

# Tröpfchen-Mikrofluidik für die Einzelzellanalyse

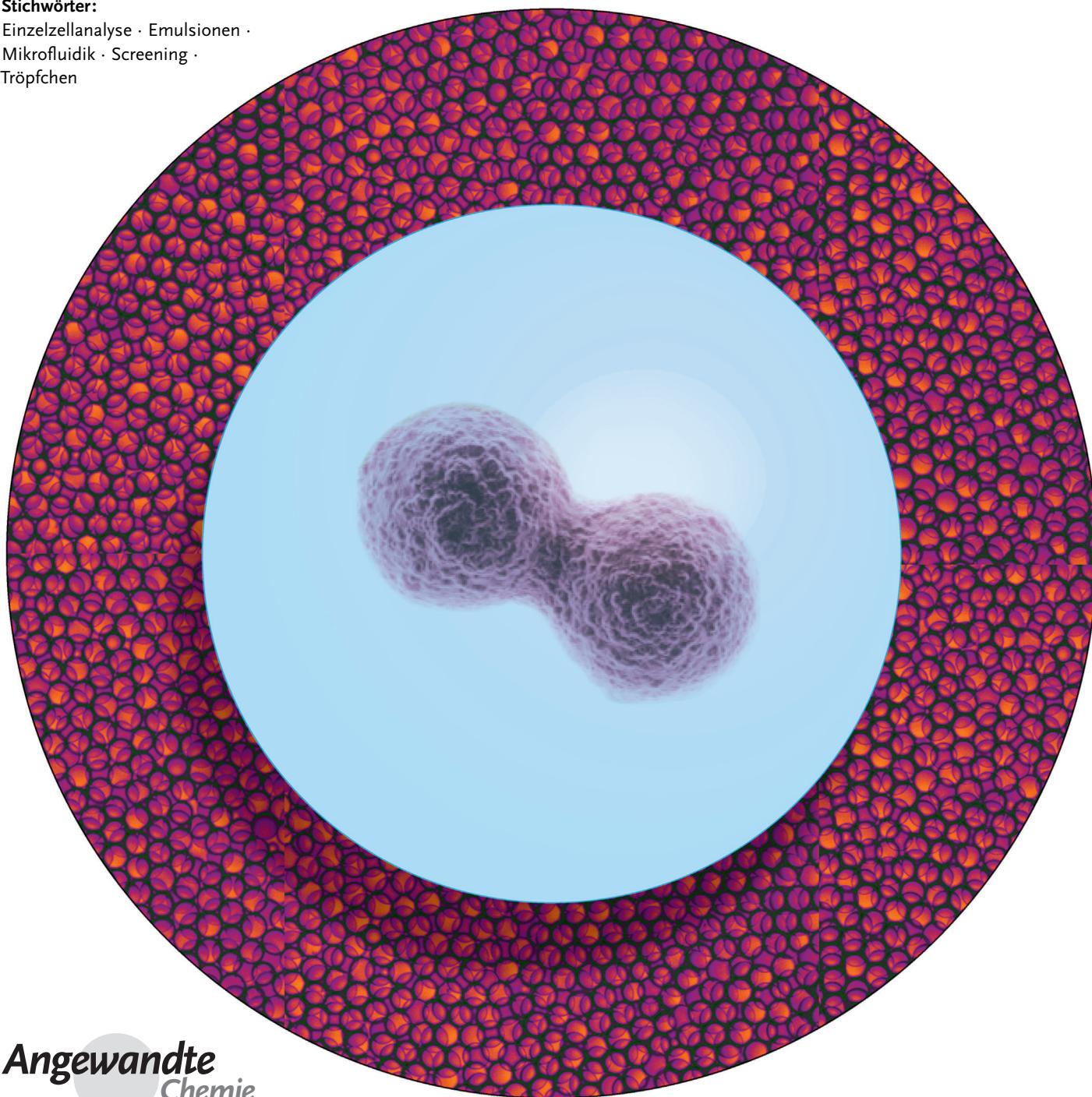
Haakan N. Joensson\* und Helene Andersson Svahn

**Stichwörter:**

Einzelzellanalyse · Emulsionen ·

Mikrofluidik · Screening ·

Tröpfchen



**D**ie tröpfchenbasierte Mikrofluidik dient der Isolierung und Manipulation von einzelnen Zellen und Reagentien innerhalb von monodispersen, mikrolitergroßen Flüssigkapseln bei einem Umsatz von tausenden Tröpfchen pro Sekunde. Diese Qualitäten machen die Tröpfchen-Mikrofluidik geeignet für viele Anforderungen der Einzelzellanalyse. Durch die Monodispersität lässt sich die Konzentration in den Tröpfchen quantitativ einstellen. Die Tröpfchen bieten der Zelle und ihrer unmittelbaren Umgebung ein isoliertes Kompartiment, und bei einem Durchsatz von tausenden Tröpfchen pro Sekunde ist es möglich, zehntausende bis millionen verkapselfte Zellen zu prozessieren. Heterogene Zellpopulationen lassen sich somit exakt beschreiben oder seltene Zellarten identifizieren. Das kleine Volumen der Tröpfchen macht auch sehr große Screenings ökonomisch machbar. Dieser Aufsatz gibt einen Überblick über den aktuellen Stand der Einzelzellanalyse durch die Tröpfchen-Mikrofluidik und nennt Beispiele, bei denen sie biologische Vorgänge besser verstehen hilft.

## 1. Einleitung

Die Einzelzelle ist fundamentaler Bestandteil des Lebens. Mit der Erfindung des Mikroskops und der daraus folgenden Kenntnisnahme über den zellulären Bauplan des Lebens stellte man fest, dass die Zellen untereinander sehr ähnlich sind, aber auch erhebliche Unterschiede aufweisen. Die Einteilung der Zellen erfolgte nach ihrem Gewebeursprung, ihrer charakteristischen Merkmale und ihren Sekretionsprodukten. Mithilfe dieser Gliederung war es möglich, bestimmte an Krankheiten beteiligte Zellarten<sup>[1]</sup> zu identifizieren und Zell-Zell-Wechselwirkungen<sup>[2]</sup> zu beschreiben. Durch molekularbiologische Hochdurchsatzverfahren wurden Genome von einer großen Zahl von Einzelorganismen<sup>[3]</sup> und Organismengruppen vorgenommen, wie zum Beispiel des Mikrobioms des Darms<sup>[4]</sup> und des humanen Proteoms<sup>[5]</sup> vorläufig beschrieben, und das Sekretom von bestimmten Organismen<sup>[6]</sup> und Krebszellen<sup>[7]</sup> wurde detailliert analysiert.

Als Techniken verfügbar waren, auch einzelne Zellen zu untersuchen, wurden selbst bei isogenen Kulturen Heterogenitäten festgestellt. Die Zellen unterschieden sich in Größe,<sup>[8]</sup> Genexpression<sup>[9]</sup> und bestimmten Wachstumsmerkmalen.<sup>[10]</sup> Darüber hinaus folgte in vielen Fällen die Verteilung dieser Merkmale keineswegs einer Gauß-Verteilung, sondern multimodalen oder anderen komplexen Verteilungen (Abbildung 1). Trotz dieser Tatsachen gehen viele Studien immer noch vom Durchschnitt eines Zellensembles und der Normalverteilung aus. Die Gruppe von Lee veröffentlichte 2006 einen ausgezeichneten Beitrag zum dynamischen Verhalten von Einzelzellen und Zellensembles.<sup>[11]</sup> Um die Heterogenität und ihre Ursachen genau beschreiben zu können, muss eine ausreichend große Zahl von Einzelzellen analysiert werden, die die Population repräsentiert. Solche Methoden werden kollektiv als Hochdurchsatztechniken für die Einzelzellanalyse bezeichnet. Führend unter diesen Techniken ist die seit knapp einem halben Jahrhundert verwendete Durchflusszytometrie, bei der ein Laser Einzelzel-

## Aus dem Inhalt

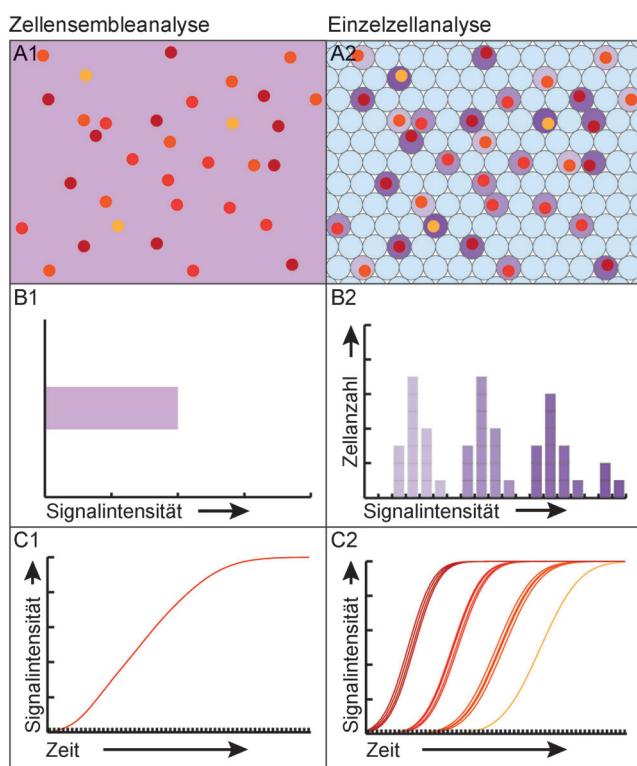
1. Einleitung	12343
2. Tröpfchen-Mikrofluidik	12345
3. Zellen in Tröpfchen	12348
4. Manipulation der Tröpfchen und Analyse	12349
5. Einzelzellanalyse in Tröpfchen	12352
6. Schlussfolgerungen	12356

len, die an einem Detektor mit Geschwindigkeiten von zehntausenden Zellen pro Sekunde vorbeiströmen, auf fluoreszierende Moleküle und Lichtstreuung hin überprüft. Die Durchflusszytometrie ist ideal für Einzelzeit-Screenings oder Populationsanalysen bei der Proteinexpression und wird in der Regel durch Fluoreszenzmarkierung mit Antikörpern oder Coexpression von Fluoreszenzproteinen durchgeführt. Bestimmte Einzelzellanalysen wie etwa die zeitliche Nachverfolgung von Zellen, die Analyse von Sekretionsprodukten und die Analyse von isolierten Zellen oder Klonen deckt die Durchflusszytometrie jedoch nicht ab. Dies ist zum großen Teil einer zu geringen Kompartimentierung der Einzelzellen geschuldet.

Die Verwendung von mikrofluidischen Techniken setzt auch ein Verständnis über das Verhalten und mögliche Manipulationen von Fluiden im Mikromaßstab voraus. Inzwischen sind dazu ein stetig anwachsendes Grundwissen und jede Menge Techniken zur Handhabung der Fluide verfügbar. Anwendungsbereiche der Mikrofluidik sind die Medizin und die Biotechnologie sowie die Materialwissenschaften und die Chemie. Forschung und Entwicklung der Mikrofluidik-basierten Einzelzellanalysen erleben seit einigen Jahren einen deutlichen Aufschwung. Allein 2011 wurden mehrere Übersichten zu mikrofluidischen Einzelzellanalysen publiziert,<sup>[12]</sup> auch zum Teil über die Einzelzellanalyse in mikrofluidischen Tröpfchen.<sup>[12d]</sup> Eine Reihe von jüngeren Aufsätzen<sup>[13]</sup> befasst sich außerdem mit verschiedenen Aspekten biologischer Analytik mithilfe der Tröpfchen-Mikrofluidik.

Dass sich die Mikrofluidik-Technik für die Einzelzellanalyse so durchsetze, hat unserer Meinung nach mehrere Gründe. So sind die Probenvolumina klein, die Reagenzien können dynamisch und kontrolliert eingesetzt werden, der Durchsatz ist hoch und das System ist biokompatibel und empfindlich. Anwendungen für Einzelzellen auf Mikrofluidik-

[\*] Dr. H. N. Joensson, Prof. H. Andersson Svaahn  
Division of Nanobiotechnology, School of Biotechnology  
Royal Institute of Technology (KTH)  
AlbaNova University Center, 10691 Stockholm (Schweden)  
E-Mail: hakan.jonsson@biotech.kth.se



**Abbildung 1.** Der Unterschied zwischen Zellensembleanalysen (A1, B1 und C1) und Einzelzellanalysen (A2, B2 und C2). Es wird deutlich, warum die Zellen einer Population oft besser individuell als als Ensemble zu untersuchen sind. Bei der Einzelzellanalyse kann die bi- oder multimodale Verteilung eines bestimmten Merkmals (B2) oder auch die Einzeldynamiken (C2) untersucht werden. Ensembleanalysen der gleichen Zellen resultieren dagegen in einem Durchschnittsmerkmal (B1) oder einer mittleren Dynamik (C1), wodurch wie in dem hier beschriebenen hypothetischen Fall die eigentliche Population manchmal nicht gut charakterisiert wird. Seltene Zellarten (wie die im Bild gelb gefärbten) stellen eine weitere Motivation dar. Zellen, die nur eine kleine Minderheit in einer Population ausmachen, werden leicht von der Mehrheit der Zellen maskiert, auch wenn ihre Merkmale von denen der anderen substantiell abweichen. (Abbildung verändert nach Lit. [11].)

dikchips finden sich unter anderem bei der Polymerasekettenreaktion (PCR), Zellkultur, Zytotoxizität, Sortierung, Separierung, Klonerstellung, Lyse, Gen- und Proteinexpression und bei Studien zur Antikörpersekretion. Mikrofluidik-

systeme für die Untersuchung des Verhaltens von Einzelzellen enthalten meistens in irgendeiner Form auch die Separation von Zellen. Diese kann räumlich auf Oberflächen oder als Kompartimentierung in Festkörperarrays oder in Zweiphasensystemen wie den Tröpfchen erfolgen.

### 1.1. Kompartimentierung in Emulsionen

Emulsionen sind Kolloide, die durch das Aufbrechen von einer flüssigen Phase in einer anderen entstehen und meistens oberflächenaktive Substanzen (Tenside) als Stabilisatoren enthalten. Eine Emulsion ist ein metastabiler Zustand, der sich über die Zeit durch Koaleszenz oder Ostwald-Reifung abbaut.<sup>[14]</sup> Es sind aber auch Beständigkeiten von einem Jahr und mehr möglich. Emulsionen können durch einfaches Mischen von einer Öl- und einer Wasserphase hergestellt werden. Normalerweise enthalten sie Tröpfchen in der Größenordnung von mehreren hundert Nanometern bis im Zehnerbereich von Mikrometern. Solche Emulsionen sind stark dispers, wobei die Dispersität als Standardabweichung der Verteilung der Tröpfchendurchmesser geteilt durch den durchschnittlichen Tröpfchendurchmesser definiert.<sup>[15]</sup>

Emulsionen werden seit Jahrzehnten in der Biologie eingesetzt, um Zellen zu verkapseln und zu untersuchen. Lederberg erzeugte in den 1950er Jahren erstmals Bakterien enthaltende Wasser-in-Öl-Tröpfchen, indem er eine Bakterienlösung durch eine untergetauchte 100 µm breite Spalte einer Mikropipette in einen Ölfilm einsprühnte.<sup>[16]</sup> Mit dieser Technik gelang ihm die Kompartimentierung von einzelnen Bakterienzellen in polydispersen Emulsionströpfchen. Mit einer ähnlichen Technik wurden später eine Studie zur Antikörperproduktion von Einzelzellen<sup>[16]</sup> und die ersten Experimente zur Aktivität von Einzelmolekülen durchgeführt.<sup>[17]</sup> So wurde die β-Galactosidase (β-gal) auf diese Weise nachgewiesen und die Aktivität von einzelnen Enzymen durch gemeinsame Verkapselung von verdünnter Enzymsuspension mit einem fluorogenen Substrat charakterisiert. Bereits in diesen frühen Studien wiesen Rotman und Lederberg auf das Potenzial der Kompartimentierung hin, um die Heterogenität von Einzelmolekülen untersuchen zu können. Viel später nutzte die Mikrofluidikforschung eben dieses Potenzial, um nicht nur bei Molekülpopulationen, sondern bei ganzen Zellpopulationen Heterogenitäten zu analysieren. Trotz des



Haakan Joansson studierte an der Lund University (Schweden) und an der University of Illinois in Urbana-Champaign (USA) technische Physik und promovierte in Biotechnologie am KTH über biologische Anwendungen der Hochdurchsatz-Tröpfchen-Mikrofluidik. Er war von 2006 bis 2007 Gastwissenschaftler bei RainDance Technologies, Boston (USA). Zurzeit ist er Postdoktorand in der Division of Nanobiotechnology am Royal Institute of Technology (KTH) und Leiter der Gruppe für Tröpfchen-Mikrofluidik im Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability, The Royal Institute of Technology (Schweden).



