

Effizientes Multikanal-Lab-on-Chip-System für die Bioanalytik

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften

der Fakultät für Maschinenbau
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
genehmigte

Dissertation

von

Dipl.-Ing. Wonhee Hwang

Tag der mündlichen Prüfung: 17.09.2010

Hauptreferent:	Prof. Dr. rer. nat. V. Saile
Korreferent:	Prof. Dr. rer. nat. B. Wolf
	PD Dr.-Ing. A.E. Guber

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	3
2 Grundlagen.....	6
2.1 Lab-on-Chip.....	7
2.2 Einführung in die Kapillarelektrophorese.....	8
2.3 Theoretische Grundlagen der Kapillarelektrophorese.....	11
2.3.1 Elektrophoretische Mobilität.....	11
2.3.2 Elektroosmotischer Fluss.....	13
2.3.3 Detektion.....	17
2.3.4 Puffersysteme.....	24
2.4 DNA-Analyse.....	26
2.4.1 DNA.....	26
2.4.2 Elektrische Eigenschaften von DNA-Lösung.....	28
2.4.3 Kapillarelektrophorese zur DNA-Analytik.....	30
2.5 Impedanzspektroskopie.....	30
2.6 Mikrofertigung	32
2.6.1 Kunststoff als Substrat in der Mikrofluidik.....	32
2.6.2 Optische Lithographie.....	33
2.6.3 Mikrozerspannung.....	34
2.6.4 Replikationstechnologie.....	34
2.6.5 Aufbau- und Verbindungstechnik.....	35
2.6.6 Dünnschichtabscheidung.....	36
3 Herstellung von mikrofluidischen CE-Chips und Impedanzsensoren. .	38
3.1 Herstellung von mikrofluidischer CE-Chips.....	39
3.1.1 Strukturierung der Mikrokanäle.....	40
3.1.2 Deckeln der Mikrokanäle.....	41
3.1.3 Integration der Detektionselektroden.....	43
3.1.4 Aufbringen der Fluidreservoirs.....	43
3.2 Herstellung der Impedanzsensoren.....	44
3.2.1 Herstellung von Mikrobandelektroden	45

4 Versuchsdurchführung und Ergebnisse.....	51
4.1 Untersuchung der elektrischen Eigenschaften von DNA-Lösung...	52
4.1.1 Elektrische Leitfähigkeit von DNA-Lösungen.....	52
4.1.2 Einflüsse der Ausrichtung der Moleküle	53
4.2 Fragmentierung der DNA-Molekülen bei der CE-C4D.....	56
4.3 Messtechnische Verbesserung der CE-C4D.....	59
4.3.1 Messaufbau und -ablauf der Mikrochip-CE mit C4D.....	59
4.3.2 Optimierung der C4D.....	61
4.3.3 Überwachung der Analytinjektion mittels C4D.....	64
5 Miniaturisiertes Multikanal-CE-System.....	71
5.1 CD als mikrofluidische Plattform.....	72
5.2 Herstellung von CE-Disc.....	73
5.2.1 Cyclo-Olefin-Polymer (COP).....	73
5.2.2 Oberflächenaktivierung von Cyclo-Olefin-Polymer.....	74
5.2.3 Entwurf und Herstellung.....	76
5.3 Miniaturisiertes CE-Gerät.....	82
5.4 CE-C4D-Messungen.....	86
5.4.1 Puffer und Analyten.....	86
5.4.2 Messablauf und Ergebnisse.....	86
6 Zusammenfassung.....	90
Anhang.....	93
Verwendete Chemikalien.....	93
Verwendete Polymere.....	94
Abkürzungsverzeichnis.....	95
Literaturverzeichnis.....	96

1 Einleitung

Die analytische Chemie hat in den 1990er Jahren den generellen technischen Trend der Miniaturisierung aufgenommen und dabei aus messtechnischer und technologischer Sicht einen revolutionären Paradigmenwechsel vollzogen [1-5]. Durch umfassenden Einsatz der Mikrotechnik konnten kleine kompakte analytische Instrumente entwickelt werden, mit denen chemische Analysen schneller, zuverlässiger und kostengünstiger mit geringerer Probenmenge und niedrigem Energieverbrauch durchgeführt werden können. Hauptkomponente ist ein mikrofluidischer Chip, auf dem wichtige Funktionen der chemischen Analyse von der Probenvorbereitung bis zur Detektion realisiert werden können. Das „Labor auf dem Chip“ (*engl. Lab-on-Chip, LOC*) ist insbesondere für die Bioanalytik attraktiv, sei es für den Einsatz im Zentrallabor oder für „Point-of-Care“ Anwendungen. Aber auch für eine Vielzahl weiterer Anwendungen von der Lebensmittelanalytik, Umweltanalytik, Prozesskontrolle bis hin zu „Homeland Security“ besteht großes Interesse [6-13].

Das Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) hat diesen Trend aufgegriffen und sich dabei auf Kapillarelektrophorese (CE) im Mikrochipformat fokussiert, welche generell als ein Schrittmacher der LOC-Systeme gilt [14-17]. Mit dem Einsatz von Polymeren anstelle des bisher verwendeten Glases als Material für die Chipsubstrate und der kontaktlosen Leitfähigkeitsmessung anstelle aufwändiger optischer Verfahren für die Detektion, will man eine signifikante Kostenreduktion gegenüber dem bisherigen Gerätestandard erreichen und so für LOC mehr Praxisanwendungen und verbesserte Akzeptanz erreichen. Eine Gerätefamilie für „Miniaturisierte Kapillarelektrophorese“ (*MinCE_family*) wurde konzipiert, wobei *MinCE_basic* ein erstes universell einsetzbares Gerät darstellt und *MinCE_online* mit automatisiertem Fluidikhandling für komplexe Aufgaben in der Prozesskontrolle zum Einsatz kommen soll [18, 19].

Die bisherigen Arbeiten führten zu neuen Fragestellungen, die für den weiteren Einsatz von MinCE äußerst relevant sind:

- Im Bereich von Grundlagenuntersuchungen zur DNA-Analytik als Hauptanwendung mit extrem großem Einsatzpotenzial wurde bei ersten Versuchen eine besonders hohe Empfindlichkeit der kontaktlosen Leitfähigkeitmessungen festgestellt. Was sind mögliche Ursachen dafür und kann man daraus Schlussfolgerungen für die weitere Optimierung ziehen?
- Wichtig für die analytische Performance der Mikrochip-CE sind die exakte Injektion der Probe als kritische Größe für die Analysepräzision und ein großes Signal-Rausch-Verhältnis der elektrischen Messanordnung als bestimmend für die analytische Nachweisgrenze. Welche Möglichkeiten zu messtechnischen Verbesserungen gegenüber dem gegenwärtigen Stand gibt es?
- MinCE_*basic* und MinCE_*online* sind Ein-Kanal-Messsysteme. Welche Möglichkeiten der Mikrotechnik zur Integration von Komponenten und damit zur Steigerung der Produktivität und zur weiteren Kostenreduktion lassen sich nutzen?

Unter diesen Aspekten ist die vorliegende Arbeit wie folgt gegliedert:

Kapitel 2 enthält die theoretischen und technischen Grundlagen der Mikrochip-Kapillarelektrophorese und der zugehörigen Messtechniken. Zum Thema DNA-Analyse werden die Struktur von DNA, ihre elektrischen Eigenschaften in wässrigen Lösungen und die Vorgehensweise der DNA-Analyse mittels Elektrophorese erarbeitet. Anschließend werden Basistechnologien zur Mikrostrukturierung und die Aufbau- und Verbindungstechnologien beschrieben.

In Kapitel 3 werden die Herstellungsstrategien und die Prozessschritte für die mikrofluidischen Chips aus Polymeren und die Impedanzsensoren ausführlich dargestellt. Aufbauend auf dem schon am IMT etablierten Know-How werden weitere Optimierungen zu dieser Arbeit dargestellt.

Die durchgeführten Experimente zu Grundlagenuntersuchungen folgen in Kapitel 4. Die Ergebnisse zum Thema empfindliche Leitfähigkeitsdetektion in der DNA-Analytik werden zunächst diskutiert, anschließend wird auf die messtechnische Verbesserung der Sensorempfindlichkeit eingegangen. Die integrierte Überwachung der Probeninjektion zur Verbesserung der Analysenpräzision wird zum Schluss vorgestellt.

Kapitel 5 stellt ein Lab-on-Chip-System für Multi-Kanal-Messungen als Prototyp für die nächste Gerätegeneration vor. Neu ist insbesondere die CE auf einer CD-Plattform, wofür eine Industriekooperation mit der Firma arvato digital service (Gütersloh, Deutschland) eingegangen wurde, die hauptsächlich optische Speichermedien wie CDs und DVDs herstellt. Die Entwicklungsschritte vom Layout-Entwurf über die Auswahl und technologische Anpassung eines für die chemische Analyse geeigneten Hochleistungspolymers bis hin zur Entwicklung eines kompakten Messgeräts, das einem portablen CD-Player gleicht, werden detailliert aufgeführt. Erste Messungen und die Ergebnisse werden zum Schluss dargestellt.

Die Arbeit wird schließlich in Kapitel 6 zusammengefasst.

2 Grundlagen

In diesem Kapitel werden theoretische und technische Grundlagen zum Verständnis des in dieser Arbeit behandelten Themas erarbeitet. Eine Einführung in das Arbeitsgebiet und die Vorstellung der relevanten Theorien werden Hinweise auf die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen und System-Entwicklungen geben.

2.1 Lab-on-Chip

Der generelle Trend der Miniaturisierung bei modernen Techniken wurde auch in die instrumentelle Chemie implementiert [20-26]. Die Idee war, dass zu analysierende Proben in mikrofluidische Chips gebracht werden, in denen sämtliche Teilschritte einer Analyse von der Probenvorbereitung bis zur Detektion vollzogen werden. Durch die Miniaturisierung können chemische Analysen schneller, zuverlässiger und kostengünstiger mit geringerer Probenmenge und niedrigem Energieverbrauch durchgeführt werden. Außerdem können die Analysen durch die Integration sämtlicher Teilprozesse automatisiert werden.

Das erste Lab-on-Chip-System war ein miniaturisierter Gaschromatograph, der in den 1970er Jahren von Terry, Jerman and Angell auf einem zwei-Zoll-Siliziumwafer entwickelt wurde. Dabei zeigten sie den neuen Einsatz von dem aus der Mikroelektronik bekannten Silizium als Substrat für analytische Komponenten [27, 28]. Ende der 1980er Jahre und Anfang der 1990er Jahre expandierte die Lab-on-Chip-Forschung in verschiedenen analytischen Bereichen [7, 29-32]. Mikrofluidische Bauteile, wie Mikrokanäle, Mikropumpen, Mikroventile und Flusssensoren wurden mit den aus der Halbleiterforschung übernommenen Techniken hergestellt und in einem System integriert [33].

In den 1990er Jahren wurde kommerzielles Interesse für Lab-on-Chip-Systeme geweckt, als die Technologien ein großes Potenzial in der gentechnischen Forschung wie Kapillarelektrophorese für DNA-Sequenzierung und DNA-Mikroarrays gezeigt haben. Hierfür bietet Mikrofluidik attraktive Vorteile wie schnelle Prozesse mit einem hohen Probendurchsatz, hohe Auflösung und die Möglichkeit zur Automatisierung. Das erste vollautomatisierte Lab-on-Chip-System zur DNA- und Proteinanalyse wurde von der Firma Agilent Technologies (Palo Alto, Kalifornien, USA) 1998 auf dem Markt präsentiert (Abb. 2-1).



Abbildung 2-1 Ein Lab-on-Chip-System zur DNA- und Protein-Analyse der Firma Agilent Technologies

Mit den Mikrochips in handhabbarem Maßstab erhöhte sich der Bedarf an kompakten Messgeräten. Die miniaturisierten portablen Analysengeräte können die Analytik vom Zentrallabor hin zur Vor-Ort-Untersuchung bringen. Insbesondere kann solch ein kompaktes System in Point-of-Care-Testing für medizinische Diagnostik und in der Telemedizin eingesetzt werden. Ein Blutmessgerät von der Firma Medimate (Enschede, Niederlande) mittels Kapillarelektrophorese im Mikrochipformat für Lithiumgehaltbestimmung im Blut zur Behandlung von Depression stellt ein gutes Beispiel dar [34, 35]. Patienten können selbst durch Blutmonitoring mit einem Mikrochip zu Hause die richtige Lithiumdosierung zur Behandlung der Depression überwachen.

2.2 Einführung in die Kapillarelektrophorese

Kapillarelektrophorese gilt als eine der fortschrittlichsten instrumentellen Separationstechniken in der analytischen Chemie. Die Miniaturisierung von Kapillarelektrophorese auf einem Chip ist ein gelungenes Beispiel in der Lab-on-Chip-Entwicklung.

Elektrophorese bezeichnet die Migration von elektrisch geladenen Spezies in elektrolytischen Lösungen unter Einfluss des elektrischen Feldes. Die Migrationsgeschwindigkeit von jeder Spezies ist von der Ladung des Teilchens, seiner Größe und Umgebung sowie von der Stärke des elek-

trischen Feldes abhängig. Dadurch kommt es im Zuge einer elektrophoretischen Migration zur Separation verschiedener Spezies in Lösungen.

Elektrophorese als Separationstechnik wurde zuerst in den 1930er Jahren von Tiselius vorgestellt, dabei wurde menschliches Serum nach Albumin, α -Globuline, β -Globuline und γ -Globuline getrennt [36]. Seine Arbeit demonstrierte das Potential der Elektrophorese und wurde in 1948 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Die Entwicklung der Kapillarelektrophorese begann mit den Pionierarbeiten Ende der 1970er Jahre von Mikkers, Everaerts und Verheggen [37]. Durch den Einsatz dünner Röhren aus Teflon mit Innendurchmessern bis 200 μm wurden elektrophoretische Trennungen realisiert. Zu Beginn der 1980er Jahre konnten hocheffiziente Trennleistungen durch den Einsatz von Quarzglas kapillaren mit Innendurchmessern von 75 μm von Jorgenson und Lukacs erzielt werden, wobei das große Verhältnis von Oberfläche zu Volumen den störenden Einfluss der thermisch induzierten Konvektion stark vermindert hat [38, 39]. Verbesserte Wärmeableitung ermöglichte dabei den Einsatz eines großen elektrischen Feldes zur Separation, welches die gesamte Analysezeit verkürzte.

Bei den gegenwärtigen Entwicklungen zur Miniaturisierung in der analytischen Chemie wurde die Kapillarelektrophorese Anfang der 1990er Jahre von Manz und Harrison in das Mikrochipformat übertragen [40, 41]. Die Motivation zur Miniaturisierung instrumenteller Trennverfahren beruht auf der reduzierten Analysezeit und dem geringen Verbrauch von Lösungsmitteln und Analytproben. Kapillaren werden durch Mikrokanäle ersetzt. Außerdem wurde eine neue Methode zur Integration der Probeninjektion auf dem Chip mittels einen zusätzlichen Mikrokanals vorgestellt. Eine typische Mikrochip-Kapillarelektrophorese ist in Abbildung 2-2 dargestellt. Sie besteht aus zwei sich kreuzenden Kanälen; ein kurzer Kanal dient zum Proben transport und zur Probeninjektion, im langen Kanal findet elektrophoretische Separation statt. An den Enden der Kanäle befinden sich Fluidreservoirs zur Fluideinführung von der Makrowelt in den Mikrokanal.

Die beide Kanäle werden mit Puffer, einer elektrolytischen Lösung befüllt und die Probe wird in ein Reservoir an einem Ende des kurzen Injektionskanals überführt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes, lässt sich

die Probe durch den Injektionskanal transportieren (Abb. 2-2 (a)). Ein definierter Teil der Probe, der sich in der Kanalkreuzung befindet, wird durch Umschalten der Spannung vom Injektionskanal zum Separationskanal überführt (Abb. 2-2 (b)), wodurch eine reproduzierbare Dosierung der Probenmenge erreicht wird, die dem Volumen der Kanalkreuzung entspricht. Die Probe im Separationskanal wird dann unter dem Einfluss des elektrischen Feldes in einzelne Spezies getrennt, welche dann am Ende des Trennkanals detektiert werden (Abb. 2-2 (c)).

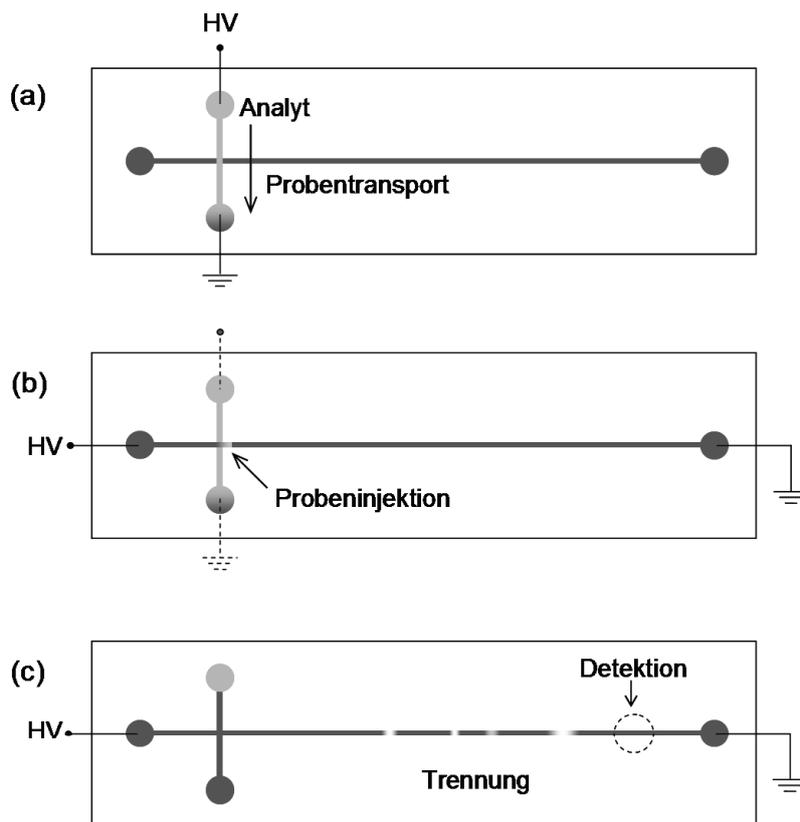


Abbildung 2-2 Sequenz der Mikrochip-CE:
 (a) Probentransport, (b) Probeninjektion, (c) Separation

Anwendungen der Kapillarelektrophorese im Mikrochipformat sind vielseitig. Sie reichen von der Lebensmittelanalytik, dem Umweltmonitoring, dem Prozessmonitoring in der Elektrochemie, der pharmazeutischen Forschung, der medizinischen Diagnostik, kriminaltechnischen Untersuchungen bis zur Genforschung [8, 42-51]. Auftrennung von DNA-Fragmenten ist in vielen biologischen Untersuchungen und der Genforschungen ein wichtiger Schritt; Kapillarelektrophorese etablierten sich in der

DNA-Analytik als ein Standardverfahren.

2.3 Theoretische Grundlagen der Kapillarelektrophorese

2.3.1 Elektrophoretische Mobilität

In einem elektrischen Gleichfeld wandern geladene Teilchen in bestimmten Richtungen – Anionen wandern zur Anode und Kationen zur Kathode. Unter stationären Bedingungen bewegen sich die Ionen durch die Trägermedien mit einer konstanten Geschwindigkeit. Dabei wird die Wandergeschwindigkeit mit zunehmender Feldstärke größer.

$$v_{ep} = \mu_{ep} \cdot E \quad (2-1)$$

v_{ep} = Wandergeschwindigkeit (m/s)

μ_{ep} = elektrophoretische Mobilität (m²/V·s)

E = elektrische Feldstärke (V/m)

Die unterschiedliche Wandergeschwindigkeit von Ionen resultiert aus ihrer elektrophoretischen Mobilität, einer stoffspezifischen Konstante der Ionen, die durch die auf die Ionen wirkenden Kräfte beschrieben wird. Auf sie wirkt einerseits durch das elektrische Feld eine beschleunigende Kraft, andererseits eine Reibungskraft. Die Beschleunigungskraft F_{ep} (N) kann aus der Ladungszahl der Ionen z_i , und der Feldstärke E berechnet werden.

$$F_{ep} = z_i \cdot e_o \cdot E \quad (2-2)$$

e_o = elektrische Elementarladung ($1,6 \cdot 10^{-19}$ C)

Die Reibungskraft F_R (N) lässt sich unter der Annahme von kugelförmigen Ionen in einem laminaren Fluss annähernd durch das Stokessche Gesetz beschreiben.

$$F_R = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i \cdot v_{ep} \quad (2-3)$$

η = Viskosität der Lösung (Pa·s)

r_i = Stokesscher Ionenradius (m)

Das Ion wird solange beschleunigt, bis die beiden Kräfte zueinander im Gleichgewicht stehen.

$$F_{ep} = F_R \quad (2-4)$$

Im Kräftegleichgewicht bewegen sich die Ionen mit einer konstanten Geschwindigkeit v_{ep} , die proportional zum angelegten elektrischen Feld und zur Mobilität ist (Gl. 2-1).

Durch Einsetzen von 2-1, 2-2 und 2-3 in 2-4 ergibt sich folgende Gleichung:

$$\mu_{ep} = \frac{z_i \cdot e_0}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i} \quad (2-5)$$

Die elektrophoretische Mobilität und die daraus resultierende Wandergeschwindigkeit eines Ions ist abhängig von seiner Größe und seiner Ladung. Kleine und höher geladene Ionen wandern schneller als große Ionen mit weniger Ladungen. Jedoch ist die direkte Berechnung der elektrophoretischen Mobilität nicht möglich, da Gl. 2-5 nur für kugelförmige Teilchen in unendliche verdünnten Lösungen gilt. Der Stokessche Radius beinhaltet auch die Hydrathülle in wässrigen Lösungen und korreliert nicht mit dem messbaren Ionenradius in Kristallgittern. Er konnte dennoch durch viele experimentelle Arbeiten gewonnen werden. Anionen sind im Allgemeinen wesentlich größer als Kationen und damit auch schwächer hydratisiert. In der Praxis wird die elektrophoretische Mobilität von zusätzlichen Parametern, wie Temperatur, pH-Wert und Konzentration von Lösungen beeinflusst.

2.3.2 Elektroosmotischer Fluss

Neben der elektrophoretischen Mobilität ist die Elektroosmose noch ein wichtiger elektrokinetischer Effekt in der Kapillarelektrophorese. Viele Materialien, z. B. Glas und Kunststoffe, haben in elektrolytischen Lösungen Ladungen an die Oberflächen. Die Elektroosmose ist ein Phänomen zwischen einer Elektrolytlösung und der geladenen Oberfläche in der Kapillare beim Anlegen eines elektrischen Feldes. Die resultierende relative

Bewegung der Elektrolytlösung zur Kapillarenwand wird elektroosmotischer Fluss (EOF) genannt. Das Grenzflächenphänomen wird durch das Prinzip des von Helmholtz und Stern beschriebenen Zwei-Phasen-Systems erklärt.

Bei Quarzglas, das für Kapillarelektrophorese häufig verwendet wird, ist die Oberfläche je nach pH-Wert der Lösungen durch die Dissoziation der Silanolgruppen unterschiedlich stark negativ geladen. Bei Polymeren, die eigentlich keine ionisierbaren funktionellen Gruppen besitzen, können sich Oberflächenladungen durch die Herstellungsprozesse, Oberflächenbehandlung (z. B. Plasmabehandlung) oder durch die Adsorption dehydrierter Anionen von Elektrolytlösungen auf der Oberfläche bilden.

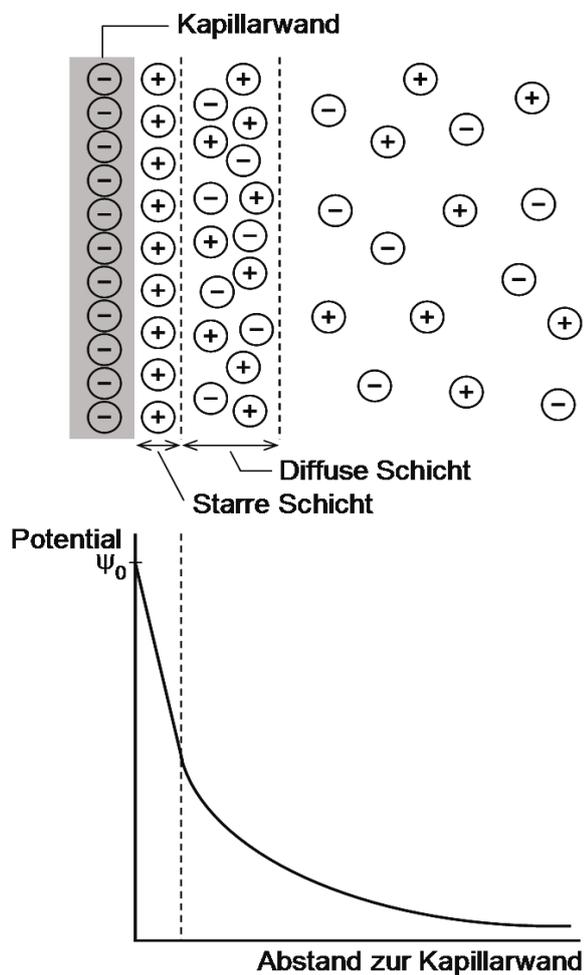


Abbildung 2-3 (a) Aufbau der elektrischen Doppelschicht nach Stern
(b) Potentialverlauf in Abhängigkeit vom Abstand der Kationen zur Kapillaroberfläche

Zur Kompensation der negativ geladenen Oberfläche wird ein Teil der positiv geladenen Ionen aus dem Elektrolyt an der Kapillaroberfläche fixiert und dadurch eine elektrische Doppelschicht ausgebildet (Abb. 2-3, oben). Zu dieser starren Doppelschicht werden weitere gegengeladenen Ionen hingezogen und es entsteht eine diffuse, mobile Grenzschicht, deren Potential exponentiell mit dem Abstand von der Oberfläche abnimmt, während das Potential in der starren Schicht linear abnimmt (Abb. 2-3, unten).

Die Elektroosmose ist vom Potential an der Grenzfläche zwischen starrer und beweglicher Schicht, dem so genannten Zeta-Potential, abhängig. Dieses Zeta-Potential ist eine experimentell indirekt zugängliche Größe. Wird ein elektrisches Feld angelegt, wandern die Kationen in der diffusen Schicht längs ihrer Achse zur Kathode und ziehen die gesamte Flüssigkeit mit. Es bildet sich ein extrem flaches Strömungsprofil aus (Abb. 2-4 (links)), das zu einer sehr geringen Dispersion der Proben und daher zu schmalen Peaks und hoher Effizienz führt, während bei der druckgetriebenen Strömung in der Chromatographie ein parabolisches Hagen-Poisson-Strömungsprofil ausgebildet wird.

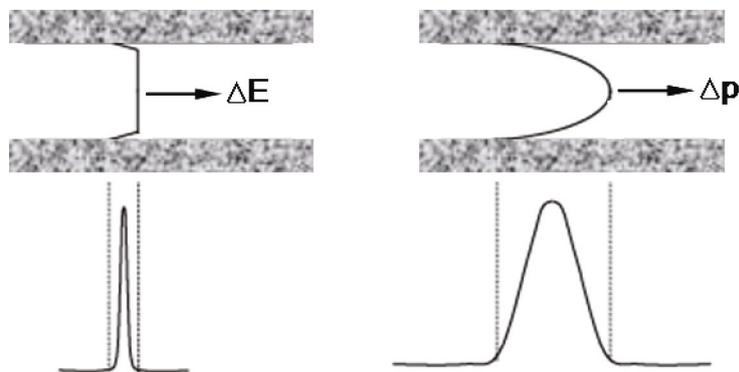


Abbildung 2-4 Vergleich der Strömungsprofile in der CE (links) und der Hochdruckflüssigchromatographie (rechts) und die daraus resultierenden Peakprofile

Zur Beschreibung der Einflüsse eines kapillarelektrophoretischen Systems auf den EOF ist es notwendig, das Zeta-Potential mathematisch darzustellen. Betrachtet wird das Modell des parallelen Plattenkondensators für die Beschreibung von Doppelschichten zwischen zwei Phasen:

$$\zeta = \frac{\rho}{P \cdot \varepsilon} \quad (2-6)$$

ζ = Zeta-Potential

ρ = Ladungsdichte an der Wandoberfläche

P = Debye-Hückel-Parameter

ε = Permittivität des Elektrolyten

Der Debye-Hückel-Parameter P ist proportional zur Ionenstärke des Elektrolyten u , die wie folgt definiert ist:

$$u = \frac{1}{2} \sum c_i z_i \quad (2-7)$$

c_i = Konzentration aller Puffer Bestandteile

z_i = Ladungszahl der Ionen

Aus den Gleichungen 2-6 und 2-7 ist ersichtlich, dass sich das Zeta-Potential umgekehrt proportional zur Ionenstärke und direkt proportional zur Ladungsdichte an der Kapillarwand verhält. Da die Oberflächenladung an der Kapillarinnenwand stark vom pH-Wert anhängig ist ändert sich der EOF mit dem pH-Wert des Elektrolyten. Mit zunehmendem pH-Wert steigt der EOF. Der EOF ist auch von der Konzentration des Elektrolyten und von der Temperatur abhängig. Steigt die Konzentration des Puffers, sinkt der EOF. Die Smoluchowski-Gleichung beschreibt den Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit der Volumenströmung innerhalb der Kapillare, der Feldstärke und dem Zeta-Potential:

$$V_{eof} = - \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta} \cdot E \quad (2-8)$$

V_{eof} = elektroosmotischer Fluss (EOF)

Der EOF ist wie folgt definiert:

$$V_{eof} = \mu_{eof} \cdot E \quad (2-9)$$

μ_{eof} = elektroosmotische Mobilität

Daraus resultiert die elektroosmotische Mobilität μ_{eof} :

$$\mu_{eof} = - \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta} \quad (2-10)$$

Ein kathodischer elektroosmotischer Fluss übt eine Kraft in Richtung Kathode auf die Analytmoleküle aus, so dass sich die effektive Mobilität eines Ions aus der vektoriellen Summe der elektrophoretischen Mobilität des Ions und der elektroosmotischen Mobilität im jeweiligen System ergibt.

$$\mu_{eff} = \mu_{eof} \pm \mu_{ep} \quad (2-11)$$

μ_{eff} = effektive Mobilität
 + für Kationen, - für Anionen

Die Wanderungsgeschwindigkeit v_{eff} des Analyten setzt sich entsprechend aus der vektoriellen Summe des EOF v_{eof} und der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit v_{ep} zusammen:

$$V_{eff} = V_{eof} \pm V_{ep} \quad (2-12)$$

+ für Kationen, - für Anionen

2.3.3 Detektion

Detektion von aufgetrennten Ionen wird meistens direkt in der Trennkapillare erfolgen, kann aber nach Bedarf auch außerhalb der Trennkapillare durch Kopplung mit dem Massenspektrometer (MS) oder mit einem amperometrischen oder konduktometrischen Detektor durchgeführt werden.

Die Detektion stellt ein Problem in der CE dar, da die Detektoren auf die winzigen Dimensionen und die sehr scharfen Banden angepasst sein sollten. Die Messzelle von z. B. $50 \times 50 \times 200 \mu\text{m}^3$ in einer Kapillare entspricht so einem Volumen von nur 0,5 nL. Außerdem benötigen viele Anwendungen eine sehr niedrige Nachweisgrenze und die Detektoren sollen auf die Trennleistung keine negativen Einflüsse haben. Eine hohe Leistung eines Detektors ist in der Praxis immer noch eine wichtige Herausforderung.

