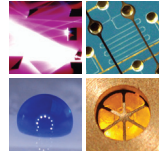


SCHRIFTEN DES INSTITUTS FÜR MIKROSTRUKTURTECHNIK
AM KARLSRUHER INSTITUT FÜR TECHNOLOGIE (KIT)



Band 31

SEOUNG-EUN KIM

Konzeption und prototypische Fertigung einer
nicht-invasiven mikrofluidischen Plattform für
die Elektrophysiologie (NIMEP) zur Zellenanalyse

Seoung-Eun Kim

Konzeption und prototypische Fertigung einer nicht-invasiven mikrofluidischen Plattform für die Elektrophysiologie (NIMEP) zur Zellenanalyse

Schriften des Instituts für Mikrostrukturtechnik
am Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Band 31

Hrsg. Institut für Mikrostrukturtechnik

Eine Übersicht aller bisher in dieser Schriftenreihe
erschienenen Bände finden Sie am Ende des Buchs.

Konzeption und prototypische Fertigung einer nicht-invasiven mikrofluidischen Plattform für die Elektrophysiologie (NIMEP) zur Zellenanalyse

von
Seoung-Eun Kim

Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Fakultät für Maschinenbau

Tag der mündlichen Prüfung: 05. Dezember 2014

Hauptreferent: Prof. Dr. Andreas E. Guber (KIT)

Korreferenten: Prof. Dr. Volker Saile (KIT)

Prof. Dr. Bernhard Wolf (TU-München)

Impressum



Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
KIT Scientific Publishing
Straße am Forum 2
D-76131 Karlsruhe

KIT Scientific Publishing is a registered trademark of Karlsruhe
Institute of Technology. Reprint using the book cover is not allowed.

www.ksp.kit.edu



*This document – excluding the cover – is licensed under the
Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 DE License
(CC BY-SA 3.0 DE): <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/de/>*



*The cover page is licensed under the Creative Commons
Attribution-No Derivatives 3.0 DE License (CC BY-ND 3.0 DE):
<http://creativecommons.org/licenses/by-nd/3.0/de/>*

Print on Demand 2015

ISSN 1869-5183

ISBN 978-3-7315-0378-1

DOI 10.5445/KSP/1000046877

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT)

Konzeption und prototypische Fertigung einer nicht-invasiven mikrofluidischen Plattform für die Elektrophysiologie (NIMEP) zur Zellenanalyse

Zur Erlang des akademischen Grades eines

Doktors der Ingenieurwissenschaften

an der Fakultät für Maschinenbau des
Karlsruher Instituts für Technologie

genehmigte

Dissertation

von

Dipl.-Ing. Seoung-Eun Kim

Tag der mündlichen Prüfung: 05. Dezember 2014

Hauptreferent: Prof. Dr. Andreas E. Guber (KIT)
Korreferenten: Prof. Dr. Volker Saile (KIT)
Prof. Dr. Bernhard Wolf (TU-München)

Danksagung

Mit der Fertigstellung meiner Dissertation ist es an der Zeit, denjenigen zu danken, die mich begleitet und unterstützt haben.

Zunächst danke ich meinem Gott, der mich den richtigen Weg führt und mein Gebet hört.

Mein großer Dank geht an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Andreas E. Guber, der diese Arbeit vorgeschlagen hat und als mein wissenschaftliches Vorbild mich auf meinem Weg begleitet hat. Der gleiche Dank gilt Herrn Prof. Dr. Volker Saile, der mich in jeder Schwierigkeit unterstützt und ermutigt hat. Bei Prof. Dr. Bernhard Wolf bedanke ich mich sehr dafür, dass er gerne das Korreferat übernommen hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Lars Wegner, der dieses Projekt geplant hat und sich um die Vorbereitung der Protoplasten sowie die Durchführung der biologischen Experimente kümmerte. Für seine freundliche und stetige Unterstützung möchte ich ihm an dieser Stelle herzlich danken. Ebenso gilt mein großer Dank Dr. Ralf Ahrens. Ohne seine stetige Betreuung und sein offenes Ohr für Fragen hätte ich diese Dissertation nicht fertigstellen können. Für die freundliche und vielfältige Unterstützung möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Mikrostrukturtechnik herzlich bedanken. Besonders danke ich Herrn PD Dr. Matthias Worgull und Herrn Marc Schneider für die Unterstützung beim Heißprägen sowie Frau Alexandra Moritz und Herrn Andre Wolfschläger für die Fertigung der prototypischen Chipteile.

Bei meinen lieben Eltern, meinem Vater Youngsun Kim und meiner Mutter Sungjo Kim, vor denen ich sehr großen Respekt habe, bedanke ich mich für Ihren großen Glauben an mich und Ihr Gebet für mich. Ebenso gilt mein Dank meiner lieben Schwester Yoori Kim, die mir das Leben und das Studium in

Danksagung

Deutschland ermöglicht hat und mit mir gemeinsam gute und schlechte Zeiten in Deutschland durchgemacht hat. Meiner Großmutter Bonggu Kim, die tagtäglich für mich betet und mich segnet, danke ich von ganzem Herzen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei vielen anderen herzlich bedanken, die immer an mich geglaubt und mich immer wieder aufgemuntert haben.

Zuletzt danke ich noch einmal meinem Gott, der mir als Wegweiser stets zur Seite steht.

Kurzfassung

Die Zelle, die kleinsten lebenden Einheiten, kommunizieren mit den benachbarten Zellen und mit ihrer Umgebung durch die elektrische Signalübertragung und den Stoffwechsel. Für diese Kommunikation spielen die Ionenkanäle, die in der die Zelle umgebende Plasmamembran eingelagert sind, eine hauptsächliche Rolle. Daher haben die Analyse der durch Ionenkanäle stattfindenden Kommunikationsmechanismen und ferner die Forschung für die Einflussfaktoren auf diese Mechanismen eine große Bedeutung bei der pharmakologischen und medizinischen Forschung und Diagnostik.

Das bisher für die Untersuchung der Ionenkanäle verwendete konventionelle Standard-Messverfahren ist die Patch-Clamp-Technik. Zwar kann durch diese Messtechnik die präzise Untersuchung der durch Ionenkanäle stattfindenden Kommunikationsmechanismen ermöglicht werden, aber sie hat einige unerwünschte Nachteile bei der Messung wie z.B. die lokale Zerstörung der Plasmamembran, eine geringe Erfolgsquote und eine aufwendige Versuchsdurchführung. Um diese Nachteile zu vermeiden, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine mikrofluidische Chipplatte auf Polymerbasis entwickelt. Diese Plattform wurde so konzipiert, dass man einzelne Zellen in der Plattform auswählen und im intakten Zustand analysieren kann. Zu diesem Zweck besitzt die Plattform die drei Hauptfunktionen, Zellsortierung, Zellfixierung und Wirkstoffaustausch. Die Zellsortierung wurde durch eine Kreuzkanalstruktur, die Zellfixierung durch eine konische Kanalstruktur und die Wirkstoffaustauschfunktion durch ein dreischichtiges mikrofluidisches Konzept realisiert. Außerdem kann man die in dieser Plattform untersuchte Zelle für andere Anwendungen weiter verwenden, da die Zelle vor und nach der Untersuchung im intakten Zustand bleibt. Die entwickelte Plattform ist für eine spätere Massenproduktion durch Standard-Abformverfahren geeignet. Eine Auto-

matisierung der kompletten Messvorgänge wie z.B. der Manipulierung der Zellposition und die Messung der elektrischen Signale, die durch Ionenkanäle übermittelt werden, kann in der Zukunft ermöglicht werden.

Zur Untersuchung der elektrischen Signalübertragung der Ionenkanäle wurde die Zelle in der Chipplatte durch eine angelegte Spannung polarisiert und die daraus resultierende Aufladung der Membran erzeugt einen transzellulären Summenstrom, der auf Ionen transport über die Zellmembran, vor allem durch Ionenkanäle, zurückgeht. Zur Messung dieser elektrischen Signalwerte wurde der spannungssensitive Membranfarbstoff ANNINE-6 verwendet. Mit Hilfe dieses Farbstoffes kann man die Intensitätswerte, die aus der gefärbten aufgeladenen Zellmembran emittiert werden, in Abhängigkeit von Membranpotentialwerten fluoreszenzoptisch messen. Aus diesen Messdaten konnten Strom-Spannungskurven erstellt werden, indem der transzelluläre Strom gegen das fluoreszenzoptisch gemessene Membranpotential aufgetragen wurde.

Abstract

The cell, the smallest living unit, communicates with its neighbor cells and its environment through electrical signal transfer and metabolism. For this communication the ion channels that are embedded in the surrounding plasma membrane play a major role. Therefore, the analysis of communication mechanisms that takes place through ion channels and further research on the factors influencing these mechanisms have great significance in the pharmacological and medical research and diagnostics.

The conventional standard measurement technique, which is so far most widely used for the study of ion channels, is the patch clamp technique. While this measurement technique allows the precise investigation of the communication taking place through ion channels, it has some undesirable drawbacks in the measurement such as the local destruction of the plasma membrane, a low success rate and an elaborate implementation of the measurement. To avoid these drawbacks, in the context of this work a microfluidic chip plate out of polymer was developed. This platform was designed so that an individual cell can be selected and analyzed in the intact state. For this purpose, the platform has three main functions, a cell sorting, a cell fixation and a solvent exchange function. Cell sorting was achieved through a cross-channel structure, cell fixation through a conical channel structure and solvent exchange function through a three layered microfluidic concept. In addition, the investigated cell can be used for other applications, since the cell is before and after the test in the intact state. The design of the platform also allows a mass production by standard replication techniques. A complete automation measurement of the processes such as manipulating the cell position and measurement of the electrical signals which are transmitted by ion channels seems to be possible.

Abstract

To investigate the electrical signal transmission of the ion channels, the cell was polarized in the chip plate by an applied voltage and the resulting charging of the membrane produces a transcellular total current caused due to ion transport through the cell membrane, in particular by ion channels. To measure these electrical signal values, a voltage-sensitive membrane dye ANNINE-6 was used. Using this dye the intensity values, which are emitted from the colored charged cell membrane, can be measured fluorescence optically depending on the membrane potential. Based on these measurement data, the current-voltage curves were created by plotting the transcellular current against the fluorescence optically measured membrane potential.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	IX
Abbildungsverzeichnis.....	XI
Abkürzungsverzeichnis.....	XVII
1 Einleitung.....	1
1.1 Motivation.....	1
1.2 Zielsetzung.....	2
1.3 Stand der Technik.....	3
1.4 Gliederung der Arbeit.....	7
2 Physiologische und biologische Grundlagen.....	9
2.1 Aufbau der Pflanzenzelle.....	9
2.2 Struktur der Zellmembran und Membranproteine.....	11
2.3 Struktur und Funktionsprinzip der Ionenkanäle.....	14
2.4 Ionenfluss durch Potentialdifferenz.....	17
2.5 Messung der Aktivität der Ionenkanäle mit Hilfe der Patch-Clamp- Technik.....	20
2.6 Spannungssensitiver Fluoreszenzfarbstoff ANNINE-6.....	23
3 Technische Grundlagen.....	25
3.1 Mikrofluidik.....	25
3.2 Strömungstechnische Grundlagen.....	26
3.2.1 Fluidische Kennzahlen.....	26
3.2.2 Strömungsprofile.....	28
3.2.3 Stofftransport: Diffusion und Konvektion.....	31
3.3 Mikrofertigungstechnik.....	32
3.3.1 Mikrofräsen.....	33
3.3.2 Mikrofunkenerosion (μ EDM).....	35
3.3.3 Lasermikrobearbeitung.....	37
3.3.4 Heißprägen.....	39
3.4 Verbindungstechnik.....	41
3.4.1 Thermobonden.....	41
3.4.2 Klebverfahren.....	43

3.5	Optische Untersuchungsmethoden.....	45
3.5.1	Rasterelektronenmikroskop (REM).....	45
3.5.2	Fluoreszenzmikroskopie	46
4	Konzept für das NIMEP-System und Vorbereitung der Zellenanalyse.....	49
4.1	Konzept und Idee	49
4.2	Erprobung der einzelnen Komponenten	51
4.2.1	Herstellung des Zellsortierteils	51
4.2.2	Herstellung des Zellfixierteils durch Replikationstechnik	54
4.2.3	Herstellung eines integrierten Ventilsystems	68
4.2.4	Fazit.....	74
4.3	Vorbereitung der Zellenanalyse.....	76
4.3.1	Modellorganismen	76
4.3.2	Herstellung von Protoplasten.....	77
4.3.3	Anfärben der Protoplasten mit ANNINE-6	81
4.3.4	Membranpotentialmessung der Protoplasten.....	82
5	Konzept für das NIMEP-Gesamtsystem und experimentelle Ergebnisse	87
5.1	Aufbau des NIMEP-Gesamtsystems.....	87
5.1.1	Konzept für das Gesamtsystem.....	87
5.1.2	Entwicklung des Zellfixier- und Medienaustauschsystems.....	90
5.1.3	Herstellung des Systems	97
5.1.4	Überprüfung der Funktionstüchtigkeit	109
5.1.5	Fazit des Aufbaus des NIMEP-Gesamtsystems	118
5.2	Optimierung des NIMEP-Gesamtsystems	119
5.2.1	Verbesserungen am vorgestellten Gesamtsystem.....	119
5.2.2	Herstellung des kompletten Testsystems	120
5.2.3	Aufbau und Herstellung des optimierten NIMEP-Gesamtsystems.....	129
5.2.4	Experiment mit den Protoplasten.....	132
5.2.5	Fazit der Optimierung des NIMEP-Gesamtsystems.....	138
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	141
	Literaturverzeichnis.....	147
	Anhang 1: Drucktabelle für Thermobonden.....	155

Anhang 2: Formplatte NIMEP	156
Anhang 3: Stift mit der Länge von 2 mm	157
Anhang 4: Stift mit der Länge von 4 mm	158
Anhang 5: Konuskanal mit dem aufgeweiteten Übergang	159
Anhang 6: Untere Halbschale des Konusteils.....	160
Anhang 7: Obere Halbschale des Konusteils.....	161
Anhang 8: Unterteil des erweiterten Zellsortiersystems	162
Anhang 9: Oberteil des erweiterten Zellsortiersystems	163
Anhang 10: Untere Abfuhrkanalplatte	164
Anhang 11: Obere Zufuhrkanalplatte	165
Anhang 12: Obere Halterung aus PMMA.....	166
Anhang 13: Untere Halterung aus PMMA.....	167
Anhang 14: Unterteil des NIMEP-Chips	168
Anhang 15: Oberteil des NIMEP-Chips	169
Anhang 16: Obere Halterung aus PMMA.....	170
Anhang 17: Untere Halterung aus Aluminium.....	171

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1:	Basisdurchmesser in Abhängigkeit von der Stiftlänge.....	59
Tabelle 4.2:	Zusammensetzung der Protoplastierlösung und Waschlösung; Gewichtsangaben bezogen auf 100 ml	78
Tabelle 4.3:	Modifizierte Zusammensetzung der Albach-Lösung I / II / III; Gewichtsangaben bezogen auf 100 ml	79
Tabelle 4.4:	Zusammensetzung der „W5“-Lösung und des 16 mS-Puffer; Gewichtsangaben bezogen auf 100 ml	80
Tabelle 5.1:	Mechanische und thermische Eigenschaft von COC 6013	92
Tabelle 5.2:	Bondparameter der Chipteile	107
Tabelle 5.3:	Dichte des gemischten Lösungsmittels in Abhängigkeit des Anteils von Glycerin und Wasser.....	110
Tabelle 5.4:	Technische Daten des verwendeten Fräasers	122
Tabelle 5.5:	Ergebnisse der maximalen Dauer des beidseitigen Medienaustausches	129
Tabelle 5.6:	Bondparameter der neu gefertigten Chipteile.....	129

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Schematische Darstellung des neuen Messprinzips in einem mikrofluidischen System	3
Abbildung 1.2:	Unterschied der Messsituation zwischen der herkömmlichen Patch-Clamp-Technik und dem Planar Patch Clamp System	4
Abbildung 1.3:	Porenstruktur in der Planar Patch Clamp Technik und das komplette PPC-System mit kapillaren Anschlüssen	5
Abbildung 1.4:	Zwei unterschiedliche Öffnungsgeometrien.....	6
Abbildung 1.5:	Automatisiertes HTS-System und die in diesem HTS-System einsetzbare Plattform von der Firma Nanion Technologies GmbH.....	7
Abbildung 2.1:	Verbindungsstruktur zwischen den Pflanzenzellen.....	9
Abbildung 2.2:	Struktur und Bestandteile der Pflanzenzelle.....	10
Abbildung 2.3:	Struktur eines Phospholipidmoleküls	11
Abbildung 2.4:	Membranstruktur nach Singer und Nicholson (Flüssig-Mosaik-Modell).....	12
Abbildung 2.5:	Periphere und integrale Proteine.....	13
Abbildung 2.6:	Drei Transmembranproteine in Abhängigkeit von ihrer Transportart	13
Abbildung 2.7:	Unterschiedlicher Schaltmechanismus der Ionenkanäle durch verschiedene Stimulationsarten: Spannungsregulierte, ligandenregulierte und stress- oder druckaktivierte Ionenkanäle	15
Abbildung 2.8:	Spannungsabhängige K ⁺ -Ionenkanalstruktur und Schaltmechanismus bei einer Spannungsänderung	16
Abbildung 2.9:	Unterschiedliche Zustände des Ionenflusses unter dem Potentialunterschied zwischen Membran- und Ruhepotential	19
Abbildung 2.10:	Schematische Darstellung der Patch-Clamp-Messung und mikroskopische Aufnahme der mit einer	

	Glaspipette kontaktierten Pflanzenzelle bei der Patch-Clamp-Messung.....	21
Abbildung 2.11:	Einzelne Konfigurationen bei Patch-Clamp-Technik ..	22
Abbildung 2.12:	Einlagerung von ANNINE-6 in Lipiddoppelschicht und die Molekülstruktur	24
Abbildung 3.1:	Geschwindigkeitsprofil der <i>Hagen-Poiseuille-Rohrströmung</i>	29
Abbildung 3.2:	Geschwindigkeitsprofil der <i>Hagen-Poiseuille-Kanalströmung</i>	31
Abbildung 3.3:	Unterschiedliche Arten der Fräsbearbeitung	33
Abbildung 3.4:	REM-Bilder der durch die Fräsbearbeitung entstehenden Frässpuren und Grate von Mikrobauteilen.....	35
Abbildung 3.5:	Abtragungsvorgänge der Mikrofunkenerosion.....	36
Abbildung 3.6:	Lasermikrobearbeitungsanlage <i>microPULSE ps355</i> der 3D-Micromac AG.....	38
Abbildung 3.7:	Schematischer Prozessablauf des Heißprägevorgangs.	40
Abbildung 3.8:	Schematischer Aufbau beim Thermobonden	42
Abbildung 3.9:	Reaktionsprinzip der photoinitiert polymerisierenden Thiol-ene	44
Abbildung 3.10:	Prinzipskizze des REM-Verfahrens.....	46
Abbildung 3.11:	Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops	47
Abbildung 3.12:	Fluoreszenzmikroskop und Lichtquelle.....	48
Abbildung 4.1:	Schematische Darstellung der Funktion der mikrofluidischen Plattform	50
Abbildung 4.2:	Kreuzstück aus PMMA mit gebohrten Kanälen.....	52
Abbildung 4.3:	Gefertigtes Kreuzstück und Versatz in der Mitte des Kreuzkanals	53
Abbildung 4.4:	Querschnitt des fluidischen Anschlusses.....	54
Abbildung 4.5:	Formeinsetzkonzept mit zentraler Bohrung zur Aufnahme des Einsatz-Stiftes.....	55
Abbildung 4.6:	REM-Aufnahmen von einem gefertigten Einsatz-Stift	56
Abbildung 4.7:	Blende mit zentraler 15 x 15 mm ² großer Öffnung.....	56

Abbildung 4.8:	Mikroskopaufnahmen der abgeformten konischen Strukturen.....	57
Abbildung 4.9:	Biegung der einseitig eingespannten kegelförmigen Struktur	58
Abbildung 4.10:	Grafische Darstellung der Verbiegung des Messingstifts	60
Abbildung 4.11:	Grafische Darstellung der Verbiegung des Stahlstifts..	60
Abbildung 4.12:	REM-Aufnahmen eines Messingstifts.....	62
Abbildung 4.13:	REM-Aufnahmen eines Hartmetallstifts	63
Abbildung 4.14:	Schematischer Prozessablauf des Gießvorgangs.....	64
Abbildung 4.15:	Montiertes Gießwerkzeug (links) und Arbeitsplatz für den Gießprozess	65
Abbildung 4.16:	Prozessablauf eines Gießvorgangs	66
Abbildung 4.17:	Mikroskopische Aufnahmen der mit einem Messingstift hergestellten konischen Kanalstruktur.....	67
Abbildung 4.18:	Mikroskopische Aufnahmen der mit einem Hartmetallstift hergestellten konischen Kanalstruktur	67
Abbildung 4.19:	Konzept des Silikonventils	68
Abbildung 4.20:	Ventilsimulation in Abhängigkeit der Foliendicke	70
Abbildung 4.21:	Darstellung der Halterung zur fluidischen Kontaktierung und gebondeter Prototyp.....	71
Abbildung 4.22:	Zusammengebauter Prototyp	71
Abbildung 4.23:	Schaltbild für den Versuch der Ventilfunktion	72
Abbildung 4.24:	Strömungsverlauf bei geschlossenem bzw. geöffnetem Silikonventil	73
Abbildung 4.25:	Nachbearbeitung des durch Gießverfahren hergestellten Bauteils.....	75
Abbildung 4.26:	Protoplastenband zwischen Albach-Lösung II und III	80
Abbildung 4.27:	Zellkultur und die Protoplasten der Modellorganismen	81
Abbildung 4.28:	Fluoreszenzbilder der mit ANNINE-6 gefärbten Protoplasten	82
Abbildung 4.29:	Messung der Fluoreszenzintensität der mit ANNINE-6 gefärbten Protoplasten der Zelllinie	

	VBI-0 bei Anregungswellenlängen von 390 nm (30 ms) und 475 nm (60 ms) sowie die Zusammensetzung der Lösung in Pipette und Bad	84
Abbildung 4.30:	Vergleich der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Belichtungszeit	85
Abbildung 4.31:	Kalibrierungskurven und Standardabweichung von unterschiedlichen VBI-0-Protoplasten	86
Abbildung 5.1:	Zweidimensionale Darstellung des Gesamtsystems.....	88
Abbildung 5.2:	Dreidimensionale Darstellung des geänderten Konzepts und des zusammengebauten Systems.....	89
Abbildung 5.3:	Funktionsweise des Medien austauschsystems	91
Abbildung 5.4:	Zusammenbau der beiden Kanalplatten mit der dünnen Trennwand	91
Abbildung 5.5:	Erste Variante für den Medien austausch	92
Abbildung 5.6:	Zweite Variante für den Medien austausch	93
Abbildung 5.7:	Dreidimensionale Darstellung der zweiten Variante....	94
Abbildung 5.8:	Simulationsergebnis für den Zelleintrittsbereich der ersten Variante	95
Abbildung 5.9:	Simulationsergebnis für den Zelleintrittsbereich der zweiten Variante	96
Abbildung 5.10:	Simulationsergebnis an der Spitze der konischen Kanalstruktur	96
Abbildung 5.11:	Unterteil des erweiterten Zellsortiersystems mit Abfuhrkanal	98
Abbildung 5.12:	Oberteil des erweiterten Zellsortiersystems mit Zufuhrkanal.....	98
Abbildung 5.13:	Untere Abfuhrkanalplatte des Auslaufsystems	99
Abbildung 5.14:	Obere Zufuhrkanalplatte des Auslaufsystems	99
Abbildung 5.15:	Positionierung des Zellfixierteils mit anderen Teilkomponenten	100
Abbildung 5.16:	Untere Halterung mit der Öffnung	101
Abbildung 5.17:	Obere Halterung mit 2 Öffnungen zur Vermeidung von Autofluoreszenz im Beleuchtungsstrahlengang ..	101

Abbildung 5.18: Messsituation im Zusammenhang von Halterung und Objektiv vom Mikroskop.....	102
Abbildung 5.19: Kontaktprinzip zwischen dem Federkontaktstift und der im oberen Chipteil geklebten Elektrode	103
Abbildung 5.20: REM-Bilder vom Kreuzkanalbereich der gefertigten Chipteile.....	103
Abbildung 5.21: REM-Bilder vom Oberteil des Konusteils mit Trennfolienstelle und Bohrung für Justierstift	105
Abbildung 5.22: REM-Bilder vom Unterteil des Konusteils mit Klebkammer und Justierstift.....	106
Abbildung 5.23: Zusammengebautes Testsystem.....	108
Abbildung 5.24: Verkippungsproblem beim Zusammenbau des gegossenen Konusbauteils mit anderen Teilkomponenten	109
Abbildung 5.25: Partikeltransport zum Kreuzungspunkt des Zellsortiersystems	112
Abbildung 5.26: Positionierung der Partikel in der Mitte des Kreuzkanals	113
Abbildung 5.27: Fixierte Partikel in der konischen Kanalstruktur.....	114
Abbildung 5.28: Spalt bei der Verbindungsstelle zwischen den beiden Hälften der konischen Chipteils.....	116
Abbildung 5.29: Querschnitt der Verbindungsstelle beider Chipteile im Konusbereich.....	117
Abbildung 5.30: Unterschiedliche Frässpuren im Konusbereich	117
Abbildung 5.31: Schematische Darstellung des neu entwickelten und miniaturisierten Testsystems	121
Abbildung 5.32: Verwendeter Fräser mit einem Radius von 10 μm	122
Abbildung 5.33: Mikroskopische Aufnahme des reduzierten Spitzendurchmessers der konischen Kanalstruktur mit der glatten Oberfläche durch die Auswahl der geeigneten Frässtrategie.....	122
Abbildung 5.34: REM-Bilder vom oberen Chipteil	123
Abbildung 5.35: REM-Bilder vom Spitzenbereich des Konuskanals ...	124
Abbildung 5.36: REM-Bilder vom unteren Chipteil	124

Abbildung 5.37: Bisheriger Zustand für den Medienaustausch	125
Abbildung 5.38: Neuer Zustand für den Medienaustausch	125
Abbildung 5.39: Simulationsergebnis für den Zelleintrittsbereich vor der Zellverformung.....	126
Abbildung 5.40: Simulationsergebnis für den Zelleintrittsbereich nach der Zellverformung	127
Abbildung 5.41: Simulationsergebnis für die Auslaufseite vor der Zellverformung	127
Abbildung 5.42: Simulationsergebnis für die Auslaufseite nach der Zellverformung	128
Abbildung 5.43: Vergleich der gebondeten Chipteile	130
Abbildung 5.44: Komplettes Testsystem im Justiertisch des Messmikroskops	131
Abbildung 5.45: Diagramm der Referenzwiderstandsmessung	132
Abbildung 5.46: Gesamtes Schaltbild für das Experiment.....	133
Abbildung 5.47: Auswahl eines Protoplasten im Kreuzkanalbereich ...	134
Abbildung 5.48: Fixierter Protoplast und seine Verformung in der konischen Kanalstruktur	135
Abbildung 5.49: Diagramm der Abdichtwiderstandsmessung.....	136
Abbildung 5.50: Lichtmikroskopisches Bild und Fluoreszenzbild des in der konischen Kanalstruktur fixierten Protoplasten	137

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ANNINE-6	ANellated hemicyaNINE
ATP	Adenosintriphosphat
BioMEMS	Biomedical Microelectromechanical Systems
COC	Cyclic Olefin Copolymer
HTS	High-Throughput-Screening
KORC	K^+ outward rectifying conductance
LoC	Lab-on-a-Chip
μ EDM	Mikrofunkenerosion (engl.: Micro Electro Discharge Machining)
μ TAS	Micro Total Analysis Systems
Nd:YAG	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat
NIMEP	Nicht-Invasiven Mikrofluidische Plattform für Elektrophysiologie
NOA	Norland Optical Adhesive
<i>Pe</i>	Peclet-Zahl
PMMA	Polymethylmethacrylat
POCT	Point-of-Care-Testing
PPC	Planar Patch Clamp
<i>Re</i>	Reynolds-Zahl
RE	Rückstreuelektronen
REM	Rasterelektronenmikroskopie
SE	Sekundärelektronen
SEM	Scanning Electron Microscopy

1 Einleitung

1.1 Motivation

Alle Lebewesen sind aus Zellen aufgebaut. Zellen sind die kleinsten lebenden Einheiten. Jede Zelle ist durch eine Membran von der Umgebung getrennt. In der äußeren Zellmembran bzw. Plasmamembran fast aller Zelltypen eines Organismus sind porenbildende Proteine, sog. Ionenkanäle, eingelagert, die eine entscheidende Rolle bei der elektrischen Signalübertragung und dem Stoffwechsel zwischen Zellen und mit ihrer Umgebung spielen [1, 2, 3]. Die präzise Vermessung der Aktivität von Ionenkanälen in der Plasmamembran von Zellen und ihre gezielte Beeinflussung durch (neue) Wirkstoffe ist daher von elementarer Bedeutung für die pharmakologische Forschung und Diagnostik wie zum Beispiel für die Züchtungsforschung und für die Phytopathologie [4, 5]. Für die genannten Anwendungen sind elektrophysiologische Messtechniken zur Dokumentation der spannungsabhängigen Membranfähigkeit am besten geeignet. Hierzu wird zum Beispiel vor und nach Applikation einer Substanz die Strom-Spannungskennlinie der Zelle aufgezeichnet. Es besteht daher ein großes Interesse an hocheffizienten Techniken zur schnellen und exakten Vermessung der Strom-Spannungskennlinie diagnostisch relevanter Zellen sowie von Zellen, die als Expressionssystem für Ionenkanäle eingesetzt werden. Ein besonderer Nachholbedarf im Hinblick auf die Zugänglichkeit für elektrophysiologische Messtechnik besteht bei pflanzlichen Zellen [6].

Die am häufigsten verwendete elektrophysiologische Standard-Messtechnik ist die sog. Patch-Clamp-Technik, bei der eine dünne präparierte Glaspipette dicht an die Zellmembran angesetzt und durch Anlegen von Unterdruck am Ende der Pipette die Membran geöffnet wird (siehe Kap. 2.5), um einen elektrischen Zugang zum Zellinneren zu ermöglichen. Ein Nachteil dieses

Verfahrens besteht darin, dass durch diese lokale Zerstörung der Zelle bzw. invasive Erzeugung des Untersuchungszustandes sich die Zelle physiologisch anders als intakte Zellen verhalten kann. Außerdem erfordert die Durchführung der Untersuchung mit dieser Technik einen erfahrenen und geschickten Experimentator, die Erfolgsquote der Patch-Clamp-Messungen bleibt meist sehr gering und die Daten können nur mit einem sehr hohen zeitlichen, personellen und technischen Aufwand erhoben werden.

Aus diesem Grund wird der Bedarf an einem neuen Ansatz und Entwicklung einer nicht-invasiven Technik erkannt, die die oben genannten Nachteile der herkömmlichen Patch-Clamp-Technik umgeht und die bei der Patch-Clamp-Technik durchgeführten elektrophysiologischen Untersuchungen im intakten Zellzustand ermöglicht.

1.2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Weiterentwicklung der herkömmlichen Patch-Clamp-Technik. Dazu soll eine neue nicht-invasive mikrofluidische Plattform für die elektrophysiologische Forschung (NIMEP) im Hinblick auf die Aktivität der Ionenkanäle entwickelt werden. Beim herkömmlichen Ansatz wird die Aktivität von Ionenkanälen in der Plasmamembran von Zellen vor und nach ihrer gezielten Beeinflussung durch Wirkstoffe invasiv vermessen, wozu die Zellwand der Zellen entfernt wird. Der neuartige Ansatz beruht auf der nicht-invasiven Messung des Summenstroms über die Zellmembran.

Zu diesem Zweck sollen über ein Zellsortiersystem einzelne Zellen ausgewählt werden, die dann wie bei der Patch-Clamp-Technik separat analysiert und untersucht werden sollen. Die ausgewählte Zelle soll dann in einen konischen Kanal (Zellfixierteil) eingeschleust werden, der so bemessen wird, dass die Zelle im Verlauf des immer enger werdenden Kanals fixiert wird und diesen vollständig abdichtet. Nach der Zellfixierung wird durch

zwei Ag/AgCl-Elektroden, die beidseits des Kanals angebracht sind, ein elektrisches Feld an die Zelle angelegt, wodurch die Membranspannung gegenüber dem Ruhepotential ausgelenkt wird. Es kommt zu einem elektrischen Potentialaufbau mit entgegengesetztem Vorzeichen an beiden Polen der Zelle, der mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung fluorezenzoptisch gemessen werden kann. Hierzu soll die Zellmembran zuvor mit einem spannungssensitiven Membranfarbstoff wie z. B. ANNINE-6 dotiert werden [7]. Der durch das elektrische Feld erzeugte transzelluläre Summenstrom soll durch elektrophysiologische Standard-Messtechnik erfasst werden. Aus der Potentialverteilung in beiden Hemisphären der Zelle und aus dem Summenstrom soll die Strom-Spannungskurve der Zelle nach einem mathematischen Verfahren rekonstruiert werden, wenn die angelegte Feldstärke in aufeinander folgenden Pulsen variiert wird. Des Weiteren ist der Aufbau so zu gestalten, dass ein Lösungsaustausch in Zellenähe durchgeführt und die Zelle nach Abschluss der Messungen wieder aus dem Konus herausgespült werden kann. Abbildung 1.1 zeigt eine schematische Darstellung des neuen Messprinzips in einem mikrofluidischen System.

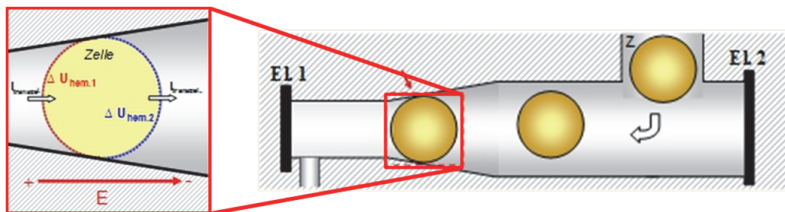


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des neuen Messprinzips in einem mikrofluidischen System [6]

1.3 Stand der Technik

In den letzten Jahren wurde die herkömmliche Patch-Clamp-Technik mit mikrofluidischen Applikationen kombiniert und mithilfe von mikrotechni-

1. Einleitung

schen Fertigungsverfahren weiterentwickelt. Der sog. *Planar Patch Clamp (PPC) Chip* [8] ist eine Alternative, die bisher erhebliche Fortschritte für den Einsatz der mikrofluidischen Applikationen zur elektrophysiologischen Messung ermöglicht. Die entsprechende Arbeit wurde im Rahmen der Dissertation von Sandra Wilson am IMT durchgeführt [9]. Bei PPC wird anstatt der Glaspipette, die bei der herkömmlichen Patch-Clamp-Technik an die Zellmembran angesetzt wird, eine auf dem Substrat mikrotechnisch gefertigte kleine Öffnung bzw. Pore verwendet. In Abbildung 1.2 wird der Unterschied der Messsituation zwischen der herkömmlichen Patch-Clamp-Technik (A) und des Planar Patch Clamp Systems (B) dargestellt.

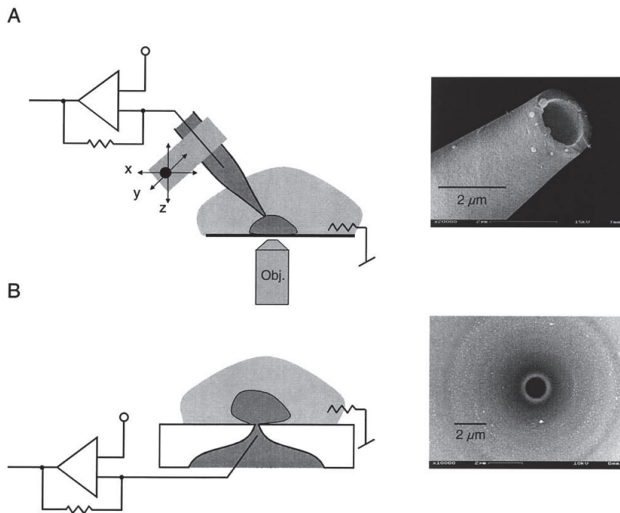


Abbildung 1.2: Unterschied der Messsituation zwischen der herkömmlichen Patch-Clamp-Technik (A) und dem Planar Patch Clamp System (B) [8]

Die Zelle wird durch Anlegen von Unterdruck an die Unterseite der Öffnung auf die Pore platziert und nach der Platzierung wird durch die Kontrolle des Unterdrucks eine *Whole Cell Konfiguration* erzeugt (siehe Kap. 2.5). In diesem Zustand wird ein elektrisches Feld mithilfe von zwei Ag/AgCl-

Drahtelektroden, die beiderseits des Substrats angebracht sind, an die Zelle angelegt und die Aktivität von Ionenkanälen elektrophysiologisch gemessen. Dieses PPC-System bietet eine Automatisierungsmöglichkeit für die Untersuchung der einzelnen Zellen und man kann dadurch die aufwändige Durchführung der Untersuchung mit der Patch-Clamp-Technik vermeiden [10]. Für die Fertigung der mikrodimensionalen Pore wird meist eine Ätz- oder Lasertechnik verwendet. Durch beide mikrotechnische Fertigungsverfahren können Poren mit Durchmessern unter $10\ \mu\text{m}$ hergestellt werden [10, 11, 12]. In Abbildung 1.3 wird die Porenstruktur in der Planar Patch Clamp Technik und das komplette PPC-System mit kapillaren Anschlüssen dargestellt.

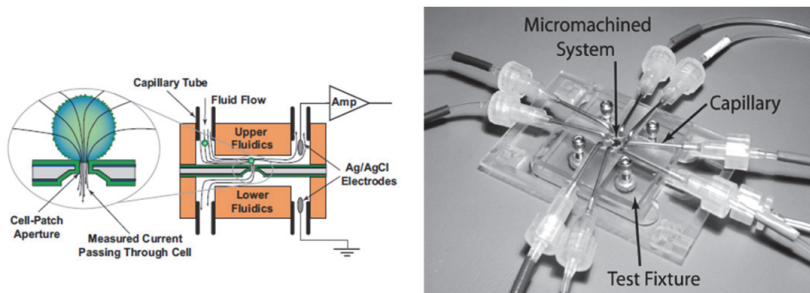


Abbildung 1.3: Porenstruktur in der Planar Patch Clamp Technik (links) und das komplette PPC-System mit kapillaren Anschlüssen (rechts) [10]

Bei dieser Planar Patch Clamp Technik variiert der Abdichtwiderstand zwischen Zelle und Pore im Bereich von einigen Hundert $\text{M}\Omega$ bis zu einigen $\text{G}\Omega$ [3], während bei der herkömmlichen Patch-Clamp-Technik der Widerstand fast in allen Fällen im $\text{G}\Omega$ -Bereich liegt. Der Widerstandsbereich hängt stark von der Geometrie der Öffnung, dem Substratmaterial und der Oberflächenqualität ab. Das von Bruggemann *et al.* (Nanion Technologies GmbH) [13] und Tao *et al.* (AVIVA Biosciences, SealchipTM) [14] gefertigte PPC-System, in dem eine zylindrische Öffnung auf einem Glas-Substrat hergestellt ist, ermöglicht es, bei einigen Zelltypen einen Abdichtwiderstand im $\text{G}\Omega$ -

1. Einleitung

Bereich zu erreichen. Auch das Siliziumsubstrat mit SiO_2 Schicht von Kutchinsky *et al.* (Sophion Bioscience) [15] bietet diese Möglichkeit [12]. Neben der Auswahl der unterschiedlichen Substratmaterialien wird die Öffnung mit unterschiedlichen Geometrien hergestellt. In Abbildung 1.4 werden zwei unterschiedliche Öffnungsgeometrien dargestellt. Die dreieckige Öffnungsgeometrie kann man bei kristallinem Quarz durch die anisotropische Ätztechnik erzeugen, doch mit dieser Geometrie kann kein ausreichender Abdichtwiderstand erreicht werden [16, 17].

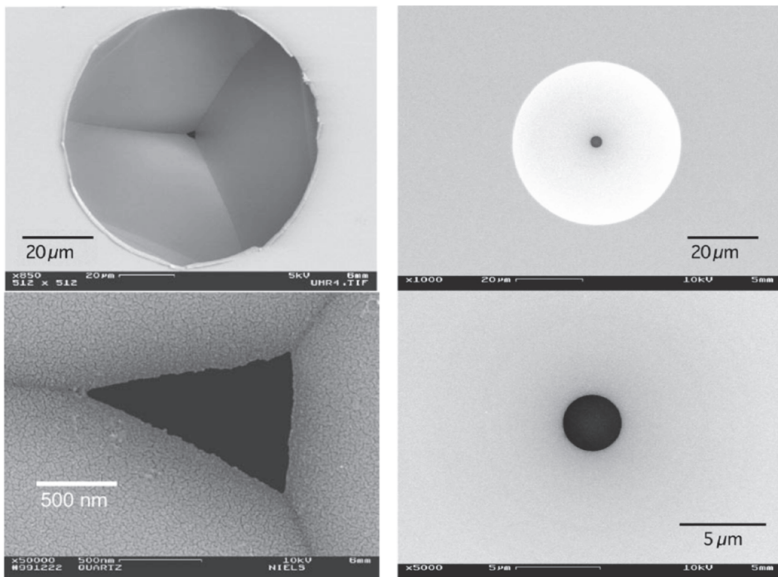


Abbildung 1.4: Zwei unterschiedliche Öffnungsgeometrien (links: dreieckig, rechts: kreisförmig) [16]

Der große Vorteil von PPC-Systemen liegt in der Automatisierung und Parallelisierung der Patch-Clamp-Technik. Durch die Automatisierung kann ein Hochdurchsatz-Screening (High-Throughput-Screening (HTS)) realisiert werden. Mithilfe eines HTS-Systems kann man in kurzer Zeit kostengünstig verschiedene pharmakologische Untersuchungen durchführen und darüber

hinaus kann die Messung simplifiziert werden, während bei der Patch-Clamp-Technik ein hoher zeitlicher, personeller und technischer Aufwand für die Messung erforderlich ist [16]. Abbildung 1.5 zeigt ein automatisiertes HTS-System sowie die in diesem HTS-System einsetzbare Plattform von der Firma Nanion Technologies GmbH.

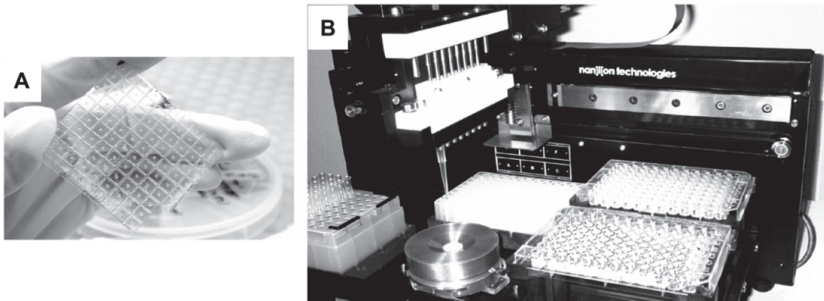


Abbildung 1.5: Automatisiertes HTS-System (B) und die in diesem HTS-System einsetzbare Plattform (A) von der Firma Nanion Technologies GmbH [16]

1.4 Gliederung der Arbeit

In Kapitel 2 werden zunächst die Grundbegriffe der Zellbiologie, die Zell- und Ionenkanalstruktur, die Funktionsweise der Ionenkanäle und das elektrische Membranpotential erläutert. Darüber hinaus wird das Patch-Clamp-Messprinzip vorgestellt.

Als nächstes werden in Kapitel 3 die technischen Grundlagen beschrieben und die verschiedenen Herstellungstechniken wie Mikrofertigungstechnik, Replikations- und Verbindungstechnik vorgestellt. Außerdem werden die mikrofluidischen Grundlagen erläutert.

Kapitel 4 beschreibt das Konzept für das NIMEP-System und die Vorbereitung der Präparation für die Analyse der Zelle im mikrofluidischen Testsystem. Hier geht es um die Machbarkeit der Herstellung der Kanalstruktur und die erarbeiteten Materialien sowie die Charakterisierung der

einzelnen Teilkomponenten. Außerdem werden die Auswahl der Modellorganismen, die Herstellung der Protoplasten und die Überprüfung der fluoreszenzoptischen Membranpotentialmessung mit einem spannungssensitiven Farbstoff ANNINE-6 erörtert.

In Kapitel 5 werden die Weiterentwicklung des in Kapitel 4 vorgestellten Konzepts zum NIMEP-Gesamtsystem sowie experimentelle Ergebnisse mit der entwickelten mikrofluidischen Plattform präsentiert. Dabei werden die experimentellen Ergebnisse für die Selektion einzelner Polymerpartikel und Protoplasten sowie die Messergebnisse der fluoreszenzoptischen Untersuchung der Membranspannung dargestellt.

Die Arbeit schließt mit einer Zusammenfassung und einem Ausblick über die zukünftigen Entwicklungsmöglichkeiten in Kapitel 6.

2 Physiologische und biologische Grundlagen

2.1 Aufbau der Pflanzenzelle

Die Besonderheit der Pflanzenzelle ist die Existenz einer Zellwand. Die Zellwand grenzt die Zellorgane, die von Plasmamembranen umgeben sind, von ihrer Umgebung ab. Diese Zellwand besteht aus drei Schichten, einer dünnen Mittellamelle und der jeweils viel dickeren Primär- und Sekundärwand. Untereinander stehen die einzelnen Pflanzenzellen über die in der Plasmamembran befindlichen Tüpfel bzw. Plasmodesmen in Verbindung. Abbildung 2.1 veranschaulicht die Verbindungsstruktur zwischen den Pflanzenzellen.

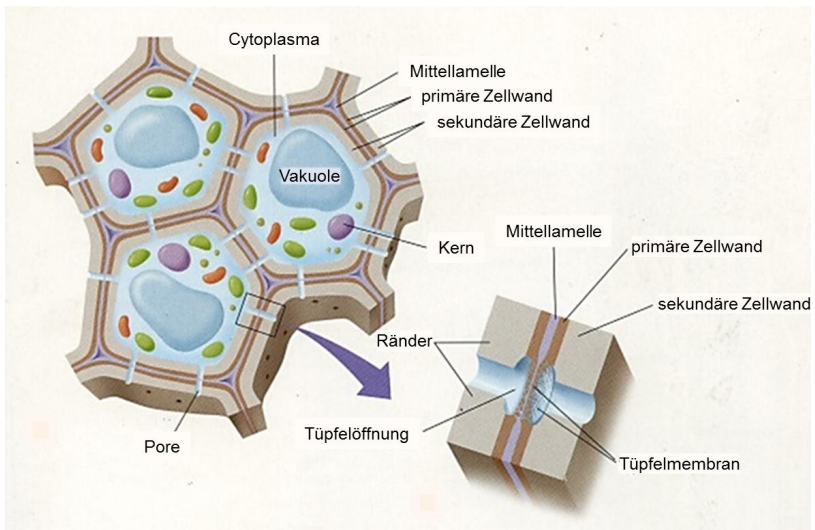


Abbildung 2.1: Verbindungsstruktur zwischen den Pflanzenzellen (verändert nach [18])

Die einzelne Zelle innerhalb der Zellwand, die als Protoplast bezeichnet wird, besteht aus zwei Hauptbestandteilen, dem Zellkern und dem Cytoplasma. Das Cytoplasma enthält membranabgegrenzte Zellorgane (Organellen wie die Platten, die Vakuole und die Mitochondrien), Membransysteme (endoplas-

2. Physiologische und biologische Grundlagen

matisches Reticulum und Golgi-Apparat) und membranlose Plasmastrukturen (Ribosomen, Actinfilamente und Mikrotubuli). Im Vergleich zu der tierischen Zelle enthält die Pflanzenzelle die Vakuole und Chloroplasten. Die Vakuole, die bis zu 90 Prozent des Volumens einer Pflanzenzelle einnehmen kann, ist von einer Membran, dem Tonoplast, umgeben und mit Wasser und gelösten Stoffen wie z.B. anorganischen Ionen (Na^+ , Ca^+ , K^+ , Cl^-), Zucker und organischen Säuren (Äpfel-, Zitronen-, Oxal-, und Aminosäure) gefüllt. Die Vakuole übernimmt viele wichtige Funktionen wie z.B. Stoffwechsel, Entgiftung, Abbau von Makromolekülen und Ablagerung der Farbstoffe. In Abbildung 2.2 sind die Struktur und die Bestandteile einer Pflanzenzelle dargestellt. Diese Bestandteile übernehmen unterschiedliche Aufgaben wie z.B. die Photosynthese oder die Speicherung von Farb- oder Reservestoffen [17, 18].

