

Entwicklung einer digitalen Mikrofluidikplattform für die synthetische Biologie

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Ingenieurwissenschaften
der Fakultät für Maschinenbau
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

genehmigte
Dissertation
von

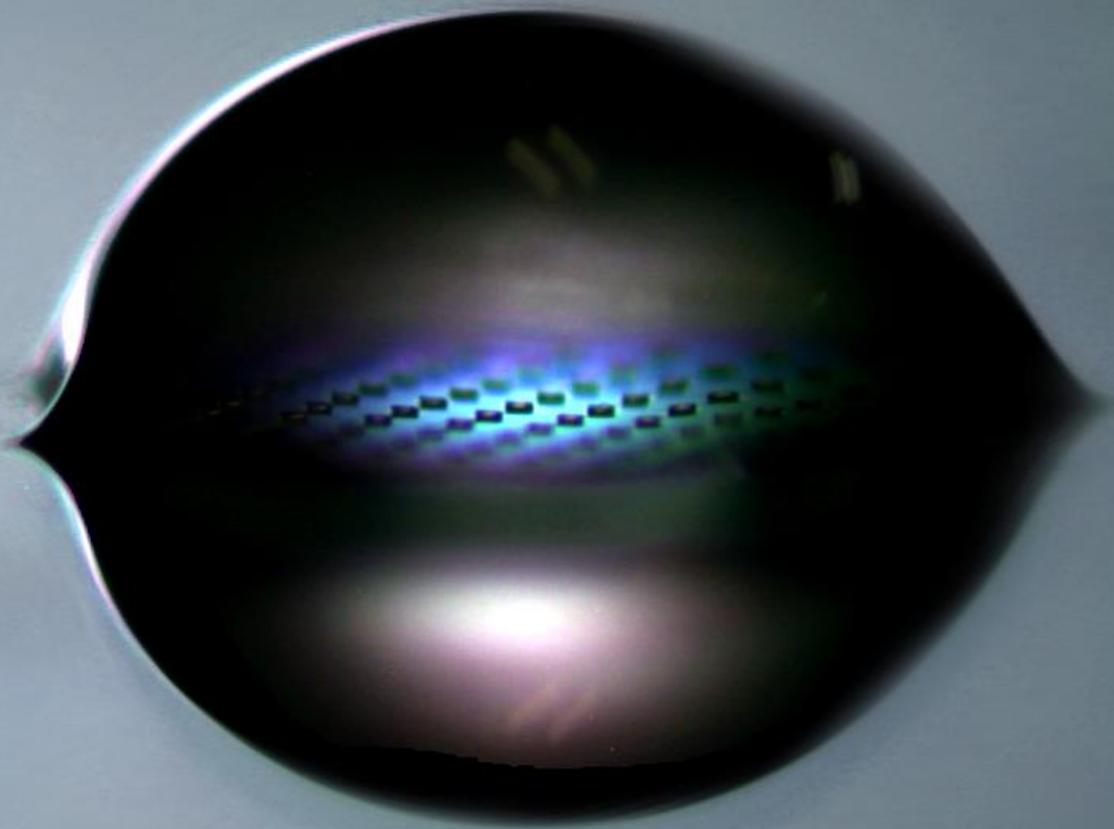
Dipl.-Ing. Sebastian von der Ecken

Tag der mündlichen Prüfung:	20. März 2017
Hauptreferent:	Prof. Dr. Andreas E. Guber
Korreferent:	Prof. Dr. Jan G. Korvink
Korreferent:	Prof. Dr. Uwe Strähle



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung –
Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0 International Lizenz (CC BY-SA 4.0):
<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.de>

Entwicklung einer digitalen Mikrofluidikplattform für die synthetische Biologie



Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Ingenieurwissenschaften
der Fakultät für Maschinenbau am Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
genehmigte

Dissertation

von

Dipl.-Ing. Sebastian von der Ecken

Tag der mündlichen Prüfung:

20. März 2017

Hauptreferent:

Prof. Dr. Andreas E. Guber

Korreferent:

Prof. Dr. Jan G. Korvink

Korreferent:

Prof. Dr. Uwe Strähle

Titelbild: Nahaufnahme eines Wassertropfens auf einem offenen Deckelsubstrat eines digitalen Mikrofluidik (DMF) Chips. Der Tropfen benetzt die quadratische, im Vergleich zur Umgebung leicht tieferliegende, Fläche um die Whispering Gallery Mode Mikrokelch Laser (WGMML), obgleich alles mit einer dünnen Teflonschicht überzogen ist. Zu erkennen sind daher die „Ecken“ des Tropfens und durch den Linseneffekt die Vergrößerung des WGMML Feldes. Digital nachbearbeitet. Bild: Sebastian von der Ecken (CC-BY-NC-SA 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>)

Zusammenfassung

Das Ziel der Arbeit war die Adaptierung eines komplexen Laborprotokolls der synthetischen Biologie zur Ligation einer TALEN-Bindedomäne in einem mikrofluidischen System, um zukünftig eine Automatisierung und somit eine on-Demand Hochdurchsatz-Assemblierung von TALEN zu ermöglichen. Dazu müssen bis zu 31 Flüssigkeiten individuell in wechselnder Reihenfolge gesteuert, mit magnetischen Partikeln gemischt und wieder getrennt werden können. Ein großer Nachteil der gängigen Kanalmikrofluidik ist, dass ihr Aufbau schnell sehr komplex wird, wenn viele Flüssigkeiten frei verwaltet werden sollen.

Digitale Mikrofluidik (DMF) ist eine Technologie im Bereich der Mikrofluidik, bei der einzelne Tropfen mittels eines elektrischen Feldes diskret gesteuert werden. Der besondere Vorteil der DMF-Technologie ist ihre Fähigkeit, Tropfen individuell in einem frei programmierbaren Mikrofluidikchip ohne Pumpen, Ventile oder komplizierte Kanalstrukturen steuern zu können. Mit dem in dieser Arbeit entwickelten DMF-System wurde erstmals die Ligation einer TALEN-Bindedomäne auf einem DMF-Chip erfolgreich umgesetzt.

Das DMF-System sollte nach Erfüllung seiner ursprünglichen Aufgabe nun durch die Integration von optischer Sensortechnologie für die markerfreie Detektion von Biomolekülen eingesetzt werden. Daher wurde hier ein Multi-Sensor-DMF-Chip mit einem großzahligen Feld aus Whispering Gallery Mode Mikrokelch Lasern (WGMML) entwickelt. Optische Resonatoren erlaubten hier erstmals die markerfreie Detektion von Biomolekülen in einem DMF-System.

Die DMF-Technologie wird seit ca. zehn Jahren vermehrt in Laboren verwendet. Ein großes Problem besteht darin, dass die DMF-Technologie meist selbst das eigentliche Forschungsobjekt in diesen Laboren darstellt und sich schwertut, den Weg zum Endanwender zu finden.

Verschiedene Ideen, Neuerungen und Verbesserungen wurden rund um DMF-Chip und Versuchsstand untersucht. Papier-DMF-Chips bieten einen kostengünstigen und einfachen Einstieg in die DMF, „echte“ Microwells helfen beim Dosieren unabhängig vom Elektrodendesign, eine Zwischenfolie mit eingebetteten Kapillaren ermöglicht leichtere (De-)Assemblierung und Konnektivität zu anderen Fluidiksystemen und eine magnetische Linse bietet bessere Kontrolle von magnetischen Partikeln und überdies ein neues Chip-to-World-Interface.

Schriftliche Erklärung über Hilfsmittel

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich und inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und die Satzung des KIT zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet habe.¹

¹ Übernommen aus <https://www.khys.kit.edu/promotionsordnungen.php> am 15. September 2016

Schriftliche Erklärung über weitere Promotionsverfahren

Hiermit erkläre ich, dass für mich Promotionsverfahren außerhalb der Fakultät für Maschinenbau des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) weder anhängig sind noch erfolglos abgeschlossen wurden.²

² Übernommen aus <https://www.khys.kit.edu/promotionsordnungen.php> am 15. September 2016

Danksagung

Mein erster Dank geht an Prof. Dr. Andreas E. Guber, der mich seit meiner Vorlesungszeit und Diplomarbeit und bis heute mit der Betreuung meiner Promotion immer unterstützte. Dr. Ralf Ahrens danke ich für die Gespräche und Ratschläge während meiner Promotion.