2.3.3.1 Optische Detektion

Optische Detektion erfolgt durch die Kapillare ohne Kontakt mit der Lösung. Für konventionelle Systeme ist die optische Detektion wie UV/Vis- und Fluoreszenzdetektion noch die meist verwendete Methode. Mit der Methode können die meisten organischen Ionen detektiert werden. Sie kann auf einem mikrofluidischen Chip durch optische Fasern und Laserdioden integriert werden.

UV-Detektion

Bei den kommerziellen CE-Systemen wird die UV-Detektion, die von der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (*engl. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC*) übernommen wurde, bisher häufig verwendet. UV-absorbierende Ionen können bei bestimmten UV-Wellenlängen detektiert werden. Diese direkte Detektion ist jedoch für die meisten anorganischen Ionen nicht geeignet, da sie nur selten eine signifikante UV-Absorption aufweisen. Sie können jedoch durch Verwendung von UV-aktiven Puffern indirekt gemessen werden. Dabei liefern die Puffer ein konstantes Absorptionssignal, wenn die Analytionen durch die Messzelle wandern werden durch Verdrängung des Puffers negative Signalpeaks gewonnen. Indirekte optische Detektion ist allerdings allgemein weniger empfindlich als direkte Detektion.

Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (Gl. 2.13) ist die Empfindlichkeit proportional zum Lichtweg durch die Messzelle. Bei der Kapillarelektrophorese, die im Gegensatz zur HPLC einen kurzen Lichtweg besitzt, der dem Durchmesser der Kapillare entspricht, ist die Empfindlichkeit der Detektion jedoch begrenzt.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (2.13)$$

I_0 = Intensität des eingestrahlteten Lichtes

I = Intensität des transmittierten Lichtes

ε_{λ} = molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ

c = Konzentration der absorbierenden Substanz

d = Lichtweg durch die Messzelle

Fluoreszenzdetektion

Fluoreszenzdetektion ist das empfindlichste Detektionsverfahren, das in der CE zum Einsatz kommt, wobei sogar ein einzelnes Molekül detektiert werden kann [52]. Laserinduzierte Fluoreszenzdetektion (LIF) basiert auf der Fluoreszenzanregung durch einen Laserstrahl mit einer Wellenlänge, die seinem Absorptionsbereich entspricht. Die Intensität der Fluoreszenz, die natürlich in den Molekülen vorhanden oder nachträglich durch Markierung eingebracht ist, ist von der Laserleistung und der Konzentration abhängig. Die Methode wird hauptsächlich in der DNA-Sequenzierung eingesetzt, in der die Proben bereits einen entsprechenden Farbstoff zur Detektion tragen. Niedermolekulare Verbindungen müssen jedoch erst entsprechend derivatisiert werden. Durch die hohe Leistungsdichte des Lasers kann die Methode eine extrem hohe Empfindlichkeit aufweisen.

2.3.3.2 Elektrochemische Detektion

Neben der optischen Detektion bieten sich die elektrochemischen Detektionsverfahren wie Potentiometrie, Amperometrie und Konduktometrie in der Trenntechnik an. Im Gegensatz zu den optischen Verfahren kann in der elektrochemischen Detektion das analytische Signal als elektrisches Signal direkt zur Datenerfassung geliefert werden. Allgemein werden für die Detektion nur elektronische Schaltungen benötigt, die durch Mikroelektronik auch im miniaturisierten Maßstab hergestellt werden können. Somit können die elektrochemischen Detektoren mit einfachen und kostengünstigen Bauteilen realisiert werden.

Potentiometrie

Potentiometrie ist vom Konzept her das einfachste elektrochemische Verfahren. Dabei wird im stromlosen Zustand die Potentialänderung durch Konzentrationsänderung gemessen. Das Potential an der Elektrode, das von der Konzentration des zu bestimmenden Ions abhängig ist, wird durch Spannungsmessung im Bezug zur Referenzelektrode bestimmt. Typische Anwendungen in der chemischen Analytik sind die potentiometrische Bestimmung des pH-Wertes und die Detektion in verschiedene Arten von Titration. Miniaturisierung der Elektroden und geringe Probenvolumina haben bei der Potentiometrie keinen negativen Ein-

fluss auf das Signal, deshalb ist sie für miniaturisierte Systeme gut geeignet.

Amperometrie

Weit verbreitet in der CE ist die Amperometrie, die konventionell bei der Fließinjektionsanalyse oder Flüssigchromatographie häufig verwendet wird. Sie wurde lange in der HPLC verwendet und 1987 durch Wallingford und Ewing in die CE eingeführt [53]. Die Amperometrie bezeichnet Messverfahren eines Elektrolysestroms an einer Arbeitselektrode, während ein konstantes elektrochemisches Potential anliegt. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen optischen Detektionsverfahren, deren Empfindlichkeit nach dem Lambert-Beersche Gesetz in den miniaturisierten Fluidkanälen abnimmt, verbessert in der Amperometrie die Arbeitselektrode im Miniaturmaßstab die Leitungsfähigkeit. Bei einer Elektronentransferreaktion ist der Faradaysche Strom I_f proportional zur Anzahl der Moleküle des oxidierten oder reduzierten Analytes auf der Oberfläche der Arbeitselektrode. Der kapazitive Strom I_c wird beim Doppelschichtprozess gemessen. Mit der Miniaturisierung der Arbeitselektroden nimmt das Verhältnis I_f/I_c zu und die Antwortzeit und Analytadsorption nimmt ab. Der gemessene Elektrolysestrom ist zur Konzentration des umgesetzten Stoffes direkt proportional. Nach dem Faradaysche Gesetz gilt:

$$I_f = \frac{dQ}{dt} = nF \frac{dN}{dt} \quad (2.14)$$

Q = auf der Arbeitselektrodenoberfläche übertragene Ladung; t = Zeit

n = Anzahl der übertragenen Elektronen pro Analytmolekül

N = Anzahl der oxidierten oder reduzierten Moleküle

F = Faradaysche Konstante (96485 C/mol)

Bei der Amperometrie entsteht jedoch durch die Separationsspannung Interferenz auf der Arbeitselektrode, die entkoppelt werden muss. Außerdem können viele anorganische Ionen, die nicht elektroaktiv sind, nicht detektiert werden.

Konduktometrie

Konduktometrie ist streng genommen kein elektrochemisches Verfahren, da es nicht von elektrochemischer Oberflächenreaktion abhängig ist. Es wird eine elektrische Eigenschaft, die Leitfähigkeit der Lösung zwischen den Messelektroden, gemessen. Im Gegensatz zur Amperometrie, die geeignete Redox-Eigenschaften der Analyten benötigt, ist die Konduktometrie ein universell einsetzbares Verfahren. In der CE erfolgt die Separation durch Migration der ionischen Spezies. Im Prinzip können alle geladenen Spezies durch Konduktometrie detektiert werden. Konduktometrie wurde bereits in der frühen Entwicklungsphase der CE als Detektionsmethode betrachtet. Die erste Anwendung erfolgte 1979 durch Mikkers et al. [37].

Der Widerstand der Elektrolytlösungen ist durch das Ohmsche Gesetz definiert. Weiterhin gilt:

$$R = \rho \frac{d}{A} = \frac{1}{\kappa} \frac{d}{A} \quad (2-15)$$

d = Elektrodenabstand

A = Fläche zwischen den Elektroden

ρ = spezifischer elektrischer Widerstand der Lösung

κ = spezifische Leitfähigkeit der Lösung

Die spezifische Leitfähigkeit κ (S/m) ist von der Anzahl der vorhandenen Ionen abhängig. Sie steht in Beziehung mit der molaren Konzentration des Elektrolyten c und der molaren Leitfähigkeit λ (S·m²/mol).

$$\kappa = c\lambda \quad (2-16)$$

Die Leitfähigkeit von einer Elektrolytlösung wird durch Konzentrationen und molare Leitfähigkeiten von beiden Kation E⁺ und Anion E⁻ beschrieben:

$$\kappa = c_{E^+} \lambda_{E^+} + c_{E^-} \lambda_{E^-} \quad (2-17)$$

Die molare Leitfähigkeit resultiert aus der elektrophoretischen Mobilität μ :

$$\lambda = zF\mu \quad (2-18)$$

F = Faradaysche Konstante (96485 C/mol)

Gemessen wird die Leitfähigkeit von einem Kation eines Analyts A^+ , das in einer Pufferlösung P gelöst ist.

$$\kappa = c_{A^+} \lambda_{A^+} + (c_{P^-} + [1 - k_A] c_{A^+}) \lambda_{P^-} + (c_{P^+} - c_{A^+} k_A) \lambda_{P^+} \quad (2-19)$$

$$\text{mit } k_A = \frac{\mu_{P^-} (\mu_{A^+} + \mu_{P^+})}{\mu_{A^+} (\mu_{P^-} + \mu_{P^+})} \quad [54]$$

Leitfähigkeitsdetektion in der CE basiert auf Leitfähigkeitsänderungen in der Detektionszelle. Das Messsignal ist daher direkt proportional zum Mobilitätsunterschied zwischen Analyt und Puffer. Die Leitfähigkeit bzw. Mobilität der Ionen wird aber auch durch Temperatur, Konzentration der Lösung und elektrostatischen Wechselwirkungen von Ionen in Elektrolytlösungen beeinflusst.

Die Leitfähigkeit kann nicht direkt gemessen, sondern indirekt durch Strommessung beim Anlegen der Spannung ermittelt werden. Die meisten Anwendungen benötigen eine Wechselspannung. Gleichspannung führt zur Polarisierung und Ladungstransportreaktion, d. h. Elektrolyse an den Elektroden. Wechselspannung vermeidet die Nettoreaktion, der Polarisierungseffekt wird im ersten Halbzyklus zurückgesetzt während der Strom in dem nachfolgenden Zyklus in anderer Richtung fließt.

Die Leitfähigkeitsdetektion kann sowohl direkt in einer Lösung kontaktiert, als auch ohne Kontakt mit der Lösung mittels Hochfrequenztechnik durchgeführt werden. In dem nächsten Abschnitt wird die kontaktlose Leitfähigkeitsdetektion, die in dieser Arbeit verwendet wurde, beschrieben.

2.3.3.3 Kapazitiv gekoppelte kontaktlose Leitfähigkeitsdetektion

Die kapazitiv gekoppelte kontaktlose Leitfähigkeitsdetektion (*engl. Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection, C4D*) hat in letzter Zeit als eine Alternative zur konventionellen Leitfähigkeitsmessung Auf-

merksamkeit erregt [55-58]. Bei der Methode wird Wechselspannung durch Hochfrequenztechnik kapazitiv in die Messzelle eingekoppelt. Das kontaktlose Messverfahren hat den Vorteil, dass die Messelektroden nicht mit der Elektrolytlösung in Kontakt kommen, d. h. die Messelektroden sind inhärent entkoppelt vom Gleichspannungsfeld für die Stofftrennung, zusätzlich wird eine Elektrodenkorrosion vermieden. Somit sind die Messsignale langzeitstabil und besser reproduzierbar.

Kontaktlose Leitfähigkeitsdetektion wurde bereits in den 1950er Jahren in der analytischen Chemie zur nicht invasiven Untersuchung eingeführt. Zu der Zeit wurde die Methode zur Überwachung von Titration oder von Flussströmung verwendet. In der Elektrophorese wurde die Methode 1980 von Gas und seinen Mitarbeitern in der Isotachophorese vorgestellt [59], wobei die Messzelle aus vier radial um die Trennsäule angeordneten Elektroden bestand. Ende den 1990er Jahren wurden zwei unabhängige Arbeiten über kontaktlose Leitfähigkeitsdetektion mit axialem Elektrodendesign in der Kapillarelektrophorese vorgestellt [60, 61]. Beide Gruppen haben ein ähnliches Layout mit röhrenförmigen Detektionselektroden axial um die Kapillare entworfen.

Die Messzelle eines kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektors besteht aus zwei Elektroden, an die eine hochfrequente Wechselspannung angelegt wird.

Aus Gl. 2-15 folgt:

$$R_E = \frac{v}{i} = \frac{1}{\kappa} \frac{d}{A} \quad (2-20)$$

Die komplexe Impedanz eines Kondensators Z_C bei der Wechselspannung mit Frequenz f ist:

$$Z_C = \frac{1}{j\omega C} \quad (2-21)$$

mit $\omega = 2 \cdot \pi \cdot f$

Kapazitive Kopplung zwischen Elektroden und Messzelle lautet wie folgt:

$$C = \varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{A}{d} \quad (2-22)$$

ε_0 = Permittivität des Vakuums ($8,854 \times 10^{-12}$ F/m),

ε_r = materialspezifische relative Permittivität

Für die in dieser Arbeit verwendeten Chips werden zwei Elektroden ko-planar zueinander auf den Mikrokanälen angeordnet (Abb. 2.5). Die Elektroden sind durch eine Deckfolie vom Elektrolyt getrennt. Der Deckel bildet das Dielektrikum der Ein- bzw. Auskoppelkapazität. An die Senderelektrode wird eine vom Oszillator erzeugte Wechselspannung angelegt. Die Empfängerelektrode ist an einen Verstärker angeschlossen. Aus den Gleichungen 2.21 und 2.22 geht hervor, dass Ein- und Auskoppelimpedanzen mit steigender Frequenz sinken, weiterhin nehmen sie mit großen Ein- und Auskoppelflächen und einer dünnen Deckelfolie ab. Der Empfindlichkeitsverlust durch den Abstand zur Lösung kann somit durch Verwendung einer dünneren Deckelfolie minimiert werden. Außerdem ist eine hohe Permittivität des Kapillarmaterials hierfür ein Vorteil. Die Verwendung einer zu dünnen Deckelfolie für eine guten Ein- und Auskopplung kann allerdings durch Anlegen einer Hochspannung für die elektrophoretische Trennung je nach Material des Deckels zu einem dielektrischen Durchschlag führen. Wie in Abbildung 2-5 (c) dargestellt ist jedoch zu beachten, dass ein direktes Übersprechen zwischen beiden Elektroden vermieden werden muss.

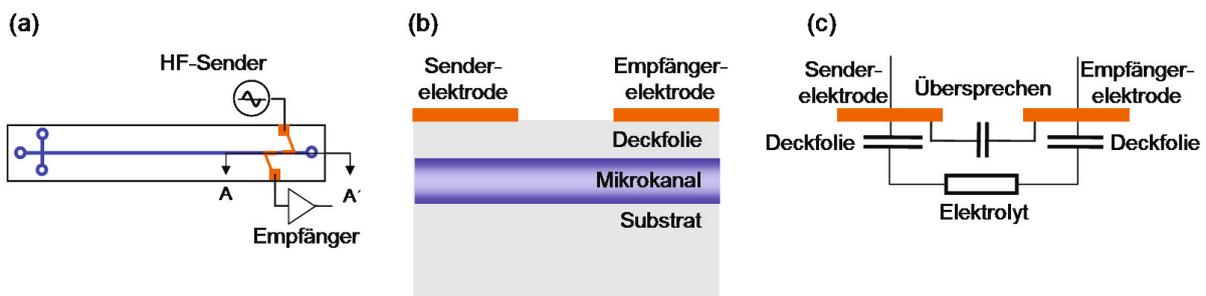


Abbildung 2-5 Kontaktlose Leitfähigkeitsdetektion:

(a) Aufsicht, (b) seitlicher Querschnitt (A-A'), (c) Ersatzschaltbild

Optimierungen von Parametern für die C4D, wie die Frequenz, Signalamplitude, Messzellegeometrie und Elektrodengeometrie wurden in zahlreichen Arbeiten vorgestellt [57, 62-67]. Die Parameter müssen allerdings zusammenhängend betrachtet werden. Zum Beispiel führt eine Er-

höhung der Frequenz zu einer besseren Ein- und Auskopplung des Signals sowie gleichzeitig zu einer größeren Signalüberkopplung. Der Betrag der Signalüberkopplung hängt wiederum von der Elektrodengeometrie und Abschirmung ab. Mit zunehmender Frequenz steigt der kapazitive Leitwertanteil des Analyten und der Pufferlösung, wohingegen im Idealfall nur der reale Widerstand des Analyten erfasst werden soll. Zusätzlich muss der Einfluss der Frequenz und der Messamplitude auf das Signal-Rausch-Verhalten des Verstärkers berücksichtigt werden [65].

2.3.4 Puffersysteme

Die Pufferlösung dient als ein elektrolytisch leitendes Medium, das die Eigenschaft besitzt, die Einhaltung eines definierten pH-Werts zu gewährleisten. Die Wahl des Puffersystems hat einen entscheidenden Einfluss sowohl auf die Trennleistung als auch auf die Detektion [68, 69]. Bei der optischen Detektion sollte der Puffer so gewählt werden, dass er zu keiner optischen Interferenz führt. Außerdem muss auf die Art der Analyten selbst geachtet werden, da z. B. einige Moleküle wie Proteine und Enzyme in bestimmten pH-Wert-Bereichen oder Puffersubstanzen instabil sind. Die Parameter wie pH-Wert und Pufferkonzentration wirken sich direkt auf Effizienz und Selektivität der Trennung aus.

Der pH-Wert der Pufferlösung ist der wichtigste Parameter für die Optimierung der Selektivität eines Systems. Bei der Kapillarelektrophorese wird ein homogenes Puffersystem eingesetzt, das über die gesamte Trennstrecke und -zeit den gleichen pH-Wert gewährleistet. Die elektrophoretische Mobilität der Analytspezies, die durch den EOF überlagert wird, ist abhängig vom Dissoziationsgrad, und damit vom pH-Wert des Puffers. Damit nimmt der EOF mit steigendem pH-Wert zu. Außerdem kann die Ionenmobilität durch den Dissoziationsgrad in der Pufferlösung, d. h. von ihrem pH-Wert bestimmt werden. Durch die Veränderung des pH-Wertes des Puffers kann die Trennung optimiert werden. Jedoch erfolgt die optimale Trennung bei den meisten Puffern nur in einem eng begrenzten pH-Wert-Bereich. Eine hohe Mobilität der Ionen führt außerdem zu einer hohen Stromstärke und dadurch auch zu einer hohen Jouleschen Wärme, welche eine Dispersion verursacht.

Neben dem pH-Wert ist die von der Pufferkonzentration abhängige Ionenstärke ein wichtiger Parameter für die Effizienz der Trennung, der den EOF beeinflusst. Bei einer hohen Konzentration steigt die Temperatur in der Kapillare durch die hohe Leitfähigkeit, welche die Dispersion der Analyttropfen vergrößern. Eine geringe Konzentration führt allerdings leicht zu einer überladenen Elektrodispersion. Mit abnehmender Pufferkonzentration steigt der EOF und somit können Anionen, die eigentlich gegen den EOF wandern, analysiert werden.

Die Diffusionseffekte auf Grund langer Trennzeit und thermischer Effekte durch hohe Ionenmobilität müssen minimiert werden, um eine optimale Trennleistung zu erzielen. Bei der Wahl der Pufferkonzentration wird gefordert, dass sich der pH-Wert durch die eingesetzten Analyten nicht ändern darf. Da bei der Mikrochip-CE nur kleine Volumina eingesetzt werden kann jedoch eine schnelle Änderung des pH-Wertes vorkommen, die zur Änderung der elektrophoretischen und elektroosmotischen Mobilität führt.

2.4 DNA-Analyse

Die DNA-Analyse bezeichnet molekularbiologische Verfahren, welche die DNA verwenden, um Rückschlüsse auf verschiedene Aspekte des Individuums ziehen zu können. Dabei kann es sich, unter Verwendung beispielsweise von menschlicher DNA, um medizinisch-diagnostische Fragen handeln, also um die genetischen Grundlagen einer bereits bestehenden Krankheit aufzuklären, oder um die Untersuchung von Prädispositionen für Krankheiten. DNA-Analysen werden auch durchgeführt, um mit dem Genetischen Fingerabdruck Identitäts- und Verwandtschaftsfragen zu klären.

2.4.1 DNA

DNA ist ein in allen Lebewesen und DNA-Viren vorkommendes Biomolekül und die Trägerin der Erbinformation. Sie enthält unter anderem die Gene, die Proteine codieren, welche für die biologische Entwicklung eines Organismus und den Stoffwechsel in der Zelle notwendig sind.

Die DNA ist ein lineares Polymer auf Basis monomerer Einheiten, die sogenannte Nukleotide. Jedes Nukleotid hat drei Bestandteile: Zucker, Phosphat-Reste sowie eine der vier heterozyklischen Basen, Adenin (A), Thymin (T), Cytosin (C), Guanin (G). Der Zucker, Desoxyribose, ist eine ringförmige Pentose, wobei eine OH-Gruppe am zweiten C-Atom durch H-Atom substituiert ist. Die Desoxyribose ist mit einer der vier Basen verbunden und bildet dadurch vier unterschiedliche Nucleoside. Die Bindung zwischen dem Zucker und der Base heißt glycosidische Bindung. Die Basen können nur in räumlich zulässigen Richtungen um die glycosidischen Bindungen rotieren. An der 3'-Position Zuckers ist eine OH-Gruppe vorhanden, welche ein Nukleotid über eine Phosphodiester-Bindung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids zum 5'-Kohlenstoffatom des zugehörigen Zuckers verknüpft. Dadurch besitzt jeder Einzelstrang zwei verschiedene Enden: ein 3'-Hydroxylende und ein 5'-Phosphatende. Die Desoxyribose und die Phosphatreste zusammen bilden das Rückgrat des Moleküls. In Abbildung 2-6 sind zwei typische Basenpaarabschnitte dargestellt.

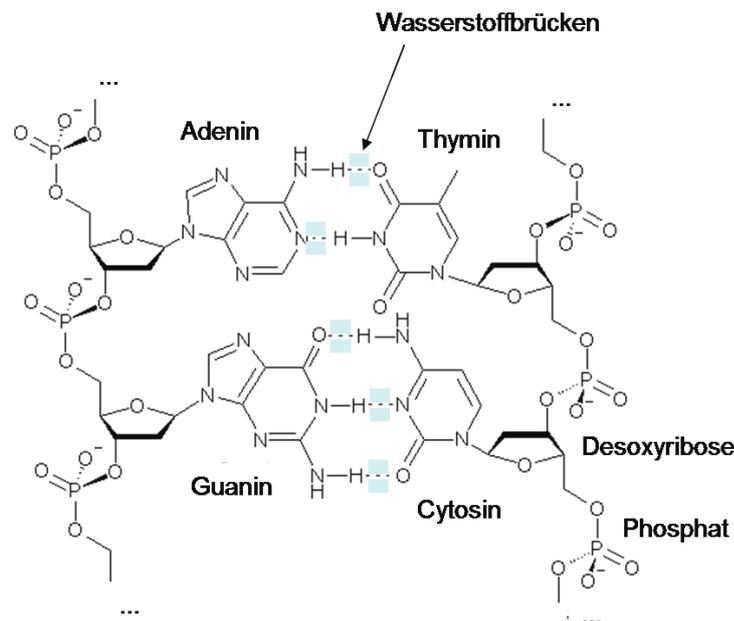


Abbildung 2-6 Strukturformel eines DNA-Abschnitts

Zwei Einzelstränge bilden eine Doppelhelix einer spiralförmigen Konformation, die in entgegengesetzter Richtung aneinandergelagert sind. An jedem Ende der Doppelhelix hat einer der beiden Einzelstränge ein 3'-Hydroxylende, der andere ein 5'-Phosphatende. Durch die Aneinanderla-

gerung stehen sich in der Mitte der Doppelhelix immer zwei bestimmte Basen gegenüber. Es paaren sich immer Adenin und Thymin, die dabei zwei Wasserstoffbrücken ausbilden, oder Cytosin mit Guanin, die über drei Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Da sich immer die gleichen Basen paaren, lässt sich aus der Sequenz der Basen in einem Strang die des anderen Strangs ableiten, d. h. diese Sequenzen sind komplementär. Die Wasserstoffbrücken sind dabei für die Ausprägung der Paarungen verantwortlich. Die Doppelhelix wird durch Stapelwechselwirkungen zwischen aufeinander folgenden Basen stabilisiert. Die Abfolge der Basen im Strang kodiert die genetische Information. Die ganze Helix hat einen Durchmesser von ca. 2 nm und windet sich mit jedem Zuckermolekül um 0,34 nm weiter. Die Ebenen der Zuckermoleküle stehen in einem Winkel von 36° zueinander und nach 10 Basen wird eine volle Umdrehung und 3,4 nm erreicht. Beim Umeinanderwinden der beiden Einzelstränge verbleiben seitliche Lücken, so dass hier die Basen direkt an der Oberfläche liegen. Von diesen „Grooves“ gibt es zwei, die sich um die Doppelhelix herumwinden. Die „major Groove“ ist 2,2 nm breit, die „minor Groove“ 1,2 nm.

2.4.2 Elektrische Eigenschaften von DNA-Lösung

Die DNA ist bei neutralem pH-Wert ein negativ geladenes Molekül, wobei die negativen Ladungen auf den Phosphaten im Rückgrat der Stränge sitzen. Zwei von drei sauren OH-Gruppen der Phosphate sind mit den jeweils benachbarten Desoxyribosen verestert und die dritte gibt bei neutralem pH-Wert ein Proton ab, welches die negative Ladung bewirkt. Diese dadurch in der Phosphatgruppe freigelegten Sauerstoffatome auf der Außenoberfläche der Moleküle sind die dominanten Ladungen der DNA-Moleküle (siehe Abb. 2-5).

Wasserstoffbrücken zwischen zwei Basen entstehen durch die Anziehung zwischen einem elektronegativen Atom wie Stickstoff oder Sauerstoff und Wasserstoff, das an weiteren elektronegativen Stickstoff kovalent gebunden ist. Diese schwachen Bindungen zwischen den Basen werden bei hoher Temperatur überwunden und die beiden Einzelstränge trennen sich voneinander. Dies wird als Denaturieren bezeichnet. Die Temperatur hängt von der Länge des Moleküls, der Ionenstärke des Lösungsmittels und der jeweiligen Basensequenz in der Doppelhelix ab.

Sie steigt, wenn im Molekül mehr GC-Basenpaare liegen, da diese entropisch günstiger sind als AT-Basenpaare. Die Denaturierung ist reversibel. Wenn die Temperatur unter die Denaturierungstemperatur fällt lagern sich die Einzelstränge der Nukleinsäuren wieder zusammen. Die Denaturierung durch Erwärmung kann auch zu Änderungen kovalenter Bindungen und somit zu Kettenbrüchen führen.

Dielektrische Relaxation von doppelsträngiger DNA und denaturierter einsträngiger DNA in Elektrolytlösungen wurde als eine Funktion von der Frequenz und auch von der elektrischen Feldstärke des Messsignals bei der Impedanzspektroskopie untersucht. Einsträngige DNA zeigte eine geringere dielektrische Relaxation als doppelsträngige DNA [70]. DNA in Einzelsträngen haben auf Grund der Ausrichtung der positiv geladenen Amidgruppen ein permanentes Dipolmoment quer zur Achse. Das permanente Dipolmoment beträgt ca. 20 D pro Basenpaarabschnitt. Da DNA allgemein aus tausenden Basenpaaren besteht muss das gesamte Dipolmoment berücksichtigt werden. Die denaturierte DNA tendiert allerdings sich zu winden, wobei die effektive Länge des Moleküls zurückgeht und dadurch das Dipolmoment abnimmt [71, 72]. Wenn einsträngige DNA ausgerichtet wird kommt im niedrigen MHz-Frequenzbereich eine Relaxation vor.

Im Allgemein hat doppelsträngige DNA ein kaum intrinsisches permanentes Dipolmoment weil zwei Stränge antiparallel so angeordnet sind, dass das Dipolmoment eines Strandes das Dipolmoment des anderen ausgleicht. Allerdings wurde bei einigen Untersuchungen ein kleines permanentes Dipolmoment beobachtet [73]. Im Wechselfeld kann die Symmetrie der Moleküle leicht deformiert werden, dadurch kann ein kleines Dipolmoment entstehen [74]. Das kleine Dipolmoment von doppelsträngiger DNA kann aber auch durch geladene Liganden, die an der DNA anhängen, z. B. Protein oder multivalente Kationen vorkommen. Durch diese unsymmetrischen Liganden wird die Symmetrie gebrochen, welche ein permanentes Dipolmoment produzieren kann [75].

Wenn DNA in einem Lösungsmittel, wie z. B. einer Salzlösung, aufgelöst wird, bildet sich ein induziertes Dipolmoment auf Grund der Reorganisation der Ladungen in eine Schicht um die DNA-Moleküle, welche als Gegenionschicht bezeichnet wird. Die Kationen, die ans Phosphatrück-

grat des DNA-Moleküls angezogen werden, bilden eine Doppelschicht. Die Ladungen sind wenig mobil und oszillieren in einem elektrischen Feld um die Phosphatzentren. Die meisten dieser Gegenionen sind um die DNA-Moleküle diffundiert und ein Teil davon kondensiert an der Oberfläche. Diese kondensierten Gegenionen verbinden sich mit den Ladungen des Phosphatrückgrats durch schwache kovalente Bindungen. Das Dipolmoment, das bei der doppelsträngigen DNA gemessen wird, ist eher induziert als permanent.

Die Permittivität einer DNA-Lösung hängt von der Konzentration und dem Auftreten von der Art von Kationen ab [76, 77]. Mit zunehmender Konzentration der Lösung werden mehr Ladungen von Phosphat neutralisiert und dielektrische Inkremente nehmen ab. Einfache anorganisch monovalente Kationen verbinden sich am Phosphatrückgrat der DNA-Moleküle und bilden dort kondensierte und diffuse Schichten. Hohe Konzentrationen der divalenten metallischen Kationen destabilisieren die DNA-Helix [78, 79], wobei das dielektrische Inkrement verringert [80]. Farbstoffe können sich an DNA anhängen, Ladungen neutralisieren und dadurch das dielektrische Inkrement reduzieren. Die Kationenkonzentration entscheidet die Dissoziation der DNA-Moleküle. Mit zunehmender Kationenkonzentration steigt das Dipolmoment der Gegenionen [79, 81].

2.4.3 Kapillarelektrophorese zur DNA-Analytik

DNA-Elektrophorese ist ein auf Elektrophorese beruhendes analytisches Verfahren zur Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Hierfür wird meist ein spezielles Verfahren der Elektrophorese, die Gelelektrophorese verwendet, wobei Gelmatrizen als Trennmedien verwendet werden. DNA ist in wässrigen Lösungen ein negativ geladenes Molekül, somit kommt es im elektrischen Feld zur elektrophoretischen Migration. Jeder Basenpaarabschnitt besitzt in wässrigen Lösungen zwei negative Ladungen am Phosphat, d. h. die Ladungszahl ist proportional zur Anzahl der Basenpaare. Somit weisen alle DNA-Fragmente ein konstantes Ladungs-zu-Größen-Verhältnis auf, d. h. es kommt zu keiner elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten. Gelmatrizen dienen bei der Auftrennung als Molekularsieb, wobei größere Molekülen stärker gebremst werden. Damit kommt es zur Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe.

2.5 Impedanzspektroskopie

Impedanzspektroskopie ist ein vielfältig angewendetes Verfahren zur berührungslosen Charakterisierung dielektrischer Eigenschaften eines Mediums über einen Frequenzbereich. Dabei wird das frequenzabhängige Verhalten der elektrischen und elektrochemischen Komponenten analysiert. Die Impedanzspektroskopie erfasst die dielektrischen Eigenschaften eines Mediums als Funktion der Frequenz. Die Impedanz ist der komplexe Wechselstromwiderstand, der sowohl die relative Amplitude von Wechselspannung zu Wechselstrom als auch die Phasenverschiebung beschreibt.

