tröpfchen mit entgegengesetzten elektrostatischen Ladungen erzeugt. b) Ohne elektrisches Feld sind Frequenz und Zeitpunkt der Tröpfchenerzeugung an den beiden Kanalmündungen selbst bei gleicher Infusionsgeschwindigkeit voneinander unabhängig. In Gegenwart eines Tensids vereinigten sich die Tröpfchen beim Zusammenfluss der beiden Strömungen nicht (Skalierung 100 µm). c) Bei einer angelegten Spannung von 200 V (Abstand der Mündungen: 500 µm) werden die Tröpfchen gleichzeitig an den Kanalmündungen ausgelassen und vereinigen sich beim Zusammenfluss. Wiedergabe in veränderter Form aus Lit. [170a].

Zugabe von Reporterfarbstoffen, deren Konzentrationen mit den Reagentien in den Tröpfchen korreliert sind. Um Wechselwirkungen der Reporterfarbstoffe mit der chemischen Reaktion auszuschließen, kann man die Reaktionsbedingungen indizieren, indem man die Tröpfchen paarweise so zusammenfasst, dass in einem Tröpfchen die Reaktion abläuft, während das andere Tröpfchen die Information transportiert (Abbildung 16).^[33,41] Mithilfe dieser Tröpfchenpaare

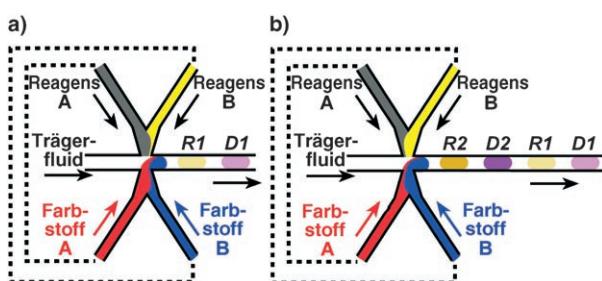


Abbildung 16. Konzentrationen in Tröpfchen können durch Erzeugung alternierender Tröpfchen in Mikrokanälen indiziert werden.^[41] Die gezeigte Mikrofluidikeinheit erzeugt Tröpfchenpaare R und D; die Tröpfchen R enthalten die Reagentien und die Tröpfchen D die Farbstoffe zur Indizierung. Die Strömungsgeschwindigkeiten von Reagens A und Farbstoff A bzw. von Reagens B und Farbstoff B sind miteinander gekoppelt (angedeutet durch die gestrichelten Linien). a) Die Konzentrationen der Reagentien A und B in R1 sind mit den Konzentrationen der Farbstoffe A und B in D1 korreliert, sodass mithilfe der Farbstoffkonzentration in D1 die Reagenskonzentration in R1 indiziert werden kann. b) Array alternierender Tröpfchen. Wiedergabe in veränderter Form aus Lit. [41]. Copyright 2004 American Chemical Society.

wird die Information über die Reaktionsbedingungen räumlich organisiert. Ein Tröpfchen des Paares enthält das Reaktionsgemisch, das zweite Tröpfchen enthält die Farbstoffe, deren ratiometrische Intensität dem Verhältnis der Reagenzien im ersten Tröpfchen entspricht.^[33,41]

Tröpfchen in Mikrokanälen können mit alternierender Zusammensetzung (XYXY...) erzeugt werden. Ein Tröpf-

chenpaar besteht aus einem Tröpfchen mit der Zusammensetzung „X“ und einem mit der Zusammensetzung „Y.“ Die Bildung alternierender Tröpfchen in Mikrokanälen wurde als Funktion der Kapillarzahl und der Strömungsgeschwindigkeiten der wässrigen Phase und der Transportflüssigkeit untersucht.^[41] (Ein in den Hintergrundinformationen hinterlegtes Video illustriert die Bildung alternierender Tröpfchen in einem Mikrokanal.)

2.7. Analyse von Tröpfcheninhalten

Es gibt zwei Methoden, um die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches und den Reaktionsfortschritt in Tröpfchen zu analysieren: entweder jedes Tröpfchen einzeln oder viele Tröpfchen zusammen in einer Messung.

Die Einzelanalyse von Tröpfcheninhalten erfordert die Handhabung kleiner Probenvolumina, meist im Bereich von Femto- und Mikrolitern. Am häufigsten werden Fluoreszenzmethoden für Analysen in Mikrofluidikeinheiten eingesetzt, wobei der Inhalt eines einzelnen Tröpfchens mithilfe eines fluorogenen Substrats erfasst wird. Bei integrierten Mikrofluidikeinheiten wurde ein elektrophoretisches Verfahren angewendet.^[51] Kürzlich wurde MALDI-Massenpektrometrie zur halbquantitativen Charakterisierung von Desacytylierungen in nanolitergroßen Ovalkompartimenten eingesetzt.^[126] Mikrospulen-NMR-Spektroskopie wurde zur Analyse von kleinen Proben genutzt.^[171] Auch Röntgenbeugung wurde eingesetzt, um einen einzelnen Proteinkristall in einem Ovalkompartiment zu analysieren.^[34]

Im zweiten Fall besteht die Möglichkeit, gesammelte Tröpfchen außerhalb oder innerhalb der Mikrofluidikeinheit zu analysieren. Für eine externe Analyse können die Tröpfchen in Gefäßen gesammelt werden, bis das Volumen für eine vollständige Analyse ausreicht. Diese Methode wird typischerweise bei der Synthese von Nanopartikeln verwendet, wo Absorptionsmessungen, Rasterelektronenmikroskopie und ähnliche Verfahren erforderlich sind. Für On-Chip-Analysen lassen sich zeitaufgelöste Messungen aus einzelnen ortsaufgelösten Fluoreszenzmikrographien (wie in Abbildung 11b gezeigt) erhalten.^[1,44] Die Fluoreszenzintensität ist linear an die Bildung des Reaktionsprodukts gekoppelt. Da keine Dispersion auftritt, lässt sich die Menge des zum Zeitpunkt t gebildeten Produkts aus der im Abstand d zum Mikrokanal gemessenen Fluoreszenzintensität bestimmen (Abbildung 17). Mit dieser Methode lassen sich kinetische Messungen im Millisekundenbereich bei Reagensmengen im Nanoliterbereich realisieren.^[44]

3. Anwendungen von Mikrofluidiktröpfchen

Die oben beschriebenen Techniken wurden für viele Arten von Reaktionen mit paralleler und serieller Reaktionsführung angewendet. Die Reaktionen teilen wir in fünf Kategorien ein: 1) Enzymkinetik, Enzymassays und DNA-Analyse; 2) Proteinkristallisation; 3) Synthese von Molekülen; 4) Synthese von Nano- und Mikropartikeln und kolloidalen Systemen; 5) Erzeugung von Reaktionsnetzwerken.

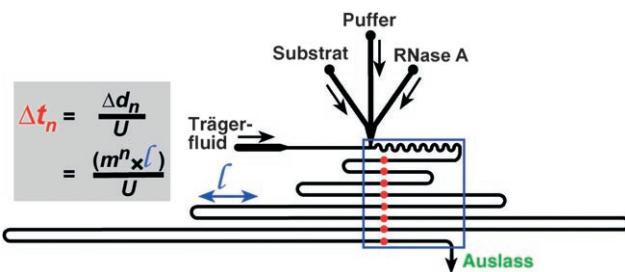


Abbildung 17. Kinetische Messungen durch Analyse einer einzelnen Mikrophotographie von Tröpfchen, die durch einen Mikrokanal transportiert werden.^[44] Die roten Punkte entsprechen Zeitpunkten t_m , und das blaue Rechteck markiert den Bereich der Fluoreszenzmikrophotographie. Die zu untersuchende Reaktion in den Tröpfchen sollte eine Änderung der Fluoreszenz zur Folge haben (wie in Abbildung 11 b). Der zeitliche Ablauf der Reaktion wird erhalten, indem man in der Mikrophotographie die Fluoreszenzintensität an den einzelnen Positionen (rote Kreise) bestimmt. Mithilfe der angegebenen Gleichung können die zeitlichen Differenzen zwischen den einzelnen Zeitpunkten berechnet werden; Δt_n [s] ist das Zeitintervall zwischen t_n und t_{n+1} ($n=1-8$, entsprechend den einzelnen Mikrokanalabschnitten im Sichtfeld der Mikrophotographie), $m=1.5$, $l=0.9$ mm, $U=106$ mm s $^{-1}$. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [44]. Copyright 2003 American Chemical Society.

3.1. Enzymkinetik, Enzymassays und DNA-Analyse in Tröpfchen

3.1.1. Enzymkinetik in Tröpfchen

Aufgrund mehrerer Vorteile, wie schnelle Durchmischung (Abschnitt 2.3), biokompatibles Grenzflächenverhalten (Abschnitt 2.4) und kein Auftreten von Dispersion, wurde die tröpfchenbasierte Mikrofluidik als bevorzugte Methode für Messungen der Einzelumsatzkinetik des Enzyms Ribonuclease A (RNase A) mit Millisekundenauflösung ausgewählt (Abbildung 18).^[44] Mit der Methode der On-Chip-Verdünnung (Abschnitt 2.2.2) wurden serielle kinetische Messungen des RNase-A-Umsatzes bei drei Substratkonzentrationen ausgeführt (Abbildung 18b). Um einen Satz kinetischer Daten zu erhalten, wurde jeweils eine Aufnahme mit zeitlich gemittelten Fluoreszenzintensitäten analysiert (Abschnitt 2.7); dabei wurden für jedes Fluoreszenzbild ca. 66 nL der Probelösung benötigt. Mit der gleichen Methode wurde auch der Umsatz von alkalischer Phosphatase in Ovalkompartimenten mit Millisekundenauflösung kinetisch untersucht.^[43] Durch Anwendung eines Schlaglochmischers (Abbildung 12a) gelang es, die Luciferase-Aktivität in Tröpfchen viskoser Lösungen in Millisekundenauflösung zu messen.^[45] Durch Kontrolle der Dispersion konnten Enzymreaktionen in Ovalkompartimenten auf langsameren Zeitskalen (im Bereich von Sekunden über Minuten bis Stunden) ausgeführt werden. Ein Mehrstufenassay zur Messung der Blutgerinnungszeit wurde für die tröpfchenbasierte Mikrofluidik entwickelt, wobei Fibrinklumpchen in den Tröpfchen durch den Mikrokanal transportiert wurden, ohne die Wände zu kontaminieren oder mit ihnen in Kontakt zu kommen.^[132] Ein Enzym-Screening wurde ausgeführt, indem mit Enzymen beladene Ovalkompartimente aus einer Kartusche (Abschnitt 2.2.1) mit einer Substratströmung vereinigt wurden (Abbildung 6).^[42]

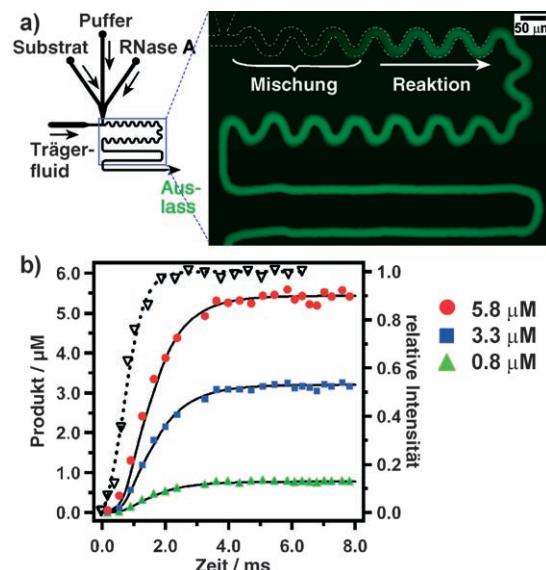


Abbildung 18. Kinetische Analyse des RNase-A-Umsatzes in Ovalkompartimenten im Millisekundenbereich.^[44] a) Links: experimenteller Aufbau; rechts: Fluoreszenzmikrophotographie (Falschfarbenbild) der zeitlich gemittelten Intensität (Belichtungszeit 2 s) der wässrigen Ovalkompartimente und der Transportflüssigkeit. b) Diagramm der experimentellen kinetischen Daten für drei Substratkonzentrationen bei 0.8 (▲), 3.3 (■) und 5.8 μM (●); die Daten wurden aus der Analyse von Mikrophotographien, wie in (a) gezeigt, erhalten. Ebenfalls gezeigt ist die Mischungskurve (rechte Koordinatenachse, ▽), die mit dem Fluor-4/Ca²⁺-System in der gleichen Mikrofluidikeinheit erhalten wurde. Die durchgezogenen Linien sind Angleiche an den Reaktionsverlauf, wobei die Durchmischung miteinbezogen wurde. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [44]. Copyright 2003 American Chemical Society.