Prof. Dr. Jan G. Korvink möchte ich für sein Interesse an diese Arbeit und die Übernahme des Korreferates danken.

Für die Übernahme des zweiten Korreferates und die finanzielle Unterstützung der Arbeit danke ich Prof. Dr. Uwe Strähle.

Bei theoretischen und praktischen Fragen rund ums Thema Biologie standen mir Dr. Marco Ferg, Dr. Sepand Rastegar und Dr. Kathrin Herbst vom ITG zur Seite.

M.Sc. Joshua Fragoso half mit seinem Laser am Lichttechnischen Institut (LTI) bei meinen frühen Versuchen. Dr. Harold Raat vom Erasmus Medical Center (EMC) in Rotterdam und Jean-Pierre Teunissen vom Holst Centre TNO in Eindhoven brachten mit mir DMF-Chips zu Papier. M.Sc. Sentayehu Wondimu und Prof. Dr. Christian Koos ermöglichten unser gemeinsames WGMML-DMF-Lab-on-Chip-Projekt.

Von meinen Studierenden möchte ich Patrick Doll für seine Hilfe beim Aufbau des Versuchstandes, Jonas Ohmer für seine Erweiterungen und Ideen, mit denen er zum Versuchstand beitrug, Evelyn Riegel für ihre Markt- und Kostenanalyse und nicht zuletzt Bahman Moradi für seine vielfältigen Fähigkeiten als Hiwi danken.

In ungeordneter Reihenfolge sind diverse Kolleginnen und Kollegen des IMT zu nennen, z.B. Alexandra Moritz und ihre Werkstatt fürs Grobe, Heike Fornasier fürs Feine, Dipl.-Ing. (FH) Richard Thelen fürs maßlose Messen, Dr. Uwe Köhler, Alexandra Karbacher und Marie-Kristin Gamer für einen Reinraum, in dem immer Isoprop und Azeton bereitstanden, Dipl.-Phys. Ulrich Klein für einen immer funktionierenden PC, Nina Giraud für das ausdauernde Berichtigen meiner Einkaufswagen, Dr. Bastian Rapp, der wirklich auf alle Fragen eine Antwort hatte, Ursula Rothweiler für ihre Hilfe bei internen IMT-Arbeitsabläufen, Dipl.-Ing. (FH) Achim Voigt, der immer zur Verfügung stand bei Fragen rund um die Elektronik, diese danach auch gleich zusammen baute oder reparierte, Dr. Pascal Meyer als wohl besten Tischnachbarn und die Doktorierenden für die morgendlichen, nachmittäglichen und nächtlichen Runden am Kicker-Tisch: Senta, Hinnerk, Marcel, Felix, Frieder und Norbert, der mich zudem auch mit lebenswichtigem 1,3,7-Trimethyl-3,7-dihydro-1H-purin-2,6-dion versorgte.

Für meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Grundlagen und Stand der Technik.....	9
2.1	Iterative Capped Assembly (ICA).....	9
2.2	Flüssigkeiten: Oberflächenspannung und Tenside	11
2.2.1	Oberflächenspannung	11
2.2.2	Benetzung und statischer Kontaktwinkel	12
2.2.3	Tenside	15
2.3	Wirkprinzipien in der digitalen Mikrofluidik (DMF)	18
2.3.1	Dielektrophorese und Elektrobenetzung.....	19
2.3.2	Aktor-Kraft.....	20
2.3.3	Die Verbindung zur Young-Lippmann Gleichung	22
2.3.4	Eine technische Interpretation der Young-Lippmann Gleichung und der Elektrobenetzungskraft	25
2.3.5	Hysterese, Abrollwinkel und minimale Aktor-Spannung	28
2.4	Digitale Mikrofluidik und Elektrobenetzung.....	30
2.4.1	Prinzip des DMF-Chip Aufbaus	32
2.4.2	Der geschlossene DMF-Chip.....	33
2.4.3	Dielektrische Materialien.....	34
2.5	Grundlegende Tropfenmanipulationen.....	36
2.5.1	Elektrodendesign	37
2.5.2	Beladung und Dispensen	39
2.5.3	Mischen	40
2.5.4	Tropfentrennung auf der Matrix.....	41
2.5.5	Ausschleusen.....	42
2.5.6	Charakterisierung von Flüssigkeiten in DMF-Systemen.....	43
2.6	Herstellungsmethoden für DMF-Chips.....	49
2.7	Stand der DMF-Technik und Ansatzpunkte zur Weiterentwicklung.....	51
2.7.1	Magnetische Partikel	51
2.7.2	Passives Dispensen: (Virtuelle) Wells.....	52
2.7.3	Sensorik	53
2.7.4	Stand der Technik	54
2.7.5	Anwendungsmöglichkeiten der DMF.....	55

3	Entwicklung von Versuchsstand und DMF-Chips basierend auf dem Stand der Technik ..	56
3.1	Chipinterface.....	57
3.2	Steuerelektronik, Spannungsquelle, PC und Software	58
3.2.1	IMT DMF Box.....	58
3.2.2	DropBot	59
3.3	Entwicklung der DMF-Chips	60
3.3.1	Auswahl der Methode zur Elektrodenstrukturierung.....	61
3.3.2	Verwendete Elektrodenstrukturen	63
3.3.3	Alternative Elektrodenstrukturen	70
3.3.4	Verwendete Dielektrika	75
3.3.5	Hydrophobe Beschichtung	78
3.3.6	Prüfung der Schichtdicken.....	81
4	Frei programmierbare Synthese einer TALEN-Bindedomäne auf der DMF-Plattform	82
4.1	Der verwendete DMF-Chip	82
4.2	Optimierung der Tropfenbeweglichkeit	83
4.3	Ligation der Bindedomäne im DMF-Chip	87
4.3.1	DMF-Proben mit Pluronic 64.....	88
4.3.2	Manuelle Referenzproben mit Tween 20 und Pluronic 64.....	90
4.3.3	Vergleich der Proben	90
5	Integration von Whispering Gallery Mode Mikrokelch Lasern in digitale Mikrofluidik-Chips	92
5.1	Synergie von WGML und DMF	92
5.2	Der integrierte DMF-Chip.....	94
5.2.1	Deckelsubstrat.....	94
5.2.2	Oberflächenfunktionalisierung.....	96
5.2.3	Bodensubstrat.....	98
5.2.4	Inspektion der WGML	98
5.3	Optimierung der Tropfenbeweglichkeit	100
5.3.1	Referenzmessung zur Chip Charakterisierung	100
5.3.2	Biofouling durch Streptavidin.....	101
5.3.3	Tenside zur Optimierung der Tropfenbeweglichkeit	102
5.3.4	Der Einfluss von Pluronic 64	104
5.4	Messaufbau.....	105
5.5	Bestimmung des Brechungsindex.....	106
5.6	Markerfreie Detektion von Streptavidin.....	108

6	Weiterentwicklungen der DMF-Technik.....	110
6.1	Papier-Chips	110
6.1.1	Konzept.....	110
6.1.2	Umsetzung und Funktionstest	111
6.2	Echte Microwells.....	112
6.2.1	Microwells als Nebenprodukt der WGMML-Herstellung	113
6.2.2	Unerwartetes Verhalten der WGMML-Felder.....	114
6.2.3	Untersuchung und Analyse	116
6.2.4	Vergleich von „echten“ und „virtuellen“ Microwells	118
6.3	Zwischenfolie mit integrierten Kapillaren	119
6.3.1	Konzept.....	119
6.3.2	Umsetzung.....	119
6.4	Steuerung magnetischer Partikel in DMF-Systemen	122
6.4.1	Magnetische Linse	122
6.4.2	Aufbau des XYZ-Tisches	124
6.4.3	Ein neuer Freiheitsgrad: Steuerung magnetischer Partikel.....	125
6.4.4	Ein weiterer Freiheitsgrad: Ausschleusen der Partikel	126
7	Zusammenfassung und Ausblick	128
A.	Anhang	136
B.	Abbildungsverzeichnis	142
C.	Tabellenverzeichnis	146
D.	Abkürzungen und Symbole	148
E.	Quellenverzeichnis.....	152

1 Einleitung

Die synthetische Biologie erschafft biologische Systeme, die in dieser Form in der Natur nicht existieren. Ein zentrales Thema ist die gezielte Manipulation von DNA. Aktuell angewandte Verfahren zur Modifikation von DNA sind „Transcription Activator-like Effector Nuclease“ (TALEN), Zinkfinger Nukleasen und „Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats“ CRISPR/Cas9. Cathomen et al. (2008), Boch et al. (2009), Jinek et al. (2012), Gaj et al. (2013)

Das Grundprinzip einer DNA-Editierung via TALEN ist wie folgt: Nuklease kann an jeder beliebigen Stelle von DNA einen Doppelstrangbruch erzeugen. Wenn die Nuklease durch ein Zielführungssystem, die DNA-Bindedomäne, an eine bestimmte Position gebracht wird, schneidet sie die DNA spezifisch. Auf die Weise kann z.B. ein Stück DNA entfernt werden und anschließend auch ein neuer Strang eingesetzt werden. Moscou et al. (2009), Cermak et al. (2011), Briggs et al. (2012)

Der „Iterative Capped Assembly“ (ICA) Prozess nach Briggs et al. (2012) bietet eine flexible Plattform zur on-Demand Herstellung von TALEN.