Bei Anlegen einer Wechselspannung

$$\underline{u}(t) = U \cdot e^{j\omega t} \quad (2.23)$$

antwortet der Wechselstrom mit einer Phasenverschiebung φ .

$$\underline{i}(t) = I \cdot e^{j(\omega t + \varphi)} \quad (2.24)$$

Die Impedanz ist der Quotient aus komplexer Wechselspannung und komplexem Wechselstrom.

$$\underline{Z} = \frac{\underline{u}(t)}{\underline{i}(t)} = |\underline{Z}| \cdot e^{j\varphi} = \operatorname{Re}\{\underline{Z}\} + j \operatorname{Im}\{\underline{Z}\} \quad (2.25)$$

Der Betrag von Z und die Phasenverschiebung φ berechnen sich dabei aus:

$$|\underline{Z}| = \sqrt{\operatorname{Re}^2\{\underline{Z}\} + \operatorname{Im}^2\{\underline{Z}\}} \quad (2.26)$$

$$\varphi = \arctan \frac{\operatorname{Im}\{\underline{Z}\}}{\operatorname{Re}\{\underline{Z}\}} \quad (2.27)$$

Aus Impedanzmessungen über einen bestimmten Frequenzbereich erhält man ein Impedanzspektrum. Das Impedanzspektrum beschreibt die Übertragungsfunktion des Systems und kann als Bode-Diagramm oder als Nyquist-Diagramm dargestellt werden. Beim Bode-Diagramm werden

der Betrag der Impedanz und die Phasenverschiebung über eine logarithmische Frequenzachse aufgetragen. Im Gegensatz zum Bode-Diagramm werden beim Nyquist-Diagramm Betrag und Phasenverschiebung in einem Diagramm dargestellt, indem man den Real- und Imaginärteil direkt in die komplexe Zahlenebene zeichnet. Da in diesem Fall hauptsächlich Kapazitäten und seltener Induktivitäten auftreten, wird die negative imaginäre Achse normalerweise nach oben aufgetragen. Sind typische Kurvenverläufe für bestimmte Zustände in einem System bekannt, so ist häufig bereits eine grafische Auswertung der Diagramme möglich.

Die Impedanz einer C4D-Messzelle (Abb. 2-7) wird wie folgt dargestellt:

$$Z_{Zelle}(j\omega) = \frac{1}{j\omega C_{St} + \frac{1}{Z_E + \frac{2}{j\omega C}}} \quad (2.28)$$

C_{St} = Streukapazität

C = Kapazität der Deckelfolie

Z_E = Impedanz der Elektrolytlösung

mit $Z_E = R_E + X_E$

R_E = Widerstand der Elektrolytlösung

X_E = kapazitiver Widerstand der Elektrolytlösung)

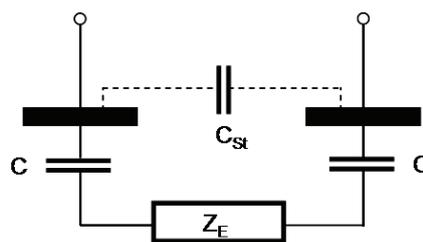


Abbildung -2-7 Vereinfachtes Ersatzschaltbild der C4D-Messzelle

Bei niedriger Frequenz wird die Impedanz der Ein- und Auskopplung größer als Z_E , die Ein- und Auskopplung des Messsignals erfolgt nur schlecht. Ab einer bestimmten Frequenz wird die Streuimpedanz kleiner als Z_E , d. h. es kommt zu einem starken Überkoppeln, die Impedanz der

Analyten kann schlechter erfasst werden. Daraus folgt, dass die Frequenz weder zu tief noch zu hoch gewählt werden darf.

2.6 Mikrofertigung

2.6.1 Kunststoff als Substrat in der Mikrofluidik

Mikrofluidische Komponenten wurden bisher überwiegend in Glas oder Silizium mittels üblicher Ätztechniken hergestellt. Diese aus der Halbleiterindustrie übernommenen Technologien zeigen auch für die mikrofluidische Bauteile die hohe Präzision und Reproduzierbarkeit. Außerdem sprechen die hohe chemische Beständigkeit von Glas und Silizium für dieses Vorgehen. Allerdings sind sowohl Silizium als auch Glas zur Herstellung von großen Stückzahlen zu aufwendig.

Neben Glas und Silizium können die mikrostrukturierten Teile auch aus Kunststoff hergestellt werden. In vielen biologischen und chemischen Anwendungen sind Einwegprodukte wünschenswert, um eine mögliche Kontaminierung der Proben zu vermeiden. Durch Abformprozesse lassen sich thermoplastische Kunststoffteile unabhängig von der Komplexität ihrer Geometrie schnell und kostengünstig herstellen [82]. In dieser Hinsicht wurde Polymer in letzter Zeit immer häufiger als Substratmaterial für mikrofluidische Bauteile eingesetzt [83, 84].

Für den Einsatz im biochemischen, medizinischen und Life-Science Bereich sind insbesondere Biokompatibilität und chemische Beständigkeit gefordert. Speziell als Chipsubstrat für CE-C4D-Messungen sind dazu auch gute dielektrische Eigenschaften, wie hohe Durchschlagfestigkeit und hohe Permittivität bei hoher Frequenz nötig. Kunststoffe haben eine große Auswahl an Materialien mit unterschiedlichen chemischen, mechanischen, elektrischen und optischen Eigenschaften, so dass sich für fast jede Anwendung ein geeigneter Kunststoff finden lässt.

2.6.2 Optische Lithographie

Bei der optischen Lithographie werden die Strukturen einer Maske in den lichtempfindlichen Resist übertragen. Dadurch können planare Struktu-

ren mit der Abmessung abhängig von der Lichtwellenlänge und dem Photolack bis zu Submikrometer-Bereich erzeugt werden. Die Maske bestehen aus Glas- oder Quarzscheiben mit einer strukturierten Chromschicht als Absorber.

Ein flüssiger Photolack, der durch eine Belichtung chemisch verändert wird, wird durch Aufschleudern auf einem Substrat homogen beschichtet. Durch Belichtung mit dem Einsatz einer Maske wird der Photolack strukturiert. Anschließend wird die belichtete Probe mit ausgewählten Lösungsmitteln entwickelt. Bei Positivlack bleiben die belichteten Stellen stehen, somit werden die Strukturen der Maske direkt in den Lack übertragen. Bei Negativlack bleiben die unbelichteten Bereiche stehen, somit werden inverse Strukturen der Maske in den Lack übertragen.

2.6.3 Mikrozerspanung

Die traditionellen Fertigungsverfahren in der Feinwerktechnik wie Fräsen, Bohren oder Drehen wurden in den letzten Jahren auch für Mikrofertungsverfahren eingeführt. Durch hochpräzise Werkzeuge und Steuerung können Strukturen mit den kleinsten lateralen Abmessungen bis zum Bereich von 10 μm und Fertigungstoleranzen bei den Lateralabmessungen bis zum Mikrometerbereich gefertigt werden. Das erzeugbare Aspektverhältnis von freistehenden Einzelstrukturen beträgt drei bis zehn. Als Materialien kommen alle mit Diamant, Hartmetall oder Keramik zerspanbaren Werkstoffe wie formstabile Kunststoffe, Metalle und Halbleiter in Frage [85].

2.6.4 Replikationstechnologie

Zur seriellen Produktion von Mikrostrukturen aus Kunststoffen können Heißprägen, Spritzgießen oder Spritzprägen eingesetzt werden. Beim *Heißprägen* wird der mikrostrukturierte Formeinsatz bei einer Temperatur oberhalb der Glasübergangstemperatur des Kunststoffes in ein Kunststoffhalbzeug gedrückt. Bei dieser Temperatur befindet sich der Kunststoff in einem viskoselastischen Zustand und kann so die Kavitäten des Formeinsatzes ausfüllen, d. h. die Struktur des Formeinsatzes wird in den Kunststoff invers abgebildet. Während des Heißprägens ist ein Evakuieren des Formwerkzeuges notwendig, um Lunker zu vermeiden. An-

schließlich wird der Formeinsatz abgekühlt bis sich der Kunststoff wieder zu verfestigen beginnt. Nach dem Herausfahren des Formeinsatzes aus dem Kunststoff kann das geprägte Teil entnommen werden. Durch sehr geringe Umformungsgeschwindigkeiten und damit kurze Fließwege des Kunststoffes können beim Heißprägeprozess sehr hohen Aspektverhältnisse realisiert werden.

Beim *Mikrospritzgießen* wird dagegen das Kunststoffgranulat in einer Fördereinheit aufgeschmolzen und in ein beheiztes Formwerkzeug eingespritzt. In diesem Werkzeug ist ein mikrostrukturierter Formeinsatz eingebaut. Nach dem Öffnen des Werkzeugs werden die spritzgegossenen Kunststoffteile ausgeworfen. Im Vergleich zum Heißprägen lassen sich beim Spritzgießen kürzere Zykluszeiten realisieren.

Spritzprägen ist eine Variation des Mikrospritzgußverfahrens, wobei das Bauteil nach dem Einspritzvorgang durch Prägen in seine endgültige Form gebracht wird. Hierbei wird der geschmolzene Kunststoff in das praktisch drucklos nicht vollständig geschlossene Werkzeug eingespritzt. Der ansteigende Innendruck öffnet das Werkzeug um einen kontrollierten geringen Weg. Durch Anheben der Schließkraft wird Druck auf die Formmasse ausgeübt und ein relativ spannungsarmes Bauteil ausgeformt. Das Verfahren wurde ursprünglich zur Herstellung von optischen Datenträgern wie CDs und DVDs entwickelt. Es kombiniert Vorteile von Heißprägen und Spritzgießen, zeigt sowohl eine schnelle Zykluszeit als auch eine hohe Genauigkeit.

2.6.5 Aufbau- und Verbindungstechnik

Neben der Herstellung von Mikrokomponenten ist die Aufbau- und Verbindungstechnik zur Integration einzelner Komponenten aus verschiedenen Materialien zu einem Mikrosystem ein wichtiger und kritischer Schritt in der Mikrosystemtechnik. In meisten Fällen müssen die mikrofluidischen Kanalstrukturen mit Deckel versehen werden, um ein geschlossenes Kanalsystem zu erzeugen. Verschiedene Verbindungstechniken wie z. B. thermisches Bonden, Laserschweißen, Klebetechniken und Ultraschallbonden sind dafür einsetzbar.

Die *Klebertechnik* ist eine wichtige Komponente der Aufbau- und Verbindungstechnik, hierfür sind zahlreiche für die Mikrotechnik geeignete Klebstoffe kommerziell erhältlich. Im Gegensatz zu Fügeverfahren wie Bonden oder Löten, trägt die Klebertechnik geringe Wärme ein, deshalb kommt es nicht zu Gefügeveränderungen oder Spannungen in den Fügeteilen. Die Fügeteile werden mittels Klebstoff stoffschlüssig miteinander verbunden. Der Klebstoff haftet an der Fügeteiloberfläche durch physikalische und chemische Wechselwirkungen und mechanischen Formschluss. Für eine optimale Benetzung muss der Klebstoff während des Fügevorgangs flüssig sein, seine innere Festigkeit wird schließlich durch physikalische Abbindevorgänge oder durch chemische Reaktion gewonnen.

Thermoplastische Kunststoffe lassen sich durch *thermisches Bonden* unter erhöhter Temperatur und Druck miteinander verbinden. Dadurch können gleiche Werkstoffe, oder Werkstoffe mit ähnlicher Glasübergangstemperatur und ähnlichem Viskositätsverhalten in der Schmelze ohne Einsatz von Klebstoffen oder Lösungsmitteln miteinander verbunden werden. Die Fügeteile werden aufeinander liegend zwischen zwei parallel ausgerichteten Heizplatten gelegt und dann zusammengedrückt. Knapp unter dem Glasübergangsbereich werden die Teile so miteinander verbunden. Nach der Abkühlung, die noch unter Druck erfolgt, entsteht eine stabile Verbindung.

2.6.6 Dünnschichtabscheidung

Die zur elektrischen Detektion benötigten Mikroelektroden werden durch Dünnschichttechnologien auf die mikrofluidischen Chips integriert. Die Abscheidung der dünnen Schichten (meistens unter 1 μm) erfolgt meist über Verfahren der physikalischen und chemischen Gasphasenabscheidung.

Die *chemische Gasphasenabscheidung* (engl. *Chemical Vapor Deposition, CVD*) ist eine Gasphasenreaktion an oder in der Nähe der Substratoberfläche. Dabei werden die Reaktionsgase gleichzeitig in die Reaktionskammer mit dem zu beschichtenden Substrat geleitet. Die meist vorgeheizten Gase werden durch das beheizte Substrat thermisch aktiviert

und reagieren miteinander. Dabei wird das erwünschte Material abgeschieden und chemisch gebunden.

Bei der *physikalischen Gasphasenabscheidung* (engl. *Physical Vapor Deposition, PVD*), wie Aufdampfen oder Sputtern, wird die Schicht im Gegensatz zu chemische Gasphasenabscheidungsverfahren direkt durch Kondensation eines Materialdampfes des Ausgangsmaterials gebildet. Beim *Aufdampfen* wird das Ausgangsmaterial unter einer erhitzten Temperatur verdampft. Die verdampften Atome wandern durch die Vakuumkammer hin zu dem gegenüberliegenden kühleren Substrat, schlagen sich dort nieder und bilden eine dünne Schicht. Beim *Sputtern* werden Atome und aus wenigen Atomen bestehende Cluster aus einem Target durch Beschuss mit energiereichen Ionen herausgelöst und in die Gasphase überführt. Bei dieser Anwendung sind möglichst reine Metallschichten gewünscht. Daher werden in diesen Fällen hochreine Edelgase, in der Regel Argon, eingesetzt, um eine Oxidation der Schichten zu vermeiden. Im elektrischen Feld wird Argon ionisiert und in Richtung des Targets beschleunigt. Die Argonionen schlagen dort Targetatome und Cluster heraus, diese werden dann auf dem Substrat abgeschieden. Da die Cluster durch den Aufprall und das Herausschlagen durch die Argonionen eine höhere Geschwindigkeit als beim Beschichten durch Aufdampfen haben, treffen sie auch mit einer höheren Geschwindigkeit auf das Substrat auf. Die Schichten haften somit besser.

3 Herstellung von mikrofluidischen CE-Chips und Impedanzsensoren

Das innovative Konzept des Lab-on-Chip kann nur durch die zuverlässige Mikrosystemtechnik realisiert werden. Die richtige Wahl der Fertigungstechnologien einzelner Bauteile und Aufbau- und Verbindungstechnologien ist der Schlüssel zur Entwicklung eines Lab-on-Chip-Systems. In dieser Arbeit wurden mikrofluidische CE-Chips mit integrierten Detektion und Impedanzsensoren mit Mikrobandelektroden hergestellt.

Das IMT bietet Anlagen und praxisbezogenes Know-How für wichtigen Basistechnologien zur Mikrostrukturierung und zum Aufbau der mikrostrukturierten Bauteile. In diesem Kapitel werden die wichtige Herstellungsschritte für mikrofluidische CE-Chips und Impedanzsensoren zusammengefasst.

3.1 Herstellung von mikrofluidischer CE-Chips

Die Herstellungsstrategien für die CE-Mikrochips wurden in den vorangegangenen Arbeiten am IMT entwickelt und optimiert [65, 86-89]. Das Design für den Chip und die Detektionselektroden wurden nach der Optimierung und dem erfolgreichen Einsatz in verschiedenen Anwendungen [65, 86] in diese Arbeit übernommen. Die Geometrie des mikrofluidischen CE-Chips und der Detektionselektroden ist in Abbildung 3-1 dargestellt.

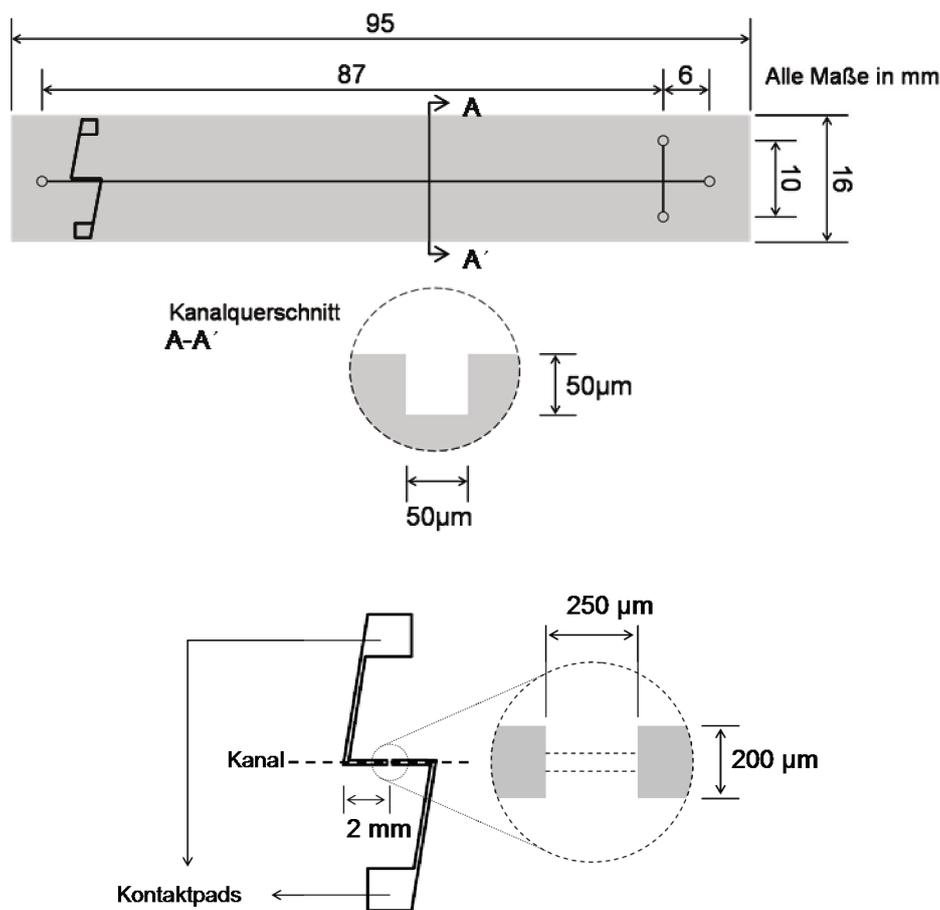


Abbildung 3-1 Geometrie des CE-Chips (oben) und der C4D-Elektroden (unten)

Ein CE-Chip (95 mm x 16 mm) besteht aus zwei sich kreuzenden Mikrokanälen, die quadratischen Querschnitt von 50 µm x 50 µm besitzen. Die Mikrokanäle werden durch Abformung aus verschiedenen thermoplastischen Polymeren hergestellt und mit einer dünnen Folie gedeckelt. Mikroelektroden zur kontaktlosen Leitfähigkeitsmessungen werden direkt

auf dem Chip integriert. Um das direkte Übersprechen zwischen beiden Elektroden zu minimieren wurde die Dicke der Elektroden auf $300\ \mu\text{m}$ verringert. An den beiden Enden der Elektroden werden Kontaktpads ($2\ \text{mm} \times 2\ \text{mm}$) zum Verbinden mit den C4D-Sensoren aufgebracht.

3.1.1 Strukturierung der Mikrokanäle

Die Mikrokanäle wurden durch Heißprägen aus Polymeren hergestellt, wozu ein Formeinsatz benötigt wird. Zur Herstellung eines Formeinsatzes können je nach Strukturgröße, Genauigkeit und Aspektverhältnis der abzuformenden Strukturen unterschiedliche Herstellungsmethoden verwendet werden. In dieser Arbeit wurde er am Institut für Mikroverfahrenstechnik, Karlsruher Institut für Technologie durch Mikrofräsen aus Messing hergestellt. Als Ausgangsmaterialien kamen je nach Anwendungen verschiedenen Thermoplasten, unter anderem Polymethylmethacrylat (PMMA), Polystyrol (PS), Polycarbonat (PC) und Cycloolefin-Polymer (COP) mit Dicken von 500 bis $650\ \mu\text{m}$ zum Einsatz. Die verwendeten Polymeren sind im Anhang A aufgelistet. Für das Heißprägen wurde die Anlage HEX03et des Herstellers Jenoptik Mikrotechnik GmbH (Jena, Deutschland) eingesetzt. In Abbildung 3-2 ist ein Formeinsatz mit zwei CE-Strukturen dargestellt.

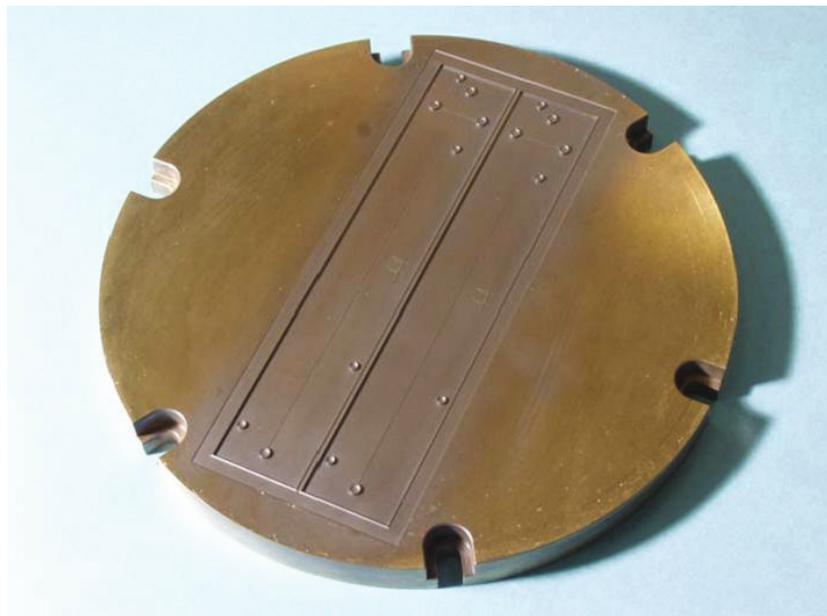


Abbildung 3-2 Formeinsatz aus Messing mit zwei CE-Strukturen [65]

Abbildung 3-3 zeigt eine Rasterelektronenmikroskop (REM)-Aufnahme des Kanalkreuzes einer durch Heißprägen abgeformten Mikrokanalstruktur. Die gute Oberflächenqualität der Mikrokanäle ist deutlich zu erkennen.

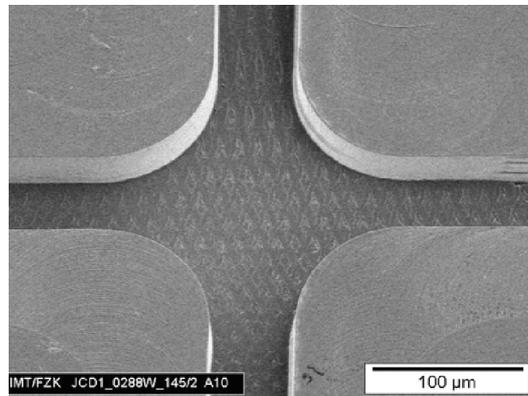


Abbildung 3-3 REM-Aufnahme: Kanalkreuz eines abgeformten Mikrochips [86]

3.1.2 Deckeln der Mikrokanäle

Die abgeformten Mikrokanalstrukturen werden danach mit dünnen Folien mit Dicken von 25 bis 50 µm aus den gleichen Materialien wie die Chipsubstrate verschlossen. Dabei sollen keine Fremdstoffe wie Klebstoffe in die Kanäle gelangen und es sollen keine Deformationen der Kanalgeometrie entstehen. Dafür ist das thermische Bondverfahren gut geeignet. In Abbildung 3-4 ist zu erkennen, dass der Kanalquerschnitt nach dem thermischen Bonden ohne Deformation erhalten bleibt.

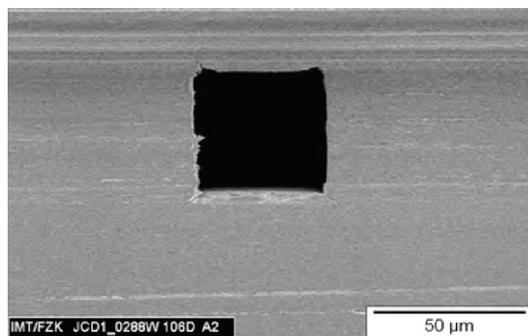


Abbildung 3-4 REM-Aufnahme: Kanalquerschnitt nach dem thermischen Bonden [88]

Der Bondvorgang wurde auf einer Presse (LAT 6.0) der Firma Bürkle GmbH (Freudenstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Heizplatten der Anlage werden zunächst auf die gewünschte Temperatur vorgeheizt. Der notwendige Druck wird pneumatisch durch die bewegliche untere Heizplatte erzeugt. Zur gleichmäßigen Verteilung des Drucks auf die gesamte Oberfläche des Chips wird eine elastomere Siliconunterlage unter dem Chip verwendet. Wenn die eingestellte Temperatur erreicht ist, werden der Chip und die Deckfolie zwischen die Platten eingesetzt und der Druck aufgebracht.

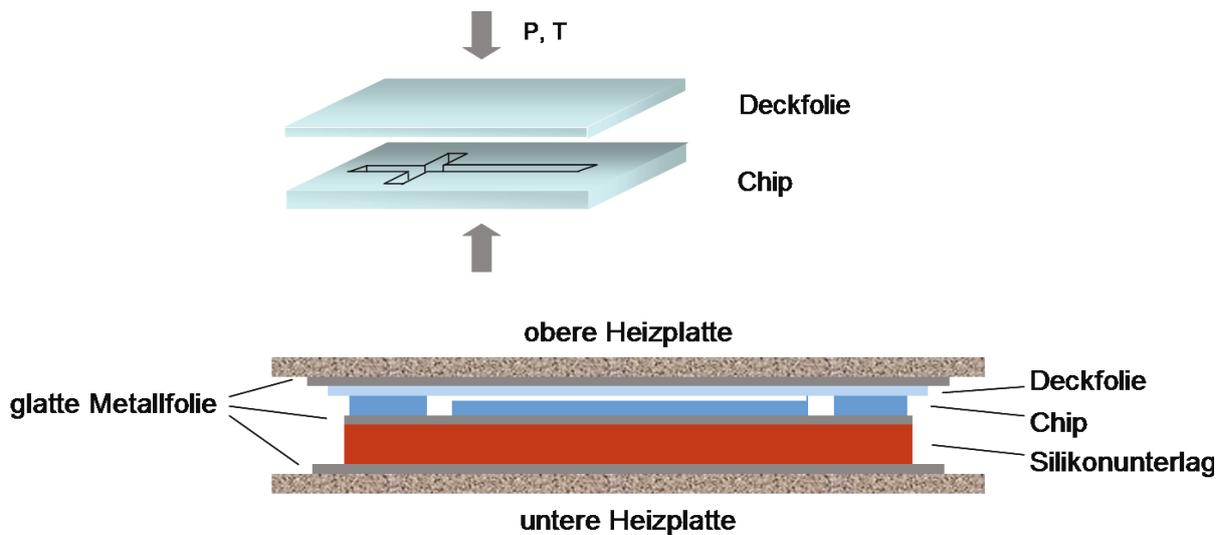


Abbildung 3-5 Versuchsaufbau für das thermische Bonden

Polymer (Glasübergangstemperatur)	PMMA (110 °C)	PS (90 °C)	PC (153 °C)	COP (136 °C)
Prozesstemperatur	94 °C	85 °C	135 °C	128 °C
Prozessdruck	3,4 N/mm ²	3,4 N/mm ²	3,4 N/mm ²	3,4 N/mm ²
Dauer	5 Min	5 Min	5 Min	5 Min

Tabelle 3-1 Prozessparameter für das thermische Bonden von verschiedenen Polymeren

Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 3-5 dargestellt. Während des Prozesses werden Temperatur und Druck konstant gehalten. Nach der eingestellten Prozesszeit wird die Anlage abgekühlt und der Chip kann dann entnommen werden. In Tabelle 3-1 sind alle Prozessparameter beim thermischen Bondverfahren zusammengefasst.

3.1.3 Integration der Detektionselektroden

Zur kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektion werden Mikroelektroden in dünner Schicht auf dem Chip aufgebracht. Die Mikroelektroden können durch den Einsatz einer Schattenmaske mit einem gewünschten Design (Abbildung 3-6) strukturiert werden. Die Maske wurde durch das naschemische Ätzen aus Stahl gefertigt (Ätztechnik Herz GmbH, Ependorf, Deutschland). Die Beschichtung von Gold erfolgt durch Sputtern in einer Sputteranlage (MED 010, FA. Balzers Union, Balzers, Lichtenstein). Als Prozessgas wird Argon verwendet. Die Abscheidungs-geschwindigkeit ist vom Strom und von dem als Target verwendeten Material abhängig. In der Anlagen beträgt die Beschichtungsrate von Gold bei 30 mA ca. 30 nm/s. Bei 10 minütigem Prozess wird ein Goldfilm mit einer Dicke von ca. 300 nm abgeschieden.

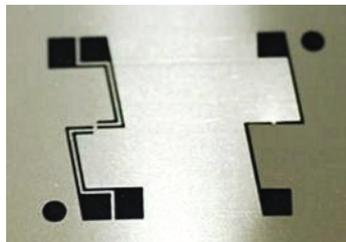


Abbildung 3-6 Schattenmaske mit zwei Elektrodenstrukturen

3.1.4 Aufbringen der Fluidreservoirs

Zur Kopplung der mikrofluidischen Kanäle zur Makrowelt, z. B. zum Befüllen der Kanäle mit Lösungen oder zur Probenaufgabe, werden Flüssigkeitsreservoirs an den Positionen der Einlass- bzw. Auslassöffnungen der Mikrokanäle aufgebracht. Die Verbindung der relativ großen Reservoirstrukturen in Form von Zylinder (Innendurchmesser: 3,5 mm, Außendurchmesser: 5 mm und Höhe: 5 mm) auf den CE-Chip erfolgt durch

Klebertechnik. Hierfür ist ein UV-härtender Klebstoff gut geeignet, wobei die Bildung der Startradikale durch Bestrahlung mit UV-Licht hervorgerufen wird. UV-Klebstoffe ermöglichen ein gezieltes Aushärten unter UV-Licht und weisen dabei eine schnelle Aushärtung (meist unter einer Minute) mit geringer Temperaturerhöhung auf. Als Klebstoff wurde DYMAX 191-M (DYMAX GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet. Abbildung 3-7 zeigt einen fertigen CE-Chip mit integrierten C4D-Elektroden und vier aufgeklebten Reservoirzylindern.