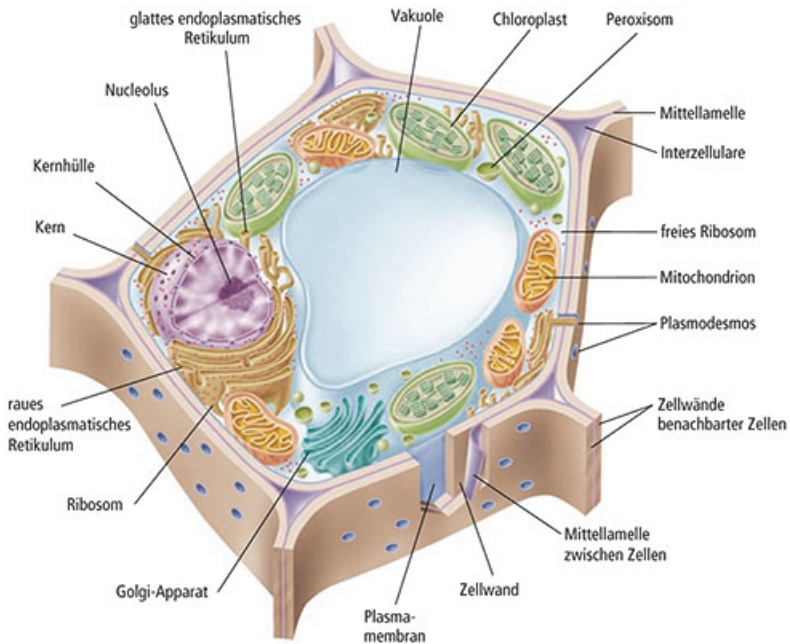


Abbildung 2.2: Struktur und Bestandteile der Pflanzenzelle (Verändert nach [18])

2.2 Struktur der Zellmembran und Membranproteine

Die Plasmamembran, die den intrazellulären Raum (Cytoplasma) der Zelle umschließt und vom extrazellulären Raum trennt, besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht und aus daran eingelagerten Proteinen. Die Phospholipide werden mit einem wasserliebenden (hydrophilen) Teil und einem wasserabstoßenden (hydrophoben) Teil zusammengesetzt. Der hydrophile Teil wird als Kopf und der hydrophobe Teil als Schwänze betrachtet [17, 18, 19]. Der hydrophile Teil enthält eine Phosphatgruppe, die mit Cholin und Glycerin verbunden ist, und der hydrophobe Teil, der zwei Fettsäure- bzw. Kohlenwasserstoffketten besitzt, ist über Esterbindung mit Glycerin verknüpft [20]. Abbildung 2.3 zeigt die schematische Darstellung der Struktur eines Phospholipidmoleküls.

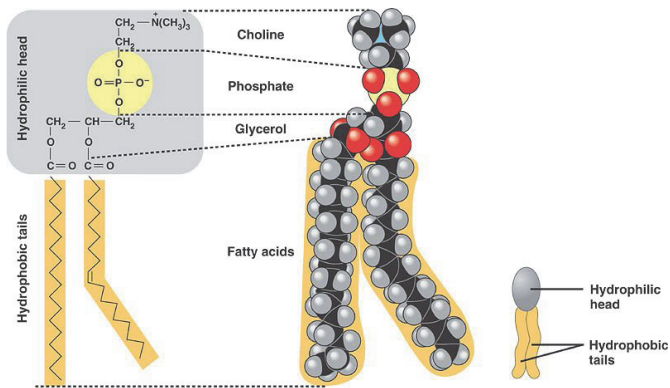


Abbildung 2.3: Struktur eines Phospholipidmoleküls [21]

Die 6–10 nm dicke Phospholipid-Doppelschicht ist quasi flüssig, d.h., die Phospholipidmoleküle sind beweglich und biegsam [17, 19]. Aufgrund dieser Beweglichkeit und Flexibilität wird ein Modell der Plasmamembran von Singer und Nicholson entwickelt, das als Flüssig-Mosaik-Modell bezeichnet

2. Physiologische und biologische Grundlagen

wird [18, 19]. Abbildung 2.4 zeigt das Schema des Modells der Membranstruktur nach Singer und Nicholson.

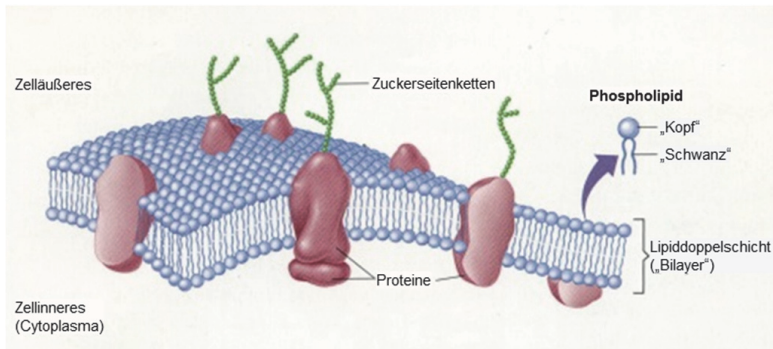


Abbildung 2.4: Membranstruktur nach Singer und Nicholson (Flüssig-Mosaik-Modell) (verändert nach [18])

Die Proteine sind in diese Phospholipid-Doppelschicht eingelagert und werden in Abhängigkeit von ihrer integrierten Form in periphere Proteine und integrale Proteine unterteilt. Periphere Proteine können wegen fehlender hydrophober Anteile die gesamte Membranschicht nicht durchdringen, sondern lagern sich an Innen- oder Außenseite der Lipid-Doppelschicht an. Darüber hinaus verbinden sie sich häufig mit anderen Membranproteinen. Andere Proteine, die sowohl den hydrophoben als auch den hydrophilen Anteil besitzen und daher die gesamte Membranschicht durchdringen, werden als integrale Proteine bezeichnet [17, 19, 22]. Abbildung 2.5 veranschaulicht die peripheren und integralen Proteine mit integrierter Membranschicht.

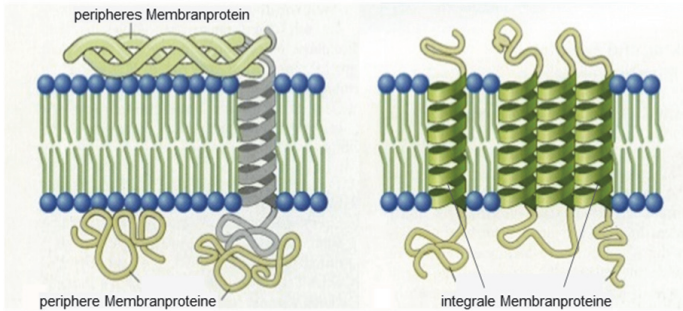


Abbildung 2.5: Periphere (links) und integrale (rechts) Proteine (verändert nach [22])

Die peripheren Proteine übernehmen keine Aufgabe für den Membrantransport. Die physiologisch wichtige Aufgaben wie z.B. die Transport- und Rezeptorfunktion übernehmenden Proteine sind integrale Proteine, auch Transmembranproteine genannt. Diese Transmembranproteine werden in Abhängigkeit von ihrer Transfunktionsart als Carrier, als Kanäle (Ionenkanäle und Wasserkanäle) und als Pumpe klassifiziert [17, 23]. Abbildung 2.6 zeigt drei Transmembranproteine in Abhängigkeit von ihrer Transportart.

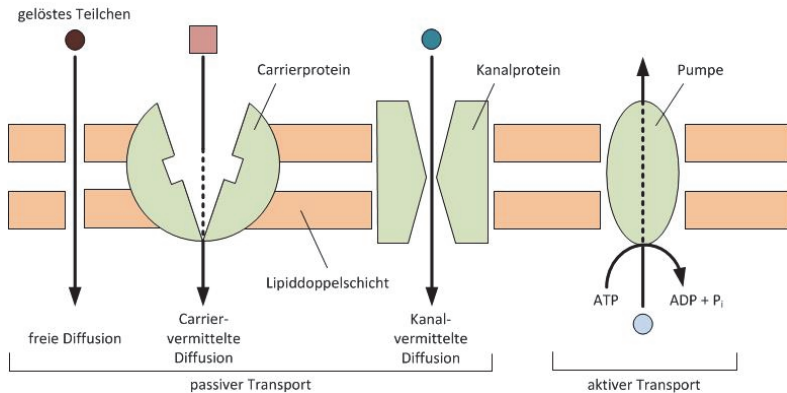


Abbildung 2.6: Drei Transmembranproteine in Abhängigkeit von ihrer Transportart (verändert nach [17])

Der durch einen elektrochemischen Gradienten stattfindende Transport wird als passiver Transport (auch „erleichterte Diffusion“) bezeichnet. Dieser Transport wird sowohl vom Konzentrationsgradienten als auch vom elektrischen Gradienten eines geladenen Teilchens getrieben. Zu dieser Gruppe gehören Carrier und Kanäle. Ein Carrier-Protein transportiert gelöste Moleküle mit Hilfe von Konformationsänderungen, während ein Kanalprotein bestimmte Ionen wie z.B. Na^+ oder K^+ mit Hilfe des geöffneten oder geschlossenen Kanalzustandes transportiert. Der Schaltmechanismus (engl. *Gating mechanism*) der Kanäle bzw. das Öffnen und Schließen der Kanäle wird durch einen externen Stimulus wie z.B. durch das Anlegen eines elektrischen Feldes an die Zelle oder durch die Bedingungen innerhalb der Zelle gesteuert [2, 17].

Der nicht durch Gradienten, sondern durch Energie angetriebene Transport wird aktiver Transport genannt und dieser Prozess wird durch eine „Pumpe“ vermittelt. Beim aktiven Transport werden gelöste Stoffe gegen ihren elektrochemischen Gradienten unter Aufwand von Energie transportiert [2, 17].

Die in dieser Arbeit untersuchte und wichtige Bedeutung habende Transmembranfunktion ist der passive Transport durch Ionenkanäle. Im folgenden Kapitel 2.3 werden die Struktur und das Funktionsprinzip der Ionenkanäle noch näher beschrieben.

2.3 Struktur und Funktionsprinzip der Ionenkanäle

Die vielfältige Art der Ionenkanäle ist durch zwei wichtige Kriterien, nämlich durch Ionenselektivität und Regulierung, voneinander unterschieden. Die hochselektive Eigenschaft der Ionenkanäle bezeichnet man als Ionenselektivität. Die Ionenkanäle ermöglichen den Durchtritt von nur einer Ionenart in Abhängigkeit vom Durchmesser und der Form des Kanals. Dies bedeutet, dass durch Ionenkanäle nur bestimmte anorganische Ionen wie z.B. K^+ , Ca^+ ,

Na^+ und Cl^- transportiert werden können. Das zweite wichtige Unterscheidungskriterium ist die Regulation der Ionenkanäle. Der Schaltmechanismus (Öffnen und Schließen des Kanals) der Ionenkanäle wird durch unterschiedliche Stimulationen gesteuert [2, 24]:

1. spannungsregulierte Kanäle (durch das Membranpotential gesteuert),
2. ligandenregulierte Kanäle (durch die Assoziation des Liganden gesteuert),
3. stress- oder druckaktivierte Kanäle (durch mechanische Kraft gesteuert).

Abbildung 2.7 zeigt die unterschiedlichen Schaltmechanismen der Ionenkanäle durch verschiedene Stimulationsarten.

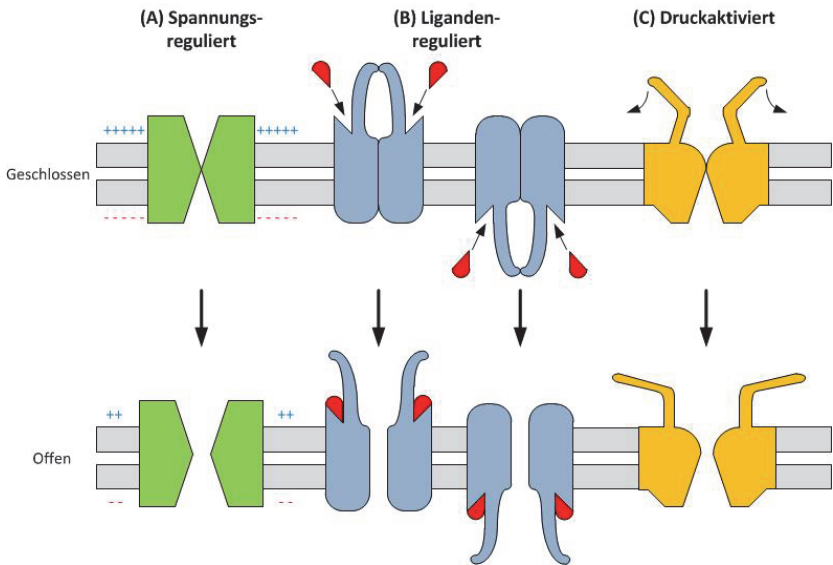


Abbildung 2.7: Unterschiedlicher Schaltmechanismus der Ionenkanäle durch verschiedene Stimulationsarten: Spannungsregulierte (A), ligandenregulierte (B) und stress- oder druckaktivierte (C) Ionenkanäle (verändert nach [2])

Die in dieser Arbeit untersuchten Ionenkanäle sind spannungsabhängige K^+ -Kanäle (K_v) bzw. KORC (K^+ outward rectifying conductance), da diese Ionenkanäle weitgehend bekannte electrophysiologische Eigenschaften und Schaltmechanismen besitzen und daher die aus der Patch-Clamp-Technik

2. Physiologische und biologische Grundlagen

gemessenen Ergebnisse als Referenz- und Zielwert für die aus der mikrofluidischen Plattform resultierenden Messergebnisse genutzt werden können. Der K^+ -Kanal besteht aus vier identischen α -Untereinheiten, die jeweils sechs hydrophobe Transmembrandomänen (S1–S6) enthalten. Die Zusammenlagerung der einzelnen Untereinheiten bildet ein in der Mitte eine Pore bzw. einen Ionenkanal besitzendes Homotetramer. Auf der Eintrittsseite der K^+ -Ionen vom extrazellulären Bereich befindet sich der Selektivitätsfilter, der eine Glycin-Tyrosin-Glycin-Sequenz bildet und wobei die Wasserhülle der eintretenden K^+ -Ionen durch den Carbonylsauerstoff des Glycin ersetzt wird. Diese eintretende K^+ -Ionen strömen durch das Kanaltor, das sich auf der intrazellulären Seite befindet und durch die geladenen S4-Segmente bei der Spannungsänderung geöffnet wird, ins Zellinnere hinein [2, 24, 25]. Abbildung 2.8 zeigt die spannungsabhängige K^+ -Ionenkanalstruktur und den Schaltmechanismus bei einer Spannungsänderung.

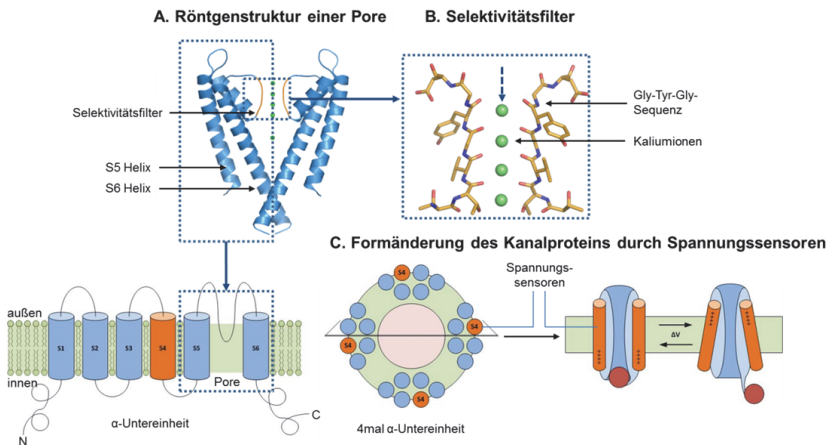


Abbildung 2.8: Spannungsabhängige K^+ -Ionenkanalstruktur (A, B) (verändert nach [26]) und Schaltmechanismus bei einer Spannungsänderung (C) (verändert nach [24])

Durch die Öffnung der Ionenkanäle können bis zu 10^8 Ionen pro Sekunde hindurchströmen. Diese Geschwindigkeit ist viel schneller als die Transportgeschwindigkeit bei Carrier-Protein und annähernd so hoch wie die freie Diffusion von Teilchen im Wasser [2, 23].

2.4 Ionenfluss durch Potentialdifferenz

Die elektrische Membranspannung bzw. das Membranpotential ist der wichtigste Begriff, um die Transportmechanismen der Ionen durch Ionenkanäle zu verstehen. Durch die Ionenverteilung auf beiden Seiten der Zellmembran entsteht eine Spannungsdifferenz zwischen der inter- und extrazellulären Seite. Diese elektrische Potentialdifferenz zwischen beiden Membranseiten wird als *Membranpotential* bezeichnet.

Wie bereits in Kapitel 2.2 erwähnt, wird der Ionenstrom durch Ionenkanäle als passiver Transport bezeichnet, der durch einen elektrochemischen Gradienten oder einen Konzentrationsgradienten angetrieben wird. Die Triebkraft, die auf den Ionenfluss durch die Ionenkanäle wirkt, kann man daher mit der chemischen Triebkraft, die auf Konzentrationsgradienten zurückgeführt wird, und der elektrischen Triebkraft, die auf der elektrischen Potentialdifferenz beruht, vergleichen. Diese elektrochemische Potentialdifferenz (= chemische Energiedifferenz + elektrische Energiedifferenz) kann mit der nachstehenden Formel berechnet werden [24]:

$$\Delta\mu_x = R \cdot T \cdot \ln \frac{[X]_i}{[X]_a} + z_x \cdot F \cdot (\Psi_i - \Psi_a) \quad (2.1)$$

mit

- $\Delta\mu_x$: Elektrochemische Potentialdifferenz [$J \cdot mol^{-1}$]
- R : Universelle Gaskonstante [$J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$]
- T : Absolute Temperatur [K]
- F : Faraday-Konstante [$J \cdot mol^{-1} \cdot V^{-1}$]

2. Physiologische und biologische Grundlagen

- z_x : Wertigkeit des Ions X [-]
 Ψ : Elektrisches Potential [mV]
 $[X]$: Konzentration des Ions X [$mol \cdot l^{-1}$]
Index i : Innen
Index a : Außen.

Im Gleichgewichtszustand sind chemische und elektrische Triebkraft exakt gleich groß und entgegengesetzt gerichtet. Dadurch sind beide Treibkräfte miteinander ausgeglichen und der ein- und auswärts gerichtete Ionentransport findet nicht mehr statt. Das Membranpotential unter diesem Gleichgewichtszustand bezeichnet man als *Ruhepotential*. Entsprechend beträgt der Wert für die elektrochemische Potentialdifferenz Null: $\Delta\mu_x = 0$. Von Gleichung 2.1 kann man die vereinfachte Formel für das Ruhepotential herleiten [2, 24]:

$$R \cdot T \cdot \ln \frac{[X]_i}{[X]_a} + z_x \cdot F \cdot (\Psi_i - \Psi_a) = 0. \quad (2.2)$$

Damit ergibt sich die *Nernst-Gleichung* für das Ruhepotential E_x :

$$E_x = -R \cdot T \cdot \ln \frac{[X]_i}{[X]_a}. \quad (2.3)$$

Bildet man die Differenz zwischen Membranpotential E_m und Ruhepotential E_x kann man die Transportrichtung der Ionen durch die Ionenkanäle erkennen:

$$\Delta E = E_m - E_x. \quad (2.4)$$

Dabei wird ΔE als Potentialdifferenz zwischen Membranpotential E_m und Ruhepotential E_x bezeichnet. Abbildung 2.9 stellt unterschiedliche Zustände des Ionenflusses der K^+ -Ionen unter dem Potentialunterschied zwischen Membran- und Ruhepotential dar. Wie in Abbildung 2.9 gezeigt, erreicht der Ionentransport den Gleichgewichtszustand, wenn das Membranpotential E_m gleich hoch wie das Ruhepotential E_x ist ($E_m = E_x$). Im Gegensatz dazu führt

2. Physiologische und biologische Grundlagen

der Unterschied zwischen beiden Potentialen zur Ein- oder Ausströmung der K^+ -Ionen. Wenn die Potentialdifferenz zwischen Membranpotential und Ruhepotential größer als Null ist (d. h. $E_m > E_x$), sind die K^+ -Ionen auswärts gerichtet. Im Gegensatz dazu sind die K^+ -Ionen einwärts gerichtet, wenn die Potentialdifferenz kleiner als Null ist (d. h. $E_m < E_x$).

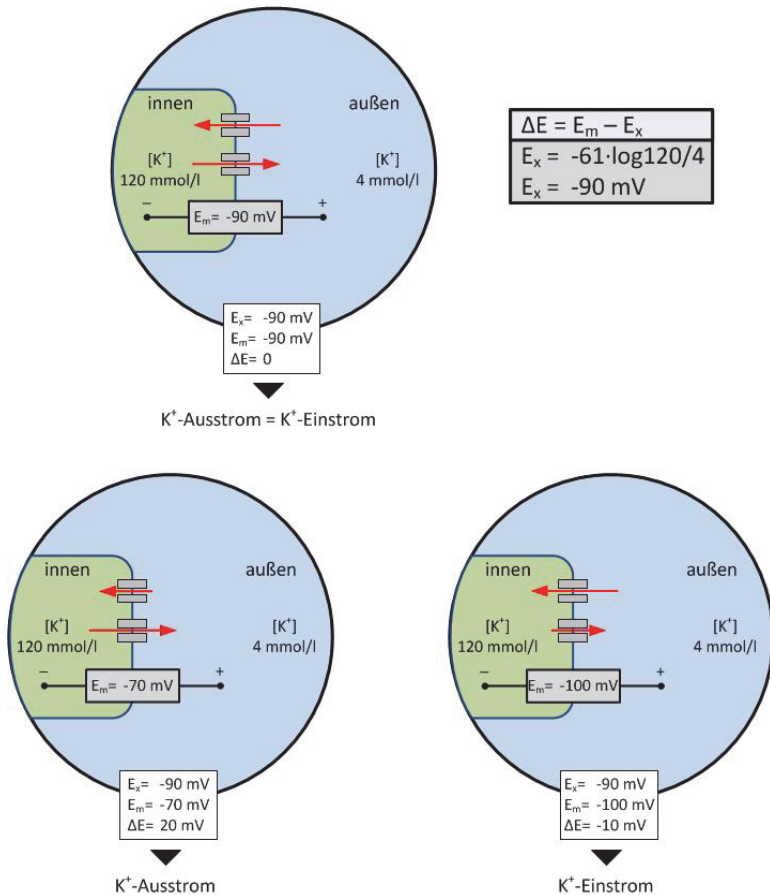


Abbildung 2.9: Unterschiedliche Zustände des Ionenflusses unter dem Potentialunterschied zwischen Membran- und Ruhepotential (verändert nach [24])

2.5 Messung der Aktivität der Ionenkanäle mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik

Die bekannteste konventionelle Messtechnik für die elektrische Aktivität und Leitfähigkeit der Ionenkanäle ist die *Patch-Clamp-Technik*. Die Patch-Clamp-Technik wurde von E. Neher und B. Sakmann im Jahr 1976 entwickelt, wofür sie 1991 den Nobelpreis für Medizin erhielten. Diese Technik ermöglicht die Untersuchung der Ionenkanäle hinsichtlich ihrer Leitfähigkeit, Schaltkinetik und Regulation [1, 23, 27].

Bei der Patch-Clamp-Technik wird zunächst eine feine Glaspipette mit einem Spitzendurchmesser von 0,3–3 μm mit der Zellmembran eines Protoplasten in Kontakt gebracht. Durch Anlegen eines Unterdrucks bzw. Ansaugen entsteht ein sehr hoher elektrischer Abdichtwiderstand (im Bereich von 1–100 $\text{G}\Omega$) zwischen Glaspipette und Zellmembran. Die Grenzschicht zwischen Glaspipette und Zellmembran, wo der $\text{G}\Omega$ -Abdichtwiderstand entsteht, isoliert die Membranoberfläche innerhalb der Pipettenöffnung elektrisch von der Außenseite des Kontaktbereiches. Dadurch kann der durch Ionenkanäle stattfindende Stromfluss bei der angelegten Spannung, die mit Hilfe der beiden in der Pipetten- und der Badlösung eingetauchten Elektroden erzeugt wird, gemessen werden [2, 23, 24, 27]. Abbildung 2.10 zeigt die schematische Darstellung der Patch-Clamp-Messung und eine mikroskopische Aufnahme einer mit einer Glaspipette kontaktierten Pflanzenzelle.

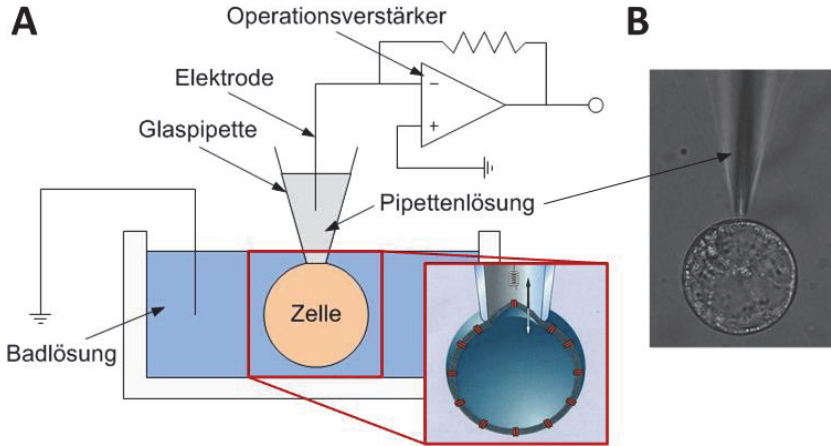


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der Patch-Clamp-Messung (A) [22] und mikroskopische Aufnahme der mit einer Glaspipette kontaktierten Pflanzenzelle bei der Patch-Clamp-Messung (B)

Bei der Patch-Clamp-Technik können die Messungen je nach Untersuchungsziel mit unterschiedlichen Konfigurationen durchgeführt werden. Einzelne Konfigurationen sind in Abbildung 2.11 dargestellt. Wie bereits oben beschrieben, kann durch den leichten Unterdruck eine „On-Cell“-Konfiguration erzeugt werden. Mit Hilfe dieser Konfiguration kann man zwar die Transmembranströme über die gesamte Zelloberfläche der intakten Protoplasten messen, welches das Ziel dieser Arbeit ist (siehe Kap. 1.2), aber die Signalstärke ist so schwach, dass man keine ausführliche Informationen bekommt. Als Alternative kann man die „Whole-Cell“-Konfiguration (Abb. 2.11 B) verwenden, um die Transmembranströme über die gesamte Zelloberfläche zu messen. Ausgehend von der „On-Cell“-Konfiguration kann durch weiteren negativen Druck die „Whole-Cell“-Konfiguration erzeugt werden. Bei dieser Konfiguration wird die Zelloberfläche durchbrochen und die intrazelluläre Lösung und die Pipettenlösung bilden einen kontinuierlichen Zustand. Mit Hilfe dieser Konfiguration kann man ausführliche Informationen der Transmembranströme über die gesamte Zelloberfläche bzw. der Gesamtleitfähig-

keit der Protoplasten bekommen. Der Nachteil liegt darin, dass die lokale Zelloberfläche durch den weiteren Unterdruck verletzt wird und daher die Untersuchung der Zelle im intakten Zustand nicht durchgeführt werden kann. Durch diese invasive Erzeugung des Untersuchungszustandes kann sich die Zelle physiologisch anders als intakte Zellen verhalten. Darüber hinaus erfordert die Durchführung der Untersuchung mit dieser Technik einen erfahrenen und geschickten Experimentator und die Daten können nur mit einem sehr hohen zeitlichen, personellen und technischen Aufwand erhoben werden.

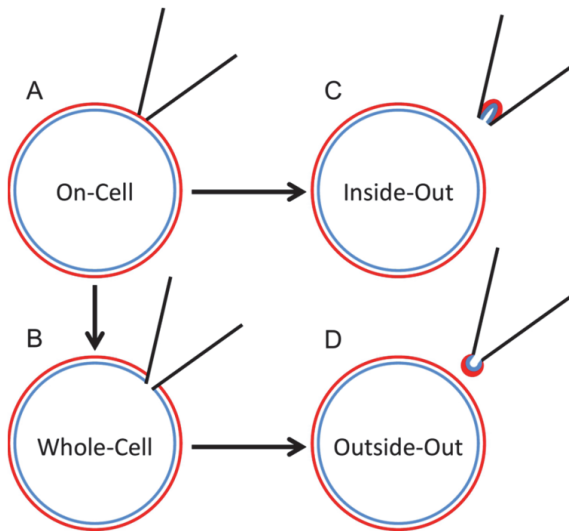


Abbildung 2.11: Einzelne Konfigurationen bei Patch-Clamp-Technik (verändert nach [28])

Neben der Strommessung über die gesamte Zelloberfläche kann man die Messung der Einzelkanalströme mit anderen Konfigurationen durchführen. Bei der „On-Cell“-Konfiguration kann man durch Abziehen der Pipette ein kleines Membranstück von der Zelle entfernen („Inside-Out“-Konfiguration, Abb. 2.11 C). Bei dieser Konfiguration ist die ursprüngliche Zytosolseite der Membran zur Badlösung hin orientiert. Dadurch ist es möglich den Einfluss

der auf der Zytosolseite applizierten Lösemittel auf die Einzelkanalaktivität zu untersuchen. Darüber hinaus kann man bei der „Whole-Cell“-Konfiguration durch Abziehen der Pipette eine „Outside-Out“-Konfiguration erzeugen (Abb. 2.11 D). Nach dem Abziehen des Membranstückes werden die beiden abgerissenen Ränder spontan zusammen verbunden und dadurch ist die ursprüngliche extrazelluläre Seite zur Badlösung orientiert. Diese Konfiguration ermöglicht die Untersuchung des Einflusses der auf der extrazellulären Seite applizierten Lösemittel auf Einzelkanalaktivität [2, 24]. Mit den oben genannten beiden Einzelkanalmessungen kann man zwar die Aktivität des einzelnen Ionenkanals bei der angelegten Spannung untersuchen, aber in dieser Konfiguration werden sehr schwache Signale gemessen [29]. Die Untersuchung des Verhaltens einer ganzen Zelle bei der variierten Spannungsgröße, das das Ziel dieser Arbeit ist, ist nicht möglich.

2.6 Spannungssensitiver Fluoreszenzfarbstoff ANNINE-6

Bei Anlegen einer Spannung im Zeitraum von Millisekunden an die Zelle wird die Membranspannung verändert, wodurch der Ionenfluss (Ein- oder Ausstrom) durch die Ionenkanäle stattfindet (siehe Kap. 2.4 und 2.5). Der Ionenfluss hat eine Umverteilung der Ladungen an der Zellmembran bzw. eine Änderung des Membranpotentials zur Folge.

Um diese Membranpotentialänderung zu messen, wird in dieser Arbeit der Fluoreszenzfarbstoff ANNINE-6 (ANellated hemicyaNINE) verwendet. ANNINE-6 ist ein spannungssensitiver Fluoreszenzfarbstoff, der innerhalb von Pikosekunden auf eine Änderung der Membranspannung reagiert. Die Membranspannungsänderung führt zur Umverteilung der Ladungen innerhalb des Farbstoffmoleküls. Die Farbstoffmoleküle können durch den phospholipidähnlichen Aufbau in umgekehrter Ladungsorientierung zwischen die Phospholipidmoleküle der äußeren Schicht einer Phospholipid-Doppelschicht

2. Physiologische und biologische Grundlagen

eingelagert werden [7, 30, 31]. Abbildung 2.12 zeigt eine schematische Darstellung der Einlagerung des Farbstoffmoleküls in die Zellmembran (A) und die Molekülstruktur von ANNINE-6 (B).

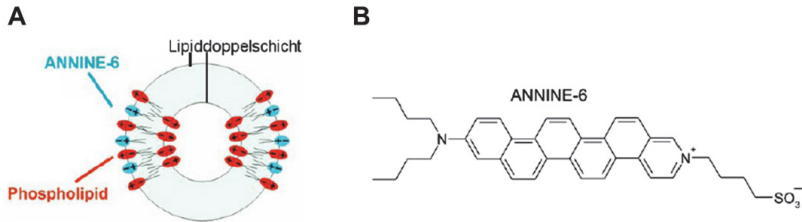


Abbildung 2.12: Einlagerung von ANNINE-6 in Lipiddoppelschicht (A) [29] und die Molekülstruktur (B) [32]

Ist die angelegte Spannung kleiner als Ruhepotential, wird die Membran hyperpolarisiert. Bei dieser Hyperpolarisation wird die Membranspannung zu negativen Werten hin verschoben und dies führt zu einer Intensitätszunahme. Wird die Membran durch eine angelegte Spannung, die höher als das Ruhepotential ist, depolarisiert, wird die Membranspannung zu positiven Werten verschoben und damit wird die Intensität erniedrigt [7, 30].

3 Technische Grundlagen

In diesem Abschnitt werden zunächst strömungstechnische Grundlagen erläutert, die für das Verständnis des Strömungsverhaltens im entwickelten mikrofluidischen Testsystem wichtig sind. Darüber hinaus werden mikrotechnische Fertigungsverfahren dargestellt, die in dieser Arbeit für die Herstellung der einzelnen Teile des mikrofluidischen Testsystems verwendet wurden. Am Ende dieses Kapitels werden optische Untersuchungsmethoden für das Verständnis der fluoreszenzoptischen Untersuchung der Zelle im Testsystem und der Überprüfungsmethode der mikrotechnisch gefertigten Teile kurz dargestellt.

3.1 Mikrofluidik

Mikrofluidik bezieht sich auf Methoden und Systeme für die Manipulation und Kontrolle der fluidischen Strömung im μm -Bereich [33]. Die Kenntnisse auf dem Gebiet von Strömungstechnik und Mikrosystemtechnik ermöglichen Flüssigkeiten oder Gase im μm -Bereich zu behandeln. Durch die erheblichen Fortschritte der Mikrofluidik in den letzten Jahren wurden die Einsatzbereiche dieser Technik erweitert. Insbesondere ist der Bedarf an die Entwicklung von mikrofluidischen Komponenten in den biomedizinischen Bereichen aufgrund ihres Anwendungspotentials und ihrer vielfältigen Vorteile wie z.B. Portabilität, Reduzierung der Reagenzmenge, geringer Herstellungskosten sowie der Verkürzung der Diagnosedauer in den vergangenen Jahren stetig zunehmend. Mikrofluidikchips können im Allgemeinen auf Polymerbasis gefertigt werden, weil die Polymere biokompatible und optisch geeignete Eigenschaften für medizinische und biologische Untersuchungen besitzen. Die polymerbasierend gefertigten mikrofluidischen Systeme enthalten in Abhängigkeit von ihren Aufgaben unterschiedliche Komponenten wie z.B. Pumpen,

Ventile, Kanäle, Filter, Mischer und elektrische sowie optische Komponenten. Derartige Mikrofluidikchips werden als Lab-on-a-Chip (LoC), Micro Total Analysis Systems (μ TAS) oder Biomedical Microelectromechanical Systems (BioMEMS) bezeichnet [34, 35].

3.2 Strömungstechnische Grundlagen

3.2.1 Fluidische Kennzahlen

Das unterschiedliche Strömungsverhalten im fluidischen System kann durch dimensionslose Kennzahlen charakterisiert werden. Die dimensionslosen Kennzahlen werden durch das Verhältnis zwischen den verschiedenen physikalischen Größen wie z.B. Trägheitskraft, Reibungskraft, Diffusionskoeffizient und Viskosität bestimmt [36]. Die für diese Arbeit relevanten dimensionslosen Kennzahlen sind die Reynolds-Zahl Re und Peclet-Zahl Pe .

Reynolds-Zahl

Die Reynolds-Zahl Re wird durch das Verhältnis zwischen Trägheits- und Reibungskraft bestimmt und spielt als Entscheidungskriterium zwischen der laminaren und turbulenten Strömung eine wichtige Rolle. Bei einer relativ großen Reibungskraft wird die Reynolds-Zahl entsprechend kleiner. Diese Strömung ist dann stabil und laminar. Im Gegensatz dazu bedeutet eine große Reynolds-Zahl instabile und turbulente Strömung:

$$Re = \frac{\text{Trägheitskraft}}{\text{viskose Reibungskraft}} = \frac{\rho \cdot \bar{v} \cdot D_h}{\mu} = \frac{\bar{v} \cdot D_h}{\nu} \quad (3.1)$$

Dabei sind ρ die Fluidichte, \bar{v} die mittlere Strömungsgeschwindigkeit, D_h der hydraulische Durchmesser und μ die dynamische Viskosität. Die kinematische Viskosität $\nu = \mu / \rho$ ist durch das Verhältnis zwischen der Fluidichte ρ und der dynamischen Viskosität μ bestimmt.

Da in dieser Arbeit mikrofluidische Kanäle mit rechteckigem Querschnitt verwendet werden, ist es bedeutend, die physikalischen Größen wie z.B. den hydraulischen Durchmesser D_h und die Strömungsgeschwindigkeit \bar{v} entsprechend einer Strömung in einem rechteckigen Kanal zu definieren. Bei einer Strömung in einem rechteckigen Kanal ist der hydraulische Durchmesser $D_h = 4 \cdot A_Q / U$ durch den Zusammenhang zwischen dem Kanalquerschnitt A_Q und dem Umfang des Kanals U gegeben.

Die Reynolds-Zahl, die als Grenzwert zwischen einer laminaren und einer turbulenten Strömung verwendet wird, ist in der Mikrofluidik meist kleiner als die kritische Reynolds-Zahl von 2300. Daher kann die Strömung im mikrofluidischen System als eine laminare Strömung angenommen werden [36, 37, 38].

Peclet-Zahl

Die Peclet-Zahl Pe wird durch das Verhältnis zwischen Konvektion und Diffusion bestimmt und beschreibt den Stofftransportprozess in einem fluidischen System. Ein Stofftransportprozess, der von den Konzentrationsgradienten verursacht wird, nennt man Diffusion. Die Konvektion ist ein von der Strömung verursachter Transportprozess [36]. Mithilfe der Peclet-Zahl wird das Verhältnis von Konvektion zu Diffusion in einem in dieser Arbeit erforderlichen Lösungsaustauschteil nachwiesen (siehe Kap. 1.2). Die mathematische Beschreibung des Stofftransportprozesses wird im nachfolgenden Abschnitt erörtert:

$$Pe = \frac{\text{Konvektion}}{\text{Diffusion}} = \frac{\bar{v} \cdot L_{ch}}{D}. \quad (3.2)$$

Dabei sind \bar{v} die mittlere Strömungsgeschwindigkeit, L_{ch} die charakteristische Länge des Transportprozesses und D der Diffusionskoeffizient.

3.2.2 Strömungsprofile

Die Strömung in einem Kanal bildet unterschiedliche Strömungsprofile in Abhängigkeit vom Kanalquerschnitt. In diesem Abschnitt werden zwei Strömungsprofile, die in dieser Arbeit relevant sind, dargestellt, nämlich die Rohrströmung mit Kreisquerschnitt und die Kanalströmung mit Rechteckquerschnitt. Eine laminare stationäre Strömung eines inkompressiblen Mediums wird als *Hagen-Poiseuille-Strömung* beschrieben. Die mathematische Gleichung der Strömungsprofile wird aus der *Navier-Stokes-Gleichung* hergeleitet.

Hagen-Poiseuille-Rohrströmung mit Kreisquerschnitt

Die *Navier-Stokes-Gleichung* in Zylinderkoordinaten kann wie folgt beschrieben werden [38]:

$$\frac{\partial v}{\partial t} + v \cdot \frac{\partial v}{\partial s} = -\frac{\partial p}{\partial s} + \nu \cdot \frac{1}{r} \cdot \frac{\partial}{\partial r} \cdot \left(r \cdot \frac{\partial v}{\partial r} \right) - g \cdot \frac{dz}{ds}. \quad (3.3)$$

Dabei sind s die Stromfadenkoordinate, r die Radialkoordinate, v die Strömungsgeschwindigkeit, t die Zeit, g die Erdbeschleunigung und z die Ortskoordinate in Schwerkraftrichtung. Die Strömung wird als stationär ($\partial v / \partial t = 0$) und inkompressibel ($\partial v / \partial s = 0$) angenommen. Die inkompressible Strömung bedeutet sowohl keine Änderung des Strömungsprofils in s -Richtung als auch keine Änderung der Druckgradienten in s -Richtung ($(1/\rho) \cdot \partial p / \partial s = K$, wobei K eine Konstante ist. Wird die Strömung als eine horizontale zwei-dimensionale Strömung betrachtet, liefert dies $dz = 0$ [38, 39]. Aus diesen Voraussetzungen wird die *Navier-Stokes-Gleichung* in Zylinderkoordinaten folglich beschrieben:

$$\frac{1}{r} \cdot \frac{\partial}{\partial r} \cdot \left(r \cdot \frac{\partial v}{\partial r} \right) = \frac{1}{\rho \cdot \nu} \cdot \frac{\partial p}{\partial s} = K. \quad (3.4)$$

Durch Integration von (Gl. 3.4)

$$\int d\left(r \cdot \frac{dv}{dr}\right) = \int K \cdot r \, dr \quad (3.5)$$

erhält man folgende Gleichung

$$r \cdot \frac{dv}{dr} = \frac{K}{2} \cdot r^2 + K_1. \quad (3.6)$$

Diese Gleichung 3.6 ergibt durch nochmalige Integration

$$\int dv = \int \frac{K}{2} \cdot r \, dr + \int \frac{K_1}{r} \, dr \quad (3.7)$$

folgende Gleichung für das Geschwindigkeitsprofil der Rohrströmung

$$v(r) = \frac{K}{4} \cdot r^2 + K_1 \cdot \ln r + K_2. \quad (3.8)$$

Mit den Randbedingungen

$$v(r = R) = 0, \quad \left. \frac{dv}{dr} \right|_{r=0} = 0 \quad (3.9)$$

werden die beiden Integrationskonstanten $K_1 = 0$ und $K_2 = -K \cdot R^2 / 4$ bestimmt.

Die *Hagen-Poiseuille-Strömung* mit Kreisquerschnitt lautet damit:

$$v(r) = -\frac{R^2}{4 \cdot \nu \cdot \rho} \cdot \frac{dp}{ds} \cdot \left(1 - \frac{r^2}{R^2}\right). \quad (3.10)$$

Abbildung 3.1 zeigt das Geschwindigkeitsprofil der *Hagen-Poiseuille-Rohrströmung*.

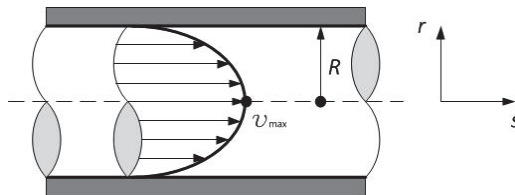


Abbildung 3.1: Geschwindigkeitsprofil der *Hagen-Poiseuille-Rohrströmung* (verändert nach [38])

Hagen-Poiseuille-Kanalströmung mit Rechteckquerschnitt

Im Vergleich zur Rohrströmung wird die *Navier-Stokes-Gleichung* der Kanalströmung mit Rechteckquerschnitt mit der Stromfadenkoordinate s und der dazu senkrechten Koordinate n wie folgt beschrieben [38]:

$$\frac{\partial v}{\partial t} + v \cdot \frac{\partial v}{\partial s} = -\frac{1}{\rho} \cdot \frac{\partial p}{\partial s} + \nu \cdot \frac{\partial^2 v}{\partial n^2} - g \cdot \frac{dz}{ds}. \quad (3.11)$$

Mit den oben genannten Voraussetzungen

$$\frac{\partial v}{\partial t} = 0, \quad \frac{\partial v}{\partial s} = 0, \quad \frac{1}{\rho} \cdot \frac{\partial p}{\partial s} = K, \quad g \cdot \frac{dz}{ds} = 0 \quad (3.12)$$

erhält man die *Navier-Stokes-Gleichung* der Kanalströmung mit Rechteckquerschnitt wie folgt in der vereinfachten Form:

$$\frac{\partial^2 v}{\partial n^2} = \frac{1}{\rho \cdot \nu} \cdot \frac{\partial p}{\partial s} = K. \quad (3.13)$$

Diese Gleichung 3.13 ergibt durch zweimalige Integration folgende Gleichung

$$v(n) = \frac{1}{2} \cdot K \cdot n^2 + K_1 \cdot n + K_2. \quad (3.14)$$

Mit den zwei Randbedingungen

$$v(n = \pm H) = 0 \quad (3.15)$$

werden die Integrationskonstanten $K_1 = 0$ und $K_2 = -1/2 \cdot K \cdot H^2$ bestimmt und schließlich wird das Geschwindigkeitsprofil der *Hagen-Poiseuille-Kanalströmung* mit Rechteckquerschnitt wie folgt beschrieben:

$$v(n) = -\frac{H^2}{2 \cdot \nu \cdot \rho} \cdot \frac{dp}{ds} \cdot \left(1 - \frac{n^2}{H^2}\right). \quad (3.16)$$

Abbildung 3.2 zeigt das Geschwindigkeitsprofil der *Hagen-Poiseuille-Kanalströmung*.

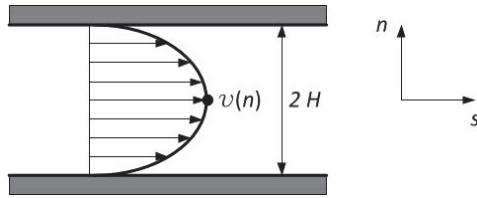


Abbildung 3.2: Geschwindigkeitsprofil der *Hagen-Poiseuille-Kanalströmung* (verändert nach [38])

3.2.3 Stofftransport: Diffusion und Konvektion

Bei der in dieser Arbeit entwickelten mikrofluidischen Plattform wird die Zelle in einer konischen Kanalstruktur fixiert. Anschließend soll in Zellnähe d.h. im Kanalstück vor und hinter der Zelle das Lösungsmittel ausgetauscht werden können. Bei diesem Bereich finden zwei wichtige Austauschvorgänge statt: Der eine Vorgang ist die *Diffusion* und der andere die *Konvektion*. Diffusionsmechanismen werden grundsätzlich aufgrund des Konzentrationsgradienten verursacht. Beim Lösungsaustausch findet die Diffusion so lange statt, bis keine Konzentrationsunterschiede zwischen den beiden Medien bestehen. Die Diffusion wird durch die *Fickschen Gesetze* beschrieben [40]. Das 1. und 2. *Ficksche Gesetz* lauten in der allgemeinen Form:

$$\vec{\Phi}_D = -D \cdot \vec{\nabla} c \quad (1. \text{ Ficksches Gesetz}), \quad (3.18)$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \vec{\nabla}^2 c \quad (2. \text{ Ficksches Gesetz}), \quad (3.19)$$

mit $\vec{\nabla} = \left(\frac{\partial}{\partial x}, \frac{\partial}{\partial y}, \frac{\partial}{\partial z} \right)$ im dreidimensionalen Fall.

Dabei sind $\vec{\Phi}_D$ die Flussdichte durch Diffusion, c die Konzentration und $\vec{\nabla}$ der Nabla-Operator. Darüber hinaus kann man die durchschnittliche Diffusionszeit τ_D über eine Diffusionslänge l wie folgt definieren:

$$\tau_D = \frac{l^2}{2 \cdot D}. \quad (3.20)$$

Wie in Gleichung 3.20 erkannt, nimmt die Diffusionsdauer in der zweiten Ordnung mit der Diffusionslänge zu [37].