Helene Andersson Svahn studierte molekulare Biotechnologie an der Universität von Uppsala und promovierte 2001 am Royal Institute of Technology in Elektrotechnik. Von 2002 bis 2005 war sie Marketing Director bei Silex Microsystems. Von 2005 bis 2008 hatte sie eine Professur für angewandte BIOMEMS am MESA+ Research Institute in den Niederlanden inne, und zurzeit leitet sie das Nanobiotechnology Department am Royal Institute of Technology in Schweden. Derzeit ist sie CEO des Startup-Unternehmens Picovitro AB und wissenschaftliche Beraterin für Silex Microsystems. Für die Young Academy of Sweden wurde sie 2011 zum Chairman gewählt.

polydispersen Charakters der durch Schütteln im Makro-maßstab erzeugten Emulsionen, in denen die Kompartimente einen breiten Volumenbereich überdecken, werden diese Kompartimente in Emulsions-PCR(emPCR)-<sup>[18]</sup> und BEAMing-Verfahren<sup>[19]</sup> genutzt, die in vielen DNA-Sequenzierungssystemen der zweiten Generation enthalten sind, sowie für Experimente zur gerichteten Evolution.<sup>[20]</sup>

## 2. Tröpfchen-Mikrofluidik

Dieser Aufsatz befasst sich mit der Hochdurchsatz-Tröpfchen-Mikrofluidik an wässrig-monodispersen Systemen. Die wässrigen Tröpfchen werden durch Einspritzen unter Druck in eine kontinuierliche Ölphase erzeugt und bei einem normalen Durchsatz von über 1000 Tröpfchen pro Sekunde analysiert und manipuliert. Tröpfchenerzeugung und -manipulation findet in mikrofluidischen Systemen statt, deren Geometrie überwiegend durch den jeweiligen Manipulationszweck definiert ist. Auch eine Reihe von weiteren Mikrofluidik-Techniken wie die Elektrobenetzung auf einem Dielektrikum (EWOD)<sup>[21]</sup> wurden zeitweise als Tröpfchen-Mikrofluidik bezeichnet. Die EWOD-Tröpfchen sind jedoch im Allgemeinen größer (Mikro- bis Nanoliter) als die normalerweise bei der Tröpfchen-Mikrofluidik anfallenden, und ihre Manipulation findet auf Oberflächen und nicht innerhalb der fluiden Phase statt. Auch werden in den EWOD-Bauteilen die Tröpfchen stets einzeln adressiert, was bei den Apparaturen der Tröpfchen-Mikrofluidik nicht immer der Fall ist. Wegen dieser Unterschiede in Tröpfchengröße, Stabilisierung, Manipulationsmethodik und Biokompatibilität stehen die EWOD-Tröpfchen außerhalb der Zielsetzung dieses Aufsatzes und werden hier nicht weiter behandelt, auch wenn sie als Gefäße für die Einzelzellanalyse verwendet werden.

### 2.1. Mikrofluidik-Chips für die Tröpfchen-Mikrofluidik

Die in der Tröpfchen-Mikrofluidik verwendeten Apparaturen bestehen normalerweise aus Glas-Polydimethylsiloxan (PDMS) und werden durch softlithographische Verfahren<sup>[22]</sup> gefertigt. Daneben wurden auch andere Materialien wie Kieselglas,<sup>[23]</sup> Thiol-En-Harze,<sup>[24]</sup> Polymethylmethacrylat<sup>[25]</sup> (PMMA), Polystyrol<sup>[26]</sup> (PS) und fluorierte Thermoplasten<sup>[27]</sup> eingesetzt. Die Softlithographie ist ein gut dokumentiertes und etabliertes Herstellungsverfahren.<sup>[28]</sup> Das PDMS ist inhärent hydrophob, aber inzwischen gibt es viele Techniken zur Oberflächenmodifizierung,<sup>[29]</sup> mit denen ganz unterschiedliche Kanalbeschichtungen für variable Benetzungseigenschaften möglich werden. Glas-PDMS-Bauelemente, die für Zweiphasensysteme aus wässriger Phase und fluorierter Ölphase vorgesehen sind, werden im Allgemeinen durch Verfahren wie „Aquapel flushing“ (PPG Industries)<sup>[30]</sup> oder durch Fluorsilanbeschichtung<sup>[23]</sup> beschichtet. Weil bei manchen Tröpfchenmanipulationen große elektrische Felder in unmittelbarer Umgebung der Kanäle auftreten, sind häufig Elektroden in die Glas-PDMS-Bauelemente<sup>[31]</sup> integriert. Ein Vorteil der PDMS-Bauelemente ist ihre Porenstruktur, die sie

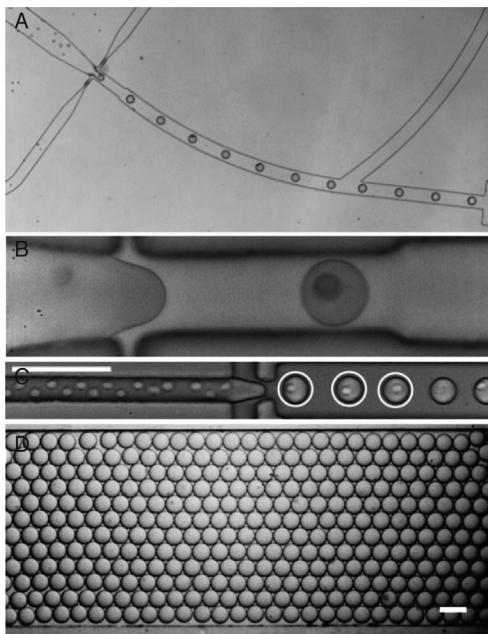
für O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> durchlässig macht. Daher können einerseits Gasbläschen aus den Kanälen entweichen, andererseits kann Gas auch innerhalb der Kanäle von den Zellen weg und zu ihnen hin transportiert werden. Allerdings bedingt die Porosität auch eine Diffusion von kleinen Molekülen in das Material hinein.<sup>[32]</sup>

### 2.2. Erzeugung von Tröpfchen

Bevor Apparaturen zur Erzeugung von Tröpfchen zur Verfügung standen, wurden hoch monodisperse Emulsionen mit enger Tröpfchengrößenverteilung durch einen makroskopischen Prozess entsprechend einer fraktionierenden Kristallisation hergestellt.<sup>[33]</sup> Da hierbei die große Mehrzahl der produzierten Tröpfchen ungenutzt bleibt, ist diese Technik recht ineffizient. Daher wurde 2000 eine Methode zur Erzeugung von monodispersen Tröpfchen vorgestellt, bei der ein Strahl wässriger Lösung aus einer Kapillare in eine ein Tensid enthaltene kontinuierliche Flussphase eingebracht wird und dabei abbricht.<sup>[34]</sup> Thorsen et al. beschrieben 2001 eine Mikrofluidik-Apparatur, in der innerhalb einer T-Kreuzung durch druckgesteuerte Injektion von wässriger Phase in eine kontinuierliche Ölphase hinein monodisperse wässrige Tröpfchen (1–3 % Durchmesser differenz) erzeugt werden.<sup>[35]</sup> Im Vergleich zu früheren Techniken haben diese Mikrofluidik-Verfahren den Vorteil, dass die Tröpfchen kontinuierlich erzeugt werden. Die danach gebauten Mikrofluidik-Apparaturen ermöglichen die Tröpfchenerzeugung mit Frequenzen von 0.1 bis 10 kHz. Durch Parallelisierung ist es möglich, mit einer Apparatur bis zu 1 Liter monodisperse 96.4-μm-Tröpfchen pro Stunde zu erzeugen.<sup>[36]</sup> Die drei Hauptstrategien beim „Dripping“ genannten Prozess für die druckgetriebene kontinuierliche Tröpfenerzeugung sind die Aufspaltung eines Strahls in cofließenden Strömen, in sich kreuzenden Strömen in einer T-Kreuzung und die Flussfokussierung<sup>[15]</sup> (Abbildung 2A–C). Tröpfchen werden gebildet, wenn Spannungs Kräfte in Konkurrenz stehen. Hierbei verkleinert die Oberflächenspannung die Grenzfläche zwischen den Phasen, und Viskositätskräfte vergrößern das Grenzflächensegment und ziehen es stromabwärts. Bei Zweiphasensystemen von mäßiger Viskositätsdifferenz wurden zwei grundsätzlich verschiedenen Vorgänge zur Tröpfchenbildung nachgewiesen. Sie werden „Dripping“ und „Jetting“ genannt oder auch konvektive und absolute Plateau-Rayleigh-Instabilitäten. Die in diesem Aufsatz behandelten Tröpfchen gehen mit wenigen Ausnahmen auf das Dripping-Verfahren zurück.

Um alternierende „Tröpfchen-in-Tröpfchen“-Systeme wie etwa Wasser-Öl-Wasser-Emulsionen zu erzeugen, wurden mehrere Tröpfchenerzeuger in Reihe geschaltet.<sup>[37]</sup> Die synchrone Erzeugung von Tröpfchen mit gegensätzlichen Phasen lässt sich durch zwei druckverbundene Module zur Tröpfchenerzeugung einstellen.<sup>[38]</sup>

Auch nichtkontinuierliche Ansätze zur Erzeugung von diskreten Tröpfchen nach Bedarf, zum Beispiel durch elektrische<sup>[39]</sup> oder Druckpulse<sup>[40]</sup> wurde verfolgt, ebenso eine lasergesteuerte Tröpfchenbildung.<sup>[41]</sup> Diese Methoden ermöglichen die Ad-hoc-Erzeugung von einzelnen Tröpfchen und bieten eine große Volumengenauigkeit. Allerdings sind sie im



**Abbildung 2.** Mikroskopische Aufnahmen der Erzeugung von monodispersen Tröpfchen in mikrofluidischen Apparaturen durch Flussfokussierung. Übersicht A) und Vergrößerung B) des Verkapselungsvorgangs von statistisch verteilten U937-Zellen,<sup>[115]</sup> der zur Poisson-Verteilung der Zellbesetzung führt. C) Die Anordnung der Zellen erfolgt in einem Kanal, der in der gezeigten Dimension eng, in der Dimension der Bildnormalen jedoch weit ist. Durch diese Geometrie wird ein erheblich größerer Teil der Zellen verkapselt als bei statistischer Verkapselung.<sup>[43]</sup> D) Tröpfchen-Monoschichten lassen sich aufgrund ihrer Größenhomogenität kristallin anordnen.<sup>[30b]</sup> (Nachdruck von (A) und (B) mit Erlaubnis von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA sowie (C) und (D) von The Royal Society of Chemistry, 2008.)

Vergleich zur kontinuierlichen Methode erheblich langsamer. Bedarfsorientierte Methoden eignen sich sehr gut für Einzelzellanalysen, wenn vorsortierte Subpopulationen untersucht werden sollen, oder keine große Zahl von Zellen verlangt ist.

### 2.3. Verkapselung von Einzelzellen

Zellen aus sehr unterschiedlichen Quellen, von humanen Patientenproben bis Zelllinien und Bakterien, werden zu Kultivierungs- und Analysezwecken bei hohem Durchsatz meist in Flussfokussierern (Abbildung 2 A,B) in zuvor mikrofluidisch erzeugten Tröpfchen verkapselt. Bei der statistischen Verkapselung von Zellen, die an die Austrittsdüse des Tröpfchenerzeugers herangeführt werden, wird eine Population von Tröpfchen produziert, deren Zellbesetzung der Poisson-Verteilung folgt.<sup>[42]</sup> Daher lässt sich standardmäßig erzeugten Tröpfchen keine uniforme oder zumindest vorwiegende Einzelzellbesetzung erreichen. Abhängig davon, in welchem Ausmaß eine Mehrfachbesetzung in einer Anwendung toleriert wird, kann die Zellkonzentration jedoch auf eine bestimmte Poisson-Verteilung eingestellt werden, zum Beispiel auf eine Besetzung von 90, 9 und 1% oder 40, 30 und 30% bei einem Verhältnis von Zellen zu Tröpfchen von 0.1 beziehungsweise > 1. Um die Poisson-Verteilung der besetz-

ten Tröpfchen zu umgehen, wurden Hochdurchsatz-Injektionsmethoden entwickelt,<sup>[43]</sup> die Trägheitseffekte von engen Kanälen ausnutzen (Abbildung 2 C). Der mikrofluidische Durchsatz erwies sich in den meisten Studien als nebenschließlich auf die Poisson-Verteilung der Zellbesetzung, und in gewissem Maße können Tröpfchen ohne Zellen sogar als interne Standards in den Assays genommen werden. Bei Tröpfchen, deren Besetzung durch Fluoreszenz oder auf andere Weise nachgewiesen werden kann, kommt als Lösungsstrategie für das Problem der differenziellen Zellbesetzung auch eine dielektrophoretische Tröpfchensorтировung nach der Verkapselung infrage. Außerdem wurden auch verschiedene hydrodynamische Verfahren entwickelt, um Tröpfchen, die Einzelzellen oder Klone enthalten, von den zellfreien Tröpfchen zu trennen. Bei diesen Methoden handelt es sich unter anderem um eine von der Zelle selbst ausgelöste Tröpfchenerzeugung mit anschließender Größentrennung<sup>[44]</sup> oder um eine Abtrennung von Tröpfchen, die einzelne Klone enthalten, durch deterministische laterale Auslenkung nach einem durch die Zelle induzierten Schrumpfvorgang des Tröpfchens.<sup>[45]</sup> Sofern es möglich ist, eine große Population von homogenen einzelsetzten Tröpfchen zu erzeugen, wäre es wesentlich einfacher, Studien zur Wechselwirkung von Zellen untereinander oder auch Assays zur Protein- oder DNA-Isolierung mit Mikrokugelchen aus der Einzelzelle durchzuführen. Ein Problem ist die Poisson-Verteilung der Zellbesetzung insbesondere für solche Anwendungen, wo unbedingt zwei oder mehr Einzelobjekte wie Zellen oder Partikel in jedem Tröpfchen vorkommen müssen.

### 2.4. Tröpfchenstabilität, Biokompatibilität und Verlust

Mikrotröpfchenemulsionen sind per Definition metastabile Kolloide, die durch Tenside stabilisiert werden. Für die Erzeugung der Tröpfchen sind Tenside nicht unbedingt notwendig, aber ohne ihre Stabilisierung verschmelzen die gerade erzeugten Tröpfchen bei Kontakt wieder.<sup>[13a]</sup> Aus der Metastabilität folgt auch, dass die Tröpfchen vor ihrer Koaleszenz eine begrenzte Lebensdauer haben. Abhängig von den Stabilisierungscharakteristiken der Tenside im jeweiligen Zweiphasensystem und den physikalischen Umgebungsbedingungen der Emulsion kann sich diese Lebensdauer jedoch vom Submillisekundenbereich bis hin zu Jahren erstrecken. Die kritische Mizellkonzentration (CMC) und die Grenzflächenspannung beschreiben jeweils einen wichtigen Parameter eines grenzflächenaktiven Zweiphasensystems aus wässriger Phase und Ölphase. Während die CMC den Betrag von freiem Tensid beschreibt, das in der Dispersionsphase gelöst ist, gibt die Grenzflächenspannung  $\gamma_{\text{CMC}}$  den Grad an Organisation an, den das Tensid den Grenzflächen zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen verleiht, also die Stabilisierung des Tröpfchens. Um stabile Tröpfchen zu erhalten, liegen die allgemeinen Anforderungen an das System bei einer CMC im Bereich von 100 mM–10  $\mu\text{M}$  und einer  $\gamma_{\text{CMC}}$  von  $< 20 \text{ mN M}^{-1}$ .<sup>[46]</sup> Baret<sup>[47]</sup> erläutert in seinem Aufsatz ausführlich die Rolle der Tenside in mikrofluidischen Tröpfchensystemen.