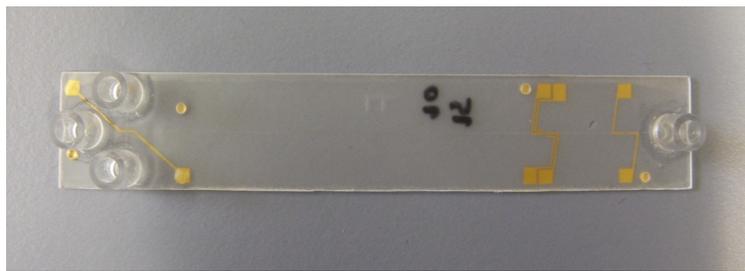


Abbildung 3-7 CE-Chip mit Reservoirstrukturen

3.2 Herstellung der Impedanzsensoren

Zur Untersuchung von elektrischen Eigenschaften von DNA-Lösungen wurde in dieser Arbeit ein koplanarer Impedanzsensor mit variierender Geometrie entworfen. Die Mikroelektroden werden aus Gold auf einem 4-Zoll-Glaswafer durch das Lift-off-Verfahren hergestellt. Für bessere Impedanzkopplung wurde eine Messzelle mit zwei langen Bandedelektroden entworfen. Zusätzlich wurde der Elektrodenabstand minimiert um eine kleinere Anzahl von Molekülen zu erfassen und noch größere Feldstärken und somit hohe Energiedichten einstellen zu können. Dabei wurden kleine Elektrodenabstände von 2 μm bis 100 μm angestrebt. Um eine Wechselwirkung der Lösung mit den Messelektroden auszuschließen wurden die Sensoren zur kontaktlosen Messung im Folgenden mit einer Nitridschicht isoliert. Der Nachteil der kontaktlosen Messung durch die Isolationsschicht kann durch Einstellen eines geringen Schichtdicken minimiert werden. Die Isolationsschicht sollte daher eine möglichst hohe elektrische Durchschlagsfestigkeit aufweisen. Die Siliziumnitridschicht besitzt einen hohen spezifischen elektrischen Widerstand von $10^{12} \Omega/\text{cm}$ und eine Durchschlagsfestigkeit von $10^7 \text{ V}/\text{cm}$ und wird somit in der

Halbleitertechnik und Mikroelektronik häufig als Isolationsmaterial verwendet. In Abbildung 3-8 ist der Entwurf des Impedanzsensors dargestellt. Die gesamte Anordnung der Mikrobandelektroden mit verschiedenen Geometrien auf einem 4-Zoll-Wafer ist in Abbildung 3-9 gezeigt.

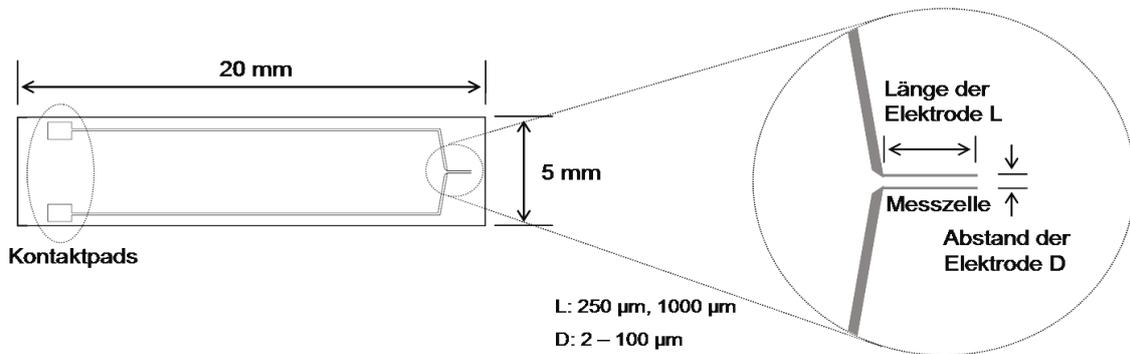


Abbildung 3-8 Entwurf eines Impedanzsensors

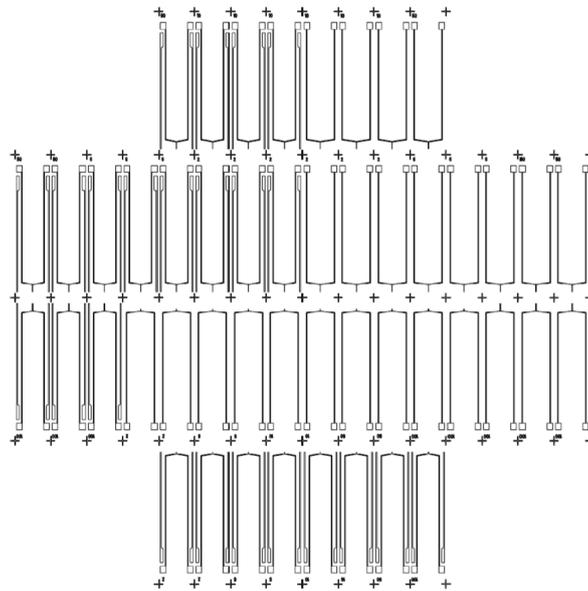


Abbildung 3-9 Anordnung eines Mikrobandelektrodenansatzes auf einem 4-Zoll-Wafer

3.2.1 Herstellung von Mikrobandelektroden

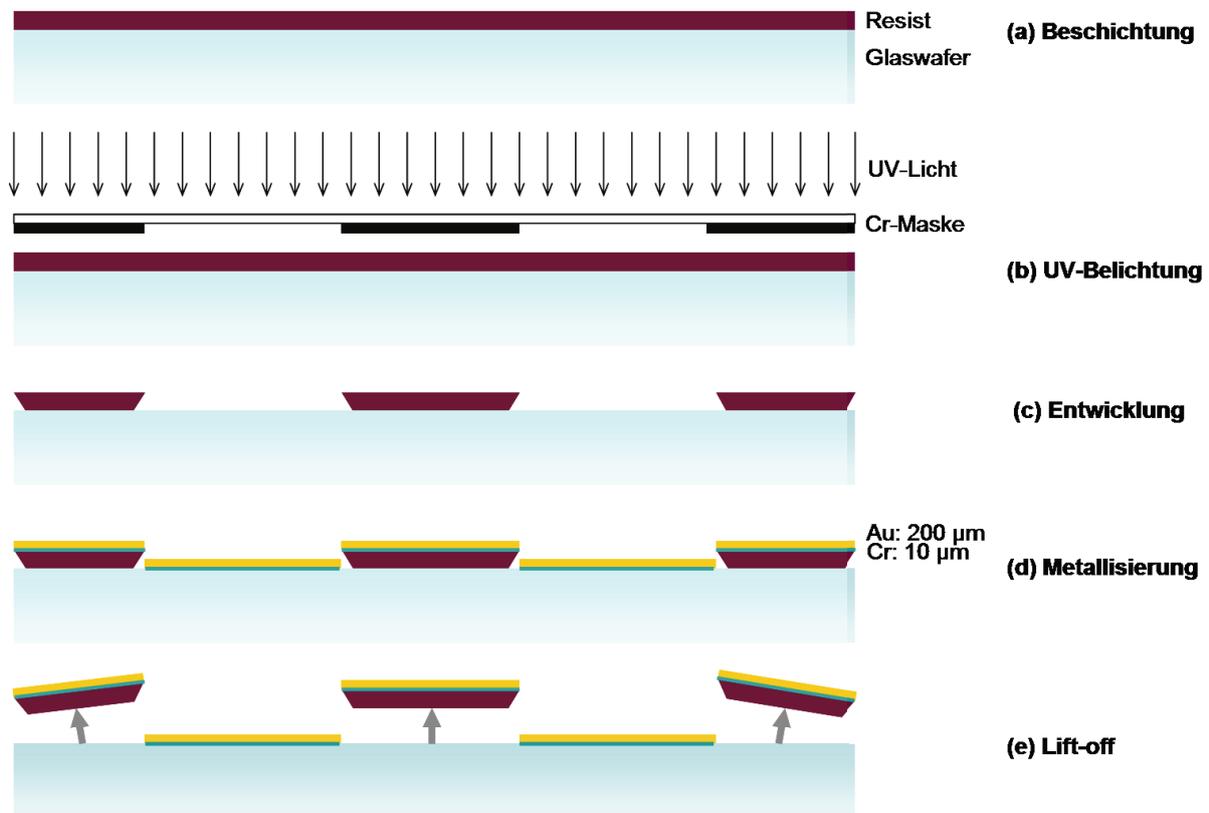


Abbildung 3-10 Schematischer Ablauf des Herstellungsprozesses eines Impedanzsensors

In Abbildung 3-10 sind die Herstellungsschritte des Impedanzsensors zusammengefasst. Die für die Photolithographie eingesetzte Chrommaske wurde durch einen Elektronenstrahlschreiber (VB6, FA. VISTEC, Jena, Deutschland) invers strukturiert. Ein positiver Photoresist (AR-P 5300, Allresist GmbH, Strausberg, Deutschland) wird auf einem Glaswafer (V015.04-0003, Borosilikatglas, Dicke: 500 µm, Durchmesser: 100 mm, Planoptik AG, Elsoff, Deutschland) aufgeschleudert (a). Mit der Chrommaske wird der Photoresist im Bereich der Strukturen belichtet (b) und anschließend chemisch entwickelt (c) und somit die inversen Strukturen durch den Photoresist auf dem Wafer erzeugt (c). Die Elektroden werden aus Gold durch Aufdampfen erzeugt (d). Für eine verbesserte Haftung der Goldschicht auf Glas wird hierfür eine 10 nm dicke Chromschicht unter dem Gold ebenfalls durch Aufdampfen aufgebracht. Nach dem Beschichten wird der restliche Lack mit dem darüber liegenden Metallfilm entfernt (e, abgehoben, *engl. lift-off*). An den Stellen, die mit dem Glas-

wafer direkte Kontaktierung hatte, bleiben die gewünschten Dünnschichtstrukturen.

Die Messzelle besteht aus zwei langen Bandedelektroden ($250\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ und $1\ \text{mm} \times 10\ \mu\text{m}$), der kleinste Abstand zwischen den Bandedelektroden beträgt $2\ \mu\text{m}$ (Elektrodenabstand: $2\ \mu\text{m}$, $5\ \mu\text{m}$, $10\ \mu\text{m}$, $50\ \mu\text{m}$ und $100\ \mu\text{m}$). Zur Herstellungsoptimierung der feinen Elektroden beim Lift-off-Verfahren wurden in Voruntersuchungen $300\ \text{nm}$ dicke Goldschichten durch zwei unterschiedliche Dünnschichtverfahren – Aufdampfen und Sputtern verglichen. Nach dem Lift-off-Vorgang zeigten die aufgedampften Strukturen (Abb. 3-11 (b)) glatte Kanten, wohingegen die gesputterte Strukturen raue Kanten hatten (Abb. 3-11 (a)). Somit ist es deutlich zu erkennen, dass das Aufdampfen zum Lift-off-Prozess ein besser geeignetes Beschichtungsverfahren ist und es wurde weiterhin verwendet. Der Grund hierfür ist, dass die Targetatome beim Aufdampfen noch ausgerichtet zur abscheidenden Oberflächen beschleunigen als beim Sputtern. Außerdem ist die Dünnschicht beim Aufdampfen auf dem Glas besser haftend als beim Sputtern. Bei der Beschichtung ist es nicht zu vermeiden, dass auf den Seitenwänden des strukturierten Photoresists auch beschichtet werden. Beim Sputtern ist dieser Effekt noch größer und diese Schicht bleibt durch schwache Haftung an der Seitenoberfläche des Resists nach dem Entfernen desselben noch an der Kante haften.

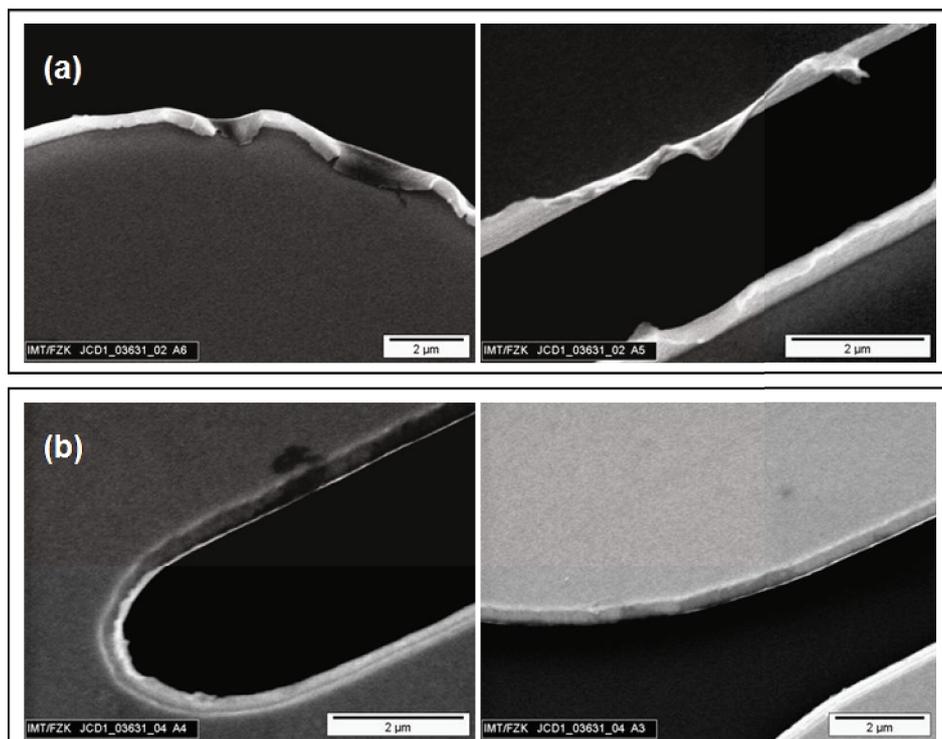


Abbildung 3-11 REM-Aufnahmen: Teststrukturen (Au) nach dem Lift-off-Prozess

(a) gesputterte Elektroden, (b) aufgedampfte Elektroden

Nach der UV-Belichtung bleibt eine inverse Struktur des Photolacks auf dem Wafer und somit lange und sehr schmale Streifen im Messzellenbereich, deren Breite dem Elektrodenabstand der Messzelle entspricht. Auf Grund der begrenzten Haftkraft des Photolacks war die Herstellung der Bandedelektroden mit dem Abstand von $2\ \mu\text{m}$ durch das Verfahren allerdings mühsam, wobei sich die Resiststruktur mit dem Aspektverhältnis der Höhe zu Breite von 0,5 und dem extremen Aspektverhältnis der Länge zu Breite von 500 ergibt.

In Abbildung 3-12 sind zwei Beispielbilder der defekten Elektroden nach dem Lift-off-Vorgang zu sehen. Nach der Entwicklung wurde die dünne Resiststreifen auf dem Wafer abgetrennt (Abb. 3-12 (a)) oder sogar vollständig abgelöst (Abb. 3-12 (b)). Nur ca. 10 % der gesamten Elektroden mit dem Abstand von $2\ \mu\text{m}$ wurden ohne Defekt hergestellt (Abb. 3-12 (c)). Die Elektroden mit dem Abstand ab $5\ \mu\text{m}$ lassen sich hingegen durch das Verfahren zuverlässig herstellen. In Abbildung 3-13 ist eine REM-Aufnahme der Messzelle eines Impedanzsensors mit einem Elektrodenabstand von $10\ \mu\text{m}$ dargestellt.

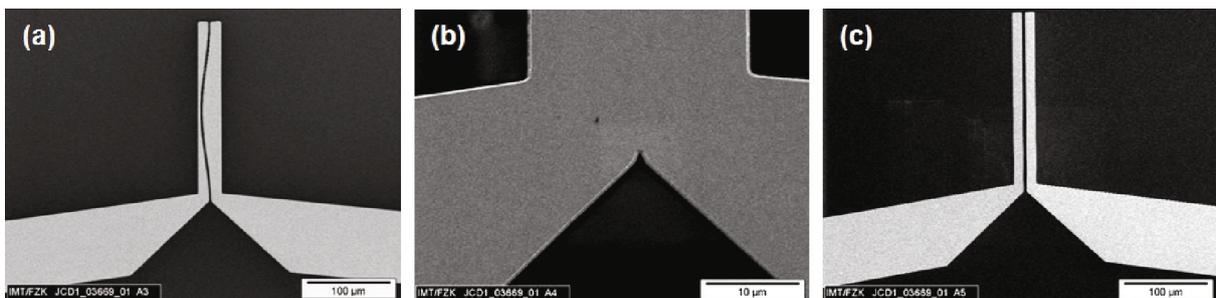


Abbildung 3-12 REM-Aufnahmen: Au-Bandedelektroden mit dem Abstand von $2\ \mu\text{m}$ nach dem Lift-Off-Verfahren

(a) Defekt: Resiststreifen zwischen Elektroden haftete nicht auf dem Wafer

(b) Defekt: Resiststreifen zwischen Elektroden bei der Entwicklung abgetrennt

(c) Bandedelektroden ohne Defekt

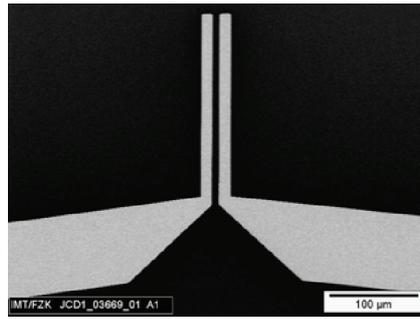


Abbildung 3-13 REM-Aufnahme: Messzelle des Impedanzsensors
Elektrodenlänge: 1000 µm, Elektrodenbreite: 10 µm, Elektrodenabstand: 10 µm

Die Elektroden wurden anschließend zur kontaktlosen Impedanzmessung mit einer Isolationsschicht beschichtet. Als Isolationsschicht wurde eine 300 nm dicke Siliziumnitridschicht auf der gesamten Waferoberfläche mit den Elektrodenstrukturen aufgebracht, die Nitridschicht im Bereich der Kontaktpads wurde danach zur Ohmschen Kontaktierung wieder freigeätzt. Die Nitridschicht wurde durch die plasmaunterstützte chemische Gasphasenabscheidung (*engl. Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition, PECVD*) im Zentrum für Mikro- und Nanotechnologien (Ilmenau, Deutschland) hergestellt.

Die fertigen Elektroden wurden dann vereinzelt. Ein Glaswafer mit 48 Impedanzsensoren mit verschiedenen Geometrien ist in Abbildung 3-14 dargestellt. Um die Mikroelektroden zu schützen wurde der Wafer vor dem Sägen mit einer blauen Haftfolie bedeckt. Vier Justiermarken am Rand wurden zum Ausrichten einer Folienmaske beim Freiätzen der Nitridschicht auf den Kontaktpads verwendet. In Abbildung 3-15 ist ein einzelner Impedanzsensor dargestellt.

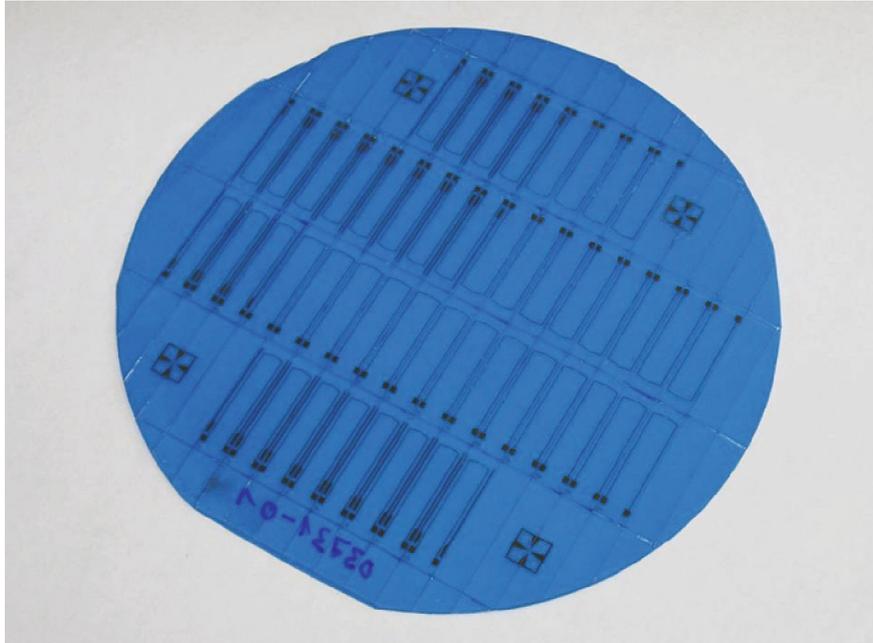


Abbildung 3-14 48 Impedanzsensoren mit verschiedenen Elektrodengeometrien auf einem 4-Zoll-Glaswafer nach dem Vereinzeln, mit blaue Haftfolie bedeckt

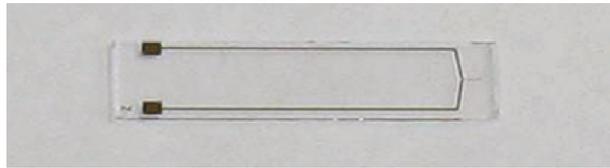


Abbildung 3-15 Vereinzelter Impedanzsensor

4 Versuchsdurchführung und Ergebnisse

Für die Untersuchungen der elektrischen Eigenschaften von DNA-Lösungen bei CE-C4D-Messungen sollen die speziellen Bedingungen bei der CE-Trennung sowie die C4D-Messprinzipien betrachtet werden. Die Erweiterung des Einsatzes der kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektion in der DNA-Analytik wird dabei diskutiert. Die hoch empfindliche Impedanzspektroskopie kann hierfür experimentelle Aussagen liefern.

Für die analytische Performance soll die messtechnische Optimierung des CE-C4D-Messplatzes erarbeitet werden. Messtechnische Verbesserung der Detektorperformance und Analysenpräzision werden überlegt. Methoden zur Überwindung der generellen Schwierigkeiten der Fluidüberwachung in mikrofluidischen Systemen sind zu diskutieren.

4.1 Untersuchung der elektrischen Eigenschaften von DNA-Lösung

Impedanzspektroskopische Untersuchungen wurden in dieser Arbeit mit einer Anlage Alpha High Resolution Dielectric Analyzer der Firma Novoccontrol Technologies GmbH & Co. KG (Hundsangen, Deutschland) durchgeführt. DNA-Proben und ein speziell dazu benötigter Puffer sind kommerziell auf dem Markt erhältlich.

4.1.1 Elektrische Leitfähigkeit von DNA-Lösungen

Die ersten Impedanzmessungen von DNA-Lösungen wurden noch mit der C4D-Messelektrode (Abb. 4-1) aus Gold in direktem Kontakt durchgeführt. Die Elektroden wurden auf einen Polyetheretherketon (PEEK)-Folie durch Sputtern hergestellt (siehe Kap. 3.1.3).

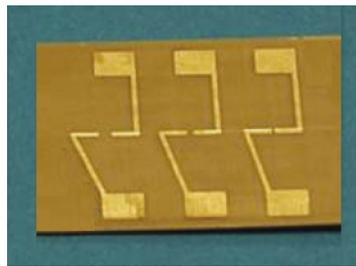


Abbildung 4-1 Impedanzmeselektroden aus Gold in Form von C4D-Elektroden auf PEEK-Substrat, Dicke: 300 nm, Messzelle; Elektrodenabstand: 250 μm , Elektrodenbreite: 200 μm

DNA-Proben (Salmon Sperm DNA Solution, FA. Life TechnologiesTM, Carlsbad, CA, USA) wurden sowohl im Wasser als auch im TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6, Bioneer Corporation, Daejeon, Südkorea) mit der Konzentration von 1 bzw. 10 ng/ μl angesetzt. Die Messungen wurden bei einer Messamplitude von 1 V durchgeführt. Da die hoch leitende Pufferlösung bei einem niedrigeren Frequenzbereich z. B. zu einer möglichen Mikrogasblasenbildung auf den Elektrodenoberflächen neigt, wird der Messfrequenzbereich bei den in Puffer angesetzten DNA-Lösungen von 100 kHz bis 1 MHz ausgewählt. Bei den in Wasser angesetzten DNA-Lösungen wird die Messung über die Frequenz

von 10 kHz bis 1 MHz durchgeführt. In Abbildung 4-2 sind die Impedanzspektren von DNA in Pufferlösung bzw. in Wasser dargestellt.

Die in der Pufferlösung angesetzte DNA-Proben zeigten bei solchen geringen Konzentrationen im Bezug auf dem hoch leitenden Puffer einen großen Leitfähigkeitsanstieg (Abb. 4-2 (links)). Die DNA-Lösung in Wasser zeigt im niedrigeren Frequenzbereich von 10 Hz einen Leitfähigkeitsunterschied von ca. 5 % bei der DNA-Lösung mit 1 ng/μl DNA und bei der Lösung mit 10 ng/μl DNA sogar über 30 %.

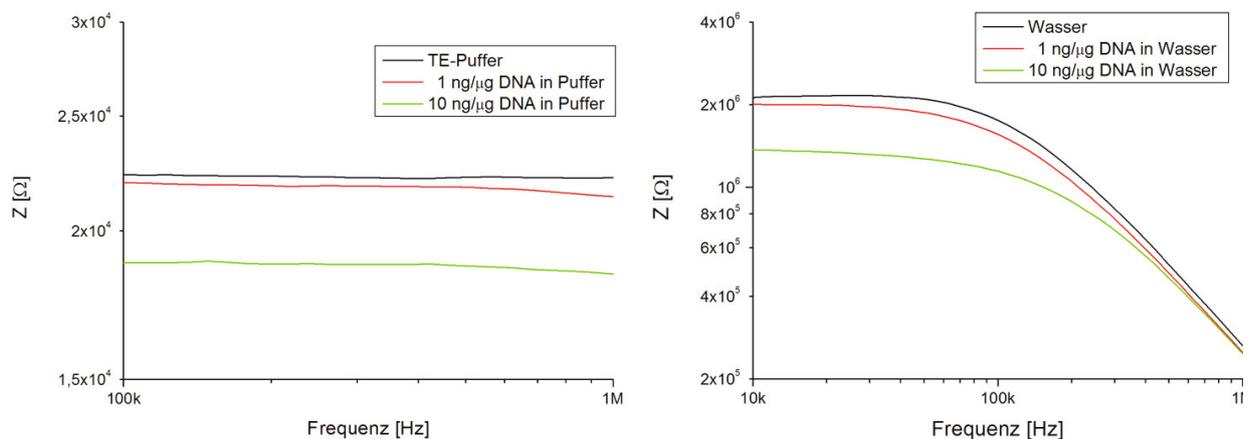


Abbildung 4-2 Impedanzspektren von DNA-Lösungen in Pufferlösung (links) und in Wasser (rechts), Messamplitude 1 V

Da die Lösung bei einer DNA-Konzentration von 10 ng/μl rund 1000-mal weniger Ladung pro Volumen als der Puffer aufweist, ist eine so hohe Leitfähigkeitszunahme bei DNA nicht zu erwarten und mit einem rein ionischen Ladungstransport nicht zu begründen. Induzierte Dipolmomente oder Gegenionen, die an den DNA-Molekülen fest bzw. diffus anlagern, könnten eine mögliche Ursache für die hohen Leitfähigkeitswerte von DNA in wässriger Lösung sein.

4.1.2 Einflüsse der Ausrichtung der Moleküle

DNA ist ein langes Kettenmolekül, das in spannungslosem Zustand ein „Random Coil“-Struktur bildet. Allerdings werden die beliebig knäuelnden Moleküle im elektrischen Feld parallel zum Feld ausgerichtet. In dieser

Arbeit wurde der Einfluss von DNA-Molekülausrichtung auf die Leitfähigkeit untersucht.

Hierfür wurde ein Gleichspannungsfeld in paralleler Richtung bzw. in senkrechter Richtung zum Messfeld angelegt. In Abbildung 4-3 sind beide Anordnungen. Zum Anlegen des Gleichfeldes wurden Platinelektroden auf dem Glassubstrat aufgebracht.

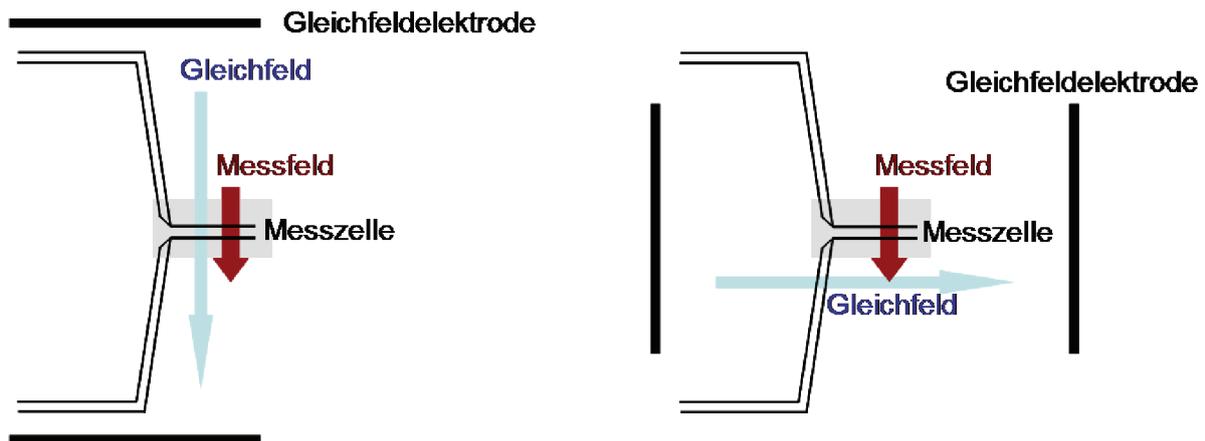


Abbildung 4-3 Messaufbau zum Anlegen des Gleichspannungsfeld in paralleler Richtung (links) bzw. in senkrechter Richtung (rechts) zum Messfeld

Mit dieser Elektrodenanordnung wurden die Impedanz von DNA-Lösungen (Salmon Sperm DNA Solution, Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) mit und ohne Gleichfeld in paralleler Richtung zum Messfeld über der Messzelle gemessen. Die Messfrequenz wurde auf 1 MHz festgelegt, da bei einem Gleichfeld über ein Spektrum für längere Zeit andere Effekte auftreten können. Zunächst wurde die Messung dreimal nacheinander ohne Gleichspannungsfeld durchgeführt. Anschließend wurde die Messung auch dreimal mit einem Gleichfeld von 2 V/mm durchgeführt.

Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 4-4 (a) die Impedanzdifferenz von DNA-Lösung im Bezug zu Wasser dargestellt. Nach Anlegen des Gleichfeldes erkennt man einen deutlichen Leitfähigkeitsanstieg der DNA-Lösung. Die Zunahme der Leitfähigkeit von DNA-Lösung im Gleichfeld deutet auf einen verstärkenden Einfluss der Ausrichtung von DNA auf ihre Leitfähigkeit hin. Dieses Phänomen kann im Vergleich mit der selben Messung mit Gleichfeld in senkrechter Richtung zum Messfeld

(Abbildung 4-4 (b)) noch deutlicher erkannt werden. Die Impedanzdifferenz von DNA-Lösung im Bezug auf Wasser ist bei einem Gleichfeld in dieser Richtung wesentlich kleiner, es ist keine signifikante Änderung mehr erkennbar. Der kleine Anstieg kann durch die Erwärmung der Lösung erklärt werden.