Neben dem Diffusionsvorgang findet beim Lösungsaustausch der Konvektionsvorgang statt. Die Konvektion ist ein durch eine erzwungene Kraft hervorgerufener Stofftransportvorgang und wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\vec{\Phi}_K = \vec{v} \cdot c. \quad (3.21)$$

Dabei sind $\vec{\Phi}_K$ die Flussdichte durch Konvektion und \vec{v} der Geschwindigkeitsvektor. Daher wird die gesamte Flussdichte $\vec{\Phi}_{ges}$ beim Lösungsaustausch, der durch kombinierte Austauschvorgänge von Diffusion und Konvektion stattfindet, wie folgt formuliert [38]:

$$\vec{\Phi}_{ges} = \vec{\Phi}_D + \vec{\Phi}_K = -D \cdot \vec{\nabla}c + \vec{v} \cdot c. \quad (3.22)$$

3.3 Mikrofertigungstechnik

In diesem Abschnitt werden die für diese Arbeit relevanten Fertigungs- und Replikationstechniken Mikrofräsen, Erosion, Laserschneiden und Heißprägen zur Herstellung der mikrostrukturierten Bauteile und der für den Systemaufbau zusätzlich benötigten Bauteile beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Fräsbearbeitung zur Herstellung der polymerbasierten mikrofluidischen Strukturen, der Abformwerkzeuge und der Halterungen aus PMMA und Aluminium verwendet. Die Mikrofunkenerosion kam zum Abtrennen der Elektrodenstücke aus der Silberplatte, die für das Anlegen eines elektrischen Feldes in System eingesetzt wird, zum Einsatz. Die

Lasermikrobearbeitung wurde im Rahmen dieser Arbeit zum Schneiden der dünnen Polymertrennfolien und der dünnen Silikonfolien verwendet.

3.3.1 Mikrofräsen

Mikrofräsen ist aufgrund seiner vielfältigen Strukturierungsmöglichkeiten und der Schnelligkeit der Komplettbearbeitung die für die Herstellung komplexer drei-dimensionaler mikrostrukturierter Geometrien am meisten verwendete kostengünstige Fertigungstechnik. Bei der Fräsbearbeitung wird ein eingespanntes Werkstück durch den rotierten Fräser abgetragen [41]. In Abbildung 3.3 werden unterschiedliche Arten der Fräsbearbeitung schematisch dargestellt.

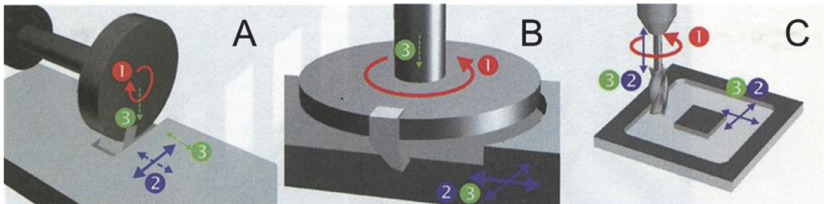


Abbildung 3.3: Unterschiedliche Arten der Fräsbearbeitung (A: Formfräsen, B: Planfräsen, C: Profilfräsen, ❶: Schnittbewegung, ❷: Vorschub, ❸: Zustellung) (verändert nach [41])

Wie in Abbildung 3.3 dargestellt, gibt es unterschiedliche Arten der Fräsbearbeitung: Form-, Plan- und Profilfräsen. Diese drei unterschiedlichen Fräsbearbeitungen verwenden gleiche Bearbeitungsvorgänge. Zum Beginn der Fräsbearbeitung wird der Fräser in vertikale Richtung bewegt und dadurch kann man den Fräser mit dem zu fräsenden Werkstück in Kontakt bringen (Nullpunktdefinieren) (Abb. 3.3, ❸). Nach dem Nullpunktdefinieren des Fräasers wird das Werkstück durch Drehen des Fräasers in Abhängigkeit von der Zustellungtiefe abgetragen (Abb. 3.3, ❶). Beim Fräsen wird die abgetragene Stelle durch die Werkstückbewegung (Abb. 3.3, ❷) definiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden insbesondere Plan- und Profilfräsen für die Herste-

llung der mikrofluidischen Plattform verwendet. Das Planfräsen wurde zur Reduzierung der Materialplatte und dadurch zur Herstellung einer gleichmäßigen Oberflächen und Plattendicke verwendet und das Profilfräsen kam zur Herstellung der komplexen drei-dimensionalen mikrostrukturierten Geometrien zum Einsatz. Im Folgenden sind die Vorteile der Fräsbearbeitung aufgelistet:

- vielfältige drei-dimensionale Strukturierungsmöglichkeiten,
- kostengünstige Herstellung von Prototypenwerkstücken oder Kleinserien,
- große bearbeitbare Werkstoffvielfalt,
- Schnelligkeit der Komplettbearbeitung,
- Kombinationsmöglichkeit mit Replikationstechniken für die Massenfertigung.

Trotz dieser Vorteile können bei der Fräsbearbeitung Grate, unerwünschte Rillen oder Frässpuren auf der Werkstückoberfläche entstehen, da das Werkstück durch die Bewegung der rotierten Fräser abgetragen wird und daher der Fräser bei der Fräsbearbeitung nicht ständig in Kontakt mit dem Werkstück steht [41]. Diese durch die Fräsbearbeitung entstehenden Frässpuren und Grate können durch die Auswahl des Fräswerkzeugs oder der Frässtrategie sowie durch eine Nachpolierung reduziert werden. Die REM-Bilder in Abbildung 3.4 veranschaulichen die durch die Fräsbearbeitung entstehenden Frässpuren und Grate von Mikrobauanteilen. Das Funktionsprinzip und die Grundlagen der REM-Aufnahme werden im Abschnitt 3.5 erörtert.

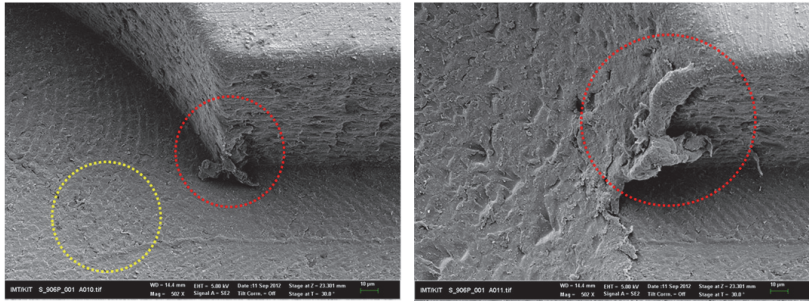


Abbildung 3.4: REM-Bilder der durch die Fräsbearbeitung entstehenden Frässpuren und Grate von Mikrobauteilen (rote Markierung: Grate, gelbe Markierung: Frässpuren)

Die Genauigkeit der Strukturen hängt von verschiedenen Faktoren wie z.B. Material des Werkstücks, Fräswerkzeug, Schnittgeschwindigkeit, Zustellvorgang und Maschinengenauigkeit ab. Die Präzision und Reproduzierbarkeit des Zustellvorgangs und die Strukturqualität der bearbeiteten Bauteile sind stark von der Erfahrung des Maschinenbedieners abhängig. Durch die präzise Mikrofräsbearbeitung können komplex strukturierte Mikrobauteile mit Oberflächen in optischer Qualität in hoher Genauigkeit bzw. mit einer Rauigkeit im Bereich weniger Nanometer und mit Formtoleranzen im Submikrometerbereich gefertigt werden [42].

3.3.2 Mikrofunktenerosion (μ EDM)

Mikrofunktenerosion (engl.: Micro Electro Discharge Machining, μ EDM) wird in der Mikrosystemtechnik für die Mikrostrukturierung elektrisch leitender Werkstücke, die mechanisch nicht oder schwierig bearbeitbar sind, verwendet [34]. Bei der Mikrofunktenerosion wird ein elektrisch leitendes Werkstück durch die elektrische Entladung (Funken), die beim Anlegen einer elektrischen Spannung bei genügend kleinem Abstand zwischen Werkstück- und Werkzeugelektrode entsteht, abgetragen. Die Abtragung durch Mikrofun-

3. Technische Grundlagen

kenerosion erfolgt in drei Phasen, der Aufbau-, Entlade- und Abbauphase [34, 43, 44, 45]. Die Funkenerosion kommt meistens in zwei unterschiedlichen Arten, der Draht- und Senkerosion, zum Einsatz. Die Drahterosion wird meist zum funkerosiven Schneiden des Werkstücks verwendet, wobei ein Draht als Werkzeugelektrode benutzt wird. Die Senkerosion wird zum Abtragen des Werkstücks für die Herstellung der komplexen drei-dimensionalen Geometrien verwendet. Daher wird bei der Senkerosion eine negativ strukturierte Elektrode des zu abtragenden Werkstücks als Werkzeugelektrode benutzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde insbesondere die Drahterosion zum Abtrennen der Elektrodenstücke aus einer Silberplatte verwendet. Diese Vorgänge werden schematisch in Abbildung 3.5 dargestellt.

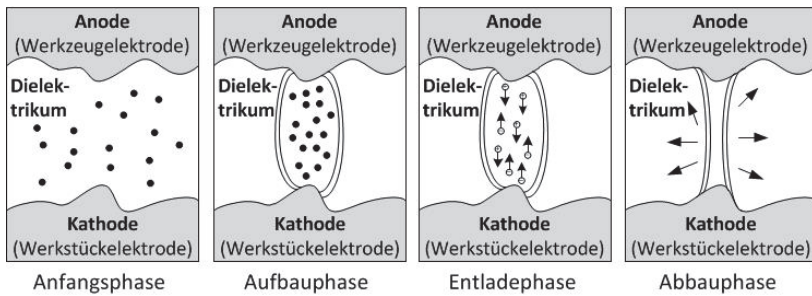


Abbildung 3.5: Abtragungsvorgänge der Mikrofunkenerosion (verändert nach [34])

Bei der Aufbauphase sind die Werkstück- und Werkzeugelektrode durch ein flüssiges Dielektrikum elektrisch voneinander isoliert und beim Anlegen einer Gleichspannung durch einen Generator wird die höchste elektrische Feldstärke am engsten Spalt zwischen beiden Elektroden erzeugt. Bei Übersteigen der Durchschlagfestigkeit des Dielektrikums durch die angelegte Spannung bildet sich ein Entladekanal. Darin werden Elektronen an der Kathode herausgelöst, die sich im Dielektrikum durch den Einfluss des elektrischen Feldes auf die Anode zu bewegen. Die durch Stoßionisation der Elektroden mit neutralen Teilchen im Dielektrikum entstehenden Ionen bilden einen

Plasmakanal [34, 46, 47, 48, 49, 50]. Bei der anschließenden Entladephase findet die Umwandlung von elektrischer Energie in thermische Energie statt. Durch diese Energieumwandlung wird das Werkstück bis über den Siedepunkt erhitzt und schließlich geschmolzen und verdampft [41, 51]. Bei der letzten Phase, der Abbauphase, bricht der Plasmakanal durch Abschalten der Spannung zusammen und das aufgeschmolzene und verdampfte Abtragmaterial aus Werkstück- und Werkzeugelektrode wird weggespült [41, 51, 52, 53].

Zwar ermöglicht es die Mikrofunktenerosion, mechanisch nicht oder schwierig bearbeitbare elektrisch leitende Materialien mit hoher geometrischer Genauigkeit zu strukturieren, aber die Oberfläche des abgetragenen Werkstücks weist eine hohe Rauigkeit auf, da die Werkstückoberfläche bei der Bearbeitung aufgeschmolzen wird. Deshalb ist dieses Fertigungsverfahren nur dann geeignet, wenn keine hohe Oberflächenqualität erforderlich ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Mikrofunktenerosion zum Abtrennen der Elektrodenstücke aus der Silberplatte verwendet, die für das Anlegen eines elektrischen Feldes im System eingesetzt werden.

3.3.3 Lasermikrobearbeitung

Die Lasertechnik kommt in der Mikrosystemtechnik für viele verschiedene Anwendungen wie z.B. Laserschweißen, Laserschneiden und Laserstrukturierung zum Einsatz. In Abhängigkeit von den Anwendungsfeldern werden unterschiedliche Lasertypen verwendet. Die am häufigsten verwendeten Lasertypen für die Mikrobearbeitung sind CO₂-Laser, Kupferdampf-Laser, Excimer-Laser und Nd:YAG-Laser. Die Laserbearbeitung bietet in einigen Fällen Fertigungsmöglichkeiten, die bei anderen Fertigungstechniken schwierig oder nicht erreichbar sind. Im Folgenden sind die zahlreichen Vorteile der Laserbearbeitung aufgelistet [41]:

3. Technische Grundlagen

- hohe Präzision und Genauigkeit,
- hohe Bearbeitungsgeschwindigkeit,
- berührungslose Bearbeitung,
- breites Bearbeitungsspektrum an bearbeitbaren Materialien,
- vielfältige Strukturierungsmöglichkeit.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Laserbearbeitung zum Schneiden dünner Kunststofffolien verwendet, da die Laserbearbeitung ein berührungsloses Kunststoffschneiden in hoher Genauigkeit ermöglicht. Durch die geeignete Auswahl vom Lasertyp und durch zahlreiche Parameterstudien können optimale Bearbeitungsergebnisse erzielt werden. Die Laserschneidbearbeitung in dieser Arbeit wurde mit einem Nd:YAG-Laser (Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat) am Institut für Produktionstechnik (wbk) im Karlsruher Institut für Technologie (KIT) durchgeführt. Zum Laserschneiden kommt die Lasermikrobearbeitungsanlage *microPULSE ps355* der Firma 3D-Micromac AG mit dem programmierbaren CNC-Steuerungssystem *Aerotech Automation 3200* der Firma Aerotech AG zum Einsatz. In Abbildung 3.6 wird die in dieser Arbeit zum Laserschneiden verwendete Lasermikrobearbeitungsanlage dargestellt.



Abbildung 3.6: Lasermikrobearbeitungsanlage *microPULSE ps355* der 3D-Micromac AG

Das Kunststoffschneiden durch Laserstrahlung wird von verschiedenen physikalischen Größen wie z.B. der Intensität und der Pulsdauer des Laserlichtes sowie der Stoffeigenschaften beeinflusst. Das eingestrahelte Laserlicht wird vom Werkstück absorbiert und die Absorption des Laserlichts wird durch den Intensitätsunterschied zwischen Anfangs- und Endintensität, die aus dem *Lambert-Beer-Gesetz* erhalten wird, beschrieben (absorbierte Energie = $I_o - I$) [40]:

$$I = I_o \cdot e^{-\alpha \cdot d} \quad (3.23)$$

Dabei sind I die Intensität, I_o die Anfangsintensität des Laserlichts, α der Absorptionskoeffizient und d die Werkstückdicke. Die Intensität des eingestrahelten Laserlichts nimmt im Werkstück exponentiell ab und wegen dieses absorbierten Laserlichts wird die Stelle im Werkstück, wo das Laserlicht fokussiert wird, erhitzt und verdampft. Dadurch kann man die definierte Struktur vom Werkstück abtrennen.

3.3.4 Heißprägen

Heißprägen ist eine Kunststoffabformungstechnik, bei der ein thermoplastischer Kunststoff über seine Glasübergangstemperatur erhitzt und durch Prägekräfte umgeformt wird. Der Heißprägevorgang besteht aus folgenden vier Schritten:

1. Erwärmung des Werkstücks auf die Umformtemperatur,
2. isotherme Umformung durch Prägen,
3. Abkühlen des Werkstücks auf die Entformtemperatur,
4. Entformen des Werkstücks durch die Öffnungsbewegung der Prägemaschine.

3. Technische Grundlagen

Bei der Erwärmungsphase werden die Heizplatten der Heißprägemaschine unter Vakuum auf Umformtemperatur, die oberhalb der Glasübergangstemperatur des Kunststoffes liegt, erwärmt. Durch die Erwärmung wird der Kunststoff, der auf die von der unteren Heizplatte miterwärmte Entformplatte gelegt wird, auf diese Temperatur erhitzt. Bei dieser Temperatur befindet sich der Kunststoff im formänderungs- oder fließfähigen Zustand und anschließend wird der erwärmte Kunststoff durch die Prägekraft umgeformt. Ist die voreingestellte maximale Prägekraft erreicht, werden die Kraft und die Temperatur unter Vakuum konstant gehalten, um die Formeinsatzstruktur mit dem Kunststoff vollständig zu befüllen. Nach der Umformungsphase werden die Heizplatten und der Formeinsatz auf Entformtemperatur, die unterhalb der Glasübergangstemperatur des Kunststoffes liegt, abgekühlt und bei Erreichen dieser Temperatur wird durch den Öffnungsvorgang der Heißprägemaschine das geprägte Werkstück aus dem Formeinsatz entformt [34, 54]. Zu diesem Zweck hat die Entformplatte eine angeraute Oberfläche. In Abbildung 3.7 wird der Prozessablauf des Heißprägevorgangs schematisch dargestellt.

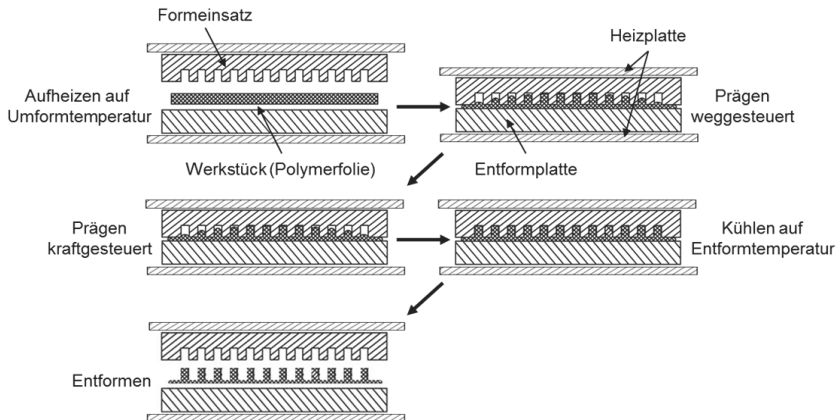


Abbildung 3.7: Schematischer Prozessablauf des Heißprägevorgangs (verändert nach [54])

Um optimale Ergebnisse aus dem Heißprägen zu erzielen, müssen neben den Material- und Prägeprozessparametern wie Umformtemperatur, Prägekraft, Prägeschwindigkeit, Nachdruckzeit, Entformtemperatur und Entformgeschwindigkeit vielfältige Einflussgrößen wie z.B. Geometrie, Anordnung, Oberflächenrauigkeit der Mikrostrukturen auf dem Formeinsatz, Materialeigenschaften des Formeinsatzes und Maschinengenauigkeit berücksichtigt werden [54].

3.4 Verbindungstechnik

Im folgenden Abschnitt werden die für diese Arbeit relevanten Verbindungstechniken zum Zusammenbau der unterschiedlichen Komponenten erläutert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Thermobonding zum Zusammenbau zweier oder mehrerer Kunststoffteile, die einen möglichst geringen Unterschied der Glasübergangstemperatur besitzen, und das Klebverfahren zum Zusammenfügen der Bauteile in den Fällen, in denen Thermobonding nicht möglich ist, verwendet.

3.4.1 Thermobonding

Beim thermischen Bonding bzw. Thermobonding werden zwei oder mehrere Fügepartner unter Verwendung einer beheizbaren Presse stoffschlüssig zusammengefügt. Zum stoffschlüssigen Zusammenfügen der beiden Kunststoffe werden die Fügepartner auf oberhalb der Glasübergangstemperatur beheizt und unter hohem Druck gepresst. Die verchromten Messingplatten werden aufgrund ihrer guten Wärmeleitfähigkeit und ausreichenden Festigkeit als Hilfsmittel verwendet, um Unebenheiten der Heizplatte auszugleichen und dadurch eine unterschiedliche Temperatur- und Druckverteilung auf die Bauteile während des Bondprozesses zu vermeiden. Darüber hinaus kann mit Hilfe

einer dünnen Silikonmatte, die zwischen der unteren Heiz- und Messingplatte liegt, eine bessere Temperatur- und Druckverteilung auf die Bauteile erzielt werden.

Zu Beginn des thermischen Bondens werden die obere und untere Heizplatte der Bondmaschine auf eine Temperatur oberhalb der Glasübergangstemperatur des Kunststoffes vorgewärmt. Nach dem Erreichen dieser Temperatur werden die zwischen den beiden Messingplatten aufgelegten Bauteile auf die Heizplatte angebracht. Die in die erwärmten Heizplatten eingeschobenen Messingplatten und Kunststoffteile werden ausreichend lang aufgeheizt, bis sie auf diese Temperatur erwärmt werden. Anschließend werden die Bauteile unter der konstanten Temperatur mit dem voreingestellten Pressdruck gepresst. Auf diese Weise werden die Bauteile stoffschlüssig miteinander verbunden. In Abbildung 3.8 wird das Prinzip des Bondprozesses schematisch dargestellt.

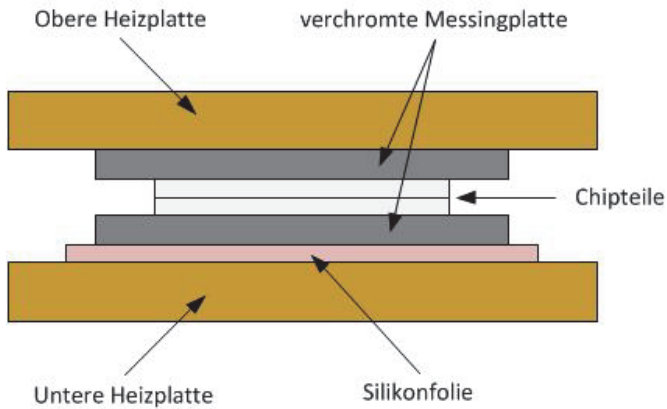


Abbildung 3.8: Schematischer Aufbau beim Thermobonding

Das optimale Bonden der Bauteile wird durch die geeignete Einstellung der drei Parameter Bondtemperatur T_B , Kolbenkraft F_K und Haltezeit t_H ermöglicht.

cht. Die Kolbenkraft wird durch die Kontaktfläche der beiden Bauteile und den Bonddruck wie folgt berechnet:

$$F_K = P_B \cdot A_B. \quad (3.24)$$

Dabei ist A_B die Kontaktfläche der zu bondenden beiden Bauteile und P_B der Bonddruck. Der Bonddruck beträgt erfahrungsmäßig $3,357 \text{ N/mm}^2$ [55, 56]. Dieser Bonddruck ist der eigentliche Solldruckwert während des Bondprozessesverlaufs. Um diesen Wert bei der in dieser Arbeit verwendeten Bondmaschine der Firma Robert Bürkle GmbH einzustellen, lassen sich dieser Bonddruck in die Kolbenkraft mit Hilfe der obigen Formel 3.24 umrechnen. Für die Bürkle-Bondmaschine existiert eine Tabelle (Anhang 1), die die Beziehung zwischen der berechneten Kolbenkraft F_K und Kolbendruck P_K definiert. Durch diese Tabelle kann man den Kolbendruck entsprechend der umgerechneten Kolbenkraft bestimmen und bei der Bondmaschine einstellen. Die weiteren Parameter wie die Bondtemperatur und die Haltezeit ergibt sich aus den in Vorversuchen gewonnenen Erfahrungen.

3.4.2 Klebverfahren

Zum Zusammenfügen zweier oder mehrerer Materialien, die unterschiedliche thermische Eigenschaften und Materialeigenschaften besitzen, wurde in dieser Arbeit das UV-Kleben verwendet. Beim UV-Kleben wird der flüssige Klebstoff nach der Verteilung im Fügebereich durch ultraviolettes Licht ausgehärtet. Die Vorteile dieser Technik liegen darin, dass über einen langen Zeitraum eine genaue Justierung der Füge Teile und etwaige Korrekturen möglich sind, bevor der Klebstoff mittels UV-Licht in kurzer Zeit ausgehärtet werden kann [57]. Der in dieser Arbeit verwendete Klebstoff ist photoinitiiertes polymerisierendes Thiol-ene Typ NOA (Norland Optical Adhesive) der Firma Norland Products (Bezugsquelle: Firma Edmund Optics GmbH).

3. Technische Grundlagen

Dieser Klebstoff kann aufgrund seiner vielfältigen vorteilhaften Eigenschaften wie z.B. seiner guten Biokompatibilität, der geringen Autofluoreszenz und der guten Transparenz nicht nur als Klebstoff sondern auch als Gießmaterial zum Einsatz kommen [58, 59]. Das allgemeine Reaktionsprinzip von Thiol-ene wird in Abbildung 3.9 dargestellt [60, 61].

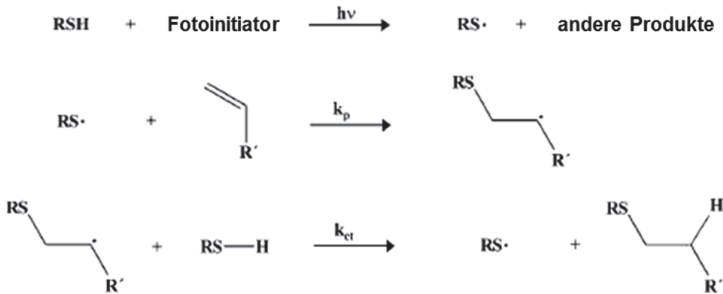


Abbildung 3.9: Reaktionsprinzip der photoinitiiert polymerisierenden Thiol-ene (verändert nach [60])

Dabei sind k_p die Propagationskonstante, k_{ct} die Kettenübertragungskonstante (engl. *chain transfer constant*). Die Photopolymerisation der Thiol-ene basiert auf der Zugabe einer thiol-funktionellen Gruppe ($-SH$) an einer ene-funktionelle Gruppe ($-C=C-$). Durch die Belichtung entstehen die Thiylradikale ($RS\cdot$), die sich von Thiol ableiten. Die Reaktion verläuft sequentiell über die Ausbreitung eines Thiylradikals durch eine ene-funktionellen Gruppe. Das daraus entstehende Produkt regeneriert das Thiylradikal durch eine Kettenübertragung eines Wasserstoffes aus dem Thiol. Diese aufeinanderfolgenden Ausbreitungs- und Kettenübertragungsmechanismen sind die Basis für die Photopolymerisation der Thiol-ene [62].

3.5 Optische Untersuchungsmethoden

3.5.1 Rasterelektronenmikroskop (REM)

Als Rasterelektronenmikroskopie (engl. *Scanning Electron Microscopy, SEM*) wird eine elektronenmikroskopische Untersuchungsmethode zur drei-dimensionalen Abbildung von Oberflächen bezeichnet. Bei REM wird ein gebündelter Elektronenstrahl durch die elektromagnetischen Ablenkspulen auf die zu untersuchenden Objekte geführt. Zur Ableitung des auf die Oberfläche der zu untersuchenden Objekte geführten Elektronenstrahls lässt sich die Oberfläche durch leitfähige Metalle wie z.B. Gold beschichten und wird mit Primärelektronen abgerastert. Die aus der Wechselwirkung mit der Probenoberfläche resultierende Emission von Sekundärelektronen (SE) und Rückstreuielektronen (RE) werden in unterschiedlichen Detektorsystemen aufgefangen und auf dem Schirm einer Kathodenstrahlröhre synchron zur Abbildung zusammengesetzt [63, 64]. Das Auflösungsvermögen des REM ist etwa 40 mal höher als das des Lichtmikroskops, da bei der REM-Untersuchung beschleunigte Elektronen verwendet werden. Dies ermöglicht die Beobachtung bei Vergrößerungen unterhalb 1000-fach beliebige räumliche Strukturen. Daher ist das REM besonders gut geeignet für die Untersuchung der Oberfläche [64, 65]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden REM-Aufnahmen für die Überprüfung der Oberflächenqualität der gefertigten Chipteile verwendet, wobei Frässpuren, Gratbildungen und Rauigkeit des Chipteils nach der Fräsbearbeitung beobachtet und Korrekturmaßnahmen erkannt werden können. In Abbildung 3.10 wird die Prinzipskizze des Rasterelektronenmikroskops dargestellt.

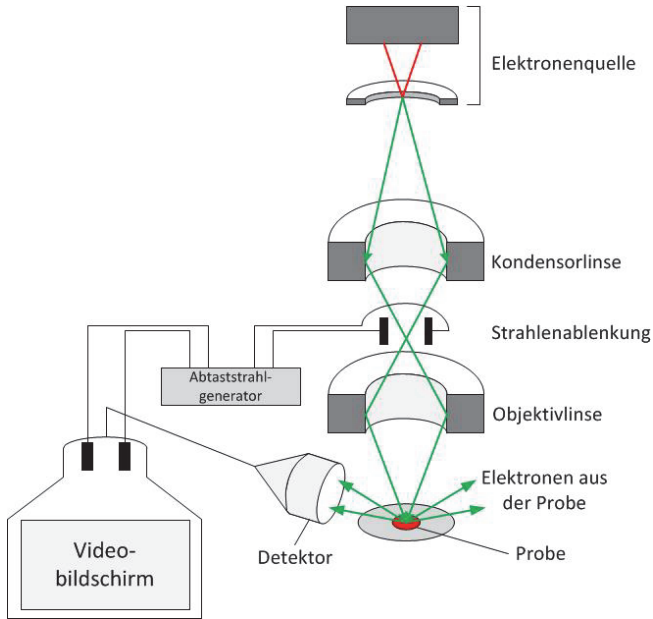


Abbildung 3.10: Prinzipskizze des Rasterelektronenmikroskops (verändert nach [2])

3.5.2 Fluoreszenzmikroskopie

Das Funktionsprinzip eines Fluoreszenzmikroskops ist ähnlich wie das eines gewöhnlichen Lichtmikroskops. Der Unterschied ist, dass das Fluoreszenzmikroskop zusätzlich zwei Filtersysteme enthält, die nur bestimmte Wellenlängen passieren lassen. Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops kann man die mit einem fluoreszierenden Farbstoff (ANNINE-6, Kap. 2.6) gefärbte Probe im schwarzen Hintergrund bzw. im maximalen Bildkontrast betrachten. Darüber hinaus ist auch die Messung der von der Probe emittierten Fluoreszenzintensität möglich [2, 66, 67]. Da im Rahmen dieser Arbeit die Pflanzenzelle, die sich im mikrofluidischen Kanal befindet, mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden soll, sollte das Chipmaterial möglichst geringe Autofluoreszenz aufweisen und möglichst transparent sein. Dadurch kann

eine optimale Messung mit dem Fluoreszenzmikroskop erfolgen. In dieser Arbeit kommt ein *Axiovert 200M* der Firma Carl Zeiss AG als Mikroskop mit einer *Lamda DG-4 plus* Lichtquelle der Firma Sutter Instrument Company zum Einsatz. In Abbildung 3.11 ist der Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops schematisch dargestellt.

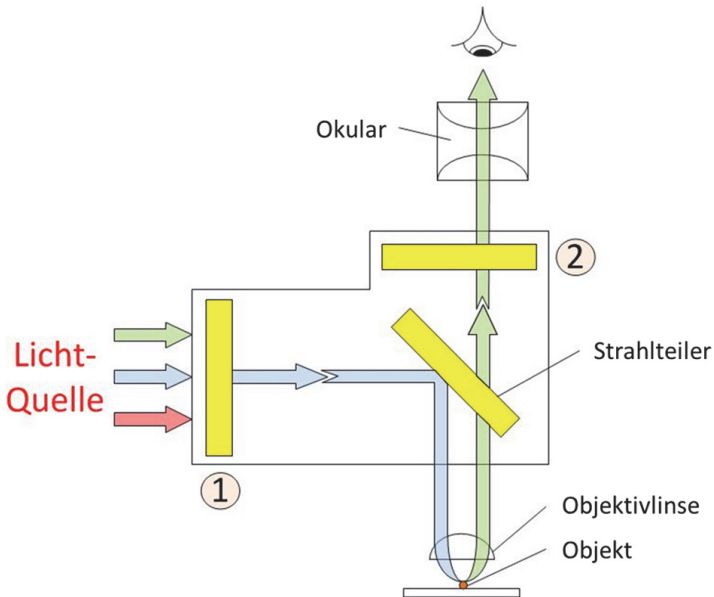


Abbildung 3.11: Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops (verändert nach [2])

Wie in Abbildung 3.11 zu erkennen, wird das Licht, das aus der Lichtquelle ausgesendet wird, durch einen Bandpassfilter (1) geleitet, den nur die Wellenlängen, die auch den Fluoreszenzfarbstoff anregen können, passieren können. Alle anderen Wellenlängen werden zurückgehalten. Das gefilterte Licht erreicht die mit dem fluoreszierenden Farbstoff markierte Pflanzenzelle und regt diesen an. Durch die Anregung der gefärbten Zelle emittiert die Zelle Fluoreszenzlicht einer anderen Wellenlänge, das durch das zweite Emissionsfilter (2) geleitet wird, so dass nur die mit der Fluoreszenzwellenlänge des verwend-

3. Technische Grundlagen

ten Farbstoffs übereinstimmenden Signale den Filter passieren können [2, 28, 66]. Abbildung 3.12 zeigt das in dieser Arbeit verwendete Fluoreszenzmikroskop.



Abbildung 3.12: Fluoreszenzmikroskop (links) und Lichtquelle (rechts)

4 Konzept für das NIMEP-System und Vorbereitung der Zellenanalyse

Dieser Abschnitt beschreibt das Strukturkonzept und die Idee der nicht-invasiven mikrofluidischen Plattform, mit der die herkömmliche Patch-Clamp-Messung ersetzt werden kann. Dazu werden in diesem Abschnitt der Herstellungsprozess der einzelnen Teilkomponenten und deren Integration in den gesamten Systemaufbau dargestellt.

4.1 Konzept und Idee

Um die Patch-Clamp-Messung in einer mikrofluidischen Plattform zu ermöglichen, soll das gesamte mikrofluidische System mehrere Aufgaben erfüllen:

- Antransport der Zellen,
- Vorsortierung der Zellen,
- Fixierung einer Zelle,
- Lösungsmittelaustausch der Zellsuspension,
- Transparenter Aufbau zur mikroskopischen Überwachung,
- Material mit geringer Autofluoreszenz für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen,
- Durchführung von elektrophysiologischen Messungen.

Zum Ermöglichen dieser Funktionen besteht der mikrofluidische Gesamtaufbau aus drei Hauptkomponenten, dem Zellsortiersystem, dem Zellfixiersystem und dem Medien austauschsystem. In Abbildung 4.1 wird die Funktion der mikrofluidischen Plattform schematisch dargestellt. Im unteren Bereich befindet sich das Zellsortiersystem, dessen Herz ein Kreuzstück darstellt. Die Zelllösung fließt von rechts nach links durch den hier horizontal dargestellten Kanal des Kreuzstücks. In der Mitte vom Kreuzstück können einzelne Zellen

4. Konzept für das NIMEP-System und Vorbereitung der Zellenanalyse

mikroskopisch beobachtet und eine gewünschte Zelle durch ein von unten eingeleitetes Lösemittel in den vertikal verlaufenden Kanal nach oben abgelenkt werden. Von dort aus gelangt die Zelle in das Zellfixierteilsystem und wird dort in einem konischen Kanal fixiert. Die vor und hinter dem Konuskanal angeordneten Medienaustauschsysteme erlauben es, nach der Fixierung der Zelle die in der Nähe der Zelle befindlichen Wirkstoffe beidseitig durch neu zugeführte Lösemittel auszutauschen. Anschließend wird durch zwei Elektroden ein elektrisches Feld an die Zelle angelegt und der durch das externe Feld erzeugte transzelluläre Summenstrom durch elektrophysiologische Standard-Messtechnik erfasst.

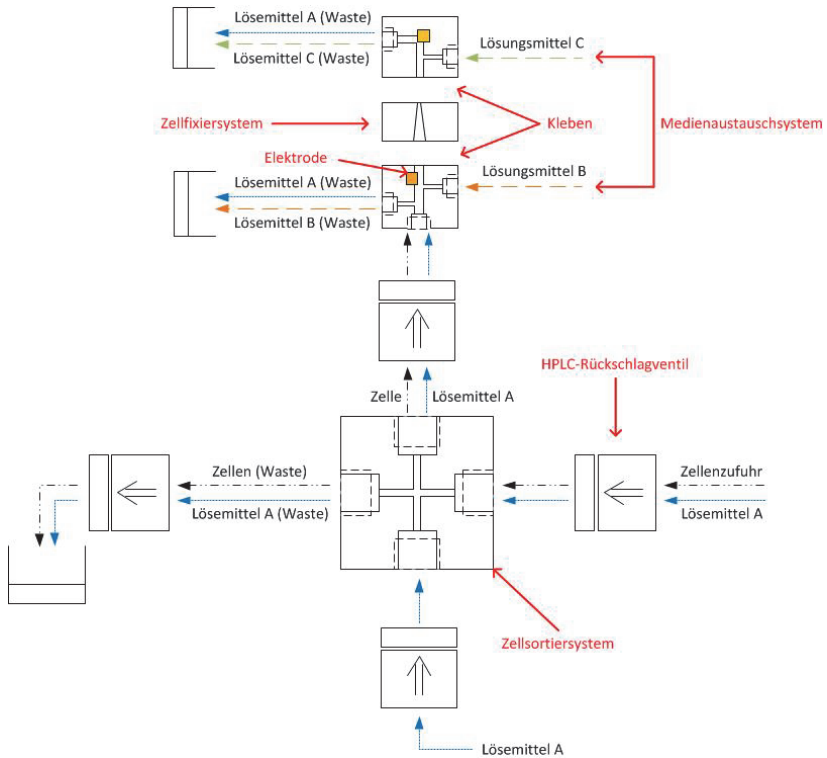


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Funktion der mikrofluidischen Plattform

Wie in der obigen Abbildung zu erkennen, können das Zellsortier- und Medienaustauschsystem mit Hilfe von HPLC-Bauteilen und das Zellfixiersystem und die beiden Medienaustauschsysteme mit Hilfe des Klebens miteinander verbunden werden. In diesem Konzept kann die Flussrichtung von Zelle und Lösemittel durch HPLC-Rückschlagventile kontrolliert werden. Dies bedeutet, dass mit Hilfe des Rückschlagventils, das sich im unteren Bereich vom Kreuzstück befindet, und der bei der Zellzufuhr mit Blindstopfen geschlossenen Anschlüsse vom Medienaustauschteil die Zelllösung nur durch den horizontalen Kanal fließt. Bei der Zellsortierung fließt die Zelllösung nur durch den vertikalen Kanal mit Hilfe des Rückschlagventils, das sich im rechten Bereich vom Kreuzstück befindet, und des bei der Zufuhr von Druck über den unteren Anschluss mit Blindstopfen geschlossenen Rückschlagventils, das sich im linken Bereich vom Kreuzstück befindet. Außerdem wird beim Medienaustausch mit Hilfe des sich zwischen Medienaustauschteil und Zellsortierteil befindenden Rückschlagventils verhindert, dass der Wirkstoff in den unteren Bereich d.h. ins Zellsortiersystem fließt. Zur Realisierung dieser Idee werden im folgenden Abschnitt einzelne Teilkomponenten prototypisch aufgebaut und charakterisiert.

4.2 Erprobung der einzelnen Komponenten

4.2.1 Herstellung des Zellsortierteils

Als erster Schritt zur Herstellung des Zellsortierteils wird in der IMT-Werkstatt ein Kreuzstück für die Zellsortierung aus PMMA gefertigt. Mit diesem prototypischen Kreuzstück kann die prinzipielle Funktionstüchtigkeit des Kreuzkanals für die Zellsortierung überprüft werden und dadurch kann die Struktur und das Herstellungsverfahren des Kreuzkanals weiter charakterisiert und optimiert werden. Für die direkte Verbindung zwischen dem Kreuz-

4. Konzept für das NIMEP-System und Vorbereitung der Zellenanalyse

stück und den HPLC-Bauteilen wird die Dicke des Kreuzstücks so ausgewählt, dass die Gewinde entsprechend der Gewindedurchmesser des HPLC-Anschlussbauteils UNF 1/4" 28 G direkt ins Kreuzstück eingebaut werden kann. Zur Herstellung des Kreuzkanals wird das Kreuzstück direkt gebohrt. Die Konstruktionszeichnung des Kreuzstücks wird in Abbildung 4.2 dargestellt.

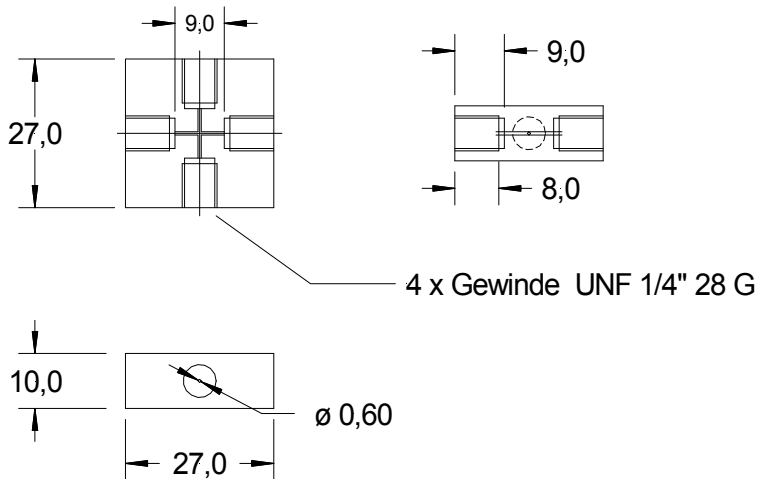


Abbildung 4.2: Kreuzstück aus PMMA mit gebohrten Kanälen

Bei der Fertigung stellte sich heraus, dass mit dem 0,6 mm durchmessenden Bohrer allenfalls 10 mm lange Bohrungen gemacht werden können, so dass bei einer vorgesehenen Länge der gekreuzten Kanäle von 12 mm diese von allen 4 Seiten des Kreuzstücks aus gebohrt werden müssen. Diese Methode hat allerdings den Nachteil, dass sich die Bohrungen nicht ausreichend exakt positionieren lassen, wodurch im Kreuzungsbereich ein Versatz auftritt. Außerdem kann man beim Bohren keine glatte Kanaloberfläche herstellen. Dadurch kann die Zelle beim Transport verletzt werden und es ergibt sich eine Sichtbehinderung bei den mikroskopischen Untersuchungen der sich im

Kanal befindenden Zelle. In Abbildung 4.3 sind das gefertigte Kreuzstück und der Versatz in der Mitte des Kreuzkanals dargestellt. Des Weiteren sind Trübungen der Seitenwand des gebohrten Bereiches erkennbar.

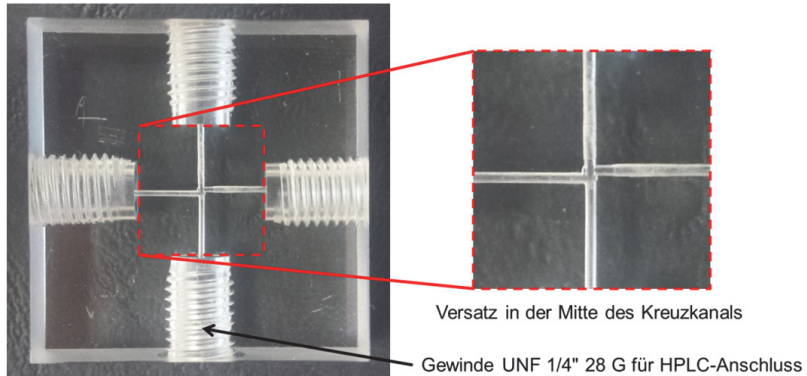


Abbildung 4.3: Gefertigtes Kreuzstück und Versatz in der Mitte des Kreuzkanals

Um den Versatz in der Mitte des Kreuzkanals zu vermeiden und die Oberfläche der Kanalinnenwände zu verbessern, werden die Kanäle als zwei Hälften mit rechteckigem Querschnitt durch Fräsbearbeitung hergestellt und dann die beiden Hälften mittels thermischen Bondens miteinander verbunden. Die Fräsbearbeitung soll später durch ein entsprechendes Replikationsverfahren wie Spritzgießen oder Heißprägen ersetzt werden. Da die Gewinde für die HPLC-Verschraubungen nun nicht mehr in das Bauteil integriert werden können, wird ein anderes fluidisches Anschlusskonzept verwendet. Die Kontaktierung erfolgt nun von oben mit Hilfe von Hohlschrauben und einer Dichtscheibe. Die Gewinde für diese Verschraubungen werden in eine zusätzliche Halterung verlegt, die das gesamte mikrofluidische Bauteil fixiert. Abbildung 4.4 zeigt den Querschnitt des fluidischen Anschlusses.

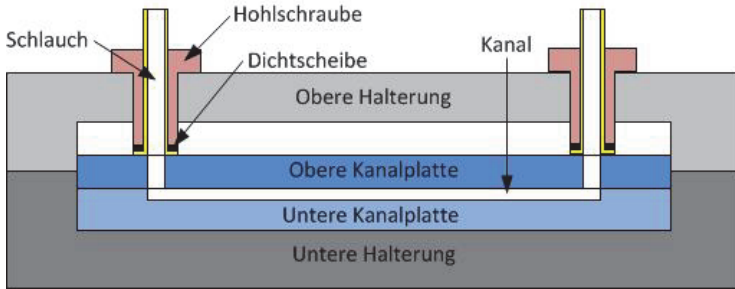


Abbildung 4.4: Querschnitt des fluidischen Anschlusses

4.2.2 Herstellung des Zellfixierteils durch Replikationstechnik

Um ein Zellfixiersystem mit konischem Kanal, das optisch transparent sein soll, zu fertigen, ist eine Fertigungsmöglichkeit, diesen aus Polymeren über Replikationsverfahren, wie beispielsweise das Heißprägen oder Gießverfahren, herzustellen. Das Werkzeug, der so genannte Formeinsatz, muss dabei zwei wichtige Anforderungen erfüllen:

- Der Formeinsatz muss möglichst glatte Seitenwände aufweisen, damit die Zelle sich optimal an die Zellwand anschmiegen kann und somit die Leckströme reduziert werden können.
- Der Formeinsatz der konischen Kanalstruktur soll ein möglichst hohes Aspektverhältnis aufweisen, damit unterschiedliche große Zellen in einem gewissen Spielraum fixiert werden können.

4.2.2.1 Heißprägen

Das Abformwerkzeug wird so konzipiert, dass ein auswechselbarer Messingstift im Zentrum des Formeinsatzes angeordnet ist, der über einen Bund auf der Rückseite des Formeinsatzes positioniert und fixiert werden kann. Der Formeinsatz und der Stift in Messing wurden von der Firma I-SYS Mikro-

4. Konzept für das NIMEP-System und Vorbereitung der Zellenanalyse

und Feinwerktechnik GmbH gefertigt (Anhang 2). Der Vorteil bei dieser Ausführung des Formeinsatzes ist, dass bei einem defekten Stift dieser sehr schnell ersetzt werden kann, ohne den Formeinsatz komplett auszutauschen. Der Messingstift weist an der Spitze einen Durchmesser von $50\ \mu\text{m}$ auf, der sich auf einer Länge von $4\ \text{mm}$ auf $400\ \mu\text{m}$ erweitert. Abbildung 4.5 zeigt den Stift und den Formeinsatz mit zentraler Bohrung zur Aufnahme des Einsatz-Stiftes und Abbildung 4.6 zeigt REM-Aufnahmen des oberen Endes eines gefertigten Einsatz-Stiftes sowie eine Detailaufnahme der Seitenwand. Messungen ergaben einen typischen Spitzendurchmesser von knapp über $50\ \mu\text{m}$. Die durch die Bearbeitung entstandene Seitenwandrauigkeit liegt die unter $1\ \mu\text{m}$.