Mikroreaktoren für die In-vitro-Expression von Proteinen wurden zur gerichteten Proteinevolution eingesetzt. Die Gene und das Proteinsubstrat können im gleichen Mikroreaktor enthalten sein, sodass eine simultane Expression und Funktionsprüfung des Proteins möglich ist.^[61,149] In einem Mikrofluidiksystem wurden mit zwei wässrigen Strömungen Tröpfchen mit Subpikolitervolumen erzeugt (Abschnitt 2.2.2), die die Komponenten für die GFP-Expression – GFP-Codierungsvektor, RNA-Polymerase, Aminosäuren, Nucleotide und ATP – enthielten (GFP = grün fluoreszierendes Protein).^[149] Nach Inkubation bei 37°C wurde die Expression von GFP durch hochempfindliche Epifluoreszenzmikroskopie nachgewiesen (Abbildung 19).^[149] Dieses Verfahren, das eine einfache Kontrolle der Reagenskonzentrationen in einer großen Zahl von Tröpfchen ermöglicht (Abschnitt 2.2.2), belegt das Anwendungspotenzial von Mikrofluidiktröpfchen für die gerichtete Evolution von Proteinen.

3.1.2. Verkapselung von Makromolekülen und Zellen in Tröpfchen

Mit der tröpfchenbasierten Mikrofluidik lassen sich Zellkulturen in großem Umfang parallelisieren, wie am Beispiel von *C.-elegans*-Embryonen^[172] und mikrobiellen Zellen^[162,173,174] gezeigt wurde. Wenn man den Aufenthalt einer Zelle auf ein einzelnes Tröpfchen beschränkt, gelingt es

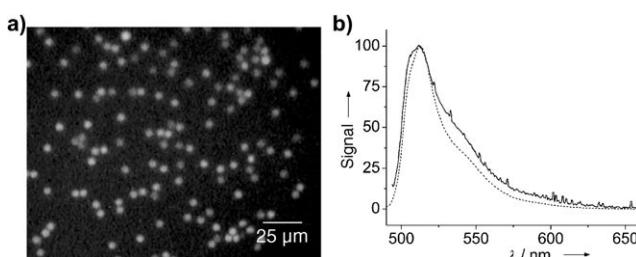


Abbildung 19. In-vitro-Translation von GFP in Tröpfchen.^[149] a) Fluoreszenzmikrophotographie der Tröpfchen nach der GFP-Expression. Die Tröpfchen wurden in einer Mikrovertiefung gesammelt. b) Fluoresenzspektren von GFP; gestrichelte Linie: kommerziell erhältliche Proteinprobe in wässriger Lösung, durchgezogene Linie: einzelnes Tröpfchen nach In-vitro-Expression. Wiedergabe aus Lit. [149].

relativ leicht, geringste Mengen von Molekülen nachzuweisen, die von der Zelle abgegeben werden.

Durch die Verkapselung von einzelnen Zellen in Tröpfchen konnten Enzymassays von einzelnen Zellen durchgeführt werden.^[175] Hierbei lassen sich mithilfe spezieller T-Kanäle Tröpfchen mit einem festgelegten Femtolitervolumen erhalten. Vor der Tröpfchenbildung wird eine einzelne Zelle aus der wässrigen Lösung ausgewählt und mithilfe einer optischen Falle zur Grenzfläche der wässrigen Transportflüssigkeit bewegt.^[175] Die Zelle wird dann im sich bildenden Tröpfchen verkapstelt. Ähnliche selektive Verkapselungen gelangen auch mit Polystyrolkugelchen und einzelnen Mitochondrien.^[175] In einem Beispiel wurde eine einzelne Mastzelle in einem Tröpfchen verkapstelt, das ein fluorogenes Substrat enthielt (Abbildung 20a). Unter dem Fluoreszenz-

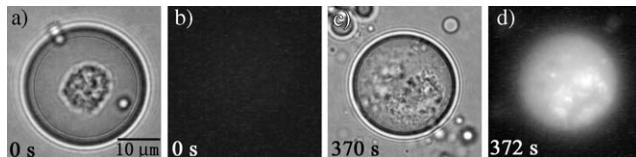


Abbildung 20. Ein Enzymassay für eine einzelne Mastzelle in einem Tröpfchen.^[175] a, c) Hellfeldaufnahmen; b, d) Fluoreszenzaufnahmen. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [175]. Copyright 2005 American Chemical Society.

mikroskop erschien das Tröpfchen dunkel (Abbildung 20b), solange die Zelle nicht photoliert wurde. Nach der Photolyse (Abbildung 20c) wurde das intrazelluläre Enzym β-Galactosidase freigesetzt, das das Substrat spaltet und so die Fluoreszenz des Tröpfchens auslöst (Abbildung 20d).^[175] In einer Mikrofluidikeeinheit mit integrierten Heiz- und Kühllementen wurden auch Zylinderkompartimente zur Zellyse und zum Nachweis der transienten Antworten des MAPK-Signalwegs eingesetzt.^[176]

Kürzlich wurden Mikrofluidiktröpfchen auch zur Erzeugung von Lipidvesikeln genutzt, in denen biologische Makromoleküle oder Zellen verkapstelt wurden. Zunächst wurden wässrige Tröpfchen erzeugt, wobei Ölsäure, in der Phospholipide gelöst waren, als Transportflüssigkeit (kontinuierliche Phase) diente.^[177] Diese Wasser-Lipid-Emulsion wurde in eine EtOH/H₂O-Lösung gegeben, wobei die Öl-

säure extrahiert wurde und die Phospholipide Vesikel bildeten.^[177] Zur Verkapselung von biologischen Molekülen oder Zellen wurden für die anfängliche Tröpfchenherzeugung wässrige Lösungen verwendet, die die zu verkapselnden Objekte enthielten (Abbildung 21).^[177] Zellen, die mit dieser Methode in Vesikeln verkapstelt wurden, blieben für 2 h lebensfähig.^[177] Dieses Verfahren ist ein einstufiger Prozess und kommt ohne toxische Lösungsmittel aus.^[177]

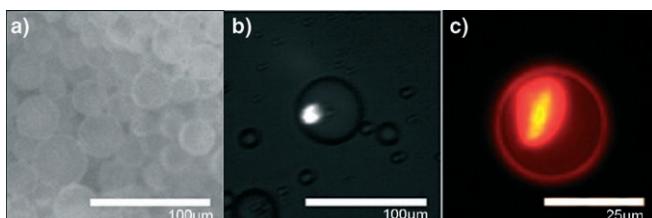


Abbildung 21. Fluoreszenzmikrophotographien von a) fluoreszierenden GFP-Proteinen, die in DOPC-Vesikeln verkapstelt wurden, b) einer einzelnen HeLa-Zervixkarzinomzelle (Durchmesser 10 µm), die in einem DOPC-Vesikel verkapstelt wurde, und c) einer MCF7-Brusttumorzelle in einem DMPC-Vesikel. Wiedergabe aus Lit. [177]. Copyright 2006 American Chemical Society. DOPC = Dioleylphosphatidylcholin, DMPC = Dimyristoylphosphatidylcholin.

3.1.3. DNA-Analyse

Die Verwendung von Zylinderkompartimenten als Mikroreaktoren wird durch die Entwicklung eines integrierten DNA-Analysators illustriert.^[51] Mit einem solchen Analysator können nanolitergroße Proben in Zylinderkompartimenten gehandhabt und analysiert werden. Ein hydrophiler Mikrokanal mit einem hydrophoben Abschnitt auf der Oberfläche wird durch Kapillarkräfte mit einer wässrigen Lösung der Probe oder des Reagens gefüllt, bis die Lösung den hydrophoben Abschnitt erreicht (Abbildung 22).^[51, 178] Dann wird durch Druck eine Luftblase erzeugt, die ein Zylinderkompartiment mit einem Nanolitervolumen erzeugt und durch den Kanal transportiert (Abbildung 22). Schließlich werden die Zylinderkompartimente, die die Probe enthalten, mit den Zylinderkompartimenten der Reagensströmung vereinigt und in der Reaktionskammer erhitzt. Nach dem Ende der Reaktion werden die Zylinderkompartimente durch Druck zum Elektrophoresekanal transportiert, wo eine On-Chip-Trennung und Detektion durchgeführt wird. Auch DNA-Polymerasekettenreaktionen wurden in Zylinder-^[148a,b] und Ovalkompartimenten^[148c] ausgeführt.

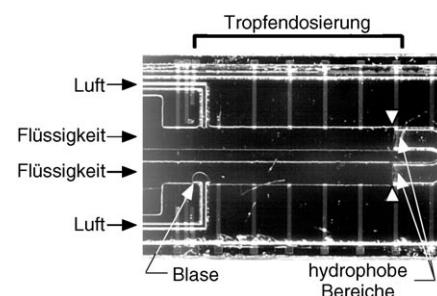


Abbildung 22. Optische Mikrophotographie des Injektionsteils eines integrierten DNA-Analysators. Wiedergabe aus Lit. [51]. Copyright 1998 AAAS.

3.2. Proteinkristallisation in Mikrofluidiktröpfchen

Ein wichtiger Schritt bei der Strukturaufklärung von Proteinen durch Röntgenbeugung ist das Züchten von Kristallen hoher Qualität. Normalerweise werden Kristalle mit der Mikrobatch- oder Dampfdiffusionsmethode gezüchtet. Bei den Mikrobatchmethoden wird ein mikrolitergroßer Tropfen, der die Proteinprobe und die Fällungsreagentien enthält, unter einer Ölschicht inkubiert. Bei den Dampfdiffusionsmethoden wird ein mikrolitergroßes Tröpfchen, das die Proteinprobe und die Fällungsreagentien enthält, neben einem Reservoir platziert, das ein Trockenmittel in hoher Konzentration enthält. Das Trockenmittel entzieht dem Tröpfchen Wasser, sodass sich die Übersättigung im Tröpfchen erhöht und so die Keimbildung und das Kristallwachstum beschleunigt werden.

Proteinproben stehen meist nur in einer begrenzten Menge zur Verfügung; daher wurden Strategien zur Miniaturisierung von Kristallisierungsverfahren entwickelt, die entweder auf Robotertechnik^[179,180] oder Mikrofluidiksystemen mit Mikroventilen^[24–26] beruhen. In Mikrofluidikanälen können nanolitergroße Tröpfchen erzeugt werden, sodass ca. 10 µL einer Proteinprobe genügen, um 1000 Kristallisierungsproben anzusetzen. Im Folgenden werden wir diskutieren, wie sich mit Mikrofluidiktröpfchen sowohl Mikrobatch- als auch Dampfdiffusionsmethoden realisieren lassen, wie man Röntgenbeugungsmessungen auf einem Chip durchführen kann und wie sich der Einfluss der Durchmischung auf die Keimbildung und das Kristallwachstum von Proteinen untersuchen lässt.

3.2.1. Proteinkristallisation durch Sparse-Matrix- und Gradientenscreening

Die Züchtung eines Proteinkristalls verläuft bei der Mikrobatchmethode in zwei Schritten. Zuerst müssen sehr viele Kristallisierungsreagentien (eine bestimmte Kombination aus Puffer, Fällungsreagentien und Polymerlösung) zusammen mit dem Protein getestet werden, um eine geeignete Kombination von Reagentien zu finden, mit der sich Proteinkristalle erzeugen lassen (Sparse-Matrix-Screening). Danach folgt für jedes Reagens der vorselektierten Kombination ein Feinscreening, um Kristalle in Beugungsqualität zu erhalten (Gradientenscreening).

Sparse-Matrix-Screenings wurden mithilfe der tröpfchenbasierten Mikrofluidik ausgeführt, indem die Proteinprobe zu einem Array aus Kristallisierungsreagentien gegeben wurde, das in einem Kartuschenmodul (Abschnitt 2.2.1) vorbereitet war.^[42] Die Kartusche enthielt 48 Ovalkompartimente mit unterschiedlichen Kristallisierungsbedingungen, die über eine T-Kreuzung mit dem Protein Thaumatin versetzt wurden. Die resultierenden Ovalkompartimente wurden in eine Glaskapillare transportiert, versiegelt und zur Kristallzüchtung inkubiert. Die Proben konnten in der Glaskapillare über ein halbes Jahr aufbewahrt werden, ohne dass Verdampfung auftrat.^[42] Die gebildeten Proteinkristalle in der Kapillare wurden mit einem Hellfeld-Polarisationsmikroskop detektiert.

Gradientenscreenings mit computergesteuerten Strömungsgeschwindigkeiten der Reagenzien wurden mithilfe eines Tröpfchenarrays ausgeführt (Abbildung 23).^[128] Die Reagenskonzentrationen werden über die Strömungsgeschwindigkeiten verändert (Abschnitt 2.2.2), und für den Screeningvorgang werden die Reagensströme angehalten und die Tröpfchen zur Bestimmung der optimalen Kristallisationsbedingungen inkubiert.