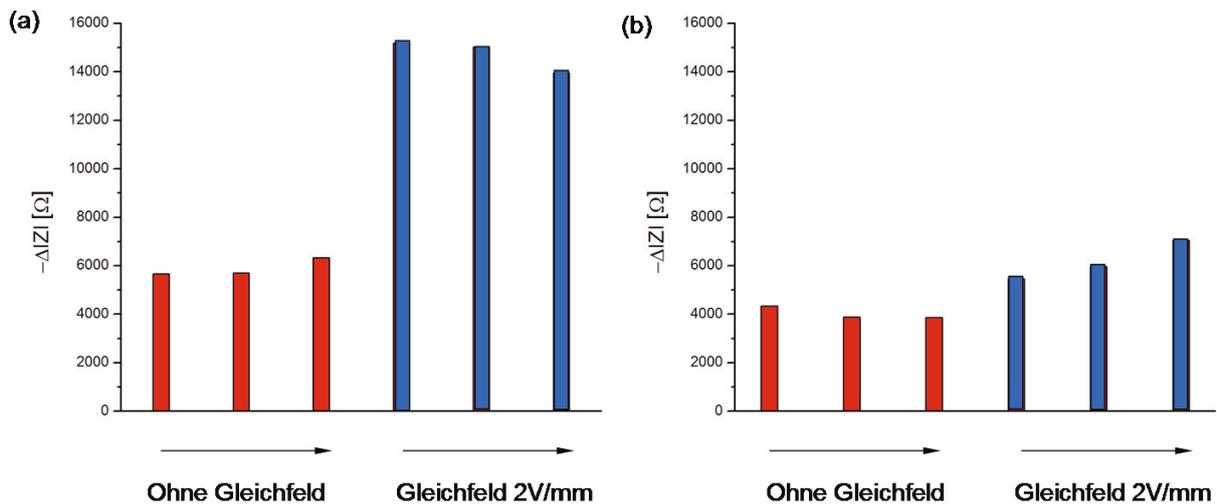


Abbildung 4-4 Impedanzdifferenz von DNA-Lösung im Bezug zu Wasser mit und ohne Gleichfeld;

- (a) Gleichfeld in *paralleler* Richtung zum Messfeld
- (b) Gleichfeld in *senkrechter* Richtung zum Messfeld

DNA-Lösung: 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in Wasser

Gleichfeld: 2 V/mm, Messamplitude: 1 V

Elektrodenabstand: 10 μm

Bei der CE-Trennung wird ein elektrisches Feld von 10 bis 50 V/mm angelegt, diese Feldstärken sind rund eine Größenordnung höher als die im Versuch angelegten. Das durch die C4D Messung anliegende Feld liegt im Bereich bis max. 1 kV/mm, d. h. ebenfalls wenigstens eine Größenordnung höher als im Versuch. Diese ersten Ergebnisse zeigen, dass es durch die zur Trennung und zur Messung anliegenden Felder im Kanal zu einer höheren Messempfindlichkeit bei den CE-C4D-Systemen kommen sollte.

Die Beobachtung von Leitfähigkeitsunterschieden zwischen ausgerichteter, und nicht ausgerichteter DNA legt den Schluss nahe, dass es neben dem ionischen Ladungstransport zu einem zusätzlichen Effekt kommt.

Das Design von C4D-Messzellen auf dem CE-Chip in dieser Arbeit, wobei das Messfeld in der Richtung zum CE-Hochspannungsfeld angeordnet ist, ist dabei vorteilhaft für eine hoch empfindliche DNA-Detektion.

4.2 Fragmentierung der DNA-Molekülen bei der CE-C4D

Eine weitere Erklärung zu hoher Leitfähigkeit von DNA unter der CE-C4D-Messbedingungen, die zu einer hohen elektrischen Leitfähigkeit von DNA-Lösungen führen könnten, basiert auf der Fragmentierung der DNA-Moleküle, d. h. das Auftreten von Kettenbrüchen auf Grund der hohen Energiedichte in der Messzelle. Durch Joulesche Wärme einerseits auf Grund des hohen elektrischen Feldes, das für elektrophoretische Trennung angelegt wird, und andererseits auf Grund des Einflusses des Wechselfeldes in der C4D-Messzelle, entsteht eine Temperaturerhöhung. Speziell bei der DNA-Trennung in gelbasierenden Trennmedien, die höhere Leitfähigkeiten besitzen als wässrige Puffer und deshalb bei der vorgegebenen Spannung einen höheren Stromfluss aufweisen, wird diese Erwärmung noch größer.

Wie bereits in Kapitel 2.4.2 beschrieben, beginnt die doppelsträngige DNA bei einer Temperaturerhöhung auf ca. 80°C zu denaturieren, welche bei der Abkühlung reversibel ist. Eine hohe Energiedichte kann außerdem Kettenbrüche in DNA-Molekülen verursachen, die irreversibel sind. Durch Denaturierung sowie Fragmentierung wird die Gesamtladungszahl zunehmen, wodurch die elektrolytische Leitfähigkeit von DNA-Lösungen steigen wird.

In diesem Versuch wird untersucht, ob die hohe Energiedichte, die durch CE-C4D Messung erzeugt wird, zu Kettenbrüchen von DNA-Molekülen führt. Zum Bestätigen der möglichen Fragmentierung von DNA-Molekülen bei der CE-C4D-Messung wird eine DNA-Probe mit einer bestimmten Fragmentenkomposition nach einem CE-C4D-Vorgang untersucht. Die Probe wird nach dem Messvorgang mit der ursprünglichen Probe verglichen. In der CE-Messung werden sich die DNA-Ionen nun durch den Trennkanal in dem Waste-Reservoir bewegt, der mit einem Puffer befüllt ist. Die Probe in dem Waste-Reservoir wird in dem Puffer diffundiert und somit sofort eine andere Konzentration aufweisen als die ursprüngliche

Probe, die in dem Analyt-Reservoir einpipetiert wurde, welche den Vergleich der Fragmentenkomposition beider Proben nicht möglich macht.

Deshalb wurde ein Modelmessaufbau entworfen, der nach dem Versuch die Konzentration der Probe nicht verändert. Um vergleichbare C4D-Messzellbedingungen zu realisieren wurde ein Mikrokanal, der die gleichen Dimensionen wie ein Kanal auf dem CE-Chip hat, in Kombination mit C4D-Elektroden verwendet. Die Proben werden bei der Simulation nicht elektrophoretisch bewegt, sondern mit einer Spritzpumpe durch die Messzelle gedrückt. Die Geschwindigkeit der Flüssigkeit durch die Messzelle wird äquivalent zu den Standardbedingungen der CE-Trennung gewählt.

Als Probe wurde eine DNA-Leiter (GeneRuler™ DNA Ladder Mix #SM0331, Gesamtkonzentration: 0,5 µg/µl, Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 1 mM EDTA) der Firma Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Der temperaturregulierter Messplatz wurde zunächst bei eine Temperatur bis max. 85°C erwärmt. Die Lösung wurde mit einer Geschwindigkeit von 20 nl/min (entsprechend 8 mm/min) durch die C4D-Messzelle bewegt. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 4-5 dargestellt.

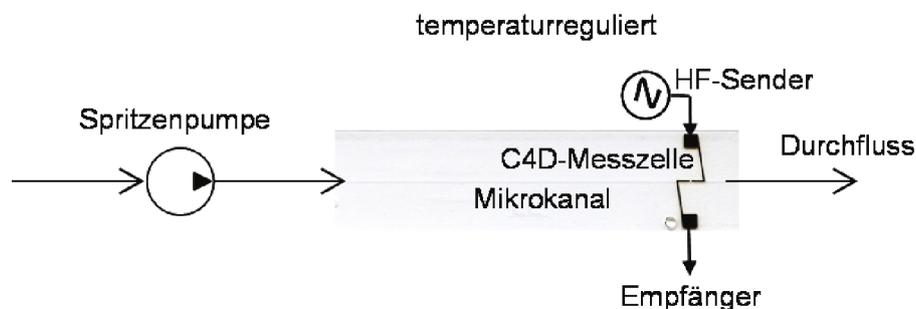


Abbildung 4-5 Versuchsaufbau für den Nachweis einer Fragmentierung der DNA durch die C4D mit Simulation der Erwärmung durch das Gel

Anschließend wurde die durch die Messzelle bewegte DNA-Probe mittels Agarose-Gelelektrophorese im Vergleich mit einer unbehandelten Probe untersucht, bei der keine C4D zur Detektion eingesetzt wurde.

Das Ergebnis ist in Abbildung 4-6 dargestellt. Die DNA-Fragmente wurden nach dem elektrophoretischen Prinzip nach der Größe aufgetrennt. Die Proben wurden in Taschen, die sich im Gelpad befinden (in Abbil-

dung 4-6 oben zu erkennen) einpipettiert. Am weitesten gewandert sind die kürzesten Fragmente, die längeren Fragmente wandern langsamer. Die Intensität der Banden deutet auf die Anzahl der Fragmente hin. Die DNA-Probe nach der CE-C4D-Simulation zeigte eine deutlich veränderte Fragmentekomposition. Die langen Fragmente sind deutlich reduziert, wohingegen kurze Fragmente hinzugekommen sind. Die Menge der kurzen hat sich überraschender Weise erhöht. Darüber hinaus konnte sogar ein neu entstandenes kleines Fragment nachgewiesen werden.

Diese Fragmentierung führt in Kombination mit einer Denaturierung zu einer deutlich größeren Anzahl von Ladungen, da auch die neu entstandenen Fragmente an beiden Enden negative Ladungen besitzen. Verbunden mit der höheren Mobilität der kleineren DNA-Fragmente ist somit eine höhere elektrolytische Leitfähigkeit zu erwarten.

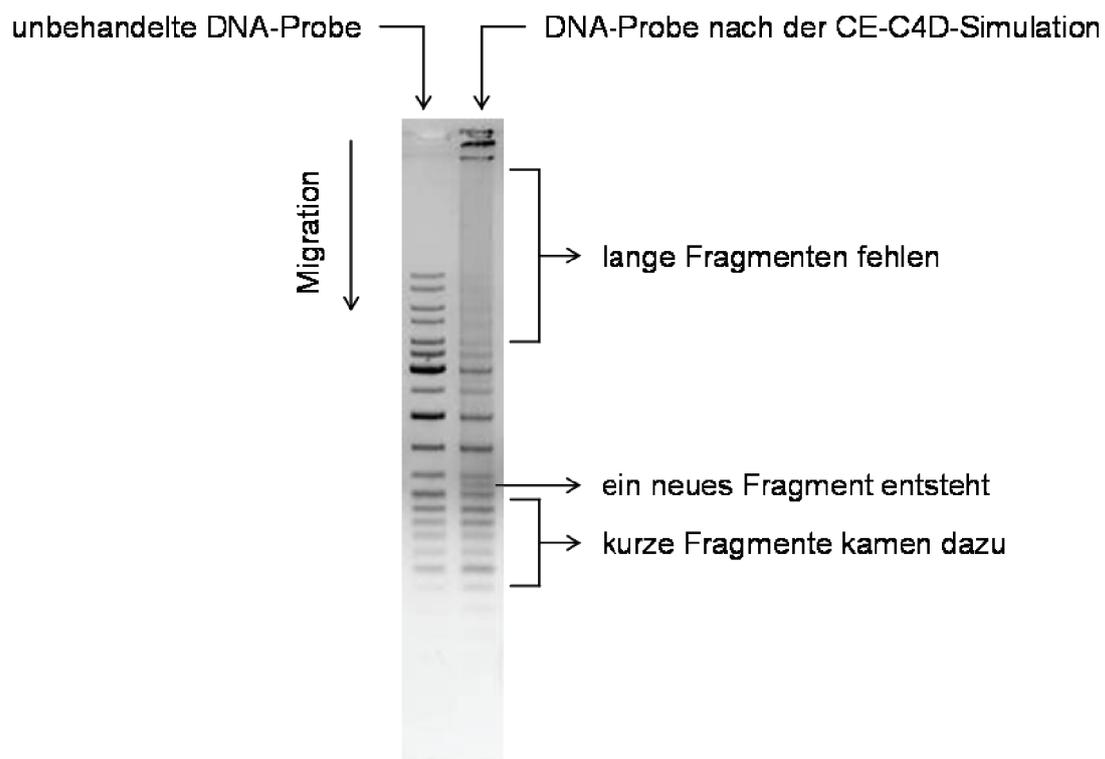


Abbildung 4-6 Auftrennung der DNA-Proben im Argarose-Gelpad

Zusammen mit der Leitfähigkeitserhöhung durch DNA-Ausrichtung führen die Fragmentierung und die Denaturierung von DNA zu einer hohen Messempfindlichekeit bei der CE-C4D. Somit kann die in der ersten

Messung beobachtete hohe Leitfähigkeit von DNA mit den CE-C4D-Messbedingungen erklärt werden.

4.3 Messtechnische Verbesserung der CE-C4D

4.3.1 Messaufbau und -ablauf der Mikrochip-CE mit C4D

In Abbildung 4-7 ist der verwendete Messplatz dargestellt. Der Messplatz besteht aus programmierbaren Hochspannungsquellen (Eigenbau IMT / Institut für Prozessdatenverarbeitung und Elektronik (IPE) des KIT) zum Anlegen von elektrischen Feldern für die elektrophoretische Migration zur Probeninjektion und Separation sowie einem kontaktloser Leitfähigkeitsdetektor. Eine Software zur Steuerung der Hochspannungseinheiten ermöglicht die Einstellung von unterschiedlichen Injektions- und Separationssequenzen, sowie die Darstellung aller im System fließenden Ströme. Das Messsignal von der C4D wird mit einem AD Wandler eingelesen und mit der Auswertungssoftware ChemStation (FA. Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) dargestellt und analysiert.

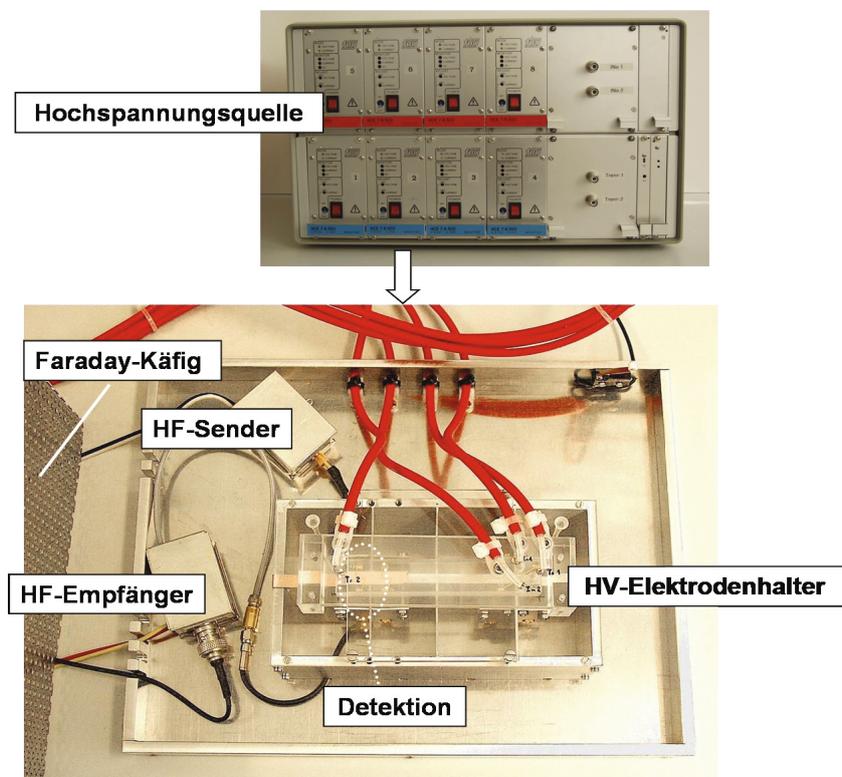


Abbildung 4-7 CE-C4D-Messplatz

Die Hochspannung wird durch Platinstifte am Ende der beiden Mikrokanäle in die elektrolytischen Lösungen zugeführt, somit kann ein elektrisches Feld für die elektrokinetische Probeninjektion bzw. Separation angelegt werden. Die C4D arbeitet nach dem Sender- und Empfängerprinzip. Die Sender- und Empfängermodule sind in abgeschirmten Metallboxen untergebracht und werden durch abgeschirmte HF-Leitungen über Kontaktfederstifte mit den Detektionselektroden auf dem Chip angekoppelt. Bei der Messung wird der Messplatz mit einem Metallkäfig (Faradayscher Käfig) abgedeckt um den Kontakt des Bedieners mit der Hochspannung zu verhindern und gleichzeitig elektromagnetischen Störungen abzuschirmen.

Alle Lösungen werden mit destilliertem Wasser angesetzt und durch einen sterilisierten Filter mit 0,2 µm Poren gefiltert. Zur allgemeinen Chipcharakterisierung und zum Testen der Trennleistungen wird die Trennung von drei Alkali-Kationen Li^+ , Na^+ und K^+ durchgeführt. Als Pufferlösung wird MES/His, ein Standardpuffer aus MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure) und Histidin mit einer Konzentration von 10 mM verwendet. Als Analyten werden Lithiumchlorid, Natriumchlorid und Kaliumchlorid mit einer Konzentration von 100 mM angesetzt und weiter in Pufferlösung auf 1 mM verdünnt (alle verwendeten Chemikalien sind im Anhang aufgelistet).

Alle Fluidreservoirs an den Enden der Mikrokanäle werden zunächst sorgfältig mit Pufferlösung befüllt, wobei insbesondere darauf geachtet wird, dass keine Luftblasen im Kanal entstehen, die isolierend wirken, den Ionenfluss behindern und zu lokal hohen Feldstärken führen würden, die unter anderem den C4D-Detektor durch Überschläge beschädigen könnten. Nach dem Befüllen wird die Pufferlösung im Analytreservoir an einem Ende des kurzen Kanals durch Analyt ersetzt. Der Chip wird in den Messplatz eingebaut, damit die Detektionselektroden mit den HF-Kontaktstiften zum Sender bzw. Empfänger fest kontaktiert werden. Danach werden die Platinstifte zum Anlegen der Hochspannung in die Fluidreservoirs eingetaucht. Nach der Abschirmung des Messplatzes aus Sicherheitsgründen kann der gesamte Messvorgang automatisiert durchgeführt werden. Die Versuchsparameter lassen sich über die Steuerungssoftware einstellen (Abbildung 4-8). Beim Starten wird zunächst eine Hochspannung an dem kurzen Injektionskanal angelegt wodurch

der Analyt sich zum anderen Ende des Kanals bewegt. Nach der Analyt-injektion erfolgt automatisch eine Umschaltung der Spannung auf den langen Trennkanal. Der Analyt, der sich am Kanalkreuz befindet bewegt sich durch den langen Kanal, wobei es zur elektrophoretischen Stofftrennung kommt. Beim Trennvorgang wird das C4D-Messsignal über die Auswertesoftware erfasst und in einem Elektropherogramm dargestellt.

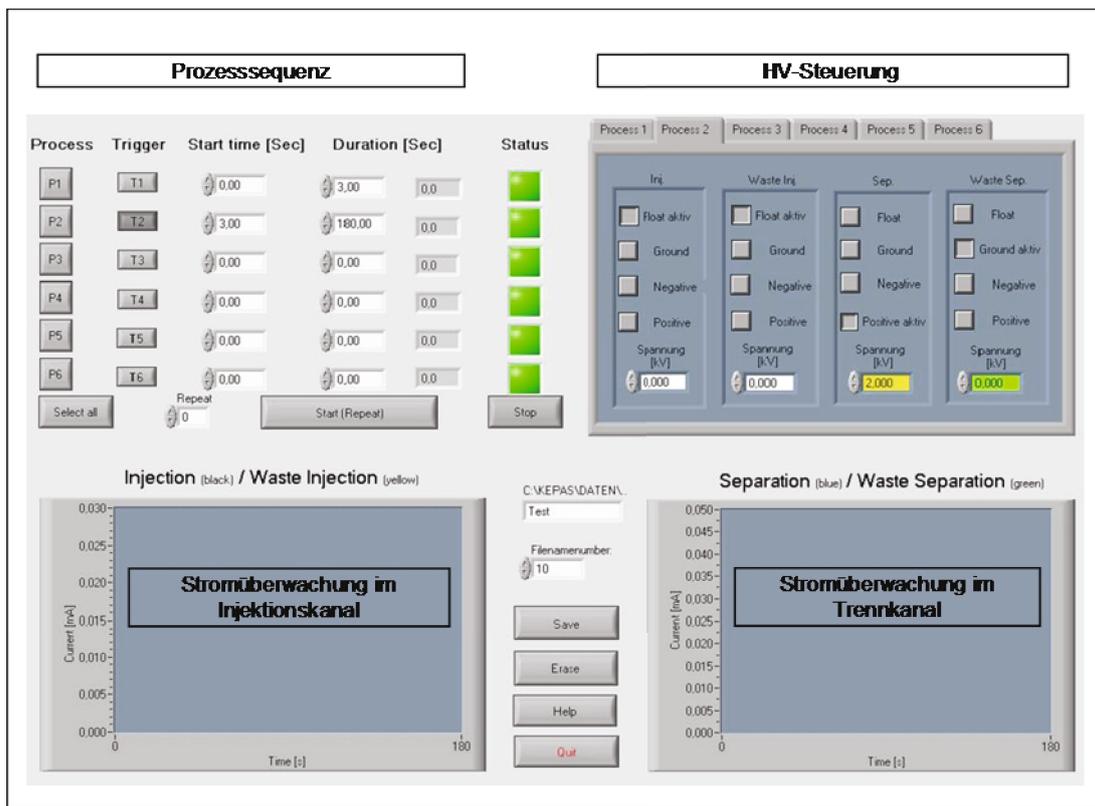


Abbildung 4-8 Steuerungssoftwareoberfläche

4.3.2 Optimierung der C4D

Um eine niedrigere Nachweisgrenze zu erreichen, ist das Design der Detektionselektrode bei der kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektion ein wichtiger Faktor. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses bei einer Leitfähigkeitsmessung mittels Hochfrequenztechnik wurden die C4D-Elektroden modifiziert, die das direkte Übersprechen zwischen den Elektroden (Streukapazität C_{st} in Abbildung 4-9) minimieren und das Signalrauschen reduzieren sollten. Dabei wurden Abschirmungselektroden mit der gleichen Geometrie wie die C4D-Elektroden mit einem Abstand

gleich der der Breite der Elektroden eingeführt und mit Masse verbunden. Die neue C4D-Elektroden und ihr Ersatzschaltbild sind in Abbildung 4-9 dargestellt.

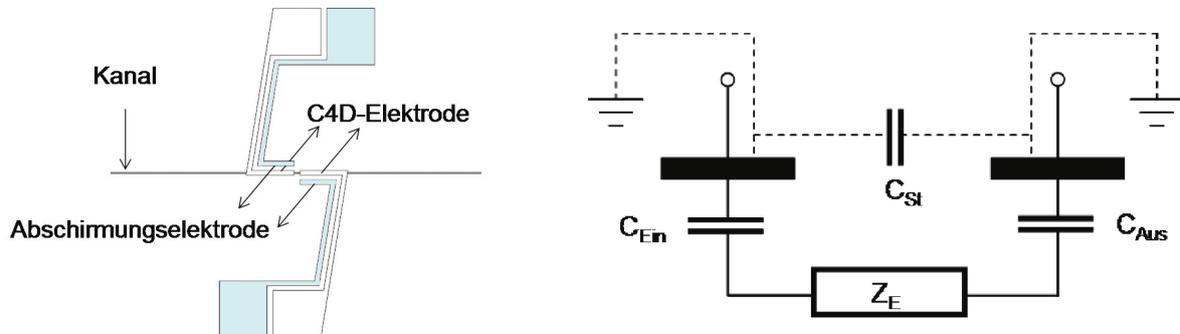


Abbildung 4-9 Modifizierte Detektionselektroden durch Einführung von Abschirmungselektroden (blau) und Ersatzschaltbild (rechts)

Mit den neu entworfenen C4D-Elektroden wurde zunächst eine Trennung von Li^+ , Na^+ und K^+ durchgeführt (Analyt je 1 mM, Puffer: 10 mM MES/His) und mit einem gleichen Messvorgang ohne die Abschirmung durch die zusätzliche Elektroden, d. h. ohne Kontaktierung von Abschirmungselektroden zur Masse verglichen. Die Basislinien wurden in beiden Messungen auf die gleiche Höhe angepasst. In Abbildung 4-10 sind Elektropherogramme mit und ohne Abschirmung dargestellt. Das Ergebnis zeigt eine deutliche Reduzierung des Rauschens um ca. 75 %. Dabei zeigt die Signalpeaks auch eine Erhöhung von ca. 25 %, weil die Detektorleistung dabei erhöht wurde um die Höhe des Grundsignals anzupassen. Insgesamt wurde das Signal-Rausch-Verhältnis somit um das Fünffache erhöht.

In vielen mikrofluidischen Lab-on-Chip-Systemen ist auf Grund des geringen Volums der Messzelle eine hohe Messempfindlichkeit wichtig. Durch die Modifizierung der Messelektroden, deren Abschirmung ohne zusätzliche Herstellungsschritte realisiert werden kann, konnte das Signal-Rausch-Verhältnis effektiv erhöht werden.

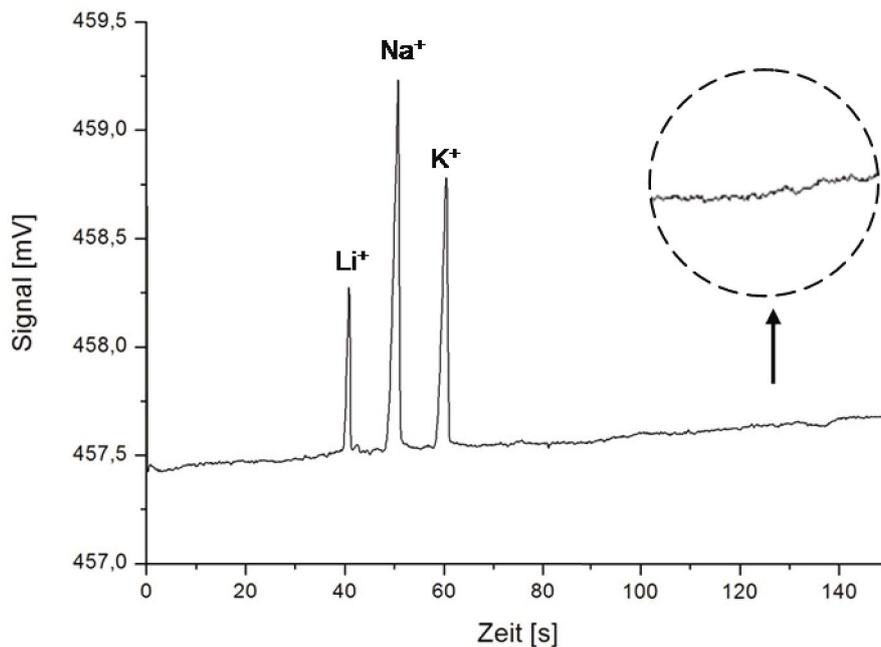
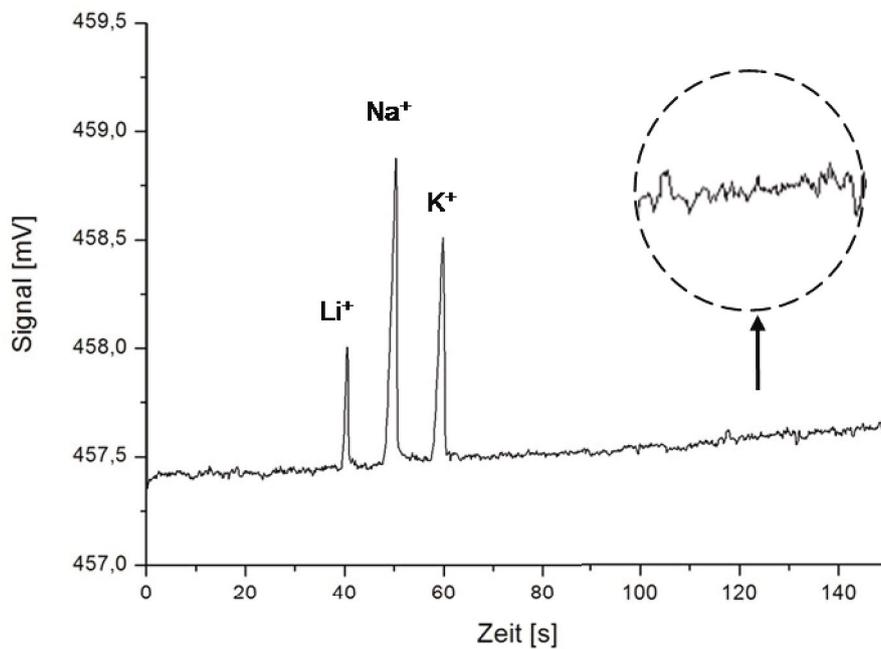


Abbildung 4-10 Elektropherogramm: Trennung von Li^+ , Na^+ , K^+ und Ca^{2+}
Signal und Rauschen ohne (links) und mit (rechts) Abschirmung der C4D-Elektroden
Puffer: 10 mM MES/His, Analyt: je 1 mM,
 $E_{\text{inj}} = 50 \text{ V/mm}$, $t_{\text{inj}} = 3 \text{ s}$, $E_{\text{sep}} = 23 \text{ V/mm}$

4.3.3 Überwachung der Analytinjektion mittels C4D

Bei der Auswertung von Elektropherogrammen ist die quantitative Bestimmung der Analytmenge durch Berechnung der Peakfläche möglich. Dabei ist es wichtig, die Probenmenge, die tatsächlich bei der Analyse injiziert wird, zu ermitteln. Bei der Mikrochip-CE, die zur automatisierten Probeninjektion aus zwei sich kreuzenden Kanälen besteht, lässt sich das Probenvolumen bei Injektion theoretisch reproduzierbar dosieren. In der Praxis wird das Injektionsverhalten jedoch von verschiedenen Bedingungen, z. B. Injektionszeit, Injektionsspannung sowie Füllstand von Fluidreservoirs beeinflusst. Außerdem wurde bei einer speziellen Methode, dem so genannten „Sample Stacking“, bei der die Analyten zur Erhöhung der Trennleistung anstatt in Pufferlösung in Wasser verdünnt wird, ein instabiles Injektionsverhalten beobachtet [65, 86]. In den beiden Arbeiten wurde beobachtet, dass bei jeder Injektion in einer Messsequenz unterschiedliche Analytmengen in den Trennkanal injiziert wurden. Aus diesem Grund können Messergebnisse auch bei gleichen Analyten zu unterschiedlich großen Peaks führen, so dass bei den quantitativen Analysen deutliche Messfehler verursacht werden. Das Injektionsverhalten wurde in vorhergehenden Untersuchungen mittels Fluoreszenzmikroskopie veranschaulicht und der Einsatz der C4D wurde neben der Detektion zur Überwachung des Injektionsverhaltens vorgeschlagen. [65, 86]. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass durch C4D-Signal am Injektionskreuzungsbereich die tatsächlich in den Trennkanal injizierte Probenmenge quantitativ ermittelt werden kann.

In dieser Arbeit wurde dieser Ansatz zum Einsatz in den praktischen Anwendungen weiter vertieft. Durch die simultane Messung im Injektionskreuzungsbereich und an der Detektionsstelle kann eine Korrelation zwischen dem Injektionsverhalten und der Detektionssignale gewonnen werden. Darüber hinaus kann der Fehler bei der quantitativen Analyse, der durch variierende Probeninjektionsverhalten verursacht wird, dynamisch korrigiert werden.

Die Geometrie der Detektionselektroden wurde nach dem erfolgreichen Einsatz in den vorangegangenen Arbeiten [65, 86] übernommen. Das Elektrodendesign ist in Abbildung 4-11 dargestellt (vgl. mit Abb. 3.1). Die Elektroden sind 200 μm breit und 1 mm lang. Der Abstand beider Elek-

troden beträgt $150\ \mu\text{m}$. An den beiden Enden der Elektroden werden Kontaktpads ($2\ \text{mm} \times 2\ \text{mm}$) zum Verbinden mit den C4D-Sensoren aufgebracht.