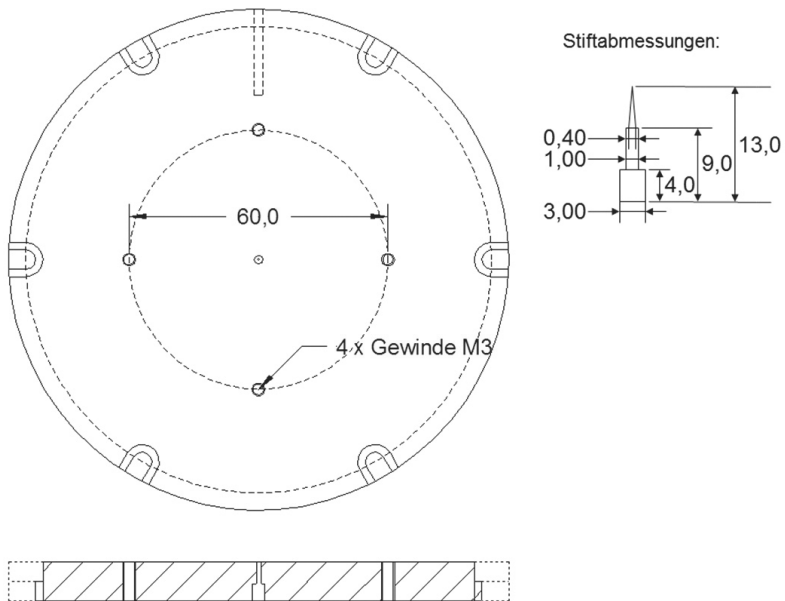


Abbildung 4.5: Formeinsatzkonzept mit zentraler Bohrung zur Aufnahme des Einsatz-Stiftes

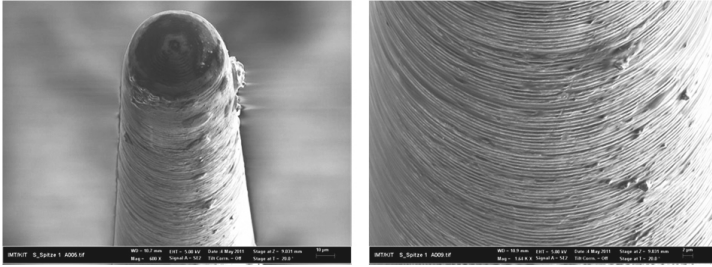


Abbildung 4.6: REM-Aufnahmen von einem gefertigten Einsatz-Stift

Zusätzlich wird durch die IMT-Werkstatt eine 4 mm hohe Blende hergestellt, die auf der Entformplatte montiert werden kann und die Aufgabe hat, beim Heißprägen das weich gewordene Polymer in Position zu halten, damit der nötige Abformdruck erzeugt werden kann (siehe Abb. 4.7). Gleichzeitig begrenzt sie durch ihren zentralen quadratischen Ausschnitt mit 15 mm Kantenlänge den Materialverbrauch. Zusätzlich wird durch einen Hinterschnitt erreicht, dass das abgeformte Werkstück auf der Entformplattenseite fixiert wird.

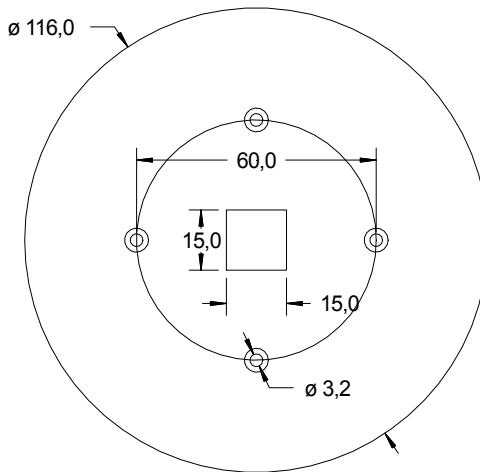


Abbildung 4.7: Blende mit zentraler 15 x 15 mm² großer Öffnung

Mit diesem Formwerkzeug wurden erste Abformversuche in Polycarbonat (PC) durchgeführt. Um den sehr dünnen Messingstift nicht zu stark zu belasten, wurden für diese Abformungen 4 mm starke PC-Plättchen verwendet, die eine zentrale Bohrung mit einem Durchmesser von 1 mm hatten. So konnte der Stift berührungsfrei ins Polymer eingetaucht werden. Erst dann wird das PC auf die Abformungstemperatur erhitzt, so dass es von allen Seiten an den Stift heran fließen kann. Bereits beim ersten Abformversuch wies die Spitze des konischen Kanals eine leichte Deformation auf (siehe Abb. 4.8, links). Die zweite Abformung führte zu einem ähnlichen Ergebnis, während bei der dritten Abformung die Spitze stark verbogen wurde (siehe Abb. 4.8, rechts).

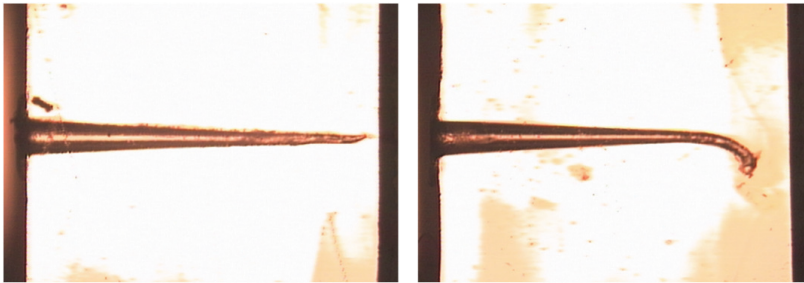


Abbildung 4.8: Mikroskopaufnahmen der abgeformten konischen Strukturen (links: 1. Abformung; rechts: 3. Abformung)

Um dieses auftretende Verbiegungsproblem zu analysieren, wird die Biegleichung der kegelförmigen Struktur abgeleitet und die Abhängigkeit der Verbiegung von den unterschiedlichen Parametern numerisch berechnet und analysiert. Anschließend werden die daraus resultierenden Ergebnisse mit Simulationsergebnissen verglichen. Im Folgenden wird die Verbiegung der kegelförmigen Struktur schematisch dargestellt (siehe Abb. 4.9). Die Biegleichung lautet im vorliegenden Fall:

$$y = \frac{2 \cdot F \cdot l^2}{3 \cdot \pi \cdot E \cdot b^3 \cdot [(a-b) \cdot x + b \cdot l]^2} \cdot \left[(2 \cdot a - 3 \cdot b) \cdot x^3 + 3 \cdot b \cdot l \cdot x^2 \right] + \frac{8 \cdot F \cdot (1 + \mu)}{3 \cdot \pi \cdot E \cdot r^2} \quad (4.1)$$

Dabei sind F die Differenzkraft der Polymerschmelze, l die Länge des Stifts, E der Elastizitätsmodul, a der Radius der Stiftspitze, b der Radius der Stiftbasis, r der mittlere Radius des Stifts und μ die Querkontraktionszahl. Da das Heißprägen bei einer Temperatur oberhalb von Glasübergangstemperatur des Polymers durchgeführt wird (siehe Abschn. 3.3.4), soll der Elastizitätsmodul entsprechend dieser Temperatur in die obige Gleichung eingesetzt werden.

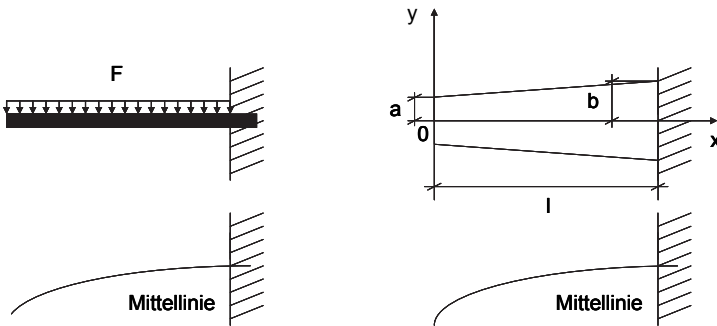


Abbildung 4.9: Biegung der einseitig eingespannten kegelförmigen Struktur

Die Temperaturabhängigkeit vom Elastizitätsmodul wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$E(T) = E(0K) \cdot \left(1 - 0.5 \cdot \frac{T}{T_m} \right) \quad (4.2)$$

Dabei ist T die Bearbeitungstemperatur und T_m die Schmelztemperatur des verwendeten Materials. Mit obigen Gleichungen wird die Verbiegung unterschiedlicher Werkzeugmaterialien in Abhängigkeit von der Stiftlänge und der Differenzkraft der Polymerschmelze berechnet. Dadurch können das geeignete Werkzeugmaterial und dessen Länge für das Heißprägen ausgewählt

werden, wobei eine Verbiegung des Stifts möglichst vermieden werden sollte. Um die Verbiegung von Messing- und Stahlstiften miteinander zu vergleichen, wird der jeweilige Elastizitätsmodul bei der gewählten Umformtemperatur von PC von 230 °C wie folgt berechnet:

$$\begin{aligned} T_{m, \text{Messing}} &= 910 \text{ }^\circ\text{C} = 1183 \text{ K}, \\ T_{m, \text{Stahl}} &= 1536 \text{ }^\circ\text{C} = 1809 \text{ K}, \end{aligned} \tag{4.3}$$

$$\begin{aligned} E_{\text{Messing}}(0 \text{ K}) &= 114134,11 \text{ N/mm}^2, \\ E_{\text{Stahl}}(0 \text{ K}) &= 228505,27 \text{ N/mm}^2, \end{aligned} \tag{4.4}$$

$$\begin{aligned} E_{\text{Messing}}(230 \text{ }^\circ\text{C} = 503 \text{ K}) &= 114134,11 \cdot \left(1 - 0,5 \cdot \frac{503}{1183}\right) = 89869,757 \text{ N/mm}^2, \\ E_{\text{Stahl}}(230 \text{ }^\circ\text{C} = 503 \text{ K}) &= 228505,27 \cdot \left(1 - 0,5 \cdot \frac{503}{1809}\right) = 1967736,84 \text{ N/mm}^2. \end{aligned} \tag{4.5}$$

Neben dem unterschiedlichen Elastizitätsmodul soll die Stiftlänge für die Berechnung berücksichtigt werden. Um die Spitzendurchmesser des Stifts und die ursprünglich geplante Steigung beizubehalten, wird der Basisdurchmesser des Stifts abhängig von der Stiftlänge geändert. In Tabelle 4.1 sind die entsprechenden Basisdurchmesser in Abhängigkeit von der Stiftlänge aufgeführt.

Stiftlänge in mm	4	3,5	3	2,5	2
Basisdurchmesser in μm	400	365	320	275	230

Tabelle 4.1: Basisdurchmesser in Abhängigkeit von der Stiftlänge

Durch das Einsetzen der oben berechneten Parameter in die Gleichung 4.1 kann man die Verbiegung der Messing- und Stahlstifte in Abhängigkeit von der Stiftlänge und der Differenzkraft berechnen. Die daraus resultierenden Verbiegungen sind in den nachfolgenden Abbildungen grafisch dargestellt.

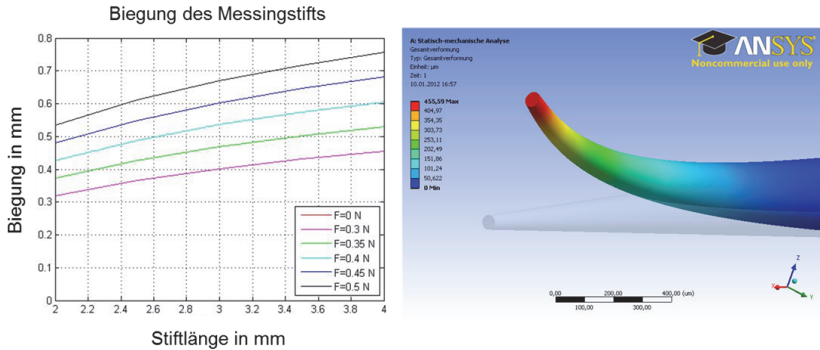


Abbildung 4.10: Grafische Darstellung der Verbiegung des Messingstifts

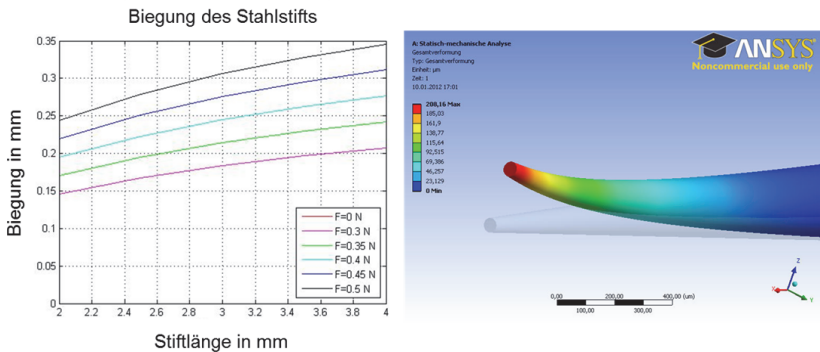


Abbildung 4.11: Grafische Darstellung der Verbiegung des Stahlstifts

Aus den obigen Ergebnissen kann man erkennen, dass die Verbiegung des Stifts wegen seines hohen Aspektverhältnisses und seiner duktilen Eigenschaft nicht vollständig vermieden werden kann. Dies bedeutet, dass das Aspektverhältnis reduziert und ein noch härteres Werkzeugmaterial verwendet werden soll. Außerdem kann man durch die Wahl einer alternativen Replikationstechnik, mit der die Abformung bei niedrigeren Temperaturen durchgeführt und die auf den Stift wirkende Belastung reduziert werden kann, die Herstellung der konischen Kanalstruktur optimieren.

Aus diesem Grund wird Hartmetall als ein alternatives Abformwerkzeugmaterial ausgewählt, da es ein spröderes und härteres Material ist und sein Elastizitätsmodul mehr als 2-fach größer als der von Stahl ist. Dies bedeutet, dass der Hartmetallstift im Vergleich zum Messing- und Stahlstift bei der Abformung kaum verbogen wird. Allerdings besteht beim Hartmetallstift eine erhöhte Bruchgefahr. Zwei unterschiedliche Hartmetallstifte wurden am Institut für Mikroverfahrenstechnik (IMVT) in Karlsruher Institut für Technologie (KIT) in Campus Nord gefertigt. Da das Hartmetall nicht durch Fräsen bearbeitet werden kann, wurde der Stift mit Hilfe eines Schleifverfahrens gefertigt. Der erste Stift weist an der Spitze einen Durchmesser von 50 μm auf, der sich auf einer Länge von 4 mm auf 400 μm erweitert. Der zweite Stift besitzt eine auf 2 mm reduzierte Stiftlänge und hat einen auf 225 μm reduzierten Basisdurchmesser.

4.2.2.2 Gießverfahren

Als alternative Abformungstechnologie wurde ein Gießverfahren ausgewählt. Durch das Gießverfahren kann man die Differenzkraft der Polymerschmelze reduzieren und mittels eines anderen Polymers wie z.B. Thiol-ene oder PDMS kann die Abformung bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Durch die Abformung bei Raumtemperatur wird eine Reduzierung des Elastizitätsmoduls vermieden (siehe Gl. 4.4 und 4.5) und die Schrumpfung des Polymers minimiert. Durch diese Änderung des Herstellungskonzeptes und Anwendung des alternativen Werkstoffes ist es möglich, in möglichst geringen Belastungszustand die Abformung durchzuführen. Da die Messingstifte vielfältige Vorteile bzw. relativ gute Oberflächenqualität nach der Fertigung besitzen sowie leicht und kostengünstig herstellbar sind, wird weiter geprüft, ob die Herstellung der konischen Kanalstruktur nicht nur mit einem Hartmetallstift, sondern auch mit einem Messingstift möglich ist.

4. Konzept für das NIMEP-System und Vorbereitung der Zellenanalyse

Für das Gießverfahren stehen jeweils Messing- und Hartmetallstifte mit der unterschiedlichen Länge von 2 mm und 4 mm zur Verfügung. Der Messingstift wurde von der Firma I-SYS durch Fräsbearbeitung und der Hartmetallstift vom IMVT durch Schleifverfahren (Anhang 3 und 4) hergestellt. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen REM-Aufnahmen der Spitze und eine vergrößerte Darstellung der Seitenwand der gefertigten beiden Stifttypen.

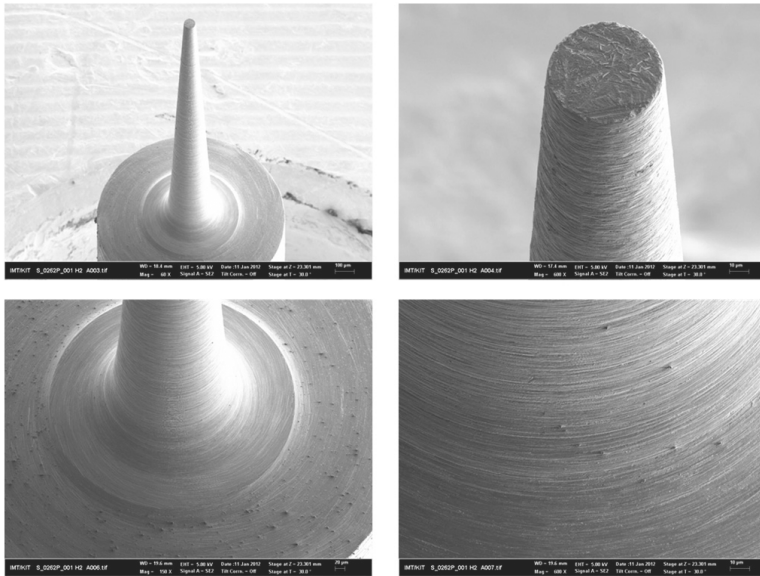


Abbildung 4.12: REM-Aufnahmen eines Messingstifts

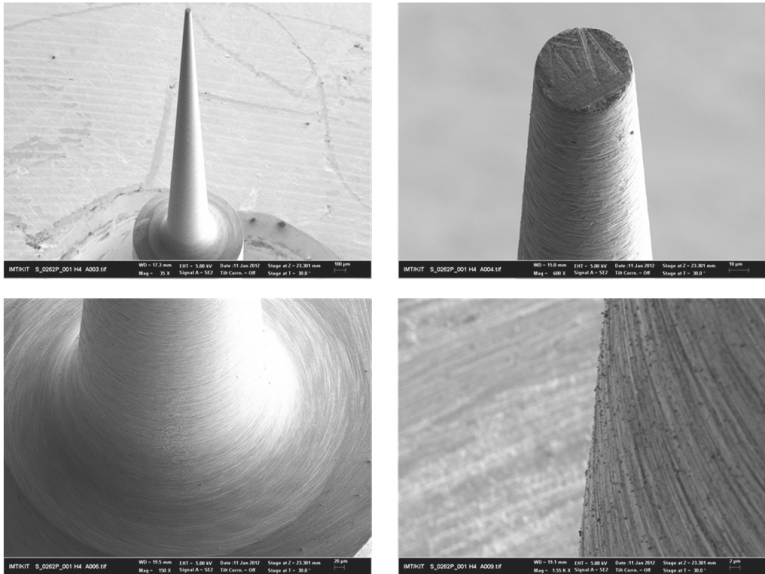


Abbildung 4.13: REM-Aufnahmen eines Hartmetallstifts

Messungen ergeben bei beiden Stiften eine gute Oberflächenqualität. Aufgrund der Fräsbearbeitung entstehen Seitenwandrillen beim Messingstift. Die Tiefe der Rillen liegt deutlich unter $1\ \mu\text{m}$. Im Vergleich zum Messingstift besitzt der gefertigte Hartmetallstift eine ähnlich gute Oberflächenqualität. Für das Gießverfahren wird ein neuer Entwurf der Abformplatte und der zusätzlichen Stützstruktur angefertigt. Im Folgenden wird der gesamte Prozessablauf des Gießverfahrens schematisch dargestellt.

4. Konzept für das NIMEP-System und Vorbereitung der Zellenanalyse

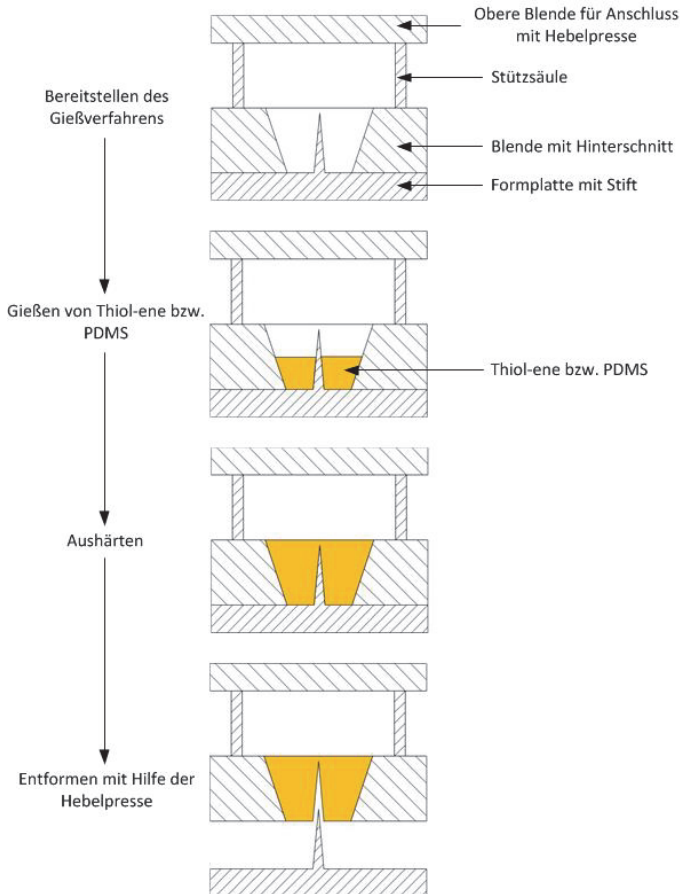


Abbildung 4.14: Schematischer Prozessablauf des Gießvorgangs

Die untere Blende besitzt eine quadratische Öffnung in der Mitte wie die bisherige Stützblende, um das Polymer beim Gießvorgang in Position zu halten und den Materialverbrauch zu begrenzen und einen Hinterschnitt, um das abgeformte Werkstück auf der Entformplattenseite zu fixieren. Da Verkipnungen oder horizontale Bewegungen des Werkzeugs bei der Entnahme des fertigen Bauteils zur Verbiegung des Stifts führen kann, soll der Entformvorgang mit Hilfe einer Hebelpresse durchgeführt werden. Dazu werden die bei-

4. Konzept für das NIMEP-System und Vorbereitung der Zellenanalyse

den Blenden über Stützsäulen miteinander verschraubt und die obere Blende wird mit dem Stempel der Hebelpresse verbunden.

Für das Gießverfahren wird Thiol-ene von der Firma Norland Products als ein alternatives Material ausgewählt, da dieses Material vielfältige Vorteile wie gute Biokompatibilität, geringe Autofluoreszenz und gute Transparenz bietet (siehe Abschn. 3.4.2). Nach dem Zusammenbau des gesamten Gießwerkzeugs wird Thiol-ene langsam in die Mitte der unteren Blende gegossen und durch UV-Strahlung ausgehärtet. Nach vollständiger Aushärtung wird das gefertigte Werkstück mit der unteren Blende durch Hochziehen der Hebelpresse von der Formplatte entformt. In Abbildung 4.15 werden die verwendeten Geräte dargestellt, Abbildung 4.16 zeigt den Prozessablauf des Gießverfahrens.

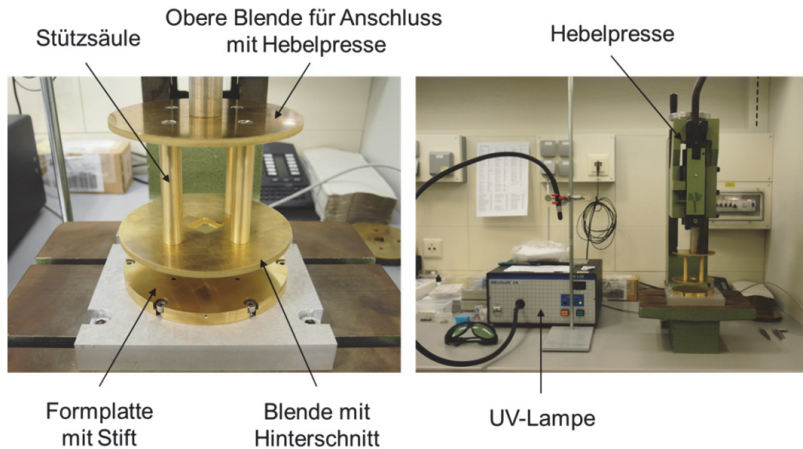


Abbildung 4.15: Montiertes Gießwerkzeug (links) und Arbeitsplatz für den Gießprozess (rechts)

4. Konzept für das NIMEP-System und Vorbereitung der Zellenanalyse

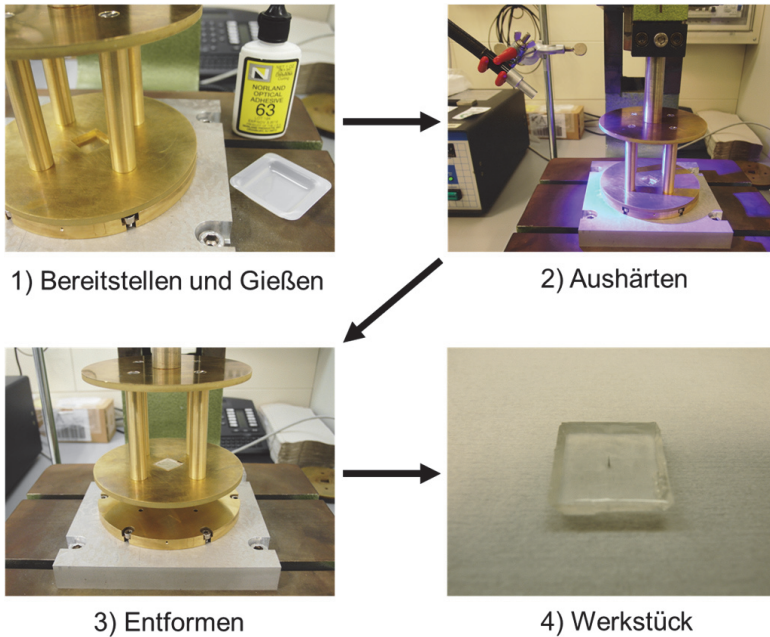


Abbildung 4.16: Prozessablauf eines Gießvorgangs

Um den für das Gießverfahren am besten geeigneten Typ von Thiol-ene auszuwählen, werden die beiden Thiol-ene-Typen NOA 61 und 63 bei Gießversuchen verwendet und miteinander verglichen. Diese beiden Materialien besitzen unterschiedliche Viskosität. Die Viskosität vom NOA 61 beträgt $300 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, die von NOA 63 $2500 \text{ mPa}\cdot\text{s}$. Da sich keine Dichtung an der Kontaktstelle zwischen dem Formeinsatz und der unteren Blende befindet, kann bei niedriger Viskosität des Klebstoffs dieser in die Spalte einfließen, wobei die dabei entweichende Luft meist Blasen im Bauteil entstehen lässt. Außerdem sollten die UV-Strahlungsdauer und der Abstand zwischen dem punktförmigen Austritt des Lichtleiters der UV-Entladungslampe *DELOLUX 04* der Firma DELO Industrie Klebstoffe und der oberen Seite des Klebstoffs für die optimale Aushärtung bestimmt werden. Da der Klebstoff von der

oberen Seite aus ausgehärtet wird, kann die oberste Schicht verbrannt werden, wenn der Klebstoff zu lange Zeit bestrahlt wird. Durch zahlreiche Experimente wurde NOA 63 ausgewählt und die optimalen Parameter wie z.B. Aushärtungsdauer (ca. 40 min) und Abstand zwischen dem UV-Strahler und der oberen Seite des Klebstoffs (ca. 10 cm) bestimmt. Nach der Materialauswahl wurden Gießversuche mit unterschiedlichen Stiften durchgeführt. Im Folgenden werden mikroskopische Aufnahmen der konischen Kanalstruktur dargestellt.

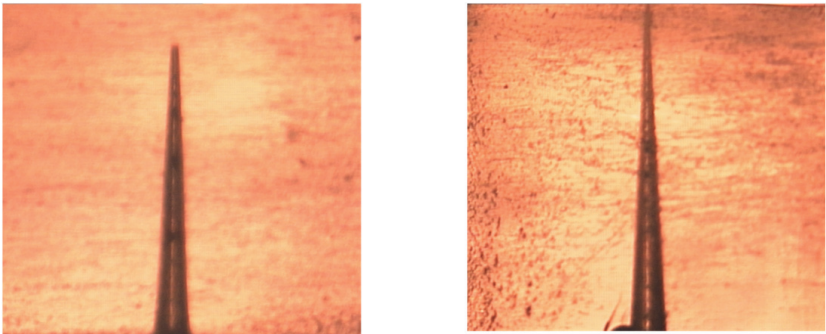


Abbildung 4.17: Mikroskopische Aufnahmen der mit einem Messingstift hergestellten konischen Kanalstruktur (Stiftlängen: links: 2 mm, rechts: 4 mm)

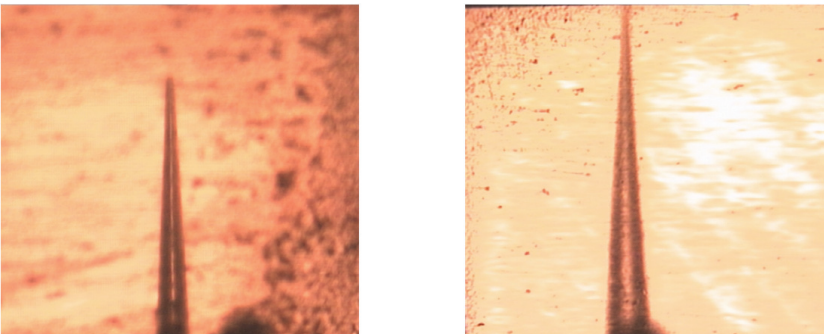


Abbildung 4.18: Mikroskopische Aufnahmen der mit einem Hartmetallstift hergestellten konischen Kanalstruktur (Stiftlängen: links: 2 mm, rechts: 4 mm)

Wie in Abbildung 4.17 und Abbildung 4.18 erkennbar ist, tritt beim Gießverfahren weder bei der Verwendung eines Messingstifts noch bei einem Hartmetallstift ein Biegeproblem auf. Zur Vermeidung des Risikos einer Verbiegung während der Befüllung des Formwerkzeugs sollen künftig Hartmetallstifte für die Herstellung der konischen Kanalstruktur verwendet werden. Außerdem soll die 2 mm lange Kanalstruktur für besseren und einfacheren Lösungsmittelaustausch verwendet werden.

4.2.3 Herstellung eines integrierten Ventilsystems

Die Rückschlagventile, die sich zwischen Zellsortier- und Medienaustauschteil befinden, können zur Verletzung der Zelle beim Transport führen. Außerdem verlängern sie wegen der zusätzlichen Schläuche die Transportstrecke und damit auch den Zeitbedarf für das Experiment. Um diese Nachteile zu vermeiden, wird ein alternatives Ventilsystem entwickelt, das ins System integriert werden kann. Damit kann man sogar alle Teilsysteme mit den beiden Medienaustauschsystemen in einer Strukturplatte integrieren.

Das neue Ventilsystem wird so konzipiert, dass durch die Verformung einer Silikonfolie der Kanal komplett abgeschlossen und wieder geöffnet werden kann. In Abbildung 4.19 wird das Konzept dieses Silikonventils dargestellt.

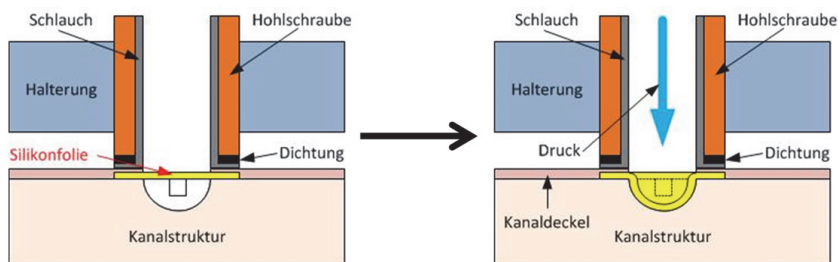


Abbildung 4.19: Konzept des Silikonventils (links: geöffnet, rechts: geschlossen)

Die durch Fräsbearbeitung hergestellte rechteckige Kanalstruktur wird unterhalb der Silikonfolie zu einer Halbkugel erweitert, um durch eine hydraulische Verformung der Silikonfolie ein komplettes Verschließen des Kanals zu ermöglichen. Da der Innendurchmesser der gewählten HPLC-Schläuche 500 μm beträgt, ist die maximale Tiefe der Halbkugel 250 μm . Die Folie soll unter dem Kanaldeckel positioniert werden, um unerwünschte Verformungen, die wegen der Dicke des Kanaldeckels verursacht werden, zu vermeiden. Zur Positionierung und Fixierung der Folie wird ein Absatz, dessen Tiefe ca. 70 % von Dicke der Silikonfolie beträgt, unter dem Kanaldeckel eingebaut. Zur Überprüfung der Funktionalität des Silikonventils wird eine Simulation in Abhängigkeit von den Foliendicken (130 μm und 180 μm) durchgeführt. Entsprechend der Foliendicke ändert sich der Betriebsdruck, der zum Erreichen der maximalen Tiefe der Halbkugel benötigt wird. Für die 130 μm dicke Folie wird ein Betriebsdruck von ca. 0,4 MPa benötigt, während die 180 μm dicke Folie einen Druck von ca. 0,65 MPa erfordert. Abbildung 4.20 veranschaulicht die Ergebnisse der Simulation in Abhängigkeit der Foliendicke.

4. Konzept für das NIMEP-System und Vorbereitung der Zellenanalyse

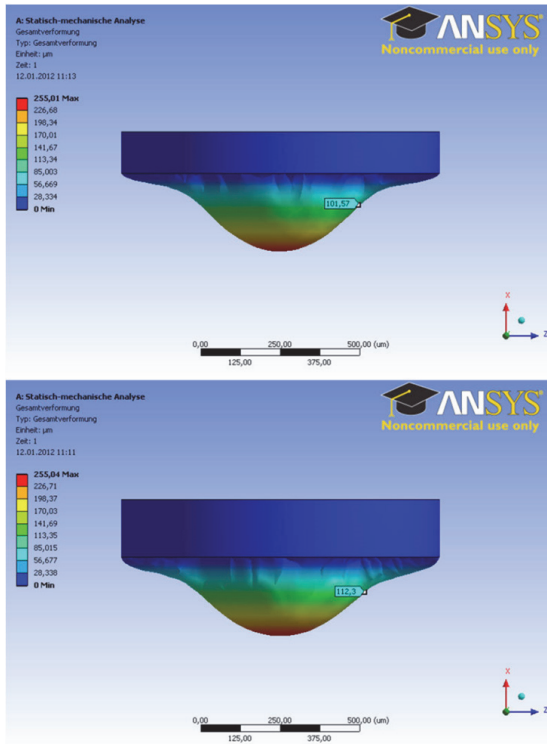


Abbildung 4.20: Ventilsimulation in Abhängigkeit der Foliendicke (oben: 130 µm, unten: 180 µm)

Da die Silikonfolien beim thermischen Bondprozess für das Zusammenfügen von Kanalstrukturplatte und Kanaldeckelplatte hoch geheizt werden, sollen sie eine hohe Wärmebeständigkeit besitzen. Aus diesem Grund werden dampfsterilisierbare Folien von der Firma Spiggle & Theis Medizintechnik GmbH erworben. Diese Folie wird entsprechend der konzipierten Geometrie mit dem am Institut für Produktionstechnik (wbk) des KIT verfügbaren Nd:YAG-Laser geschnitten, da das Laserschneiden ein präzises Schneiden unterschiedlicher Kunststoffe in hoher Genauigkeit ermöglicht. Zum Laserschneiden kommt die Lasermikrobearbeitungsanlage *microPULSE ps355* der Firma 3D-Micromac AG zum Einsatz (siehe Kap. 3.3.3). Für die Überprüfung der

Funktionstüchtigkeit des Silikonventils wird ein Prototyp hergestellt. Der gefertigte Prototyp wird in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt.

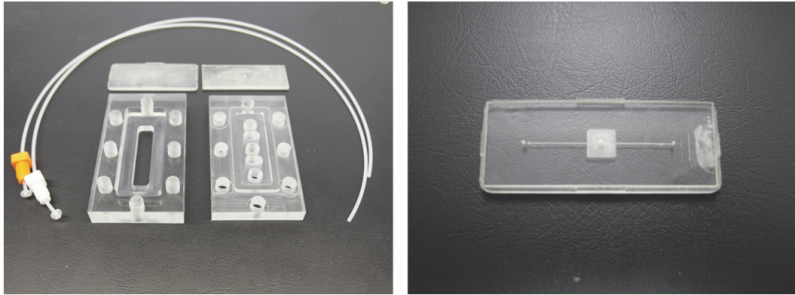


Abbildung 4.21: Darstellung der Halterung zur fluidischen Kontaktierung (links) und gebogener Prototyp (rechts)

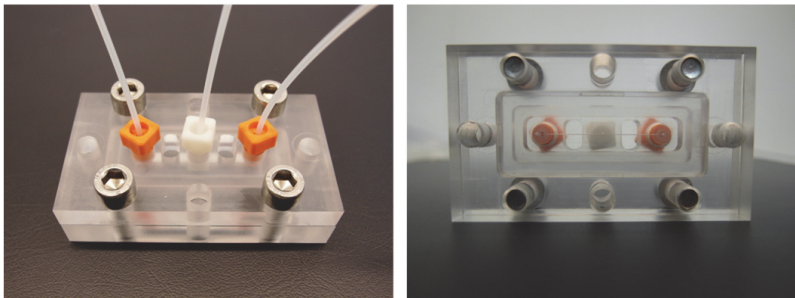


Abbildung 4.22: Zusammengebauter Prototyp

Da dieser Prototyp später ins System integriert werden soll, wird seine Struktur wie z.B. Kanalbreite, Kanallänge und Kanaltiefe so konstruiert, dass das Experiment unter den gleichen Betriebsbedingungen, die später für das System vorausgesetzt werden, durchgeführt werden kann. Die Kanalbreite und die Kanaltiefe betragen jeweils $200\ \mu\text{m}$ und die gesamte Kanallänge beträgt $30\ \text{mm}$. Wie bereits oben beschrieben, ist der Halbkugeldurchmesser $500\ \mu\text{m}$. Zur Visualisierung der Funktionstüchtigkeit des Ventils wird ein blauer Farbstoff in den Kanal zugeführt und das Ventil mit dem Kreuzkanal, der beim ersten Konzept aus PMMA hergestellt wurde, verbunden. In Abbildung 4.23

4. Konzept für das NIMEP-System und Vorbereitung der Zellenanalyse

wird ein Schaltbild für den Versuch der Ventilfunktion schematisch dargestellt. Das obere Schaltbild zeigt einen geschlossenen Zustand und das untere Bild einen offenen Zustand. Abbildung 4.24 zeigt die Ergebnisse des geschlossenen Vorgangs (oben) und des offenen Vorgangs (unten) des Silikonventils.

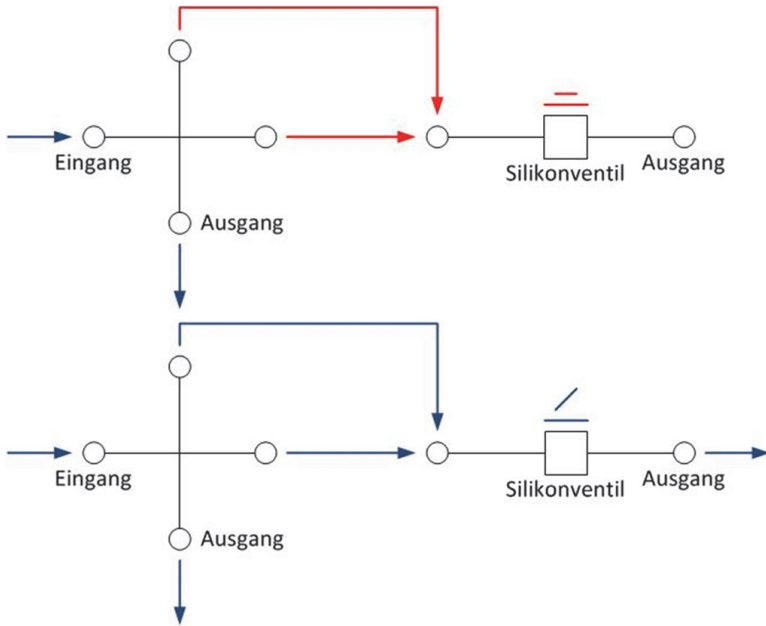


Abbildung 4.23: Schaltbild für den Versuch der Ventilfunktion (blau: Farbstofffluss, rot: kein Farbstofffluss)

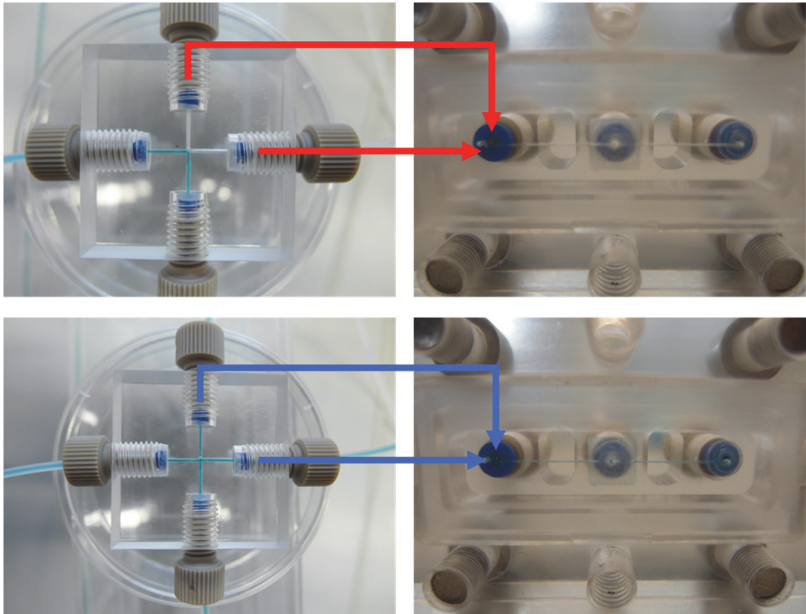


Abbildung 4.24: Strömungsverlauf bei geschlossenem (oben) bzw. geöffnetem Silikonventil (unten)

Zu Beginn des Versuchs wird die Silikonfolie durch hydraulischen Druck, der mit Hilfe einer Spritzenpumpe (*PHD UltraTM Syringe Pump* der Firma Harvard Apparatus) erzeugt wird, verformt und durch diese Verformung der Silikonfolie wird der Kanal vollständig geschlossen. Beim geschlossenen Zustand fließt der blaue Farbstoff nur vom linken Kanal in den unteren Kanal, wie man in Abbildung 4.24 erkennen kann, während der blaue Farbstoff bei geöffnetem Ventil in alle Richtungen fließt. Da der Prototyp des Silikonventils richtig funktioniert, kann man dieses Ventil für die Integration der beiden Komponente bzw. Zellsortier- und Lösungsmittelaustauschsystem einsetzen.

4.2.4 Fazit

In Kapitel 4.2 wurden ein Kreuzkanalstück für die Zellsortierung, eine konische Kanalstruktur für die Zellfixierung und Silikonventile zum Verändern der Fließrichtung hergestellt. Bei der Herstellung des Kreuzkanals traten folgende Probleme auf:

- Große Bauteildicke wegen der Gewinde, die direkt ins Bauteil eingebaut werden,
- Beschränkung von Bohrungsdurchmesser und Kanallänge,
- Versatz der Kanäle im Kreuzbereich,
- Keine saubere Kanaloberfläche,
- Ungeeignete Fertigungsmethode für Massenproduktion.

Um diese Probleme zu vermeiden und damit das Zellsortiersystem zu optimieren, wurde als alternatives Herstellungsverfahren die direkte Fräsbearbeitung ausgewählt. Die Kanäle wurden als zwei Hälften mit rechteckigem Querschnitt durch Fräsbearbeitung hergestellt und dann die beiden Hälften mittels thermischen Bonden miteinander verbunden. Außerdem wurde zur Reduzierung der Bauteildicke ein modifiziertes Anschlusskonzept verwendet, damit die Kontaktierung des Anschlusses mit dem gefrästen Chipteil von oben mit Hilfe von Hohlschrauben und einer Dichtscheibe erfolgen kann. Die Gewinde für diese Verschraubungen werden in eine zusätzliche Halterung verlegt, die das gesamte mikrofluidische Bauteil fixiert.

Bei der Herstellung der konischen Kanalstruktur traten folgende Probleme auf:

- Hohe Anforderungen an die Nachbearbeitung, um das endgültige Endmaß zu erreichen,
- Lange Herstellungsdauer,
- Schwierigkeit bei der Integration mit anderen Komponenten,

- Hohe Anforderungen an die Fertigung,
- Ungeeignete Fertigungsmethode für Massenproduktion.

Zwar konnte man die beim Heißprägen aufgetretenen Verbiegungsprobleme durch das alternative Gießverfahren vermeiden, aber auch das Gießverfahren weist einige Nachteile auf: Beim Befüllen der Form wird die obere Öffnung des konischen Kanals durch das Gießmaterial geschlossen und muss durch eine Nachbearbeitung wie z.B. Fräsbearbeitung wieder geöffnet werden (siehe Abb. 4.25, links). Darüber hinaus soll die Dicke der Seitenwand reduziert werden, da die Zelle, die sich in dieser konischen Kanalstruktur befindet, seitlich beobachtet werden soll (siehe Abb. 4.25, rechts). Dieses Nachbearbeitungsproblem wird in folgenden Abbildungen schematisch dargestellt.

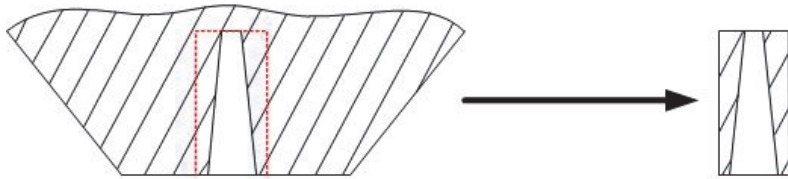


Abbildung 4.25: Nachbearbeitung des durch Gießverfahren hergestellten Bauteils

Das durch das Gießverfahren hergestellte Bauteil stellt nicht nur eine hohe Anforderung an die Nachbearbeitung nach seiner Herstellung, es bestehen auch Schwierigkeiten bei der Integration mit anderen Komponenten wie dem Medien austauschteil. Daher soll im zu entwickelnden Konzept die präzise Integrationsmöglichkeit des Bauteils mit anderen Komponenten gesucht werden.

Zum Erreichen eines möglichst hohen Integrationsgrades wurde ein Silikonventilsystem entwickelt. Mit Hilfe dieser Silikonventile kann man die Verwendung des Rückschlagventils vermeiden und alle Teilsysteme mit den beiden Medien austauschsystemen in einer Strukturplatte integrieren. Durch das Exp-

eriment mit Farbstoff konnte man nachweisen, dass durch diese Verformung der Silikonfolie der Kanal vollständig geschlossen und geöffnet werden kann. Aus diesem Grund wird das Silikonventilsystem zur Integration der einzelnen Teilsysteme weiter verwendet werden. Darüber hinaus kann mit Hilfe der Silikonventile und deren z.B. pneumatische Ansteuerung eine Automatisierung der Schaltvorgänge einfacher ermöglicht werden. Dies bietet später die Möglichkeit, einzelne Schritte der experimentellen Untersuchungen zu automatisieren.

4.3 Vorbereitung der Zellenanalyse

Eine wichtige Aufgabe in der Startphase bestand in der Etablierung der Anzucht der in dieser Arbeit vorgesehenen Modellorganismen und in der Optimierung der Kulturbedingungen. Diese Etablierung der Modellorganismen wurde von der AG Wegner am Institut für Hochleistungsimpuls- und Mikrowellentechnik (IHM) im KIT bearbeitet [68].

4.3.1 Modellorganismen

Bei der Auslegung des Testsystems wurde davon ausgegangen, dass große pflanzliche Zellen mit einem Durchmesser von bis zu 100 μm untersucht werden sollen. Entsprechend wurde der Spitzendurchmesser des Konusteils auf 50 μm festgelegt. Darüber hinaus soll mit dem ausgewählten Zelltyp die fluoreszenzoptische Membranpotentialmessung möglich sein, die wesentliche Voraussetzung für die Anwendung der NIMEP-Technik (Nicht-invasive mikrofluidische Plattform für Elektrophysiologie) ist (siehe Kap. 1.2), und es sollten Referenzmessungen mit der etablierten Patch-Clamp-Technik vorliegen.