Als Ölphase der Wasser-in-Öl-Emulsionen werden meist entweder Kohlenwasserstoffe oder Fluorkohlenstoff-Verbindungen eingesetzt. In einem Kohlenwasserstofföl wie Hexadecan oder einem Mineralöl werden die Tröpfchen in der Regel durch handelsübliche Tenside stabilisiert, zum Beispiel Span80,<sup>[48]</sup> oder Abil EM.<sup>[49]</sup> Gegenüber den Kohlenwasserstoffölen haben jedoch die Fluorkohlenstofföle einige Vorteile wie etwa einen besseren Sauerstofftransport, und vor allem bieten sie eine absolute Unmischbarkeit mit organischen und wässrigen Lösungsmitteln. Daraus resultiert bei den fluorierten Flüssigkeiten zusätzlich zur Gasphase, der wässrigen, organischen und der Festphase eine „fünfte Phase“.<sup>[50]</sup> Für Mikroemulsionen in Fluorkohlenstoffölen – zum Beispiel das häufig verwendeten Fluorinert FC-40, FC-77 (3 M) – als kontinuierliche Phase eignen sich Tenside auf Perfluorpolyether(PFPE)-Basis wie Krytox (DuPont)<sup>[30b]</sup> oder Pseudotenside wie Perfluoroctanol als Stabilisatoren am besten.<sup>[51]</sup> Krytox besteht aus einem PFPE-Schwanz und einer carboxylyischen Kopfgruppe. Ein Artikel von Clausell-Tormos et al.<sup>[52]</sup> befasst sich mit der Verbesserung der Biokompatibilität von PFPE durch Austauschen der Kopfgruppe mit anderen nichtpolaren hydrophilen Kopfgruppen. So wurden Polyethylenglycol (PEG)-PFPE, das Ammoniumsalz von Carboxy-PFPE, Dimorpholinophosphat(DMP)-PFPE und Polylysyl(pLL)-PFPE gegen HEK293T-Zellen getestet, die auf einen Ölfilm mit dem entsprechenden Tensid aufgebracht wurden. Während das Ammoniumsalz und pLL-PFPE eine Zelllyse auslösten, brachten DMP-PFPE und PEG-PFPE gute Ergebnisse. Von diesen beiden Substanzen ist das häufig verwendete PEG-PFPE bislang am umfangreichsten charakterisiert. In Versuchen, PEG-PFPE weiter zu optimieren, stellten Holtze et al.<sup>[30b]</sup> eine Reihe von amphiphilen fluorierten Diblocktensiden aus PEG und PFPE mit unterschiedlicher Kettenlänge her. Aus den Kombinationen erwiesen sich  $600 \text{ g mol}^{-1}$  PEG zusammen mit  $6000 \text{ g mol}^{-1}$  PFPE als optimal zur Ausbalancierung von Tröpfchenbildung und deren Langzeitstabilität für eine Speicherung außerhalb des Chips. Dieses Tensid war außerdem biokompatibel für biologische Anwendungen wie die PCR und die Kultivierung der Zellen.

In jüngerer Zeit wurden eine Reihe von neuartigen Fluortensiden getestet, die PFPE oder Perfluoralkyl(PFA)-Schwänze in Kombination mit Kohlenhydrat-, Kronenether- und Hexaethylenkopfgruppen enthalten. Insbesondere die beiden letzteren Gruppen brachten vielversprechende Ergebnisse bei der Stabilisierung von organischen Lösungsmitteltröpfchen.<sup>[46,53]</sup> PFPE-Hexaethylenglycol eignete sich besonders gut zur Stabilisierung von wässrigen Tröpfchen und Tröpfchen aus Acetonitril.

Bei der Suche nach einem Öl-Tensid-Systems, das so wenig wie möglich mit den Zellen und den im Tröpfchen eingeschlossenen aktiven Molekülen interferieren soll, kommt den Wechselwirkungen an der Öl-Wasser-Grenzfläche der Mikrotröpfchen (die ja ein besonders großes Oberfläche/Volumen-Verhältnis haben) eine starke Bedeutung zu. So wurde bei bestimmten Kombinationen von fluorierten Ölen und (ionischen) Fluortensiden eine nichtspezifische Absorption von Protein an der Grenzfläche festgestellt.<sup>[54]</sup> An der Tröpfchenoberfläche adsorbiertes Protein kann sich bei

Enzymassays oder Screenings mit funktionalen Proteinen als sehr schädlich auswirken.

Letztendlich müssen bei der Auswahl eines geeigneten Öl-Tensid-Systems auch die Transporteigenschaften betrachtet werden. Die in der dispergierten Phase gelösten Verbindungen sowie die Hauptkomponente selbst können über die Tröpfchen-Grenzfläche hinweg in die Dispersionsphase hinein migrieren. Obwohl man der Einfachheit halber die Tröpfchen gerne als geschlossenes Kompartiment ansieht, ist dies nicht immer der Fall. Sowohl der Transport von kleinen Molekülen aus der wässrigen Phase in die Ölphase hinein<sup>[55]</sup> als auch untereinander zwischen Tröpfchen unterschiedlicher Konzentration<sup>[56]</sup> wurde beobachtet. Für eine erfolgreiche Verkapselung – insbesondere bei Einzelzellanwendungen – muss daher ein Öl-Tensid-System ausgesucht werden, das sich sowohl mit dem Inhalt der Tröpfchen als auch mit der beabsichtigten Anwendung verträgt. Im Fall des Transports von modifizierten Cumarienen zwischen Tröpfchen durch eine fluorierte Ölphase hindurch stieg die Geschwindigkeit des Transports mit abnehmender Hydrophilie der Cumarine.<sup>[56]</sup> Dazu ist noch zu erwähnen, dass selbst Moleküle, die unmischbar mit und unlöslich in fluorierten Ölen sind, einen Mizelltransport durch die Ölphase eingehen können.

## 2.5. Komplementäre Formate zur Zellkompartimentierung

Außer der Mikrotröpfchen-Technologie wurde auch eine Reihe von zur Mikrofluidik komplementären Techniken entwickelt, die ebenfalls stark parallel und mit hohem Durchsatz durchgeführt werden können. Sie sind alle mehr oder weniger als Mikroarrays aufgebaut. Die Systeme enthalten miniaturisierte, in die Festkörper- oder Polymeroberfläche eingefräste oder eingeätzte Kompartimente mit Dichten von  $10^6$  Kompartimenten pro Apparatur.<sup>[57]</sup> Da diese Mikrotiterplatten den Zellen eine Oberfläche zum Anwachsen bieten, eignen sie sich besonders gut für Einzelzellassays und Assays von Klonen.<sup>[58]</sup> Die Komplettapparaturen enthalten im Hochdurchsatz-Operationsmodus enthalten im Allgemeinen zusätzlich eine automatisierte Mikroskopiereinrichtung.

Ein weiteres Beispiel für Apparaturen mit Arrayaufbau sind die hochgradig integrierten (LSI) elastomeren Fluidsysteme, bei denen die Kompartimentierung über Ventile gesteuert wird.<sup>[59]</sup> Solche Apparaturen werden für großformatige Projekte wie die die jüngste Sequenzierung des humanen Gesamtgenoms durch Einzelmolekültechniken eingesetzt.<sup>[60]</sup> Die Systeme bieten eine große Kontrollmöglichkeit mit vielen potenziellen Anwendungen, haben aber den Nachteil, dass ihre Komplexität die maximale Anzahl an Assays begrenzt.

Zwischen Tröpfchen und Festkörperarrays liegen die so genannten „SlipChip“-Systeme. Diese kombinieren zwei in Mikrofabrikation gefertigte Kompartiment- oder Kanaloberflächen, bei denen durch gegenseitiges Verschieben Flüssigkeitsbündel von einem Kompartimentensatz zu einem anderen, parallelen transportiert werden.<sup>[61]</sup> Von der miniaturisierten Kompartimentierung profitieren sowohl das die Tröpfchentechniken als auch alle anderen genannten For-

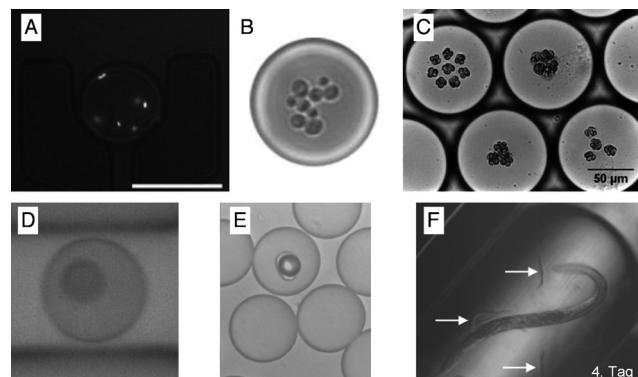
mate, denn die Miniaturisierung vereinigt die Vorteile der erhöhten Geschwindigkeit und Empfindlichkeit bei gleichzeitig geringerem Reagensverbrauch.

### 3. Zellen in Tröpfchen

Um viele zelluläre und subzelluläre Prozesse verstehen zu können und Informationen über die Heterogenität einer Zellpopulation zu sammeln, muss die Möglichkeit gegeben sein, Einzelzellen zu untersuchen. Ein Tröpfchen kann ein definiertes, kontrolliertes, zuordenbares und schnell transportierbares Kompartiment für die Kultivierung von Zellen sein. Das pikolitergroße Kompartiment bietet den Vorteil, etwa gleich groß wie die Zelle zu sein und der Einzelzelle eine Verknüpfung zu seiner individuellen Umgebung bieten zu können.

#### 3.1. Zellkultur in Tröpfchen

Für die Kultivierung von auf Platten kompartimentierten In-vitro-Zellkulturen, insbesondere die von Säugerzellen, muss eine Vielzahl von Bedingungen erfüllt sein. So müssen Nährstoffe aus einem Wachstumsmedium und ein Atemgas zur Verfügung stehen. Außerdem müssen von der Zelle produzierte toxische Faktoren entfernt werden, ehe die Konzentration ein wachstumsbeschränkendes oder sogar den Zelltod induzierendes Niveau erreicht. Die Standardmethoden mit Petrischale und Kulturgefäßen erfüllen zwar diese Bedingungen, aber es ist keine Kompartimentierung von Klonen oder individuellen Zellen vorgesehen. In Tröpfchen können die notwendigen Lebensbedingungen für viele Zellarten wie Bakterien,<sup>[42,62]</sup> Hefe,<sup>[30b]</sup> Hybridomzellen,<sup>[63]</sup> adhärent wachsende Säuger-<sup>[64]</sup> und Insektenzellen<sup>[65]</sup> und sogar humane Zellen<sup>[52,66]</sup> bereitgestellt werden (Abbildung 3). So behielten Einzelzellen der humanen Zelllinien Jurkat (nicht adhärent) und HEK293T (adhärent) drei Tage lang ihre Lebensfähigkeit zu mehr als 80%.<sup>[52]</sup> Auch adhärente Insektenzellen wurden verkapselt.<sup>[65]</sup> Um ihre normalen Wachstumsbedingungen besser nachzubilden, wurden diese adhärenten Zellen auf festen Oberflächen kultiviert. Sogar ganze Nematoden (*C. elegans*)<sup>[52]</sup> und der Zebrafisch (*D. rerio*)<sup>[67]</sup> sind in stabilen Tröpfchen von knapp Mikrolitergröße verkapselt worden. Eine Zellproliferation wurde ebenfalls für Bakterien (*E. coli*)<sup>[68]</sup> und *S. aureus*<sup>[69]</sup>, Mikroalgen<sup>[70]</sup> (*C. reinhardtii*, *C. vulgaris*, *D. tertiolecta*) und Hefe (*S. cerevisiae*)<sup>[71]</sup> in den Tröpfchen nachgewiesen. Zunächst proliferierten die verkapselten Zellen kaum langsamer als unter Standardkulturbedingungen, aber dann stoppte das Wachstum. Grund könnte ein Mangel an Nährstoffen oder die Produktion von toxischen Faktoren sein. Dagegen sekretierten nicht proliferierende Hybridomzellen bestimmte Antikörper mit ähnlicher Geschwindigkeit wie unter normalen Kulturbedingungen. Dies zeigten Analysen von Tröpfchen, die zunächst gesammelt wurden, wieder verschmolzen, und dann auf ihren Gehalt an Antikörpern hin untersucht wurden.<sup>[63]</sup>



**Abbildung 3.** Verkapselung von verschiedenen Zellarten in Tröpfchen und Nachweis ihrer Lebensfähigkeit. A) RFP exprimierende *E. coli*-Zellen.<sup>[97d]</sup> B) Tröpfchenkultur von *S. cerevisiae*-Klonen, die in den Tröpfchen proliferieren.<sup>[30b]</sup> C) Die grüne Mikroalge *C. reinhardtii*.<sup>[70]</sup> D) Humane monocyttische U937-Zellen.<sup>[115]</sup> E) Auf Mikrokugelchen wachsende adhärente Insektenzellen von *B. mori*.<sup>[65]</sup> F) Zwei Generationen von in Tröpfchen kultivierten *C. elegans*-Zellen. Die Pfeile markieren die zweite Generation der Tröpfchen-kultivierten Wurmzellen.<sup>[52]</sup> (Nachdruck mit freundlicher Erlaubnis von: (A), (B) und (C) The Royal Society of Chemistry, 2009, 2008 und 2011, (D) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, 2009, (E) und (F) Elsevier, 2010 und 2008, aus *Chemistry & Biology*.)

Säugerzellen proliferierten in diesen Studien jedoch nur stark verlangsamt oder kaum merklich.<sup>[52]</sup> Diesen Zellen Bedingungen zur normal schnellen Proliferation in den Tröpfchen zu verschaffen, ist derzeit noch ein ungelöstes Problem. Vor dessen Lösung muss allerdings auch die Frage beantwortet sein, wieweit sich die Zellen in den Tröpfchen von denen in Standardkulturen unterscheiden. Ein entscheidendes Kriterium für Langzeitkulturen von aeroben Zellen könnte die Effizienz sein, mit der die die fluorierten Öle Sauerstoff und Kohlendioxid transportieren.<sup>[72]</sup>

In der bislang stringentesten Evaluierung über die Lebensfähigkeit von Zellen nach der Verkapselung wendeten Brouzes et al. ein neu entwickeltes Assay zur Fluoreszenzbestimmung von lebenden und toten Zellen auf humane U937-Zellen an, das eine Lebensfähigkeit von über 80% nach 4 Tagen bescheinigte (Abbildung 7D2).<sup>[66]</sup> Aus der Studie geht jedoch auch hervor, dass injizierte Zellen zu etwa 15% einen Zelltod erleiden. Dies geschieht während oder unmittelbar nach der Tröpfchenbildung und wird auf Scherspannung bei der Injektion und/oder die Wechselwirkung mit den fluorierten Ölen oder Tensiden zurückgeführt.

#### 3.2. Rückgewinnung von Zellen, Einfriervorgänge und Zellyse in Tröpfchen

Die Rückgewinnung von Zellen aus den Tröpfchen geschieht zumeist durch Zugabe von destabilisierenden chemischen Reagentien zur Ölphase<sup>[52]</sup> und Schütteln der Emulsion. Eine möglicherweise elegantere und weniger zytotoxische Methode ist die elektronische gesteuerte Überführung von Tröpfchen in eine kontinuierliche Phase,<sup>[73]</sup> mit der aber bislang nur verkapselte Mikrokugelchen wiedergewonnen wurden. Um Zellen oder Proben für längere Zeit aufzube-

wahren, werden sie üblicherweise eingefroren. Eingefrorene und nach einer Woche wieder aufgetaute B-Zellen der Maus blieben weiter lebensfähig.<sup>[74]</sup>

Ein Grund für die Kompartmentierung von Einzelzellen ist die Möglichkeit, isolierte Zellen individuell und in definierter Umgebung zu manipulieren, ohne andere Zellen zu beeinflussen. So wurden Mastzellen der Maus in Tröpfchen durch Erhitzen und Photoanregung mit einem Laser individuell lysiert.<sup>[75]</sup> Die Zellyse innerhalb eines Tröpfchens ermöglicht die kontrollierte Freisetzung des Zellinhalts in das Pikoliter fassende „Gefäß“ des Tröpfchens. Anschließend kann der Zellinhalt massenspektrometrisch und durch RNA oder DNA-Sequenzierung analysiert werden.