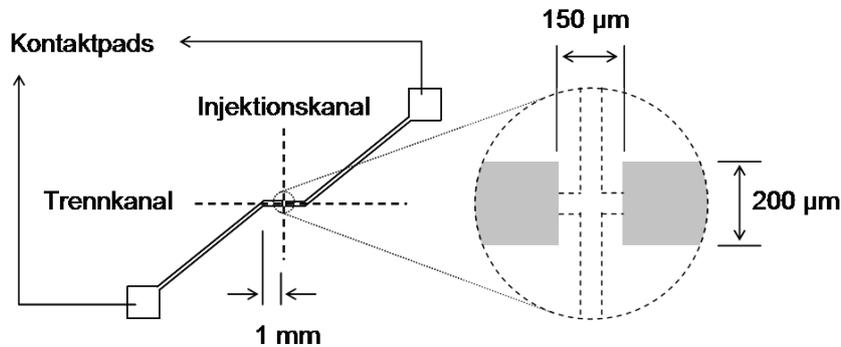


Abbildung 4-11 C4D-Elektroden im Injektionsbereich

In Abbildung 4-12 ist ein CE-Chip mit C4D-Elektroden an der Detektionsstelle sowie im Injektionsbereich dargestellt. Die Elektroden am Injektionskreuz wurden wie die Detektionselektroden durch Sputtern unter dem Einsatz von einer Schattenmaske aufgebracht.

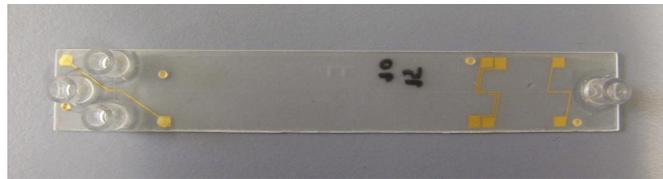


Abbildung 4-12 CE-Chip mit C4D-Elektroden im Injektionsbereich und an der Detektionsstelle

Die Leitfähigkeitssignale am Injektionskreuz und an der Detektionsstelle auf einem Chip können durch den Einsatz von zwei C4D-Detektoren gleichzeitig erfasst werden. Die beiden C4D-Detektoren zur simultanen Messung werden mit zwei unterschiedlichen Frequenzen betrieben, um eine gegenseitige Beeinflussung zu vermeiden.

Zunächst wurden beide Kanäle mit einem $10\ \text{mM}$ MES/His-Puffer befüllt und die Messsignale wurden zum Test erfasst. Dabei wurde das elektrische Feld in beiden Kanälen angelegt. Bei den Messungen wurde allerdings beobachtet, dass das Ein- und Ausschalten der Hochspannung im Injektionsbereich zu einer unmittelbaren Signaländerung, d. h. zu einer

Veränderung der Höhe des Leitfähigkeitssignals, führt. Diese wird auch beim Anlegen der Masse an die mit Elektrolyt befüllten Reservoirs beeinflusst. Drei von vier Fluidreservoirs, die mit Elektrolyt befüllt sind, liegen vom Kanalkreuz nur 5 mm entfernt. Der Innendurchmesser der Fluidreservoirs beträgt 5 mm, die Füllhöhe variiert mit den eingesetzten Lösungsvolumina und liegt meist bei 3 bis 5 mm. Der Einfluss dieser relativ großen Elektrolytsäule ist nicht zu vernachlässigen. In Abbildung 4-13 sind die Veränderungen des Leitfähigkeitssignals der Messung im Injektionsbereich durch Anlegen von Masse an verschiedene Kanalenden zusammengefasst.

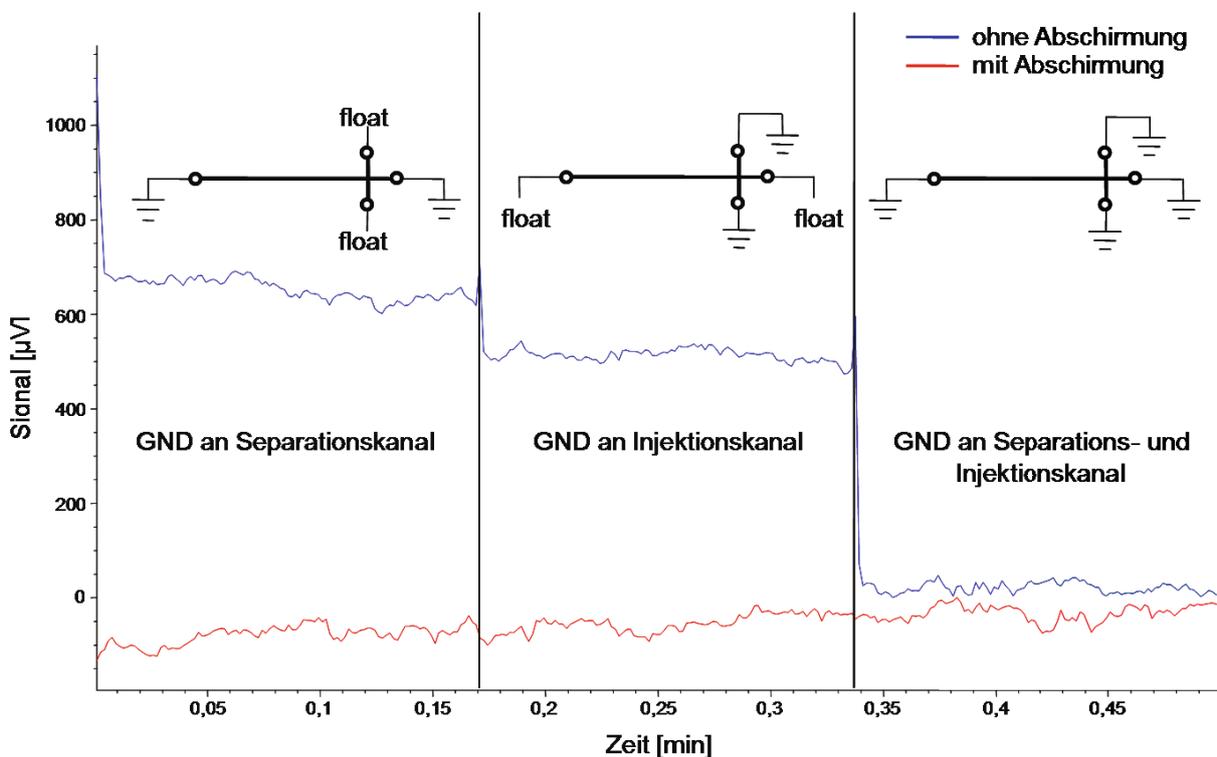


Abbildung 4-13 Verläufe der Messsignale von 10 mM MES/His im Injektionsbereich;
 Einfluss der unterschiedliche angelegten Masse
 mit dem derzeitigen Messplatz (blau) und nach der Modifizierung (rot)
 GND: Masse

Die blaue Linie zeigt das Messsignal der C4D-Messung am Injektionskreuz mit der an unterschiedlichen Stellen angelegten Masse. Zunächst wurde an beiden Enden des Separationskanals Masse angelegt und der Injektionskanal wurde vom Potential getrennt. Anschließend wurde umgekehrt an beiden Enden des Injektionskanals Masse angelegt und der Separationskanal wurde vom Potential getrennt. Zum Schluss wurde an

beiden Enden beider Kanäle Masse angelegt. Dabei wurde beobachtet, dass der Einfluss auf das Messsignal während des Messablaufs zur quantitativen Messabweichung führt. Die Abweichung ist von dem Abstand zwischen Messzelle und Fluidreservoirs abhängig, d. h. die näheren Fluidreservoirs haben noch größere Einflüsse auf die Messsignalabweichungen, so dass die Messung am Injektionsbereich noch stärker betroffen wird als an der Detektionsstelle. Diese äußeren Einflüsse auf das Messsignal sollten zur quantitativen Auswertung des Signals unterdrückt werden. Dazu wurde eine Abschirmung der Fluidreservoirs mit Kupferfolien gegen die C4D-Elektroden eingeführt, um den Einfluss eliminieren zu können. Ein neuer Hochspannungselektrodenhalter mit eingebauten Abschirmungen der Fluidreservoirs wurde hierfür aufgebaut (Abb. 4-14). Die Fluidreservoirs des CE-Chips passen in die Löcher, somit werden die Reservoirzylinder mit den Kupferfolien abgeschirmt. Außerdem werden Hochspannungsstifte auf dem Chip einfach justiert und tauchen präzise in die Fluidreservoirs ein. Die Kupferfolien werden während der Messung mit der Masse verbunden.

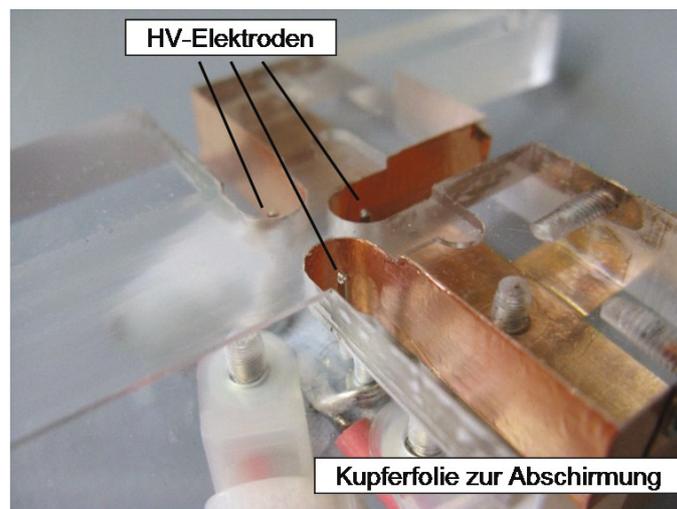


Abbildung 4-14 Modifizierter HV-Elektrodenhalter

Mit dem neuen Messaufbau wurde die gleiche Messung durchgeführt. Die rote Kurve in Abbildung 4-13 zeigt das Messsignal mit den abgeschirmten Reservoirs. Die Abweichung von der Basislinie wurde nicht mehr beobachtet. Für die weiteren Versuche wurde deshalb der neue Hochspannungselektrodenhalter eingesetzt.

Des Weiteren wurde eine Testlösung aus einem Gemisch von Lithiumchlorid, Natriumchlorid und Kaliumchlorid (jeweils 1 mM, Pufferlösung: 10 mM MES/His) zur Trennung von den Kationen, Li^+ , Na^+ und K^+ eingesetzt. Während des Analyseorgans (Probeninjektion und Trennung) wurden die Messsignale an beiden Stellen erfasst. Zunächst wurde die Injektionszeit von 5 bis 15 Sekunde variiert, die anderen Messbedingungen wie Injektionsspannung und Fluidreservoirfüllstand blieben dabei unverändert.

Die simultanen Messsignale vom Injektionskreuzungsbereich sowie von der Detektionsstelle sind in Abbildung 4-15 dargestellt. Der Analyt besitzt eine größere Leitfähigkeit als der Hintergrundelektrolyt. Somit zeigt der Anstieg des Signals die Injektion des Analyts am Kanalkreuz in den Trennkanal an. Abbildung 4-15 (oben) zeigt, dass mit zunehmender Injektionszeit das Signal kontinuierlich ansteigt, d. h. mehr Analyt strömt in den Trennkanal hinein. Nach der Injektion folgt die Trennsequenz, bei der der Trennkanal am Kanalkreuz wieder mit Pufferlösung befüllt wird, und somit die Messsignale zurückgehen. Das unterschiedliche Injektionsverhalten sollte zu unterschiedlichen Peakflächen im zugehörigen Elektropherogramm führen, wie in Abbildung 4-15 (unten) deutlich zu erkennen ist. Jeweils drei Signalpeaks von Li^+ , Na^+ und K^+ wurden detektiert. Mit zunehmender Probenmenge, die in den Trennkanal injiziert wurde, werden die Flächen der Signalpeaks auf dem Elektropherogramm auch größer.

Aus den Messergebnissen mit dem Messaufbau in Abbildung 4-14 konnte ein Zusammenhang zwischen den Messsignalen im Injektionskreuzungsbereich und der Signalpeaks des Elektropherogramms hergestellt werden. Aus der Höhe des Peaks direkt vor der Umschaltung der Injektionssequenz zum Trennsequenz kann eine injizierte Analytmenge ermittelt werden. Die aufgetrennte Spezies bilden schmalen Plugs und führen zu peakförmigen Signalen während sie sich durch die Messzelle bewegen. Das Integral jedes Peaks über die Zeit, d. h. jede Peakfläche entspricht der Menge jeder Spezies.

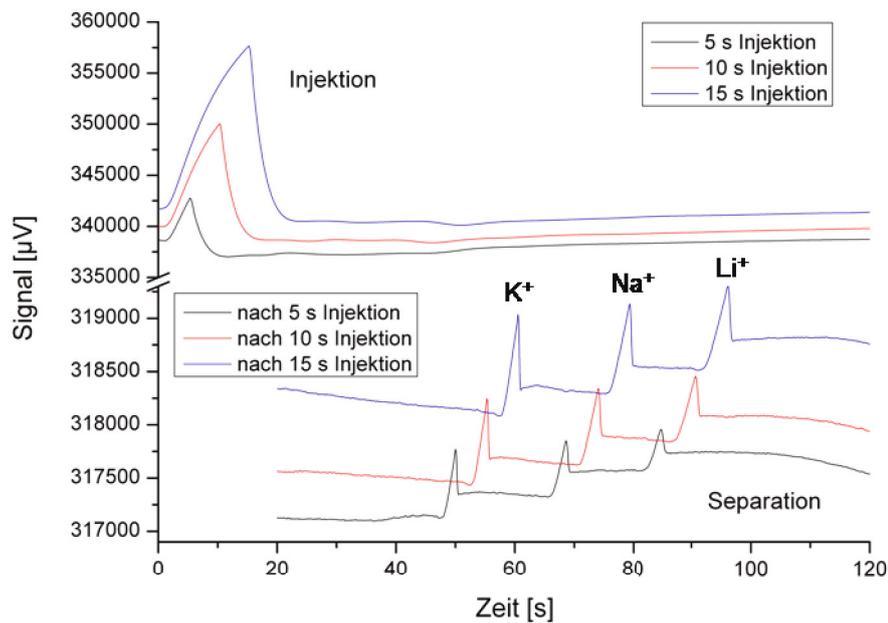


Abbildung 4-15 Simultane C4D-Messungen der Injektion (oben) und Separation (unten) von Li^+ , Na^+ und K^+

Puffer: 10 mM MES/His, Analyt: je 1 mM

$E_{\text{inj}} = 50 \text{ V/mm}$, $E_{\text{sep}} = 11,5 \text{ V/mm}$

Aus den Messsignalen kann der Zusammenhang zwischen den Messsignalen bei der Injektion und den Signalpeaks der daraus resultierten Elektropherogrammen dargestellt werden. Die Fläche unterhalb des Signalpeaks von Li^+ , Na^+ und K^+ des Elektropherogramms steigt mit der zunehmenden Menge des in den Trennkanal injizierten Analyts, die im Injektionsbereich gemessen wurde. Der typische Verlauf des Zusammenhangs zwischen Peakflächen und Signalhöhe der ersten Messserie (Abb. 4-15) ist in Abbildung 4-16 dargestellt. Der zu erkennende geringfügige Drift am Nullpunkt sollte auf die Diffusion während der Migration im Separationskanal zurückzuführen sein, die mit längerer Analysenzeit zunimmt. Mit der Berücksichtigung der Diffusion und der elektrophoretischen Mobilität können mit der Messung am Injektionskreuz die Messabweichungen bei den quantitativen Analysen korrigiert werden. Diese Methode kann in weiterführenden Arbeiten in die Auswertungssoftware implementiert werden.

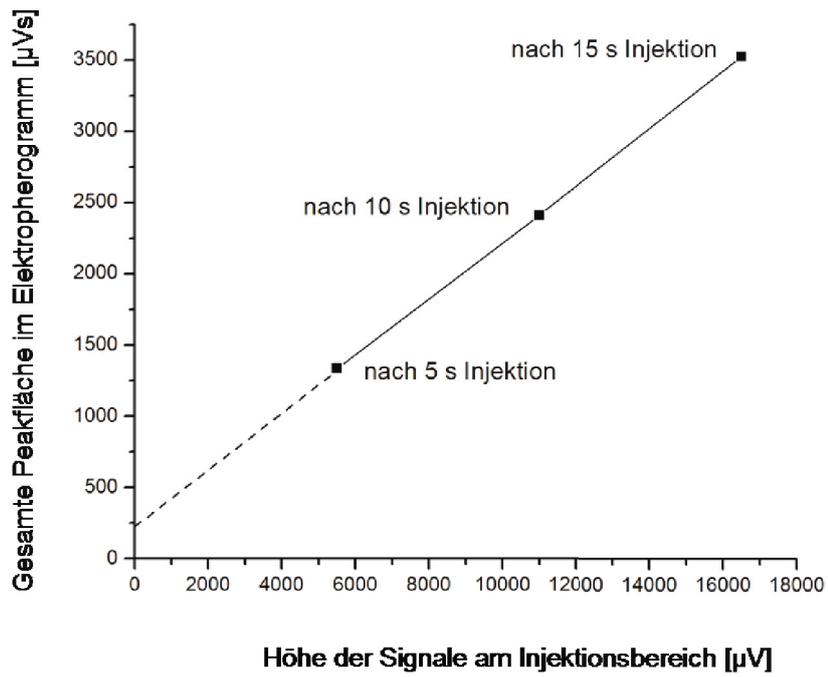


Abbildung 4-16 gesamte Peakfläche der aufgetrennte Analytspezies in Abhängigkeit von der Injektion

5 Miniaturisiertes Multikanal-CE-System

In der modernen Analytik steigt der Bedarf an kostengünstigen Einwegprodukten, um mögliche Probenkontaminierung und zusätzliche Reinigungsschritte zu vermeiden. Wichtig sind dabei ein hoher Probendurchsatz mit kurzer Analysenzeit und ein kompaktes bedienerfreundliches Messgerät.

Das Mult-Kanal-CE-System „MinCE_48“ (Miniaturisierte CE mit 48 Kanälen) wird konzipiert. Ziele sind dabei die Steigerung der Produktivität und die weitere Kostenreduktion. Die hoch optimierte Replikationstechnologie für CDs/DVDs kann hierfür zur Herstellung der mikrofluidischen „CE-Disc“ adaptiert werden.

5.1 CD als mikrofluidische Plattform

Das optische Speichermedium Compact Disc (CD) zur digitalen Speicherung von Musik, Film sowie Daten für Rechner wurde Anfang der 1980er Jahre von den Firmen Philips und PolyGram in Zusammenarbeit mit der Firma Bayer entwickelt. Später in den 1990er Jahren wurde sie in einen neuen Datenträger, Digital Versatile Disc (DVD), zur höheren Speicherkapazität erweitert. Die DVD sieht ähnlich aus wie die CD, sie ist aber nur halb so dick. Bei einer CD und DVD werden Daten in Form von Vertiefungen im Mikromaßstab gespeichert, welche mit einem Laser ausgelesen werden können. Das unterschiedlich stark reflektierte Licht des Lasers beim Abtasten der Vertiefungen wird dabei in ein elektrisches Signal umgewandelt, welches schließlich als digitale Information interpretiert wird. Die Grubenstrukturen bei einer CD haben eine Länge von 0,833 bis 3,054 μm und eine Breite von 0,5 μm ; bei einer DVD sind die Strukturen etwa halb so groß.

Das Replikationsverfahren von CDs und DVDs gilt als ein gelungenes Beispiel für die Herstellung von Mikrostrukturen in großen Serien. Die Replikation von CDs und DVDs erfolgt im Spritzprägeverfahren – ein Spritzgussverfahren, wobei die Kunststoffschmelze über eine Hochdruckpresse in eine Form gespritzt wird. Das Formwerkzeug (meistens aus Nickel) wird zuvor von einem Master-Formwerkzeug (üblicherweise in Glas mit Hilfe einem Laserstrahl lithographisch strukturiert) galvanisch erstellt. Durch den hoch optimierten Vorgang kann eine schnelle (ca. 500 - 1000 Discs pro Stunde) und kostengünstige Mikrostrukturierung in Polymer erzielt werden.

Durch die Rotationseigenschaften wurde die CD für einige mikrofluidische Anwendungen interessant, z. B. konnte die Zentrifugalkraft und Corioliskraft zum Fluidtransport genutzt werden [90-93]. Dabei wurden mikrofluidische Bauteile wie Mikroventile und Mikromischer und Analysenschritte wie Proben transport und Separation durch Zentrifugalkraft und Corioliskraft mit der Kombination von Oberflächenbenetzung realisiert. Die tragbare und handhabbare Disc mit relativ großer nutzbarer Fläche bietet außerdem eine günstige Plattform in der Mikrofluidik zur Entwicklung von vollständigen Lab-on-Chip-Systemen mit einer Vielzahl von parallelen analytischen und mikrofluidischen Bauteilen.

5.2 Herstellung von CE-Disc

5.2.1 Cyclo-Olefin-Polymer (COP)

In analytischen Anwendungen spielen die Eigenschaften des Chipsubstratsmaterials eine entscheidende Rolle. Die Materialauswahl sollte sowohl in Hinsicht auf die Mikrochipherstellung als auch auf die analytischen Anwendungen betrachtet werden. In dieser Arbeit wurde neben Polycarbonat (PC), ein Standardmaterial zur CD- und DVD-Herstellung Cyclo-Olefin-Polymer (COP), ein biokompatibles Hochleistungspolymer mit exzellenten chemischen und physikalischen Eigenschaften als Chipsubstrat, eingesetzt.

Cyclo-Olefin-Polymer oder Cyclo-Olefin-Copolymer ist ein Polymer aus einem Typ von Olefinen bzw. aus zwei oder mehrerer verschiedenen Olefinen – Copolymer. Im Gegensatz zu den teilkristallinen Polyolefinen wie Polyethylen und Polypropylen ist COP amorph und damit optisch transparent. Zudem ist es für die Standard-Mikrochipherstellung mittels Abformung und thermischen Bondens gut geeignet. COP besitzt attraktive Eigenschaften für die Analytik und Mikrofluidik, unter anderem eine exzellente Biokompatibilität, hervorragende chemische Beständigkeit gegen Säuren und Basen und geringe Wasserabnahme. In dieser Arbeit wurde Cyclo-Olefin-Polymer (COP) vom Hersteller Zeon Chemical's (Tokyo, Japan, Handelsname Zeonex und Zeonor) als Substrat für die mikrofluidische CD verwendet. Das COP wurde durch ringöffnende Metathesepolymerisation und anschließende Hydrierung hergestellt. Das Polymerisationsschema und die Struktur von COP sind in Abbildung 5-1 dargestellt.

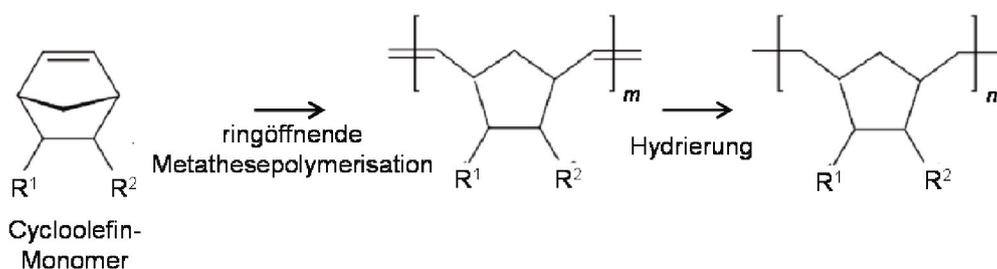


Abbildung 5-1 Polymerisationsschema und Struktur von COP [94]

5.2.2 Oberflächenaktivierung von Cyclo-Olefin-Polymer

COP ist von sich aus unpolar aufgebaut und daher ein hydrophobes Material mit einem Wasserkontaktwinkel von knapp 90° . Bei den CE-Anwendungen treten wegen der schlechten Benetzbarkeit häufig Probleme auf, z. B. lassen sich die Mikrokanäle mit wässrigen Lösungen schwer befüllen und es bilden sich häufig Gasbläschen auf der Kanaloberfläche und am Kanaleingang/-ausgang, welche zu einer lokalen Isolierung führen und den Stromfluss im Kanal unterbrechen wodurch die elektrophoretische Migration verhindert wird. Zur Hydrophilisierung der Oberfläche wird häufig Sauerstoffplasma eingesetzt. Der Sauerstoff reagiert mit der Kunststoffoberfläche und bildet dort polare bindungsfreudige Radikalstellen. Die Polyolefinoberfläche erhält z. B. nach der Behandlung im Sauerstoffplasma Carbonyl, Hydroxyl und andere sauerstoffhaltige funktionelle Gruppe. Neben der Benetzbarkeit wird durch die Plasmabehandlung die Haftung nach dem Verbindung über thermisches Bonden erhöht [65].

In dieser Arbeit wurden die für Herstellung und analytischen Anwendungen wichtige Eigenschaften von COP als Chipmaterial ohne bzw. nach der Sauerstoffplasmabehandlung untersucht. Die gereinigte Proben wurden zunächst im Niederdruck-Plasma mit Sauerstoff (0,4 mbar, 100 W) 5 Minuten lang behandelt (Plasmaanlage, FA. 4-TEC Vakuum - Anlagenbau GmbH, Vierkirchen, Deutschland).

Die Benetzbarkeit der Oberfläche kann durch das Vermessen des Wasserkontaktwinkels bestimmt werden (Abb. 5-2). Der Kontaktwinkel lässt sich durch das Vermessen einzelner Tropfen von Wasser auf der Probenoberfläche bestimmen. Durch Anlegen einer Tangente an den Punkt, wo der aufgesetzte Flüssigkeitstropfen die Festkörperoberfläche und die Umgebungsphase, meist Luft, berührt, wird der Kontaktwinkel ermittelt. Ein Kontaktwinkel kann sowohl an statischen als auch an dynamischen Tropfen gemessen werden. Bei der statischen Messung wird der Tropfen vor der Messung erzeugt und hat während der Messung ein konstantes Volumen. Bei der dynamischen Messung wird der Kontaktwinkel gemessen, während der Tropfen vergrößert oder verkleinert wird; die Grenzfläche wird also während der Messung ständig neu gebildet.

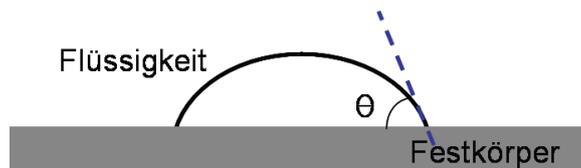


Abbildung 5-2 Kontaktwinkelbildung

Die behandelten Mikrokanalstrukturen sollen im Anschluß mit einer dünnen Folie durch thermisches Bonden bei 130°C gedeckelt werden. Der Einfluss der Wärmebehandlung auf die Oberflächenbenetzbarkeit sollte hierbei beachtet werden. Zum Simulieren des thermischen Bondvorgangs wurden die behandelten Proben anschließend der gleichen Temperatur ausgesetzt (130°C, 5 Min). Gemessen wurden die dynamischen Kontaktwinkel von diesen unterschiedlich behandelten Proben.

Die Wirksamkeit einer Plasmabehandlung ist in der Regel zeitlich begrenzt. Die Zeit, für die eine Funktionalisierung erhalten bleibt, hängt stark vom behandelten Substrat und dem verwendeten Prozess ab und kann zwischen wenigen Minuten und einigen Monaten betragen. Die Proben wurden über einen Zeitraum von etwa einer Woche (1 Stunde, 4,5 Stunden, 2 Tage, bzw. 8 Tage nach der Plasmabehandlung) untersucht. Insgesamt wurden fünf unterschiedlich behandelten Probe, jeweils drei Stück mit etwa gleich großer Fläche zum mehrfachen Messen nach unterschiedlichen Zeiten vorbereitet. Nach einer Messung wurde die vermessene Stelle markiert, damit immer unbenutzte Stellen untersucht werden konnten. Die Proben wurden von einer abgeformten Disc aus COP abgeschnitten und wie folgt behandelt:

Probe 1: plasmabehandelt

Probe 2: nach der Plasmabehandlung bei 120°C temperiert

Probe 3: nach der Plasmabehandlung mit destilliertem Wasser gespült

Probe 4: unbehandelt

Probe 5: ohne Plasmabehandlung bei 120°C temperiert

In Abbildung 5-3 sind die Ergebnisse der Änderung der Kontaktwinkel der unterschiedlich behandelten Proben dargestellt. Die unbehandelten Proben zeigen Kontaktwinkel zwischen 85° und 90°, die wärmebehan-

delten eine Erhöhung von ca. 5°. Nach der Plasmabehandlung wiesen die Proben eine gute Benetzbarkeit d. h. sehr kleinen Kontaktwinkel auf. Dieser Effekt geht nach der Wärmebehandlung oder Wasserbehandlung etwas zurück aber nicht bis zum ursprünglichen Zustand. Nach einer Woche stellt sich ein Kontaktwinkel von ca. 45° ein. Diese langzeitige Untersuchung zeigt, dass die mit Sauerstoffplasma behandelte COP-Oberfläche nach dem thermischen Bonden sowie nach der Befüllung mit wässriger Lösung hydrophil bleibt.

Die unvorteilhafte Oberflächeneigenschaft des COPs konnten mit einer kurzen Vorbehandlung verbessert werden, dieses Hochleistungspolymer mit guten chemischen Eigenschaften kann in der Mikrofluidik vorteilhaft in den Einsatz kommen.

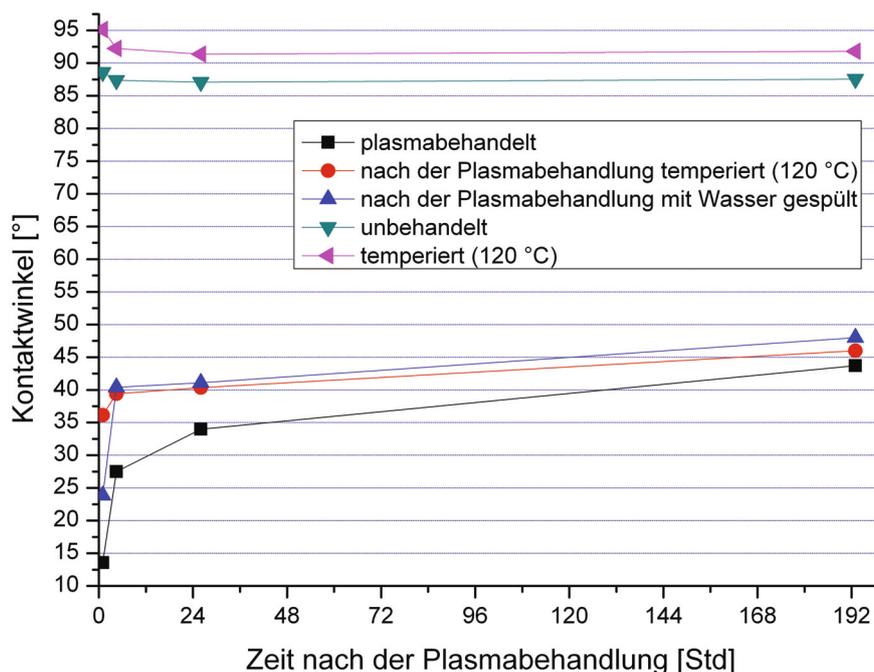


Abbildung 5-3 Benetzbarkeit von COP nach unterschiedlichen Behandlungen

5.2.3 Entwurf und Herstellung

Zur maximalen Nutzung der Disc-Fläche und zur effektiven Anordnung der Strukturen beim Einsatz wurden insgesamt 48 CE-Strukturen auf ei-

ner CD radial angeordnet. Die mikrofluidische Disc wird auf dem Messplatz in der Mitte fest auf einer drehbaren Achse eingespannt um ein Wechseln von CE-Struktur zu einer Anderen zu erleichtern. Die Injektionskanäle wurden zur einfacheren Probennahme durch Einpipettieren auf der Außenseite der Disc angebracht. Die Strukturen werden für eine sichere Zuordnung von 1 bis 48 durchnummeriert.