Die oben genannten Kriterien erfüllten Protoplasten, die aus den Tabakzelllinien *Nicotiana tabacum* Bright Yellow 2 (BY-2) sowie *Nicotiana tabacum* Virginia Bright Italian 0 (VBI-0) gewonnen werden. Die Zellkulturlinien wurden sowohl als Platten- als auch als Suspensionskultur etabliert. Diese beiden Tabakkulturen sind physiologisch gut charakterisiert, weisen einen kurzen Zellzyklus auf und bei ihnen fehlt die störende Autofluoreszenz des Chlorophylls [30].

4.3.2 Herstellung von Protoplasten

Zur Gewinnung sphärischer Einzelzellen wurden die ausgewählten Modellorganismen durch enzymatischen Abbau der Zellwand protoplastiert. Die für die Protoplastierung verwendeten Enzyme wurden von Duchefa Biochemie B.V. und die verwendeten Chemikalien sowie Nährmedien von der Firma Roth GmbH bezogen. Die Osmolarität der Lösungen wurde mit Hilfe eines Osmometers *VAPRO 5520* der Firma Wescor Inc. bestimmt und mit Mannitol auf den erwünschten Wert eingestellt [30].

Protoplastierung der Tabakzelllinie

Die Methode der Protoplastierung und die Zusammensetzung von Protoplastierlösung und Nährmedien wurden aus der Dissertation von Flickinger (2010) [30] und aus der Masterarbeit von Schönwälder (2012) [28] entnommen. In Tabelle 4.2 sind die Zusammensetzungen der Protoplastierlösung und der Waschlösung aufgeführt.

4. Konzept für das NIMEP-System und Vorbereitung der Zellenanalyse

Protoplastierlösung	
Inhaltsstoff	Menge
Cellulase	30 mg
Marcerozym	15 mg
Pektinase	3 mg
BSA	15 mg
Waschlösung	3 ml

Waschlösung		
Inhaltsstoff	Menge	
	c	m
CaCl ₂ *2H ₂ O	50 mM	0,735 g
NaAcetat	10 mM	0,082 g
Mannitol	0,25 M	4,55 g

Tabelle 4.2: Zusammensetzung der Protoplastierlösung und Waschlösung; Gewichtsangaben bezogen auf 100 ml (c: Konzentration der zugesetzten Lösung, m: Einwaage der Lösung) (verändert nach [28])

In dieser Arbeit wurde die Waschlösung 1:1 mit Wasser verdünnt, um die Osmolarität herabzusetzen. Dadurch kann man noch größere Protoplasten isolieren. Mit Hilfe dieser Lösung wurde die Protoplastierung der in Abschnitt 4.3.1 genannten Modellorganismen durchgeführt. Zunächst wurde die Zellkultur in die Protoplastierlösung überführt und suspendiert. Die in der Protoplastierlösung suspendierte Zellkultur wurde für 3 Stunden im Brutschrank im Dunkeln bei 25 °C inkubiert. Nach dem enzymatischen Abbau der Zellwände wurde das Enzym-Protoplasten-Gemisch in ein 15 ml Falcontube überführt und 5 min lang bei 100·g (g: Erdbeschleunigung = 9,81 m/s²) abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Protoplasten wurden vorsichtig durch leichtes Schwenken resuspendiert. Anschließend wurden den resuspendierten Protoplasten 5 ml Waschlösung zugegeben und erneut 5 min lang bei 100·g abzentrifugiert. Nach der Protoplastierung erfolgte die Aufreinigung der Protoplasten mit Hilfe eines diskontinuierlichen Saccharose-Mannitol-Gradienten [28, 30].

Diskontinuierlicher Saccharose-Mannitol-Gradient zur Aufreinigung der Protoplasten

Die Protoplasten wurden vorsichtig in 5 ml Albach-Lösung I resuspendiert und mit 5 ml Albach-Lösung II überschichtet. Abschließend wurde mit 2 ml Albach-Lösung III überschichtet. Das Protokoll der Albach-Lösungen aus der Dissertation von Flickinger [30] wurde in dieser Arbeit modifiziert, um bei geringeren Osmolaritäten arbeiten zu können und so größere Protoplasten zu isolieren. In der folgenden Tabelle sind die Zusammensetzungen der in dieser Arbeit verwendeten Albach-Lösungen aufgeführt.

	Albach I		Albach II		Albach III	
Inhaltsstoff	Menge		Menge		Menge	
	c	m	c	m	c	m
MES	2,9 mM	0,565 g	2,9 mM	0,565 g	0,175 mM	3,5 mg
Saccharose	125 mM	4,277 g	82,4 mM	9,72 g	163 mM	2,97 g
KCl	0,29 mM	2,32 mg	0,29 mM	2,32 mg	0,35 mM	2,32 mg
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,29 mM	4,35 mg	0,29 mM	4,35 mg	0,35 mM	4,35 mg
Mannitol	/	/	53,1 mM	3,33 g	/	/
MgCl ₂ *6H ₂ O	0,29 mM	6,1 mg	0,29 mM	6,1 mg	0,35 mM	6,1 mg
Ficoll 400 ^a	/	17,5 g	/	14,65 g	/	7,66 g

Tabelle 4.3: Modifizierte Zusammensetzung der Albach-Lösung I / II / III (Fa. Roth, Art. Nr. CN 90.3); Gewichtsangaben bezogen auf 100 ml (c: Konzentration der zugesetzten Lösung, m: Einwaage) (verändert nach [28])

Die Zentrifugation erfolgte mit einer Kühlzentrifuge 10 min lang bei 100-g und 4 °C. Zur deutlichen Trennung der einzelnen Phasen wurde ein Ausschwingrotor bei der Zentrifugation verwendet. Nach der Zentrifugation befanden sich die aufgereinigten Protoplasten zwischen Albach-Lösung II und III, die unteren beiden Bänder bildeten defekte Protoplasten und andere Teilchen (siehe Abb. 4.26). Mit Hilfe einer abgeschnittenen Pipettenspitze wurden die

4. Konzept für das NIMEP-System und Vorbereitung der Zellenanalyse

aufgereinigten Protoplasten aufgenommen und in ein neues 15 ml Falcon-Röhrchen überführt [69].

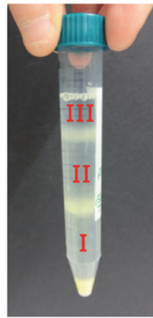


Abbildung 4.26: Protoplastenband zwischen Albach-Lösung II und III [28]

Schließlich wurde 5 ml „W5“-Lösung zur Abtrennung der Protoplasten zu diesen abgenommenen Protoplasten zupipettiert und 5 min lang bei 100-g und 4 °C abzentrifugiert. Die nach der Zentrifugation erhaltenen Protoplasten wurden in 1 ml 16 mS-Puffer (elektrische Leitfähigkeit 16 mS/cm bei 20 °C) resuspendiert [28]. In Tabelle 4.4 ist die Zusammensetzung der „W5“-Lösung und der 16 mS-Puffer aufgeführt.

„W5“-Lösung		
Inhaltsstoff	Menge	
	c	m
NaCl	154 mM	0,9 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	125 mM	1,85 g
KCl	5 mM	0,037 g
Glucose	5 mM	0,1 g
TRIS	1 mM	0,013 g

16 mS-Puffer		
Inhaltsstoff	Menge	
	c	m
KCl	125 mM	0,94 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	5 mM	0,074 g
MgCl ₂ *6H ₂ O	5 mM	0,102 g
Sorbit	150 mM	2,74 g
TRIS	1 mM	0,013 g

Tabelle 4.4: Zusammensetzung der „W5“-Lösung und des 16 mS-Puffer; Gewichtsangaben bezogen auf 100 ml (c: Konzentration der zugesetzten Lösung, m: Einwaage) (verändert nach [28])

Aus beiden Tabakzelllinien *Nicotiana tabacum* Bright Yellow 2 (BY-2) sowie *Nicotiana tabacum* Virginia Bright Italian 0 (VBI-0) wurden erfolgreich Protoplasten isoliert. Nach der Isolierung wurde der Durchmesser der Protoplasten vermessen. Der Durchmesser der Zelllinie VBI-0 lag zwischen 70 μm und 110 μm und bei der Zelllinie BY-2 zwischen 30 μm und 50 μm [68]. In Folgenden werden mikroskopische Aufnahmen von Zellen und den entsprechenden Protoplasten dargestellt.

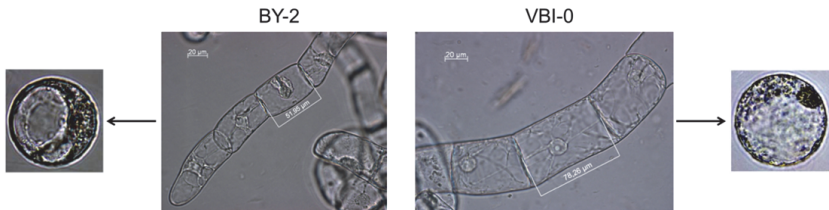


Abbildung 4.27: Zellkulturen (Bildmitte) und die Protoplasten (Bilder rechts und links) der Modellorganismen [28]

Wie in Abbildung 4.27 zu erkennen, kann man nach enzymatischem Abbau der Zellwand eine sphärische Einzelzelle gewinnen. Diese gewonnene Zelle kann durch den spannungsabhängigen Membranfarbstoff ANNINE-6 gefärbt und mit Hilfe dieses Farbstoffs eine fluoreszenzoptische Membranpotentialmessung durchgeführt werden.

Die Wahl für den Einsatz der Zelle in NIMEP-Technik fiel auf die Tabak-Zellkulturlinie Virginia Bright Italian 0 (VBI-0). Die genannte Zelllinie wurde insbesondere wegen der Größe der aus diesen Zellen gewonnen Protoplasten ausgewählt.

4.3.3 Anfärben der Protoplasten mit ANNINE-6

Die durch den enzymatischen Abbau der Zellwand und durch die Aufreinigung gewonnenen Protoplasten wurden mit dem spannungsabhängigen Farbstoff ANNINE-6 gefärbt. Wie im Kapitel 2.6 beschrieben, kann man mit dies-

em Farbstoff die spannungsabhängige Fluoreszenzintensität messen. Der Färbungsprozess wurde aus der Dissertation von Flickinger (2010) [30] und aus der Masterarbeit von Schönwälder (2012) [28] entnommen.

Zur Färbung der Protoplasten wurden 10 μl ANNINE-6-Stammlösung zu 300 μl der aufgereinigten Protoplastensuspension zupipettiert und vorsichtig resuspendiert. Diese mit ANNINE-6 gemischte Protoplastensuspension wurde für 7 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Zum Waschen wurden die Protoplasten bei 100·g für 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert und nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen. Zum Schluss wurde das Protoplastenpellet in 300 μl 16 mS-Puffer resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde einmal wiederholt. Die Lagerung der gefärbten Protoplasten erfolgte im Kühlschrank im Dunkeln [28, 30]. In Abbildung 4.28 werden die Fluoreszenzbilder der mit ANNINE-6 gefärbten Protoplasten dargestellt. Da nur die Zelloberfläche gefärbt und die Zelle im Mikroskop von unten betrachtet wird, erscheint die Intensität am seitlichen Rand der Zelle stärker.

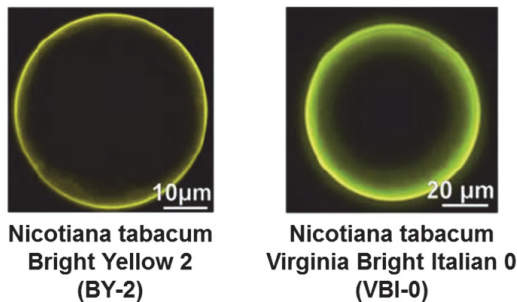


Abbildung 4.28: Fluoreszenzbilder der mit ANNINE-6 gefärbten Protoplasten [30]

4.3.4 Membranpotentialmessung der Protoplasten

Für die fluoreszenzoptische Messung wurde die am Institut für Hochleistungsimpuls- und Mikrowellentechnik (IHM) vorhandene Patch-Clamp-Appa-

ratur verwendet und um eine Fluoreszenzlichtquelle (siehe Kap. 3.5.2), die die Fluoreszenzanregung einzelner Zellen im Zeitfenster einiger Millisekunden erlaubt, und um eine CCD-Kamera ergänzt. Diese Messeinrichtung ermöglicht ein ratiometrisches Verfahren zur Messung des Membranpotentials an pflanzlichen Zellen. Zur Messung des Membranpotentials wurden die mit dem spannungsabhängigen Membranfarbstoff ANNINE-6 gefärbten Zellen nacheinander mit zwei verschiedenen Wellenlängen (390 und 475 nm) angeregt. Die Wellenlängen wurden dabei so ausgewählt, dass bei der einen Wellenlänge die Fluoreszenzintensität möglichst stark spannungsabhängig und bei der anderen möglichst spannungsunabhängig ist. Durch Bildung des Quotienten der spannungsabhängigen und der –unabhängigen Intensitätswerte kann man die spannungssensitive Fluoreszenzemission normieren, so dass das Ergebnis unabhängig ist von anderen Faktoren wie z.B. von der Farbstoffkonzentration in der Zellmembran, die von Färbung zu Färbung und Zelle zu Zelle stark variieren kann oder vom Ausbleich-Effekt. Auf diese Weise können aus den Fluoreszenzmessungen auf absolute Membranpotentiale geschlossen werden [70].

Um den Einfluss der Wellenlängen auf die Spannungsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität zu messen, wurden einem Protoplasten der für diese Arbeit ausgewählten Tabak-Zellkulturlinie Virginia Bright Italian 0 (VBI-0) (siehe Abschn. 4.3.2) in der Whole-Cell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik (siehe Kap. 2.5) verschiedene Membranspannungen aufgeprägt; gleichzeitig wurde der Farbstoff nacheinander mit gleich langen Lichtpulsen der Wellenlängen 390 nm und 475 nm angeregt. Die dadurch gemessene Fluoreszenzintensität war bei 475 nm stark spannungsabhängig, während sie bei 390 nm eine sehr geringe Spannungsabhängigkeit aufwies. Die Wellenlänge von 390 nm wird daher als Referenzwellenlänge eingesetzt [70]. Abbildung 4.29 zeigt die Ergebnisse der Messung der Fluoreszenzintensität der mit ANNINE-

6 gefärbten Protoplasten der Zelllinie VBI-0 bei Anregungswellenlängen von 390 nm (30 ms) und 475 nm (60 ms).

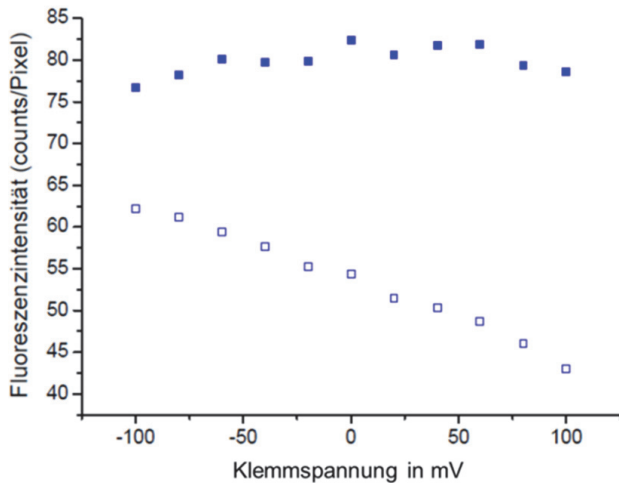


Abbildung 4.29: Messung der Fluoreszenzintensität der mit ANNINE-6 gefärbten Protoplasten der Zelllinie VBI-0 bei Anregungswellenlängen von 390 nm (30 ms, ■) und 475 nm (60 ms, □) sowie die Zusammensetzung der Lösung in Pipette und Bad (oben rechts) [70]

Um den Einfluss der Belichtungszeit auf die ratiometrische Spannungsmessung zu untersuchen, wurde die Belichtungszeit bei beiden Wellenlängen verdoppelt. Abbildung 4.30 zeigt die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Belichtungszeit. Wie in dieser Abbildung zu erkennen, nimmt die Intensitätsstärke mit steigender Belichtungszeit erheblich zu, der Intensitätsquotient ändert sich aber nicht [70]. Aus diesen Ergebnissen kann man folgern, dass die absolute Belichtungszeit keinen Einfluss auf die relative Fluoreszenzintensität für die mit ANNINE-6 gefärbten VBI-Protoplasten hat und das Membranpotential fluoreszenzoptisch mit ausreichender Präzision gemessen werden kann.

4. Konzept für das NIMEP-System und Vorbereitung der Zellenanalyse

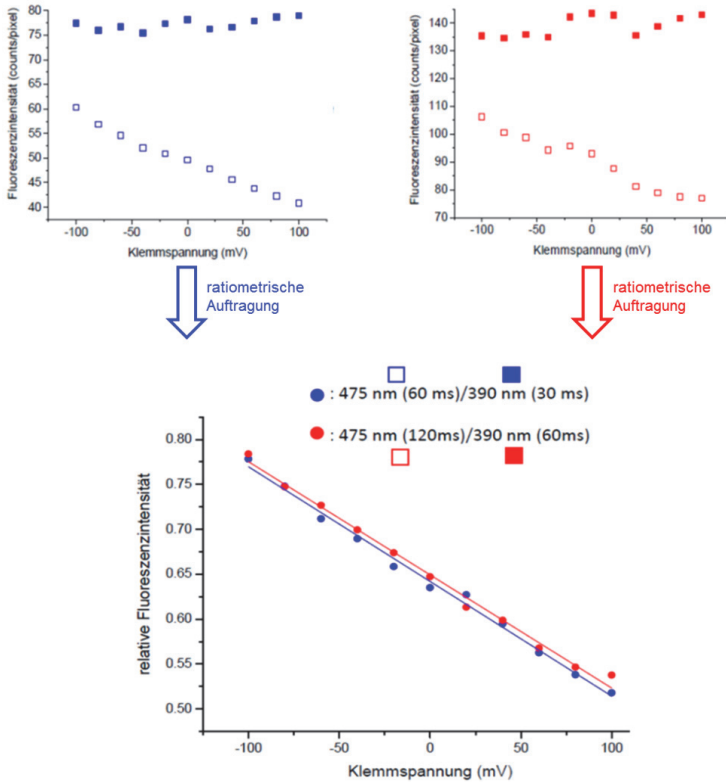


Abbildung 4.30: Vergleich der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Belichtungszeit (verändert nach [70])

In Abbildung 4.31 werden die Kalibrierungskurven der mit ANNINE-6 gefärbten VBI-0-Protoplasten und die Standardabweichung dargestellt. Bei den Messungen der VBI-0-Protoplasten konnte man zwei Fraktionen erhalten, die sich insbesondere hinsichtlich des Achsenabschnitts der Kalibriergraden deutlich unterscheiden. Die Kalibrierungsgleichungen sind in der Abbildung aufgeführt. Mit Hilfe dieser Kalibrierkurven kann eine fluoreszenzoptische Messung des Membranpotentials ermöglicht werden, die eine wesentliche technische Voraussetzung für den Einsatz der NIMEP-Technik ist [71].

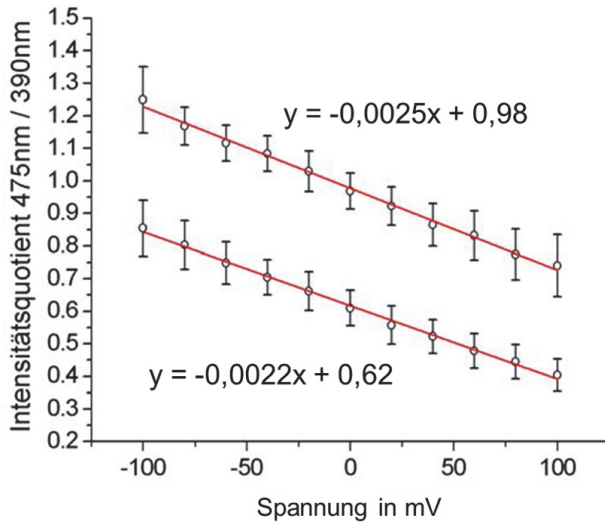


Abbildung 4.31: Kalibrierungskurven und Standardabweichung von unterschiedlichen VBI-0-Protoplasten [28]

5 Konzept für das NIMEP-Gesamtsystem und experimentelle Ergebnisse

5.1 Aufbau des NIMEP-Gesamtsystems

Nachdem im vorangegangenen Kapitel die einzelnen Komponenten des NIMEP-Systems vorgestellt und getestet wurden, wird in diesem Kapitel ein Konzept vorgestellt, das alle Komponenten des Gesamtsystems vereint. Abschließend erfolgt eine weitere Optimierung, die es erlauben würde, das Gesamtsystem einschließlich des Konuskanals mit Hilfe eines Replikationsverfahrens wie Spritzgießen oder Heißprägen herzustellen.

5.1.1 Konzept für das Gesamtsystem

Wie im Kapitel 4.2.1 beschrieben, kommt für die Herstellung der Kanalstrukturen das Fräsverfahren zum Einsatz, um den Versatz in der Mitte des Kreuzkanals zu vermeiden und die Oberfläche der Kanalinnenwand zu verbessern. Durch die Fräsbearbeitung werden die Kanäle als zwei Hälften mit rechteckigem Querschnitt hergestellt und die Bauteildicke kann vermindert werden. Aufgrund der Reduzierung der Bauteildicke kann eine bessere mikroskopische Beobachtung der sich in der Kanalstruktur befindenden Zelle(n) ermöglicht werden. Da die Gewinde für die HPLC-Verschraubung durch die Reduzierung der Bauteildicke nicht mehr ins Bauteil integriert werden können, wird ein neues Anschlussystem mit Hilfe einer Halterung, die mit Verschraubung befestigt werden kann, entwickelt (siehe Abb. 4.4 im Kap. 4.2.1). Vor der Fräsbearbeitung wird ein geeigneter Werkstoff ausgewählt. Aufgrund ihrer hervorragenden Biokompatibilität, die in zahlreichen biomedizinischen Studien nachgewiesen wurde, konzentrierten sich die Testmessungen für die Auswahl des Werkstoffes auf Polystyrol (PS; Norfl-

5. Konzept für das NIMEP-Gesamtsystem und experimentelle Ergebnisse

ex[®], Nordenham, Deutschland) und Cyclic Olefin Copolymer (COC; Topas[®], Höchst, Deutschland). Ein wichtiges Kriterium bei der Auswahl des Werkstoffes ist eine möglichst geringe Eigenfluoreszenz des Materials im relevanten Wellenlängenbereich (ca. 400 bis 750 nm), weil der Werkstoff die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen nicht durch seine Eigenfluoreszenz beeinträchtigen soll. Für die Testmessung wurden Folien mit einer Stärke von 50 μm (PS) und 200–700 μm (COC) verwendet. Beide Werkstoffe erwiesen keine Autofluoreszenz im relevanten Wellenlängenbereich zwischen 400–750 nm. COC hat die etwas besseren optischen Eigenschaften bzgl. des Brechungsindex und wird daher für die Herstellung der Kanalplatten bevorzugt ausgewählt. Im Folgenden werden das geänderte zweidimensionale Konzept und das zusammengebaute Gesamtsystem schematisch dargestellt.

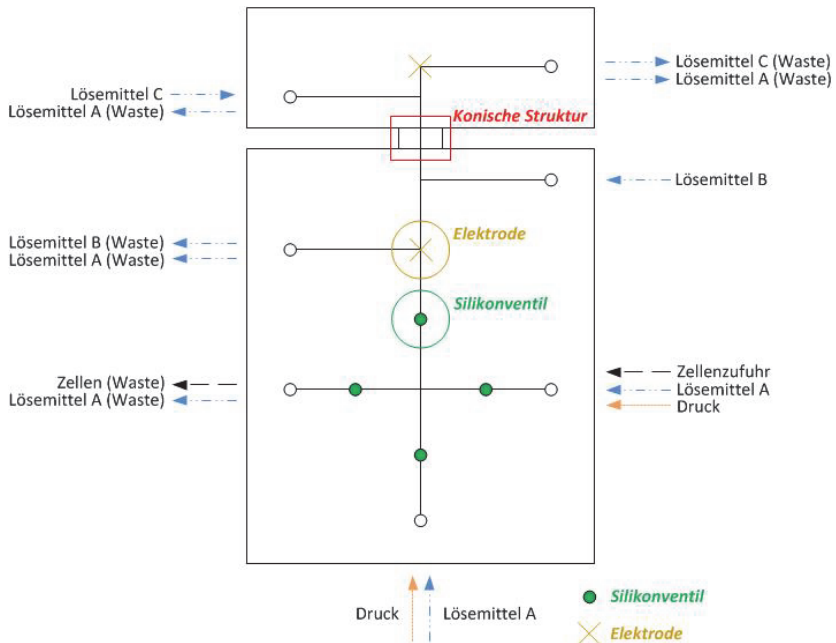


Abbildung 5.1: Zweidimensionale Darstellung des Gesamtsystems

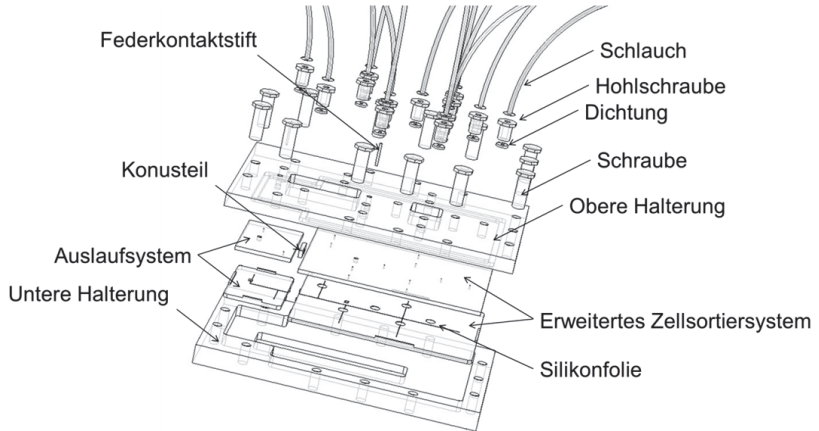


Abbildung 5.2: Dreidimensionale Darstellung des geänderten Konzepts und des zusammengebauten Systems

Abbildung 5.1 zeigt eine zweidimensionale Darstellung des NIMEP-Gesamtsystems. Es besteht aus drei Einzelkomponenten, dem erweiterten Zellsortiersystem, das neben dem Kreuzkanal zur Zellsortierung auch ein Medienaustauschsystem zum Wechseln des Lösemittels im Zulauf des Konuskanals enthält, dem Konusteil zur Zellfixierung und dem Auslaufsystem, das ein zweites Medienaustauschsystem zum Wechseln des Lösemittels an der Konuskanalspitze enthält. Alle drei Einzelkomponenten werden mittels Klebeverfahren miteinander verbunden und dann, wie in Abbildung 5.2 dargestellt, in einer Halterung platziert, an die die elektrischen und fluidischen Verbindungen angeschlossen werden können.

Die Vorteile dieses weiterentwickelten Konzepts werden im Folgenden aufgelistet:

- Wegfall der HPLC-Schlauchverbindungen durch Integration aller Teilkomponenten auf einer gemeinsamen Basisplatte,
- Kurze Transportstrecken der Zellen und damit auch verkürzter Zeitbedarf zur Durchführung der Experimente,

- Vermeidung einer möglichen Zellverletzung durch Wegfall der Rückschlagventile,
- Bessere Möglichkeit für die kontinuierliche mikroskopische Beobachtung der Zelle in der Kanalstruktur,
- Miniaturisierung des Gesamtsystems,
- Verbesserte optische Qualität der Kanaloberflächen.

5.1.2 Entwicklung des Zellfixier- und Medienaustauschsystems

In diesem Konzept wird ein Medienaustauschsystem entwickelt und durch die Simulation des Medienaustauschprozesses dessen Struktur weiter optimiert. Mit Hilfe dieses Systems kann man die umgebenen Lösemittel der in der konischen Kanalstruktur gefangenen Zelle beiderseitig austauschen. Zu diesem Zweck werden die Kanäle beiderseits der konischen Kanalstruktur jeweils zweigeteilt, so dass neues Lösungsmittel zu- und altes Lösungsmittel abgeführt werden kann. Dazu wird eine Trennwand in Form einer dünnen Kunststoffolie eingesetzt. Diese Trennwand unterteilt den vorhandenen Kanal in einen oberen Zufuhr- und unteren Abfuhrkanal und soll die gleichen thermischen Eigenschaften wie die Kanalplatte besitzen, da sie für den Zusammenbau mit beiden Kanalplatten thermisch gebondet werden soll. Daher wird COC für das Material der Trennfolie ausgewählt, da COC aufgrund der vorteilhaften optischen und biokompatiblen Eigenschaften für die Herstellung der Kanalplatte bereits ausgewählt wurde. Die Funktionsweise des Medienaustauschsystems ist in Abbildung 5.3 dargestellt, Abbildung 5.4 zeigt den Zusammenbau der beiden Kanalplatten mit der dünnen Trennwand.

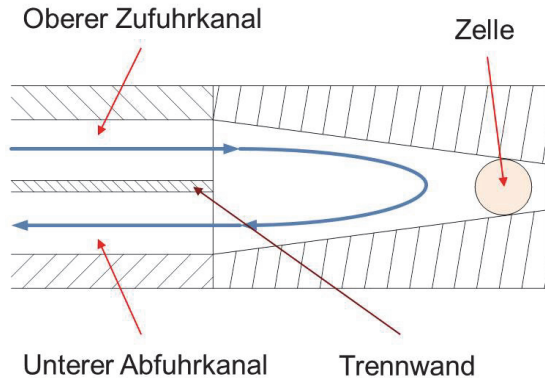


Abbildung 5.3: Funktionsweise des Medienaustauschsystems (Seitenansicht)

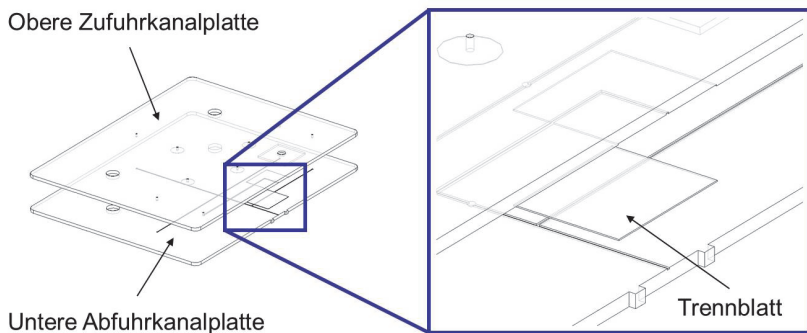


Abbildung 5.4: Zusammenbau der beiden Kanalplatten mit der dünnen Trennwand

Die minimale Wandstärke der Trennwand aus COC ist ca. 80 μm , da noch dünnere Folien im Markt nicht vorhanden sind und die Reduzierung der Dicke mit Hilfe von Ultrafräsen oder mit anderen mechanischen Bearbeitungen schwierig ist. Da diese Trennfolie außerdem nur beim Typ von COC 6013S-04 verfügbar ist, wird für auch die Herstellung der Kanalplatte COC 6013 ausgewählt und die Trennfolie entsprechend der konzipierten Geometrie mit Hilfe eines Nd:YAG-Laser am Institut für Produktionstechnik (wbk)

5. Konzept für das NIMEP-Gesamtsystem und experimentelle Ergebnisse

geschnitten. In Tabelle 5.1 werden die mechanischen und thermischen Eigenschaften von COC 6013 zusammengefasst.

Mechanische Eigenschaften		Thermische Eigenschaften	
Elastizitätsmodul	Zugfestigkeit	Wärmeformbeständigkeit	Linearer Wärmeausdehnungskoeffizient
2900 MPa	63 MPa	130 °C	$0,6 \cdot 10^{-4}$

Tabelle 5.1: Mechanische und thermische Eigenschaft von COC 6013

Für die Auswahl einer für den Medienaustausch besser geeigneten Geometrie wird die Simulation mit unterschiedlichen Varianten durchgeführt. Durch die Simulation kann man eine optimierte Konstruktion für den Lösungsmittelaustausch bestimmen. Die nachfolgenden Abbildungen veranschaulichen zwei Varianten für die konische Kanalstruktur.

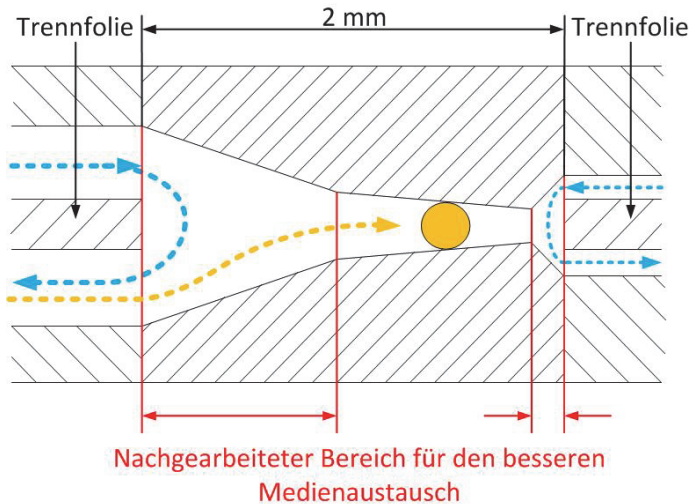


Abbildung 5.5: Erste Variante für den Medienaustausch (gelbe Pfeile: Zellbewegungsrichtung, blaue Pfeile: Medienfließrichtung für den Lösungsmittelaustausch)

Aufgrund der 80 µm dicken Trennfolie muss die Gesamtkanalhöhe von Zu- und Abfuhrkanalhöhe vergrößert werden, weshalb auch der Konuskanal am Übergang aufgeweitet werden muss. In der ersten Variante erfolgt dies durch Vergrößerung der Steigung des hinteren Konusteils (siehe Abb. 5.5, Anhang 5), in der zweiten Variante wird der Konuskanal verkürzt und im hinteren Bereich durch einen zylindrischen Kanal ersetzt (siehe Abb. 5.6 und Abb. 5.7, Anhang 6 und 7).

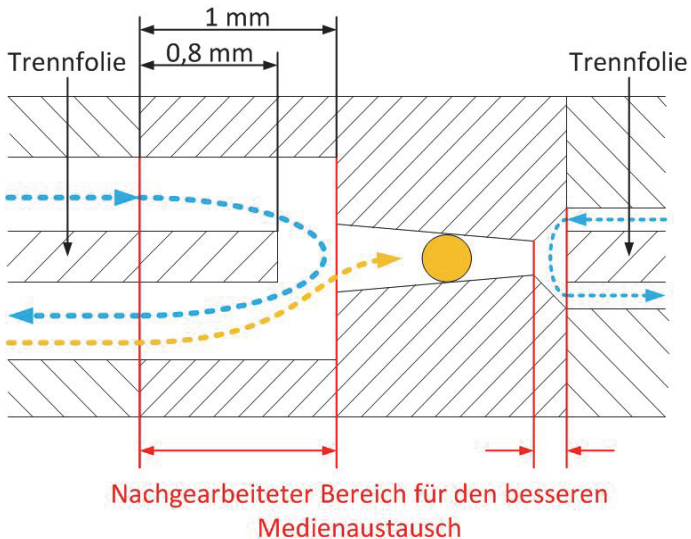


Abbildung 5.6: Zweite Variante für den Medienaustausch (gelbe Pfeile: Zellbewegungsrichtung, blaue Pfeile: Medienfließrichtung für den Lösungsmittelaustausch)

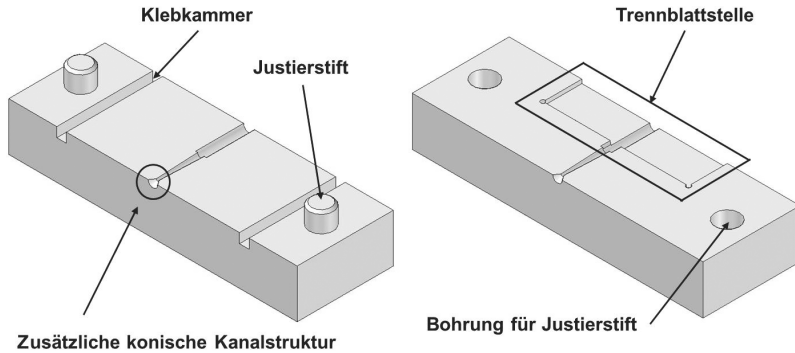


Abbildung 5.7: Dreidimensionale Darstellung der zweiten Variante

Wie in Abbildung 5.6 zu erkennen, wird bei der zweiten Variante die Trennfolie 0,8 mm in den Konusbereich hineingeschoben, da der Durchmesser der zum Experiment relevanten Zelle maximal ca. 100 μm ist und daher ein ausreichender Eintrittspalt ($> 100 \mu\text{m}$) zwischen der Trennfolie und dem Eintrittsbereich eingebaut werden soll. Darüber hinaus wird in der Basis des Konussteils eine zusätzliche Bohrung zum Ermöglichen des Zelleintritts vom Zellsortiersystem in die konische Kanalstruktur eingebaut (Anhang 6 und 7). In dieser Variante kann man die Diffusionsstrecke im Vergleich zur ersten Variante von 1 mm auf 0,2 mm verkürzen und dadurch in kurzer Zeit die Medien austauschen.

Bei der zweiten Variante ergibt sich das Problem, dass bei einer Dicke der Trennfolie von 80 μm und einer nötigen Tiefe von 800 μm ein derartiger Spalt wegen des großen Aspektverhältnisses nicht direkt in das Bauteil gefräst werden kann. Stattdessen soll versucht werden, die Struktur aus zwei Hälften, die direkt in COC gefräst werden, zusammenzufügen. Ein passgenaues Zusammenfügen der Halbschalen ist ein wichtiges Kriterium, um einen Versatz zwischen den Halbschalen, insbesondere im Bereich des konischen Kanalelementes, zu vermeiden. Die zweiteilig gefertigten Konusteile sollen daher durch eine Justierstruktur wie z.B. durch zwei präzise Justierstifte und exakt

reziprok positionierte Bohrungen auf dem Gegenstück zusammengefügt werden. Diese zweiteilig gefertigten Konusteile bieten die Möglichkeit, künftig zusammen mit den anderen Teilkomponenten wie dem Zellsortiersystem und dem Medien austauschsystem durch Fräsbearbeitung in einer Platte direkt gefertigt werden zu können. Dies ermöglicht die Herstellung eines Formeinsatzes, so dass eine Abformungstechnik für die Massenproduktion verwendet werden kann. In den folgenden Abbildungen werden die Simulationsergebnisse für den Zelleintrittsbereich der beiden Varianten und für die andere Seite der konischen Kanalstruktur dargestellt.

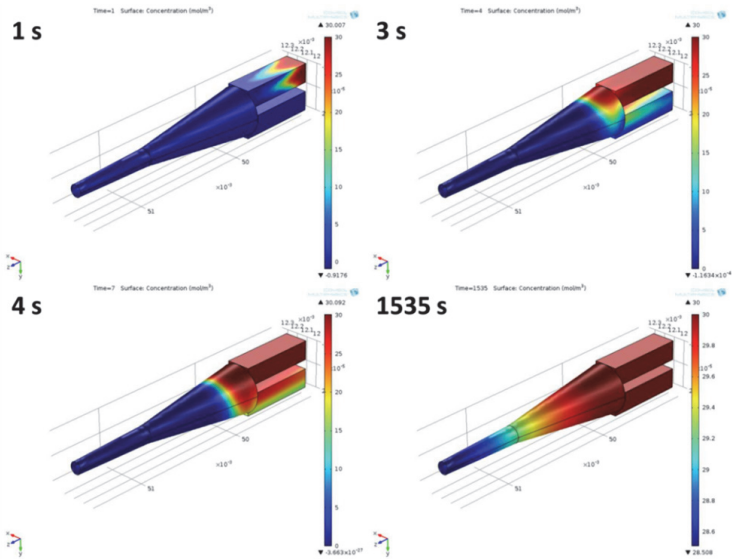


Abbildung 5.8: Simulationsergebnis für den Zelleintrittsbereich der ersten Variante (1 mm Diffusionsstrecke)

5. Konzept für das NIMEP-Gesamtsystem und experimentelle Ergebnisse

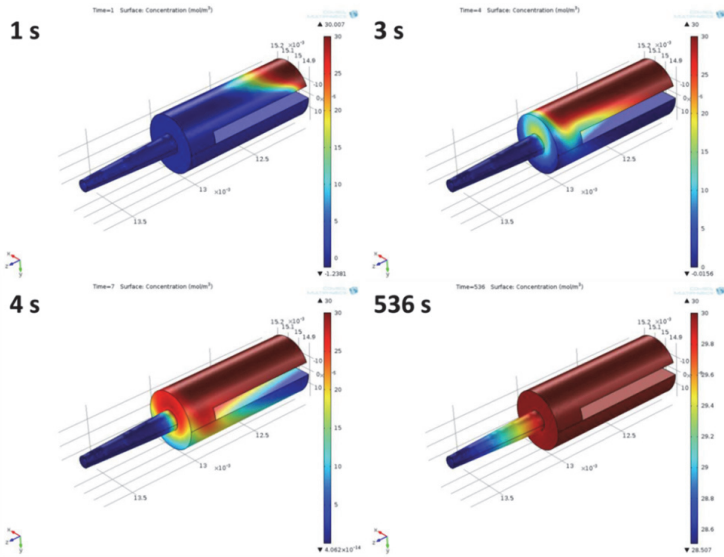


Abbildung 5.9: Simulationsergebnis für den Zelleintrittsbereich der zweiten Variante (0,2 mm Diffusionsstrecke)

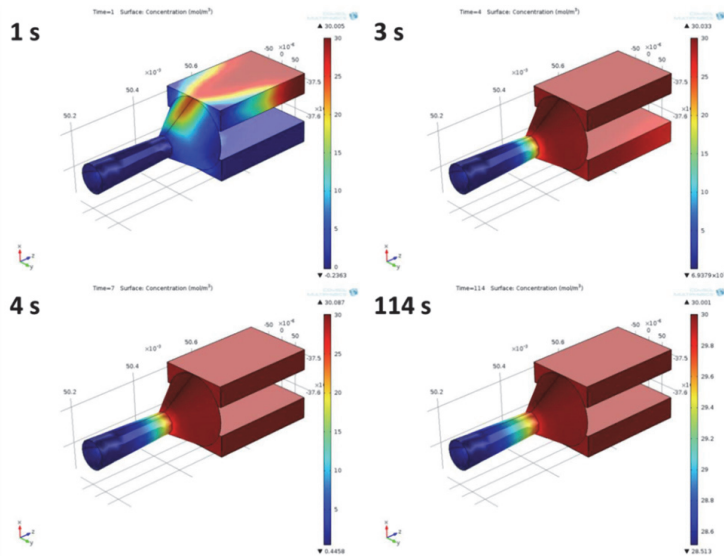


Abbildung 5.10: Simulationsergebnis an der Spitze der konischen Kanalstruktur

In dieser Simulation wird eine beim Experiment relevante Glukose-Lösung angenommen, die im Wasser einen Diffusionskoeffizient von $0,7 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ und eine Konzentration von $30 \text{ mol}/\text{m}^3$ besitzt. Aus den obigen Ergebnissen kann man erkennen, dass man mit der zweiten Geometrie die kompletten Lösemittel in 536 s (ca. 9 min) im elektrophysiologisch akzeptablen Konzentrationstoleranzbereich bzw. $\pm 5 \%$ Konzentrationsunterschied der eingesetzten Lösemittel-Konzentration (min.: $28,5 \text{ mol}/\text{m}^3$ und max.: $31,5 \text{ mol}/\text{m}^3$) austauschen kann. In der ersten Variante dauert der komplette Medien austausch 1535 s (ca. 26 min). Aufgrund der kürzeren Diffusionsstrecke von $434 \mu\text{m}$ im Vergleich zum Zelleintrittsbereich dauert der Medien austausch auf der anderen Seite der konischen Kanalstruktur nur 114 s.

5.1.3 Herstellung des Systems

Die nachfolgenden Abbildungen veranschaulichen den Aufbau des Zellsortiersystems (Abb. 5.11 und Abb. 5.12; Anhang 8 und 9), das das Zellsortiersystem und das Medien austauschsystem am Eingang der konischen Kanalstruktur enthält. Durch das Schließen des mit der Nummer 2 gekennzeichneten Silikonventils kann man das Medien austausch- und Zellsortiersystem voneinander trennen und so den Durchfluss der Lösemittel in die Richtung des Kreuzkanals verhindern.

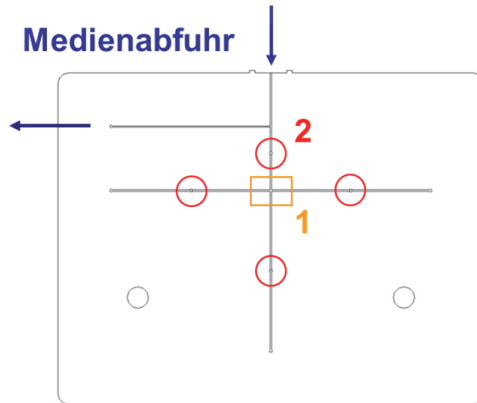


Abbildung 5.11: Unterteil des erweiterten Zellsortiersystems mit Abfuhrkanal (1: Kreuzkanal für Zellsortierung, 2: Halbkugelförmige Kanalstruktur für Silikonventil)

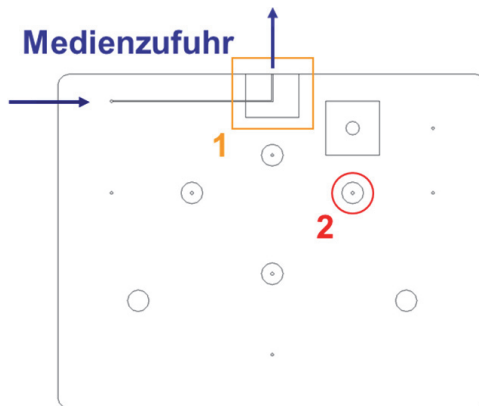


Abbildung 5.12: Oberteil des erweiterten Zellsortiersystems mit Zufuhrkanal (1: Position für Trennwand, 2: Kreisförmige Vertiefung für Silikonfolie)

An der kreisförmigen Vertiefung (Abb. 5.12, Position 2) kann man die Silikonfolie positionieren, wobei die Tiefe dieses Absatzes ca. 70 % (91 μm) der Dicke der Silikonfolie beträgt und der Durchmesser dieser Vertiefung um 50 μm größer ist als der Durchmesser der Silikonfolie. Dadurch kann sich die Silikonfolie beim Zusammenfügen beider Kanalplatten seitlich dehnen und

der Randbereich der Vertiefungsstelle wird vollständig abgedichtet. Das Auslaufsystem auf der Spitze der konischen Kanalstruktur wird ohne Silikonventile konstruiert. Folgende Abbildungen veranschaulichen die untere Abfuhrkanalplatte (Anhang 10), die obere Zufuhrkanalplatte (Anhang 11) des Auslaufsystems.

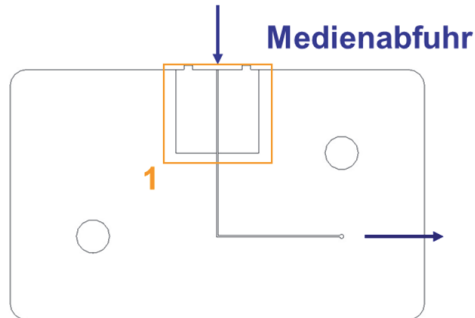


Abbildung 5.13: Untere Abfuhrkanalplatte des Auslaufsystems (1: Position für Trennwand)

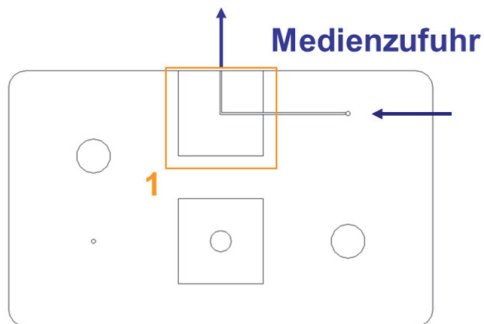


Abbildung 5.14: Obere Zufuhrkanalplatte des Auslaufsystems (1: Position für Trennwand)

Bei den Unterteilen des erweiterten Zellsortiersystems (Abb. 5.11) und des Auslaufsystems (Abb. 5.13) wird eine Hilfsstruktur für die Positionierung des Zellfixierteils vorgesehen. Mit diesen Hilfsstrukturen kann das Zellfixierteil in seitliche Richtung korrekt positioniert werden, während die Einhaltung der

korrekten Höhe mit Hilfe der Trennfolien sichergestellt werden kann, da sich die Trennfolien zwischen dem Zellfixierteil und Zellsortierteil in der gleichen Ebene befinden. Die aus der Fertigung hervorgerufenen Toleranzen und eine daraus resultierende mögliche Verschiebung des Mittelpunktes kann mit Hilfe der erweiterten konischen Struktur im Einlaufbereich sowie der zusätzlichen konischen Struktur am Auslauf des ursprünglichen Konusteils kompensiert werden. Abbildung 5.15 zeigt die Positionierung des Zellfixierteils mit anderen Teilkomponenten.