Für den ICA-Prozess müssen zur Konstruktion der DNA-Bindedomäne 31 Flüssigkeiten in wechselnder Reihenfolge verwaltet werden. Streptavidin beschichtete magnetische Partikel (Beads) werden mit der wechselnden Auswahl an Flüssigkeiten gemischt, inkubiert und wieder von diesen getrennt. Dabei werden die Flüssigkeiten und magnetischen Partikel in Mikroreaktionsgefäßen auf Eis gelagert, mit Pipetten bewegt und dosiert, mit einer Magnetbank separiert und einem Vortexmischer gemischt werden.

Auch wenn das Protokoll des Ligationsprozesses iterativ verläuft (Abbildung 1.1), steht diesem seine große Anzahl an Misch- und Trennschritten gegenüber, die keine Fehler erlauben. Dies macht die manuelle on-Demand TALEN Herstellung langwierig und fehleranfällig.

Der Ablauf des Protokolls sollte im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich einer mikrofluidischen Automatisierung analysiert und umgesetzt werden.

Die Gesamtauswahl der 31 Flüssigkeiten variiert nicht und könnte mit gängigen mikrofluidischen Methoden, bei Bedarf auch in größeren Mengen, hergestellt werden. Die Ligation der Bindedomäne, der Schlüsselschritt im ICA-Protokoll, unterscheidet sich von allen anderen Schritten in der Hinsicht, als dass sie zwar iterativ verläuft, aber auch mit der anvisierten Ziel-DNA variiert. Elution und PCR, gefolgt von der Assemblierung der Bindedomäne an die Nuklease, sowie Verifikation und Transfektion sind technisch betrachtet wiederum lineare Prozesse. Knippers et al. (2015)

Alle linearen Prozesse könnten mit gängigen mikrofluidischen Methoden automatisiert werden, aber die Ligation der Bindedomäne würde in einem komplexen Kanal-, Pumpen-, Ventil-, Mischer- und Trennsystem resultieren.

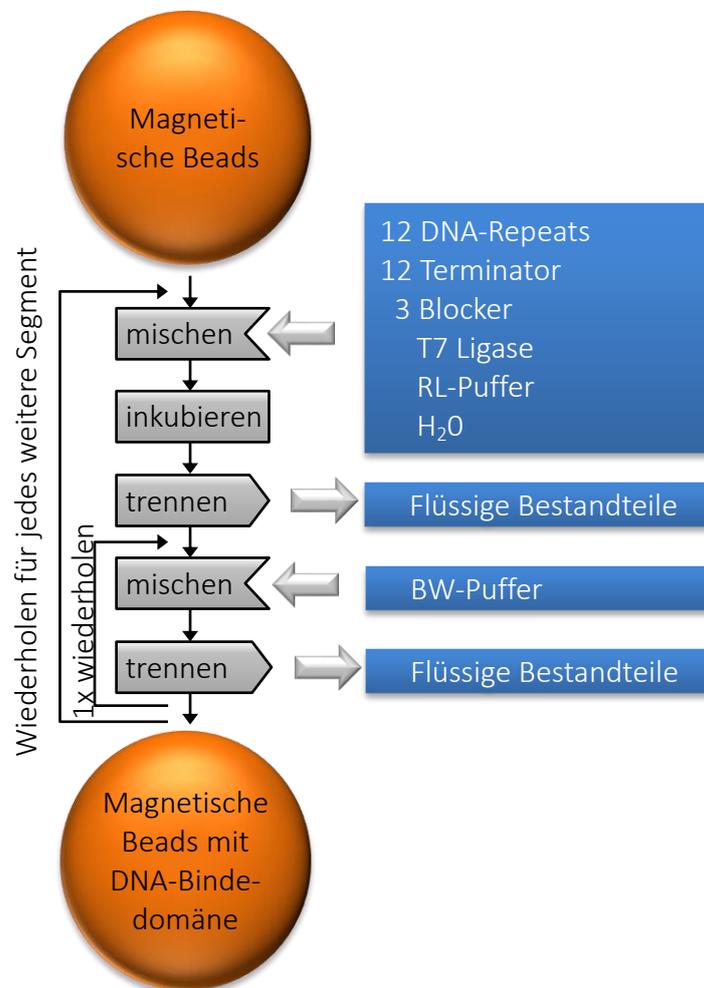


Abbildung 1.1: Technischer iterativer Ablauf der Ligationsschritte

Zum Anfügen eines (weiteren) Kettenelements an die magnetischen Partikel (Beads) wird immer eine Auswahl von sechs der 31 Flüssigkeiten benötigt. Zwei (Blocker und DNA-Repeat bzw. Terminator) variieren jedes Mal, werden aber immer mit T7 Ligase, „Rapid Ligation“ Puffer und H₂O gemischt, was das vorherige Mischen und Bereithalten dieser drei möglich macht. Nach dem Inkubieren werden Flüssigkeit und Partikel getrennt und letztere mit „Binding and Wash“ Puffer (6. Flüssigkeit) mehrmals gewaschen und wiederum getrennt. Diese Sequenz wiederholt sich, bis die DNA Bindedomäne mit dem Anbinden des Terminators abgeschlossen wird.

Digitale Mikrofluidik (DMF)

Pipettier-Roboter und Mikrofluidik bieten Ansätze zur Automatisierung. Während ein Roboter lediglich den die Pipetten bedienenden Menschen nachahmt und ersetzt, aber der Arbeitsablauf prinzipiell derselbe bleibt, bietet die Mikrofluidik zusätzliche systembedingte Vorteile. So können z.B. Reaktionsvolumina und somit die Gesamtmenge an Flüssigkeiten drastisch reduziert, oder das größere Verhältnis von Oberfläche zu Volumen genutzt werden.

Der große Nachteil der normalen, also der Kanal-Mikrofluidik ist, dass ihr Aufbau sehr schnell, sehr komplex wird, wenn viele Flüssigkeiten selektiv verwaltet werden sollen. Ein normales, kanalbasiertes Mikrofluidiksystem benötigt für jede Flüssigkeit mindestens einen Kanal, sowie Pumpen und Ventile. Jede Verzweigung, jeder Misch- oder Dosierschritt und insbesondere deren Reihenfolge müssen ebenso von vornherein im Design festgelegt sein wie Vorkehrungen gegen Querkontamination.

Die digitale Mikrofluidik (DMF) ist eine Technologie im Bereich der Mikrofluidik, bei der einzelne Tropfen mittels eines elektrischen Feldes diskret gesteuert werden. DMF-Chips bewegen, trennen, dosieren und mischen kleinste Tropfen von Mikro- bis zu Pikolitern mit elektrostatischen Kräften. Die elektrischen Felder werden über eine Elektrodenmatrix erzeugt, die sich unterhalb einer hydrophoben und elektrisch isolierenden Schicht befinden, auf der sich die Tropfen bewegen (s. Abbildung 1.2). Mugele et al. (2005), Jebrail et al. (2010), Berthier (2012)

Der besondere Vorteil der DMF ist ihre Fähigkeit, Tropfen individuell in einem frei programmierbaren Mikrofluidikchip ohne Pumpen, Ventile oder komplizierte Kanalstrukturen zu steuern, ohne dass der Ablauf schon im Design festgelegt werden muss.