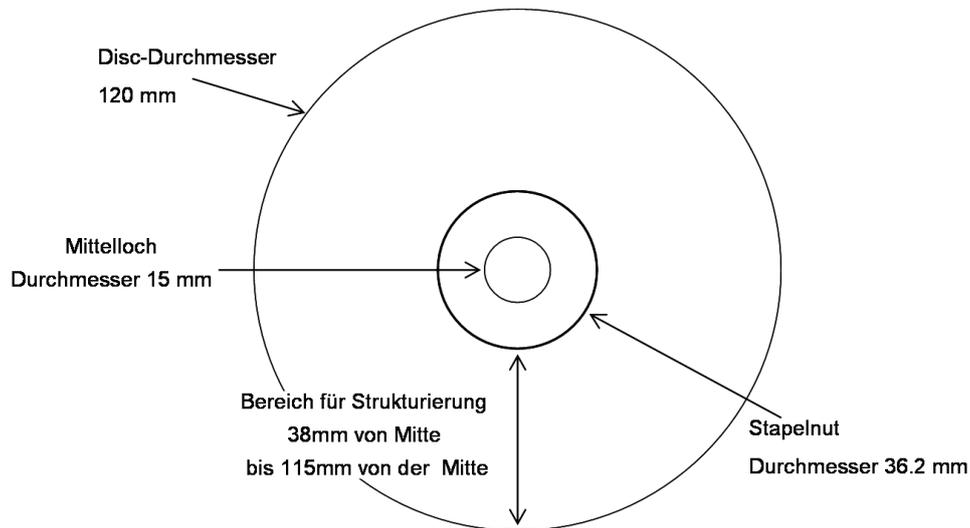


Abbildung 5-4 Designkriterium: nutzbarer Fläche auf einer Disc

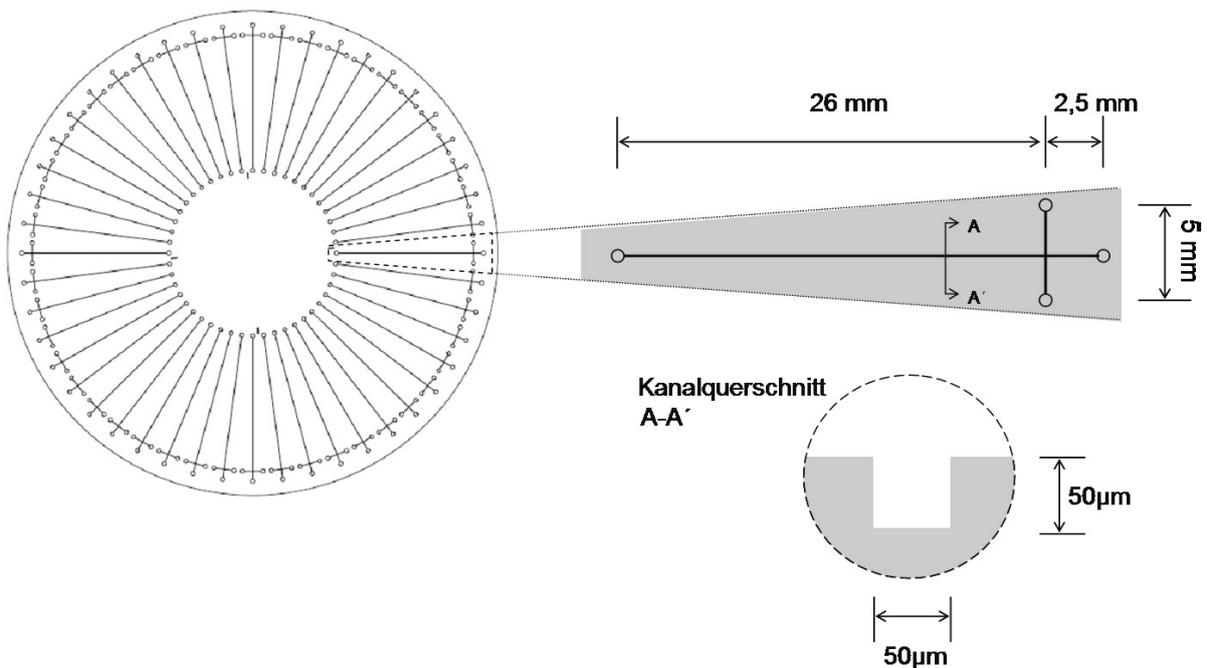


Abbildung 5-5 Layout einer mikrofluidischen Disc mit 48 CE-Einheiten (links) und Geometrie einer CE-Struktur (rechts)

Die nutzbare Fläche auf einer Disc mit ihren Abmessungen ist in Abbildung 5-4 und die radiale Anordnung von 48 CE-Einheiten ist in Abbildung 5-5 dargestellt. Die Trennkanäle sind 28,5 mm lang und dabei ist Trennstrecke bis zum Kanalkreuz 26 mm lang. Die Geometrie der CE-Disc ist in Abbildung 5-5 dargestellt.

Die mikrofluidischen CE-Discs wurden nach dem Standardverfahren zur Herstellung von üblichen CDs und DVDs bei der Firma arvato digital services (Gütersloh, Deutschland) durch Spritzprägen erzeugt. Zunächst wurde ein Formwerkzeug mit den abzuformenden Strukturen bei der Firma i-sys Automationstechnik GmbH (Karlsruhe, Deutschland) in eine 6 Zoll Messingscheibe durch Mikrofräsen strukturiert. Da ein Formeinsatz nur begrenzt haltbar ist, muss der Formeinsatz zum langzeitigen Einsatz bei der industriellen CD- bzw. DVD-Herstellung in großen Stückzahlen vervielfältigt werden. Der Messingformeinsatz wurde bei arvato digital services galvanisch in Nickel umkopierte. Die mikrofluidischen Discs wurden dann aus PC und COP mit diesem Nickel-Stamper spritzgeprägt. Der Messingformeinsatz und die abgeformte mikrofluidische Disc sind in Abbildung 5-6 bzw. 5-7 dargestellt. Es sind 48 CE-Strukturen, die zur Identifizierung durchnummeriert sind, und vier Positionierungsmarkierungen zu erkennen.

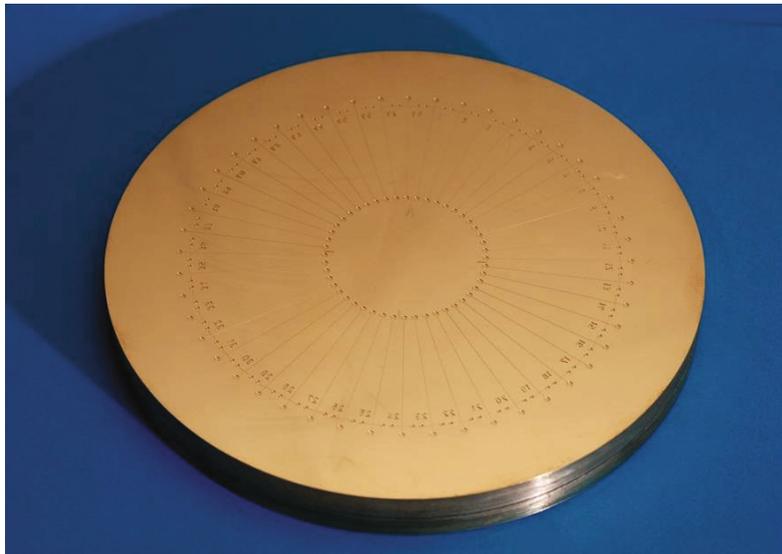


Abbildung 5-6 Masterformwerkzeug aus Messing

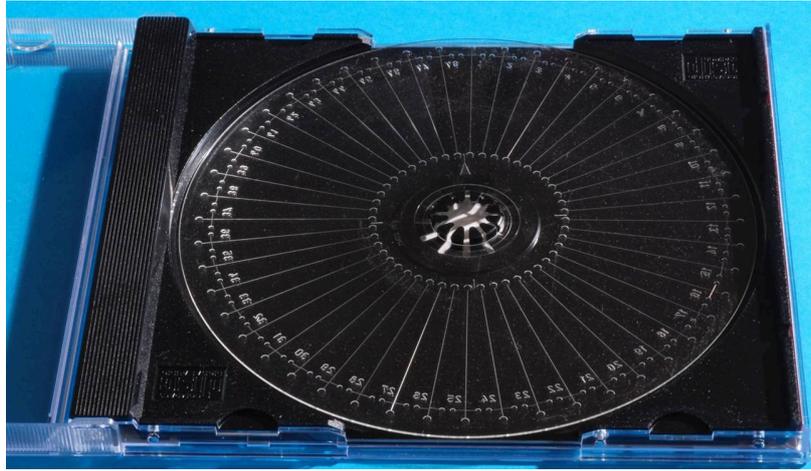


Abbildung 5-7 abgeformte CE-Disc aus COP in einem CD-Gehäuse

Mit den abgeformten Discs wurden CE-Discs hergestellt. Um die allseitig hydrophile Kanaloberfläche herzustellen wurden vor dem Deckeln der Kanalstrukturen sowohl die Kanalstrukturoberfläche als auch die Deckfolie behandelt. Die Prozessparameter bei der Sauerstoffplasmabehandlung sind in Kapitel 5.2.2 beschrieben. Die CE-Strukturen auf der CD und die Deckfolie wurden nach der Sauerstoffplasmabehandlung durch thermisches Bonden miteinander verbunden. Die Prozessparameter beim thermischen Bonden von COP finden sich in Tabelle 3-1.

Zum großformatigen Deckeln von dicht nebeneinander aufgebrachten Strukturen durch das thermischen Bonden, wurde ein modifizierter Versuchsaufbau verwendet, wobei der Druck homogen auf die gesamte Fläche aufgeteilt werden soll. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 5-8 dargestellt. Der zylindrische Halter verhindert die seitliche Ausdehnung der elastischen Silikonunterlagen durch Fließen. Er ermöglicht somit eine gleichmäßige Druckverteilung auf die gesamte Oberfläche des Substrates.

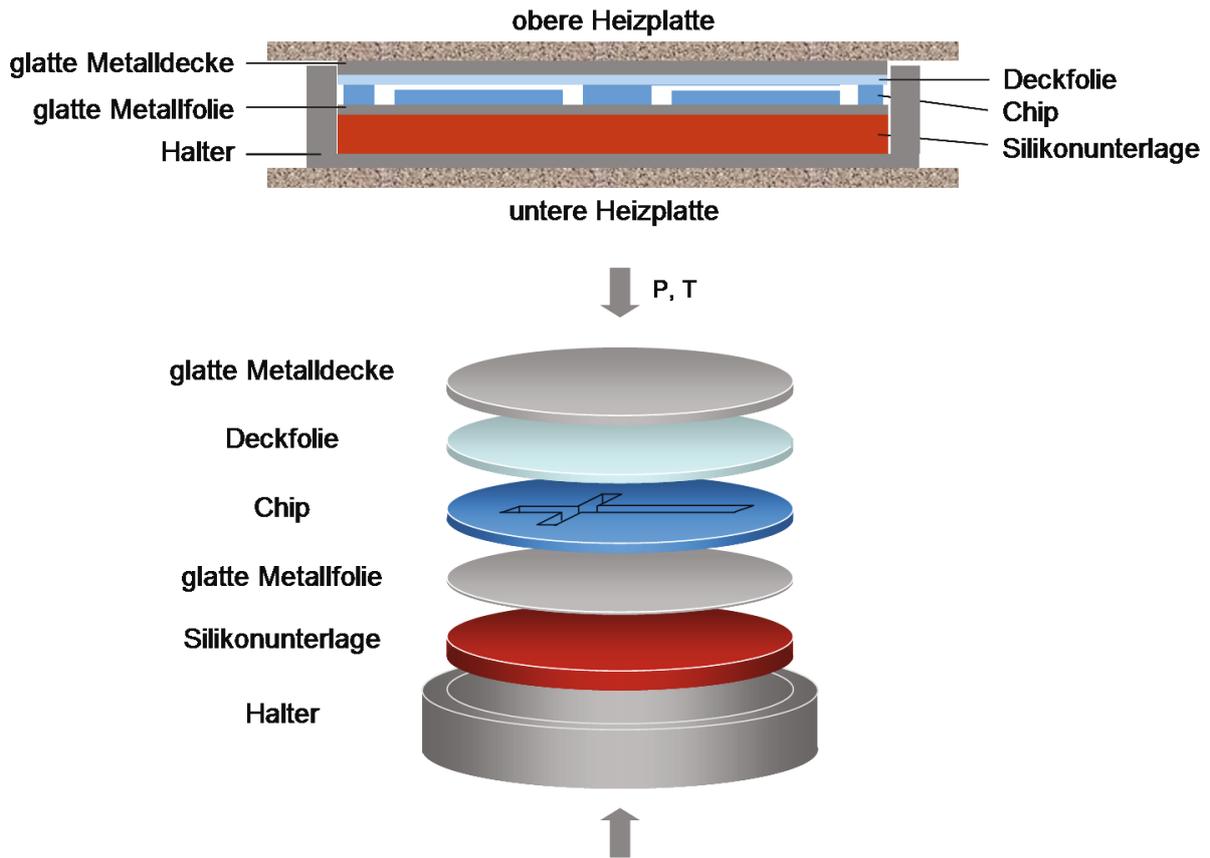


Abbildung 5-8 Versuchsaufbau zum thermisches Bonden

Anschließend werden auf den CE-Discs Mikroelektroden für die kontaktlose Leitfähigkeitsmessung aus Gold durch Sputtern aufgebracht. Die Elektroden wurden unter Einsatz einer Schattenmaske im gewünschten Design abgeschieden. Die Geometrie der C4D-Elektroden ist in Abbildung 5-9, die Schattenmaske ist in Abbildung 5-10 dargestellt. Auf der Schattenmaske sind vier schlitzformige Markierungen zur Justierung auf dem Chip angebracht. Die Maske wurde durch nasschemische Ätzen aus Stahl gefertigt (FA. Ätztechnik Herz GmbH, Epfendorf, Deutschland). Die Prozessschritte zum Sputtern sind in Kapitel 3.1.3 beschrieben.

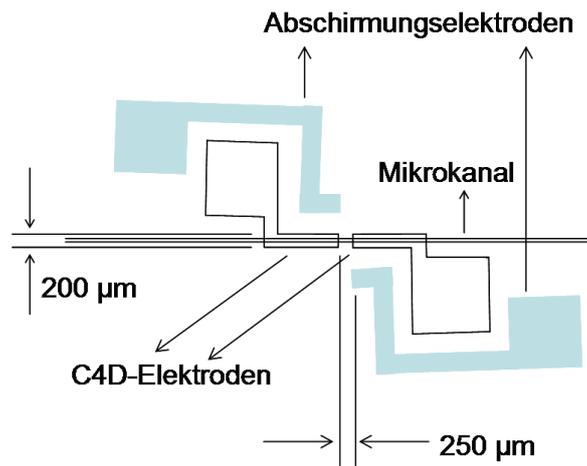


Abbildung 5-9 Geometrie der C4D-Elektroden

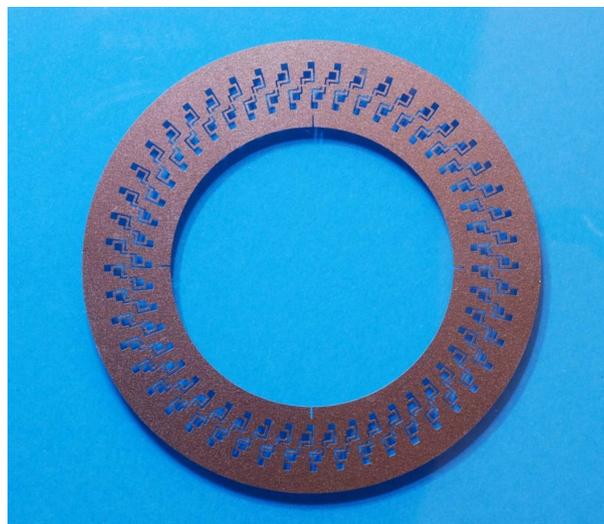


Abbildung 5-10 Schattenmaske zum Sputtern von 48 C4D-Elektrodenpaaren mit vier Positionsmarkierungen an der Innenseite des Rings

In Abbildung 5-11 ist eine CE-Disc und die Vergrößerung von einigen Elektroden dargestellt. Auf einer über die gesamte Fläche dicht gedeckelten Disc sind die auf jedem Kanal justierten Elektroden zu erkennen. Somit konnten 48 CE-Einheiten auf einer Disc durch eine Prozesssequenz hergestellt werden, diese Parallelfertigung mit Standardprozessen sollte die Kosten der mikrofluidischen Produkte deutlich reduzieren.

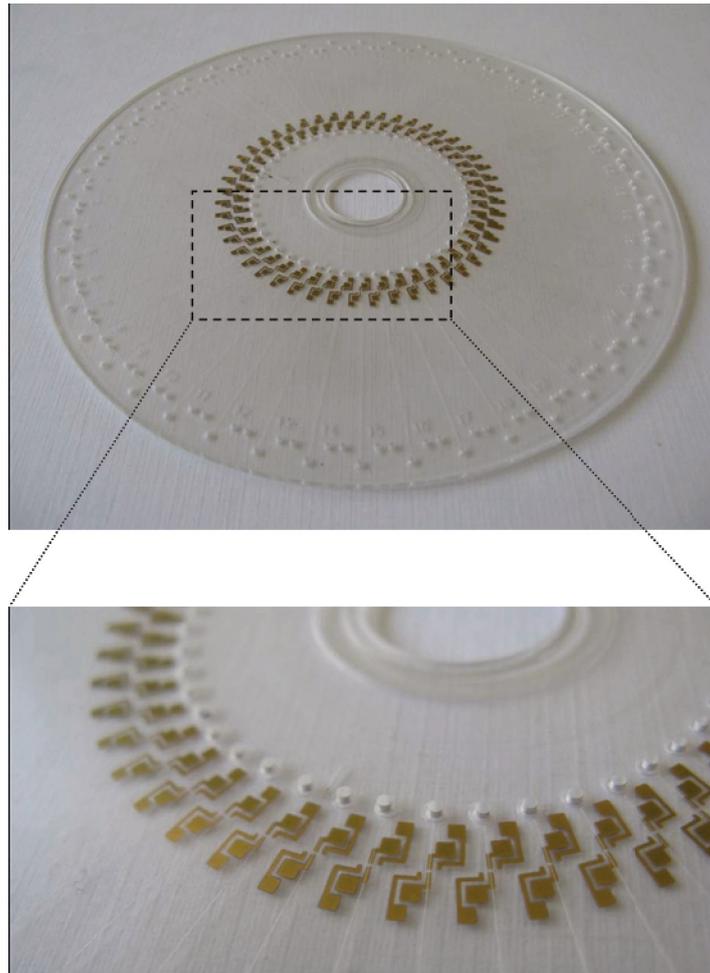


Abbildung 5-11 CE-Disc mit 48 Kanälen und integrierten Detektionselektroden einschließlich Abschirmung

5.3 Miniaturisiertes CE-Gerät

Zur neuen Mikrochip-CE im CD-Format, auf der mehrere CE-Strukturen radial angeordnet sind, wurde das neue miniaturisierte CE-Gerät „MinCE_48“ in Form eines portablen CD-Players entwickelt. Das Messgerät für die CE-C4D-Messungen besteht aus programmierbaren Hochspannungsquellen zum Anlegen des elektrischen Feldes für die elektrokinetische Injektion und Stofftrennung sowie einem kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektor. In Abbildung 5-12 ist das Konzept der MinCE_48 dargestellt.

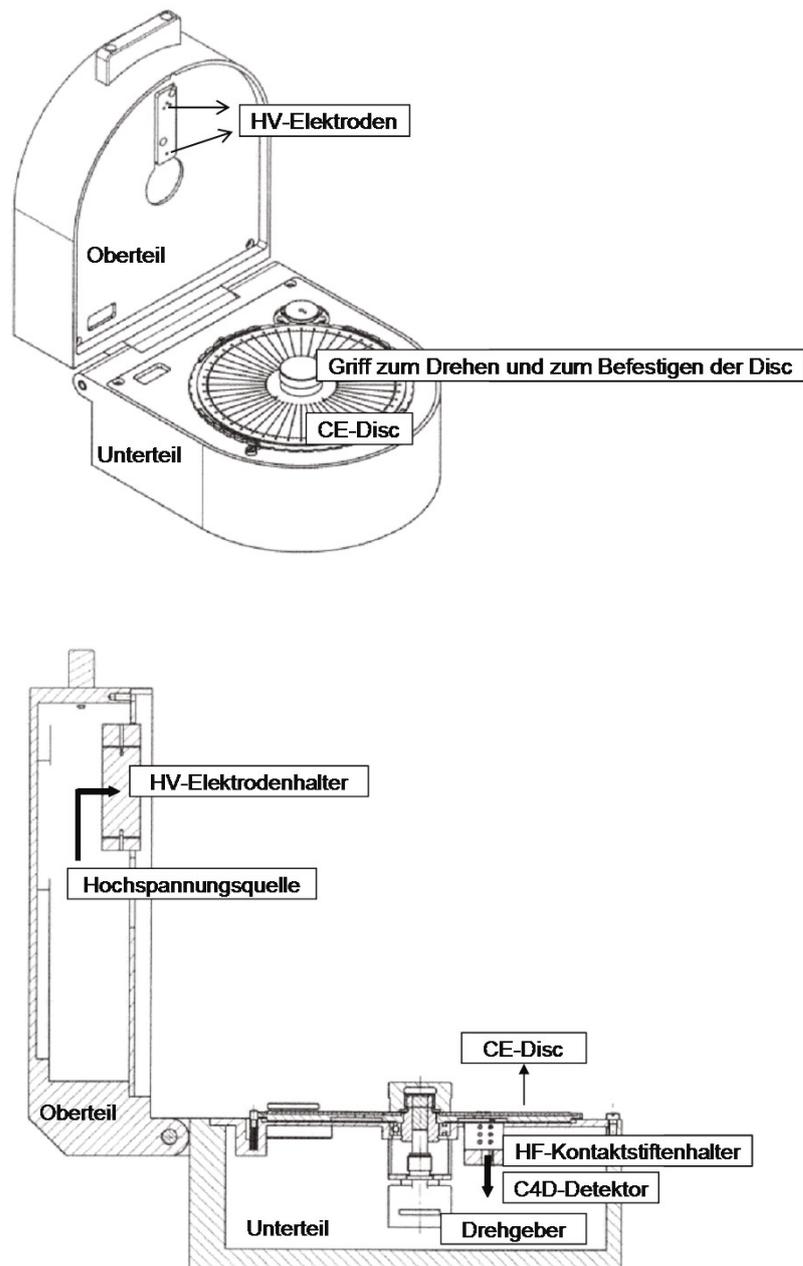


Abbildung 5-12 Entwurf des MinCE_48-Geräts (ohne Elektronik);
Aufbau (oben), seitlicher Querschnitt (unten)

Das gesamte Messgerät ist klappbar, die CE-Disc wird auf einem Drehteller im Unterteil des Gehäuses und somit mit dem Drehsensor befestigt. Die Multikanäle auf der CE-Disc sind durch Drehen zur Messposition individuell adressierbar. Der CE-Kanal, der sich zur Messung gebracht wurde, wird mit dem Drehsensor gelesen. Der Wechsel von einer Struktur zu einer beliebigen Struktur zur weiteren Messung erfolgt manuell zwischen den Messungen. Dazu wird das Gehäuse geöffnet und auch

der Befüllung des Kanals ist zu diesem Zeitpunkt vorgesehen. Die Hochspannungselektroden aus Platin sind im Oberteil eingebaut und tauchen beim Schließen des Geräts in die Fluidreservoirs ein. Die Detektionsmodule sind im unteren Teil des Geräts untergebracht und werden durch abgeschirmte HF-Leitungen über die HF-Kontaktfederstifte mit den C4D Elektroden auf der Disc verbunden. Die Messung erfolgt nach dem Schließen des Geräts bei Stillstand der Disc.

Auf Grund der dicht nebeneinander aufgebracht Mikrokanäle ist Sorgfalt bei der Montage der CE-Disc im Gerät wichtig. Dadurch kann jedes C4D-Elektrodenpaar genau mit den Kontaktstiften der C4D-Detektoren verbunden werden und die Platinelektroden für Zuführung der Hochspannung können genau in die kleinen Fluidreservoirs eingetaucht werden. Jeder CE-Kanal ist durchnummeriert und wird durch einen Drehsensor, der in der Mitte mit dem Disc-Halter (Abb. 5-13) fest verbunden ist, gelesen und identifiziert, welche CE-Einheit sich gerade im Einsatz befindet. Als Bezugspunkt wurde eine nicht rotationssymmetrische Justiermarke auf der Disc und dem Disc-Halter angebracht.

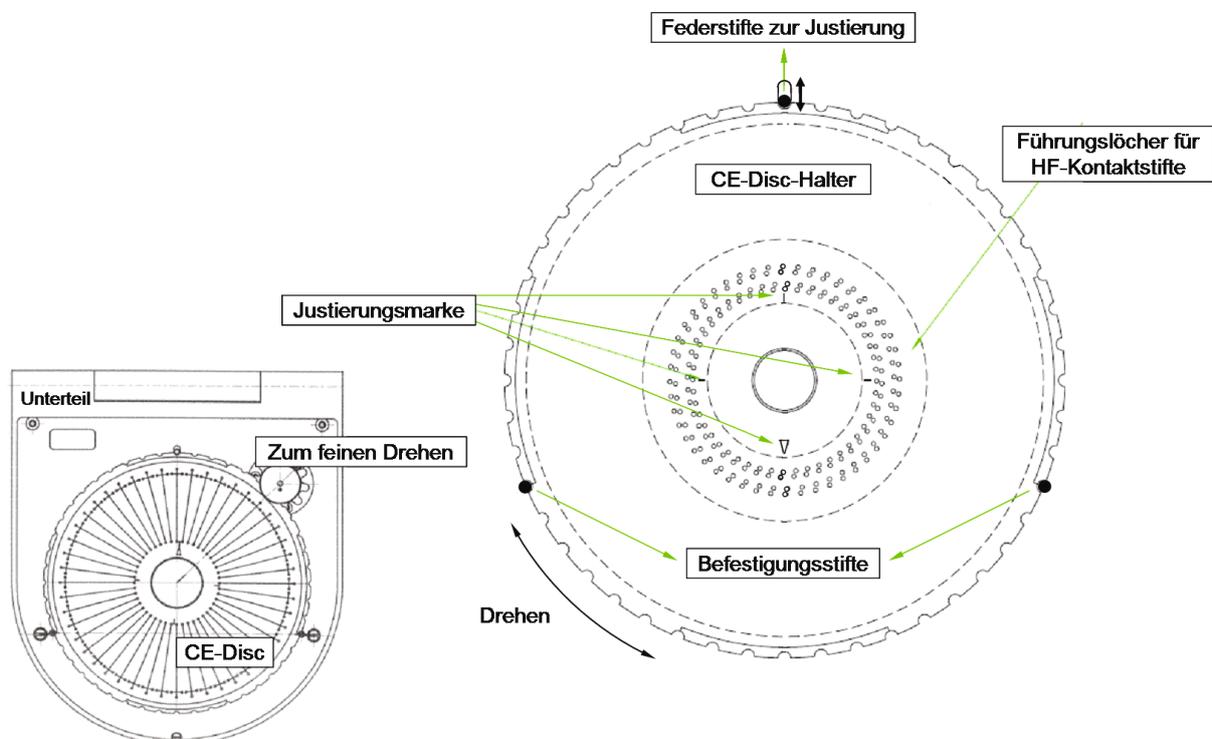


Abbildung 5-13 Aufsicht der MinCE_48 und CE-Disc-Halter

Der gesamte Analysesequenz wird über USB-Anschluss mit einer hierfür entwickelten Software gesteuert. Das Messsignal wird ausgelesen und auf der Softwareoberfläche graphisch dargestellt und automatisch skaliert. Die Analysenparameter wie Injektionsspannung, Injektionsdauer, Separationsspannung, Separationsdauer und Wiederholungen können in den Eingabefeldern übergeben werden. Außerdem kann die C4D-Sensorleistung durch einen Software-Schieberegler eingestellt werden um das Grundsignal in den optimalen Bereich zu legen. Um einen elektrischen Durchschlag der Separationsspannung an der Detektion zu vermeiden wird die Eingabe der Höhe der Injektions- bzw. Separationsspannung begrenzt. Wenn das Gerät angeschlossen ist und die Software zur Analyse bereit steht, wandelt das rote Licht im Programm ins grüne und zeigt „OK“. Die durch den Drehsensor gelesene Nummer wird auch angezeigt. Nach jeder Messsequenz werden die Messdaten mit der Kanalnummer im *txt*-Format gespeichert. Die gespeicherten Messdaten können aufgerufen und als Diagramm dargestellt werden. Bei einem mehrfachen Aufrufen von Dateien wird jede Kurve in einer anderen Farbe dargestellt. In Abbildung 5-14 sind die MinCE_48 mit einer CE-Disc und die Softwareoberfläche auf einem Laptop gezeigt.



Abbildung 5-14 MinCE_48

5.4 CE-C4D-Messungen

5.4.1 Puffer und Analyten

Alle Lösungen wurden wie in Kap. 4.3.1 beschrieben vorbereitet. Zur allgemeinen Chipcharakterisierung und zum Testen von Trennleistungen der CE-Disc wurde die Trennung von drei Alkali-Kationen Li^+ , Na^+ , K^+ und Ca^{2+} durchgeführt. Als Pufferlösung wird MES/His in 10 mM Konzentration verwendet. Als Analyt wird ein Gemisch von Lithiumchlorid, Natriumchlorid, Kalziumchlorid und Kaliumchlorid in jeweils 100 mM vorbereitet und weiter in der Pufferlösung auf 1 mM verdünnt (alle verwendeten Chemikalien sind im Anhang aufgelistet).

5.4.2 Messablauf und Ergebnisse

Die CE-Disc wird in das Messgerät fest eingebaut und die gewünschte CE-Einheit wird zur Messposition gebracht. Danach fahren die Kontaktstifte hoch bis sie mit den Detektionselektroden zur Sender- bzw. Empfängermodule fest verbunden sind. Sobald die beide Kanäle der zur Messung adressierten CE-Einheit sorgfältig mit dem Puffer befüllt worden sind wird der Analyt in ein Reservoir an einem Ende des kurzen Kanals einpipettiert. Die Kanäle werden am besten direkt vor der Messung frisch befüllt, da die Flüssigkeit in den kleinen Reservoirs schnell verdünsten kann. Die Platinstifte zur Zuführung der Hochspannung werden in die Reservoirs eingetaucht wenn das Gerät sich schließt. Nachdem die Einstellparameter eingegeben werden kann die Messung gestartet werden. Nach der elektrokinetischen Probeninjektion startet die Separation automatisch. Der gesamte Messvorgang wiederholt sich entsprechend der eingestellten Anzahl der Messwiederholungen. Die Messwerte werden durch einen A/D-Wandler erfasst und in Echtzeit als Elektropherogramm dargestellt.

Das Elektropherogramm von den vier alkalischen Kationen ist in Abbildung 5-15 dargestellt. Mit den kurzen Kanälen (Trennstrecke 26 mm) wurden schnelle Analysen erzielt (weniger als 30 Sek. für die Trennung), trotzdem wurden alle vier Peaks sauber basisliniengetrennt.