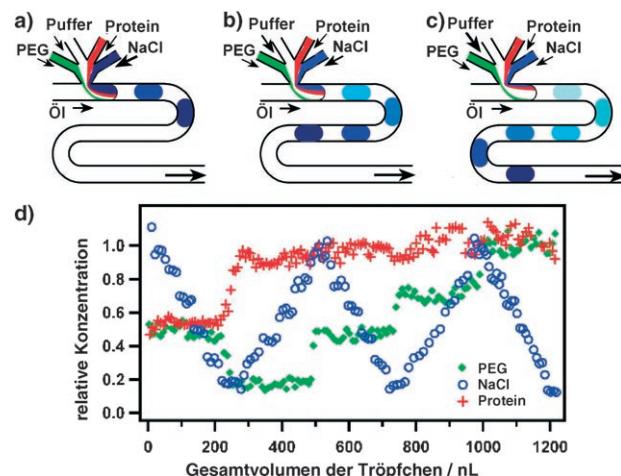


Abbildung 23. Verwendung von Tröpfchen für ein Gradientenscreening von Proteinkristallisationsbedingungen.^[128] a-c) Die Konzentrationen der Kristallisierungsreagentien (PEG, Puffer, Protein und NaCl) wurden über die relativen Strömungsgeschwindigkeiten der Reagenzien variiert. d) Experimentelle Charakterisierung des Gradientenscreenings: Pro Sekunde wurden zwei Tröpfchen mit einem Volumen von 7.5 nL erzeugt, und jeder Datenpunkt entspricht einem Tröpfchen. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [128]. Copyright 2003 American Chemical Society.

3.2.2. Proteinkristallisation durch Dampfdiffusion in Tröpfchen

Bei der Dampfdiffusionsmethode wird mithilfe eines Reservoirs, das die Lösung eines Trockenmittels enthält (z.B. eine konzentrierte Salzlösung), die Diffusion von Wasserdampf aus dem kristallisathaltigen Tropfen beschleunigt. Zur Anwendung dieser Methode in der tröpfchenbasierten Mikrofluidik wurden Paare mit alternierenden Ovalkompartimenten erzeugt (Abschnitt 2.6), wobei ein Tröpfchen das Protein und die Fällungsreagentien und das andere Tröpfchen eine konzentrierte Salzlösung enthielt (Abbildung 24).^[34] Bei

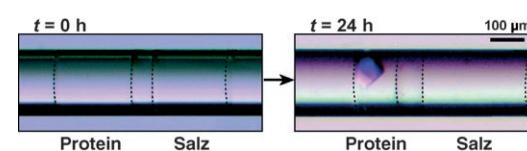


Abbildung 24. Alternierende Tröpfchen können für die Dampfdiffusionsmethode zur Proteinkristallisation eingesetzt werden.^[34] Mikrophotographien eines Paares alternierender Tröpfchen 0 h (links) und 24 h (rechts) nachdem die Tröpfchen in die Kapillare transportiert wurden. Nachdem das Volumen des Tröpfchens mit der Proteinlösung um 50% abgenommen hatte, bildete sich ein Proteinkristall. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die Grenzfläche zwischen den wässrigen Tröpfchen und der Transportflüssigkeit. Wiedergabe aus Lit. [34].

der Erzeugung der Ovalkompartimente wurde eine wasserpermeable Transportflüssigkeit verwendet, um den Wasser-austausch zwischen den Tröpfchen zu ermöglichen.

3.2.3. Bestimmung von Proteinstrukturen durch On-Chip-Röntgenbeugung und In-situ-Strukturaufklärung

Für Röntgenbeugungsmessungen müssen die Kristalle der Proteinlösung entnommen, mit einem Frostschutzmittel behandelt, gefroren und schließlich auf das Röntgendiffraktometer montiert werden. Da die Handhabung der Kristalle oft schwierig ist, wurde versucht, eine In-situ-Methode zu entwickeln. Tatsächlich gelang es, durch Kristallzüchtung in Ovalkompartimenten innerhalb röntgendiffraktometrischer Kapillaren direkte Beugungsbilder von Thaumatin-Kristallen zu erhalten (Abbildung 25).^[34]

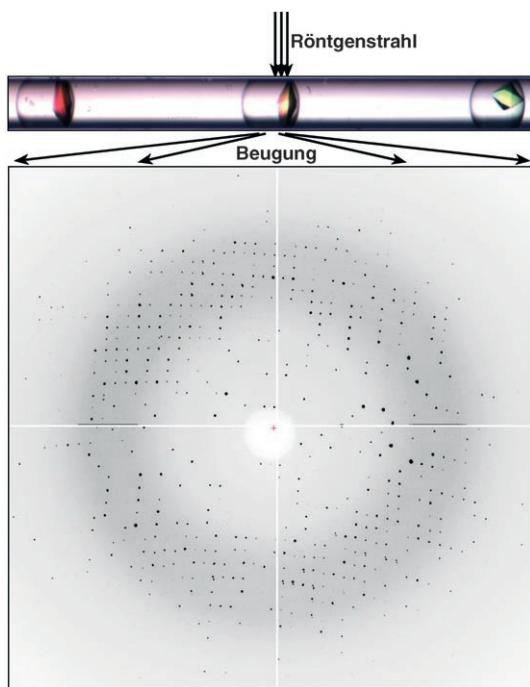


Abbildung 25. On-Chip-Röntgenbeugung an einem Thaumatin-Kristall in einer Kapillare.^[34] Wiedergabe aus Lit. [34].

Da Kristalle durch die Röntgenstrahlung beschädigt werden, ist es kaum möglich, von einem einzelnen Kristall einen vollständigen Satz von Beugungsdaten zu erhalten, ohne den Kristall einzufrieren. Ein vollständiger Datensatz lässt sich jedoch erhalten, wenn man viele Kristalle in der Mikrofluidikkapillare züchtet und die Daten der einzelnen Kristalle aufsummieren. Dieses Konzept der In-situ-Strukturaufklärung^[181] wurde an Modellproteinen in Ovalkompartimenten demonstriert.^[182] Ob die Methode als allgemeines Verfahren zur Strukturaufklärung von Proteinen geeignet ist, bleibt als wichtige Frage zu klären.

3.2.4. Einfluss der Durchmischung auf die Proteinkristallisation

Eine unzureichende Durchmischung wurde als mögliche Ursache von Unstimmigkeiten bei Batch-Kristallisationen

vermutet. Unter typischen Laborbedingungen lässt sich die Durchmischung nicht einfach steuern, und mit konventionellen Pipettiermethoden ist der Einfluss der Durchmischung schwierig zu untersuchen. In Mikrofluidiktröpfchen kann man dagegen die Durchmischung gut kontrollieren (Abschnitt 2.3), und der Einfluss der Durchmischung auf die Keimbildung von Proteinkristallen wurde entsprechend in Ovalkompartimenten untersucht (Abbildung 26).^[183] Mit zunehmender Übersättigung (gemessen an den Konzentrationen von Protein und Fällungsreagens) nimmt die Keimbildungsgeschwindigkeit stark zu (quadratisch exponentiell). Da Fällungsreagentien (meist kleine Moleküle oder Salze) schneller als das Protein diffundieren können, ist die Übersättigung an den Grenzflächen zwischen der Proteinlösung und der Fällungsreagenslösung größer als die Übersättigung in der Lösung nach der Durchmischung. In Ovalkompartimenten konnte die Lebensdauer der Grenzfläche zwischen Protein- und Salzlösung über die Durchmischung gesteuert werden. Bei langsamer Durchmischung ergab sich eine lange Lebensdauer der Grenzfläche und somit eine verstärkte Keimbildung (Abbildung 26b), wohingegen eine schnelle Durchmischung zu einer kurzen Lebensdauer und weniger Keimbildungen führte (Abbildung 26c).

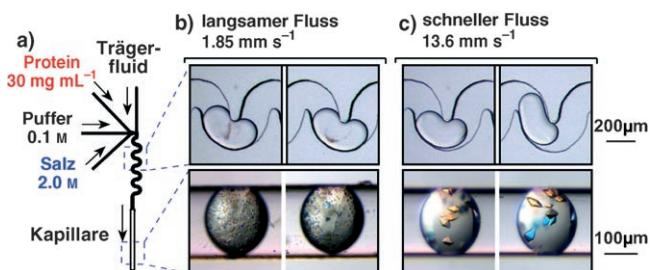


Abbildung 26. Der Einfluss der Durchmischung auf die Keimbildung von Proteinkristallen wurde mithilfe von Mikrofluidiktröpfchen untersucht.^[183] a) Experimenteller Aufbau. b) Bei niedriger Strömungsgeschwindigkeit wurde Fällung beobachtet (oberes Bild). Ausmaß der Fällung und Größe der Mikrokristalle nahmen in den Ovalkompartimenten zu (unteres Bild). c) Bei höherer Strömungsgeschwindigkeit wurden weniger und kleinere Kristalle beobachtet (unteres Bild). Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [183]. Copyright 2005 American Chemical Society.

3.3. Synthesen in Mikrofluidiktröpfchen

3.3.1. Organische Moleküle

Organische Synthesen wurden in der Mikrofluidik sowohl in Oval- als auch in Zylinderkompartimenten ausgeführt, wobei die Vorteile der Miniaturisierung und eines einfachen Wärme- und Massetransfers im Vordergrund standen. Beispiele für einstufige Reaktionen in Ovalkompartimenten sind die Nitrierung von Benzol,^[184–186] die Extraktion von Säure aus Kerosin,^[187] die Fluorierung von Aromaten,^[49] die Bromierung von Alkenen^[188] und Fällungsreaktionen.^[189] In einer zweistufigen Reaktion wurden Monomer- und Novolak-Azofarbstoffe in Ovalkompartimenten synthetisiert.^[47] Die Segmentierung von Proben in Zylinderkompartimenten verbesserte die Hybridisierungseffizienz auf DNA-Mikroarrays.^[190]

Bei heterogenen Reaktionen zwischen mehreren Phasen ist der Stofftransport von entscheidender Bedeutung. Reproduzierbare Strömungsmuster in der Tröpfchenbasierten Mikrofluidik ermöglichen einen wirksamen und gut kontrollierbaren Stofftransport zwischen den Phasen.^[196] Dies macht die Mikrofluidik zu einer geeigneten Methode, um den Einfluss des Stofftransports bei heterogenen Reaktionen zu untersuchen. Ein Beispiel ist die katalytische Hydrierung ungesättigter Aldehyde, an der drei Phasen beteiligt sind: die wässrige Phase mit dem $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{tppts})]$ -Katalysator (tppts = Triphenylphosphantrisulfonat), die organische Phase mit den ungesättigten Aldehyden und die Gasphase bestehend aus H_2 . In den Kapillaren wurden alternierend (Abschnitt 2.6) wässrige Tröpfchen und H_2 -Bläschen in einem organischen Solvens erzeugt, das als Transportflüssigkeit diente (Abbildung 27).^[191] Der Stofftransport zwischen den Phasen wurde

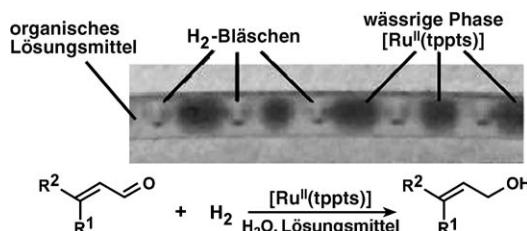


Abbildung 27. Katalytische Mehrphasenreaktion zur Hydrierung ungesättigter Aldehyde durch Anwendung alternierender Tröpfchen/Gasbläschen.^[191] Photographie einer Kapillare (Durchmesser 750 µm), die alternierend H_2 -Bläschen und wässrige Tröpfchen enthält. Ein organisches Lösungsmittel (Toluol oder Hexan) bildet die kontinuierliche Phase, in der der ungesättigte Aldehyd gelöst ist. Wiedergabe aus Lit. [191].