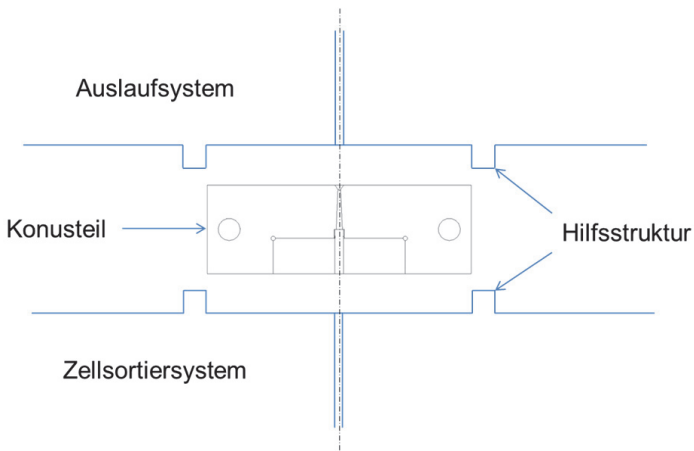


Abbildung 5.15: Positionierung des Zellfixierteils mit anderen Teilkomponenten

Für den Zusammenbau der gebondeten Chipteile und der Schläuche wird die im Abschnitt 5.1.1 dargestellte Halterung verwendet. Da die Zelle im Bereich von Zellsortier- und Zellfixierteilen mikroskopisch beobachtet werden soll und das verwendete Mikroskop nur eine kurze Fokusslänge besitzt, muss das Objektiv vom Mikroskop dicht genug an die zu beobachtende Zelle herangefahren werden können. Deshalb wurde in der unteren Halterung eine Öffnung konstruiert, durch die das Mikroskopobjektiv herangefahren werden kann, um mit einem ausreichend kleinen Arbeitsabstand die Zelle, die sich im Kanal

befindet, mikroskopisch zu beobachten. Außerdem wurde eine zusätzliche Öffnung in der oberen Halterung konzipiert, um eine mögliche Autofluoreszenz des Halterungsmaterials (PMMA) und daraus resultierende Messfehler zu vermeiden. Da der Durchmesser vom Objektiv 12,11 mm und die Höhe 3 mm ist, wird 13 mm breite Öffnung und 4 mm dicke Halterung konzipiert. Dadurch kann man mit dem Arbeitsabstand von ca. 2 mm die Zelle beobachten. Abbildung 5.16 und Abbildung 5.17 zeigen die obere (Anhang 12) und untere Halterung (Anhang 13).

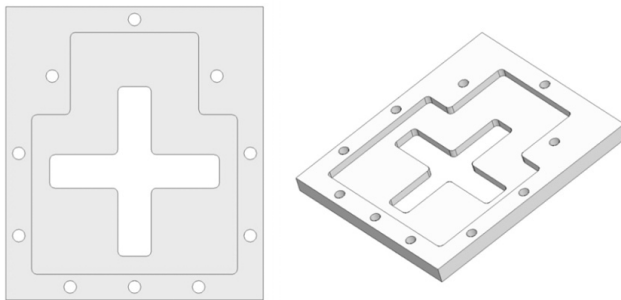


Abbildung 5.16: Untere Halterung mit der Öffnung

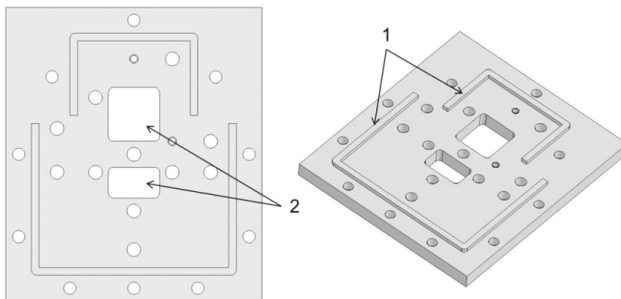


Abbildung 5.17: Obere Halterung mit 2 Öffnungen (2) zur Vermeidung von Autofluoreszenz im Beleuchtungsstrahlengang (1: Hilfsstruktur zur Positionierung der Chipplatte)

5. Konzept für das NIMEP-Gesamtsystem und experimentelle Ergebnisse

In Abbildung 5.18 wird die Messsituation im Zusammenhang von Halterung und Objektiv vom Mikroskop schematisch dargestellt.

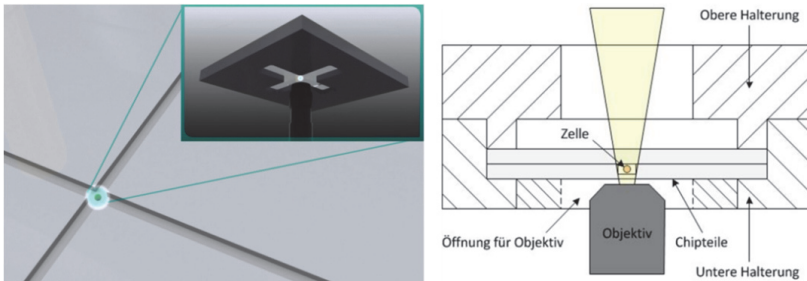
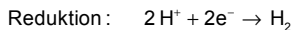
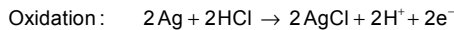
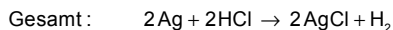


Abbildung 5.18: Messsituation im Zusammenhang von Halterung und Objektiv vom Mikroskop

Außerdem wird die obere Halterung so gestaltet, dass die Elektrode mit Hilfe in der Halterung eingelassenen Federkontaktstiften von der Firma Fixtest GmbH kontaktiert werden können. Als Elektrode wurden wie beim kommerziellen Patch-Clamp-Experiment mit Chlorid beschichtete Silberelektroden verwendet (5.1). Ag/AgCl-Elektroden werden wegen der Stabilität des Halbzellenpotentials bevorzugt.



(5.1)



Die Ag/AgCl-Elektroden werden durch μEDM (siehe Kap. 3.3.2) rechteckig geschnitten und durch Klebverfahren an der oberen Chipplatte befestigt. Die Kontaktierung der eingeklebten Elektrode erfolgt mit Hilfe eines Federkontaktstifts, der in einer abgestuften Bohrung, die sich in der oberen Halterung befindet, eingelassen ist (siehe Abb. 5.19). Mit Hilfe dieser abgestuften Bohrung wird die Feder des Kontaktstifts bei Zusammenbau beider Halterungen zusammengedrückt und aufgrund der Ausdehnungskraft der Feder wird der Stift mit konstanter Kraft auf die Elektrode gepresst.

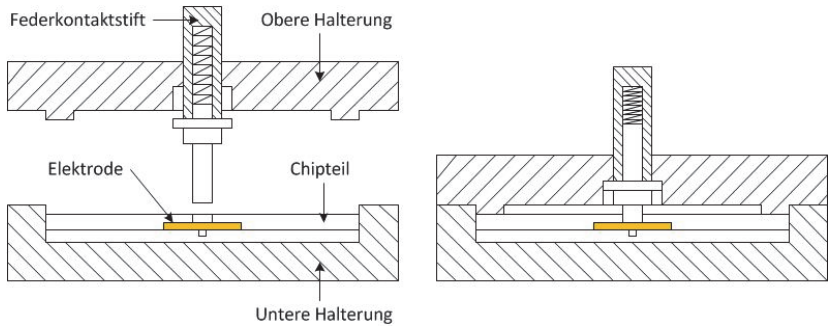


Abbildung 5.19: Kontaktprinzip zwischen dem Federkontaktstift und der im oberen Chipteil geklebten Elektrode

Die neu konzipierten Zellsortier- und Medien austauschteile werden von der Firma I-SYS durch Fräsbearbeitung gefertigt. Darüber hinaus werden die Konuskanäle aus zwei Hälften, die direkt in COC geätzt werden, von der Firma I-SYS mit Hilfe eines Kugelfräsers mit 50 µm Durchmesser gefertigt. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen REM-Bilder zur Untersuchung der Strukturqualität der gefertigten Chipteile.

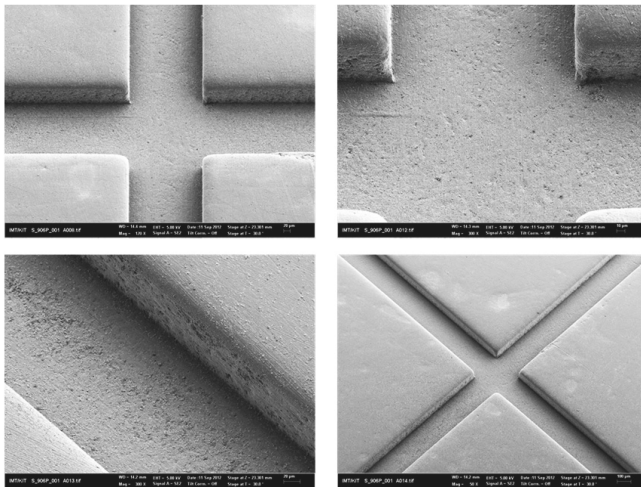


Abbildung 5.20: REM-Bilder vom Kreuzkanalbereich der gefertigten Chipteile

Da die einzelnen Zellen, die sich im Kanalbereich befinden, im späteren Experiment mikroskopisch beobachtet werden sollen, ist es wichtig, Frässpuren im Kanalbodenbereich zu vermeiden. Aus diesem Grund werden die gefertigten einzelnen Chipteile mit Hilfe eines Poliертuchs und mit Polierpaste von der Firma Leco nachpoliert. Die REM-Aufnahmen in Abbildung 5.20 zeigen, dass nach dem Nachpolieren keine Frässpuren im Kanalbodenbereich zu erkennen sind und die bei der Fräsbearbeitung an der Kanalecke entstehende Gratbildung beseitigt wurde. Zwar wird durch das Polieren eine leichte Verrundung an den Kanten verursacht, die aber keinen negativen Einfluss auf den Zellfluss und die Zellsortierung hat.

Da eine Verrundung an den Kanten der Konushälften allerdings beim Zusammenfügen beider Hälften einen Spalt verursachen kann, der zu einer unzureichenden Abdichtung der Zelle im Konuskanal führen würde, wurden die konischen Bauteile nach der Fräsbearbeitung nicht nachpoliert. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die REM-Bilder der gefertigten konischen Bauteile. Wie in Abbildung 5.21 und Abbildung 5.22 zu erkennen, sind einige Staub- und Fräspartikeln an den Oberflächen sowie Gratbildung an den Kanten vorhanden. Diese Partikeln können aber durch das Ausblasen mit Stickstoff vor der Montage und nach dem Zusammenbau beider Chipteile mit Flüssigkeit ausgespült werden. Außerdem kann man in den REM-Bildern Frässpuren erkennen. Diese Spuren könnten bei der Herstellung eines Formensatzes für die spätere Massenproduktion durch die Wahl eines noch härteren Materials vermieden werden. Der Einfluss dieser Spuren wird durch das Experiment mit Zellen untersucht werden.

5. Konzept für das NIMEP-Gesamtsystem und experimentelle Ergebnisse

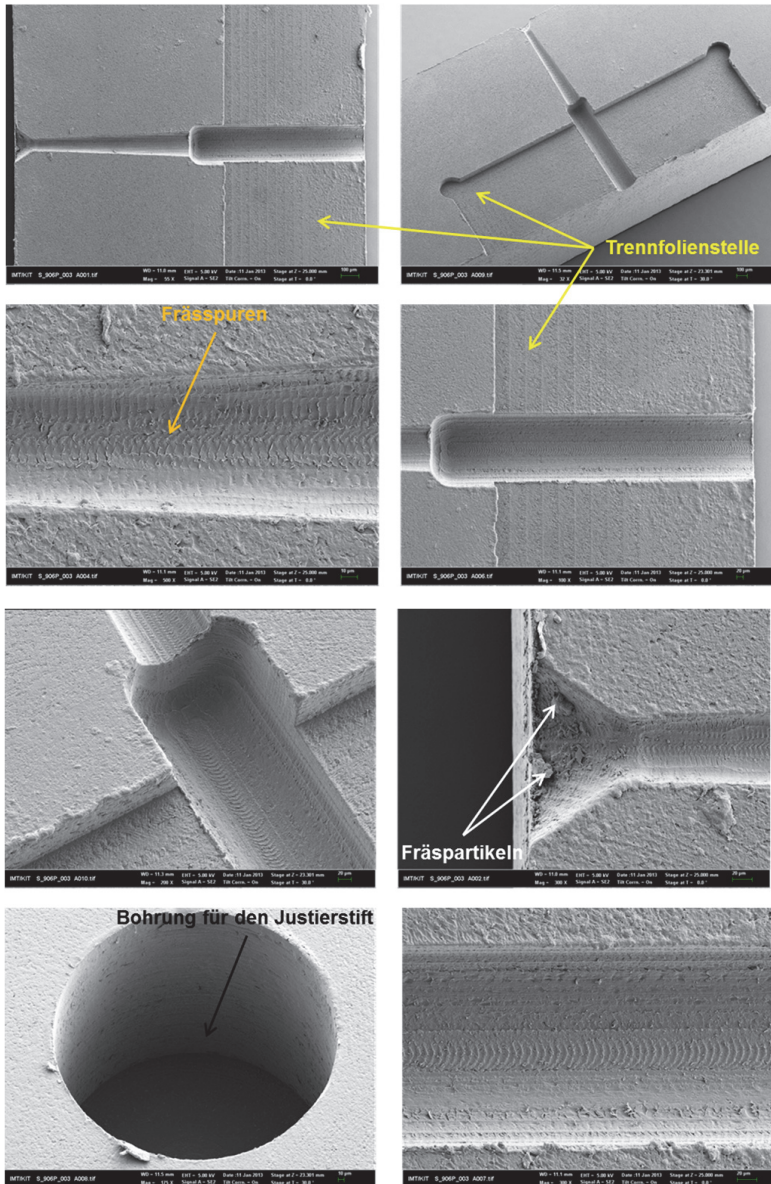


Abbildung 5.21: REM-Bilder vom Oberteil des Konusteils mit Trennfolienstelle und Bohrung für den Justierstift

5. Konzept für das NIMEP-Gesamtsystem und experimentelle Ergebnisse

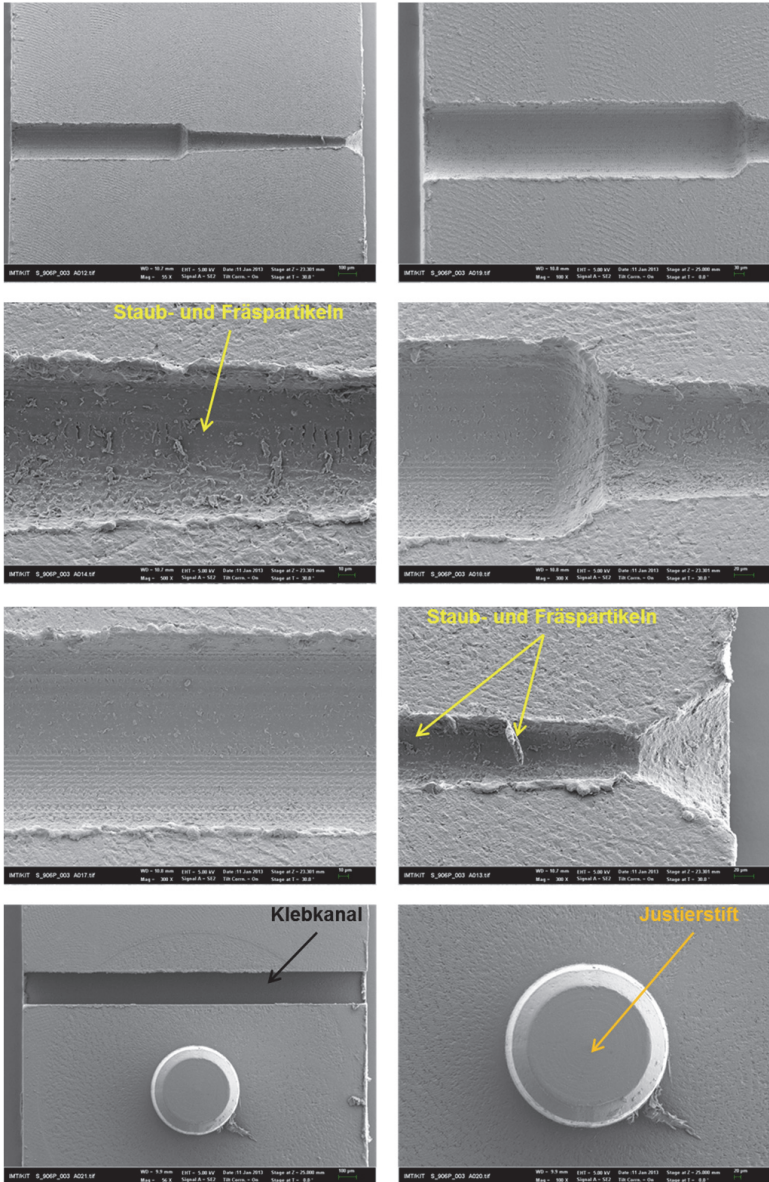


Abbildung 5.22: REM-Bilder vom Unterteil des Konusteils mit Klebkanal und Justierstift

Diese beiden Hälften des Konuskanals werden mit Hilfe der Justierstifte und Bohrungen zunächst aufeinander positioniert, dann wird UV-Klebstoff in die Klebkammern eingefüllt. Der Klebstoff wird aufgrund der Kapillarkraft in den kompletten Klebbereich bzw. in die Nähe von der konischen Kanalstruktur verteilt und anschließend durch UV-Licht ausgehärtet. Aus diesem Grund kann man die aus Graten resultierende Undichtigkeit vermeiden.

Die einzelnen Chipteile für das Zellsortier- und Medien austauschsystem werden durch thermisches Bonden mit allen Komponenten einschließlich mit der durch Laser geschnittenen Silikonfolien und Trennfolien sowie mit den Elektroden zusammengefügt. Aufgrund der unterschiedlich großen Bondflächen muss der Kolbendruck entsprechend angepasst werden, alle anderen Bondparameter sind für Zellsortier- und Austauschteil gleich. Wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben, kann man den Kolbendruck entsprechend der durch Kontaktfläche der zu bondenden beiden Bauteile und Bonddruck umgerechneten Kolbenkraft bestimmen und bei der Bondmaschine einstellen. Für das thermische Bonden der Chipteile wird eine optimale Bondtemperatur von 130 °C und eine Haltezeit von 23 min bestimmt. Die Bondparameter sind in folgende Tabelle 5.2 aufgeführt.

	Bondtemperatur	Haltezeit	Kolbenkraft	Kolbendruck
Zellsortiersystem	130 °C	23 min	15,7 kN	1,9 bar
Auslaufsystem	130 °C	23 min	4,2 kN	0,5 bar

Tabelle 5.2: Bondparameter der Chipteile

Die mit diesen Parametern zusammengefügt einzelnen Chipteile werden durch Klebverfahren (siehe Kap. 3.4.2) mit dem konischen Bauteil zusammengefügt. Der Klebstoff wird im Spalt zwischen den Bauteilen aufgrund der Kapillarkraft verteilt und nach der kompletten Verteilung im Fügebereich durch ultraviolettes Licht ausgehärtet.

5. Konzept für das NIMEP-Gesamtsystem und experimentelle Ergebnisse

Im Folgenden wird das zusammengebaute Testsystem, das in diesem Kapitel entwickelt wird, dargestellt.

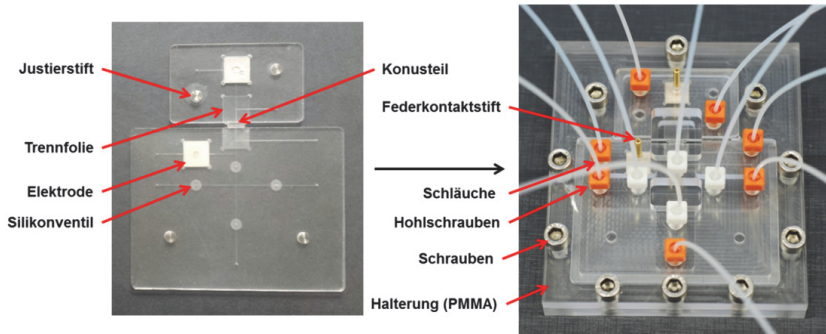


Abbildung 5.23: Zusammengebautes Testsystem

Beim Zusammenbau der gebondeten Chipteile mit dem durch Gießverfahren hergestellten Konusteil ergibt sich eine kleine Verkipfung des Konuskanals gegen die Seitenwand des Einlasses, die aus der Unebenheit der Justierplatte des Gießwerkzeugs und auch der Toleranz beim Einbau in die Hebelpresse resultiert. Außerdem wird die Oberfläche des gegossenen Materials (Thiolene) bei der Nachbearbeitung durch Fräsen für die zusätzlichen Aufweitungen der konischen Kanalstruktur angeschmolzen. Man kann daher durch Fräsbearbeitung keine ausreichend transparenten und glatten Oberflächen erzeugen, die eine wichtige Voraussetzung für biologische Experimente sind. Darüber hinaus, wie schon im Abschnitt 5.1.2 beschrieben, ergibt sich bei dieser Variante das Problem, dass bei einer Dicke der Trennfolie von $80\ \mu\text{m}$ und einer nötigen Tiefe von $800\ \mu\text{m}$ ein derartiger Spalt wegen des großen Aspektverhältnisses nicht direkt in das Bauteil gefräst werden kann. Wegen dieser Nachteile und dem aufwendigen Herstellungsprozess, der für die Massenproduktion nicht geeignet ist, wird diese Variante für die weitere Entwicklung und Optimierung nicht mehr berücksichtigt. In der folgenden Abbildung wird das Verkipppungsproblem beim Zusammenbau des gegossenen Konusbauteils mit anderen Teilkomponenten dargestellt.

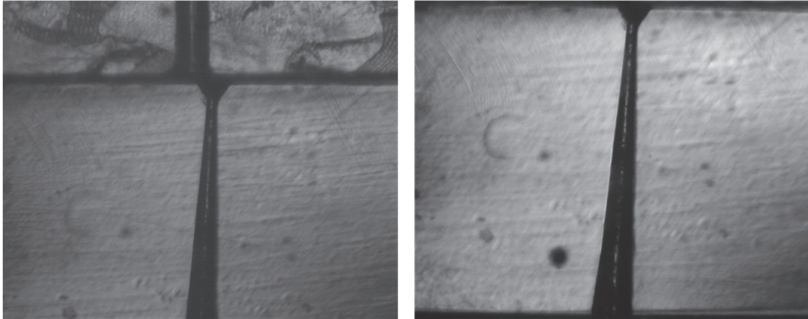


Abbildung 5.24: Verknüppungsproblem beim Zusammenbau des gegossenen Konusbauteils mit anderen Teilkomponenten

5.1.4 Überprüfung der Funktionstüchtigkeit

Nach dem Zusammenbau des Testsystems wird seine Funktionstüchtigkeit mit Polystyrol (PS)-Partikeln (Durchmesser: $99,57 \mu\text{m}$) von der Firma Micro-particles GmbH überprüft. Da die PS-Partikeln in der Transportflüssigkeit durch die Kanalstruktur transportiert werden sollen, sollte die Dichte der Partikeln und Transportflüssigkeit möglichst gleich sein. Dadurch kann man nicht nur das Absinken oder Aufschwimmen der Partikeln im Kanalbereich, sondern auch das Anhaften an der Kanalwand vermeiden. Da die Dichte der PS-Partikeln $1,05 \text{ g/cm}^3$ beträgt, wird eine Lösung von Glycerin in Wasser als Transportflüssigkeit ausgewählt. Diese Lösung besitzt bei Raumtemperatur einen ähnlichen Dichtebereich wie die PS-Partikeln. Dabei kann die Dichte einfach durch Wahl der Glycerinkonzentration eingestellt werden. In Tabelle 5.3 ist die Dichte der Lösung in Abhängigkeit des Anteils von Glycerin im Wasser aufgelistet. Um eine Dichte von ca. $1,05 \text{ g/cm}^3$ einzustellen, wird ein Volumenanteil von 21 % Glycerin mit einem Volumenanteil von 79 % Wasser gemischt.

5. Konzept für das NIMEP-Gesamtsystem und experimentelle Ergebnisse

Glycerin in %	Dichte in g/cm ³				
	15 °C	15,5 °C	20 °C	25 °C	30 °C
21	1,05100	1,05090	1,04950	1,04780	1,04600
22	1,05365	1,05350	1,05205	1,05035	1,04850

Tabelle 5.3: Dichte des gemischten Lösungsmittels in Abhängigkeit des Anteils von Glycerin und Wasser [72]

Vor dem Versuch mit diesen Partikeln werden zunächst die Luftblasen in Kanälen und Schläuchen durch längeres Spülen mit Wasser entfernt. Aufgrund der engen Kanalgeometrie muss zum Transport der Flüssigkeiten ein höherer Druck aufgebaut werden. Enthaltene Luftblasen sind stärker komprimierbar als die Flüssigkeit selbst und expandieren bei Druckentlastung wieder, was einen unerwünschten Volumenstrom auslösen kann, der zu ungezielten Bewegungen der Zelle führt. Für die Förderung der Flüssigkeit im Kanalbereich und für die Ansteuerung der Ventile kommt eine Spritzenpumpe, die auch beim Versuch mit dem Ventilprototyp verwendet wurde, zum Einsatz. Zur Ventilsteuerung werden die Schläuche, die an der sich auf der oberen Seite der Silikonfolie befindenden Bohrung angeschlossen sind, mit Wasser befüllt und dann wird jeweils das der halbkugelförmigen Kanalstruktur entsprechende Volumen (ca. 0,06 μ l) mit Hilfe der Spritzenpumpe zugeführt.

Beim Vorversuch mit den Partikeln traten einige Probleme auf. Die Spritzenpumpe benötigt eine endliche Zeit, bis das benötigte Volumen gefördert wird. Dadurch entsteht ein Zeitunterschied beim Öffnungs- und Schließvorgang zwischen zwei Ventilen beim gefertigten Testsystem. Diese Ansprechzeit und der Zeitunterschied machen es schwierig, die Zelle in einer bestimmten Position zu halten. Außerdem ergibt sich ein Problem mit dem Totvolumen des Ventils, da beim Schließen das Volumen, das der halbkugelförmige Bereich unterhalb der Silikonfolie einnimmt, verdrängt wird. Das Volumen in der Mitte des Kreuzkanals des gefertigten Chipteils beträgt

ca. 0,008 μl (Kanalbreite 1 x Kanalbreite 2 x Kanaltiefe = $(0,2 \text{ mm})^3$), während das Volumen des gebohrten Kreuzstücks ca. 0,226 μl (Bohrungsdurchmesser 600 μm) ist. Außerdem werden beim gefertigten Testsystem zwei Ventile (Volumenänderung durch die Verformung der zwei Ventile: 0,066 μl) für die Steuerung der Lösemittelrichtung verwendet, während beim Versuch mit Ventilprototyp nur ein Ventil (Volumenänderung durch Ventilverformung: 0,033 μl) verwendet wurde. Aus diesem Grund hat beim gefertigten Testsystem die Volumenänderung, die durch die Ventilverformung verursacht wird, einen größeren Einfluss auf die Zellpositionierung in der Mitte des Kreuzkanals als beim gebohrten Prototyp.

Aus diesen Gründen ist die Integration des Silikonventils ins Chipteil für die präzise Positionierung der Zelle im Gegensatz zur Flüssigkeitsteuerung nicht geeignet, weshalb für das Experiment mit PS-Partikeln das Silikonventil durch ein alternatives handsteuerbares Drosselventil außerhalb des Chipteils ersetzt wird, dessen Totvolumen vernachlässigbar ist. Damit kann man die Zelle präzise in der Mitte des Kreuzkanals positionieren.

Das Partikelverhalten in der kompletten Teststruktur wird mit Hilfe der am Mikroskop montierten Kamera aufgezeichnet. Eine Bildsequenz zum Transport einer PS-Partikel zur Mitte des Kreuzkanals ist in Abbildung 5.25 dargestellt. Die genaue Positionierung der Partikel wird in Abbildung 5.26 gezeigt.

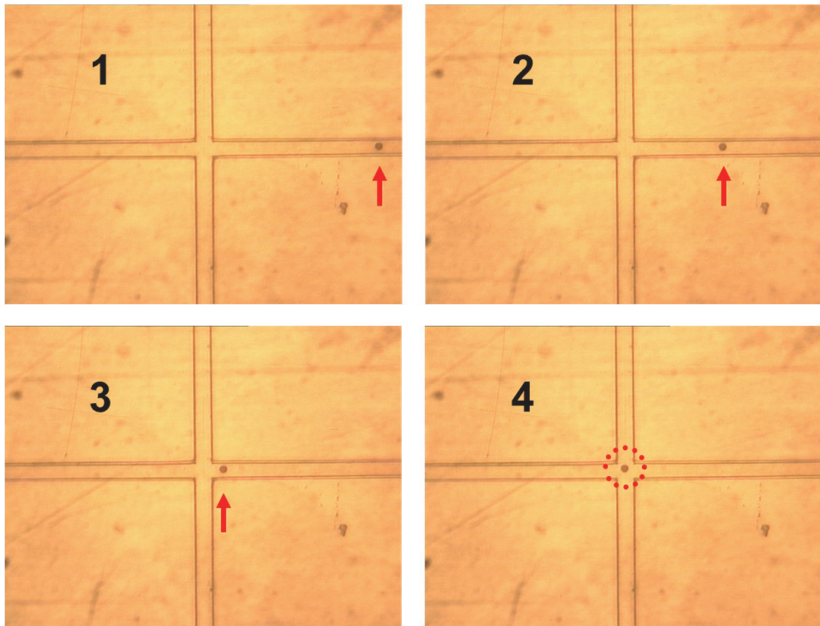


Abbildung 5.25: Partikeltransport zum Kreuzungspunkt des Zellsortiersystems (roter Pfeil zeigt die Position der Partikel)

Bei der Steuerung der Zellbewegung mit Hilfe der Spritzenpumpe macht sich der sogenannte „Stick-Slip-Effekt“ bemerkbar: Da die Haftreibung der Spritzenkolben höher ist als die Gleitreibung erfolgt keine kontinuierliche Kolbenbewegung, sondern der Kolben und damit auch der generierte Volumenstrom bleibt immer wieder stehen um sich nach einiger Zeit wieder ruckartig weiterzubewegen. Eine exakte Positionierung der Zelle in der Mitte des Kreuzkanals ist damit nicht möglich. Hierzu kommt, dass wegen des im System aufgebauten Drucks unter Umständen auch noch ein Nachlaufen der Flüssigkeit nach dem eigentlichen Stopp der Pumpe auftritt. Aus diesem Grund wird die horizontale Zellbewegung durch Betätigung einer Spritze per Hand durchgeführt, da man hier durch kombiniertes Drücken/Ziehen des Spritzenkolbens besser auf die Zellbewegung reagieren und daraus viel feinfühlicher die Zelle manipulieren kann, während die Spritzenpumpe nur den

vorgegebenen Weg fährt und die Richtung des Kolbens bei Spritzenpumpe nicht rechtzeitig geändert werden kann.

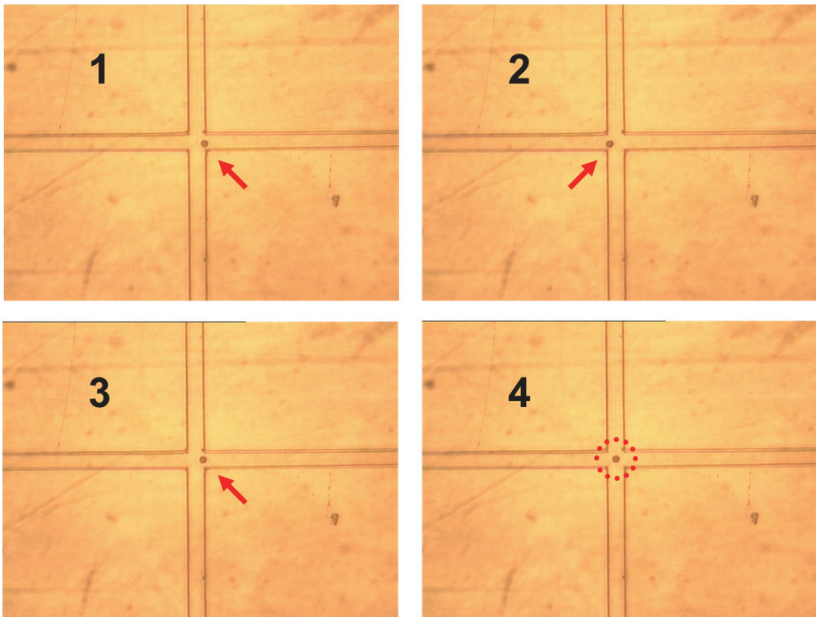


Abbildung 5.26: Positionierung der Partikel in der Mitte des Kreuzkanals

Wie in Abbildung 5.26 zu erkennen, kann man durch die Verwendung des Drosselventils und durch die Handsteuerung des Spritzenkolbens die Zellposition in der Mitte des Kreuzkanals fein kontrollieren, d.h., man kann die Partikel durch kombiniertes Drücken/Ziehen des Spritzenkolbens innerhalb des Kreuzungsbereiches bewegen und einschließlich in der Mitte des Kreuzkanals halten. Zunächst fließen die Partikel mit der Flüssigkeit nur in eine Richtung (von rechts nach links) und ihre Bewegung in der Mitte des Kreuzkanals kann man per Hand durch kombinierte Bewegung vom Drücken/Ziehen kontrollieren. Zum weiteren Transport der Partikel sollen zwei Ventile, die sich auf der oberen und unteren Seite befinden, geöffnet werden. Bei diesem Ventilzustand können die Partikel mit Hilfe der Spritz-

enpumpe durch die weitere Zufuhr der Lösemittel von der unteren Seite nach oben zum konischen Teil transportiert und dort fixiert werden. Abbildung 5.27 zeigt die in der konischen Kanalstruktur fixierte Partikel. Diese kann man durch die Lösemittelzufuhr von der anderen Konusseite her wieder entfernen und andere Partikeln in diesen Bereich hineinbringen.

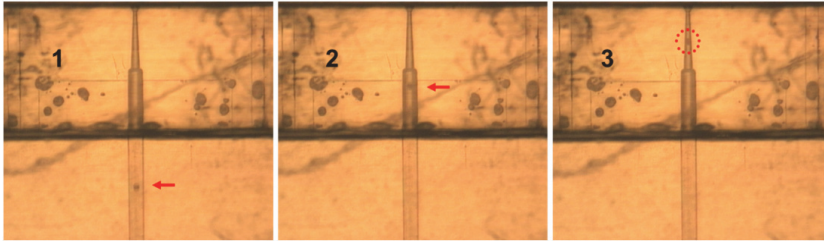


Abbildung 5.27: Fixierte Partikel in der konischen Kanalstruktur

Die Versuche mit den PS-Partikeln zeigen, dass diese sich nur dann leicht in den Kanalstrukturen bewegen lassen, wenn Dichte der Partikeln und Dichte der Transportflüssigkeit einander angeglichen sind. Andernfalls besteht die Gefahr, dass die Partikeln absinken oder aufschwimmen und sich an der Kanalwand festsetzen. Dies gilt insbesondere für den langsamen Transport mittels Spritzenpumpe. Auch der zweite Flüssigkeitskreislauf (hier zum Transport der Partikel in die vertikale Richtung) sollte eine angepasste Dichte besitzen um den Transport der in der Mitte des Kreuzkanals positionierten Partikel zu ermöglichen. Bei der Handsteuerung des Partikeltransports sind diese Probleme weniger stark ausgeprägt und die Dichten von Flüssigkeit und Partikel dürfen etwas mehr voneinander abweichen.

Neben den Versuchen mit den PS-Partikeln wurden mit den Protoplasten der für diese Arbeit ausgewählten Tabak-Zellkulturlinie Virginia Bright Italian 0 (VBI-0) weitere Experimente durchgeführt. Um die Größe der Protoplasten und ihren intakten Zustand beizubehalten, wurde eine 50 mM KCl-Lösung

mit 1 mM CaCl_2 -Zusatz als Transportmedium verwendet. Der pH-Wert wurde auf ca. 7 eingestellt und die Osmolarität mit Mannitol auf 250 mosmol/kg.

Der Transport und die Positionierung der Zelle wurden wie beim Experiment mit den PS-Partikeln per Hand durch kombinierte Bewegung vom Drücken/Ziehen kontrolliert. Nach der Positionierung der Zelle in der Mitte des Kreuzkanals wurde die gewünschte Zelle durch ein von unten eingeleitetes Lösemittel in den vertikal verlaufenden Kanal nach oben abgelenkt und von dort aus wurde die Zelle in den konischen Kanal transportiert und fixiert. Bei der Fixierung der Zelle im Konusbereich wurde die Zelle durch einen leichten Überdruck an die Konuswand angedrückt, wobei eine geringe Deformation der Zelle stattfand. Durch diese Deformation wurde die Zelle fast vollständig an die Innenwand des Konuskanals gepresst, wodurch der weitere Medienfluss blockiert und die elektrische Leitfähigkeit herabgesetzt wurde.

Beim Experiment wurde beobachtet, dass sich die Zellen aufgrund des Innendrucks, der nach dem Stoppen der Spritzenpumpe noch in der Flüssigkeit bleibt, so stark deformieren können, dass sie die Engstelle an der Spitze des Konuskanals passieren können. Dieses Problem ist abhängig von der Zellengröße und dem Zellzustand. Um diese Probleme zu vermeiden, soll der Spitzendurchmesser des Konuskanals weiter reduziert werden. Der Radius des kleinsten verfügbaren Fräasers beträgt 10 μm . Mit diesem Fräser kann der Spitzendurchmesser im Konusbereich weiter reduziert werden und dadurch kann die Schwierigkeit der Zellfixierung bzw. Durchdringung der Zelle im Spitzenbereich vermieden werden. Außerdem wurden beim Experiment Leckströme beobachtet. Diese Leckströme wurden durch den Spalt bei der Verbindungsstelle zwischen den beiden Hälften des konischen Chipteils und durch die Frässpuren an der Oberfläche des gefertigten konischen Chipteils verursacht. Daraus resultiert ein instabiler Abdichtwiderstand. Dies bedeutet, dass der durch das Anpressen der Zelle an die Innenwand des Konuskanals erzeugte Abdichtwiderstand keine konstanten Werte zeigt, sondern in

Abhängigkeit vom Abdichtzustand variiert. In Abbildung 5.28 wird der Spalt bei der Verbindungsstelle zwischen den beiden Hälften der konischen Chip-teils dargestellt (rote Markierung: Spalt bei der Verbindungsstelle).

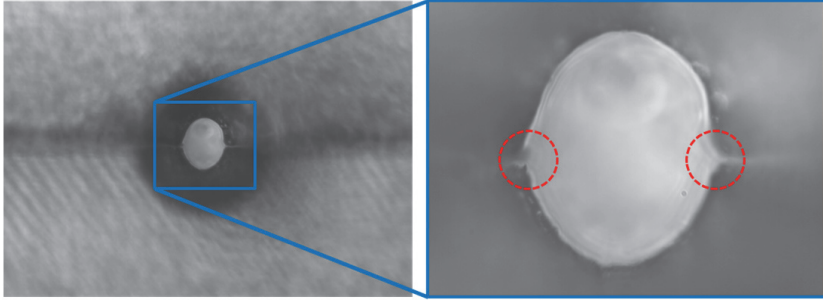


Abbildung 5.28: Spalt bei der Verbindungsstelle zwischen den beiden Hälften der konischen Chip-teils

Dieser Spalt entsteht durch die bei der Fräsbearbeitung verursachte Kantenverrundung. Da bei der Fräsbearbeitung diese Kantenverrundung nicht vermieden werden kann und dieser Spalt beim Kleben nicht vollständig ausgefüllt wird, wurde alternativ das thermische Bonden für die Verbindung beider Bauteile ausgewählt. Beim thermischen Bonden werden beide Bauteile bei hoher Temperatur nahe der Glasübergangstemperatur durch einen hohen Druck gepresst, wodurch eine kleine Umformung der Kantenverrundung in der Verbindungsstelle ermöglicht werden kann. Abbildung 5.29 vergleicht den Querschnitt der Verbindungsstelle beider Chip-teile im Konusbereich nach der Verbindung mit Hilfe des Klebens und des thermischen Bondens.

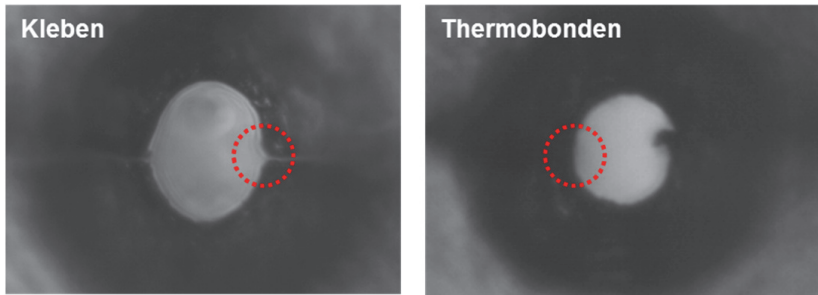


Abbildung 5.29: Querschnitt der Verbindungsstelle beider Chipteile im Konusbereich (links: Kleben, rechts: Thermobonden)

Wie in Abbildung 5.29 zu erkennen, kann man durch das thermische Bonden den Spalt, der durch die Kantenrundung verursacht wird, beseitigen, wodurch sich die Zelle besser an die Innenwand des Konuskanals anschmiegen kann. Der dunkle Fleck im rechten Bild ist eine Fräspartikel, die durch Ausblasen mit Stickstoff oder mit Hilfe von Flüssigkeit ausgespült werden kann. Bei der Fräsbearbeitung entstehen Frässpuren am Kanalwandbereich. Diese Frässpuren werden durch die unterschiedlichen Frässtrategien bei der Fräsbearbeitung verursacht. Abbildung 5.30 zeigt Beispiele für die beiden unterschiedlichen Frässpuren.

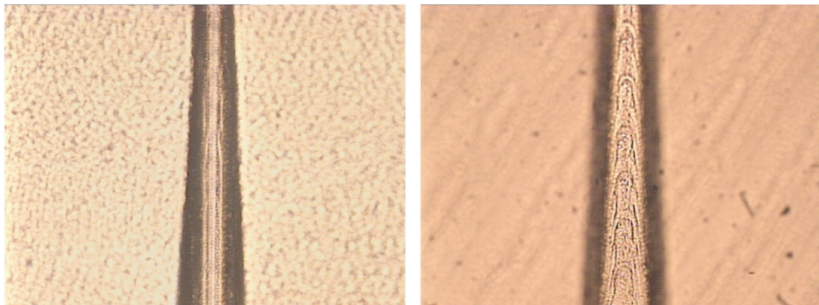


Abbildung 5.30: Unterschiedliche Frässpuren im Konusbereich

Die linken Frässpuren werden durch die gradlinige Bewegung des Fräasers in horizontaler Vorschubrichtung und die rechten Frässpuren durch die parabo-

liche Bewegung des Fräasers in vertikaler Vorschubrichtung verursacht. Die rechten Frässpuren führten zu einer starken Oberflächenunebenheit und zu Schwankungen des Abdichtwiderstandes bei der Fixierung der Zelle im Konusbereich, da die Zelle je nach ihrer Verformungsstärke die nicht glatte Kanalinnenwand unterschiedlich abdichtet. Um diese Frässpuren zu beseitigen und daher eine noch glattere Oberfläche im Konusbereich zu erzeugen, soll die geeignete Frässtrategie für die Abdichtung der Zelle ausgewählt werden oder das Chipteil aus einem noch härteren Material wie z.B. Aluminium, das für die Herstellung eines metallischen Formeinsatzes durch galvanisches Umkopieren geeignet ist, durch Fräsbearbeitung hergestellt werden. Dadurch kann man einen Formeinsatz, der eine saubere und glatte Oberfläche besitzt, herstellen und mit diesem Formeinsatz kann man dann große Stückzahlen der Chipteile durch Heißprägen oder Spritzguss herstellen.

5.1.5 Fazit des Aufbaus des NIMEP-Gesamtsystems

Im neu entwickelten Konzept wurden einzelne Teilkomponenten durch Fräsbearbeitung gefertigt. Beim Zusammenbau des Chipteils und bei der Überprüfung seiner Funktionstüchtigkeit traten folgende Probleme auf:

- Aufwendige Arbeit beim Zusammenbau des konischen Bauteils mit anderen Teilkomponenten,
- zu großes Totvolumen der Ventile, das die Zellpositionierung in der Mitte des Kreuzkanals negativ beeinflusst,
- Entstehung von Frässpuren im Konusbereich in Abhängigkeit von der Frässtrategie,
- Entstehung eines Spaltes bei der Verbindungsstelle zwischen den beiden Hälften der konischen Chipteils,

- Leckströme nach der Fixierung der Zelle im Konusbereich aufgrund des Spaltes und der vorhandenen Frässpuren,
- Durchdringung des Konuskanals durch starke Verformung der Zelle.

Wie in Abbildung 5.30 zu erkennen, wurde die geeignete Frässtrategie ausgewählt, um die Frässpuren im Konusbereich zu beseitigen. Zur Vermeidung des Spaltes bei der Verbindungsstelle zwischen den beiden Hälften der konischen Chipteils sollen die gefertigten Chipteile nicht durch Kleben, sondern durch thermisches Bonden zusammengefügt werden (siehe Abb. 5.29). Durch die Vermeidung des Spaltes und der Frässpuren kann man die Leckströme im Konusbereich reduzieren, weil die Zelle sich besser an die konische Kanalinnenwand anschmiegen und man dadurch einen hohen Abdichtwiderstand erhalten kann. Außerdem wurde das Silikonventil im Testsystem durch ein handsteuerbares Drosselventil ersetzt, da die ins Testsystem integrierten Silikonventile durch ihre Volumenänderung bei der Verformung die präzise Zellpositionierung in der Mitte des Kreuzkanals negativ beeinflussen. Beim Experiment mit den Pflanzenzellen konnte man erkennen, dass sich manche Zellen im Spitzenbereich so stark verformen, dass sie den Konuskanal durchdringen können. Um dieses Problem zu vermeiden, soll der Spitzendurchmesser des Konuskanals weiter reduziert werden, was auch die Untersuchung von Zellen mit noch kleinerem Durchmesser ermöglichen könnte.

5.2 Optimierung des NIMEP-Gesamtsystems

5.2.1 Verbesserungen am vorgestellten Gesamtsystem

Da sich bei der Erprobung des Gesamtsystems die aus zwei Halbschalen hergestellten Konuskanäle bewährt haben, deren Zusammenbau mit den anderen Teilkomponenten aber schwierig war, soll der Konuskanal in diesem Kapitel unmittelbar in den 2-schaligen Gesamtausbau integriert werden.