### 3.3. Transfektion, Transduktion und Transformation in Tröpfchen

Um die Zelle zur Expression von Fremdprotein zu bringen und um andere gängige molekularbiologische Techniken wie zum Beispiel die RNA-Stummschaltung anwenden zu können, müssen die Zellen genmanipuliert werden. Dies kann bei eukaryotischen Zellen durch die Einführung von exogener DNA oder RNA durch Transfektion oder bei Bakterienzellen durch einfache DNA-Aufnahme geschehen, andere Möglichkeiten sind die Transformation oder die virale Transduktion. So gelang es, in Tröpfchen Hefe<sup>[76]</sup> und Ovarien des Chinesischen Hamsters (CHO-Zellen)<sup>[77]</sup> mit Fremdplasmiden zu transfizieren. Hierfür wurde die Zellmembran vorübergehend perforiert und dann das Plasmid in das intrazelluläre Kompartment übergeführt. Verkapselfte CHO-Zellen wurden auch chemisch transfiziert.<sup>[78]</sup> Durch das nur Pikoliter fassende Volumen der Tröpfchen lassen sich große Plasmidkonzentrationen unmittelbar an der elektroporierten Zelle aufbauen und somit die Effizienz steigern. Gleichzeitig ist sichergestellt, dass die Zelle im Tröpfchen nur dem Gen ausgesetzt ist. Eine besonders interessante Methode zum Aufbau von Diversitätsbibliotheken von Zellen ist die Transfizierung von Einzelzellen in Mikrotröpfchen, die jeweils unterschiedliche Plasmidklone enthalten.<sup>[79]</sup> Auch eine gemeinsame Verkapselung von Wirtsbakterien mit Bakteriophagen als Genlieferanten wurde vorgestellt.<sup>[80]</sup>

## 4. Manipulation der Tröpfchen und Analyse

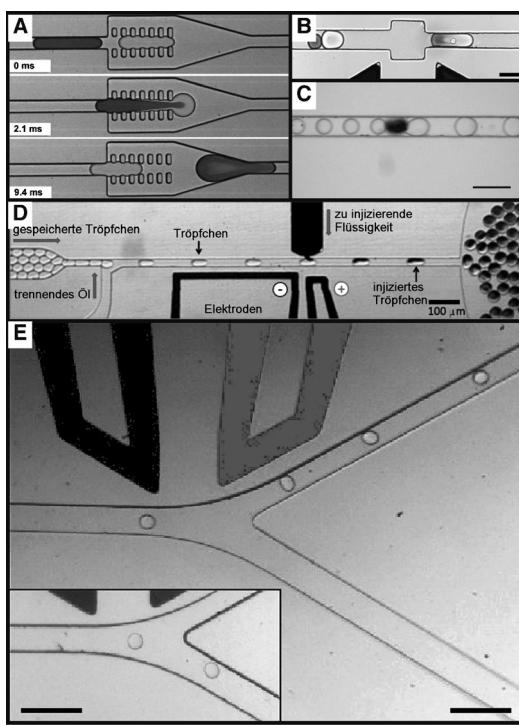
Einer der Hauptvorteile der Tröpfchen-Mikrofluidik ist die automatisierte Manipulation der Tröpfchen. So bietet die Tröpfchen-Mikrofluidik unter anderem Module zur Tröpfchenverschmelzung, zur Zugabe von Material durch Pikoinjektion, zur Aufspaltung von Tröpfchen, zur Inkubation und zur aktiven und passiven Sortierung. Diese Module werden auf Chips kombiniert und für ein bestimmtes Bioassay maßgeschneidert. Da der Aufbau in immer komplexere Systeme nicht komplikationsfrei ist, werden die Assays in manchen Fällen auch batchweise und unter Entflechtung der einzelnen Manipulationen ausgeführt. Mittlerweile ist es üblich, die einzelnen Systeme oder die Chips vorzufertigen und dann für spezifische Anwendungen iterativ zu optimieren. Andererseits gibt es inzwischen auch einen gewissen Konsens über das

Design der gängigsten Operationen (z.B. Tröpfchenerzeugung, Rückinjektion von Tröpfchen, In-Kanal-Inkubation und Tröpfchensortierung).

### 4.1. Verschmelzung von Tröpfchen und Pikoinjektion – Zugabe von Medium und Reagentien

In den mikrofluidischen Tröpfchensystemen ist die Tröpfchenverschmelzung ein überaus wichtiger Vorgang, denn nur so kann einem schon vorhandenen Tröpfchen Material zugefügt werden. Addierte Tröpfchen versorgen die Einzelzelle mit Enzymsubstraten, genetischem Material oder frischem Zellmedium, oder aber auch mit Reagentien als Reaktionsstarter, Stimuli oder Mittel zur Zellyse. Damit tensidstabilisierte Tröpfchen verschmelzen können, müssen zwei Bedingungen erfüllt sein. Zunächst müssen die Tröpfchen in Kontakt kommen und dann muss ihre stabilisierende Tensidschicht zerstört werden. Zur Destabilisierung der Tensidschicht wurden mehrere Strategien entwickelt, zum Beispiel ein auf die Tröpfchen einwirkender großer elektrischer Feldgradient,<sup>[81]</sup> die Aufladung der Tröpfchen,<sup>[82]</sup> die Entfernung von Tensid aus der Ölphase, was zur Verarmung der Grenzflächen-Tensidschicht führt,<sup>[83]</sup> oder das Erhitzen durch einen Laser.<sup>[84]</sup> Nicht durch Tenside stabilisierte Wassertröpfchen in Öl oder Fluorkohlenwasserstoffen verschmelzen spontan, wenn sie miteinander in Kontakt kommen.<sup>[85]</sup>

Der Kontakt der Tröpfchen für die Verschmelzung wird entweder durch die Chipstruktur oder besondere Oberflächenmerkmale ausgelöst. Diese bremsen das als erstes fließende Tröpfchen soweit ab, dass das nächste es einholen kann. Bei stark synchronisierten Tröpfchen funktioniert dies mit<sup>[82]</sup> oder ohne elektrische Aufladung.<sup>[88]</sup> Kanaldesigns für solche aufholende Tröpfchen sind zum Beispiel der Einbau von Säulenreihen (Abbildung 4A),<sup>[86]</sup> Windungen<sup>[83]</sup> und Kanalverbreiterungen (Abbildung 4B).<sup>[66]</sup> Auch eine hydrophile Verschmelzung wurde beschrieben (Abbildung 4C).<sup>[85b]</sup> Der Durchsatz bei diesen Methoden reicht von tausenden Tröpfchen pro Sekunde bei elektronischen Methoden und Tensidvariationen bis zu einem Tröpfchen pro Sekunde für die Lasererhitzung. Einer der Hauptvorteile des elektronisch gesteuerten Verschmelzungsprozesses ist die Möglichkeit, das Feld nach Belieben an- und abzuschalten, sodass nur ganz bestimmte Tröpfchenpaare bei Kontakt verschmelzen, zum Beispiel nur solche mit Fluoreszenzeigenschaft. Allerdings macht die zur Entscheidung und zum Verschmelzungsvorgang eingesetzte Elektronik das mikrofluidische System deutlich komplexer. Bremond et al. setzten sich ausführlich mit der Dynamik des Tröpfchenverschmelzens ohne Einfluss eines elektrischen Feldes auseinander.<sup>[87]</sup> Sie kamen in ihrer Studie zu dem etwas überraschenden Ergebnis, dass zwei miteinander in Kontakt stehende Tröpfchen genau in dem Moment miteinander verschmelzen, wenn sie sich wieder voneinander entfernen. Eine ähnliche Untersuchung über den elektronisch gesteuerten Verschmelzungsvorgang kam zum Schluss, dass an Tröpfchen, deren Abstand voneinander klein genug ist, ein elektrisches Feld von adäquater Stärke angelegt werden muss.<sup>[88]</sup>



**Abbildung 4.** Mikrofluidikmodule für die Tröpfchenverschmelzung. A) Passive säuleninduzierte Verschmelzung von tensidfreien Tropfen,<sup>[86]</sup> B) Elektrokoaleszenz von tensidstabilisierten Tröpfchen,<sup>[66]</sup> C) Oberflächenbenetzung und D) Inline-Tröpfcheninjektion.<sup>[89]</sup> Ausschnitt der dielektrophoretischen Tröpfchensortierung bei angeschaltetem (großes Bild) und abgeschaltetem (kleines Bild) elektrischen Feld.<sup>[68]</sup> (Nachdruck von (A) und (E) mit Erlaubnis von The Royal Society of Chemistry, 2008, (B) und (D) von The National Academy of Sciences USA, 2009 und 2010, (C) von H. N. Joensson, 2010.)

Abate und Mitarbeiter berichteten unlängst über eine alternative, direkte Injektionsmethode, um den Tröpfchen mithilfe von elektrischen Feldern definierte Volumina zuzufügen (Abbildung 4D).<sup>[89]</sup> Hierbei befinden sich die zu injizierenden Tröpfchen unter konstantem Druck in einem Kanal, der mit dem Injektionskanal in Verbindung steht. Alle Öl-Wasser-Grenzflächen sind durch Tenside stabilisiert, sodass die injizierten Tröpfchen den Flüssigkeitsmeniskus ohne Koaleszenz passieren können. Durch das Anschalten des elektrischen Feldes an Elektroden auf der gegenüberliegenden Seite des Meniskus wird die tensidstabilisierte Grenzfläche zerstört und die Flüssigkeit im angeschlossenen Kanal in jedes einzelne Tröpfchen injiziert, das diesen Kanal passiert. Auch eine Pikoinjektion kann eine leistungsfähige Alternative zur herkömmlichen Tröpfchenverschmelzung sein, wenn eine Tröpfchenpopulation mit Flüssigkeit aus einem oder einigen wenigen Reservoirs fusioniert werden soll und nicht Tröpfchen zweier zuvor separat erzeugter Populationen fusioniert werden sollen.

#### 4.2. Sortierung und Trennung der Tröpfchen

Die Sortierung oder Abzweigung von Tröpfchen mit dem Ziel, eine bestimmte Untergruppe von Tröpfchen zu isolieren, wird im Bereich der Zellforschung bereits vielfach ange-

wendet. Für zirkulierende Tumorzellen, für die Produktion von Hybridomzellen oder im Wirkstoffscreening gilt die Isolierung einer kleinen Subpopulation von Zellen für weitere Analysen als entscheidender Schritt. Für die Sortierung von Tröpfchen müssen die einzelnen Untergruppen durch ein bestimmtes Merkmal unterscheidbar sein. Bei aktiven Methoden mit berechneter oder Ad-hoc-Entscheidung kommen im Allgemeinen Fluoreszenzverfahren zur Unterscheidung der Untergruppen zur Anwendung. Die passive Tröpfchensortierung stützt sich hingegen auf selektive Kanalgeometrien zur Unterscheidung der Tröpfchengröße.

Bei den aktiven Prozessen werden die mikrofluidisch erzeugten Tröpfchen durch Aufladung und Abzweigung der geladenen Tröpfchen in einem elektrischen Feld sortiert,<sup>[82]</sup> was dielektrophoretisch<sup>[90]</sup> oder durch örtliches Erhitzen stattfinden kann.<sup>[41]</sup> Beim dielektrophoretischen Fluoreszenzverfahren werden Geschwindigkeiten von etwa 2000 Tröpfchen pro Sekunde erreicht (Abbildung 4E).<sup>[68]</sup> Diese Sortiertechnik nutzt einen sehr steilen elektrischen Feldgradienten von üblicherweise AC-Feldern von 30 kHz und 1 kV (von Spitze zu Spitze) bei einem Elektrodenabstand von < 100 µm. Bei Anlegen des Feldes werden die Tröpfchen in den Arm einer Y-Kreuzung gezwungen, der den höheren hydrodynamischen Widerstand aufweist, während sie ohne Feld normalerweise den Arm mit dem geringeren Widerstand nehmen. Der mögliche Durchsatz ist durch Scherkräfte an der Gabelung begrenzt, und mit kleinerem Tröpfchenabstand steigt die Fehlerquote drastisch an.<sup>[68]</sup> Die dielektrophoretische Sortierung wird robuster, wenn an der Y-Kreuzung Umgehungskanäle eingebaut sind.<sup>[91]</sup> Obwohl bereits Zellen (z.B. Hefezellen<sup>[68]</sup>) aus den Tröpfchen rückgewonnen und nach der dielektrophoretischen Sortierung neu kultiviert wurden, sind noch keine detaillierten Studien über die Lebensfähigkeit der Zellen nach der Tröpfchensortierung bekannt. Lediglich für die humane U937-Zelllinie wurde nach einer elektronisch gesteuerten Tröpfchenverschmelzung (bei etwas kleineren Potentialen) und anschließender Inkubation über Nacht eine Lebensfähigkeit von > 80 % festgestellt.<sup>[66]</sup> Im Vergleich dazu werden mit fluoreszenzaktivierte Zellsortierern (FACS) Geschwindigkeiten von über 70000 Zellen pro Sekunde erreicht,<sup>[92]</sup> wobei es hier aber nicht möglich ist, die Zellen mitsamt ihrer natürlichen Umgebung zu sortieren (zusammen mit anderen Zellen oder Molekülen, mit denen sie wechselwirken, oder mit sekretierten Molekülen).

Eine Sortierung durch örtliches Erhitzen wird mit Hochleistungslasern von > 100 mW durchgeführt. Diese heizen die Tröpfchen lokal auf und zerstreuen sie dadurch. Ein solches Sortierverfahren hat in der Regel einen kleineren Durchsatz.

Anders als bei den aktiven Verfahren wird bei passiven Methoden keine Elektronik für einen aktiven Trennvorgang eingesetzt. Stattdessen läuft die Auf trennung über die Chipstruktur und die Hydrodynamik ab. Apparaturen mit hydrodynamischer Sortierung trennen die Tröpfchen anhand ihrer Größe; so wurde die Plateau-Rayleigh-Instabilität von durch Strahlbildung (jetting) erzeugten Tröpfchen<sup>[44]</sup> genutzt, um die Tröpfchen an einem Ψ-förmig gegabelten Kanal mit Auslässen negativem Drucks zu trennen,<sup>[93]</sup> oder die Aufteilung wurde durch deterministische laterale Auslenkung (deterministic lateral displacement, DLD)<sup>[45]</sup> erreicht. Die pas-

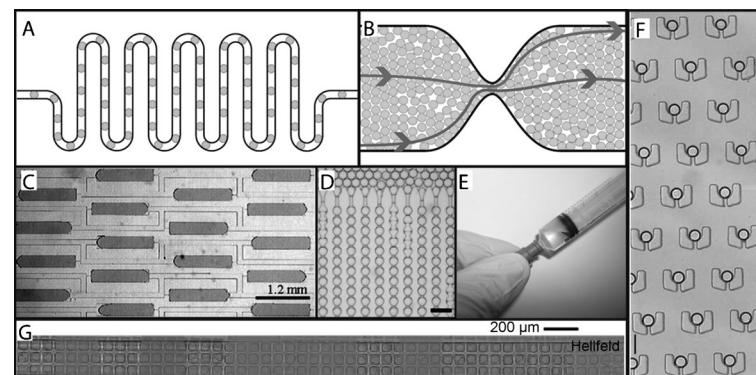
sive Trennung ermöglicht eine Parallelisierung der hydrodynamischen Techniken. Bemerkenswert im Hinblick auf die Einzelzellanalyse ist, dass für die Sortierung nach der Plateau-Rayleigh-Instabilität und dem DLD-Verfahren die Tröpfchengröße von dem Vorhandensein von Zellen in den Tröpfchen abhängt. Im Fall der Plateau-Rayleigh-Instabilität machten die Zellen die Tröpfchen größer, und diese konnten dann hydrodynamisch sortiert werden. Bei der DLD-Methode schrumpften hingegen diejenigen Tröpfchen, die wachsende und sich teilende Hefezellen enthielten. Tröpfchen ohne Zellen schrumpften nicht. Die Tröpfchen konnten dann anhand ihres Zellinhalts nach der Größe sortiert werden.