über die Strömungsgeschwindigkeiten und den Kapillardurchmesser gesteuert. Die Studie zeigte, dass der Stofftransport der geschwindigkeitsbestimmende Faktor der Reaktion ist.^[191]

Ein wichtiger Aspekt bei der Optimierung von Reaktionen mit wertvollen Substraten ist die Verringerung des Substanzverbrauchs. Indem die Reaktionen in Ovalkompartimenten ausgeführt werden, lässt sich der Substratverbrauch pro Reaktion auf den Nanoliterbereich reduzieren. Zur Optimierung einer organischen Reaktion^[126] wurde eine Kartusche mit unterschiedlichen Reaktionsbedingungen verwendet

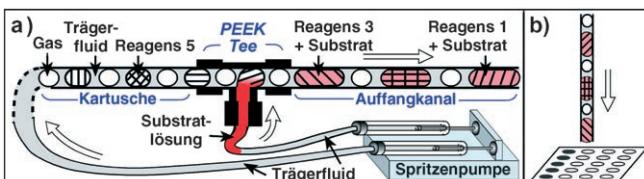


Abbildung 28. Test organischer Reaktionsbedingungen in Ovalkompartimenten mit nachfolgender Analyse mit MALDI-MS.^[126] a) Aufbau für die serielle Zusammenführung von Ovalkompartimenten, die die Reagenzien enthalten, mit der Strömung der Substratlösung. „PEEK Tee“ ist ein kommerziell erhältliches T-Stück. b) Zur Analyse werden die Ovalkompartimente, in denen die Reaktion abläuft, auf eine MALDI-Platte pipettiert. Wiedergabe aus Lit. [126]. Copyright 2006 American Chemical Society.

(Abschnitt 2.2.1) (Abbildung 28), und die Ovalkompartimente aus der Kartusche wurden mit der Substratlösung vereinigt (Abschnitt 2.2.3). Bei der selektiven Desacetylierung des Substrats Hexaacetylouabain ($\text{Ac}_6\text{-OUA}$) wurden weniger als 1 µg $\text{Ac}_6\text{-OUA}$ pro Reaktion benötigt. Anders als bei einem Screening mit Mikrotiterplatten benötigt das Mikrofluidiksystem nur zwei Injektionspumpen für die Steuerung der Strömungen. Zudem tritt keine Verdampfung auf. Zur Analyse der nanolitergroßen Tröpfchen wurde die MALDI-Massenspektrometrie als halbquantitative Detektionsmethode eingesetzt (Abbildung 28b).^[126]

3.3.2. Synthese monodisperser Nanopartikel

Bei der Synthese von monodispersen Polymeren und Nanopartikeln ist die Kenntnis der kinetischen Parameter sowie eine genaue Kontrolle der Reaktionszeit erforderlich. Die Kompartimentierung und schnelle Durchmischung (Abschnitt 2.3) in einem Mikrofluidiksystem stellt einen definierten Reaktionsbeginn und eine enge Verteilung der Verweildauer sicher. Auf diese Weise gelang z.B. die Synthese von Kieselgelpartikeln mit einheitlicher Größe in flüssigen Zylinderkompartimenten.^[192] Durch Variieren der Strömungsgeschwindigkeit und damit der Verweildauer konnte die Größe der Nanopartikel eingestellt werden (Abbildung 29).^[48, 129, 192] Eine reproduzierbare Synthese von CdSe-Nanopartikeln bei erhöhten Temperaturen gelang mit Mikrofluidikeinheiten in Oval-^[116a] und Zylinderkompartimenten.^[116b]

Eine mehrstufige Synthese von CdS- und CdS/CdSe-Kern-Schale-Nanopartikeln wurde in den Ovalkompartimenten.^[116b]

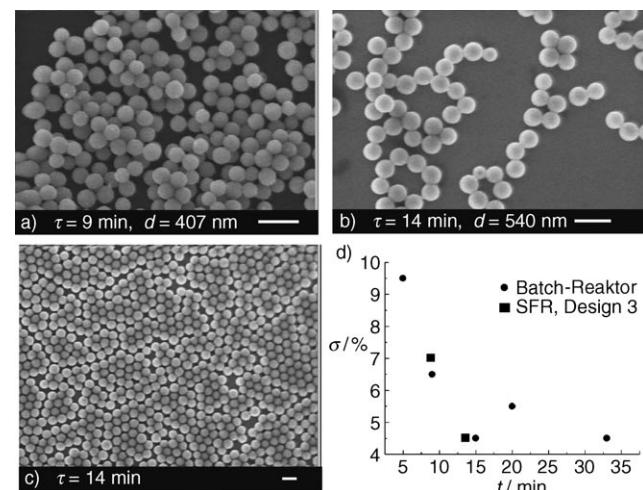


Abbildung 29. Synthese monodisperser Kieselgelpartikel in einem Reaktor mit segmentierter Strömung (segmented-flow reactor, SFR).^[192] Unterschiedliche Verweilzeiten τ [min] führten zu Kieselgelpartikeln mit unterschiedlichen mittleren Durchmessern d_{avg} [nm]. Abgebildet sind Rasterelektronenmikroskopie (REM)-Aufnahmen für a) $\tau = 9$ min, $d_{\text{avg}} = 407$ nm und b) $\tau = 14$ min, $d_{\text{avg}} = 540$ nm. c) REM-Bild der in (b) gezeigten Probe mit geringerer Vergrößerung. d) Standardabweichung σ des mittleren Durchmessers als Funktion von τ für Partikel, die mit einem SFR oder einem Batch-Reaktor erzeugt wurden. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [192]. Copyright 2004 American Chemical Society.

menten einer PDMS-Mikrofluidikeinheit ausgeführt. Es wurden mehr Nanopartikel erzeugt, wenn ein Abfangreagens über einen Seitenkanal zugegeben wurde (Abschnitt 2.2.3) (Abbildung 30).^[129] Auch die Synthese von Partikeln mit Kern-Schale-Struktur wurde durch die Zugabe eines Abfangreagens ermöglicht.

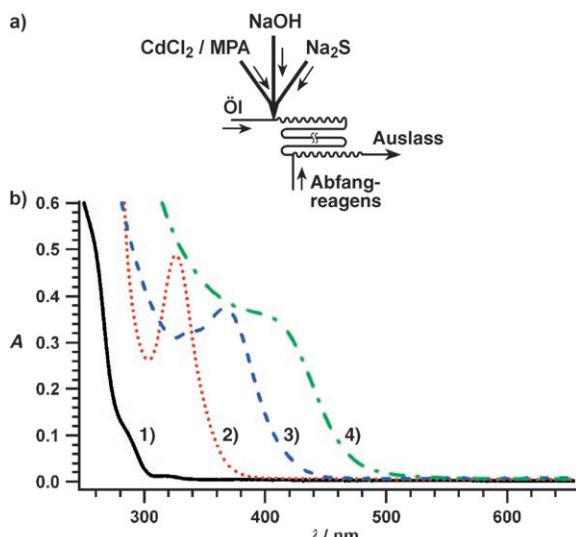


Abbildung 30. Mehrstufige Synthese von Nanopartikeln in Mikrofluidiktröpfchen im Millisekundenbereich.^[129] a) Experimenteller Aufbau. b) UV/Vis-Spektren von vier Arten von CdS-Nanopartikeln; Synthesebedingungen: 1) CdCl₂/Na₂S 20:1, Abfangreagens Methylpropionsäure (MPA) (schwarz); 2) CdCl₂/Na₂S 10:1, Abfangreagens MPA (rot); 3) CdCl₂/Na₂S 1:1, Abfangreagens Na₂S (blau). 4) CdS/CdSe-Kern-Schale-Nanopartikel, synthetisiert mit CdCl₂/Na₂S 1:1 und Abfangreagens Na₂Se (grün). Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [129]. Copyright 2004 The Royal Society of Chemistry.

3.3.3. Synthese von Mikropartikeln mit maßgeschneideter Morphologie

Die Möglichkeit, Mikropartikel mit einheitlich maßgeschneiderter Morphologie herstellen zu können, ist eine wichtige Voraussetzung für Anwendungen im Wirkstofftransport, in elektro-optischen Funktionseinheiten und in der Katalyse.^[193] Die meisten Methoden zur Herstellung solcher Partikel^[117,194] sind entweder teuer oder speziell auf eine bestimmte Partikel sorte zugeschnitten und nicht allgemein einsetzbar.^[195] Da Tröpfchen in Mikrofluidikeinheiten mit einheitlicher Größe und Form erzeugt werden können, wurden sie als Mikroreaktoren zur Selbstorganisation von Gel-Emulsionen^[196] und von Kolloidpartikeln in dreidimensionalen^[197] und periodischen zweidimensionalen^[198] Strukturen untersucht. Das „Einfrieren“ dieser einheitlichen Tröpfchen durch Grenzflächenpolymerisation oder Verfestigung der Volumenphase ist eine erfolgversprechende Methode für die Synthese von Mikropartikeln mit maßgeschneiderter Form.

Mit einer Mikrofluidikeinheit zur axialsymmetrischen Strömungsfokussierung wurden einheitliche Kapseln synthetisiert (Abbildung 31 a). Dabei bestand die disperse Phase aus einer wässrigen Lösung von 1,6-Hexandiamin und die konti-

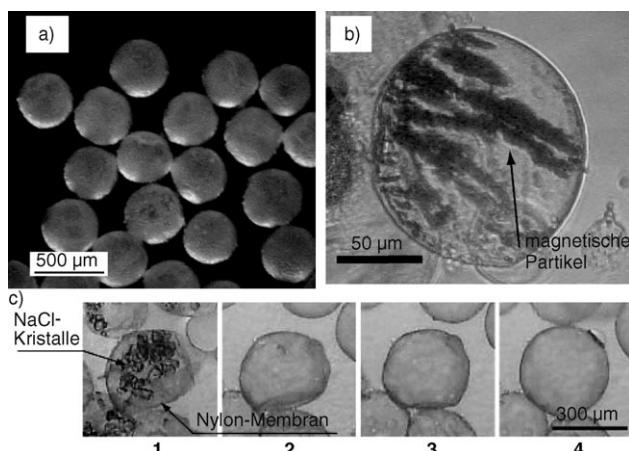


Abbildung 31. Herstellung von Nylon-beschichteten wässrigen Tröpfchen durch Grenzflächenpolymerisation an der Flüssig-flüssig-Grenzfläche der Tröpfchen.^[117] a) Kapseln mit einer engen Größenverteilung wurden mithilfe einer Mikrofluidikeinheit mit axialsymmetrischer Strömungsfokussierung hergestellt. b) Es können Kapseln hergestellt werden, die magnetische Partikel enthalten, die sich im Magnetfeld ausrichten. c) Mit NaCl versetzte Kapseln werden bei Zugabe von Ethanol dehydratisiert (Bild 1). Wenn Ethanol gegen Wasser austauscht wird, beginnt die Membran zu quellen (Bilder 2–4). Nach 30 s ist die Kapsel vollständig gequollen (Bild 4). Wiedergabe aus Lit. [117].

nuierliche Phase aus Hexadecan mit Adipoylchlorid.^[117] Bei der Polymerisation von 1,6-Hexandiamin und Adipoylchlorid an der Grenzfläche zwischen der wässrigen und der Hexadecan-Phase wurde eine semipermeable Membran (Abbildung 31 c) aus Nylon-6,6 gebildet, die die Tröpfchen der wässrigen Phase umgab.^[117] Durch Justierung der Strömungsgeschwindigkeiten der dispersen und der kontinuierlichen Phase konnte der Durchmesser der Kapseln eingestellt werden. Es ist möglich, die Kapseln zu funktionalisieren, indem Mikro- oder Nanopartikel der dispersen Phase zugesetzt werden. Zum Beispiel wurden superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel der wässrigen Lösung zugesetzt, und die erhaltenen Kapseln konnten dann mit einem Magnetfeld angesteuert werden (Abbildung 31 b).^[117] Semipermeable Polyamidkapseln wurden mithilfe einer tröpfchenerzeugenden Einheit synthetisiert, die ohne Mikrofabrikationsmethoden hergestellt wurde.^[112] Hefezellen wurden in Tröpfchen verkapselt, indem für die Kapselbildung die äußere Schale der Tröpfchen polymerisiert wurde.^[199]

Feste Partikel mit maßgeschneiderter Form können in zwei Schritten hergestellt werden, indem zuerst in Mikrofluidikeinheiten einheitliche Tröpfchen mit der gewünschten Form erzeugt werden und dann der Inhalt der Tröpfchen verfestigt wird. Diese Methode lässt sich allgemein zur Herstellung von Mikropartikeln verschiedener Materialien einsetzen, denn die Morphologie der Tröpfchen wird nur von den physikalischen Eigenschaften der Flüssigkeiten und von den Betriebsbedingungen (Strömungsgeschwindigkeiten und Geometrie der Mikrofluidikeinheit) bestimmt. Wenn die Strömungsgeschwindigkeit erhöht wird, nimmt das Tröpfchenvolumen zu, und die Tröpfchenform verändert sich von einer kugelförmigen zu einer asphärischen Form, die die Wände des Mikrokanals berührt. Die Verfestigung der

Tröpfchen erfolgt durch photoinduzierte Polymerisation, thermisch induzierte Gelbildung oder Flüssig-fest-Phasenübergänge. Mit dieser Vorgehensweise wurden monodisperse Partikel mit verschiedenen Morphologien (sphärisch, zylindrisch und stäbchenförmig) hergestellt (Abbildung 32).^[194]

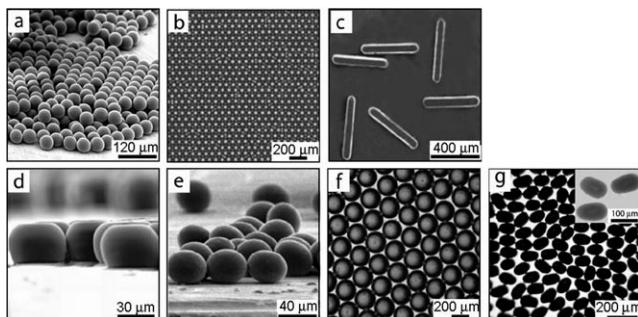


Abbildung 32. Monodisperse Partikel mit maßgeschneiderter Form und Größe, die in Mikrofluidiktröpfchen erzeugt wurden (Mikroskop-aufnahmen).^[194] a) Polymermikrokugeln, b) Kristall aus Polymermikrokugeln, c) Polymerstäbchen, d) Polymerscheiben, e) Polymerellipsoide, f) Agarosescheiben, g) Ellipsoide aus Bismutlegierung. Wiedergabe aus Lit. [194].