Die Grundlagen der digitalen Mikrofluidik sowie Aufbau, Funktionen und der Stand der Technik von DMF-Systemen werden in Kapitel 2 behandelt.

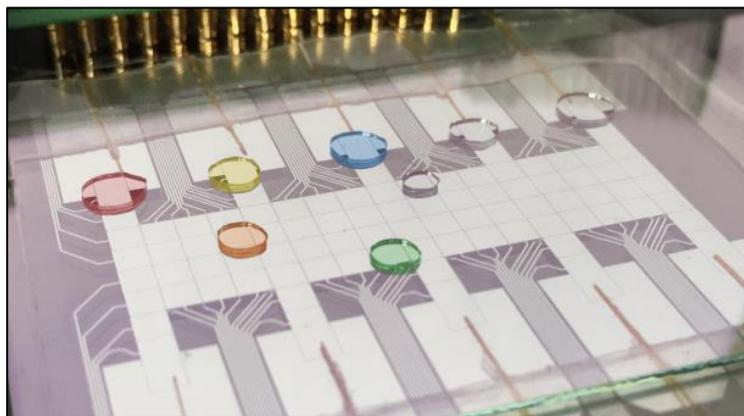


Abbildung 1.2: Ein in dieser Arbeit realisierter DMF-Chip im Testbett

Ein DMF-Chip ermöglicht die individuelle und parallele Steuerung von einer großen Anzahl von Tropfen durch eine Matrix aus Aktor-Elektroden (silberne Felder). Dieser DMF-Chip besteht aus einem Boden- und einem Deckelsubstrat, die durch eine Zwischenfolie mit eingelassenen Kapillaren auf Abstand gehalten werden und somit ein geschlossenes Volumen bildet. Bild digital nachbearbeitet. Chipdesign basierend auf Jebrail et al. (2010)

Die Fähigkeit zur parallelen Kontrolle diskreter Tropfen und die zusätzliche Möglichkeit, magnetische Partikel mit diesen zu mischen und von diesen wieder zu trennen, macht die DMF-Technik so interessant für die Handhabung von Analyten und deren Reaktionen in Lab-on-Chip (LoC) Systemen. Die magnetischen Partikel lassen sich aus einem Tropfen ausfällen und in einem anderen resuspendieren. Sista (2007), Ng et al. (2012), Choi et al. (2013)

DMF Lab-on-Chip (LoC) Systeme sind eine sehr flexible Option für die frei programmierbare Automatisierung von insbesondere kleinerer und mittlerer Probenvolumen verglichen mit einem Kanal-basierten System. Die digitale Mikrofluidik in einem Mikrofluidikchip entspricht quasi der Pipette in einem Labor. von der Ecken et al. (2016b)

Basierend auf dem Stand der Technik wird in Kapitel 3 beschrieben, wie der Versuchsstand aufgebaut wurde, welche Steuerelektronik zum Einsatz kam und wie im Detail die DMF-Chips konstruiert wurden.

DMF in der synthetischen Biologie

Ein Kanal-basierter Mikrofluidikchip muss speziell designt werden, um eine Funktionsfolge umzusetzen. Ein DMF-Chip führt viele Funktionsfolgen Design-unabhängig und im einfachsten Fall per Mausklick aus. Damit bietet die DMF einen einfachen, flexiblen und effektiven Ansatz für Labore vom Einsatz frei programmierbarer mikrofluidischer Komponenten zu profitieren.

Verschiedene Arbeiten im Bereich der synthetischen Biologie setzen auf spezielle Vorteile der DMF gegenüber normaler Mikrofluidik. Eine 40-Zyklus Polymerase Kettenreaktionen (PCR) wurde von Sista et al. (2008) in nur 12 min durchgeführt, indem sie das große Verhältnis von Tropfenoberfläche zu Volumen beim Erwärmen und Abkühlen ausnutzten. Hua et al. (2010) erweiterten diesen Ansatz zu einer parallelen, automatisierten PCR Plattform. Eine „ultra-micro-volume DNA ligation“ mittels DMF wurde von Liu et al. (2008) durchgeführt. Shih et al. (2015) stellten einen Hybrid Chip aus DMF und Kanalmikrofluidik vor, auf dem sie eine Golden Gate Assemblierung umsetzten und Yehezkel et al. (2016) synthetisierten spezifische DNA auf einer dafür zweckentfremdeten, kommerziell erhältlichen DMF Plattform.

Die Ligation einer TALEN Bindedomäne auf einem DMF-System wurde bisher nicht versucht. Dabei bietet die digitale Mikrofluidik einen neuen vielversprechenden Ansatz des mikrofluidischen Handlings und zur Automatisierung der TALEN Synthese basierend auf dem ICA-Protokoll, da dessen Flüssigkeiten kompatibel mit der DMF-Technologie sind.

Mit dem in dieser Arbeit neu entwickelten DMF-Versuchsstand sollte eine Assemblierung einer DNA-Bindedomäne eines TALEN nach dem Iterative Capped Assembly (ICA) Protokoll durchgeführt worden. Das Ziel war die Adaptierung des vorhandenen komplexen Protokolls in ein mikrofluidisches System, um eine Automatisierung und somit eine zukünftige on-Demand Hochdurchsatz-Assemblierung von TALEN zu ermöglichen. Die Ligation einer TALEN DNA-Bindedomäne auf einem DMF-Chip wird in Kapitel 4 beschrieben.

Integration von Whispering Gallery Mode Sensoren und DMF-Technologie

Vom Chip-in-a-Lab ist es noch ein langer Weg zum Lab-on-Chip (LoC). Ein Schritt in diese Richtung stellt die Integration von neuer Sensorik in die bestehende DMF-Technik dar.

Das DMF-System sollte nach seinem erfolgreichen Einsatz in der synthetischen Biologie nun durch die Integration von optischer Sensortechnologie eine markerfreie Detektion von Biomolekülen für die Analytik ermöglichen.

In-situ spektroskopische Analyse in DMF-Systemen wurde basierend auf konventionellen Lichtquellen und Spektrometern demonstriert, wobei dedizierte optische Fasern das Licht in das Messsystem und das Fluid über physischen Kontakt ein- und auskoppeln. Choi et al. (2015)

Spektroskopische Messmethoden benötigen jedoch immer noch eine Markierung der Zielmoleküle und sind daher eingeschränkt bei der Detektion einzelner Analyten im zu testenden Tropfen. Ähnliche Beschränkungen bringen Versuche mit miniaturisierten optischen Bauelementen wie lichtemittierenden Dioden (LED) oder Fotodetektoren in direkter Umgebung einer DMF Zelle mit sich, die zu Absorptions- bzw. Chemolumineszenzmessungen verwendet wurden. Wenn für Absorptionsmessungen der Lichteinfall parallel zur Tropfenebene verläuft, erhöht sich die Weglänge beträchtlich und erhöht somit die Sensitivität im Vergleich zur konventionellen senkrechten Lichteinkopplung. Luan et al. (2012), Shamsi et al. (2016), Srinivasan et al. (2004), Wijethunga et al. (2011)

Die Möglichkeit einer markerfreien in-situ Detektion in DMF-Systemen wurde mit Plasmon-Polarisation (SPR) Sensoren auf dem Deckelsubstrat eines DMF-Systems demonstriert, aber auch dieser Ansatz ist auf die Detektion eines Analyten pro Tropfenposition (entspricht einer Aktor-Elektrode) beschränkt. Malic et al. (2010)

Solche und ähnliche integrierte mikrooptische Bauelemente können verwendet werden, um großzahlige Felder aus hochempfindlichen Sensoren zu erzeugen, die individuell angesprochen eine parallele Detektion einer Vielzahl von Analyten ermöglichen. Obgleich in den letzten Jahren enorme Fortschritte im Bereich der mikrooptischen Biosensoren zu verzeichnen waren, existieren nur wenige Beispiele, in denen diese auch in DMF-Systeme integriert wurden. Cooper (2002), Estevez et al. (2012), Sun et al. (2012)