#### 4.3. Inkubation und Speicherung der Tröpfchen

Die Inkubation spielt bei den meisten biologischen Assays eine wichtige Rolle. Für die Speicherung oder Inkubation von Tröpfchen gibt es mehrere unterschiedliche Ansätze, die jeweils auf bestimmte Inkubationsszenarien abzielen. Um eine Inkubationsmethode auszuwählen, muss zum Beispiel die Inkubationszeit auf die im Assay geforderte Zeitdauer abgestimmt und die erforderliche Präzision bei der Probenlokalisierung bekannt sein. Für Inkubationszeiten im Sekundenbereich ( $< 1$  min) können die Tröpfchen einfach der Reihe nach im Kanal inkubiert werden,<sup>[94]</sup> was ein exaktes Timing auf die Millisekunde genau und eine präzise Steuerung der Tröpfchenabfolge ermöglicht. Werden jedoch mehrere Minuten Inkubationszeit benötigt, ist diese Methode nicht mehr anwendbar, weil der hydrodynamische Widerstand mit der Kanallänge zunimmt. Um länger inkubieren zu können, werden breitere und tiefere Speicherkanäle verwendet, in denen die Tröpfchen einander passieren können.<sup>[66]</sup> Dem Gewinn an Inkubationszeit durch diese breiteren und tieferen Strukturen stehen jedoch Konzessionen beim exakten Timing gegenüber, das heißt der genauen Lokalisierung der Tröpfchen. Die variable Inkubationsdauer beruht auf der unterschiedlichen Geschwindigkeit, die die Tröpfchen aufgrund der Parabelform des Fließgeschwindigkeitsprofils an verschiedenen Positionen im Kanalquerschnitt haben. Es ist möglich, diese großen Geschwindigkeitsunterschiede zwischen den Tröpfchen an verschiedenen Positionen durch den Einbau von Verengungen entlang des Kanals anzugeleichen, an denen die Tröpfchen wieder neu durchmischt werden.<sup>[95]</sup> Ebenfalls kann der Kanal durch Verzweigung in mehrere Tochterkanäle aufgeteilt werden. Tröpfchen, die aus einer zu 64% wässrigen Volumenfraktion stammen und Kanäle von mehreren hundert Mikrometern Durchmesser durchströmten, wurden nach der Inkubation trotz gewisser Dispersion erfolgreich analysiert.<sup>[96]</sup> Für Inkubationszeiten von Stunden bis zu Tagen werden die Tröpfchen im Allgemeinen in Ampullen oder Spritzen gelagert, was nur bei sehr stabilen Emulsionen möglich ist. In diesen Fällen wird die Population im Ganzen inkubiert und keine Information über die Se-

quenz, in der die Tröpfchen erzeugt worden sind, bleibt erhalten. Die Spritzenspeicherung ist eng mit der Rückinjektion und der Dispergierung von Tröpfchen in einen Ölstrom verknüpft. Die Apparaturen für die Rückinjektion ähneln in ihrer Geometrie den von Tröpfchenerzeugern durch Flussfokussierung.

Für die Aufnahme von Zeitserien, bei denen für jedes einzelne Tröpfchen mehrere Signale gemessen werden, wurden mehrere Abfangstrategien für die Tröpfchen entwickelt. Dazu gehören „Dropspot“<sup>[71]</sup> und ähnliche Methoden,<sup>[97]</sup> das Auffangen in Vertiefungen<sup>[98]</sup> oder Kompartimenten seitlich der Kanäle.<sup>[99]</sup> Besonders elegant ist die Methode von Boukellal et al., bei der als einzige bei der Ejektion die Sequenz der Tröpfchen erhalten bleibt. Um die Anzahl Tröpfchen per Flächeneinheit zu maximieren, wurde eine Schichtung der Tröpfchen vorgeschlagen.<sup>[100]</sup> In Abbildung 5 sind einige Inkubationsmethoden zusammengestellt. Wenn die Tröpfchen auf Chips aus einem gasdurchlässigen Material wie zum Beispiel PDMS gelagert werden sollen, muss be-



**Abbildung 5.** Inkubation der Tröpfchen in A) einem engen Kanal, B) einem weiteren Kanal mit Verengungen zur Wiedervermischung der Tröpfchen (verändert aus Lit. [95]), C) einer seriellen Auffanganordnung,<sup>[97c]</sup> D) einer „Dropspot“-Anordnung,<sup>[71]</sup> E) einer ölfüllten Spritze, F) einer statischen Anordnung, die durch den Fluss stabilisiert ist,<sup>[97d]</sup> G) einer Anordnung von invertierten Vertiefungen.<sup>[98]</sup> (Nachdruck von (C), (D) und (F) mit Erlaubnis von The Royal Society of Chemistry, 2009, und (G) von The American Chemical Society, 2009.)

sonders oberhalb der Raumtemperatur die Verdampfung miteinkalkuliert werden. Zur Verdampfung kommt es zum Beispiel beim thermozyklischen On-chip-PCR-Verfahren.

#### 4.4. Sonstige Manipulationen an den Tröpfchen

Außer dem Verschmelzen von Tröpfchen, der Sortierung und Inkubation gibt es noch viele weitere Möglichkeiten, Tröpfchen zu manipulieren. So ist die Aufspaltung von Tröpfchen eine passive Technik, um Tröpfchen in zwei Tochtertröpfchen von definierter Größe aufzuteilen.<sup>[48]</sup> Durch Spaltung können zum Beispiel aus einem größeren Tröpfchen Proben entnommen werden, oder in Kombination mit einer Tröpfchenverschmelzung kann der Inhalt der Tröpfchen verdünnt werden.<sup>[101]</sup> Solche Verdünnungen werden weniger auf Zellen enthaltende Tröpfchen angewendet, sondern wahrscheinlich mehr für zukünftige Anwendungen, um Langzeit-

Zellkulturen mit Nährstoffen zu versorgen und deren selbstproduzierte toxischen Substanzen zu verdünnen.

Eine weitere Manipulationstechnik ist die rasche Vermischung des Inhalts von Tröpfchen durch chaotische Advektion in gewundenen Kanälen.<sup>[102]</sup> Mit dieser Technik lässt sich der Tröpfcheninhalt im Submillisekundenbereich vollständig durchmischen.<sup>[103]</sup> Eine weitere Möglichkeit, pikolitergroße Kompartimente zu durchmischen, ist die Rotation von selbstorganisierenden Ketten magnetischer Nanopartikel innerhalb des Tröpfchens.<sup>[104]</sup>

#### 4.5. Nachweis und Analyse der Tröpfchen

Eine große Zahl von Techniken eignet sich, um die Tröpfchen anhand ihres Inhalts nachzuweisen und zu analysieren. Dazu gibt es eine ausführliche Übersicht von Theberge et al.<sup>[13a]</sup> Vorherrschend unter diesen Techniken sind die lichtbasierten Methoden im Allgemeinen und im Besonderen die Fluoreszenztechnik. Nachweismodalitäten sind die sequentielle Messung der laserinduzierten Fluoreszenzintensität (LIF) unter hohem Durchsatz (< 10 kHz) durch Photomultiplier oder die parallele Messung durch bildgebende fluoreszenzmikroskopische Verfahren. Die für die sequenziellen LIF-Messungen verwendeten Optiken und Detektoren ähneln im Prinzip denen der Durchfluszytometrie.<sup>[105]</sup> Ergänzt sind sie lediglich um eine Anordnung von Linsen, die den einfallenden Laserstrahl zu einer Linie senkrecht zum Kanal bündeln, um das gesamte passierende Tröpfchen gleichmäßig auszuleuchten. Die Bildaufnahme von statischen Tröpfchen und der LIF-Nachweis von sich bewegenden Tröpfchen sind komplementäre Techniken, mit denen verschiedene Anwendungen bedient werden. Allgemein gesprochen kann die LIF-Messung an ein Tröpfchenscreening angeschlossen werden, sodass schnelle Ereignisse mit hoher Zeitauflösung erfasst werden können, während die kontinuierliche Aufnahme von statischen Anordnungen eine bessere Auflösung im Langzeitbereich ermöglicht, wenn eine große Zahl von Kompartimenten mit unterschiedlichem Inhalt abgedeckt werden sollen. Letztere Technik wurde bislang noch nicht mit einer Sortierung verknüpft. Um die Empfindlichkeit zu erhöhen oder es zu ermöglichen, dass das gesamte Assay auf einem Chip abläuft, wurden mehrere Fluoreszenztechniken wie die Fluoreszenzpolarisation,<sup>[106]</sup> der Förster-Energietransfer (FRET)<sup>[107]</sup> und die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) eingesetzt und weiterentwickelt.<sup>[97a, 108]</sup> Die fluoreszenzmikroskopische Bildaufnahme von Tröpfchen-Monoschichten, die zehntausende Tröpfchen enthalten, wird dagegen häufiger alternativ oder als Ergänzung zur laserinduzierten Fluoreszenzanalyse genutzt. Bei der digitalen Tröpfchenanalyse (DDA) werden simultan Bilder von zehntausenden Tröpfchen aufgenommen. Mit dieser Technik, die eigentlich für die Bestimmung der Variation der Kopienzahl von Genen<sup>[109]</sup> oder die Quantifizierung von seltenen Mutationen<sup>[110]</sup> eingesetzt wird, kann man durch einfache Zählung der Moleküle in einer kompartimentierten Lösung die Konzentration eines bestimmten DNA-Fragments erfassen. Die untere Nachweisgrenze ist dann durch die Zahl der analysierten Tröpfchen definiert. Bei der DDA werden zunächst

die DNA-Fragmente auf eine Konzentration verdünnt, die weniger als ein Molekül per Tröpfchenvolumen entspricht, diese dann zusammen mit den PCR-Reagenten in Tröpfchen verkapselt, die sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden durch Hybridisierung aktiviert und die Polymerasereaktion ausgelöst. Nach den Thermozyklen werden diejenigen Tröpfchen nachgewiesen, die die spezifische DNA-Sequenz enthalten, und anhand der emittierten Fluoreszenz gezählt. Die Fluoreszenzsignale von einer Million Tröpfchen, das heißt bis zu drei Ebenen von in Kristallstrukturen verpackten Tröpfchen, wurden auf diese Weise gemessen.<sup>[111]</sup>

Auch eine Reihe von chemischen, nicht fluoreszenzbasierten Analysemethoden wurden mit der Tröpfchen-Mikrofluidik verbunden, darunter die Massenspektrometrie (MS),<sup>[112]</sup> die Kapillarelektrophorese (CE)<sup>[113]</sup> und die Raman-Spektroskopie. Diese etablierten Techniken wurden in den Arbeitsablauf der Tröpfchenmikrofluidik integriert, um Biomoleküle zu analysieren. Lediglich CE und MS besaßen jedoch die Kapazität zur Analyse von einzelnen Tröpfchen, und mit der Raman-Spektroskopie konnten nur Ensemblemessungen an einer großen Zahl von Tröpfchen vorgenommen werden.

### 5. Einzelzellanalyse in Tröpfchen

#### 5.1. Hochdurchsatzanalyse an Einzelzellen

Die Reihenuntersuchung von Tröpfchen, die mit einer Spritze aufgenommen und dann zum Laser für eine anschließende LIF-Analyse gebracht werden, ist als Hochdurchsatzanalyse von Einzelzellen möglich, die zusammen mit ihrer Umgebung verkapselt sind. Einer der ersten Einsatzes dieses Verfahrens war die Analyse der GFP-Expression von verkapselten Einzelzellen.<sup>[42]</sup> Der Nachweis der Zellfluoreszenz lief hier ähnlich ab wie bei der Durchfluszytometrie. Eine sehr übliche Methode in der Durchfluszytometrie ist auch der Nachweis von fluoreszierenden antikörpermarkierten Zellen. Auf diese Weise wurden mit einem Aufbau zur Bestimmung der konfokalen Fluoreszenz eingekapselte Knochenhautzellen aus Gewebsproben von Patienten analysiert und einzelne Progenitorzellen in einer heterogenen Zellprobe eindeutig identifiziert.<sup>[114]</sup> Vor der Verkapselung wurden die Zellen mit Antikörpern markiert. Gegenüber der Durchfluszytometrie bietet die Verkapselung in stabile Tröpfchen den einzigartigen Vorteil, dass das Tröpfchenkompartiment als pikolitergroßer Auffangbehälter für die sekretierten Moleküle dienen kann, zum Beispiel Antikörper aus Hybridomzellen.<sup>[63]</sup> An den sekretierten Biomolekülen, die mit der Zelle weiterhin geno- und phänotypisch verbunden sind, können dann tröpfchenbasierte Assays homogener Proben vorgenommen werden wie zum Beispiel die Analyse der räumlichen Fluoreszenzverteilung,<sup>[63]</sup> FP<sup>[106]</sup> oder eine FRET-Bestimmung.<sup>[107]</sup> Dagegen ist die Durchfluszytometrie, die ebenfalls den fluoreszierenden Hintergrund der Zelle wahrnimmt, auf die Untersuchung von stark und mittelstark vorkommenden Biomarkern beschränkt.<sup>[8]</sup> Die pikolitergroßen Tröpfchen, in denen die Einzelzellen kompartimentiert sind, liefern das Gefäß, in dem das Fluoreszenzsi-

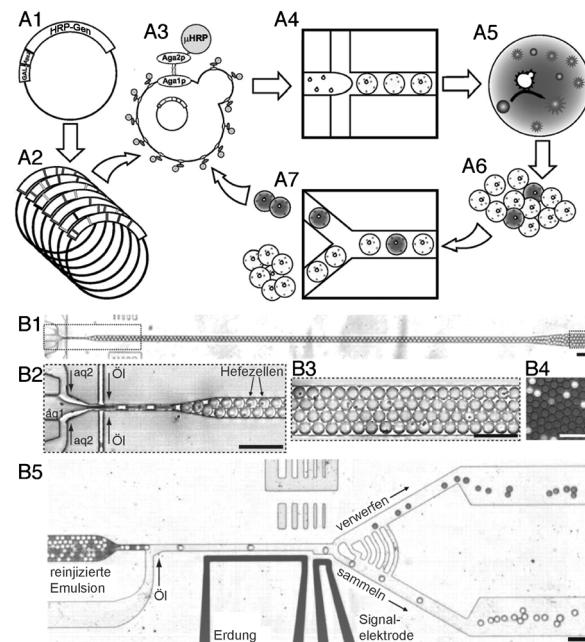
gnal eines markierten Antikörpers enzymatisch verstärkt werden kann.<sup>[115]</sup> Mit einem solchen Assay wurden humane Einzelzellen (U937) auf die seltenen Oberflächenprotein-Biomarker CCR5 und CD19 geprüft. Obwohl es auf diese Weise prinzipiell gelang, Proteine in Tröpfchen nachzuweisen, ist es noch sehr schwierig, einfache Nachweismethoden mit Antikörpern zu entwickeln, bei denen die Tröpfchen nicht vor der Verkapselung markiert und gewaschen werden müssen. Mary et al. beschreiben eine Wasch- oder Verdünnungsmethode, die das Verfahren möglicherweise einen Schritt näher an die automatisierte Antikörperanalyse in Tröpfchen heranbringt.<sup>[101a]</sup>

## 5.2. Enzymatische Analyse von Einzelzellen

Die Analyse von in Emulsionen kompartimentisierten Enzymen ist eine der frühesten Anwendungen der Tröpfchen-Mikrofluidik und wurde von Griffiths und Tawfik zu einer Hochdurchsatztechnik weiterentwickelt.<sup>[20,116]</sup> Zahlreiche Veröffentlichungen befassen sich mit der Charakterisierung von in vitro exprimierten oder gereinigten Enzymen.<sup>[81c,94,117]</sup> Auch DDA-Analysen wurden für Enzymanalysen durchgeführt.<sup>[118]</sup>

In mikrofluidisch produzierten Tröpfchen wurden auch zellexprimierte Enzyme analysiert. Solche Analysen sind besonders dann interessant, wenn es sich um sekretierte Proteine handelt, oder ein nichtgebundenes extrazelluläres Reporter- oder Signalmolekül für die Proteinanalyse verwendet wird, zum Beispiel ein fluorogenes Enzymsubstrat, das extrazellulär im Tröpfchen vorkommt. Auch hier stellt das Tröpfchen das Kompartiment dar, in dem der Genotyp (in der Zelle) mit dem Phänotyp (die erzeugten Fluorophoren oder sekretierten Biomoleküle) verknüpft ist. Eine zellbasierte Expression von Enzymen in Tröpfchen wurde für die alkalische Phosphatase (AP)<sup>[119]</sup> und die  $\beta$ -gal-Expression<sup>[68]</sup> in *E. coli* durchgeführt. In beiden Fällen wurden fluorogene Substrate verwendet. Diese Substrate ähneln dem natürlichen Substrat des Enzyms, enthalten aber auch ein Fluorophor, dessen Fluoreszenz im substratgebundenen Zustand unterdrückt ist. Nach Freisetzung durch das Enzym steigt dann die Fluoreszenzintensität steil an. Im AP-Assay wurden die Zellen enthaltenen Tröpfchen in invertierten Vertiefungen aufbewahrt und wiederholt auf ihre Fluoreszenz hin bestimmt, um Zeitserien aufzunehmen, aus denen die Enzymkinetik abgelesen werden kann. Darüber hinaus coexprimierten die *E. coli*-Zellen ein rotes Fluoreszenzprotein (mRFP1), das zur Normalisierung der Proteinexpression diente.