Desweiteren hat sich gezeigt, dass die Silikonventile aufgrund ihres zu großen Totvolumens ungeeignet sind, weshalb auf sie verzichtet wird, wodurch der gesamte Aufbau kompakter gestaltet werden kann. Schließlich soll noch versucht werden, zur Vermeidung der Durchdringung der Zelle den Spitzendurchmesser des Konuskanals weiter zu reduzieren. Durch diese Reduzierung kann man nicht nur die Durchdringung der Zelle im Spitzenbereich der konischen Kanalstruktur vermeiden, sondern auch einen ausreichenden Abdichtwiderstandsbereich erreichen. Da die Frässpuren einen großen Einfluss auf die Fixierung mit einem hohen Abdichtwiderstand in der konischen Kanalstruktur besitzen, soll für die Herstellung der konischen Kanalstruktur eine geeignete Frässtrategie ausgewählt werden. Im Folgenden werden die Änderungen, die im zweiten Konzept eingesetzt werden, aufgelistet:

- Reduzierung des Spitzendurchmessers der konischen Kanalstruktur,
- Auswahl der geeigneten Frässtrategie,
- Wegfall der integrierten Silikonventile,
- Kopplung der einzelnen Teilkomponenten,
- Miniaturisierung des gesamten Testsystems.

5.2.2 Herstellung des kompletten Testsystems

Wie im obigen Abschnitt beschrieben, wurden bei diesem Konzept die einzelnen Teilkomponenten gekoppelt und durch Fräsbearbeitung in einem Chipteil gefertigt. Zur Miniaturisierung des gesamten Testsystems und zur Verkürzung der Experimentdauer wurde die Länge der einzelnen Kanäle des Zellsortiersystems jeweils um 11 bis 15 mm verkürzt. Diese Änderung war durch den Wegfall der integrierten Silikonventile möglich (Anhang 14 und 15). Abbildung 5.31 zeigt eine schematische Darstellung des neu entwickelten und miniaturisierten Testsystems.

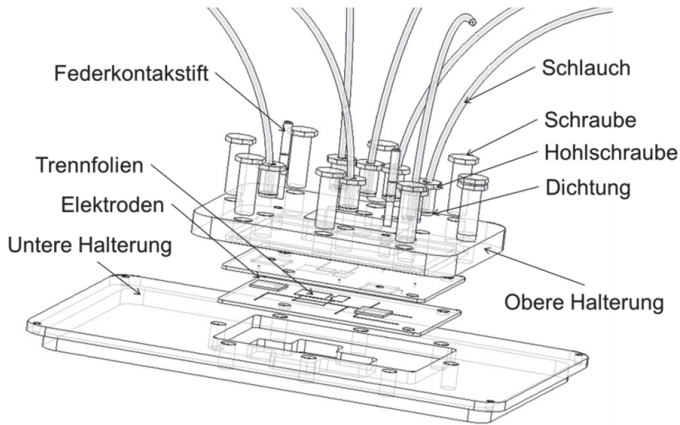


Abbildung 5.31: Schematische Darstellung des neu entwickelten und miniaturisierten Testsystems

Für den Anschluss der Schläuche an die Chipteile wird das bisherige Konzept der in der oberen Halterung integrierten HPLC-Hohlschrauben verwendet. Da die Zelle im Bereich von Sortier- und Zellfixierteil mikroskopisch beobachtet werden soll, muss die obere und untere Halterung einen freigegebenen Bereich bzw. Öffnung besitzen. Da nach dem Zusammenbau des Chipteils mit der Halterung das zusammenmontierte Testsystem in den Justiertisch des Mikroskops integriert werden soll, wurde die untere Halterung entsprechend dem Maß des Justiertisches angepasst. Die obere Halterung aus PMMA und die untere Halterung aus Aluminium wurden entsprechend dieser Verkleinerung in der IMT-Werkstatt gefertigt (Anhang 16 und 17).

Zur Reduzierung des Spitzendurchmessers der konischen Kanalstruktur kommt ein Fräser mit einem Radius von $10\ \mu\text{m}$ (siehe Abb. 5.32) von der Firma NS TOOL CO., LTD. zum Einsatz, dessen technische Daten in Tabelle 5.4 dargestellt sind. Mit Hilfe dieses Fräasers kann man den Spitzendurchmesser weiter bis auf $20\ \mu\text{m}$ reduzieren und so einen Durchtritt der Zelle im Spitzenbereich vermeiden. Im Folgenden wird der Fräser mit einem Radius von $10\ \mu\text{m}$ von der Firma NS TOOL CO., LTD. dargestellt.

5. Konzept für das NIMEP-Gesamtsystem und experimentelle Ergebnisse

Code Nummer	Radius (R)	Durchmesser (D)	Schnittlänge (l)	Übergangswinkel (y)	Schaftdurchmesser (d)	Gesamtlänge (L)
01-00003-	0,01 mm	0,02 mm	0,02 mm	15°	4 mm	45 mm

Tabelle 5.4: Technische Daten des verwendeten Fräasers (verändert nach [73])

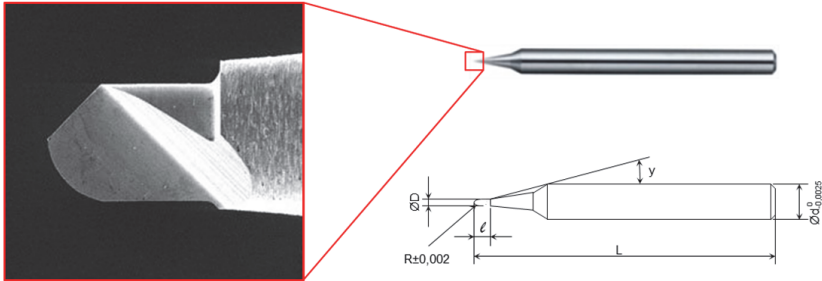


Abbildung 5.32: Verwendeter Fräser mit einem Radius von 10 µm (verändert nach [73])

Außerdem konnten durch die Auswahl der geeigneten Frässtrategie die Frässpuren vermieden werden und dadurch eine glatte und saubere Oberfläche hergestellt werden. Abbildung 5.33 zeigt die mikroskopische Aufnahme des reduzierten Spitzendurchmessers der konischen Kanalstruktur und die glatte Oberfläche durch die Auswahl der geeigneten Frässtrategie.

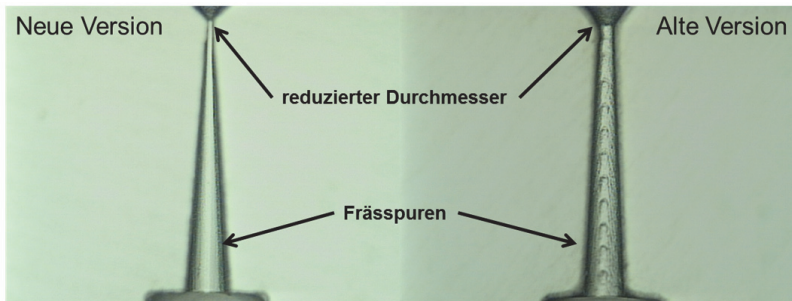


Abbildung 5.33: Mikroskopische Aufnahme des reduzierten Spitzendurchmessers der konischen Kanalstruktur mit der glatten Oberfläche durch die Auswahl der geeigneten Frässtrategie

Nach der Fertigung des neu konzipierten Testsystems werden zur Überprüfung der Strukturqualität die Teile im REM untersucht. Da die einzelnen Zellen, die durch den Kanal geleitet werden, im Experiment mikroskopisch beobachtet werden sollen, wie im Kapitel 5.1.3 beschrieben, wurden die gefertigten Chipteile vor der REM-Aufnahmen mit dem Poliertuch und mit Polierpaste nachpoliert. In den folgenden Abbildungen werden die REM-Bilder der gefertigten Chipteile dargestellt. Wie in Abbildung 5.36 zu erkennen, wird bei diesem Konzept eine zusätzliche Stufe im Kreuzkanalbereich konzipiert, um einen Zelltransport in diese Richtung zu erschweren.

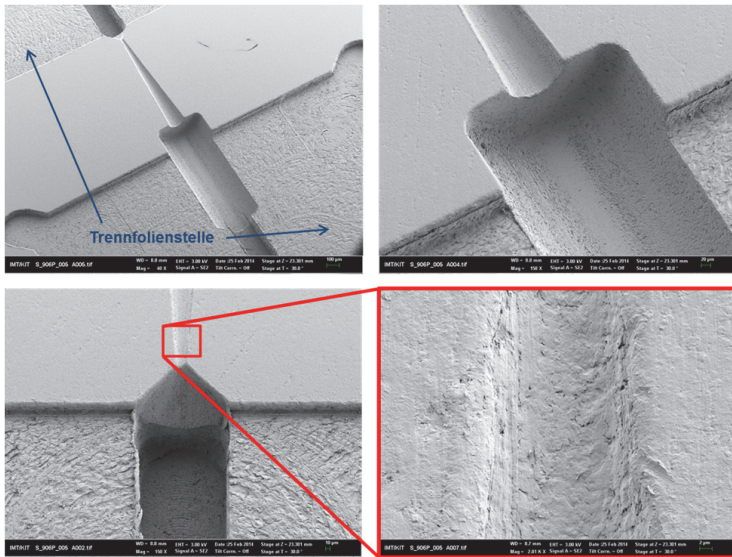


Abbildung 5.34: REM-Bilder vom oberen Chipteil

5. Konzept für das NIMEP-Gesamtsystem und experimentelle Ergebnisse

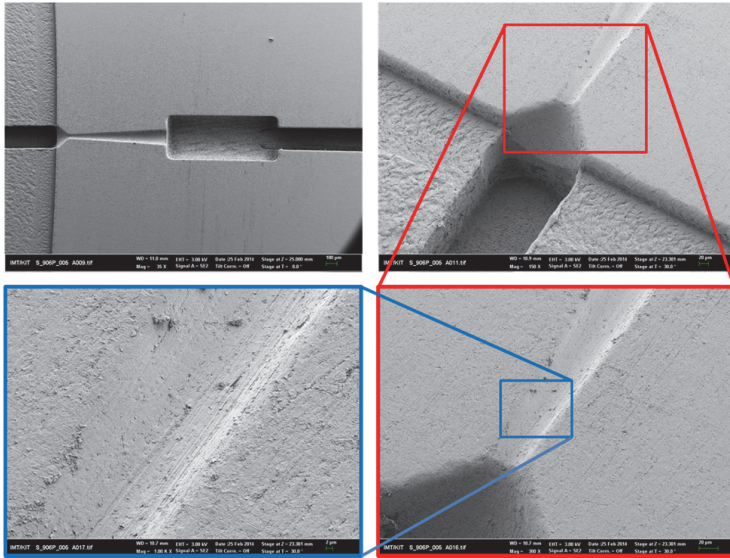


Abbildung 5.35: REM-Bilder vom Spitzenbereich des Konuskanals

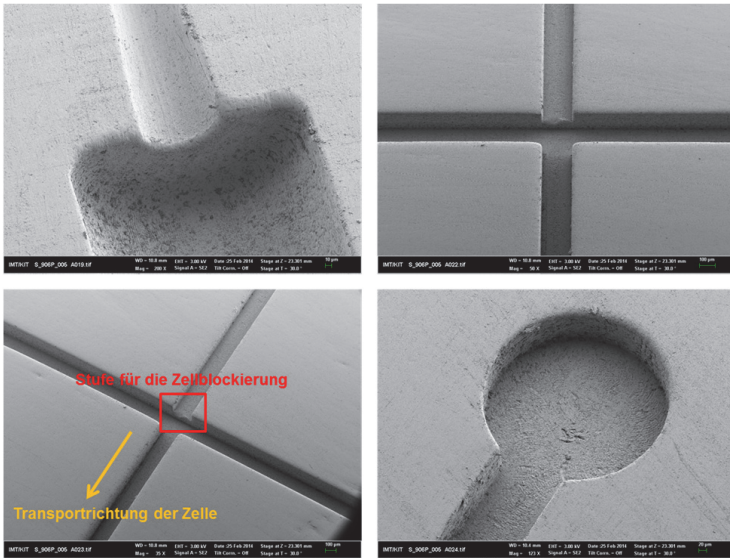


Abbildung 5.36: REM-Bilder vom unteren Chipteil

5. Konzept für das NIMEP-Gesamtsystem und experimentelle Ergebnisse

Da die Steigung der konischen Kanalstruktur steiler wird, wird die Zelle in der Nähe vom Zelleintrittsbereich fixiert, wenn sich die Zelle im Konusbereich nicht verformt. Wie im Experiment mit dem ersten Konzept zu erkennen, wird die Zelle im Konusbereich stark verformt und im Spitzenbereich der konischen Kanalstruktur fixiert. Aus diesem Grund wird die Simulation vor (siehe Abb. 5.38, 1) und nach der Verformung der Zelle (siehe Abb. 5.38, 2) durchgeführt. Für die Durchführung der Simulation wurden gleiche Bedingungen wie bei der Simulation im Kapitel 5.1.2 angenommen. In den nachfolgenden Abbildungen werden die Simulationsergebnisse für den Zelleintrittsbereich und die Auslaufseite der konischen Kanalstruktur vor und nach der Zellverformung bei der Zellfixierung dargestellt.

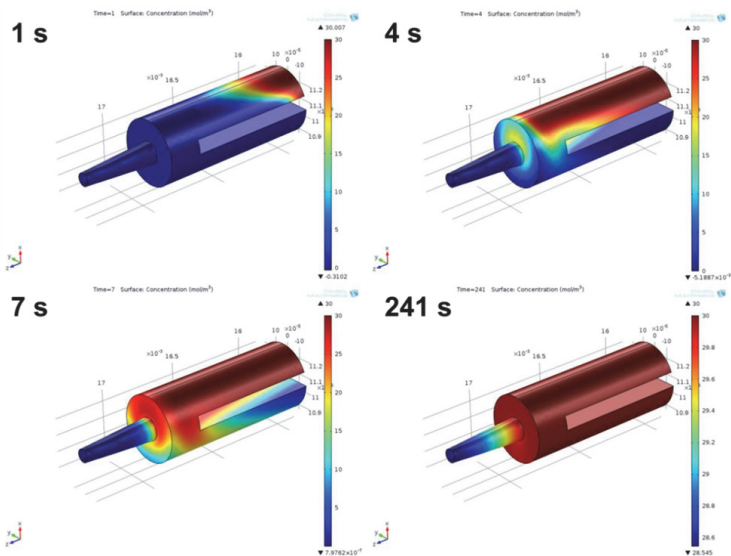


Abbildung 5.39: Simulationsergebnis für den Zelleintrittsbereich vor der Zellverformung

5. Konzept für das NIMEP-Gesamtsystem und experimentelle Ergebnisse

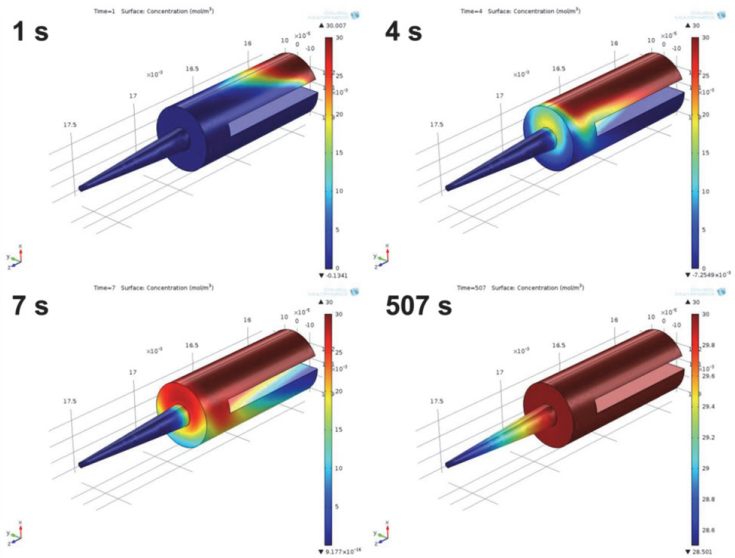


Abbildung 5.40: Simulationsergebnis für den Zelleintrittsbereich nach der Zellverformung

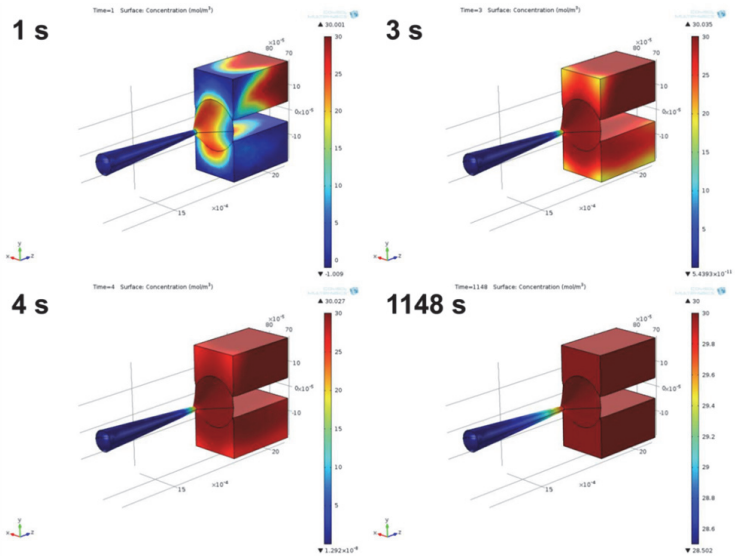


Abbildung 5.41: Simulationsergebnis für die Auslaufseite vor der Zellverformung

5. Konzept für das NIMEP-Gesamtsystem und experimentelle Ergebnisse

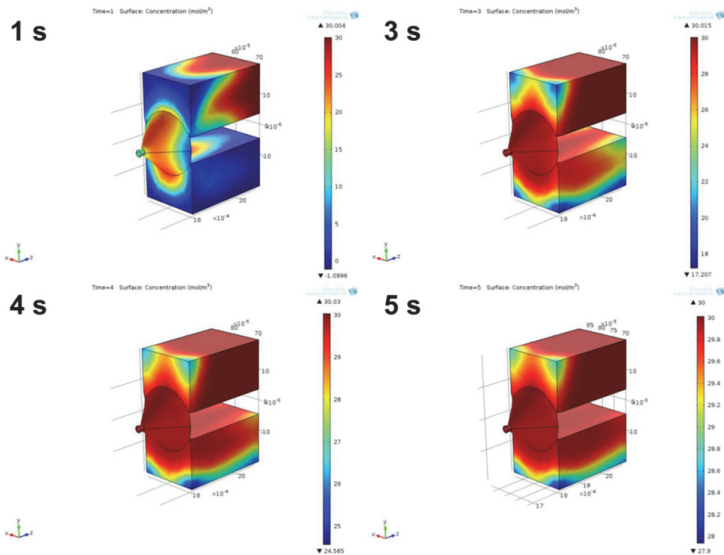


Abbildung 5.42: Simulationsergebnis für die Auslaufseite nach der Zellverformung

Aus den obigen Simulationsergebnissen kann man erkennen, dass der Medienaustausch im Zelleintrittsbereich nach der Verformung der Zelle länger als der Austausch vor der Verformung ist, da die Zelle sich nach der Verformung im Spitzenbereich der konischen Kanalstruktur befindet. Entsprechend verkürzt sich die Austauschdauer auf der Auslaufseite nach der Verformung der Zelle.

Mit der neuen Version des Zelleintrittsbereiches kann man die Lösemittel vor der Zellverformung in 241 s (ca. 4 min) komplett austauschen und nach der Zellverformung in 507 s (ca. 9 min). Die komplette Medienaustauschdauer auf der anderen Seite der konischen Kanalstruktur bzw. auf der Auslaufseite ist nach der Zellverformung (3 s) viel kürzer als vor der Zellverformung (1148 s), da die Diffusionsstrecke nach der Zellverformung viel kürzer als vor der Zellverformung ist. In Tabelle 5.5 sind die Ergebnisse des beidseitigen Medienaustausches aufgelistet.

	Zelleintrittsbereich	Auslaufbereich	Gesamtdauer
Vor der Verformung	241 s	1148 s	1389 s (ca. 23 min)
Nach der Verformung	507 s	3 s	510 s (ca. 9 min)

Tabelle 5.5: Ergebnisse der maximalen Dauer des beidseitigen Medienaustausches

5.2.3 Aufbau und Herstellung des optimierten NIMEP-Gesamtsystems

Nach der Fertigung der Chipteile und Überprüfung ihrer Strukturqualität werden beide Chipteile durch thermisches Bonden zusammengefügt. Für das thermische Bonden der beiden Chipteile wurden neue Bondparameter berechnet, da die zu bondende Fläche beim neu gefertigten Chipteil kleiner als beim ersten Chipteil ist. Die Bondtemperatur und die Haltezeit werden beibehalten, da die Chipteile aus dem gleichen Material gefertigt wurden. Die Kolbenkraft wird durch Kontaktfläche der zu bondenden beiden Bauteile und durch Bonddruck berechnet und der Kolbendruck entsprechend der Kolbenkraft bei der Bondmaschine eingestellt. In der folgenden Tabelle sind die Bondparameter für den neu gefertigten Chipteil aufgeführt.

Bondtemperatur	Haltezeit	Kolbenkraft	Kolbendruck
130 °C	23 min	10,4 kN	1,3 bar

Tabelle 5.6: Bondparameter der neu gefertigten Chipteile

Da der Spitzendurchmesser auf 20 μm reduziert wird, müssen das Ober- und Unterteil mit einer möglichst engen Toleranz zusammengefügt werden. Daher wurden vier Justierstifte mit einer engen H6-Passung integriert um mithilfe dieser engen Passung beide Chipteile genau zusammenfügen zu können.

Beim Bonden wurden Ag/AgCl Elektroden auf beiden Seiten der konischen Kanalstruktur integriert. Die Kontaktierung erfolgt später mit Hilfe von

5. Konzept für das NIMEP-Gesamtsystem und experimentelle Ergebnisse

Federkontaktstiften, die ihrerseits mit Krokodilklemmen elektrisch kontaktiert werden können. In Abbildung 5.43 wird der neu zusammenbaute Chip im Vergleich zur alten Version dargestellt.

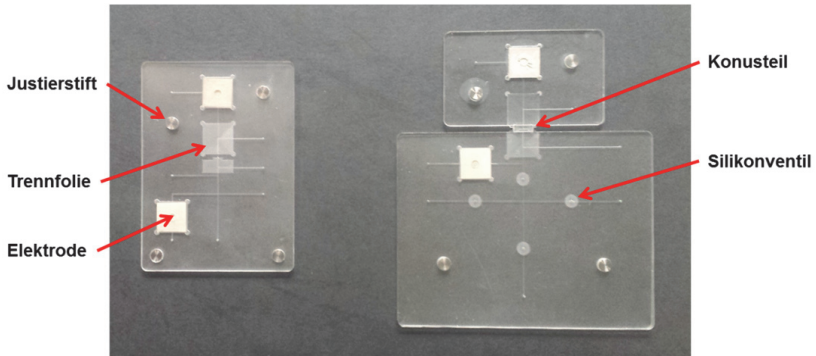


Abbildung 5.43: Vergleich der gebondeten Chipteile (links: neu, rechts: alt)

Da bei diesem Konzept einzelne Teilkomponenten gekoppelt wurden und daher alle mikrofluidischen Kanalstrukturen sich in einem Chipteil befinden, kann man darauf verzichten, die einzelnen Teile mittels Klebverfahren miteinander zu verbinden. Dies erleichtert nicht nur den Aufbau, sondern das thermisch gebondete Testsystem ist noch stabiler als das geklebte Testsystem. Dieses gebondete Chipteil wurde schließlich mit der oberen und unteren Halterung zusammengebaut und in den Justiertisch des Mikroskops eingesetzt (siehe Abb. 5.44).

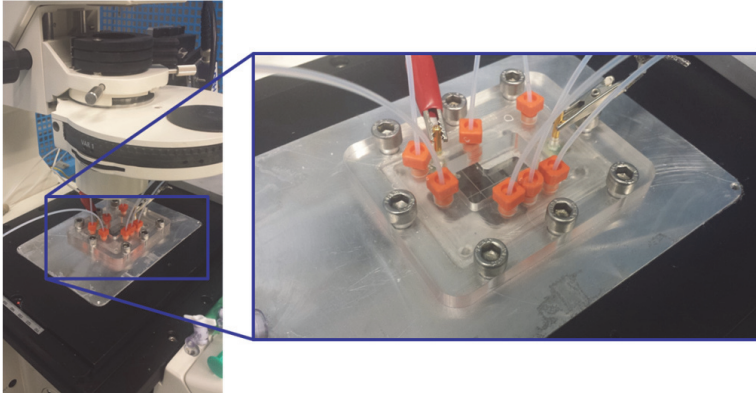


Abbildung 5.44: Komplettes Testsystem im Justiertisch des Messmikroskops

Nach Einsetzen des Testsystems in den Justiertisch des Mikroskops wurde das Testsystem mit der als Transportmedium verwendeten KCl-Lösung (siehe Abschn. 5.1.4) befüllt. Nach der Befüllung des Testsystems und anschließendem Spülen zur Beseitigung von Luftblasen wurde der Referenzwiderstand gemessen und dieser mit dem theoretischen Wert verglichen. Diesen theoretischen Widerstandswert kann man mit der folgenden Gleichung berechnen:

$$R_{Ref} = \rho \cdot \sum_{i=1}^8 \frac{l_i}{A_i}. \quad (5.2)$$

Dabei sind R_{Ref} der Referenzwiderstand, ρ der spezifische Widerstand, l die Kanallänge und A die Querschnittsfläche. Bei einem spezifischen Widerstand des Transportmediums von $1,65 \Omega \cdot \text{m}$ bei Raumtemperatur ergibt sich ein theoretischer Referenzwiderstand von $2,35 \text{ M}\Omega$. Zur Messung des Referenzwiderstandes wurde ein Spannungspuls von $\pm 5 \text{ mV}$ und 5 ms Dauer angelegt (siehe rote Kurve in Abb. 5.45) und der resultierende Strom gemessen (siehe schwarze Kurve in Abb. 5.45). Durch die gemessene Stromstärke von ca. 2 nA beim angelegten Spannungspuls von 5 mV ergibt sich ein Referenzwiderstand von $2,47 \text{ M}\Omega$. Abbildung 5.45 zeigt das Messdiagramm zur Bestimmung des Referenzwiderstandes.

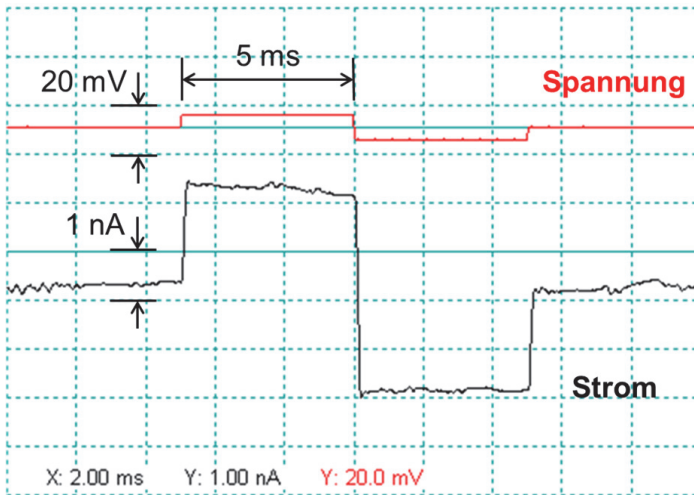


Abbildung 5.45: Diagramm zur Referenzwiderstandsmessung (bei einem angelegten Spannungspuls von 5 mV fließt ein Strom von ca. 2 nA)

Der gemessene Wert weicht vom theoretischen Referenzwiderstand von 2,35 M Ω ab. Diese Abweichung liegt vermutlich daran, dass beim Bondprozess für den Zusammenbau der oberen und unteren Chipteile wegen des relativ hohen Drucks und der hohen Bondtemperatur der Kanalquerschnitt etwas enger wird.

5.2.4 Experiment mit den Protoplasten

Nach der Entwicklung des neuen mikrofluidischen Testsystems wurden Experimente mit Tabak-Protoplasten des Typs VBI-0 durchgeführt, die wie im Kapitel 2.6 und 4.3.3 beschrieben zur Messung des Membranpotentials nach ihrer Fixierung im Konuskanal mit dem Farbstoff ANNINE-6 dotiert waren. Wie in den bisherigen Experimenten (Kap. 5.1.4) wurden die Protoplasten mit Hilfe des Transportsmediums durch den horizontalen Kanal des Zellsortiersystems geleitet und in der Mitte des Kreuzkanals mikroskopisch überprüft. Anschließend wurde ein geeigneter Protoplast durch ein von unten einge-

leitetes Lösemittel in den vertikal verlaufenden Kanal in Richtung Konuskanal gespült und im Konuskanal fixiert. In Abbildung 5.46 wird ein gesamtes Schaltbild für das Experiment dargestellt. Eine Bildsequenz zum Transport und zur genauen Positionierung eines Protoplasten zur Mitte des Kreuzkanals im neuen Testsystem wird in Abbildung 5.47 dargestellt.

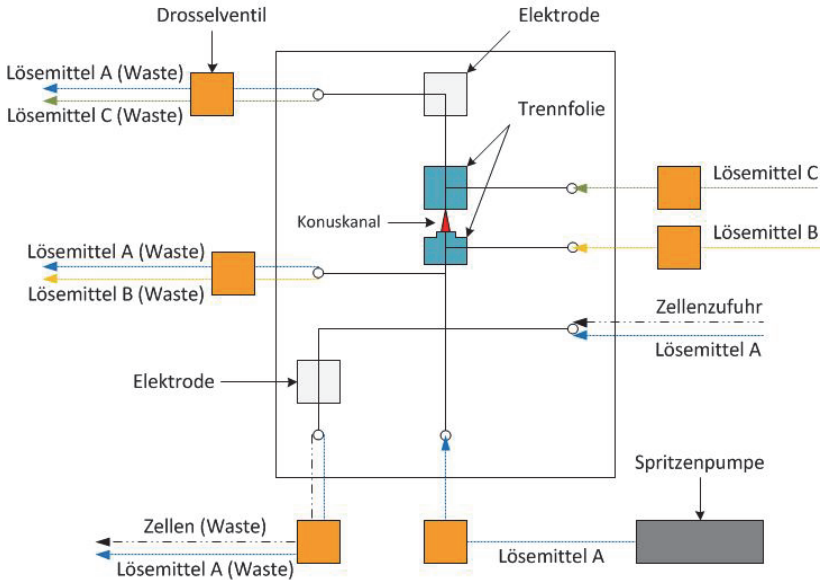


Abbildung 5.46: Gesamtes Schaltbild für das Experiment

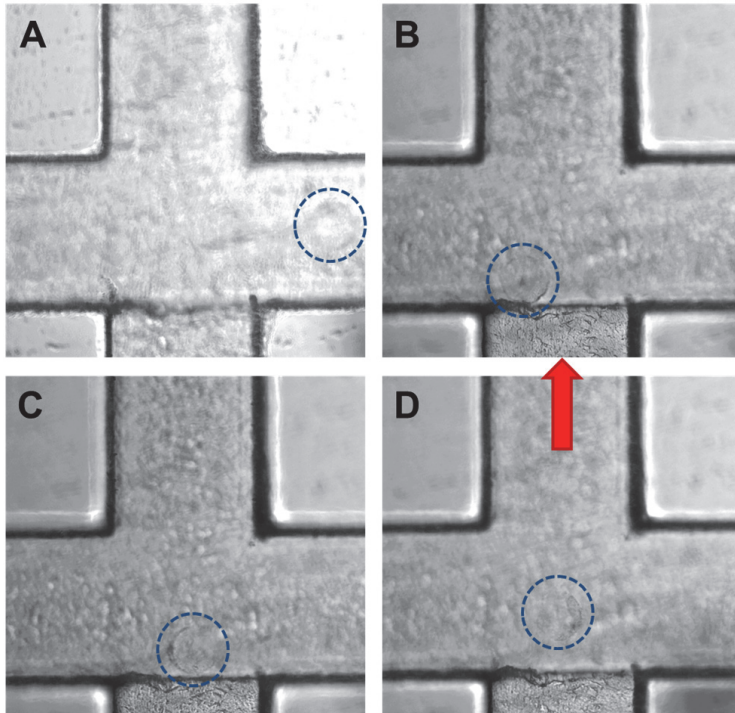


Abbildung 5.47: Auswahl eines Protoplasten im Kreuzkanalbereich

Die Aufnahmen wurden in alphabetischer Reihenfolge gemacht. Der Protoplast wird zur besseren Erkennung mit einem blauen gestrichelten Kreis markiert und der rote Pfeil gibt die Richtung an, in die der Protoplast zur konischen Struktur bewegt werden muss. Wie in Abbildung 5.47 zu erkennen, kann man den Protoplast im neu entwickelten mikrofluidischen Testsystem zur Mitte des Kreuzkanals transportieren und dort seine Position präzise halten. Zum weiteren Transport des Protoplasten müssen zwei Ventile, die sich am oberen und unteren Ende des vertikal verlaufenden Kanals befinden, geöffnet werden. Bei diesem Ventilzustand kann der Protoplast durch die weitere Zufuhr von Transportlösemittel von der unteren Seite nach oben in Richtung des Konuskanals transportiert und dort fixiert werden. Abbildung 5.48 zeigt

den in der konischen Kanalstruktur fixierte Protoplasten und ihre Verformung.

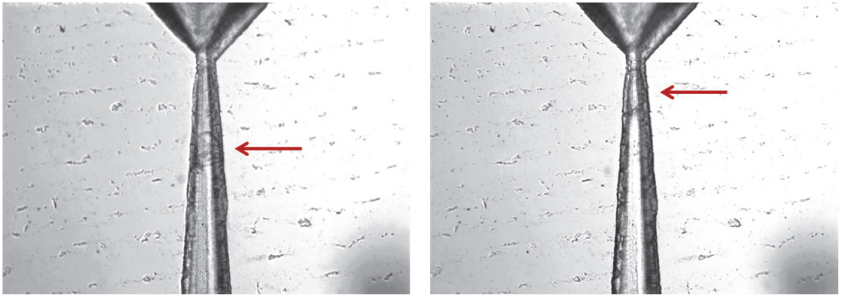


Abbildung 5.48: Fixierter Protoplast und seine Verformung in der konischen Kanalstruktur (rote Pfeile: Position des Protoplasten)

Wie in der obigen Abbildung zu erkennen, wurde der Protoplast durch den leichten Überdruck und den Innendruck, der nach dem Stoppen der Spritzenpumpe noch in der Flüssigkeit bleibt, in der konischen Kanalstruktur verformt und so bis zum Spitzenbereich verschoben. Dadurch konnte sich der Protoplast beim Fixieren besser an die Innenwand des konischen Kanals anschmiegen und dabei einen Abdichtwiderstand erreichen, der mit ca. 20 bis 30 M Ω etwa 10-mal höher als der Referenzwiderstand ist (siehe Abschn. 5.2.3).

In der nachfolgenden Abbildung 5.49 wird das Diagramm zur Bestimmung des Abdichtwiderstandes dargestellt. Zur Messung des Abdichtwiderstandes wurde wie bei der Messung des Referenzwiderstandes ein Spannungspuls von ± 5 mV und 5 ms Dauer angelegt (siehe rote Kurve in Abb. 5.49) und der resultierende Strom gemessen (siehe schwarze Kurve in Abb. 5.49). Der Abdichtwiderstandswert von 23,3 M Ω wurde durch die gemessene Stromstärke von ca. 0,2 nA beim angelegten Spannungspuls von 5 mV berechnet. Diese Werte repräsentieren die Summe aus dem Membranwiderstand des Protoplasten und dem extrazellulären Widerstand. Dieser hohe Abdichtwiderstandswert, der die grundsätzliche Voraussetzung für die weiteren Experi-

5. Konzept für das NIMEP-Gesamtsystem und experimentelle Ergebnisse

mente darstellt, konnte sowohl durch die Reduzierung des Spitzendurchmessers der konischen Kanalstruktur ermöglicht werden, als auch durch die Optimierung der Frässtrategie zur Vermeidung von Frässpuren und der Bondparameter beim thermischen Bonden zur Verminderung des Spaltes zwischen den beiden Chipteilen.

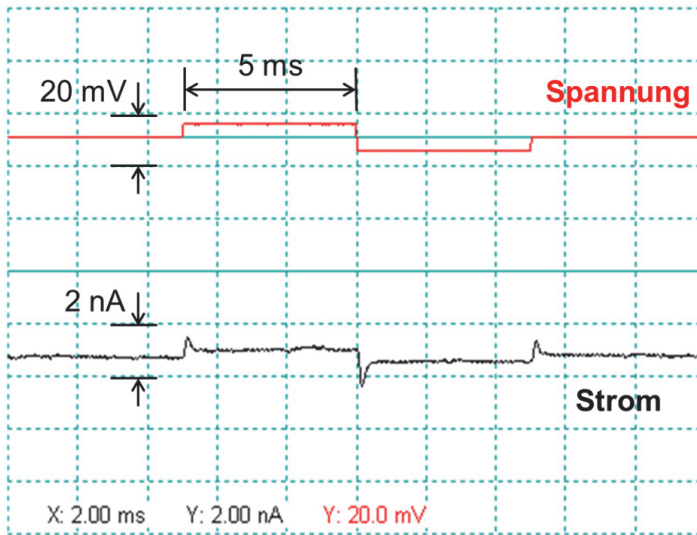


Abbildung 5.49: Diagramm der Abdichtwiderstandsmessung (bei einem angelegten Spannungspuls von 5 mV fließt ein Strom von ca. 0,2 nA)

Nach der Fixierung des Protoplasten kann man mit Hilfe des spannungsempfindlichen Farbstoffes ANNINE-6 beim angelegten Spannungspuls die Fluoreszenzintensität messen. Zur Messung der Änderung der Membranspannung wird über den Protoplasten eine definierte Spannung mit Hilfe des Patch-Clamp-Verstärkers angelegt und entsprechend der entgegengesetzten Polarisierung der Membran in den zwei Hemisphären des Protoplasten werden zwei repräsentative Membranbereiche ausgewählt (siehe gelbe Markierungen in Abb. 5.50). Diese zwei Stellen entsprechen der Pipetten- und Badseite bei der Patch-Clamp-Technik. An zwei Positionen werden Fluoreszenzintensitäten

bei 390 nm und 475 nm für eine Serie von Spannungspulsen, die über die Protoplasten angelegt werden, ausgewertet und gemäß der Eichkurve in Abbildung 4.31 im Kapitel 4.3.4 in Membranspannungen umgerechnet.

Die Auswertung erfolgte mit der aktuellen etablierten Messsoftware *Patchmaster* mit Imaging Funktion der Firma HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH. Dieses Programm erlaubt die Darstellung der Intensitätswerte eines ausgewählten Membranbereiches. Abbildung 5.50 zeigt das lichtmikroskopische Bild (links) und das entsprechende Fluoreszenzbild (rechts) des im konischen Bereich fixierten Protoplasten.

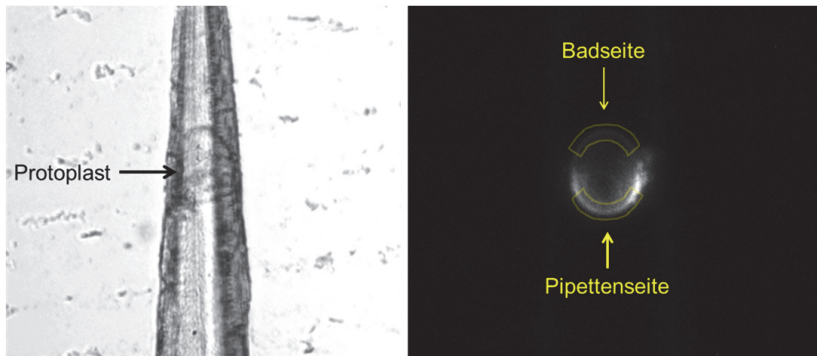


Abbildung 5.50: Lichtmikroskopisches Bild (links) und Fluoreszenzbild (rechts) des in der konischen Kanalstruktur fixierten Protoplasten

Mit Hilfe des spannungssensitiven Farbstoffes ANNINE-6 konnte man zwar die fluoreszenzoptischen Bilder des Protoplasten aufnehmen, aber die Fluoreszenzintensitäten nicht auswerten und dadurch keine optimalen Strom-Spannungskurven darstellen. Hierfür sind weitere Optimierungsarbeiten erforderlich. Trotz des um den Faktor 10 erhöhten Abdichtwiderstandes (siehe Seite 135) ist die Abdichtung der Zellmembran mit der Wand der konischen Kanalstruktur für die Messung von Strom-Spannungskurven nicht ausreichend, da ein hoher Anteil des Gesamtstromes extrazellulär abfließt. Dieser extrazellulär abfließende Strom trägt nicht zur Polarisierung der Zellmembran

bei, wodurch man keine ausreichenden Intensitätswerte, die sich durch die Polarisierung der Zellmembran ergeben, aufzeichnen konnte. Ein schwaches Membransignal führt zu einer starken Streuung der Messwerte und die daraus errechneten Membranpotentiale sind stark fehlerbehaftet. Eine verbesserte Abdichtung zwischen Kanalwand und Membran kann z.B. durch eine geeignete Oberflächenbehandlung der Kanalwand erzeugt werden. Außerdem könnte eine Optimierung des Färbeprotokolls oder auch eine verlängerte Belichtungszeit Abhilfe schaffen.

5.2.5 Fazit der Optimierung des NIMEP-Gesamtsystems

Mit der Optimierung des Gesamtsystems wurden die im vorherigen Konzept aufgetretenen Probleme (siehe Abschn. 5.1.5) korrigiert. Durch die Reduzierung des Spitzendurchmessers der konischen Kanalstruktur auf 20 μm konnte man den Durchtritt des Protoplasten im Konusbereich vermeiden und durch die Auswahl einer geeigneten Frässtrategie eine glatte Oberfläche der Innenwand der konischen Kanalstruktur erhalten. Mit diesen beiden Änderungen konnte sich die Zelle gut an die Innenwand der konischen Kanalstruktur anschmiegen und dadurch ein Abdichtwiderstand im $\text{M}\Omega$ -Bereich erreicht werden. Außerdem konnte durch die Kopplung der im ersten Konzept separat hergestellten Teilkomponenten der Montageaufwand beim Zusammenbau der einzelnen Teilkomponenten vermieden und durch den Wegfall der integrierenden Silikonventile das Testsystem weiter miniaturisiert werden.

Durch die Optimierung des im ersten Konzept etablierten mikrofluidischen Testsystems konnte man die einzelnen Protoplasten im intakten Zellzustand sortieren und transportieren. Außerdem konnten die fluoreszenzoptischen Messungen der Protoplasten mit Hilfe des spannungssensitiven Farbstoffes ANNINE-6 durchgeführt werden. Durch die Messung konnte man zwar fluoreszenzoptische Bilder der Protoplasten aufnehmen, aber die Fluoreszenz-

intensitäten nicht auswerten, da die Intensitätssignale zu schwach waren. Dieses Problem ergibt sich aus folgenden Gründen:

- Trotzdem sich die Zelle gut an die Innenwand des Konuskanals anschmiegt, ist die Abdichtung der Zellmembran entlang der Wand der konischen Kanalstruktur immer noch unzureichend,
- Aus der unzureichenden Abdichtung resultiert ein extrazellulär abfließender Strom,
- Unzureichende Färbung der Protoplasten und kurze Belichtungszeit.

Um die Patch-Clamp-Technik durch die NIMEP Technik zu ersetzen, sollen in Zukunft die oben genannten Probleme noch gelöst und das Testsystem weiter optimiert werden. Die noch zu optimierenden und weiterzuentwickelnden Aufgaben sind in Folgenden aufgelistet:

- Geeignete Oberflächenbehandlung der Kanalwand zur verbesserten Abdichtung,
- Optimierung des Färbeprotokolls und eine verlängerte Belichtungszeit,
- Weiterentwicklung für die Automatisierung der Zellmanipulierung und der fluoreszenzoptischen Messungen.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer nicht-invasiven mikrofluidischen Plattform zur elektrophysiologischen Untersuchung von Pflanzenzellen bzw. Protoplasten, die die konventionelle Patch-Clamp-Technik vereinfachen kann. Zu diesem Zweck wurde ein mikrofluidisches Testsystem entwickelt, das folgende Aufgaben erfüllen soll:

- Antransport der Zellen,
- Vorsortierung der Zellen unter mikroskopischer Überwachung,
- Fixierung einer Zelle,
- Lösungsmittelaustausch der Zellsuspension,
- Durchführung von elektrophysiologischen Messungen an mit dem spannungssensitiven Farbstoff ANNINE-6 gefärbten Zellen mittels Fluoreszenzmikroskop.

Eine wichtige Aufgabe in der Startphase war die Etablierung der Modellorganismen. Diese wurde von der AG Wegner am Institut für Hochspannungsimpuls- und Mikrowellentechnik (IHM) im KIT bearbeitet. Die Wahl fiel insbesondere wegen der Größe der aus diesen Zellen durch den enzymatischen Abbau der Zellwand gewonnenen Protoplasten auf die Tabak-Zellkulturlinie Virginia Bright Italian 0 (VBI-0). Bei der Auslegung des Testsystems wurde davon ausgegangen, dass die zu untersuchenden Protoplasten einen Durchmesser von bis zu 100 μm haben. Die Protoplasten wurden mit dem spannungssensitiven Membranfarbstoff ANNINE-6 gefärbt, mit dessen Hilfe man die spannungsabhängigen Intensitätswerte beim angelegten Spannungspuls messen und dadurch eine Kalibrierungskurve generieren konnte. Anhand dieser Kalibrierkurve können diesen Intensitätswerten Membranpotentialwerte zugewiesen werden. Durch diese Messung konnte man nachweisen, dass man in Abhängigkeit vom angelegten Spannungspuls eine Änderung der

Membranspannung gegenüber dem Ruhepotential und entsprechend dieser Änderung der Membranspannung transzelluläre Strom messen kann.

Zur Erfüllung der oben genannten Aufgabenstellungen wurde eine mikrofluidische Plattform entwickelt, die aus folgenden Einzelteilkomponenten besteht: ein Kreuzkanal zur Auswahl der einzelnen Zelle, ein Konuskanal zur Zellfixierung und Medienaustauschsysteme zum Wechsel des Lösemittels vor und hinter der fixierten Zelle.

Die Zelllösung fließt von rechts nach links durch den horizontalen Kanal des Kreuzkanals. In der Mitte des Kreuzkanals können einzelne Zellen mikroskopisch beobachtet und eine gewünschte Zelle durch ein von unten eingeleitetes Lösemittel in den vertikal verlaufenden Kanal nach oben abgelenkt werden. Von dort aus gelangt die Zelle in den Konuskanal und wird dort fixiert. Nach der Fixierung der Zelle können durch das beidseitig eingeführte Lösemittel die in der Nähe der Zelle befindlichen Wirkstoffe beidseitig ausgetauscht werden. Anschließend wird durch zwei Elektroden ein elektrisches Feld an die Zelle angelegt und der durch das externe Feld erzeugte transzelluläre Summenstrom durch elektrophysiologische Standard-Messtechnik erfasst.

Aufgrund seiner Transparenz, seiner hervorragenden Biokompatibilität, die in zahlreichen biomedizinischen Studien nachgewiesen wurde, und seiner geringen Eigenfluoreszenz Cyclic Olefin Copolymer (COC) ausgewählt.

Als erster Schritt wurden die einzelnen Teilkomponenten prototypisch entwickelt und ihre Funktionstüchtigkeit überprüft. Auf Basis dieser Untersuchungen wurden die einzelnen Teilkomponenten sowohl in ihrer Funktion als auch ihrem technischen Aufbau optimiert und damit ein erstes Gesamtsystem konzipiert, das aus drei Einzelkomponenten besteht, dem erweiterten Zellsortiersystem, das neben einem Kreuzkanal zur Zellsortierung auch ein Medienaustauschsystem zu Wechseln des Lösemittels im Zulauf des Konuskanals enthält, dem Konusteil zur Zellfixierung und dem Auslaufsystem, das

ein zweites Medienaustauschsystem zum Wechseln des Lösemittels an der Konuskanalspitze enthält.

Zur Herstellung des Zellsortierteils wurden die Kanäle durch direkte Fräsbearbeitung von entsprechenden COC-Platten als zwei Hälften mit rechteckigem Querschnitt hergestellt und dann mittels thermischen Bonden miteinander verbunden.