Einen alternativen Ansatz stellt die Integration von Mikroresonatoren in DMF-Systeme dar. Diese mikroskopischen Resonatoren benötigen nur eine sehr kleine Grundfläche und es lassen sich großzahlige Sensorfelder in Bereich einer einzelnen Aktor-Elektrode unterbringen, die somit eine simultane Detektion multipler Analyten in einem einzelnen Tropfen ermöglichen. Bisher wurden nur resonatorbasierte Sensoren in DMF-Systemen mit maximal zwölf Sensor Elementen demonstriert und diese konnten lediglich zur Messung von Brechungsindizes verwendet werden. Arce et al. (2012), Luan et al. (2012), Royal et al. (2013)

Die markerfreie Detektion von Biomolekülen mittels Mikroresonatoren in DMF-Systemen wurde noch nicht erreicht. Frühere Experimente basierten auf durch Wellenleiter gekoppelten passiven Elementen, die mit Wellenlängen im Infrarotbereich arbeiten, was die Sensitivität in Wasser nachteilig beeinflusst. Zhu et al. (2008)

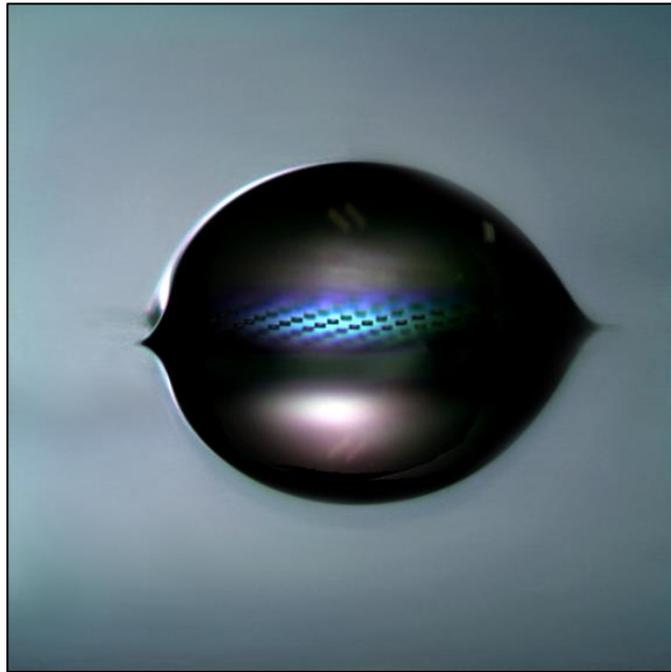


Abbildung 1.3: Nahaufnahme eines Wassertropfens auf einem offenen Deckelsubstrat

Ein Tropfen benetzt ein Sensorfeld, das sich in einem „echten“ Microwell befindet. Digital nachbearbeitet: Bild Sebastian von der Ecken (CC-BY-NC-SA 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>)

In Kapitel 5 wird ein Multi-Sensor System (s. Abbildung 1.3) präsentiert, das ein großzahliges Feld aus Whispering Gallery Mode Mikrokelch Lasern (WGMML) in einen digitalen Mikrofluidik (DMF) Chip integriert. Die Laser werden aus mit Farbstoff versetzten Polymethylmethacrylat (PMMA) in einem kostengünstigen Prozess aus Spincoating, maskenbasierter Lithografie, nasschemischem Ätzen und thermischen Reflow hergestellt.

Das Anregen und Auslesen der Sensoren wird mittels einer simplen, zum DMF-Chip berührungslos montierten Optik erreicht, wodurch auch die Adressierung eines großzahligen Sensorfeldes ermöglicht wird.

Die Funktionsfähigkeit des Systems wird mit der Messung des Brechungsindex des Umgebungsvolumens (ein durch die DMF-Technik gesteuerter Tropfen) und durch die Messung verschiedener Konzentrationen von Streptavidin innerhalb weiterer, DMF-gesteuerter Tropfen, welches auf der biotinylierten Oberfläche der Mikrosensoren spezifisch bindet, gezeigt.

Optische Resonatoren für die markerfreie Detektion von Biomolekülen konnten in dieser Arbeit zum ersten Mal in einem DMF-System eingesetzt werden. Der Ansatz kann zu einer vielseitigen Detektorplattform erweitert werden, die parallel eine weite Menge an klinisch relevanten Biomolekülen analysieren kann. von der Ecken et al. (2017)

Weiterentwicklungen der DMF-Technologie

In Kapitel **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** werden verschiedene Ansätze vorgestellt, mit denen im Rahmen dieser Arbeit die DMF-Technik weiterentwickelt wurde.

Die DMF-Technologie wird seit ca. 10 Jahren vermehrt in Laboren verwendet. Ein großes Problem ist, dass die DMF-Technologie meist selbst das eigentliche Forschungsobjekt in den Laboren von Mikrofluidik Forschungsgruppen darstellt und sich schwertut, den Weg zum Endanwender zu finden. Es gibt drei Hürden für neue Forschungsgruppen in der DMF-Technik: Es wird erstens ein Versuchsstand mit Steuerelektronik, Testbett und möglicherweise weiteren Komponenten benötigt. Zweitens gibt es keine kaufbaren DMF-Chips. Und drittens sind die Experimentkompatibilität und notwendige Experimentanpassungen unbekannt, was wiederum ohne einen DMF-Versuchsstand samt DMF-Chips nicht überprüft werden kann.

Die Entwicklung eines Versuchsstandes wird in Kapitel 3 beschrieben. Eine einfache Elektronik zur Ansteuerung der Chips kann in kurzer Zeit entwickelt werden, ebenso stehen komplexe Open Source und kommerzielle Systeme zur Verfügung. Fobel et al. (2013)

Die DMF-Chips selbst sind zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht als kommerzielles Produkt, sondern nur als Eigenanfertigung (Materialkosten in der Größenordnung um 50€ pro Chip), oder als sehr teure Sonderanfertigung (mehrere 100€ pro Chip) von einem entsprechend ausgestatteten Labor verfügbar (Samiei et al. (2016)). Eine Umsetzung wie in Abschnitt 6.1 auf Basis von Papier-Chips und Folientechnik könnte hier in Zukunft Abhilfe schaffen. von der Ecken et al. (2016b)

Um innerhalb eines DMF-Chips ein Flüssigkeitsvolumen definiert zu trennen und somit zu dosieren, muss das Elektrodendesign schon bei der Herstellung an die notwendigen Tropfenvolumina angepasst werden, da das abgetrennte Tropfenvolumen direkt abhängig von der Grundfläche der den Tropfen steuernden Aktor-Elektrode ist.

Sowohl für die Analytik, z.B. die Immunocytochemie nach Ng et al. (2015a), als auch für Dosierung unabhängig vom Elektroden- und Chipdesign bieten hydrophile Spots auf der Chipoberfläche, hier als „virtuelles“ Microwell bezeichnet, eine einfache technische Lösung. Barbulovic-Nad et al. (2010), Eydelnant et al. (2012), Shields et al. (2015), Witters et al. (2013)

Das vollständige Entleeren dieser „virtuellen“ Microwells ist nicht möglich, lediglich der Austausch des Inhalts mit einem anderen Tropfen. Die hydrophilen Spots in Form von Löchern in der hydrophoben Schicht sind sehr leicht herzustellen, weisen aber den besagten Nachteil auf. Eydelnant et al. (2012), Witters et al. (2013)

In von der Ecken et al. (2017) wird beschrieben, wie der Herstellungsprozess von in den DMF-Chip integrierten Sensoren zu den „echten“ Microwells führte. (s. Abschnitt 6.2 und Kapitel 5)

Eine weitere Schwierigkeit der DMF-Technik ist ihre Integration in vorhandene (mikrofluidische) Systeme. Das Einbringen und Ausschleusen von Flüssigkeiten benötigt ein Chip-to-World-Interface. Die Verwendung einer Zwischenfolie mit eingelassenen Kapillaren ermöglicht den Anschluss automatisierbarer Pumpsysteme und somit ein Chip-to-World-Interface (s. Abbildung 1.2). Für zukünftige Automatisierung, einfachere (De-)Assemblierung, Integration und Konnektivität wurde eine PDMS Folie mit in diese eingegossenen Kapillaren entwickelt. Damit kann der Chip schnell und leicht (de-)montiert werden und ermöglicht den Anschluss von externen Fluidikkomponenten wie Spritzenpumpen über die Kapillaren. Abschnitt 6.3 beschreibt, wie sich eine solche Zwischenfolie kostengünstig und leicht fertigen lässt.