Mithilfe des tröpfchenbasierten Screenings nach zellexprimierten Enzymen wurden auch Versuche zur gerichteten Evolution durchgeführt. Unter der gerichteten Evolution versteht man die Verlegung der Leistungsfähigkeit der Evolution ins Laboratorium. Wie in Abbildung 6 A1–A7 schematisch dargestellt, werden ausgehend von einem bekannten Molekül wiederholt iterative Diversifizierungsrunden mit anschließender Selektion durchlaufen. Die Selektion kann dann auf eine gesteigerte Enzymaktivität zur Verbesserung der Moleküleigenschaften oder andere Merkmale hin durchgeführt werden. In einem jüngeren Artikel von Agresti



**Abbildung 6.** Versuchsanordnung von Agresti et al.<sup>[96]</sup> zur gerichteten Evolution für die Verbesserung der in *S. cerevisiae* exprimierten Meerrettich-Peroxidase (HRP). A) Plasmid mit dem HRP-Gen, A2) Erstellung einer Bibliothek von mutierten HRP-Plasmiden und A3) Expression in *S. cerevisiae*. A4) Verkapselung der Hefezellen mit einem fluorogenen Substrat für HRP, A5) Inkubation während des Flusses durch ein Röhrchen zur Umwandlung des nichtfluoreszierenden Substrats in das fluoreszierende Produkt durch die HRP. A6) Nach Ende der Inkubation werden die Tröpfchen anhand ihres Fluoreszenzsignals sortiert und die Enzyme mit der besten Leistung abgetrennt. Die mikrofluidische Apparatur für dieses Assay. B1) Mikroskopische Aufnahme des Tröpfchenerzeugers, B2) (Vergrößerung von B1) die Verkapselungsnadel, B3) und B4) Die Tröpfchen vor (im Hellfeld-Mikroskop) beziehungsweise nach (im Fluoreszenzmikroskop) der Inkubation. B5) Übersicht über den gesamten Aufbau der Tröpfchen-Rückinjektion mit dielektrrophoretischer Sortierung der stark fluoreszierenden Tröpfchen in den unteren Arm der Apparatur. (Nachdruck mit Erlaubnis von The National Academy of Sciences USA, 2010.)

werden die Vorteile von tröpfchenbasierten Systemen für die gerichtete Evolution am Beispiel der Aktivitätssteigerung des Enzyms Meerrettich-Peroxidase erläutert. Dieses Enzym wurde auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* exprimiert und zeigte nach zwei Mutationsrunden eine zwölffach verbesserte Aktivität.<sup>[96]</sup> Diese Studie, bei der zunächst die Tröpfchen erzeugt, dann in breiten Kanälen 5 min inkubiert und anschließend sortiert wurden (Abbildung 6 B1–B5), diente zum Vergleich der gerichteten Evolution durch die Tröpfchen-Mikrofluidik mit einem modernen automatisierten Screeningverfahren von Mikrotiterplatten mit 384 Vertiefungen. Das Ergebnis waren eine 1000-fache Beschleunigung und eine millionenfache Kostensenkung der Tröpfchen-Technik gegenüber der automatisierten Mikrotiterplatten-Screeningtechnik. Interessanterweise wird der Hauptanteil der Kosten beim Mikrotiterplatten-Screening durch die Anschaffung der Pipettenspitzen verursacht, die zwei Drittel der geschätzten 15.81 Millionen US-Dollar ausmachen.

### 5.3. Zeitaufgelöste Einzelzellanalyse

Viele der hier geschilderten Verfahren stützen sich auf Tröpfchen, die sich an einem Laser vorbeibewegen, und Fluoreszenzdetektoren für die Analyse. Dabei werden Daten über die Verteilung von bestimmten Einzelzellmerkmalen gewonnen oder es können Screenings durchgeführt werden. Um allerdings ein- und dieselbe Zelle über einen längeren Zeitraum hinweg analysieren zu können, müsste jedes Tröpfchen, das eine Zelle enthält, einen spezifischen Fluoreszenz-„Barcode“ erhalten. Dagegen ermöglicht der in Abschnitt 4.3 beschriebene Abfangmechanismus die zeitaufgelöste Beobachtung der Zellen in Parallelformaten (oder mit kontinuierlicher Rasterung). Die exakte Identität jedes Tröpfchens bleibt durch seine Position erhalten. Diese Technik ermöglicht Analysen von einer großen Zahl Zellen mit sehr viel höherer Zeitauflösung. Ob ein kontinuierliches Monitoring oder eine Parallelanalyse vom Tröpfchenstrom gewünscht ist, hängt von der jeweiligen Anwendung und der Kombination mit weiteren Systemen ab. So ist zum Beispiel eine Sortierung mit anschließendem kontinuierlichem Monitoring möglich.

Um die Wechselwirkung von Phagen mit dem Zielbakterium zu untersuchen, wurden in einem Zellassay mit Dropspot-Anordnung Zeitserien von einer großen Anzahl Tröpfchen genommen.<sup>[80a]</sup> Hierfür wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Bildaufnahmen von Tröpfchen gemacht, die nur ein einzelnes Bakterium und Phagen enthielten. Auf diese Weise wurde für den Wildtyp und verschiedene modifizierte Phagen die Zeittdauer vor der Zellyse bestimmt. Verschiedene Bedingungen wurden getestet und die Biophysik des Phagen erforscht. Mit dem gleichen Aufbau und der gleichen Analysemethode wurden bei einer neuen Zeitserie die heterogenen Wachstumsgeschwindigkeiten von Hefezellen und deren  $\beta$ -gal-Expression untersucht.<sup>[71]</sup> Die zeitliche Verfolgung des Wachstums vieler Klone oder ihrer Proteinexpression könnte genutzt werden, um die Verteilung von Antworten etwa auf eine normale oder mit Wirkstoff versetzte Umgebung zu ermitteln.

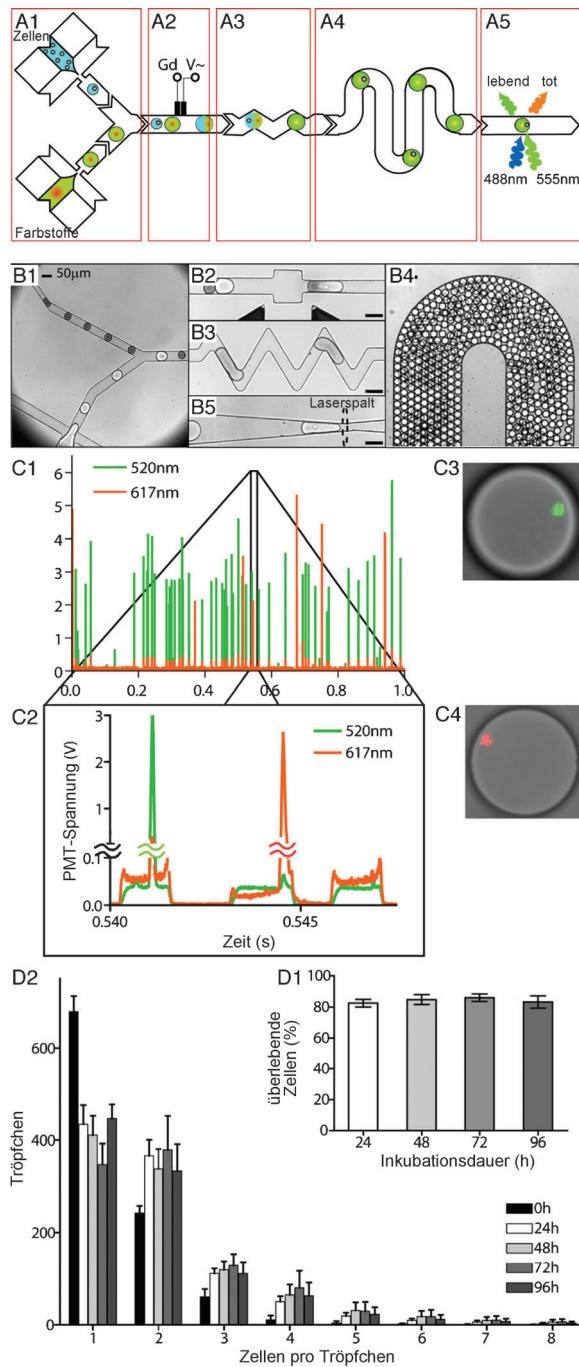
Bei einer ähnlichen Methodik wurden die einzelnen Tröpfchen in Vertiefungen abgefangen und dann die von einzelnen Bakterien exprimierten AP-Aktivitäten<sup>[119]</sup> in einer sehr großen Zahl von Tröpfchen bei hoher zeitlicher Auflösung parallel untersucht.<sup>[98]</sup> Alle diese Studien zeigen, wie variabel das Verhalten von Einzelzellen sein kann. Häufig werden stochastische Verfahren unterlegt, um die Variation zu berücksichtigen.

### 5.4. Wirkstoffscreening in Tröpfchen

Unter den biologischen Hochdurchsatzverfahren ist das tröpfchenbasierte Screening von Wirkstoffkandidaten und ihren Formulierungen eine besondere Herausforderung. So erfordern Wirkstoffscreenings, dass in jedem einzelnen Tröpfchen die Formulierung identifiziert wird, sie setzen häufig lange Inkubationsdauern der die Zellen enthaltenden Tröpfchen voraus, und erfordern möglicherweise einen großen Satz an molekularen Substanzen mit verschiedenen

chemischen Charakteristika. Betrachtet man andererseits die hohen Kosten von konventionellen automatisierten Mikrotiterplatten-Screenings (schätzungsweise \$1 per Vertiefung<sup>[120]</sup>) und rechnet man die wachsende Bedeutung von biomolekularen Pharmazeutika mit ein, kann sich der Einsatz der Tröpfchen-Mikrofluidik in einer frühen Phase der Wirkstoffsuche dennoch durchaus lohnen. Konzeptuell wäre die Suche nach biomolekularen pharmazeutischen Verbindungen ähnlich zu bereits vorhandenen Auswahlverfahren anzulegen, abgesehen von häufig weit längeren Inkubationszeiten und den in manchen Fällen nötigen eukaryotischen Zellkulturen. Trotz dieser Probleme wurden bereits Screenings zur Zytotoxizität,<sup>[66]</sup> Aktivierung von Zellkernrezeptoren,<sup>[65]</sup> Speziespezifität von Antikörpern<sup>[121]</sup> und zur Enzyminhibition<sup>[122]</sup> durchgeführt. In einer jüngeren Arbeit verknüpften Griffiths und Kollegen die Tröpfchenerzeugung mit einer automatischen Probennahme zu einem vollautomatischen Screening-System für 704 chemische Verbindungen, die die Tyrosinphosphatase 1B inhibieren sollten. Nach der Analyse von 10 000 Tröpfchen für jede Verbindung wurden dosisabhängige Kurven mit extrem hoher Auflösung erhalten.<sup>[123]</sup>

Das Konzept des Wirkstoffscreenings in Tröpfchen wurde anhand eines Einzelzell-Zytotoxizitätsabgleichs der humanen U932-Zelllinie gegen eine Modellbibliothek aus acht Konzentrationen des Chemotherapeutikums Mitomycin C demonstriert (gezeigt in Abbildung 7).<sup>[66]</sup> Zunächst wurde die Konzentrationsbibliothek zusammen mit einem fluoreszierenden optischen Code emulgiert und mit den Einzelzellen enthaltenden Tröpfchen zusammengeführt. Die verkapselten Zellen wurden dann 24 h inkubiert, in eine zweite Apparatur rückinjiziert und dort mit Tröpfchen verschmolzen, die einen Farbstoff für positive und negative Viabilität enthielten. Nach kurzer Inkubation auf dem Chip wurden die Tröpfchen auf ihre Fluoreszenz hin analysiert. Ergebnis nach der optischen Dekodierung war eine  $IC_{50}$ -Kurve für die Zytotoxizität des Wirkstoffs, die gut mit den Ergebnissen durch herkömmliche Techniken übereinstimmte. In einem tröpfchenbasierten Screening für adhärente *Bombyx-mori*-Zellen beschrieben Baret et al. die Verwendung eines quantitativen Genreporter-Assays, das die Aktivierung des Kernrezeptors bei verschiedenen Konzentrationen des Hormons 20-Hydroxyecdysone bestimmt.<sup>[65]</sup> Tausende Einzelzellen wurden auf zehn optisch kodierte Hormonkonzentrationen hin getestet. Einzelzeldaten wie diese ermöglichen Heterogenitätsanalysen, die durch Assays auf Mikrotiterplatten beispielsweise nicht zugänglich sind. Bei einer weiteren Modellstudie zum Wirkstoffscreening wurde ein Enzym ( $\beta$ -gal) in submikrolitergroßen Tropfen auf seine Inhibition hin getestet.<sup>[122]</sup> Die Tropfen stammten aus einer Platte mit 96 Vertiefungen, wurden bei 0.33 Hz mit sämtlichen Inhibitorkonzentrationen erzeugt, aufgespalten und mit dem Enzym und einem fluorogenen Enzymsubstrat (FDG) vermischt. Nach einer Inline-Inkubation in Teflonröhrchen wurden die Tropfen auf ihre Fluoreszenz hin analysiert. Für 96 Bedingungen (14 mit Inhibitor + 82 PBS-Kontrollen) wurden  $IC_{50}$ -Kurven aufgenommen. Die Identifizierung jeder Bedingung erfolgte anhand einer Kombination aus der Position im Röhrchen und einer Fluoreszenzmarkierung, die zur ersten Vertiefung in jeder Reihe der 96er-Platte gegeben wurde.



**Abbildung 7.** Die Apparatur von Brouzes et al.<sup>[66]</sup> für das Zytotoxizitätsscreening in Tröpfchen. A) Schematische Darstellung und B) die entsprechenden mikroskopischen Aufnahmen. 1) Dualer Tröpfchenerzeugung (zur Überprüfung der Lebensfähigkeit der Zellen nach der Inkubation wurde die Zellauslassnadel durch eine Rückinjektionsnadel ersetzt). 2) Elektronisch gesteuerte Tröpfchenverschmelzung. 3) Mischen des Tröpfcheninhalts. 4) Inkubation und 5) Zweikanal-Fluoreszenznachweis. C1) Datenspur der Fluoreszenzsignale im grünen 520-nm-Kanal (Lebendzellsignal) und 617-nm-Kanal (Totzellsignal). C2) Vergrößerung zur Darstellung der räumlichen Verteilung der Fluoreszenzsignale der Zellen (schmale Peaks) und der breiteren Basis der Tröpfchen. C3 und C4) Falschfarbenbilder von lebenden beziehungsweise toten Zellen, die mit Calcein AM und Sytox Orange gefärbt sind. Die Zellviabilität einer vier Tage alten Tröpfchenkultur wurde mit >80% über alle vier Tage bestimmt. D2) Bestimmung der Poisson-Verteilung der Zellzahl in den Tröpfchen. (Nachdruck mit Erlaubnis von The National Academy of Sciences USA, 2009.)

Diese Studien zeigen, dass es möglich ist, Wirkstoffscreenings an Einzelzellen in mikrofluidischen Tröpfchen durchzuführen. Anders als bei der Durchflusszytometrie werden die gesuchten Verbindungen zu kompartimentierten Einzelzellen und nicht zu einem ganzen Zellensemble gegeben. Diese Maßnahme entkoppelt die Wechselwirkungen der Zellen vom eigentlichen Effekt der Verbindung. Um den Durchsatz weiter zu erhöhen, muss beim Tröpfchenscreening der Inhalt der Tröpfchen eindeutig identifiziert werden. Dies ist durch Markierung, Lokalisierung, separate Analyse oder durch eine Kombination dieser Methoden möglich. Sehr wichtig für das Wirkstoffscreening ist auch die Erstellung von großen Tröpfchenbibliotheken. Dessen Gelingen bestimmt auch teilweise mit, ob die Tröpfchen-Mikrofluidik wirklich gegenüber dem automatisierten Screening mit Mikrotiterplatten Vorteile beim Durchsatz bietet.