Mit ähnlichen oder modifizierten Methoden wurden monodisperse Polymerpartikel mit unterschiedlichen Funktionalitäten erzeugt, z. B. Partikel mit asphärischen Formen,^[200] molekular geprägte Polymerkügelchen,^[201] Kern-Schale-Strukturen,^[195] Partikel, die immobilisierte Biokatalysatoren enthielten,^[202] zweifarbige Kügelchen^[203,204] und Partikel aus biologisch abbaubaren Mikrogelen.^[205]

Tröpfchen, die wiederum kleinere Tröpfchen enthalten, werden als Doppelmulsionen bezeichnet; sie finden vielfältige Anwendungen in Bereichen wie der Lebensmitteltechnologie bis zur Pharmazeutik.^[206] Monodisperse Doppel-mulsionen und Kern-Schale-Strukturen mit verschiedenen Größen und Zusammensetzungen wurden mithilfe der tröpfchenbasierten Mikrofluidik hergestellt.^[206–208] Doppel-mulsionen, deren Tröpfchen jeweils zwei Tröpfchen mit unterschiedlichem Inhalt enthielten, wurden mithilfe alternierender Tröpfchenströme erzeugt (Abschnitt 2.6) (Abbildung 33).

3.4. Aufbau funktionaler Reaktionsnetzwerke

Viele biologische Funktionen (z.B. Selbstregulation, Energieumwandlung und Signalverstärkung) beruhen auf Netzwerken aus miteinander wechselwirkenden enzymatischen Reaktionen. Solche funktionalen Netzwerke aus chemischen Reaktionen sind Nichtgleichgewichtssysteme, und ihr Aufbau ist ein interessantes und schwieriges Problem. Mikrofluidiktröpfchen bieten eine Möglichkeit, Reaktionen fern vom Gleichgewichtszustand zu halten, indem über die Flüssigkeitsströmungen Reagentien zugeführt oder Produkte entfernt werden. Auch können Reaktionen so gesteuert werden, dass sie „zur rechten Zeit am rechten Ort“ ablaufen.

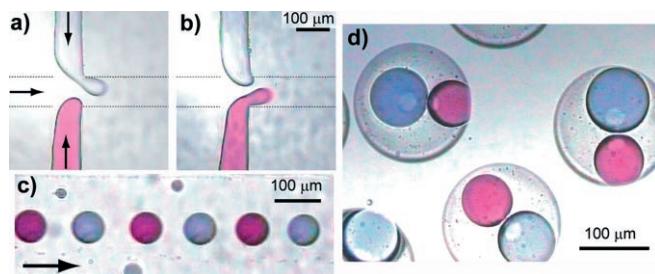


Abbildung 33. Erzeugung von Doppelmulsionen durch Verkapselung alternierender Tröpfchen.^[206] Alternierende rote und blaue Tröpfchen wurden erzeugt (a, b) und durch einen Mikrokanal (c) zu einer weiteren Kreuzung transportiert, an der die Doppelmulsionströpfchen gebildet werden, die jeweils ein rotes und ein blaues Tröpfchen enthalten (d). Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [206]. Copyright 2004 American Chemical Society.

Ein Reaktionsnetzwerk, das eine Signalverstärkungsfunktion mit einem Schwellenansprechverhalten aufweist, wurde mithilfe von Mikrofluidiktröpfchen realisiert. Dazu wurde eine autokatalytische Reaktion in unterschiedliche Ovalkompartimente aufgeteilt, die dazu dienten, die Wechselwirkungen zwischen den Reaktionen zu kontrollieren. Die Oxidation eines Co^{3+} -Komplexes mit KHSO_5 erzeugt Co^{2+} -Ionen, die die Reaktion und damit ihre eigene Bildung katalysieren (Abbildung 34 a).^[163] Hierbei führt die Oxidation des Liganden zur Dissoziation des Komplexes und zur Freisetzung des instabilen Co^{3+} -Ions, das durch die Nebenprodukte der Ligandenoxidation reduziert wird. Ohne Co^{2+} -Ionen verläuft die Reaktion mit einer sehr geringen Anfangsgeschwindigkeit, allerdings ist die Reaktionsmischung nicht im Gleichgewicht. Da die Reaktion autokatalytisch ist, führt ein allmäßlicher Anstieg der Konzentration $[\text{Co}^{2+}]$ auf ein bestimmtes Niveau zu einer raschen Beschleunigung der Reaktion und zu einer vollständigen Umsetzung innerhalb einer kurzen Zeit. Die Zeit, die für die vollständige Umsetzung des Co^{3+} -Komplexes zu Co^{2+} -Ionen benötigt wird, nimmt daher mit zunehmender Anfangskonzentration von $[\text{Co}^{3+}]$ ab.

Das Netzwerk wurde mit zwei aufeinander folgenden Stufen aufgebaut, wobei sowohl der Zufluss als auch der Auslass Lösungen von Co^{2+} -Ionen enthielten (Abbildung 34 b).^[163] In der ersten Stufe wurden kleine Ovalkompartimente erzeugt, in denen die Co^{2+} -haltige Zuflusslösung mit einer KHSO_5 -Lösung und einer Lösung des Co^{3+} -Komplexes kombiniert wurde (Abbildung 34 b, linke Mikrophotographie). Die Ovalkompartimente wurden für eine festgelegte Zeitdauer durch einen kleinen Mikrokanal transportiert, der in einen zweiten, größeren Mikrokanal mündet. In dem zweiten Mikrokanal befinden sich große Ovalkompartimente, die aus zusätzlichen Strömungen mit Lösungen des Co^{3+} -Komplexes und KHSO_5 erzeugt wurden. Mehrere der kleinen Ovalkompartimente aus dem ersten Kanal wurden mit einem großen Ovalkompartiment aus dem zweiten Kanal vereinigt (Abschnitt 2.5). Die zweite Stufe der Reaktion wurde in den großen Ovalkompartimenten beobachtet, die durch den zweiten Kanal transportiert wurden (Abbildung 34 b, rechte Mikrophotographie). Die Strömungsgeschwindigkeit im ersten Mikrokanal und dessen Länge be-

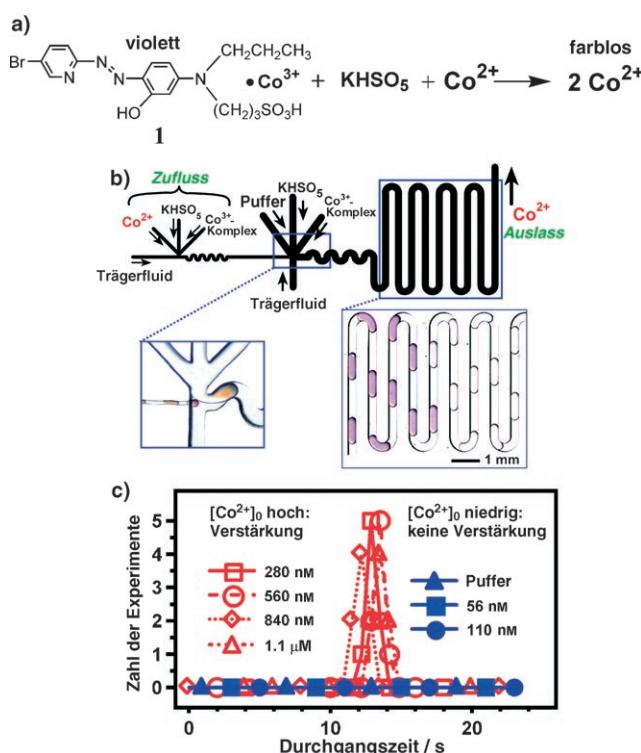


Abbildung 34. Signalverstärkung durch ein Reaktionsnetzwerk, das auf einem tröpfchenbasierten Mikrofluidiksystem beruht.^[163] a) Autokatalytische Bildung von Co^{2+} aus einem Co^{3+} -Komplex 1. b) Aufbau der Mikrofluidikeinheit für eine zweistufige Verstärkung. Die erste Stufe der Reaktion läuft in den engeren Kanälen und die zweite Stufe in den breiteren Kanälen ab. Links: Mikrophotographie der Kreuzung, an der die kleineren Tröpfchen, die eine rote Lösung enthalten, mit den größeren Tröpfchen vereinigt werden. Rechts: Mikrophotographie der Ovalkompartimente, die die autokatalytische Reaktionsmischung enthalten. Der plötzliche Farbwechsel zeigt die Umwandlung des violetten Co^{3+} -Komplexes 1 zu den farblosen Co^{2+} -Ionen an. c) Solange die Konzentration $[\text{Co}^{2+}]_0$ unter einem Schwellenwert liegt (110 nm und darüber) reicht die Zeit nicht aus, um in der ersten Stufe in den Ovalkompartimenten in den kleineren Kanälen weitere Co^{2+} -Ionen zu bilden. Die Eingangskonzentration $[\text{Co}^{2+}]_0$ wird daher in der ersten Stufe nicht verstärkt und bei der zweiten Vereinigung durch Verdünnung weiter verringert. In diesem Fall wird in der zweiten Stufe kein Antwortsignal beobachtet (blaue Symbole). Liegt die Konzentration $[\text{Co}^{2+}]_0$ oberhalb eines Schwellenwerts (280 nm oder größer), läuft die Reaktion in den kleinen Tröpfchen der ersten Stufe ab, wobei genügend Co^{2+} -Ionen gebildet werden, um die Reaktion in der zweiten Stufe zu initiieren, sodass dort ein Antwortsignal beobachtet wird (rote Symbole). Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [163]. Copyright 2004 American Chemical Society.

stimmten die Zeitspanne, nach der die kleinen Ovalkompartimente mit den großen Kompartimenten vereinigt wurden. Dieses Reaktionsnetzwerk zeigte ein Schwellenantwortverhalten hinsichtlich der Anfangskonzentration von $[\text{Co}^{2+}]$: Nur die $[\text{Co}^{2+}]$ -Anfangskonzentrationen, die oberhalb eines bestimmten Schwellenwertes lagen, wurden verstärkt (Abbildung 34c).^[163]

Dieses Netzwerk ist eine Nachbildung von biochemischen Netzwerken,^[163] die der Verstärkung des Sehvermögens und der Signalübertragung dienen. Die zugrundeliegenden Prinzipien ähneln denen von biochemischen Netzwerken: 1) ein metastabiler, kinetisch eingefrorener Zustand; 2) ein

Schwellenansprechverhalten, das diesen Nichtgleichgewichtszustand stabilisiert, solange die Anfangskonzentration des Autokatalysators unterhalb des Schwellenwertes liegt, sodass das Netzwerk unempfindlich gegen Konzentrationsrauschen ist; 3) mehrfache Verstärkungsstufen zur Vergrößerung der Gesamtverstärkung. Die Anwendung der tröpfchenbasierten Mikrofluidik war ein entscheidender Faktor für die Realisierung dieses Systems, denn sie ermöglichte sowohl die Zuflusskontrolle der Reagentien für die Implementierung des ersten Prinzips als auch die Zeitkontrolle für die Implementierung des zweiten und dritten Prinzips. Praktische Anwendungen dieses Netzwerks könnten in der Detektion von autokatalytischen Spezies und möglicherweise in der Steuerung der Keimbildung bei der Proteinkristallisation liegen.