Das DMF-System wurde außerdem mit einer Steuerung für magnetische Partikel erweitert. Dafür wurde eine punktfokussierte magnetische Linse auf einem 3-Achsen Tisch zur lateralen Steuerung (z.B. Input/Output ohne den Chip zu öffnen) von magnetischen Partikeln ergänzt.

Als weiteres alternatives Chip-to-World-Interface lassen sich mit der magnetischen Linse die magnetischen Partikel und somit z.B. auf diesen gebundene Endprodukte aus dem Inneren des DMF-Chips extrahieren. Die Partikel liegen jetzt auf der offenen Fläche des Bodensubstrats an definierter Position und können manuell per Pipette oder von einem Pipettier-Roboter aufgenommen werden, wie es in Abschnitt 6.4 gezeigt wird.

Beide Chip-to-World-Interfaces ermöglichen eine flexible Einbindung des hier entwickelten oder auch anderer DMF-Systeme in gängige mikrofluidische Labortechnologien.

Als Abschluss dieser Arbeit gibt Kapitel 7 ein Überblick und Ausblick über die realisierten Anwendungen, die untersuchten Ideen, sowie die entwickelten Neuerungen und Verbesserungen rund um DMF-Chip und Versuchsstand.

2 Grundlagen und Stand der Technik

In diesem Kapitel wird zunächst ein Überblick zu den biologischen Grundlagen der synthetischen Biologie und den technischen Grundlagen zur (digitalen) Mikrofluidik und dem aktuellen Stand der DMF-Technik beschrieben.

2.1 Iterative Capped Assembly (ICA)

Soll ein DNA-Strang an einer definierten Stelle geschnitten werden, kann dies z.B. mit TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) erreicht werden. Das TALEN besteht vereinfacht gesagt aus zwei Elementen: Die DNA-Bindedomäne bindet an eine spezifische DNA-Sequenz und leitet die angehängte Nuklease somit an eine definierte Position, damit diese dort die DNA schneidet. Jede Zielposition der anvisierten DNA benötigt eine spezifisch konstruierte DNA-Bindedomäne, während die Nuklease unverändert bleibt.

Die Ligation der Bindedomäne, auf die im Folgenden eingegangen wird, sowie die weiteren Schritte wie Elution, PCR, Assemblierung, Verifikation und Transfektion, die für die Komplettierung des TALEN benötigt werden, sind Bestandteile des ICA-Prozesses. Die Ligationsschritte zur Assemblierung sind prinzipiell einfach, weil iterativ, aber gleichwohl zeitaufwendig und, wenn manuell durchgeführt, entsprechend fehleranfällig.

Die Ligation der Bindedomäne findet auf einem (ferro-)magnetischen Bead mit Streptavidinbeschichtung statt. Magnetische Beads lassen sich mit einem Magneten aus einer Flüssigkeit ausfällen und somit von dieser trennen. Dadurch ist es möglich, nacheinander verschiedene Flüssigkeiten an die Beads zu bringen, ohne dass diese gleichzeitig mit den vorherigen Flüssigkeiten reagieren können.

Die Ligation beginnt auf den mit Streptavidin funktionalisierten Beads mit dem Initiator, welcher als Startelement der Kette dient und das erste DNA-Repeat Monomer enthält.

Danach folgt ein iterativer Prozess, bei dem das jeweils nächste DNA-Repeat Monomer das folgende Kettenelement bildet. Die Bindeprozesse finden bei Raumtemperatur unter Anwesenheit von T7 Ligase und Ligase Aktivierungspuffer statt. Als nächstes wird der entsprechende zur Ziel-DNA passende DNA-Repeat (s. Abbildung 2.1) gewählt. Mit T7 Ligase und Ligase Aktivierungspuffer lagert sich das zweite Element an.

Um zu verhindern, dass ungewollte Ligationen auftreten, wird ein Capping Oligonucleotid, der sogenannte Blocker, eingesetzt, der dafür sorgt, dass unvollständige Ketten aus dem jeweils vorangegangenen Schritt blockiert werden. Blocker enthalten kein DNA-Repeat Monomer.

Den Abschluss der Kette bildet der Terminator, der wie der Initiator ein DNA-Repeat Monomer beinhaltet. Geblockte Ketten können später nicht weiterverarbeitet werden, da der Blocker sie inkompatibel für weitere Prozessschritte macht. Ketten mit Terminatoren sind vollständig assembliert und können weiter bearbeitet werden.

Der in Abbildung 2.1 schematisch gezeigte ICA-Prozess (Details in Briggs et al. (2012)) assembliert eine DNA-Bindedomäne aus DNA-Repeats, welche Basenpaar-spezifische Ankerpunkte (rot, gelb, grün, blau) besitzen und in drei Moleküle (A, B, C) integriert sind: Die Ligation startet mit dem Initiator (I, enthält 1. Ankerpunkt), gefolgt von den DNA-Repeats (2. bis n. Anker-

punkt), und endet mit dem Terminator (letzter Ankerpunkt). Die Blocker blockieren unvollständige Ketten. Die Kettenstück können sich nur miteinander verbinden, wenn sie entsprechend der Reihenfolge „A, B, C, A, B, C...“ (Schlüssel-Schloss-Prinzip) angeordnet sind. Die Namensgebung der Reihen A, B und C dient dabei nur der einfacheren Übersicht und praktische Handhabung.

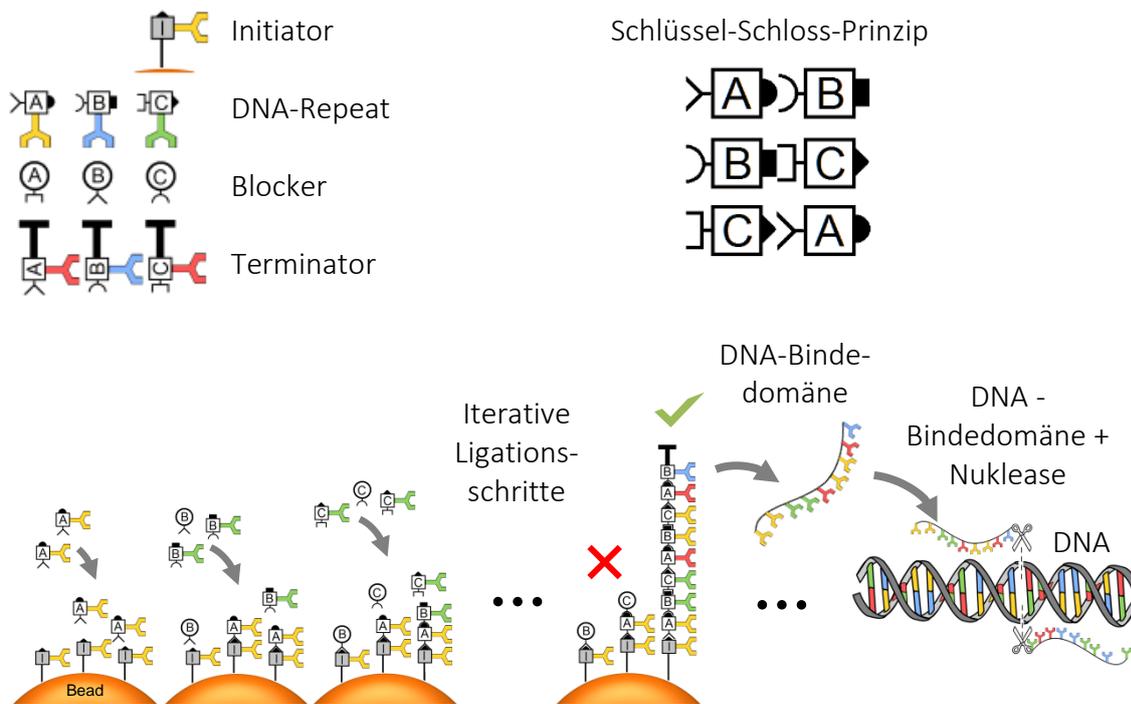


Abbildung 2.1: Schematischer Ablauf der TALEN Ligation

Die Bindedomäne der TALEN setzt sich aus einzelnen DNA-Repeat Monomeren zusammen. Jedes Monomer passt zu genau einem einzelnen DNA-Segment. Initiator, DNA-Repeat und Blocker beinhalten ein Bindedomänenelement. In einem iterativen Prozess aneinandergereihte Monomere bilden die DNA-Bindedomäne. (Abbildung zur Ligation basiert auf Briggs et al. (2012) BY-NC 3.0 und DNA-Strang auf gemeinfreiem Werk, public domain)

Damit sich gleiche Kettenelemente aus einem Ligationsschritt nicht untereinander verbinden können sind mindestens diese drei Schlüssel-Schloss Kombinationen (A, B, C) notwendig. Eine vollständige Trennung von Beads und Fluid mit den darin enthaltenen Monomeren des vorangegangenen Schritts ist praktisch nicht möglich. Es kann nur eine ausreichenden Verdünnung erreicht werden. Die Verdünnung wird über Waschschriffe erreicht. Es ist weniger aufwendig, mehr Waschschriffe durchzuführen, als noch weitere Schlüssel-Schloss-Kombinationen zu konstruieren.