Zur Zellfixierung wurde eine konische Kanalstruktur konzipiert, für die drei unterschiedliche Fertigungsmöglichkeiten erprobt wurden: Heißprägen, ein Gießverfahren und die direkte Fräsbearbeitung. Das Heißprägen schied aus, da aufgrund des sehr kleinen Durchmessers der Konusspitze von 50 μm kein ausreichend stabiles Abformwerkzeug hergestellt werden konnte, das Gießverfahren erforderte eine umfangreiche Nachbearbeitung. Der Aufbau aus zwei Halbschalen, die durch direkte Fräsbearbeitung gefertigt wurden, ist am aussichtsreichsten, da sich herausstellte, dass der Zusammenbau des separat hergestellten Konusteils mit anderen Teilkomponenten schwierig war, der aus den Halbschalen bestehende Konuskanal aber in das Gesamtsystem unmittelbar integriert werden könnte.

Für die Auswahl einer für den Medienaustausch besser geeigneten Geometrie wurde eine Simulation mit unterschiedlichen Varianten durchgeführt und die Dauer des beidseitigen Lösemittelaustausches bestimmt. Durch die Simulation konnte man eine optimierte Konstruktion für den Lösungsmittelaustausch in Form einer dreischichtigen mikrofluidischen Kanalstruktur bestimmen.

In Hinblick auf eine spätere Automatisierung wurde ein Silikonventilsystem konzipiert, das mit Hilfe einer pneumatischen Ansteuerung eine Silikonfolie so verformt, dass einzelne Kanalabschnitte komplett geschlossen und wieder geöffnet werden können. Dazu wurde die rechteckige Kanalstruktur unterhalb der Silikonfolie zu einer Halbkugel erweitert, die von der ausgelenkten Silikonfolie vollständig abgedichtet werden kann.

Nach der Herstellung der Einzelkomponenten und der Überprüfung ihrer Funktionstüchtigkeit wurden die gefertigten Einzelkomponenten mittels Klebverfahren miteinander verbunden und dann in einer Halterung platziert, an die die elektrischen und fluidischen Verbindungen angeschlossen werden können. Die fluidische Kontaktierung erfolgt mittels Standard-HPLC-Bauteilen. Dazu werden Hohlschrauben in die Halterung geschraubt und mit Hilfe einer Dichtscheibe auf die Öffnung des mikrofluidischen Testsystems gepresst.

Ein erster Funktionstest mit Polystyrol (PS)-Partikeln konnte nachweisen, dass man im Testsystem einzelne Partikel sortieren und fixieren kann und die fixierte Partikel für weitere Anwendungen vom Konusbereich wieder entnehmen kann.

Anschließend erfolgten Experimente mit Protoplasten, mit deren Hilfe die mikrofluidische Plattform weiter optimiert wurde:

Da die Protoplasten sich stark verformten und so den Konuskanal durchdringen konnten, wurde der Durchmesser der Konusspitzen auf 20 μm reduziert, um den Protoplasten zuverlässig in der konischen Kanalstruktur fixieren und seine Mindestgröße reduzieren zu können. Darüber hinaus konnte man durch die Auswahl einer geeigneten Frässtrategie eine glatte Oberfläche der Innenwand der konischen Kanalstruktur erhalten, so dass sich die Zelle gut an die Innenwand des Konuskanals anschmiegen kann, wodurch ein Abdichtwiderstand im $\text{M}\Omega$ -Bereich erreicht wurde. Die Experimente zeigten auch, dass die Protoplasten in der entwickelten mikrofluidischen Plattform nicht beschädigt werden. Daher konnte man den intakten Protoplasten nach seiner Fixierung wieder aus dem Konusbereich herauspülen und könnte ihn dann weiteren Untersuchungen zuführen, was bei der herkömmlichen Patch-Clamp-Technik wegen des invasiven Messverfahrens nicht möglich ist.

Da die ins erste Testsystem integrierten Silikonventile durch ihre Volumenänderung bei der Verformung die präzise Zellpositionierung in der Mitte des

Kreuzkanals negativ beeinflussten, wurden die Silikonventile im Testsystem durch handsteuerbare Drosselventile außerhalb des Chipteils ersetzt, deren Totvolumen vernachlässigbar sind. Durch den Wegfall der integrierten Silikonventile konnte man und gleichzeitig den gesamten Aufbau kompakter gestalten.

Um den Aufwand beim Zusammenbau der Teilkomponenten zu vermeiden, wurden alle Teilkomponenten einschließlich des Konuskanals auf einer gemeinsamen Chipplatte durch Fräsbearbeitung gefertigt und anschließend die beiden Halbschalen durch thermisches Bonden miteinander verbunden. Für eine künftige Massenproduktion könnten die beiden Halbschalen des kompakten Gesamtsystems auch durch Abformung hergestellt werden.

Nach der obigen Optimierung der in dieser Arbeit entwickelten mikrofluidischen Plattform wurden weitere Experimente mit Protoplasten durchgeführt und die zeigten, dass man in dieser Plattform einen einzelnen Protoplasten auswählen und anschließend in der konischen Kanalstruktur fixieren kann. Nach erfolgter Fixierung der zuvor mit ANNINE-6 gefärbten Protoplasten konnten bei angelegtem elektrischem Feld fluoreszenzoptische Bilder der Membranpotentialverteilung an der Oberfläche des Protoplasten aufgenommen werden. Leider waren bei den ersten Experimenten die Intensitätssignale zu schwach, so dass die Fluoreszenzintensitäten nicht ausgewertet werden konnten. Um diese Probleme zu vermeiden und die mikrofluidische Plattform dadurch zukünftig in der pharmakologischen Forschung und Diagnostik als Alternative zur Patch-Clamp-Technik einsetzen zu können, muss das System noch in folgenden Bereichen weiterentwickelt und optimiert werden:

- Optimierung des Färbeprotokolls und eine verlängerte Belichtungszeit,
- Geeignete Oberflächenbehandlung der Kanalwand zur verbesserten Abdichtung,

- Weiterentwicklung für die Automatisierung der Zellsortierung und der fluoreszenzoptischen Messungen.

Zur Weiterentwicklung des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Testsystems soll in der Zukunft die Oberflächenqualität der Kanalwand zur verbesserten Abdichtung verbessert werden. Dadurch kann bei der Fixierung der Zelle in der konischen Kanalstruktur noch höherer Abdichtwiderstand im G Ω -Bereich erreicht werden. Dies könnte durch eine geeignete Oberflächenbehandlung der Innenwand der konischen Kanalstruktur oder durch die weitere Reduzierung des Spitzendurchmessers erfolgt werden. Darüber hinaus sollen das geeignete Färbeprotokoll und die optimale Belichtungszeit für das in dieser Arbeit entwickelte Testsystem etabliert und optimiert werden. Dadurch könnte man noch stärkere Intensitätssignale aufzeichnen, durch die die physiologisch bedeutenden Ergebnisse bewertet werden können.

Zur Automatisierung der Zellsortierung im Testsystem soll in der Zukunft ein neues Ventilsystem ins System integriert werden, das das bisherige handsteuerbare Ventil ersetzen kann und bei der Steuerung eine möglichst geringe Volumenänderung verursacht, um eine präzise Zellmanipulierung zu ermöglichen.

Außerdem soll ein mikrostrukturiertes Abformwerkzeug bzw. ein metallischer Formeinsatz für die zukünftige Massenproduktion hergestellt werden. Dies kann durch die galvanische Replikation des durch Fräsbearbeitung gefertigten Testsystems ermöglicht werden.

Literaturverzeichnis

- [1] E. Neher, B. Sakmann. *Die Erforschung von Zellsignalen mit der Patch-Clamp-Technik*, Spektrum der Wissenschaft, 1992, 48-56
- [2] B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*, Wiley-VCH, 2012, 4. Auflage
- [3] H. D. Görtz, F. Brümmer. *Biologie für Ingenieure*, Springer Spektrum, 2012
- [4] J. Dunlop, M. Bowlby, R. Peri, D. Vasilyec, R. Arias. *High-throughput electrophysiology: and emerging paradigm for ion-channel screening and physiology*, Nature Reviews Drug Discovery, 2008, Vol. 7, 358-368
- [5] C. Wood, C. Williams, G. J. Waldron. *Patch clamping by numbers*, Drug Discovery Today, Vol. 9, 434-441
- [6] L. H. Wegner. *KMU-innovativ-4: Ein neuer Ansatz zum Testen von Wirkstoffen an pflanzlichen Zellen mit der nicht-invasiven mikrofluidischen Plattform für die Elektrophysiologie (NIMEP Technologie)*, Projekt-beschreibung, 2009
- [7] L. H. Wegner, W. Frey, S. Schönwälder. *A critical evaluation of whole cell patch clamp studies on electroporation using the voltage sensitive dye ANNINE-6*, 2013, Bioelectrochemistry, Vol. 92, 42-46
- [8] N. Fertig, R. H. Blick, J. C. Behrends. *Whole Cell Patch Clamp Recording Performed on a Planar Class Chip*, 2002, Biophysical Journal, Vol. 82, 3056-3062
- [9] S. Wilson. *Design and Development of a Polymer Patch Clamping Device*, 2010, Dissertation Cranfield University
- [10] B. Matthews, J. W. Judy. *Design and fabrication of a micromachined planar patch-clamp chip with integrated microfluidics for single-cell measurements*, Journal of microelectromechanical systems, 2006, Vol. 15, 214-222

- [11] N. Fertig, Ch. Meyer, R. H. Blick, Ch. Trautmann, J. C. Behrends. *Microstructured glass chip for ion-channel electrophysiology*, 2001, Physical Review E, Vol. 64, 040901(R)
- [12] C. Y. Chen, T. Y. Tu, C. H. Chen, D. S. Jong, A. M. Wo. *Patch clamping on plane glass – fabrication of hourglass aperture and high-yield ion channel recording*, Lab Chip, 2009, Vol. 9, 2370-2380
- [13] A. Brüggemann, S. Stoelzle, M. George, J. C. Behrends, N. Fertig. *Microchip Technology for Automated and Parallel Patch-Clamp Recording*, 2006, Small, Vol. 2, 840-846
- [14] H. M. Tao, D. S. Ana, A. Guia, M. X. Huang, J. Ligutti, G. Walker, K. Sithiphong, F. Chan, G. L. Tao, Z. Zozulya, S. Saya, R. Phimmachack, C. Sie, J. Yuan, L. Wu, J. Xu, A. Ghetti. *Automated Tight Seal Electrophysiology for Assessing the Potential hERG Liability of Pharmaceutical Compounds*, 2004, Assay and Drug Development Technologies, Vol. 2, 497-506
- [15] J. Kutchinsky, S. Friis, M. Asmild, R. Taboryski, S. Pedersen, R. K. Vestergaard, R. B. Jacobsen, K. Krzywkowski, R. L. Schröder, T. Ljungstrøm, N. Hélix, C. B. Sørensen, M. Bech, and N. J. Willumsen. *Characterization of Potassium Channel Modulators with QPatch™ Automated Patch-Clamp Technology: System Characteristics and Performance*, 2003, Assay and Drug Development Technologies, Vol. 1, 685-693
- [16] N. Fertig, M. George, M. Klau, C. Meyer, A. Tilke, C. Sobotta, R. H. Blick, J. C. Behrends. *Microstructured Apertures in Planar Glass Substrates for Ion Channel Research*, 2003, Receptors and Channels, Vol. 9, 29-40
- [17] P. H. Raven, R. F. Evert, S. E. Eichhorn. *Biologie der Pflanzen*, 2005, de Gruyter, 4. Auflage
- [18] M. W. Nabors. *Botanik*, 2007, Pearson Studium, 31-56
- [19] V. Sonnleitner, J. Rojacher. *BASIC Biologie*, 2009, Urban & Fischer Verlag, 1. Auflage
- [20] S. Silbernagl. *Taschenatlas der Physiologie*, 2003, Georg Thieme Verlag

- [21] N. A. Campbell, J. B. Reece, L. A. Urry, M. L. Cain, S. A. Wassermann, P. V. Minorsky, R. B. Jackson. *Biology*, 2008, Pearson Education, 8th ed.
- [22] G. Karp. *Molekulare Zellbiologie*, 2005, Springer-Verlag
- [23] U. Lüttge, M. Kluge, G. Thiel. *Botanik*, 2010, Wiley-VCH Verlag, 1. Auflage
- [24] R. Klinke, H. C. Pape, S. Silbernagl. *Physiologie*, 2005, Georg Thieme Verlag, 5. Auflage
- [25] K. Schmidt, *Charakterisierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle an glialen Vorläuferzellen der Maus*, 1998, Dissertation Humboldt-Universität zu Berlin
- [26] S. W. Lockless, M. Zhou, R. MacKinnon. *Structural and Thermodynamic Properties of Selective Ion Binding in a K⁺ Channel*, 2007, PloS Biology, Vol. 5, 1079-1088
- [27] O.P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F. J. Sigworth. *Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches*, 1981, Pflügers Archiv, Springer-Verlag, Vol. 391, 85-100
- [28] S. Schönwälder. *Patch-Clamp Messungen an Tabak-Kulturzellen zur Charakterisierung des spannungssensitiven Membranfarbstoffes ANNINE-6*, 2012, Master-Thesis KIT Karlsruhe
- [29] M. Keunecke. *Untersuchungen zum Ionentransport aus dem Xylem in den Symplasten des Maisblattes*, 1999, Dissertation CAU Kiel
- [30] B. Flickinger. *Nanosekunden-zeitaufgelöste Messungen der Plasmamembranaufladung pflanzlicher Zellen*, 2010, Dissertation KIT Karlsruhe
- [31] G. Hübner, A. Lambacher, P. Fromherz. *Anellated Hemicyanine Dyes with large symmetrical solvatochromism of absorption and fluorescence*. 2003, Journal of Physical Chemistry, Vol. 107, 7896-7902
- [32] P. Fromherz, G. Hübner, B. Kuhn, M. J. Hinner. *ANNINE-6plus, a voltage-sensitive dye with good solubility, strong membrane binding and high sensitivity*, 2008, European Biophysics Journal, Vol. 37, 509-514

- [33] H. A. Stone, A. D. Stroock, A. Ajdari. *Engineering Flows In Small Devices: Microfluidics Toward a Lab-on-a-Chip*, 2004, Annual Reviews of Fluid Mechanics, Vol. 36, 381-411
- [34] W. Menz, J. Mohr, O. Paul. *Mikrosystemtechnik für Ingenieure*, 2005, Wiley-VCH, Verlag, 3. Auflage
- [35] A. E. Guber. *BioMEMS-I: Mikrosystemtechnik für Life-Sciences und Medizin: Mikroanalytensysteme (μ TAS)*, Wintersemester 09/10, Vorlesungsskript, 3-23, KIT Karlsruhe
- [36] G. Gerlach, W. Dötzel. *Einführung in die Mikrosystemtechnik: Ein Kursbuch für Studierende*, 2006, Carl-Hanser-Verlag
- [37] N. T. Nguyen. *Mikrofluidik: Entwurf, Herstellung und Charakterisierung*, 2004, Teubner Verlag, 1. Auflage
- [38] H. O. jr., M. Böhle, U. Dohrmann. *Strömungsmechanik*, 2006, Vieweg & Sohn Verlag, 4. Auflage
- [39] H. Lesch, G. T. Birk, H. Zohm. *TVI: Theoretische Hydrodynamik*, Vorlesungsskript, 98-100, LMU München
- [40] N. Schwesinger, C. Dehne, F. Adler. *Lehrbuch Mikrosystemtechnik: Anwendungen, Grundlagen, Materialien und Herstellung von Mikrosystemen*, 2009, Oldenbourg Wissenschaftsverlag
- [41] R. Brück, N. Rizvi, A. Schmidt. *Angewandte Mikrotechnik: LIGA – Laser – Feinwerktechnik*, 2001, Carl Hanser Verlag
- [42] W. Ehrfeld. *Handbuch Mikrotechnik*, 2002, Carl Hanser Verlag
- [43] N. Mirnoff. *Einführung in das Studium der Elektroerosion (Physikalische Grundlagen und Praktische Anwendungen)*, 1968, Microtec (Hrsg.)
- [44] F. V. Dijck. *Physico-mathematical analysis of the EDM process*, 1973, Dissertation KU Leuven
- [45] D. F. Dauw. *On-Line Identification and Optimization of Electrodischarge Machining*, 1985, KU Leuven

- [46] K. Förster. *Untersuchung der technologischen und physikalischen Zusammenhänge beim funkenerosiven Drahtschneiden*, 1979, Dissertation TU München
- [47] D. D. DiBitonto, P. T. Eubank, M. R. Patel M. A. Barrufet. *Theoretical models of the electrical discharge machining process. I. A simple cathode erosion model*, 1989, Journal of Applied Physics, Vol. 66, 4095-4103
- [48] R. Wertheim. *Untersuchung der energetischen Vorgänge bei der funkenerosiven Bearbeitung als Grundlage für eine Verbesserung des Prozessablaufes*, 1975, Dissertation RWTH Aachen
- [49] P. T. Eubank, M. R. Patel, M. A. Barrufet, B. Bozkurt. *Theoretical models of the electrical discharge machining process. III. The variable mass cylindrical plasma model*, 1993, Journal of Applied Physics, Vol. 73, 7900-7909
- [50] M. R. Patel, M. A. Brrufet, P. T. Eubank, D. D. DiBitonto. *Theoretical models of the electrical discharge machining process. II. A simple anode erosion model*, 1989, Journal of Applied Physics, Vol. 66, 4104-4111
- [51] W. König. *Fertigungsverfahren, Band 3: Abtragen*, 1990, VDI-Verlag, 2. Auflage
- [52] N. Mirnoff. *Die Elektroerosion – ihre physikalischen Grundlagen und industriellen Anwendungen*, 1965, Microtechnic 19
- [53] R. Kurr. *Grundlagen zur selbsttätigen Optimierung des funkenerosiven Senkens*, 1972, Dissertation TH Aachen
- [54] M. Worgull. *Analyse des Mikro-Heißprägeverfahrens*, 2003, Dissertation FZKA Karlsruhe
- [55] C. Jubert. *Mikrofluidikchip zur gezielten Stammzellendifferenzierung*, 2009, Diplomarbeit KIT Karlsruhe
- [56] L. Petrova. *Entwicklung einer effektiven Verbindungstechnik zum Bonden von mikrostrukturierten Kunststoffplatten*. 2004, Diplomarbeit FZKA Karlsruhe
- [57] S. H. Kim, Y. Yang, M. Kim, S. W. Nam, K. M. Lee, N. Y. Lee, Y. S. Kim, S. Park. *Simple Route to Hydrophilic Microfluidics Chip Fabrication Using an*

- Ultraviolet (UV)-Cured Polymer*, 2007, *Advanced Functional Materials*, Vol. 17, 3493-3498
- [58] A. Waldbaur, H. Rapp, K. Länge, B. E. Rapp. *Let there be chip – towards rapid prototyping of microfluidic devices: one-step manufacturing processes*, 2011, *Analytical Methods*, Vol. 3, 2681-2716
- [59] C. E. Hoyle, T. Y. Lee, T. Roper. *Thiol-Enes: Chemistry of the Past with Promise for the Future*, 2004, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, Vol. 42, 5301-5338
- [60] C. F. Carlborg, T. Haraldsson, K. Öberg, M. Malkoch, W. v. d. Wijngaart. *Beyond PDMS: off-stoichiometry thiol-ene (OSTE) based soft lithography for rapid prototyping of microfluidic devices*, 2011, *Lab Chip*, Vol. 11, 3136-3147
- [61] S. K. Reddy, N. B. Cramer, C. N. Bowman, *Thiol-Vinyl Mechanisms. I. Termination and Propagation Kinetics in Thiol-Ene Photopolymerizations*, 2006, *American Chemical Society*, Vol. 39, 3673-3680
- [62] D. Baumhoer, I. Steinbrück, W. Götz. *Kurzlehrbuch: Histologie*, 2003, Urban & Fischer Verlag, 2. Auflage
- [63] E. Hornbogen, H. Warlimont. *Metallkunde: Aufbau und Eigenschaften von Metallen und Legierungen*, 2001, Springer-Verlag, 4. Auflage
- [64] E. Hornbogen, B. Skrotzki. *Mikro- und Nanoskopie der Werkstoffe*, 2009, Springer-Verlag, 3. Auflage
- [65] R. Eckert, D. Randall, W. Burggren, K. French. *Tierphysiologie*, 2002, Georg Thieme Verlag, 4. Auflage
- [66] J. Haus. *Optische Mikroskopie: Funktionsweise und Kontrastierverfahren*, 2014, Wiley-VCH Verlag
- [67] L. P. Belova. *Mehrlagige mikrofluidische Systeme aus Polymeren zur zweidimensionalen Kapillarelektrophorese*, 2010, Dissertation KIT Karlsruhe

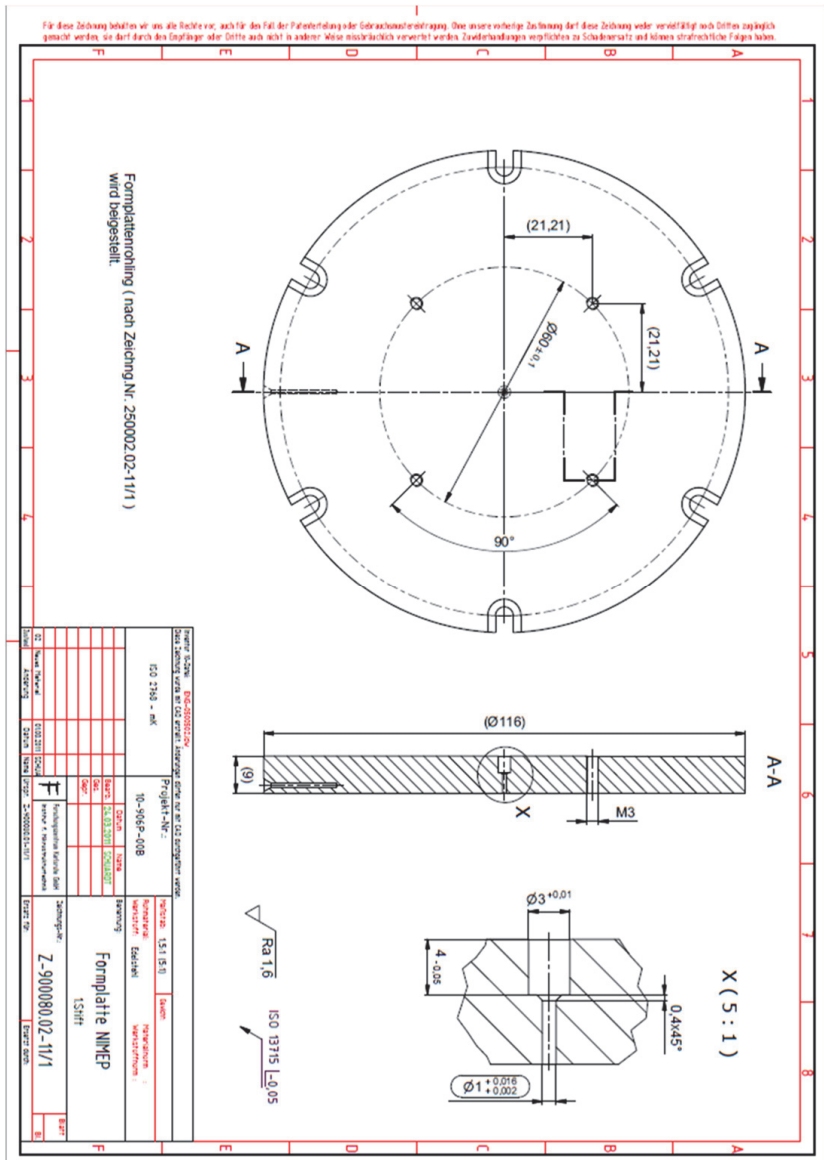
- [68] L. H. Wegner. *KMU-innovativ-4: Ein neuer Ansatz zum Testen von Wirkstoffen an pflanzlichen Zellen mit der nicht-invasiven mikrofluidischen Plattform für die Elektrophysiologie (NIMEP Technologie)*, Zwischenbericht, 2010
- [69] G. Albach. *Die Bedeutung tonoplastenständiger Ca²⁺-Transporter für die zytoplasmatische Signalübertragung und Ca²⁺-Homöostase bei Zea mays L.-Koleoptilen*, 1999, Dissertation Justus-Liebig-Universität Gießen
- [70] L. H. Wegner. *KMU-innovativ-4: Ein neuer Ansatz zum Testen von Wirkstoffen an pflanzlichen Zellen mit der nicht-invasiven mikrofluidischen Plattform für die Elektrophysiologie (NIMEP Technologie)*, Zwischenbericht, 2011
- [71] L. H. Wegner. *KMU-innovativ-4: Ein neuer Ansatz zum Testen von Wirkstoffen an pflanzlichen Zellen mit der nicht-invasiven mikrofluidischen Plattform für die Elektrophysiologie (NIMEP Technologie)*, Zwischenbericht, 2012
- [72] The Dow Chemical Company, URL abgerufen am 07.05.2014, URL <http://www.dow.com/webapps/lit/litorder.asp?filepath=glycerine/pdfs/noreg/115-00656.pdf&pdf=true>
- [73] Y. Saito. *Micro End Mill Series*, NS TOOL CO.,LTD., URL abgerufen am 07.05.2014, URL http://jp112132899.trustpass.alibaba.com/product/112221434-101825006/NSMB100_miniature_end_mill_ball_end_mill_for_micro_milling_.html, <http://www.ns-tool.com/cgi-bin/e/docat/dt.php?j=2&s=35>

Anhang 1: Drucktabelle für Thermobonden

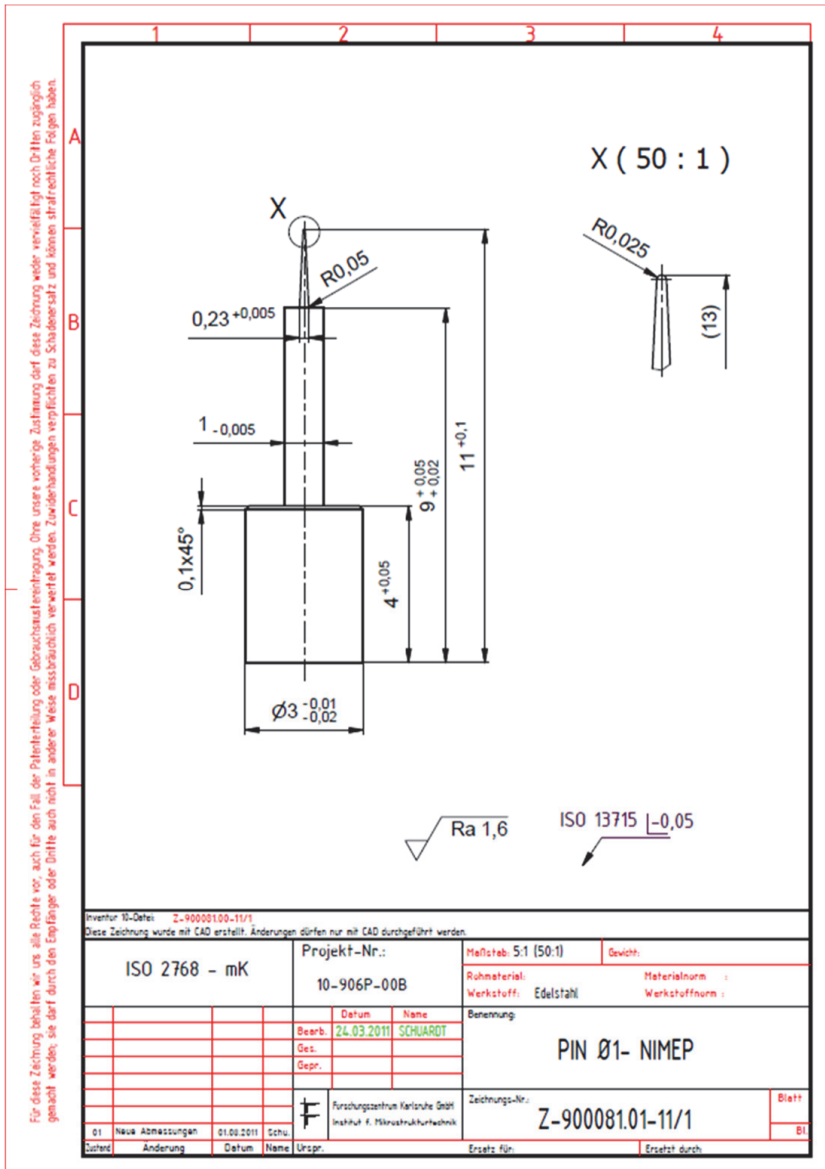
Drucktabelle

bar	N	bar	N	bar	N	bar	N
0	0	1,2	9651	2,4	19302	3,6	28953
0,2	1609	1,4	11259	2,6	20910	3,8	30561
0,4	3217	1,6	12868	2,8	22519	4,0	32170
0,6	4825	1,8	14476	3,0	24127	4,2	33778
0,8	6434	2,0	16085	3,2	25736	4,4	35387
1,0	8042	2,2	17693	3,4	27344	4,6	36995

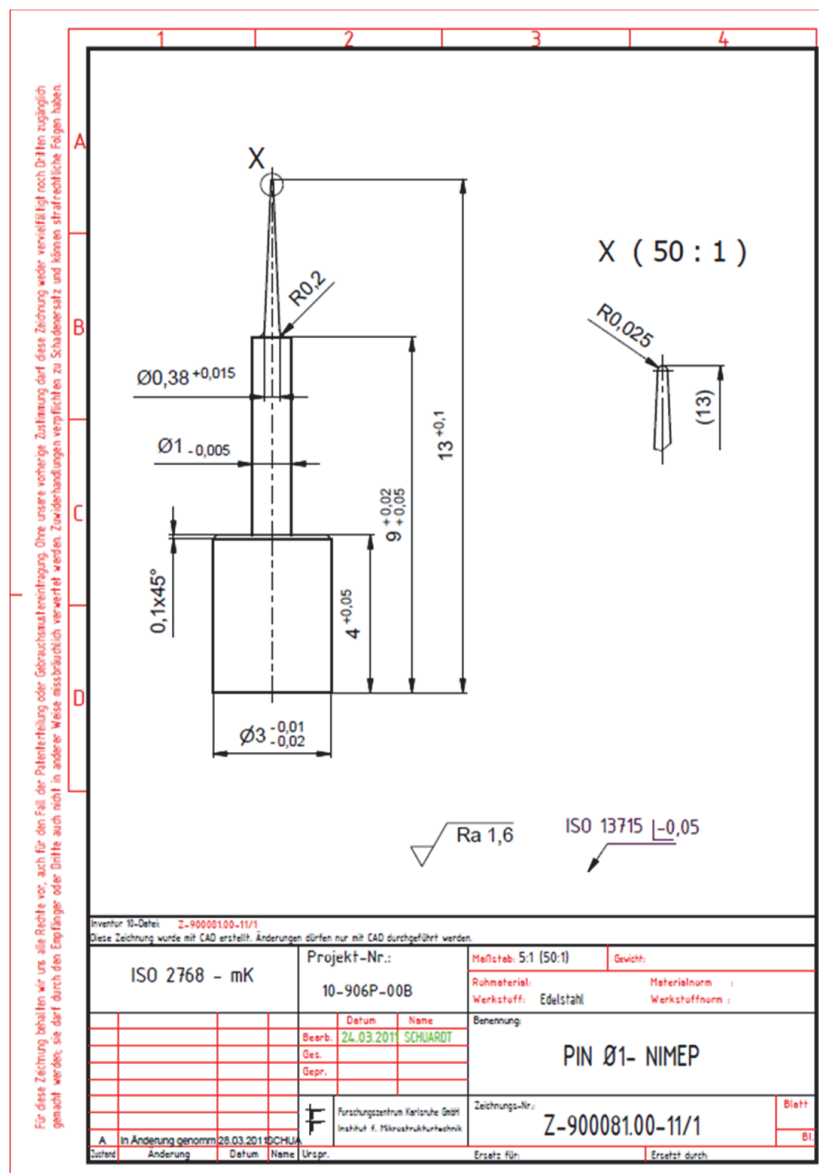
Anhang 2: Formplatte NIMEP



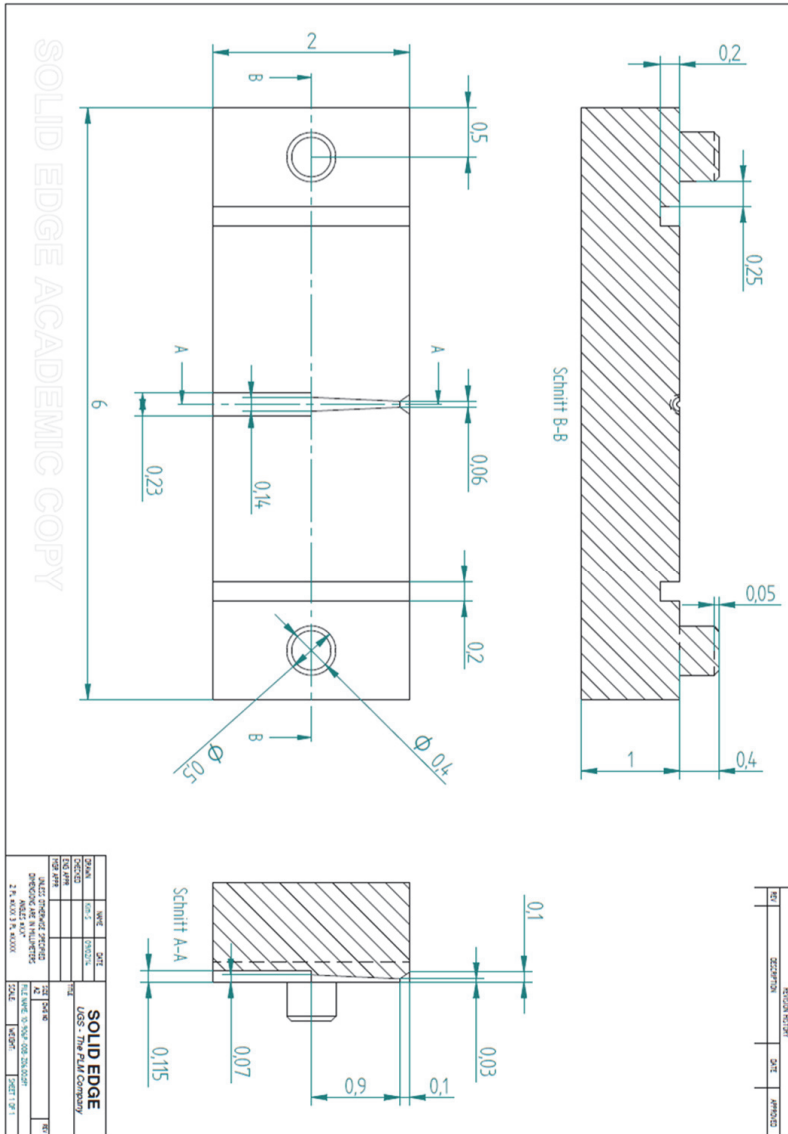
Anhang 3: Stift mit der Länge von 2 mm



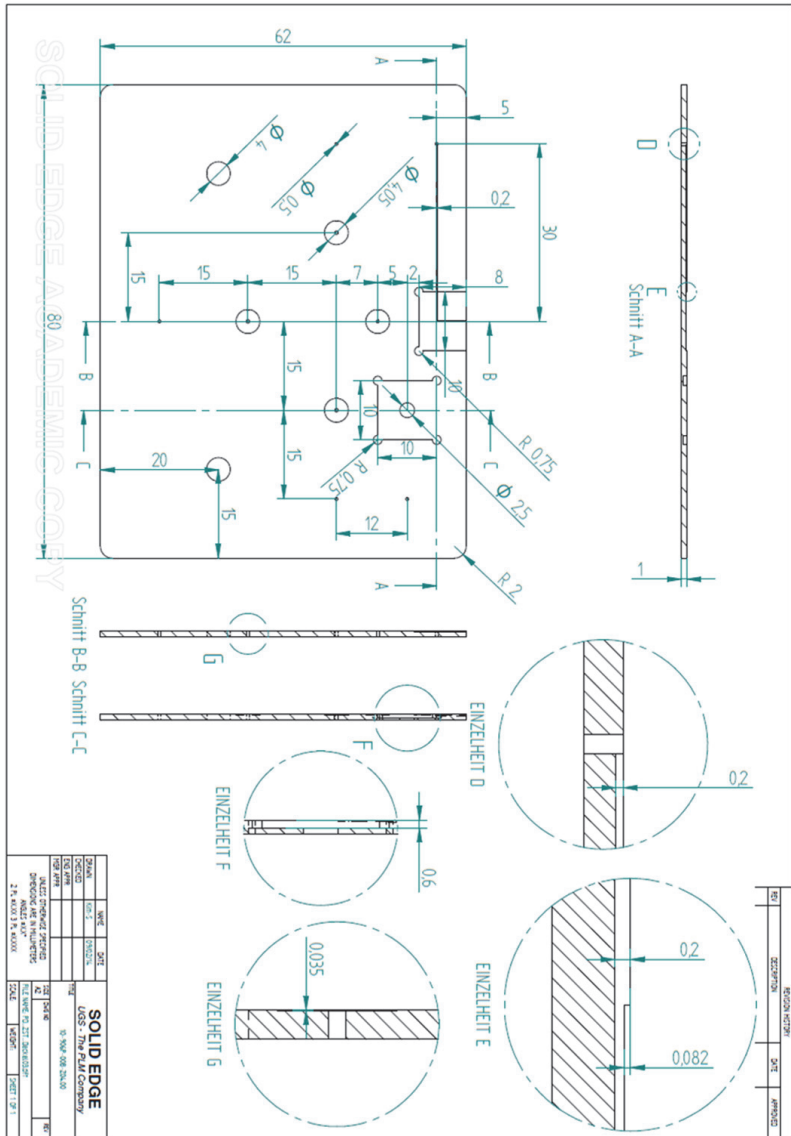
Anhang 4: Stift mit der Länge von 4 mm



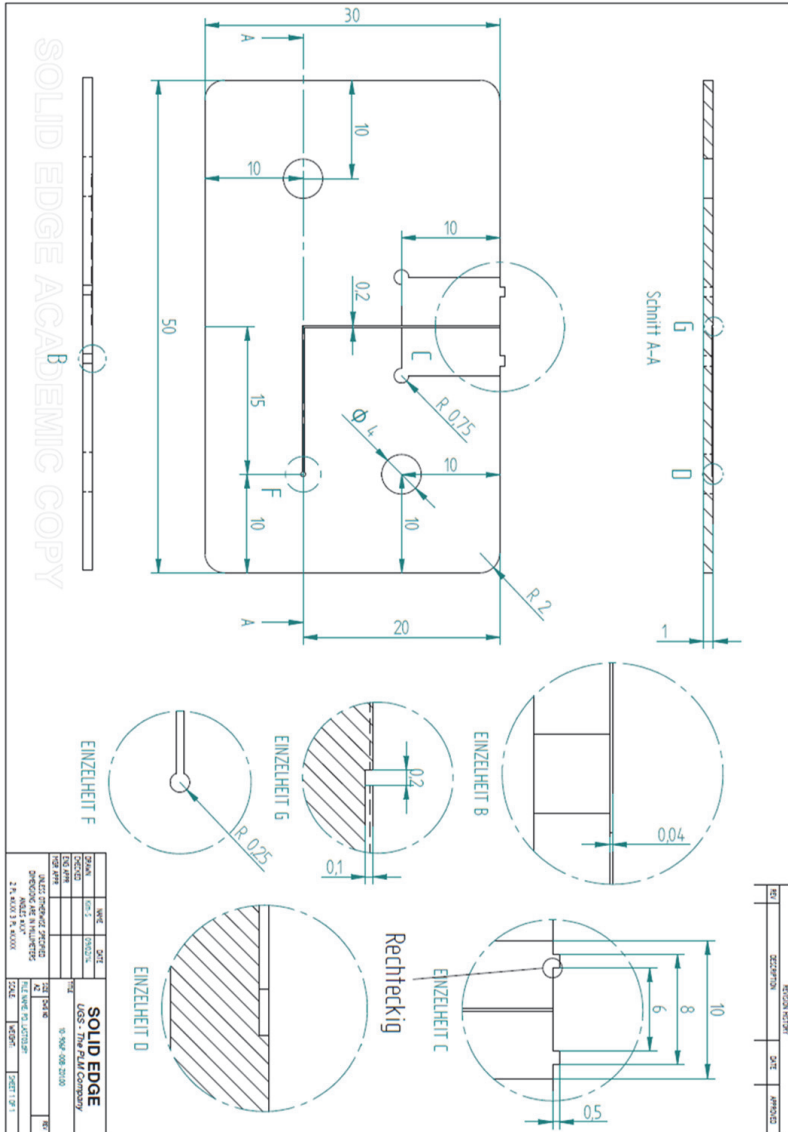
Anhang 6: Untere Halbschale des Konusteils



Anhang 9: Oberteil des erweiterten Zellsortiersystems



Anhang 10: Untere Abfuhrkanalplatte



Herausgeber: Institut für Mikrostrukturtechnik

Die Bände sind unter www.ksp.kit.edu als PDF frei verfügbar
oder als Druckausgabe zu bestellen.

- Band 1** Georg Obermaier
Research-to-Business Beziehungen: Technologietransfer durch
Kommunikation von Werten (Barrieren, Erfolgsfaktoren und
Strategien). 2009
ISBN 978-3-86644-448-5
- Band 2** Thomas Grund
Entwicklung von Kunststoff-Mikroventilen im Batch-Verfahren. 2010
ISBN 978-3-86644-496-6
- Band 3** Sven Schüle
Modular adaptive mikrooptische Systeme in Kombination
mit Mikroaktoren. 2010
ISBN 978-3-86644-529-1
- Band 4** Markus Simon
Röntgenlinsen mit großer Apertur. 2010
ISBN 978-3-86644-530-7
- Band 5** K. Phillip Schierjott
Miniaturisierte Kapillarelektrophorese zur kontinuierlichen Über-
wachung von Kationen und Anionen in Prozessströmen. 2010
ISBN 978-3-86644-523-9
- Band 6** Stephanie Kißling
Chemische und elektrochemische Methoden zur Oberflächenbe-
arbeitung von galvanogeformten Nickel-Mikrostrukturen. 2010
ISBN 978-3-86644-548-2

- Band 7** Friederike J. Gruhl
Oberflächenmodifikation von Surface Acoustic Wave (SAW)
Biosensoren für biomedizinische Anwendungen. 2010
ISBN 978-3-86644-543-7
- Band 8** Laura Zimmermann
Dreidimensional nanostrukturierte und superhydrophobe
mikrofluidische Systeme zur Tröpfchengenerierung und
-handhabung. 2011
ISBN 978-3-86644-634-2
- Band 9** Martina Reinhardt
Funktionalisierte, polymere Mikrostrukturen für die
dreidimensionale Zellkultur. 2011
ISBN 978-3-86644-616-8
- Band 10** Mauno Schelb
Integrierte Sensoren mit photonischen Kristallen auf
Polymerbasis. 2012
ISBN 978-3-86644-813-1
- Band 11** Daniel Auernhammer
Integrierte Lagesensorik für ein adaptives mikrooptisches
Ablenkensystem. 2012
ISBN 978-3-86644-829-2
- Band 12** Nils Z. Danckwardt
Pumpfreier Magnetpartikeltransport in einem Mikroreaktions-
system: Konzeption, Simulation und Machbarkeitsnachweis. 2012
ISBN 978-3-86644-846-9
- Band 13** Alexander Kolew
Heißprägen von Verbundfolien für mikrofluidische
Anwendungen. 2012
ISBN 978-3-86644-888-9

ISSN 1869-5183

- Band 14 Marko Brammer
Modulare Optoelektronische Mikrofluidische Backplane. 2012
ISBN 978-3-86644-920-6
- Band 15 Christiane Neumann
Entwicklung einer Plattform zur individuellen Ansteuerung von
Mikroventilen und Aktoren auf der Grundlage eines Phasenüber-
ganges zum Einsatz in der Mikrofluidik. 2013
ISBN 978-3-86644-975-6
- Band 16 Julian Hartbaum
Magnetisches Nanoaktorsystem. 2013
ISBN 978-3-86644-981-7
- Band 17 Johannes Kenntner
Herstellung von Gitterstrukturen mit Aspektverhältnis 100 für die
Phasenkontrastbildgebung in einem Talbot-Interferometer. 2013
ISBN 978-3-7315-0016-2
- Band 18 Kristina Kreppenhofer
Modular Biomicrofluidics - Mikrofluidikchips im Baukastensystem
für Anwendungen aus der Zellbiologie. 2013
ISBN 978-3-7315-0036-0
- Band 19 Ansgar Waldbaur
Entwicklung eines maskenlosen Fotolithographiesystems zum
Einsatz im Rapid Prototyping in der Mikrofluidik und zur gezielten
Oberflächenfunktionalisierung. 2013
ISBN 978-3-7315-0119-0
- Band 20 Christof Megnin
Formgedächtnis-Mikroventile für eine fluidische Plattform. 2013
ISBN 978-3-7315-0121-3

- Band 21** Srinivasa Reddy Yeduru
Development of Microactuators Based on
the Magnetic Shape Memory Effect. 2013
ISBN 978-3-7315-0125-1
- Band 22** Michael Röhrig
Fabrication and Analysis of Bio-Inspired Smart Surfaces. 2014
ISBN 978-3-7315-0163-3
- Band 23** Taleieh Rajabi
Entwicklung eines mikrofluidischen Zweikammer-
Chipsystems mit integrierter Sensorik für die Anwendung
in der Tumorforschung. 2014
ISBN 978-3-7315-0220-3
- Band 24** Frieder Märkle
Laserbasierte Verfahren zur Herstellung hochdichter
Peptidarrays. 2014
ISBN 978-3-7315-0222-7
- Band 25** Tobias Meier
Magnetoresistive and Thermoresistive Scanning
Probe Microscopy with Applications in Micro- and
Nanotechnology. 2014
ISBN 978-3-7315-0253-1
- Band 26** Felix Marschall
Entwicklung eines Röntgenmikroskops für
Photonenenergien von 15 keV bis 30 keV. 2014
ISBN 978-3-7315-0263-0
- Band 27** Leonardo Pires Carneiro
Development of an Electrochemical Biosensor Platform and a
Suitable Low-Impedance Surface Modification Strategy. 2014
ISBN 978-3-7315-0272-2

ISSN 1869-5183

- Band 28** Sebastian Mathias Schillo
Prozessentwicklung für die Automatisierung der Herstellung
und Anwendung von hochdichten Peptidmicroarrays. 2014
ISBN 978-3-7315-0274-6
- Band 29** Nicole E. Steidle
Micro- and Nanostructured Microfluidic Devices for Localized
Protein Immobilization and Other Biomedical Applications. 2014
ISBN 978-3-7315-0297-5
- Band 30** Jochen Heneka
Prozessentwicklung eines industrietauglichen Verfahrens zur
Fertigung von vereinzelt LIGA-Mikrobauteilen. 2015
ISBN 978-3-7315-0326-2
- Band 31** Seoung-Eun Kim
Konzeption und prototypische Fertigung einer nicht-invasiven
mikrofluidischen Plattform für die Elektrophysiologie (NIMEP)
zur Zellenanalyse. 2015
ISBN 978-3-7315-0378-1

SEOUNG-EUN KIM

Konzeption und prototypische Fertigung einer nicht-invasiven mikrofluidischen Plattform für die Elektrophysiologie (NIMEP) zur Zellenanalyse

Die am häufigsten verwendete elektrophysiologische Standard-Messtechnik ist die sog. Patch-Clamp-Technik. Zwar kann durch diese Messtechnik die präzise Untersuchung der durch Ionenkanäle stattfindenden Kommunikationsmechanismen ermöglicht werden, aber sie hat einige unerwünschte Nachteile wie z.B. die lokale Zerstörung der Plasmamembran, eine geringe Erfolgsquote und eine aufwendige Versuchsdurchführung. Um diese Nachteile zu vermeiden, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue nicht-invasive mikrofluidische Plattform für die elektrophysiologische Forschung (NIMEP) im Hinblick auf die Aktivität der Ionenkanäle entwickelt. Dieser neuartige Ansatz beruht auf der nicht-invasiven Messung des Summenstroms über die Zellmembran und bietet eine Automatisierungsmöglichkeit für die Untersuchung der einzelnen Zellen. Außerdem kann man eine mit dieser Plattform untersuchte Zelle für andere Anwendungen weiter verwenden, da die Zelle vor und nach der Untersuchung im intakten Zustand bleibt.

ISSN 1869-5183

ISBN 978-3-7315-0378-1