4. Schlussfolgerungen und Ausblick

Für chemische Reaktionen in Tröpfchen wurden eine Reihe von Techniken entwickelt, mit denen die Zugabe, die Durchmischung und der Transport von Reagentien, die Kontrolle des Grenzflächenverhaltens der Tröpfchen und die Analyse der Reaktionen möglich ist. Auf der Grundlage dieser Techniken wurden viele Arten von Reaktionen und Prozessen miniaturisiert, darunter Enzymassays, Protein-Kristallisationen, organische Synthesen und Partikelsynthesen. Speziell zur Herstellung von Partikeln wurden einige besondere Eigenschaften von Tröpfchen genutzt, z.B. ihre einstellbare Morphologie.

Es gibt genügend Spielraum für weitere Verbesserungen in der tröpfchenbasierten Mikrofluidik, sowohl was den Aufbau der Funktionseinheiten als auch die Fluidsteuerung betrifft. Einige Punkte betreffen das gesamte Gebiet der Mikrofluidik. Beispiele sind die Entwicklung neuer Materialien für Funktionseinheiten mit bestimmten Eigenschaften, die Entwicklung von Techniken zur Oberflächenmodifizierung und für Analysen mit höherer Empfindlichkeit und Genauigkeit sowie der Entwurf von integrierten Mikrofluidikeinheiten. Andere Aufgaben betreffen speziell die Tröpfchenhandhabung, z.B. eine automatisierte Steuerung sehr vieler Tröpfchen.

Zu den aktuellen Fortschritten zählen Methoden, die mithilfe von Elektrobenetzung (electrowetting on dielectric, EWOD)^[71–74] und dielektrophoretischen^[167] und elektrischen Kräften^[170] eine aktive Kontrolle der Tröpfchen ermöglichen. Ein Beispiel für neue Materialien in der Mikrofluidik ist „flüssiges Teflon“.^[209] Diese Entwicklungen werden weitere Anwendungen ermöglichen. Insbesondere werden neue Analysemethoden mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung eine wesentliche Voraussetzung für die Untersuchung von Reaktionen und Reaktionsnetzwerken sein.^[210]

Die grundlegenden Eigenschaften von Tröpfchen sind seit einigen Jahren gut verstanden, allerdings kann ihr Verhalten auch schnell kompliziert werden.^[35, 99, 211] Ein besseres Verständnis dieser Phänomene ist das Ziel laufender Forschungsarbeiten.^[143, 163, 183, 212] Neue tröpfchenbasierte Techniken werden für viele Wissenschaftsbereiche von Nutzen sein. Hier diskutierte Beispiele umfassen funktionale Reaktionsnetzwerke^[163] und die Untersuchung des Einflusses der

Durchmischung auf die Keimbildung bei der Proteinkristallisation.^[183] Diese und zahlreiche weitere Beispiele – wie die Analyse von Druckänderungen, die durch den Transport von unterschiedlichen Zellen durch Mikrofluidikkanäle verursacht werden,^[212,213] die Herstellung asphärischer Bläschen mithilfe „kolloidaler Rüstungen“^[214] und das Verständnis der nichtlinearen Dynamik in einem Bläschengenerator^[99] – legen nahe, dass auf Mikrofluidiktröpfchen basierende Techniken auch weiterhin zu wissenschaftlichen Fortschritten führen werden.

Addendum (16. Oktober 2006)

Reaktionen in Tröpfchen in Mikrokanälen etablieren sich zusehends als Standardverfahren der Mikrofluidik,^[215–217] und seit Einreichen dieses Aufsatzes wurden einige weitere Beiträge veröffentlicht. Diese Publikationen befassen sich mit neuen Techniken und Funktionseinheiten wie der Tröpfchenbildung,^[218–221] der Tröpfchensteuerung,^[222] dem Verschmelzen von Tröpfchen,^[223,224] Mikrofluidik-Viskosimetern^[225] und Messgeräten für die Grenzflächenspannung^[226] und der Analyse von Tröpfchen mit Raman-Spektroskopie.^[227,228] Die neuen Anwendungen reichen von der Synthese von Mikropartikeln^[229–231] und -kapseln^[232–234] über die Beschleunigung von Reaktionen^[235] bis hin zur Steuerung von Keimbildung und Wachstum von Proteinkristallen.^[236] Grundlegende Untersuchungen zum Druckabfall beim Tröpfchenfluss^[237] und zu den physikalischen Gesetzmäßigkeiten der Bildung^[238] und Organisation^[239] von Bläschen fallen auch in diesen Zeitraum.

Die Forschungsarbeiten in unserem Laboratorium wurden durch die NIH (National Institute for Biomedical Imaging and Bioengineering R01 EB001903 und National Institute of General Medical Sciences R01 GM075827), das Beckman Young Investigator Program und den DuPont Young Professor Award unterstützt. Wir danken Joshua D. Tice für die Bilder in Abbildung 9 und allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe für ihre hier beschriebenen Arbeiten. Unseren Kollegen im Bereich der tröpfchenbasierten Mikrofluidik danken wir für die Überlassung von Abbildungen und wertvolle Hinweise.

Eingegangen am 19. April 2006,
veränderte Fassung am 4. Juli 2006
Übersetzt von Dr. Christian Bahr, Schildow

- [1] H. Song, J. D. Tice, R. F. Ismagilov, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 792–796; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 768–772.
- [2] K. Jähnisch, V. Hessel, H. Löwe, M. Baerns, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 410–451; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 406–446.
- [3] T. Dwars, E. Paetzold, G. Oehme, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7338–7364; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7174–7199.
- [4] P. Watts, S. J. Haswell, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 235–246.
- [5] P. Watts, S. J. Haswell, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 380–387.
- [6] Y. N. Xia, G. M. Whitesides, *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1998**, *28*, 153–184.
- [7] B. Xu, F. Arias, S. T. Brittain, X. M. Zhao, B. Grzybowski, S. Torquato, G. M. Whitesides, *Adv. Mater.* **1999**, *11*, 1186–1189.
- [8] D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4974–4984.
- [9] J. C. McDonald, D. C. Duffy, J. R. Anderson, D. T. Chiu, H. K. Wu, O. J. A. Schueller, G. M. Whitesides, *Electrophoresis* **2000**, *21*, 27–40.
- [10] J. C. McDonald, G. M. Whitesides, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 491–499.
- [11] P. S. Dittrich, A. Manz, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 210–218.
- [12] M. F. Templin, D. Stoll, M. Schrenk, P. C. Traub, C. F. Vohringer, T. O. Joos, *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 160–166.
- [13] M. C. Pirrung, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 473–488.
- [14] P. O. Brown, D. Botstein, *Nat. Genet.* **1999**, *21*, 33–37.
- [15] M. H. J. Ohlmeyer, R. N. Swanson, L. W. Dillard, J. C. Reader, G. Asouline, R. Kobayashi, M. Wigler, W. C. Still, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10922–10926.
- [16] K. S. Lam, M. Lebl, V. Krchnak, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 411–448.
- [17] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091–2157.
- [18] K. Braeckmans, S. C. De Smedt, M. Leblans, R. Pauwels, J. Demeester, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 447–456.
- [19] N. H. Finkel, X. H. Lou, C. Y. Wang, L. He, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 353A–359A.
- [20] T. Thorsen, S. J. Maerkli, S. R. Quake, *Science* **2002**, *298*, 580–584.
- [21] J. W. Hong, S. R. Quake, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1179–1183.
- [22] C. C. Lee, G. D. Sui, A. Elizarov, C. Y. J. Shu, Y. S. Shin, A. N. Dooley, J. Huang, A. Daridon, P. Wyatt, D. Stout, H. C. Kolb, O. N. Witte, N. Satyamurthy, J. R. Heath, M. E. Phelps, S. R. Quake, H. R. Tseng, *Science* **2005**, *310*, 1793–1796.
- [23] J. S. Marcus, W. F. Anderson, S. R. Quake, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 956–958.
- [24] C. L. Hansen, M. O. A. Sommer, S. R. Quake, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 14431–14436.
- [25] C. L. Hansen, E. Skordalakes, J. M. Berger, S. R. Quake, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16531–16536.
- [26] C. L. Hansen, S. Classen, J. M. Berger, S. R. Quake, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3142–3143.
- [27] F. K. Balagadde, L. C. You, C. L. Hansen, F. H. Arnold, S. R. Quake, *Science* **2005**, *309*, 137–140.
- [28] G. C. Randall, P. S. Doyle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 10813–10818.
- [29] R. B. Bird, W. E. Stewart, E. N. Lightfoot, *Transport Phenomena*, Wiley, New York, **2002**.
- [30] G. I. Taylor, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **1953**, *219*, 186–203.
- [31] V. Dolnik, *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3589–3601.
- [32] D. Belder, M. Ludwig, *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3595–3606.
- [33] B. Zheng, J. D. Tice, R. F. Ismagilov, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 1365–1368.
- [34] B. Zheng, J. D. Tice, L. S. Roach, R. F. Ismagilov, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2562–2565; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2508–2511.
- [35] T. Thorsen, R. W. Roberts, F. H. Arnold, S. R. Quake, *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 4163–4166.
- [36] T. Nisisako, T. Torii, T. Higuchi, *Lab Chip* **2002**, *2*, 24–26.
- [37] J. D. Tice, H. Song, A. D. Lyon, R. F. Ismagilov, *Langmuir* **2003**, *19*, 9127–9133.
- [38] J. D. Tice, A. D. Lyon, R. F. Ismagilov, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *507*, 73–77.
- [39] H. J. Liu, M. Nakajima, T. Kimura, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2004**, *81*, 705–711.
- [40] H. Song, M. R. Bringer, J. D. Tice, C. J. Gerdts, R. F. Ismagilov, *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *83*, 4664–4666.
- [41] B. Zheng, J. D. Tice, R. F. Ismagilov, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4977–4982.
- [42] B. Zheng, R. F. Ismagilov, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2576–2579; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2520–2523.