Bei den Blockern verhält es sich anders, denn diese sollen die nichtbesetzten Kontaktpunkte des letzten Schritts blockieren. Daher blockieren die Blocker aus der Reihe B die unvollständigen Ketten aus dem letzten C-Schritt.

Die benötigten Flüssigkeiten (s. Tabelle 2.1) und die Beads werden in Mikroreaktionsgefäßen auf Eis gelagert, mit Pipetten bewegt und dosiert, mit einer Magnetbank separiert und einem Vortexmischer gemischt.

Dies wiederholt sich theoretisch beliebig oft, praktisch aber werden in der Regel Ketten aus zehn Elementen produziert, die dann später zu längeren Ketten kombiniert werden können. Im finalen Ligationsschritt wird kein Blocker mehr benötigt und statt des DNA-Repeat Monomers der Terminator der entsprechen Reihe verwendet. Briggs et al. (2012)

Tabelle 2.1: Liste der 31 Flüssigkeiten im ICA-TALEN „Baukasten“

	Bindedomänengegenstück zu DNA-Basen	Schlüssel-Schloss- Elemente A, B, C	Anzahl oder Kombinationen
DNA-Repeats	4	3	12
Blocker	-	3	3
Terminatoren	4	3	12
Waschpuffer	-	-	1
Ligase	-	-	1
Ligaseaktivierungspuffer	-	-	1
Wasser	-	-	1
			31

Somit benötigt der ICA-Prozess 31 verschiedene Flüssigkeiten, die von einem Mikrofluidik Chip in ständig wechselnder Reihenfolge gesteuert werden müssen. Der Ablauf des Protokolls muss hinsichtlich einer mikrofluidischen Automatisierung analysiert werden.

2.2 Flüssigkeiten: Oberflächenspannung und Tenside

2.2.1 Oberflächenspannung

Ein Wassertropfen ist stets bestrebt, eine Kugelform einzunehmen, sofern dies nicht durch die Schwerkraft oder umgebende Materie gestört wird. Dafür verantwortlich ist die Oberflächenspannung des Wassers (s. Abbildung 2.2).

Die Oberflächenspannung entsteht durch die intermolekularen Kräfte der Moleküle einer Flüssigkeit. Ein Molekül im Inneren des Flüssigkeitsvolumens erfährt aufgrund der Bindungen zu benachbarten Molekülen eine gleichmäßige Kraft in alle Raumrichtungen. Die Summe der anziehenden Kräfte auf ein Molekül an der Oberfläche ist jedoch nicht gleich Null. Alle an der Oberfläche liegenden Moleküle erfahren eine nach innen gerichtete Kraft, die im statischen Fall durch eine Normalkraft ausgeglichen wird. Das System (hier: Tropfen) erreicht einen statischen stabilen Zustand (Form), indem sich maximal viele Moleküle im Inneren des Volumens befinden (Kugelform).

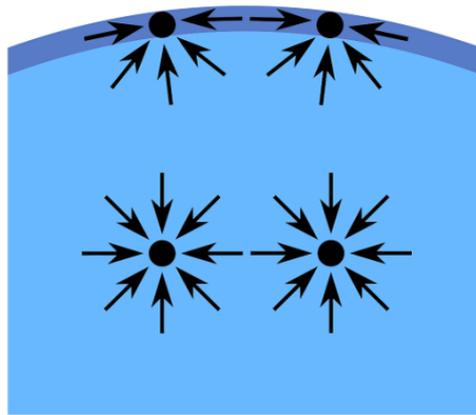


Abbildung 2.2: Ursache der Oberflächenspannung

Die anziehenden und abstoßenden Kräfte zwischen den Molekülen einer Flüssigkeit sind im Inneren des Volumens kugelsymmetrisch. Die intermolekularen Kräfte auf der Oberfläche sind in der Summe ins Innere des Volumens gerichtet. Daraus resultiert die Oberflächenspannung. (Bild: Basierend auf gemeinfreiem Werk, public domain)

Diese Eigenschaft einer Flüssigkeit kann auch allgemeiner über die Oberflächenenergie beschrieben werden. Die Oberflächenenergie erhöht sich, wenn Moleküle aus dem Volumen auf die Oberfläche verschoben werden, also weniger intermolekulare Verbindungen vorhanden sind. Die Energieänderung dW ist proportional zur Oberflächenspannung γ und der Oberflächenänderung dA :

$$dW = \gamma \cdot dA \quad (2.1)$$

Eine Oberflächenenergie ist somit auch für Feststoffe definiert. Hiermit können nun komplexere Grenzflächenphänomene wie das der Benetzung einer Teflonoberfläche durch einen Wassertropfen mit umgebender Luft beschrieben werden. Mortimer (2010), Tipler (1994) Berthier (2012)

2.2.2 Benetzung und statischer Kontaktwinkel

Oberflächenspannungen sind Grenzflächenspannungen und Oberflächenenergien sind Grenzflächenenergien. Zwei Phasen bilden eine Grenzfläche, deren Interaktion berücksichtigt werden muss.

In der Abbildung 2.3 ist schematisch dargestellt, wie die Übergänge zwischen den drei Phasen des Systems Tropfen auf Festkörper mit umgebender Luft verlaufen. Im Gegensatz zu der für die weiteren Ausführungen gemachten Vereinfachung (vgl. Abbildung 2.4), existieren keine infinitesimal dünnen Grenzschichten. Auch der Vorläuferfilm („precursor film“), der den Feststoff berührende Rand des Tropfens umgibt, wird im Folgenden vernachlässigt.

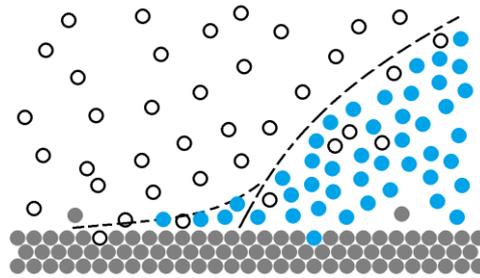


Abbildung 2.3: Die 3-Phasen-Grenze

Die Moleküle einer Flüssigkeit (blau) bilden zwischen den Molekülen eines Festkörpers (grau) und dem Umgebungsmedium (weiß) einen Tropfen. Es bildet sich zur Seite des Tropfens ein Vorläuferfilm auf dem Festkörper.

Die Oberflächenmoleküle eines Wassertropfens an Luft erfahren im Mittel kaum eine Kraft in Richtung der Luftmoleküle, da dort aufgrund der viel geringeren Dichte und somit Anzahl nur wenige potentielle Bindungspartner vorhanden sind. Somit ist die Oberflächenenergie zwischen Wasser und Luft entsprechend hoch (und vernachlässigbar kleiner als zwischen Wasser und Vakuum).

Die Dichte eines Feststoffes ist in der Regel sehr hoch, wenn von Nanoschäumen oder mikrostrukturierten Oberflächen abgesehen wird. Die Oberflächenenergie der Grenzfläche Wasser (f) und Teflon (s) ist demzufolge deutlich geringer, als von Wasser (l) und Luft (g).