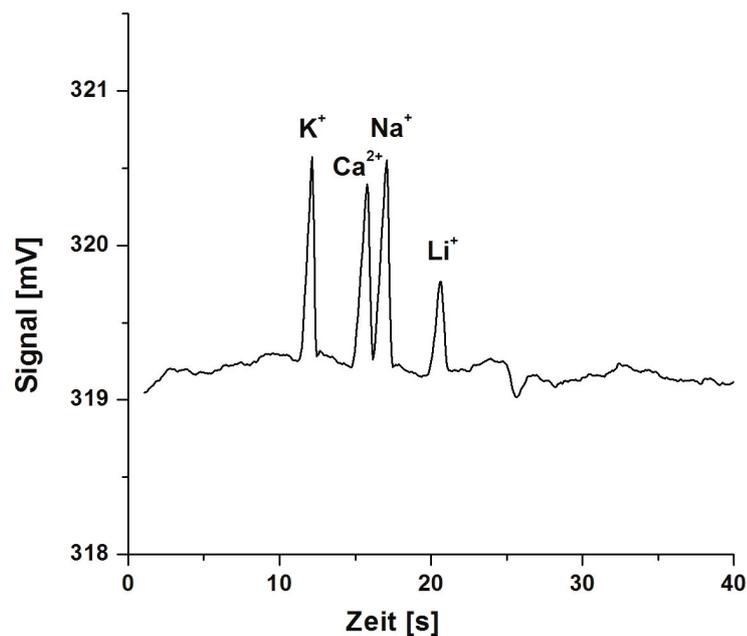


Abbildung 5-15 Elektropherogramm: Trennung von Li⁺, Na⁺, K⁺ und Ca²⁺
 Puffer: 10 mM MES/His, Analyt: je 1 mM,
 $E_{inj} = 50 \text{ V/mm}$, $t_{inj} = 1 \text{ s}$, $E_{sep} = 44 \text{ V/mm}$

Ein weiterer Vorteil von Multikanal-CE auf einer Disc ist, dass alle 48 CE-Einheiten parallel mit denselben Bedingungen hergestellt werden, so dass alle Kanaloberflächen annähernd identische Eigenschaften, z. B. Benetzbarkeit und EOF besitzen, die auf die Migrationsgeschwindigkeit der Spezies beeinflussen. Es wurden Trennungen von drei Kationen (Li⁺, Na⁺ und K⁺, jeweils 1 mM) in mehreren beliebig ausgewählten CE-Kanälen einer CE-Disc durchgeführt. Mit jedem Kanal wurden 10 Analysensequenzen wiederholt und die Elektropherogramme der jeweils fünften Sequenz wurden in Abbildung 5-16 zusammengestellt. Kanal 10, 28, 31 und 25 zeigen Fingerprints von drei Kationen mit jeweils gleicher Migrationszeit, die den Parameter zur Identifikation der zu analysierenden Stoffe darstellt. Die Abweichungen der Peakgröße sind auf die unterschiedlichen äußeren Messbedingungen zurückzuführen.

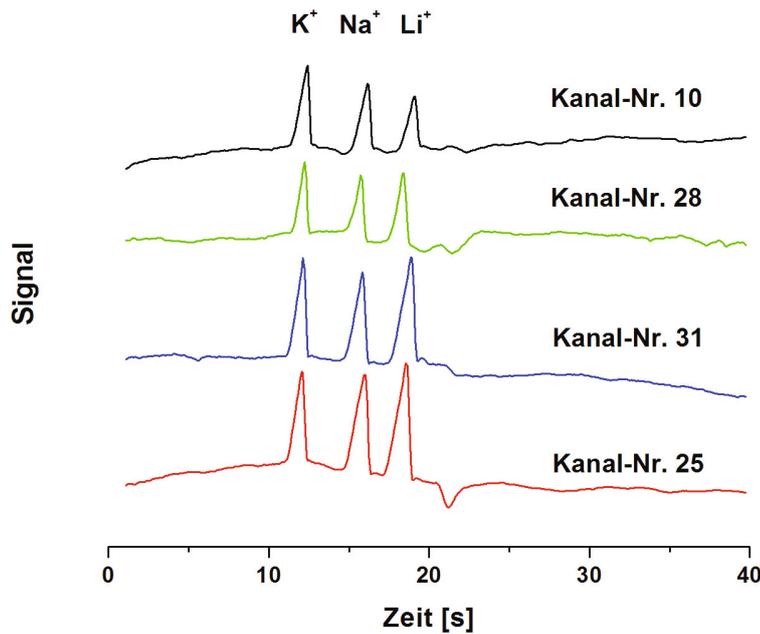


Abbildung 5-16 Reproduzierbarkeit beim Multikanaleinsatz

Trennung von Li⁺, Na⁺ und K⁺

Puffer: 10 mM MES/His, Analyt: je 1 mM

 $E_{inj} = 50 \text{ V/mm}$, $t_{inj} = 1 \text{ s}$, $E_{sep} = 44 \text{ V/mm}$

Die bisherigen Einkanal-Systeme, wobei jeder Chip seriell gefertigt wird, benötigen beim Einsatz jedes einzelnen Chips eine Referenzmessung, weil die Chipoberflächeneigenschaften unterschiedlich sein können. Mit den Kanälen auf einer Disc, die die zeitlich reproduzierbaren Ergebnissen lieferten, zeigt die Multikanal-CE-Disc, dass eine Referenzmessung zur Stoffidentifizierung mit einem CE-Kanal für die alle Strukturen auf der Scheibe gelten sollte.

Die schnelle und kostengünstige Herstellung von mikrofluidischen Strukturen auf einer Disc ist wichtiger Schritt zur Reduzierung des Stückpreises eines mikrofluidischen Chips, somit kann sein Einsatz als Einweg-Chip für Analysen im bezahlbaren Preisbereich ermöglicht werden. Mit dem biokompatiblen, chemisch hochleistungsfähigen COP als Chipsubstrat kann die Disc ihren Einsatz in der Bioanalytik erweitert werden. Das kompakte Gerät mit kostengünstigen Chips bietet die vielfältigen Einsatzmöglichkeit in den Vor-Ort-Untersuchungen, z. B. in der Vor-Ort-Diagnostik und der Telemedizin.

Die MinCE_48, ein Prototyp eines hocheffizienten Multi-Kanal-CE-Systems, zeigt somit viel versprechendes Entwicklungspotenzial im Hinblick auf weitere Anwendungen. In weiterführenden Arbeiten kann z. B. die Entwicklung der MinCE_48 der zweiten Generation für den parallelen Einsatz mehrerer CE-Einheiten einer Disc erweitert werden. Dabei ist die in dieser Arbeit gezeigte identische Trennleistung der Kanäle auf einer CE-Disc besonderes vorteilhaft: man benötigt nur eine CE-Einheit zur Referenzmessung für die restliche 47 Kanäle.

6 Zusammenfassung

Zur Erweiterung der Anwendungen der C4D für die DNA-Analytik wurden in dieser Arbeit Grundlagenuntersuchungen zur elektrischen Leitfähigkeit von DNA-Lösung durchgeführt.

Ein interessantes Phänomen wurde bei der Untersuchung der Ausrichtung von DNA-Molekülen in einem Gleichfeld beobachtet. Die in Messfeldrichtung ausgestreckten DNA-Moleküle führen zu einer deutlich erhöhten Leitfähigkeit als die senkrecht ausgerichteten DNA-Moleküle. Die C4D-Elektroden, die in dieser Arbeit für die bessere Ein- und Auskoppung entlang des Mikrokanals aufgebracht sind, entsprechen somit die optimale Elektrodenanordnung zur hoch empfindlichen Leitfähigkeitsmessung

Des Weiteren gibt das Experiment zu möglichen Molekülbrüchen und Denaturierung durch eine hohe Energiedichte weitere Hinweise auf die Erhöhung elektrolytischer Leitfähigkeit von DNA-Lösung während der CE-Trennung. Denaturierung und Molekülbrüche in der Messzelle erhöhen die Anzahl der Ladungen an den DNA-Molekülen, die zu einer entsprechend erhöhten elektrolytischen Leitfähigkeit führen.

Die dadurch gewonnenen Kenntnisse lieferten somit wichtige Hinweise auf die Modifizierung des Chip- und C4D-Elektrodendesigns sowie die Messbedingungen, wie Trenngel und Puffer, zum Einsatz der CE-C4D in der DNA-Analytik. Zusammen mit den Vorteilen, z. B. kostengünstige Miniaturisierung und Integration in die Mikrosysteme, universelle Einsatzbarkeit sowie einfache Probenvorbereitung, konnten die Ergebnisse ein großes Potenzial von C4D als eine Alternative zur derzeitigen Fluoreszenzdetektion zeigen.

Ergänzend dazu konnte in dieser Arbeit die Messempfindlichkeit der C4D auch durch messtechnische Optimierung verbessert werden. Durch eine Modifizierung der Messelektroden wurde eine fünffache Erhöhung im Signal-Rausch-Verhältnis, das die analytische Nachweisgrenze bestimmt, erzielt.

Ein wichtiger Aspekt in der Analytik sind die quantitative Aussagen. Die Schwierigkeit in der Steuerung und der Mangel der Überwachungsmöglichkeit der Probeninjektion und des Fluidverhaltens führten generell in der miniaturisierten Analytik oft zu quantitativen Messabweichungen. In dieser Arbeit wurde eine simultane Injektionsüberwachung durch die zweite C4D zur quantitative Kalibrierung vorgeschlagen. C4D am Injektionskreuz ermittelt quantitativ die zur Trennung injizierte Probenmenge, die zur Auswertung des Elektropherogramms berücksichtigt wird.

Zum Schluss dieser Arbeit wurde im Rahmen der praxisbezogenen Lab-on-Chip-Entwicklung zur Vor-Ort-Analytik ein kosten- und leistungseffizientes miniaturisiertes Mikrochip-CE-System, die „MinCE_48“ präsentiert. Dabei wurde die Compact Disc (CD) als ein ultimatives mikrofluidisches Chipsubstrat eingesetzt. Mit dieser CE-Disc wurde ein komplett miniaturisiertes Multikanal-Messgerät in Form eines CD-Players konzipiert und realisiert.

Mit der Multikanal-CE-Disc und MinCE_48 konnten erste Messungen durchgeführt werden. Eine Besonderheit ist dabei, dass alle 48 CE-Kanäle auf einer Disc, die unter exakt gleichen Bedingungen hergestellt wurden, eine gute Reproduzierbarkeit zeigten. Das in die MinCE_48 eingeführte Chipmaterial, Cyclo-Olefin-Polymer (COP), ein biokompatibles Hochleistungspolymer, erweitert den Einsatz speziell in der Bioanalytik. Die den Einsatz in der Mikrofluidik einschränkenden hydrophoben Materialeigenschaften konnten durch geeignete Vorbehandlung verbessert werden.

Durch die hohe Effizienz bei der parallelen Herstellung der mikrofluidischen Komponenten im Vergleich mit den herkömmlichen Einkanal-CE-Systemen bietet die MinCE_48 eine realistische Möglichkeit zum kostengünstigen Einwegeinsatz von Polymermikrochips. Ihre einfache und effiziente Bedienung in der Analytik erhöht außerdem den Probendurchsatz.

Die effektive MinCE_48, die neuste Generation der MinCE_ *family* am IMT, zusammen mit den Ergebnisse aus der Grundlagenuntersuchungen und der messtechnischen Optimierung des Messplatzes in dieser Arbeit hat zur Weiterentwicklung des innovativen Lab-on-Chip-Konzepts für praktische Anwendungen einen wichtigen Beitrag geliefert.

Anhang

Verwendete Chemikalien

MES Hydrate	Fluka ¹
L-Histidine	Fluka ¹
Lithiumchlorid	Fluka ¹
Natriumchlorid	Merck ²
Kaliumchlorid	Merck ²
Calciumchlorid	Merck ²

¹Fluka (Neu-Ulm, Deutschland)

²Merck (Darmstadt, Deutschland)

Verwendete Polymere

PMMA (Polymethylmethacrylat)

Chip: Plexiglas® 99530, Degussa AG³

Deckfolie: Plexiglas® 99845, 40 µm dick, Degussa AG³

COP (Cyclo-Olefin-Polymer)

Chip: Zeonex®, Zeon Chemicals⁴

Deckfolie: Zeonor® F-14, 40 µm dick, Zeon Chemicals⁴

PS (Polystyrol)

Chip: Goodfellow ST313120, Goodfellow GmbH⁵

Deckfolie: Goodfellow ST311030 30µm dick, Goodfellow GmbH⁵

PEEK (Polyetheretherketon)

Folie: Lite K, Lipp-Terler⁶

³Degussa AG (Düsseldorf, Deutschland)

⁴Zeon Chemicals (Tokyo, Japan)

⁵Goodfellow GmbH (Bad Nauheim, Deutschland)

⁶Lipp-Terler GmbH (Gafrenz, Österreich)

Abkürzungsverzeichnis

C4D	Kapazitiv gekoppelte kontaktlose Leitfähigkeitsdetektion (engl. <u>C</u> apacitively <u>C</u> oupled <u>C</u> ontactless <u>C</u> onductivity <u>D</u> etection)
CD	Kompaktdisk (engl. <u>C</u> ompact <u>D</u> isc)
CE	Kapillarelektrophorese (engl. <u>C</u> apillary <u>E</u> lectrophoresis)
COP	<u>C</u> ycloolefin- <u>P</u> olymer
CVD	Chemische Gasphasenabscheidung (engl. <u>C</u> hemical <u>V</u> apor <u>D</u> e- position)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <u>D</u> eoxyribonucleic <u>A</u> cid)
EOF	<u>E</u> lektroosmotischer <u>F</u> luss
HF	<u>H</u> ochfrequenz
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (engl. <u>H</u> igh <u>P</u> ressure <u>L</u> i- quid <u>C</u> hromatography)
LIF	<u>L</u> aserinduzierte <u>F</u> luoreszenzdetektion
LOC	Labor auf dem Chip (engl. <u>L</u> ab- <u>o</u> n- <u>C</u> hip)
MinCE	Miniaturisierte CE
PC	<u>P</u> olycarbonat
PECVD	Plasmaunterstützte chemische Gasphasenabscheidung (engl. <u>P</u> lasma <u>E</u> nhanced <u>C</u> hemical <u>V</u> apor <u>D</u> e- position)
PEEK	<u>P</u> olyetheretherketon
PMMA	<u>P</u> olymethylmethacrylat
PS	<u>P</u> olystyrol
PVD	Physikalische Gasphasenabscheidung (engl. <u>P</u> hysical <u>V</u> apor <u>D</u> e- position)
UV	<u>U</u> ltraviolett

Literaturverzeichnis

1. Kricka, L.J., *Revolution on a square centimeter*. Nature Biotechnology, 1998. **16**(6): p. 513-514.
2. Lion, N., et al., *Why the move to microfluidics for protein analysis?* Current Opinion in Biotechnology, 2004. **15**(1): p. 31-37.
3. Manz, A. and J.C.T. Eijkel, *Miniaturization and chip technology. What can we expect?* Pure and Applied Chemistry, 2001. **73**(10): p. 1555-1561.
4. Mitchell, P., *Microfluidics - downsizing large-scale biology*. Nature Biotechnology, 2001. **19**(8): p. 717-721.
5. Service, R.F., *The Incredible Shrinking Laboratory*. Science, 1995. **268**(5207): p. 26-27.
6. Escarpa, A., et al., *Microchips for CE: Breakthroughs in real-world food analysis*. Electrophoresis, 2008. **29**(24): p. 4852-4861.
7. Gardeniers, H. and A. Van den Berg, *Micro- and nanofluidic devices for environmental and biomedical applications*. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 2004. **84**(11): p. 809-819.
8. Wang, J., *Microchip devices for detecting terrorist weapons*. Analytica Chimica Acta, 2004. **507**(1): p. 3-10.
9. Yager, P., G.J. Domingo, and J. Gerdes, *Point-of-care diagnostics for global health*. Annual Review of Biomedical Engineering, 2008. **10**: p. 107-144.
10. Liu, P., et al., *Real-time forensic DNA analysis at a crime scene using a portable microchip analyzer*. Forensic Science International-Genetics, 2008. **2**(4): p. 301-309.
11. Pumera, M., *Trends in analysis of explosives by microchip electrophoresis and conventional CE*. Electrophoresis, 2008. **29**(1): p. 269-273.
12. Liu, W.T. and C. Lay, *Lab-on-a-chip devices for microbial monitoring and detection in water*, in *Sustainable and Safe Water Supplies*, H.H.P. Fang and J.H.W. Lee, Editors. 2007. p. 165-172.

13. Weigl, B.H., R.L. Bardell, and C.R. Cabrera, *Lab-on-a-chip for drug development*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003. **55**(3): p. 349-377.
14. Hwang, W., et al. *Portable on-chip multi-channel capillary electrophoresis system for low-cost high-throughput analysis*, in *3rd Annual Lab-on-a-Chip European Congress*. 2009. Stockholm, Sweden.
15. Guber, A.E., et al., *Microfluidic lab-on-a-chip systems based on polymers - fabrication and application*. *Chemical Engineering Journal*, 2004. **101**(1-3): p. 447-453.
16. Mühlberger, H., et al., *Polymer Lab-on-a-Chip system with electrical detection*. *Sensors Journal*, 2008. **8**(5-6): p. 572-579.
17. Hoffmann, W., et al. *From 'lab-on-chip' to 'chip-in-lab': advanced capillary electrophoresis in chip format for low-cost analysis*. in *61st Pittsburgh Conf.on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy (Pittcon 2010)*. 2010. Orlando, FL.
18. Schierjott, P., et al. *Continuous capillary electrophoresis on chip for the simultaneous detection of cations and anions in gaseous and liquid process flows*. in *61st Pittsburgh Conf.on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy (Pittcon 2010)*. 2010. Orlando, FL.
19. Schierjott, P., *Dissertation: Miniaturisierte Kapillarelektrophorese zur kontinuierlichen Überwachung von Kationen und Anionen in Prozessströmen*. 2010, Fakultät für Maschinenbau, Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
20. Burns, M.A., et al., *An integrated nanoliter DNA analysis device*. *Science*, 1998. **282**(5388): p. 484-487.
21. Chen, G., Y.H. Lin, and J. Wang, *Monitoring environmental pollutants by microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection*. *Talanta*, 2006. **68**(3): p. 497-503.
22. Erickson, D. and D.Q. Li, *Integrated microfluidic devices*. *Analytica Chimica Acta*, 2004. **507**(1): p. 11-26.
23. Figeys, D. and D. Pinto, *Proteomics on a chip: Promising developments*. *Electrophoresis*, 2001. **22**(2): p. 208-216.
24. Jabeen, R., et al., *Capillary electrophoresis and the clinical laboratory*. *Electrophoresis*, 2006. **27**(12): p. 2413-2438.
25. Jakeway, S.C., A.J. de Mello, and E.L. Russell, *Miniaturized total analysis systems for biological analysis*. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 2000. **366**(6-7): p. 525-539.
26. Lion, N., et al., *Microfluidic systems in proteomics*. *Electrophoresis*, 2003. **24**(21): p. 3533-3562.

27. Terry, S.C., *Dissertation: Gas Chromatography System Fabricated on Silicon Wafer Using Integrated Circuit Technology*, in *Department of Electrical Engineering 1975*, Stanford University: Stanford, California.
28. Terry, S.C., Jerman, J. H., Angell, J. B., *A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer*. IEEE Electron Devices, 1979. **26**(12): p. 1880-1886.
29. Harrison, D.J., et al., *Micromachining a Miniaturized Capillary Electrophoresis-Based Chemical-Analysis System on a Chip*. Science, 1993. **261**(5123): p. 895-897.
30. Jacobson, S.C., et al., *High-Speed Separations on a Microchip*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(7): p. 1114-1118.
31. Manz, A., N. Graber, and H.M. Widmer, *Miniaturized Total Chemical-Analysis Systems - a Novel Concept for Chemical Sensing*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1990. **1**(1-6): p. 244-248.
32. Woolley, A.T. and R.A. Mathies, *Ultra-High-Speed DNA-Sequencing Using Capillary Electrophoresis Chips*. Analytical Chemistry, 1995. **67**(20): p. 3676-3680.
33. van den Berg, A. and T.S.J. Lammerink, *Micro total analysis systems: Microfluidic aspects, integration concept and applications*, in *Microsystem Technology in Chemistry and Life Science*. 1998. p. 21-49.
34. Vrouwe, E.X., R. Luttge, and A. van den Berg, *Direct measurement of lithium in whole blood using microchip capillary electrophoresis with integrated conductivity detection*. Electrophoresis, 2004. **25**(10-11): p. 1660-1667.
35. Vrouwe, E.X., et al., *Microchip capillary electrophoresis for point-of-care analysis of lithium*. Clinical Chemistry, 2007. **53**(1): p. 117-123.
36. Tiselius, A., *A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures*. Transaction of the Faraday Society, 1937. **33**: p. 523-531.
37. Mikkers, F.E.P., F.M. Everaerts, and T.P.E.M. Verheggen, *High-Performance Zone Electrophoresis*. J. Chromatogr. A, 1979. **169**: p. 11-20.
38. Jorgenson, J.W. and K.D. Lukacs, *High-Resolution Separations Based on Electrophoresis and Electroosmosis*. Journal of Chromatography, 1981. **218**(1-3): p. 209-216.
39. Jorgenson, J.W. and K.D. Lukacs, *Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries*. Anal. Chem., 1981. **53**: p. 1298-1302.
40. Harrison, D.J., et al., *Capillary Electrophoresis and Sample Injection Systems Integrated on a Planar Glass Chip*. Analytical Chemistry, 1992. **64**(17): p. 1926-1932.

41. Manz, A., et al., *Planar Chips Technology for Miniaturization and Integration of Separation Techniques into Monitoring Systems - Capillary Electrophoresis on a Chip*. Journal of Chromatography, 1992. **593**(1-2): p. 253-258.
42. Escarpa, A., et al., *CE microchips: An opened gate to food analysis*. Electrophoresis, 2007. **28**(6): p. 1002-1011.
43. Fung, Y.S. and K.M. Lau, *Analysis of organic acids and inorganic anions in beverage drinks by capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2003. **24**(18): p. 3224-3232.
44. Kan, C.W., et al., *DNA sequencing and genotyping in miniaturized electrophoresis systems*. Electrophoresis, 2004. **25**(21-22): p. 3564-3588.
45. Li, S.F.Y. and L.J. Kricka, *Clinical analysis by microchip capillary electrophoresis*. Clinical Chemistry, 2006. **52**(1): p. 37-45.
46. Moser, A.C. and D.S. Hage, *Capillary electrophoresis-based immunoassays: Principles and quantitative applications*. Electrophoresis, 2008. **29**(16): p. 3279-3295.
47. Poinot, V., C. Bayle, and F. Couderc, *Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2003. **24**(22-23): p. 4047-4062.
48. Powell, P.R. and A.G. Ewing, *Recent advances in the application of capillary electrophoresis to neuroscience*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005. **382**(3): p. 581-591.
49. Pumera, M., *Analysis of explosives via microchip electrophoresis and conventional capillary electrophoresis: A review*. Electrophoresis, 2006. **27**(1): p. 244-256.
50. Tagliaro, F. and F. Bortolotti, *Recent advances in the applications of CE to forensic sciences (2001-2004)*. Electrophoresis, 2006. **27**(1): p. 231-243.
51. Woods, L.A., T.P. Roddy, and A.G. Ewing, *Capillary electrophoresis of single mammalian cells*. Electrophoresis, 2004. **25**(9): p. 1181-1187.
52. Lee, Y.H., et al., *Laser-Induced Fluorescence Detection of a Single-Molecule in a Capillary*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(23): p. 4142-4149.
53. Wallingford, R.A. and A.G. Ewing, *Capillary Zone Electrophoresis with Electrochemical Detection*. Analytical Chemistry, 1987. **59**(14): p. 1762-1766.
54. Kohlrausch, F., *1. Ueber Konzentrationsverschiebungen durch Electrolyse im Inneren von Lösungen und Lösungegemischen*. Ann. d. Phys. und Chem., 1897. **62**(10): p. 209-239.

55. Baltussen, E., et al., *Considerations on contactless conductivity detection in capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*, 2002. **23**(17): p. 2888-2893.
56. Kuban, P. and P.C. Hauser, *A review of the recent achievements in capacitively coupled contactless conductivity detection*. *Analytica Chimica Acta*, 2008. **607**(1): p. 15-29.
57. Kuban, P. and P.C. Hauser, *Fundamentals of electrochemical detection techniques for CE and MCE*. *Electrophoresis*, 2009. **30**(19): p. 3305-3314.
58. Pumera, M., *Contactless conductivity detection for microfluidics: Designs and applications*. *Talanta*, 2007. **74**(3): p. 358-364.
59. Gaš, B., B. Demjaněnko, and J. Vacík, *High-frequency contactless conductivity detection in isotachopheresis*. *J. Chromatogr.*, 1980. **192**: p. 253-257.
60. da Silva, J.A.F. and C.L. do Lago, *An Oscillometric Detector for Capillary Electrophoresis*. *Anal. Chem.*, 1998. **70**: p. 4339-4343
61. Zemmann, A.J., et al., *Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis*. *Analytical Chemistry*, 1998. **70**(3): p. 563-567.
62. da Silva, J.A.F., N. Guzman, and C.L. do Lago, *Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis - Hardware improvements and optimization of the input-signal amplitude and frequency*. *Journal of Chromatography A*, 2002. **942**(1-2): p. 249-258.
63. Gaš, B., et al., *Optimization of the high-frequency contactless conductivity detector for capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*, 2002. **23**(20): p. 3520-3527.
64. Kuban, P. and P.C. Hauser, *Effects of the cell geometry and operating parameters on the performance of an external contactless conductivity detector for microchip electrophoresis*. *Lab on a Chip*, 2005. **5**(4): p. 407-415.
65. Mühlberger, H., *Dissertation: Mikrofluidische CE-Systeme aus Polymeren mit elektrischer Detektion für Life-Science-Anwendungen*. 2007, Fakultät für Maschinenbau, Universität Karlsruhe (TH).
66. Tanyanyiwa, J., et al., *Improved capacitively coupled conductivity detector for capillary electrophoresis*. *Analyst*, 2002. **127**(2): p. 214-218.
67. Tuma, P., F. Opekar, and K. Stulik, *A contactless conductivity detector for capillary electrophoresis: Effects of the detection cell geometry on the detector performance*. *Electrophoresis*, 2002. **23**(21): p. 3718-3724.
68. Gaš, B., et al., *Optimization of background electrolytes for capillary electrophoresis I. Mathematical and computational model*. *Journal of Chromatography A*, 2001. **905**(1-2): p. 269-279.

69. Jaros, M., et al., *Optimization of background electrolytes for capillary electrophoresis: II. Computer simulation and comparison with experiments*. Electrophoresis, 2002. **23**(16): p. 2667-2677.
70. Baker-Jarvis, J., C. Jones, and B. Riddle, *Electrical properties of Dielectric Relaxation of DNA in Solution*. NIST Technical Note 1509, 1998.
71. Takashima, S., *Dielectric Dispersion of DNA*. Journal of Molecular Biology, 1963. **7**(5): p. 455-467.
72. Takashima, S., *Dielectric Dispersion of Deoxyribonucleic Acid .2*. Journal of Physical Chemistry, 1966. **70**(5): p. 1372-1380.
73. Hanss, M. and J.C. Bernengo, *Dielectric Relaxation and Orientation of DNA Molecules*. Biopolymers, 1973. **12**: p. 2151-2159.
74. Takashim.S, *Electrical Properties of Biopolymers and Membranes*. 1. ed. 1989.
75. Plum, G.E. and V.A. Bloomfield, *Contribution of Asymmetric Ligand-Binding to the Apparent Permanent Dipole-Moment of DNA*. Biopolymers, 1990. **29**(8-9): p. 1137-1146.
76. Sakamoto, M., R. Hayakawa, and Y. Wada, *Dielectric Relaxation of DNA in Aqueous Solutions III: Effects of DNA Concentration, Protein Contamination, and Mixed Solvents*. Biopolymers, 1979. **18**: p. 2769-2782.
77. Sakamoto, M., et al., *Dielectric Relaxation of DNA in Aqueous Solutions*. Biopolymers, 1976. **15**: p. 879-892.
78. Duguid, J.G. and V.A. Bloomfield, *Electrostatic effects on the stability of condensed DNA in the presence of divalent cations*. Biophysical Journal, 1996. **70**(6): p. 2838-2846.
79. McTague, J.P. and J.H. Gibbs, *Electric Polarization of Solutions of Rodlike Polyelectrolytes*. Journal of Chemical Physics, 1966. **44**(11): p. 4295.
80. Sakamoto, M., R. Hayakawa, and Y. Wada, *Dielectric-Relaxation of DNA Solutions 4: Effects of Salts and Dyes*. Biopolymers, 1980. **19**(5): p. 1039-1047.
81. Tung, M.S., et al., *Influence of Temperature and Ionic-Strength on Low-Frequency Dielectric-Dispersion of DNA Solutions*. Biopolymers, 1977. **16**(12): p. 2653-2669.
82. Hecke, M. and W.K. Schomburg, *Review on micro molding of thermoplastic polymers*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2004. **14**(3): p. R1-R14.
83. Becker, H. and C. Gärtner, *Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **390**(1): p. 89-111.

84. Becker, H. and L.E. Locascio, *Polymer microfluidic devices*. Talanta, 2002. **56**(2): p. 267-287.
85. Bier, W., et al. *Alternative Methoden der Siliziumbearbeitung: Plasmaloses Ätzen mit halogenhaltigen Gasen. Mikrostrukturierung mit Diamantwerkzeugen*. in *Gerätetechnik und Mikrosystemtechnik : Kongress*. 1992. Chemnitz.
86. Hwang, W., *Diplomarbeit: Untersuchung von Material- und Geometrieinflüssen auf die Performance von CE-Separationen in mikrofluidischen Lab-on-a-Chip-Systemen*. 2006, Fakultät für Maschinenbau, Universität Karlsruhe (TH).
87. Hwang, W., et al., *Polyether ether ketone microstructures for chemical analytics*. *Microsystem Technologies-Micro-and Nanosystems-Information Storage and Processing Systems*, 2008. **14**(9-11): p. 1699-1700.
88. Petrova, L., *Diplomarbeit: Entwicklung einer effektiven Verbindungstechnik zum Bonden von mikrostrukturierten Kunststoffplatten*. 2004, Fakultät für Maschinenbau, Universität Karlsruhe (TH).
89. Pfleging, W., et al., *Laser patterning and packaging of CCD-CE-Chips made of PMMA*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2009. **138**(1): p. 336-343.
90. Cho, Y.K., et al., *One-step pathogen specific DNA extraction from whole blood on a centrifugal microfluidic device*. *Lab on a Chip*, 2007. **7**(5): p. 565-573.
91. Ducree, J., et al., *The centrifugal microfluidic bio-disk platform*. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2007. **17**(7): p. 103-115.
92. Kido, H., et al., *A novel, compact disk-like centrifugal microfluidics system for cell lysis and sample homogenization*. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2007. **58**(1): p. 44-51.
93. Madou, M., et al., *Lab on a CD*. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2006. **8**: p. 601-628.
94. Shin, J.Y., et al., *Chemical structure and physical properties of cyclic olefin copolymers - (IUPAC technical report)*. *Pure and Applied Chemistry*, 2005. **77**(5): p. 801-814.