- [43] L. S. Roach, H. Song, R. F. Ismagilov, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 785–796.
- [44] H. Song, R. F. Ismagilov, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14613–14619.
- [45] A. Liau, R. Kamik, A. Majumdar, J. H. D. Cate, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 7618–7625.
- [46] A. Günther, M. Jhunjhunwala, M. Thalmann, M. A. Schmidt, K. F. Jensen, *Langmuir* **2005**, *21*, 1547–1555.
- [47] P. M. Günther, F. Möller, T. Henkel, J. M. Köhler, G. A. Groß, *Chem. Eng. Technol.* **2005**, *28*, 520–527.
- [48] A. Günther, S. A. Khan, M. Thalmann, F. Trachselt, K. F. Jensen, *Lab Chip* **2004**, *4*, 278–286.
- [49] N. de Mas, A. Günther, M. A. Schmidt, K. F. Jensen, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2003**, *42*, 698–710.
- [50] K. Hosokawa, T. Fujii, I. Endo, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4781–4785.
- [51] M. A. Burns, B. N. Johnson, S. N. Brahmasandra, K. Handique, J. R. Webster, M. Krishnan, T. S. Sammarco, P. M. Man, D. Jones, D. Heldsinger, C. H. Mastrangelo, D. T. Burke, *Science* **1998**, *282*, 484–487.
- [52] C. J. Patton, S. R. Crouch, *Anal. Chim. Acta* **1986**, *179*, 189–201.
- [53] K. K. Stewart, *Anal. Chem.* **1983**, *55*, A931–A934.
- [54] B. Rocks, C. Riley, *Clin. Chem.* **1982**, *28*, 409–421.
- [55] K. K. Stewart, *Talanta* **1981**, *28*, 789–797.
- [56] L. T. Skeggs, H. Hochstrasser, *Clin. Chem.* **1964**, *10*, 918–936.
- [57] M. P. Pilani, *Adv. Colloid Interface Sci.* **1993**, *46*, 139–163.
- [58] „Microemulsion polymerizations and reactions“: P. Y. Chow, L. M. Gan in *Polymer Particles*, Vol. 175, Springer, Berlin, **2005**, S. 257–298.
- [59] „Miniemulsions for nanoparticle synthesis“: K. Landfester in *Colloid Chemistry II*, Vol. 227, Springer, Berlin, **2003**, S. 75–123.
- [60] C. S. Peyratout, L. Dähne, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3850–3872; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3762–3783.
- [61] A. Aharoni, A. D. Griffiths, D. S. Tawfik, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 210–216.
- [62] K. Bernath, M. T. Hai, E. Mastrobattista, A. D. Griffiths, S. Magdassi, D. S. Tawfik, *Anal. Biochem.* **2004**, *325*, 151–157.
- [63] M. S. Long, C. D. Jones, M. R. Helfrich, L. K. Mangeney-Slavin, C. D. Keating, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 5920–5925.
- [64] V. Noireaux, A. Libchaber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 17669–17674.
- [65] D. T. Chiu, C. F. Wilson, F. Ryttse, A. Stromberg, C. Farre, A. Karlsson, S. Nordholm, A. Gaggar, B. P. Modi, A. Moscho, R. A. Garza-Lopez, O. Orwar, R. N. Zare, *Science* **1999**, *283*, 1892–1895.
- [66] S. Sugiura, N. Kumazawa, S. Iwamoto, T. Oda, M. Satake, M. Nakajima, *Kagaku Kogaku Ronbunshu* **2004**, *30*, 129–134.
- [67] S. Sugiura, M. Nakajima, M. Seki, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2002**, *41*, 4043–4047.
- [68] S. Sugiura, M. Nakajima, J. H. Tong, H. Nabetani, M. Seki, *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *227*, 95–103.
- [69] A. D. Dinsmore, M. F. Hsu, M. G. Nikolaides, M. Marquez, A. R. Bausch, D. A. Weitz, *Science* **2002**, *298*, 1006–1009.
- [70] I. G. Loscertales, A. Barrero, I. Guerrero, R. Cortijo, M. Marquez, A. M. Ganan-Calvo, *Science* **2002**, *295*, 1695–1698.
- [71] M. G. Pollack, A. D. Shenderov, R. B. Fair, *Lab Chip* **2002**, *2*, 96–101.
- [72] M. G. Pollack, R. B. Fair, A. D. Shenderov, *Appl. Phys. Lett.* **2000**, *77*, 1725–1726.
- [73] S. K. Cho, H. J. Moon, C. J. Kim, *J. Microelectromech. Syst.* **2003**, *12*, 70–80.
- [74] J. Lee, H. Moon, J. Fowler, T. Schoellhammer, C. J. Kim, *Sens. Actuators A* **2002**, *95*, 259–268.
- [75] O. D. Velev, B. G. Prevo, K. H. Bhatt, *Nature* **2003**, *426*, 515–516.
- [76] F. Mugele, J. C. Baret, *J. Phys. Condens. Matter* **2005**, *17*, R705–R774.
- [77] H. Ding, K. Chakrabarty, R. B. Fair, *IEEE Trans. Comput.-Aided Des. Integr. Circuits Syst.* **2001**, *20*, 1463–1468.
- [78] T. H. Zhang, K. Chakrabarty, R. B. Fair, *IEEE Trans. Comput.-Aided Des. Integr. Circuits Syst.* **2004**, *23*, 843–858.
- [79] A. R. Wheeler, H. Moon, C. J. Kim, J. A. Loo, R. L. Garrell, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4833–4838.
- [80] A. R. Wheeler, H. Moon, C. A. Bird, R. R. O. Loo, C. J. Kim, J. A. Loo, R. L. Garrell, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 534–540.
- [81] Z. Guttenberg, H. Müller, H. Habermüller, A. Geisbauer, J. Pipper, J. Felbel, M. Kielpinski, J. Scriba, A. Wixforth, *Lab Chip* **2005**, *5*, 308–317.
- [82] V. Srinivasan, V. K. Pamula, R. B. Fair, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *507*, 145–150.
- [83] T. Taniguchi, T. Torii, T. Higuchi, *Lab Chip* **2002**, *2*, 19–23.
- [84] J. R. Millman, K. H. Bhatt, B. G. Prevo, O. D. Velev, *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 98–102.
- [85] A. D. McNaught, A. Wilkinson, *Compendium of Chemical Terminology: IUPAC Recommendations*, 2. Aufl., Blackwell, Malden, **1997**.
- [86] J. S. Kuo, P. Spicar-Mihalic, I. Rodriguez, D. T. Chiu, *Langmuir* **2003**, *19*, 250–255.
- [87] H. Moon, S. K. Cho, R. L. Garrell, C. J. Kim, *J. Appl. Phys.* **2002**, *92*, 4080–4087.
- [88] M. Y. He, J. S. Kuo, D. T. Chiu, *Appl. Phys. Lett.* **2005**, *87*, 031916.
- [89] N. Pekas, M. D. Porter, M. Tondra, A. Popple, A. Jander, *Appl. Phys. Lett.* **2004**, *85*, 4783–4785.
- [90] I. F. Lyuksyutov, D. G. Naugle, K. D. D. Rathnayaka, *Appl. Phys. Lett.* **2004**, *85*, 1817–1819.
- [91] K. T. Kotz, K. A. Noble, G. W. Faris, *Appl. Phys. Lett.* **2004**, *85*, 2658–2660.
- [92] N. Garnier, R. O. Grigoriev, M. F. Schatz, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *91*, 054501.
- [93] S. Daniel, M. K. Chaudhury, P. G. de Gennes, *Langmuir* **2005**, *21*, 4240–4248.
- [94] P. Aussillous, D. Quere, *Nature* **2001**, *411*, 924–927.
- [95] M. Fialkowski, A. Bitner, B. A. Grzybowski, *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 93–97.
- [96] M. T. Kreutzer, F. Kapteijn, J. A. Moulijn, J. J. Heiszwolf, *Chem. Eng. Sci.* **2005**, *60*, 5895–5916.
- [97] A. M. Ganan-Calvo, J. M. Gordillo, *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *87*, 274501.
- [98] P. Garstecki, I. Gitlin, W. DiLuzio, G. M. Whitesides, E. Kurnacheva, H. A. Stone, *Appl. Phys. Lett.* **2004**, *85*, 2649–2651.
- [99] P. Garstecki, M. J. Fuerstman, G. M. Whitesides, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94*, 234502.
- [100] T. Cubaud, C. M. Ho, *Phys. Fluids* **2004**, *16*, 4575–4585.
- [101] P. Guillot, A. Colin, *Phys. Rev. E* **2005**, *72*, 066301.
- [102] M. Tokeshi, T. Minagawa, K. Uchiyama, A. Hibara, K. Sato, H. Hisamoto, T. Kitamori, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1565–1571.
- [103] M. Goto, K. Sato, A. Murakami, M. Tokeshi, T. Kitamori, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2125–2131.
- [104] J. Kobayashi, Y. Mori, K. Okamoto, R. Akiyama, M. Ueno, T. Kitamori, S. Kobayashi, *Science* **2004**, *304*, 1305–1308.
- [105] B. Zhao, J. S. Moore, D. J. Beebe, *Science* **2001**, *291*, 1023–1026.
- [106] P. J. A. Kenis, R. F. Ismagilov, G. M. Whitesides, *Science* **1999**, *285*, 83–85.
- [107] G. I. Taylor, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **1934**, *146*, 501–523.
- [108] G. I. Taylor, *J. Fluid Mech.* **1961**, *10*, 161–165.
- [109] F. P. Bretherton, *J. Fluid Mech.* **1961**, *10*, 166–188.
- [110] R. E. Thiers, A. H. Reed, K. Delander, *Clin. Chem.* **1971**, *17*, 42–48.

- [111] S. L. Anna, N. Bontoux, H. A. Stone, *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *82*, 364–366.
- [112] E. Quevedo, J. Steinbacher, D. T. McQuade, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10498–10499.
- [113] R. Dreyfus, P. Tabeling, H. Willaime, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *90*, 144505.
- [114] O. Y. Xu, M. Nakajima, *Appl. Phys. Lett.* **2004**, *85*, 3726–3728.
- [115] T. Ward, M. Faivre, M. Abkarian, H. A. Stone, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 3716–3724.
- [116] a) B. K. H. Yen, A. Günther, M. A. Schmidt, K. F. Jensen, M. G. Bawendi, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5583–5587; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5447–5451; b) E. M. Chan, A. P. Alivisatos, R. A. Mathies, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13854–13861.
- [117] S. Takeuchi, P. Garstecki, D. B. Weibel, G. M. Whitesides, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 1067–1072.
- [118] H. A. Stone, A. D. Stroock, A. Ajdari, *Annu. Rev. Fluid Mech.* **2004**, *36*, 381–411.
- [119] J. Atencia, D. J. Beebe, *Nature* **2005**, *437*, 648–655.
- [120] M. Joanicot, A. Ajdari, *Science* **2005**, *309*, 887–888.
- [121] T. M. Squires, S. R. Quake, *Rev. Mod. Phys.* **2005**, *77*, 977–1026.
- [122] L. Kiwi-Minsker, A. Renken, *Catal. Today* **2005**, *110*, 2–14.
- [123] P. Garstecki, M. J. Fuerstman, H. A. Stone, G. M. Whitesides, *Lab Chip* **2006**, *6*, 437–446.
- [124] B. Zheng, C. J. Gerdts, R. F. Ismagilov, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 548–555.
- [125] D. N. Adamson, D. Mustafi, J. X. J. Zhang, B. Zheng, R. F. Ismagilov, *Lab Chip* **2006**, *6*, 1178–1186.
- [126] T. Hatakeyama, D. L. Chen, R. F. Ismagilov, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2518–2519.
- [127] V. Linder, S. K. Sia, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 64–71.
- [128] B. Zheng, L. S. Roach, R. F. Ismagilov, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11170–11171.
- [129] I. Shestopalov, J. D. Tice, R. F. Ismagilov, *Lab Chip* **2004**, *4*, 316–321.
- [130] T. Henkel, T. Bermig, M. Kielpinski, A. Grodrian, J. Metze, J. M. Köhler, *Chem. Eng. J.* **2004**, *101*, 439–445.
- [131] L. Li, J. Boedicker, R. F. Ismagilov, **2006**, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [132] H. Song, H.-W. Li, M. S. Munson, T. G. van Ha, R. F. Ismagilov, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4839–4849.
- [133] I. R. Epstein, *Nature* **1995**, *374*, 321–327.
- [134] J. M. Ottino, S. Wiggins, *Science* **2004**, *305*, 485–486.
- [135] M. R. Bringer, C. J. Gerdts, H. Song, J. D. Tice, R. F. Ismagilov, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **2004**, *362*, 1087–1104.
- [136] J. B. Knight, A. Vishwanath, J. P. Brody, R. H. Austin, *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *80*, 3863–3866.
- [137] A. D. Stroock, S. K. W. Dertinger, A. Ajdari, I. Mezic, H. A. Stone, G. M. Whitesides, *Science* **2002**, *295*, 647–651.
- [138] J. M. Ottino, *The Kinematics of Mixing: Stretching, Chaos, and Transport*, Cambridge University Press, Cambridge, **1989**.
- [139] H. Aref, *J. Fluid Mech.* **1984**, *143*, 1–21.
- [140] K. Handique, M. A. Burns, *J. Micromech. Microeng.* **2001**, *11*, 548–554.
- [141] M. N. Kashid, I. Gerlach, S. Goetz, J. Franzke, J. F. Acker, F. Platte, D. W. Agar, S. Turek, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2005**, *44*, 5003–5010.
- [142] R. O. Grigoriev, *Phys. Fluids* **2005**, *17*, 033601.
- [143] M. Muradoglu, H. A. Stone, *Phys. Fluids* **2005**, *17*, 073305.
- [144] P. Garstecki, M. A. Fischbach, G. M. Whitesides, *Appl. Phys. Lett.* **2005**, *86*, 244108.
- [145] W. Salman, P. Angeli, A. Gavriilidis, *Chem. Eng. Technol.* **2005**, *28*, 509–514.
- [146] P. Garstecki, M. J. Fuerstman, M. A. Fischbach, S. K. Sia, G. M. Whitesides, *Lab Chip* **2006**, *6*, 207–212.
- [147] M. Y. He, C. H. Sun, D. T. Chiu, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1222–1227.
- [148] a) M. Curcio, J. Roeraade, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1–7; b) N. Park, S. Kim, J. H. Hahn, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6029–6033; c) K. D. Dorfman, M. Chabert, J. H. Codarbox, G. Rousseau, P. de Cremoux, J. L. Viovy, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3700–3704.
- [149] P. S. Dittrich, M. Jahnz, P. Schwille, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 811–814.
- [150] J. E. Squires, *Science* **2002**, *295*, 1002–1005.
- [151] C. L. Leach, J. S. Greenspan, S. D. Rubenstein, T. H. Shaffer, M. R. Wolfson, J. C. Jackson, R. DeLemos, B. P. Fuhrman, *N. Engl. J. Med.* **1996**, *335*, 761–767.
- [152] E. G. Schutt, D. H. Klein, R. M. Mattrey, J. G. Riess, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3336–3355; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3218–3235.
- [153] I. Giaever, C. R. Keese, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 219–222.
- [154] C. R. Keese, I. Giaever, *Science* **1983**, *219*, 1448–1449.
- [155] J. G. Riess, M. P. Krafft, *Biomaterials* **1998**, *19*, 1529–1539.
- [156] P. M. Hinderliter, M. P. DeLorme, G. L. Kennedy, *Toxicology* **2006**, *222*, 80–85.
- [157] M. K. So, N. Yamashita, S. Taniyasu, Q. T. Jiang, J. P. Giesy, K. Chen, P. K. S. Lam, *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 2924–2929.
- [158] J. A. Gladysz, D. P. Curran, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 3823–3825.
- [159] E. Dickinson, *ACS Symp. Ser.* **1991**, *448*, 114–129.
- [160] S. E. Euston, H. Singh, P. A. Munro, D. G. Dalgleish, *J. Food Sci.* **1995**, *60*, 1124–1131.
- [161] J. M. Girardet, G. Humbert, N. Creusot, V. Chardot, S. Campagna, J. L. Courthaudon, J. L. Gaillard, *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *243*, 515–522.
- [162] J. M. Köhler, T. Henkel, A. Grodrian, T. Kirner, M. Roth, K. Martin, J. Metze, *Chem. Eng. J.* **2004**, *101*, 201–216.
- [163] C. J. Gerdts, D. E. Sharoyan, R. F. Ismagilov, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6327–6331.
- [164] L. H. Hung, K. M. Choi, W. Y. Tseng, Y. C. Tan, K. J. Shea, A. P. Lee, *Lab Chip* **2006**, *6*, 174–178.
- [165] D. R. Link, S. L. Anna, D. A. Weitz, H. A. Stone, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92*, 054503.
- [166] W. Engl, M. Roche, A. Colin, P. Panizza, A. Ajdari, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *95*, 208304.
- [167] K. Ahn, C. Kerbage, T. P. Hunt, R. M. Westervelt, D. R. Link, D. A. Weitz, *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *88*, 024104.
- [168] Y. C. Tan, J. S. Fisher, A. I. Lee, V. Cristini, A. P. Lee, *Lab Chip* **2004**, *4*, 292–298.
- [169] V. Cristini, Y. C. Tan, *Lab Chip* **2004**, *4*, 257–264.
- [170] a) D. R. Link, E. Grasland-Mongrain, A. Duri, F. Sarrazin, Z. D. Cheng, G. Cristobal, M. Marquez, D. A. Weitz, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2618–2622; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2556–2560; b) M. Chabert, K. D. Dorfman, J. L. Viovy, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 3706–3715.
- [171] R. A. Kautz, W. K. Goetzinger, B. L. Karger, *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 14–20.
- [172] J. M. Köhler, T. Henkel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *69*, 113–125.
- [173] K. Martin, T. Henkel, V. Baier, A. Grodrian, T. Schön, M. Roth, J. M. Köhler, J. Metze, *Lab Chip* **2003**, *3*, 202–207.
- [174] A. Grodrian, J. Metze, T. Henkel, K. Martin, M. Roth, J. M. Köhler, *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 1421–1428.
- [175] M. Y. He, J. S. Edgar, G. D. M. Jeffries, R. M. Lorenz, J. P. Shelby, D. T. Chiu, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1539–1544.
- [176] J. El-Ali, S. Gaudet, A. Günther, P. K. Sorger, K. F. Jensen, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3629–3636.
- [177] Y.-C. Tan, K. Hettiarachchi, M. Siu, Y.-R. Pan, A. P. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5656–5658.
- [178] K. Handique, D. T. Burke, C. H. Mastrangelo, M. A. Burns, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 4100–4109.