### 5.5. Genanalyse von Einzelzellen in Tröpfchen

Die Verkapselung von Prozessierungsschritten und der Analyse von genetischem Material bietet den Vorteil, dass nur ein einziger DNA- oder RNA-Strang vervielfältigt und isoliert wird. Dieser Ansatz findet bereits breite Verwendung beim BEAMing-Verfahren<sup>[124]</sup> und in der polydispersen Emulsions-PCR<sup>[125a]</sup> und war schon etabliert, als von der praktischen Anwendung monodisperser mikrofluidisch generierter Tröpfchen noch lange keine Rede war. Daher ist auch die Prozessierung und Analyse von genetischem Material eines der am meisten erforschten Anwendungsbereiche der Tröpfchen-Mikrofluidik mit dem größten Variantenreichtum beim PCR-Verfahren. PCR-Techniken wurden in „Stop-flow“<sup>[23,125]</sup> oder „Continuous-flow“-Moden in serpentinengleichförmigen Kanälen, die durch unterschiedliche Temperaturzonen führen, angewendet.<sup>[126]</sup> Außerdem wurden zuvor gesammelte, robuste Tröpfchen im Ganzen einer PCR in Standard-Thermozyklern unterworfen,<sup>[127]</sup> oder die PCR wurde isotherm durchgeführt.<sup>[128]</sup> Die meisten Funktionsvarianten der PCR wie die reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR),<sup>[23]</sup> die quantitative PCR (qPCR) mit Fluoreszenznachweis<sup>[126]</sup> und eine Echtzeit-PCR-Analyse<sup>[125]</sup> wurden dadurch abgedeckt. Anwendungsbeispiele sind die genetische Analyse von Tumormaterial durch DDA<sup>[129]</sup> und die Multiplex-PCR von Proben von Patienten mit spinaler Muskelatrophie.<sup>[130]</sup>

Um genetische Analysen an Einzelzellen durchführen zu können, müssen die verkapselften Zellen für die DNA-Extraktion, die Vervielfältigung und die Detektion vorher durch Zelllyse aufgebrochen werden. Novak et al. integrierte sämtliche Funktionen in das Tröpfchenformat in der Form eines Assays von Hybriden aus mikrofluidisch erzeugten Tröpfchen und Agarosekügelchen.<sup>[131]</sup> Zunächst wurden die Einzelzellen enthaltenden Tröpfchen sowie die mit Primern functionalisierten Kügelchen in einer Agaroselösung erzeugt. Nach Abkühlen der Mischung zur Gelbildung wurden die Kügelchen aus dem Öl extrahiert und ein Tensid und ein Cocktail aus Proteinase zugegeben, um die Zellen aufzubrechen. Zur Entfernung der Lysereagente, die die PCR stören könnten, wurden die Agarosegel-Tröpfchen aus dem Öl extrahiert. Anschließend wurde die PCR-Reagenzienmi-

schung zugegeben, die Agarosetröpfchen durch Schütteln im Öl rückemulgert und den Thermozyklen ausgesetzt. Ergebnis waren Amplikon-beladene Kugelchen, die das genetische Material von jeweils einer Zelle pro Kugelchen enthielten. Mit einer ähnlichen Methode untersuchten Novak et al. auch Proben von *E. coli* auf mutierte pathogene Zellen hin und wiesen solche Zellen vor einem Hintergrund von  $10^5$  Zellen Wildtyp pro pathogene Mutante nach.<sup>[132]</sup>

## 6. Schlussfolgerungen

Die Einzelzellanalyse gehört zu den interessantesten und vielseitigsten Anwendungen der Tröpfchen-Mikrofluidik. Den Zellen stehen Kompartimente in der gleichen Größe wie sie selbst zur Verfügung, und es ist möglich, eine große Zahl von Zellen monodispers zu verkapseln und sie kurzfristig zusammen mit ihrer direkten Umgebung zu manipulieren. Auch automatisierte Verfahren sind möglich. Daher ist davon auszugehen, dass die Tröpfchen-Mikrofluidik eine herausragende Rolle in der weiteren Erforschung der Heterogenität von Zellpopulationen und deren Ursachen spielen wird. Durch die Tröpfchen-Mikrofluidik lassen sich Zellen identifizieren, die im Durchschnitt nur einmal pro Milliliter Blut oder dem jeweiligen Probenvolumen vorkommen, und Screenings einer so großen Zahl an Wirkstoffkandidaten und sekretierten Enzymvarianten durchführen, dass effektivere Wirkstoffe als die momentan verfügbaren gefunden werden können.

Nachdem jahrelang die Technik der Tröpfchen-Mikrofluidik im Mittelpunkt stand, liegt nun der Fokus mehr auf deren Anwendung für biologische Assays. Die Entwicklung dieser Assays hat nun vielfach einen Punkt erreicht, an dem die Assays – zum Beispiel digitale Tröpfchenanalysen oder die Detektion von nur geringen Mengen Biomarkern – mit den Standardmethoden in ihrer Empfindlichkeit gleichziehen oder sie sogar überbieten. Gleches gilt für den Durchsatz, zum Beispiel bei den massiv parallelen Enzymscreenings auf PCR- oder Tröpfchenbasis, der teilweise, wie beim Enzymscreening, sogar bis zu tausendfach überboten wird. Der Blick in die Zukunft verspricht daher noch eine Reihe von weiteren Möglichkeiten wie zum Beispiel die Untersuchung der Wechselwirkung von isolierten Zellen und die Verknüpfung von Protein- mit Genomanalysen von Einzelzellen. In all diesen Fällen hat die Tröpfchen-Mikrofluidik das Potenzial, den wissenschaftlichen Fortschritt deutlich zu bereichern.

Allerdings wachsen mit steigender Komplexität auf den Chips auch die Herausforderungen an die Integration der einzelnen Verfahren. Auch im Bereich der klinischen Proben und bei längeren Kulturzeiten nehmen die Anforderungen an die Tröpfchenumgebung zu, den Zellen ein Milieu zu bieten, das nicht die zu untersuchenden zellulären Charakteristiken beeinträchtigt. Dennoch hat auch hier die Tröpfchen-Mikrofluidik das Potenzial, langfristig den wissenschaftlichen Fortschritt voranzutreiben. Dieser betrifft nämlich die grundlegende Komponente des Lebens – die Zelle.

Wir danken der Novo Nordisk Foundation, dem Swedish Research Council und VINNOVA durch das ProNova VINN

Excellence Centre for Protein Technology für ihre finanzielle Unterstützung.

Eingegangen am 28. März 2012

Übersetzt von Dr. Roswitha Harrer, Otterberg

- [1] M. Cristofanilli, D. F. Hayes, G. T. Budd, M. J. Ellis, A. Stopeck, J. M. Reuben, G. V. Doyle, J. Matera, W. J. Allard, M. C. Miller, H. A. Fritsche, G. N. Hortobagyi, L. W. Terstappen, *J. Clin. Oncol.* **2005**, 23, 1420–1430.
- [2] R. Kiessling, E. Klein, H. Pross, H. Wigzell, *Eur. J. Immunol.* **1975**, 5, 117–121.
- [3] a) E. S. Lander, L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczky, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Cle, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grahame, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Showe, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D. McPherson, M. A. Marra, E. R. Mardis, L. A. Fulton, A. T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Chissoe, M. C. Wendl, K. D. Delehaunty, T. L. Miner, A. Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cook, R. S. Fulton, D. L. Johnson, P. J. Minx, S. W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J. F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Überbacher, M. Frazier, et al., *Nature* **2001**, 409, 860–921; b) J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. D. Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R.-R. Ji, Z. Ke, K. A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Y. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M.-H. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, et al., *Science* **2001**, 291, 1304–1351; c) *Science* **1998**, 282, 2012–2018; d) F. R. Blattner, G. Plunkett III, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, Y. Shao, *Science* **1997**, 277, 1453–1462.
- [4] S. R. Gill, M. Pop, R. T. DeBoy, P. B. Eckburg, P. J. Turnbaugh, B. S. Samuel, J. I. Gordon, D. A. Relman, C. M. Fraser-Liggett, K. E. Nelson, *Science* **2006**, 312, 1355–1359.
- [5] F. Ponten, M. Gry, L. Fagerberg, E. Lundberg, A. Asplund, L. Berglund, P. Oksvold, E. Björklund, S. Hober, C. Kampf, S. Navani, P. Nilsson, J. Ottosson, A. Persson, H. Wernerus, K. Wester, M. Uhlen, *Mol. Syst. Biol.* **2009**, 5, 337.

- [6] H. Tjalsma, H. Antelmann, J. D. H. Jongbloed, P. G. Braun, E. Darmon, R. Dorenbos, J. Y. F. Dubois, H. Westers, G. Zanen, W. J. Quax, O. P. Kuipers, S. Bron, M. Hecker, J. M. van Dijken, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2004**, *68*, 207–233.
- [7] M. Gronborg, T. Z. Kristiansen, A. Iwahori, R. Chang, R. Reddy, N. Sato, H. Molina, O. N. Jensen, R. H. Hruban, M. G. Goggins, A. Maitra, A. Pandey, *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5*, 157–171.
- [8] J. R. S. Newman, S. Ghaemmaghami, J. Ihmels, D. K. Breslow, M. Noble, J. L. DeRisi, J. S. Weissman, *Nature* **2006**, *441*, 840–846.
- [9] M. Kærn, T. C. Elston, W. J. Blake, J. J. Collins, *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *6*, 451–464.
- [10] a) A. Colman-Lerner, A. Gordon, E. Serra, T. Chin, O. Resnekov, D. Endy, C. G. Pesce, R. Brent, *Nature* **2005**, *437*, 699–706; b) T. J. Strovas, L. M. Sauter, X. Guo, M. E. Lidstrom, *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 7127–7133.
- [11] D. Di Carlo, L. P. Lee, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7918–7925.
- [12] a) H. Kortmann, L. M. Blank, A. Schmid, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **2011**, *124*, 99–122; b) H. Yin, D. Marshall, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2012**, *23*, 110–119; c) S. Lindström, H. Andersson-Svahn, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2011**, *1810*, 308–316; d) M. Zagnoni, J. M. Cooper, *Methods Cell Biol.* **2011**, *102*, 25–48.
- [13] a) A. B. Theberge, F. Courtois, Y. Schaerli, M. Fischlechner, C. Abell, F. Hollfelder, W. T. S. Huck, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5982–6005; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5846–5868; b) B. Kintses, L. D. van Vliet, S. R. A. Devenish, F. Hollfelder, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 548–555; c) S. Gulati, V. Rouilly, X. Z. Niu, J. Chappell, R. I. Kitney, J. B. Edel, P. S. Freemont, A. J. Demello, *J. R. Soc. Interface* **2009**, *6*, S493; d) M. T. Guo, A. Rotem, J. A. Heyman, D. A. Weitz, *Lab Chip* **2012**, *12*, 2146–2155; e) Y. Schaerli, F. Hollfelder, *Mol. BioSyst.* **2009**, *5*, 1392–1404; f) S. Vyawahare, A. D. Griffiths, C. A. Merten, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 1052–1065; g) X. Casadevall i Solvas, A. de Mello, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1936–1942.
- [14] F. Leal-Calderon, P. Poulin, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1999**, *4*, 223–230.
- [15] S. L. Anna, N. Bontoux, H. A. Stone, *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *82*, 364–366.
- [16] a) G. J. Nossal, J. Lederberg, *Nature* **1958**, *181*, 1419–1420; b) J. Lederberg, *J. Bacteriol.* **1954**, *68*, 258–259.
- [17] B. Rotman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1961**, *47*, 1981–1991.
- [18] a) M. Margulies, M. Egholm, W. E. Altman, S. Attiya, J. S. Bader, L. A. Bemben, J. Berkta, M. S. Braverman, Y. J. Chen, Z. T. Chen, S. B. Dewell, L. Du, J. M. Fierro, X. V. Gomes, B. C. Godwin, W. He, S. Helgesen, C. H. Ho, G. P. Irzyk, S. C. Jando, M. L. I. Alenquer, T. P. Jarvie, K. B. Jirage, J. B. Kim, J. R. Knight, J. R. Lanza, J. H. Leamon, S. M. Lefkowitz, M. Lei, J. Li, K. L. Lohman, H. Lu, V. B. Makijani, K. E. McDade, M. P. McKenna, E. W. Myers, E. Nickerson, J. R. Nobile, R. Plant, B. P. Puc, M. T. Ronan, G. T. Roth, G. J. Sarkis, J. F. Simons, J. W. Simpson, M. Srinivasan, K. R. Tartaro, A. Tomasz, K. A. Vogt, G. A. Volkmer, S. H. Wang, Y. Wang, M. P. Weiner, P. G. Yu, R. F. Begley, J. M. Rothberg, *Nature* **2005**, *437*, 376–380; b) R. Williams, S. G. Peisajovich, O. J. Miller, S. Magdassi, D. S. Tawfik, A. D. Griffiths, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 545–550.
- [19] F. Diehl, M. Li, Y. P. He, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, D. Dressman, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 551–559.
- [20] D. S. Tawfik, A. D. Griffiths, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 652–656.
- [21] F. Mugele, J.-C. Baret, *J. Phys. Condens. Matter* **2005**, *17*, R705.
- [22] D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4974–4984.
- [23] N. R. Beer, E. K. Wheeler, L. Lee-Houghton, N. Watkins, S. Nasarabadi, N. Hebert, P. Leung, D. W. Arnold, C. G. Bailey, B. W. Colston, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1854–1858.
- [24] a) Z. T. Cygan, J. T. Cabral, K. L. Beers, E. J. Amis, *Langmuir* **2005**, *21*, 3629–3634; b) L. H. Hung, R. Lin, A. P. Lee, *Lab Chip* **2008**, *8*, 983–987.
- [25] a) J. H. Xu, S. W. Li, J. Tan, Y. J. Wang, G. S. Luo, *Langmuir* **2006**, *22*, 7943–7946; b) N. T. Nguyen, S. Lassemmono, F. A. Chollet, *Sens. Actuators B* **2006**, *117*, 431–436.
- [26] H. W. Li, Y. Q. Fan, R. Kodzius, I. G. Foulds, *Microsyst. Technol.* **2012**, *18*, 373–379.
- [27] S. Begolo, G. Colas, J. L. Viovy, L. Malaquin, *Lab Chip* **2011**, *11*, 508–512.
- [28] a) J. M. K. Ng, I. Gitlin, A. D. Stroock, G. M. Whitesides, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3461–3473; b) J. C. McDonald, D. C. Duffy, J. R. Anderson, D. T. Chiu, H. Wu, O. J. A. Schueller, G. M. Whitesides, *Electrophoresis* **2000**, *21*, 27–40.
- [29] J. Zhou, A. V. Ellis, N. H. Voelcker, *Electrophoresis* **2010**, *31*, 2–16.
- [30] a) H. Kim, D. W. Luo, D. Link, D. A. Weitz, M. Marquez, Z. D. Cheng, *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *91*, 133106; b) C. Holtze, A. C. Rowat, J. J. Agresti, J. B. Hutchison, F. E. Angle, C. H. J. Schmitz, S. Koster, H. Duan, K. J. Humphry, R. A. Scanga, J. S. Johnson, D. Pisignano, D. A. Weitz, *Lab Chip* **2008**, *8*, 1632–1639.
- [31] A. C. Siegel, S. S. Shevkoplyas, D. B. Weibel, D. A. Bruzewicz, A. W. Martinez, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7031–7036; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6877–6882.
- [32] M. W. Toepke, D. J. Beebe, *Lab Chip* **2006**, *6*, 1484–1486.
- [33] J. Bibette, *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *147*, 474–478.
- [34] P. B. Umbanhauer, V. Prasad, D. A. Weitz, *Langmuir* **2000**, *16*, 347–351.
- [35] T. Thorsen, R. W. Roberts, F. H. Arnold, S. R. Quake, *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 4163–4166.
- [36] T. Nisisako, T. Torii, *Lab Chip* **2008**, *8*, 287–293.
- [37] a) A. S. Utada, E. Lorenceau, D. R. Link, P. D. Kaplan, H. A. Stone, D. A. Weitz, *Science* **2005**, *308*, 537–541; b) L. Y. Chu, A. S. Utada, R. K. Shah, J. W. Kim, D. A. Weitz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 9128–9132; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8970–8974.
- [38] L. Frenz, J. Blouwolff, A. D. Griffiths, J. C. Baret, *Langmuir* **2008**, *24*, 12073–12076.
- [39] M. He, J. S. Kuo, D. T. Chiu, *Langmuir* **2006**, *22*, 6408–6413.
- [40] J. S. Edgar, C. P. Pabbati, R. M. Lorenz, M. Y. He, G. S. Fiorini, D. T. Chiu, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 6948–6954.
- [41] C. N. Baroud, J. P. Delville, F. Gallaire, R. Wunenburger, *Phys. Rev. E* **2007**, *75*, 046302.
- [42] A. Huebner, M. Srivastava, D. Holt, C. Abell, F. Hollfelder, A. J. Demello, J. B. Edel, *Chem. Commun.* **2007**, 1218–1220.
- [43] J. F. Edd, D. Di Carlo, K. J. Humphry, S. Koster, D. Irimia, D. A. Weitz, M. Toner, *Lab Chip* **2008**, *8*, 1262–1264.
- [44] M. Chabert, J.-L. Viovy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 3191–3196.
- [45] H. N. Joensson, M. Uhlen, H. A. Svahn, *Lab Chip* **2011**, *11*, 1305–1310.
- [46] D. J. Holt, R. J. Payne, W. Y. Chow, C. Abell, *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *350*, 205–211.
- [47] J. C. Baret, *Lab Chip* **2012**, *12*, 422–433.
- [48] D. R. Link, S. L. Anna, D. A. Weitz, H. A. Stone, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92*, 054503.
- [49] F. Courtois, L. F. Olgun, G. Whyte, D. Bratton, W. T. Huck, C. Abell, F. Hollfelder, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 439–446.
- [50] D. P. Curran, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1230–1255; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1174–1196.
- [51] B. Zheng, J. D. Tice, R. F. Ismagilov, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4977–4982.
- [52] J. Clausell-Tormos, D. Lieber, J. C. Baret, A. El-Harrak, O. J. Miller, L. Frenz, J. Blouwolff, K. J. Humphry, S. Koster, H. Duan, C. Holtze, D. A. Weitz, A. D. Griffiths, C. A. Merten, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 427–437.