- [179] „Robotics for automated crystal formation and analysis“: M. Weselak, M. G. Patch, T. L. Selby, G. Knebel, R. C. Stevens in *Macromolecular Crystallography Pt C, Vol. 368*, Academic Press, San Diego, **2003**, S. 45–76.
- [180] R. C. Stevens, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 558–563.
- [181] A. McPherson, *J. Appl. Crystallogr.* **2000**, *33*, 397–400.
- [182] M. K. Yadav, C. J. Gerdts, R. Sanishvili, W. W. Smith, L. S. Roach, R. F. Ismagilov, P. Kuhn, R. C. Stevens, *J. Appl. Crystallogr.* **2005**, *38*, 900–905.
- [183] D. L. Chen, C. J. Gerdts, R. F. Ismagilov, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9672–9673.
- [184] J. R. Burns, C. Ramshaw, *Chem. Eng. Res. Des.* **1999**, *77*, 206–211.
- [185] J. R. Burns, C. Ramshaw, *Chem. Eng. Commun.* **2002**, *189*, 1611–1628.
- [186] G. Dummann, U. Quittmann, L. Groschel, D. W. Agar, O. Worz, K. Morgenschweis, *Catal. Today* **2003**, *79*, 433–439.
- [187] J. R. Burns, C. Ramshaw, *Lab Chip* **2001**, *1*, 10–15.
- [188] Z. T. Cygan, J. T. Cabral, K. L. Beers, E. J. Amis, *Langmuir* **2005**, *21*, 3629–3634.
- [189] S. L. Poe, M. A. Cummings, M. R. Haaf, D. T. McQuade, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1574–1578; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1544–1548.
- [190] C. W. Wei, J. Y. Cheng, C. T. Huang, M. H. Yen, T. H. Young, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e78.
- [191] Y. Onal, M. Lucas, P. Claus, *Chem. Eng. Technol.* **2005**, *28*, 972–978.
- [192] S. A. Khan, A. Günther, M. A. Schmidt, K. F. Jensen, *Langmuir* **2004**, *20*, 8604–8611.
- [193] „Generation, characterization, and modeling of polymer micro- and nano-particles“: J. U. Otaigbe, M. D. Barnes, K. Fukui, B. G. Sumpter, D. W. Noid in *Polymer Physics and Engineering*, Vol. 154, Springer, Berlin, **2001**, S. 1–86.
- [194] a) S. Q. Xu, Z. H. Nie, M. Seo, P. Lewis, E. Kumacheva, H. A. Stone, P. Garstecki, D. B. Weibel, I. Gitlin, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 734–738; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 724–728; Erratum: S. Q. Xu, Z. H. Nie, M. Seo, P. Lewis, E. Kumacheva, H. A. Stone, P. Garstecki, D. B. Weibel, I. Gitlin, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 3865; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3799; b) S. H. Cho, J. B. Jun, J. H. Ryu, K. D. Suh, *Colloid Surf. A* **2005**, *254*, 1–7.
- [195] Z. H. Nie, S. Q. Xu, M. Seo, P. C. Lewis, E. Kumacheva, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8058–8063.
- [196] C. Priest, S. Herminghaus, R. Seemann, *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *88*, 024106.
- [197] G. R. Yi, T. Thorsen, V. N. Manoharan, M. J. Hwang, S. J. Jeon, D. J. Pine, S. R. Quake, S. M. Yang, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 1300–1304.
- [198] M. Seo, Z. H. Nie, S. Q. Xu, P. C. Lewis, E. Kumacheva, *Langmuir* **2005**, *21*, 4773–4775.
- [199] H. J. Oh, S. H. Kim, J. Y. Baek, G. H. Seong, S. H. Lee, *J. Micromech. Microeng.* **2006**, *16*, 285–291.
- [200] D. Dendukuri, K. Tsoi, T. A. Hatton, P. S. Doyle, *Langmuir* **2005**, *21*, 2113–2116.
- [201] M. Zourob, S. Mohr, A. G. Mayes, A. Macaskill, N. Perez-Moral, P. R. Fielden, N. J. Goddard, *Lab Chip* **2006**, *6*, 296–301.
- [202] W. J. Jeong, J. Y. Kim, J. Choo, E. K. Lee, C. S. Han, D. J. Beebe, G. H. Seong, S. H. Lee, *Langmuir* **2005**, *21*, 3738–3741.
- [203] T. Nisisako, T. Torii, T. Higuchi, *Chem. Eng. J.* **2004**, *101*, 23–29.
- [204] T. Nisisako, T. Torii, T. Takahashi, Y. Takizawa, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1152–1156.
- [205] B. G. De Geest, J. P. Urbanski, T. Thorsen, J. Demeester, S. C. De Smedt, *Langmuir* **2005**, *21*, 10275–10279.
- [206] S. Okushima, T. Nisisako, T. Torii, T. Higuchi, *Langmuir* **2004**, *20*, 9905–9908.
- [207] A. S. Utada, E. Lorenceau, D. R. Link, P. D. Kaplan, H. A. Stone, D. A. Weitz, *Science* **2005**, *308*, 537–541.
- [208] E. Lorenceau, A. S. Utada, D. R. Link, G. Cristobal, M. Joanicot, D. A. Weitz, *Langmuir* **2005**, *21*, 9183–9186.
- [209] J. P. Rolland, R. M. Van Dam, D. A. Schorzman, S. R. Quake, J. M. DeSimone, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8349–8349.
- [210] N. Damean, S. K. Sia, V. Linder, M. Narovlyansky, G. M. Whitesides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 10035–10039.
- [211] P. Garstecki, M. J. Fuerstman, G. M. Whitesides, *Nat. Phys.* **2005**, *1*, 168–171.
- [212] M. Abkarian, M. Faivre, H. A. Stone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 538–542.
- [213] C. Queguiner, D. Barthes-Biesel, *J. Fluid Mech.* **1997**, *348*, 349–376.
- [214] A. B. Subramiam, M. Abkarian, L. Mahadevan, H. A. Stone, *Nature* **2005**, *438*, 930–930.
- [215] G. M. Whitesides, *Nature* **2006**, *442*, 368–373.
- [216] A. J. deMello, *Nature* **2006**, *442*, 394–402.
- [217] J. El-Ali, P. K. Sorger, K. F. Jensen, *Nature* **2006**, *442*, 403–411.
- [218] J. H. Xu, S. W. Li, J. Tan, Y. J. Wang, G. S. Luo, *Langmuir* **2006**, *22*, 7943–7946.
- [219] R. M. Lorenz, J. S. Edgar, G. D. M. Jeffries, D. T. Chiu, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 6433–6439.
- [220] O. Ozen, N. Aubry, D. T. Papageorgiou, P. G. Petropoulos, *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96*, 144501.
- [221] V. Barbier, M. Tatoulian, H. Li, F. Arefi-Khonsari, A. Ajdari, P. Taberlin, *Langmuir* **2006**, *22*, 5230–5232.
- [222] G. Cristobal, J. P. Benoit, M. Joanicot, A. Ajdari, *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *89*, 034104.
- [223] W. H. Tan, S. Takeuchi, *Lab Chip* **2006**, *6*, 757–763.
- [224] K. Ahn, J. Agresti, H. Chong, M. Marquez, D. A. Weitz, *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *88*, 264105.
- [225] N. Srivastava, M. A. Burns, *Lab Chip* **2006**, *6*, 744–751.
- [226] J. T. Cabral, S. D. Hudson, *Lab Chip* **2006**, *6*, 427–436.
- [227] G. Cristobal, L. Arbouet, F. Sarrazin, D. Talaga, J. L. Brunelle, M. Joanicot, L. Servant, *Lab Chip* **2006**, *6*, 1140–1146.
- [228] S. E. Barnes, Z. T. Cygan, J. K. Yates, K. L. Beers, E. J. Amis, *Analyst* **2006**, *131*, 1027–1033.
- [229] K. S. Huang, T. H. Lai, Y. C. Lin, *Lab Chip* **2006**, *6*, 954–957.
- [230] Z. H. Nie, W. Li, M. Seo, S. Q. Xu, E. Kumacheva, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9408–9412.
- [231] R. F. Shepherd, J. C. Conrad, S. K. Rhodes, D. R. Link, M. Marquez, D. A. Weitz, J. A. Lewis, *Langmuir* **2006**, *22*, 8618–8622.
- [232] H. Zhang, E. Tumarkin, R. Peerani, Z. Nie, R. M. A. Sullan, G. C. Walker, E. Kumacheva, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12205–12210.
- [233] J. L. Steinbacher, R. W. Y. Moy, K. E. Price, M. A. Cummings, C. Roychowdhury, J. J. Buffy, W. L. Olbricht, M. Haaf, D. T. McQuade, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9442–9447.
- [234] S. Abraham, E. H. Jeong, T. Arakawa, S. Shoji, K. C. Kim, I. Kim, J. S. Go, *Lab Chip* **2006**, *6*, 752–756.
- [235] B. Ahmed, D. Barrow, T. Wirth, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1043–1048.
- [236] C. J. Gerdts, V. Tereshko, M. K. Yadav, I. Dementieva, F. Collart, A. Joachimiak, R. C. Stevens, P. Kuhn, A. Kossiakoff, R. F. Ismagilov, *Angew. Chem.* DOI:10.1002/ange.200602946; *Angew. Chem. Int. Ed.* DOI:10.1002/anie.200602946.
- [237] B. J. Adzima, S. S. Velankar, *J. Micromech. Microeng.* **2006**, *16*, 1504–1510.
- [238] M. J. Jensen, H. A. Stone, H. Bruus, *Phys. Fluids* **2006**, *18*, 077103.
- [239] P. Garstecki, G. M. Whitesides, *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *97*, 024503.