- [53] D. J. Holt, R. J. Payne, C. Abell, *J. Fluorine Chem.* **2010**, *131*, 398–407.
- [54] L. S. Roach, H. Song, R. F. Ismagilov, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 785–796.
- [55] F. Courtois, L. Olguin, G. Whyte, A. Theberge, W. Huck, F. Hollfelder, C. Abell, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3008.
- [56] G. Woronoff, A. El Harrak, E. Mayot, O. Schicke, O. J. Miller, P. Soumillion, A. D. Griffiths, M. Ryckelynck, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 2852–2857.
- [57] C. J. Ingham, A. Sprenkels, J. Bomer, D. Molenaar, A. van den Berg, J. E. T. van Hylckama Vlieg, W. M. de Vos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 18217–18222.
- [58] S. Lindström, M. Eriksson, T. Vazin, J. Sandberg, J. Lundeberg, J. Frisén, H. Andersson-Svahn, *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6997.
- [59] T. Thorsen, S. J. Maerkel, S. R. Quake, *Science* **2002**, *298*, 580–584.
- [60] D. Pushkarev, N. F. Neff, S. R. Quake, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 847–850.
- [61] W. B. Du, L. Li, K. P. Nichols, R. F. Ismagilov, *Lab Chip* **2009**, *9*, 2286–2292.
- [62] K. Martin, T. Henkel, V. Baier, A. Grodrian, T. Schon, M. Roth, J. M. Kohler, J. Metze, *Lab Chip* **2003**, *3*, 202–207.
- [63] S. Köster, F. E. Angile, H. Duan, J. J. Agresti, A. Wintner, C. Schmitz, A. C. Rowat, C. A. Merten, D. Pisignano, A. D. Griffiths, D. A. Weitz, *Lab Chip* **2008**, *8*, 1110–1115.
- [64] H. Hufnagel, A. Huebner, C. Gulch, K. Guse, C. Abell, F. Hollfelder, *Lab Chip* **2009**, *9*, 1576–1582.
- [65] J.-C. Baret, Y. Beck, I. Billas-Massobrio, D. Moras, A. D. Griffiths, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 528–536.
- [66] E. Brouzes, M. Medkova, N. Savenelli, D. Marran, M. Twardowski, J. B. Hutchison, J. M. Rothberg, D. R. Link, N. Perrimon, M. L. Samuels, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 14195–14200.
- [67] A. Funfak, A. Brosing, M. Brand, J. M. Kohler, *Lab Chip* **2007**, *7*, 1132–1138.
- [68] J. C. Baret, O. J. Miller, V. Taly, M. Ryckelynck, A. El-Harrak, L. Frenz, C. Rick, M. L. Samuels, J. B. Hutchison, J. J. Agresti, D. R. Link, D. A. Weitz, A. D. Griffiths, *Lab Chip* **2009**, *9*, 1850–1858.
- [69] J. Q. Boedicker, L. Li, T. R. Kline, R. F. Ismagilov, *Lab Chip* **2008**, *8*, 1265–1272.
- [70] J. Pan, A. L. Stephenson, E. Kazamia, W. T. S. Huck, J. S. Dennis, A. G. Smith, C. Abell, *Integr. Biol.* **2011**, *3*, 1043–1051.
- [71] C. H. J. Schmitz, A. C. Rowat, S. Koster, D. A. Weitz, *Lab Chip* **2009**, *9*, 44–49.
- [72] H. Song, D. L. Chen, R. F. Ismagilov, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7494–7516; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7336–7356.
- [73] L. M. Fidalgo, G. Whyte, D. Bratton, C. F. Kaminski, C. Abell, W. T. S. Huck, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2072–2075; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2042–2045.
- [74] A. E. Sgro, P. B. Allen, D. T. Chiu, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4845–4851.
- [75] M. He, J. S. Edgar, G. D. M. Jeffries, R. M. Lorenz, J. P. Shelby, D. T. Chiu, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1539–1544.
- [76] C. Luo, X. Yang, Q. Fu, M. Sun, Q. Ouyang, Y. Chen, H. Ji, *Electrophoresis* **2006**, *27*, 1977–1983.
- [77] Y. Zhan, J. Wang, N. Bao, C. Lu, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2027–2031.
- [78] F. Y. Chen, Y. H. Zhan, T. Geng, H. Z. Lian, P. S. Xu, C. Lu, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8816–8820.
- [79] H. N. Joensson, H. Andersson-Svahn, *Lab Chip* **2011**, *11*, 4144–4147.
- [80] a) S. Köster, A. Evilevitch, M. Jeembaeva, D. A. Weitz, *Bioophys. J.* **2009**, *97*, 1525–1529; b) R. Derda, S. K. Y. Tang, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5429–5432; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5301–5304.
- [81] a) M. Chabert, K. D. Dorfman, J.-L. Viovy, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 3706–3715; b) C. Priest, S. Herminghaus, R. Seemann, *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *89*, 134101; c) L. Mazutis, J.-C. Baret, P. Treacy, Y. Skhiri, A. F. Araghi, M. Ryckelynck, V. Taly, A. D. Griffiths, *Lab Chip* **2009**, *9*, 2902–2908.
- [82] 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.
- [83] L. Mazutis, J.-C. Baret, A. D. Griffiths, *Lab Chip* **2009**, *9*, 2665–2672.
- [84] C. N. Baroud, M. R. de Saint Vincent, J. P. Delville, *Lab Chip* **2007**, *7*, 1029–1033.
- [85] a) H. Song, J. D. Tice, R. F. Ismagilov, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 792–796; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 768–772; b) L. M. Fidalgo, C. Abell, W. T. S. Huck, *Lab Chip* **2007**, *7*, 984–986.
- [86] X. Niu, S. Gulati, J. B. Edel, A. J. deMello, *Lab Chip* **2008**, *8*, 1837–1841.
- [87] N. Bremond, A. R. Thiam, J. Bibette, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 024501.
- [88] A. R. Thiam, N. Bremond, J. Bibette, *Phys. Rev. Lett.* **2009**, *102*, 188304.
- [89] A. R. Abate, T. Hung, P. Mary, J. J. Agresti, D. A. Weitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 19163–19166.
- [90] K. Ahn, C. Kerbage, T. P. Hunt, R. M. Westervelt, D. R. Link, D. A. Weitz, *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *88*, 024104.
- [91] M. Schindler, A. Ajdari, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 044501.
- [92] L. Bonetta, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 785–795.
- [93] L. Mazutis, A. D. Griffiths, *Appl. Phys. Lett.* **2009**, *95*, 204103–204103.
- [94] H. Song, R. F. Ismagilov, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14613–14619.
- [95] L. Frenz, K. Blank, E. Brouzes, A. D. Griffiths, *Lab Chip* **2009**, *9*, 1344–1348.
- [96] J. J. Agresti, E. Antipov, A. R. Abate, K. Ahn, A. C. Rowat, J.-C. Baret, M. Marquez, A. M. Klibanov, A. D. Griffiths, D. A. Weitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 4004–4009.
- [97] a) M. Srisa-Art, A. J. deMello, J. B. Edel, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 15766–15772; b) P. Abbyad, R. Dangla, A. Alexandrou, C. N. Baroud, *Lab Chip* **2011**, *11*, 813–821; c) H. Boukellal, S. Selimovic, Y. W. Jia, G. Cristobal, S. Fraden, *Lab Chip* **2009**, *9*, 331–338; d) A. Huebner, D. Bratton, G. Whyte, M. Yang, A. J. deMello, C. Abell, F. Hollfelder, *Lab Chip* **2009**, *9*, 692–698.
- [98] J.-u. Shim, L. F. Olguin, G. Whyte, D. Scott, A. Babtie, C. Abell, W. T. S. Huck, F. Hollfelder, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15251–15256.
- [99] J.-u. Shim, G. Cristobal, D. R. Link, T. Thorsen, Y. Jia, K. Piattelli, S. Fraden, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8825–8835.
- [100] A. C. Hatch, J. S. Fisher, A. P. Lee in *The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (uTAS 2010)* Groningen, Niederlande, **2010**.
- [101] a) P. Mary, A. Chen, I. Chen, A. R. Abate, D. A. Weitz, *Lab Chip* **2011**, *11*, 2066–2070; b) X. Niu, F. Gielen, J. B. Edel, A. J. deMello, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 437–442.
- [102] J. D. Tice, H. Song, A. D. Lyon, R. F. Ismagilov, *Langmuir* **2003**, *19*, 9127–9133.
- [103] H. Song, M. R. Bringer, J. D. Tice, C. J. Gerdts, R. F. Ismagilov, *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *83*, 4664–4666.
- [104] T. Roy, A. Sinha, S. Chakraborty, R. Ganguly, I. K. Puri, *Phys. Fluids* **2009**, *21*, 027101–027107.
- [105] H. M. Shapiro, *Practical Flow Cytometry*, 2. Aufl., Liss, New York, **1988**.
- [106] H. N. Joensson, C. Zhang, M. Uhlen, H. Andersson-Svahn, *Electrophoresis* **2012**, *33*, 436.
- [107] a) M. Srisa-Art, E. C. Dyson, A. J. Demello, J. B. Edel, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7063–7067; b) M. Srisa-Art, D. K. Kang, J. Hong, H. Park, R. J. Leatherbarrow, J. B. Edel, S. I. Chang, A. J.

- deMello, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1605–1611; c) M. Srisa-Art, A. J. deMello, J. B. Edel, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 6682–6689.
- [108] J. C. Gadd, C. L. Kuyper, B. S. Fujimoto, R. W. Allen, D. T. Chiu, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 3450–3457.
- [109] B. J. Hindson, K. D. Ness, D. A. Masquelier, P. Belgrader, N. J. Heredia, A. J. Makarewicz, I. J. Bright, M. Y. Lucero, A. L. Hiddessen, T. C. Legler, T. K. Kitano, M. R. Hodel, J. F. Petersen, P. W. Wyatt, E. R. Steenblock, P. H. Shah, L. J. Bousse, C. B. Troup, J. C. Mellen, D. K. Wittmann, N. G. Erndt, T. H. Cauley, R. T. Koehler, A. P. So, S. Dube, K. A. Rose, L. Montesclaros, S. L. Wang, D. P. Stumbo, S. P. Hodges, S. Romine, F. P. Milanovich, H. E. White, J. F. Regan, G. A. Karlin-Neumann, C. M. Hindson, S. Saxonov, B. W. Colston, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8604–8610.
- [110] S. Perkin, L. Chai, N. Kampf, U. Raviv, W. Briscoe, I. Dunlop, S. Timmuss, M. Seo, E. Kumacheva, J. Klein, *Langmuir* **2006**, *22*, 6142–6152.
- [111] A. C. Hatch, J. S. Fisher, A. R. Tovar, A. T. Hsieh, R. Lin, S. L. Pentoney, D. L. Yang, A. P. Lee, *Lab Chip* **2011**, *11*, 3838–3845.
- [112] a) L. M. Fidalgo, G. Whyte, B. T. Ruotolo, J. L. P. Benesch, F. Stengel, C. Abell, C. V. Robinson, W. T. S. Huck, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3719–3722; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3665–3668; b) J. Pei, Q. Li, M. S. Lee, G. A. Valaskovic, R. T. Kennedy, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6558–6561.
- [113] a) G. T. Roman, M. Wang, K. N. Shultz, C. Jennings, R. T. Kennedy, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8231–8238; b) J. S. Edgar, G. Milne, Y. Q. Zhao, C. P. Pabbati, D. S. W. Lim, D. T. Chiu, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2757–2760; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2719–2722.
- [114] M. Srisa-Art, I. C. Bonzani, A. Williams, M. M. Stevens, A. J. deMello, J. B. Edel, *Analyst* **2009**, *134*, 2239–2245.
- [115] H. Joensson, M. Samuels, E. Brouzes, M. Medkova, M. Uhlén, D. Link, H. Andersson-Svahn, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2556–2559; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2518–2521.
- [116] A. D. Griffiths, D. S. Tawfik, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 395–402.
- [117] a) M. R. Bringer, C. J. Gerds, H. Song, J. D. Tice, R. F. Ismagilov, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **2004**, *362*, 1087–1104; b) A. Liau, R. Karnik, A. Majumdar, J. H. D. Cate, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 7618–7625; c) P. S. Dittrich, M. Jahnz, P. Schwillie, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 811–814.
- [118] M. Najah, A. D. Griffiths, M. L. Ryckelynck, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1202–1209.
- [119] A. Huebner, L. F. Olgun, D. Bratton, G. Whyte, W. T. S. Huck, A. J. de Mello, J. B. Edel, C. Abell, F. Hollfelder, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 3890–3896.
- [120] T. K. Garyantes, *Drug Discovery Today* **2002**, *7*, 489–490.
- [121] L. Granieri, O. J. Miller, A. D. Griffiths, C. A. Merten, *J. Antimicrob. Chemother.* **2009**, *64*, 62–68.
- [122] J. Clausell-Tormos, A. D. Griffiths, C. A. Merten, *Lab Chip* **2010**, *10*, 1302–1307.
- [123] O. J. Miller, A. E. Harrak, T. Mangeat, J.-C. Baret, L. Frenz, B. E. Debs, E. Mayot, M. L. Samuels, E. K. Rooney, P. Dieu, M. Galvan, D. R. Link, A. D. Griffiths, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 378–383.
- [124] D. Dressman, H. Yan, G. Traverso, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 8817–8822.
- [125] N. R. Beer, B. J. Hindson, E. K. Wheeler, S. B. Hall, K. A. Rose, I. M. Kennedy, B. W. Colston, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 8471–8475.
- [126] M. M. Kiss, L. Ortoleva-Donnelly, N. R. Beer, J. Warner, C. G. Bailey, B. W. Colston, J. M. Rothberg, D. R. Link, J. H. Leamon, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8975–8981.
- [127] R. Tewhey, J. B. Warner, M. Nakano, B. Libby, M. Medkova, P. H. David, S. K. Kotsopoulos, M. L. Samuels, J. B. Hutchison, J. W. Larson, E. J. Topol, M. P. Weiner, O. Harismendy, J. Olson, D. R. Link, K. A. Frazer, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 1025–1094.
- [128] L. Mazutis, A. F. Araghi, O. J. Miller, J.-C. Baret, L. Frenz, A. Janoshazi, V. Taly, B. J. Miller, J. B. Hutchison, D. Link, A. D. Griffiths, M. Ryckelynck, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 4813–4821.
- [129] D. Pekin, Y. Skhiri, J. C. Baret, D. Le Corre, L. Mazutis, C. Ben Salem, F. Millot, A. El Harrak, J. B. Hutchison, J. W. Larson, D. R. Link, P. Laurent-Puig, A. D. Griffiths, V. Taly, *Lab Chip* **2011**, *11*, 2156–2166.
- [130] Q. Zhong, S. Bhattacharya, S. Kotsopoulos, J. Olson, V. Taly, A. D. Griffiths, D. R. Link, J. W. Larson, *Lab Chip* **2011**, *11*, 2167–2174.
- [131] R. Novak, Y. Zeng, J. Shuga, G. Venugopalan, D. A. Fletcher, M. T. Smith, R. A. Mathies, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 410–415; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 390–395.
- [132] Y. Zeng, R. Novak, J. Shuga, M. T. Smith, R. A. Mathies, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 3183–3190.