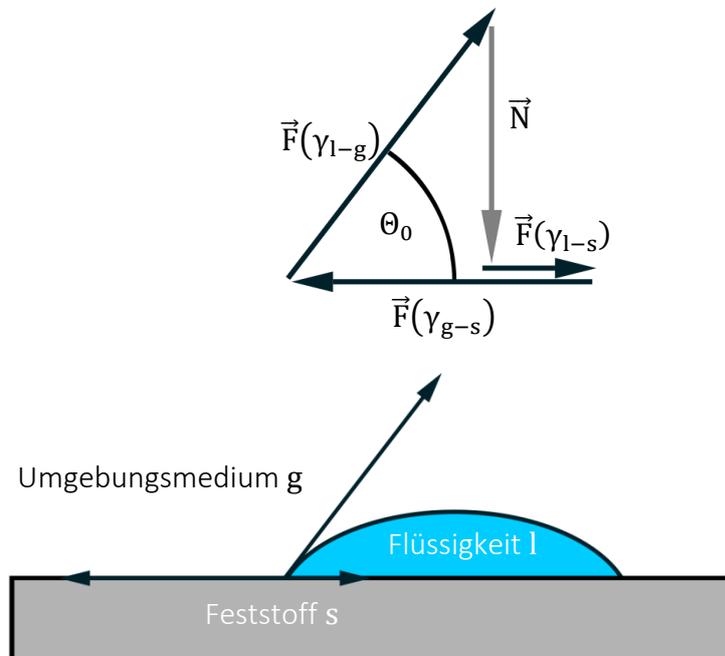


Abbildung 2.4: Kräftegleichgewicht im Triplepunkt der 3-Phasengrenze

Ein Flüssigkeitstropfen (l) liegt auf der Oberfläche eines Festkörpers (s) und ist umgeben von einem Umgebungsmedium (g) wie z.B. Luft.

Der Feststoff kann im Gegensatz zur Flüssigkeit und zum Gas seine Form nicht ändern. Die Grenzfläche zwischen Gas und Feststoff sei hier unendlich groß, und deren Änderung können somit vernachlässigt werden. Die Grenzflächenenergie zwischen Flüssigkeit und Feststoff ist das geringste erreichbare Energieniveau für ein Flüssigkeitsmolekül. Jedoch bedeutet eine Vergrößerung der Grenzfläche Feststoff-Flüssigkeit (kleinstes Energieniveau) automatisch eine Vergrößerung der Grenzfläche Flüssigkeit-Gas (hohes Energieniveau).

Ein physikalisches System strebt immer den stabilsten Zustand, den Zustand (zumindest lokal) minimaler Energie an. Im Falle von Flüssigkeit, Feststoff und Gas ist dies an der Benetzung zu beobachten. Ein stabiler (statischer) Zustand ist erreicht, wenn im Triplepunkt Kräftegleichgewicht herrscht (s. Abbildung 2.4). Die Benetzung eines Tropfens auf einer Oberfläche, der Gleichgewichtszustand des Systems, kann über den Kontaktwinkel Θ beschrieben werden.

Der Kontaktwinkel lässt sich über das Kräftepolygon herleiten und aus den Oberflächenenergien oder Oberflächenspannungen berechnen.

$$\sum_i \vec{F}_i = \vec{F}(\gamma_{l-g}) + \vec{F}(\gamma_{l-s}) + \vec{F}(\gamma_{g-s}) + \vec{N} = 0 \quad (2.2)$$

Der statische Kontaktwinkel Θ_0 ergibt sich über die Beziehung aus dem Kräftepolygon aus Abbildung 2.4 nach der Young'schen Gleichung, benannt nach Thomas Young (1805):

$$\cos \Theta_0 = \frac{\gamma_{g-s} - \gamma_{l-s}}{\gamma_{l-g}} \quad (2.3)$$

Zur Beschreibung der Vorgänge in einem digitalen Mikrofluidikchip im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit kann ein System angenommen werden, das Wassertropfen auf einer Teflonoberfläche im Umgebungsmedium Luft bewegt. Manchmal ist auch sinnvoll, die Luft durch ein anderes Fluid wie z.B. Silikonöl zu ersetzen. Dies reduziert zwar einerseits die Verdunstungsrate des Wasser und verbessert dessen Handhabung innerhalb des Chip-Systems, führt aber andererseits auch dazu, dass dessen Herstellung komplizierter wird und es zu Querkontamination kommen kann.

Silikonöl und Wasser liegen bei Normalbedingungen beide in der flüssigen Phase vor und auch ihre Dichte ist in derselben Größenordnung (s. Abbildung 2.5). Dass sich zwischen diesen dennoch eine stabile Phasengrenze ausbildet, kann nicht allein über die Dichte erklärt werden.

Wasser ist im Gegensatz zu Silikonöl polar. Außerdem haben (Silikon-)Öle größere Moleküle. Kleine Moleküle haben mehr nähere mögliche Bindungspartner. Das Silikonöl besitzt aufgrund der fehlenden Polarität und der großen Moleküle eine (sehr) geringe Oberflächenenergie. Die Polarität der kleineren Wassermoleküle erzeugt untereinander eine starke anziehende Kraft, nicht jedoch zu den unpolaren Molekülen des Silikonöls. Das Wasser hat daher eine hohe Oberflächenspannung oder Oberflächenenergie.

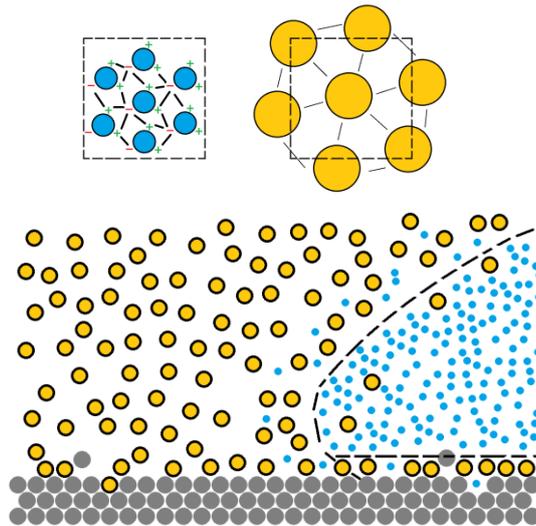


Abbildung 2.5: Einfluss von Silikonöl auf die 3-Phasengrenze

Die polaren Wassermoleküle (blau) bilden auf dem Feststoff (grau) einen Tropfen, der sich nicht mit dem unpolaren Umgebungsmedium Silikonöl (gelb) vermischt.

Um den Kontaktwinkel einer Flüssigkeit, oder allgemeiner die Grenzflächenenergie zwischen Flüssigkeit und einer weiteren festen oder flüssigen Phase, zu beeinflussen, ohne eben diese zweite Phase durch etwa ein anderes Material zu ersetzen, können Tenside verwendet werden.

2.2.3 Tenside

Tenside sind Moleküle bestehend einer längeren hydrophoben Kette und einem hydrophilen Endstück. Es gibt ionische und nicht-ionische Tenside, wobei sich diese Bezeichnung auf die hydrophile Endgruppe bezieht (s. Abbildung 2.6).

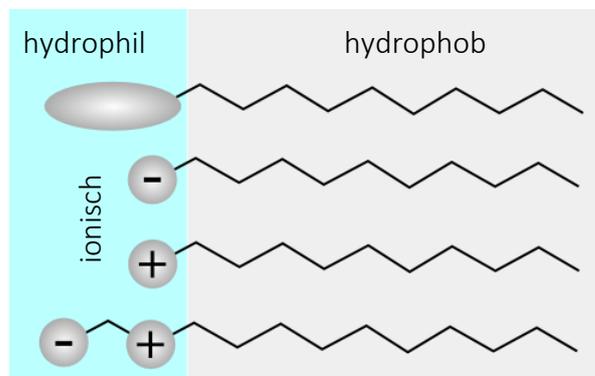


Abbildung 2.6: Verschiedene Tensidtypen

Die hydrophilen Enden des (ionischen) Tensids befinden wasserseitig der Phasengrenze z.B. zwischen Wasser und Öl. Die hydrophoben Abschnitte des Tensids befinden sich auf der anderen Seite der Phasengrenze. Bild: Roland (2016)

Als Beispiel wird ein Poloxamer (Handelsname u.a. Pluronic) gezeigt, dessen chemischer Aufbau in Abbildung 2.7 dargestellt ist. Es gibt sie in verschiedenen Längen (Indizes a und b), wobei die Kettenelemente unterschiedliche Eigenschaften besitzen. In der Mitte befindet sich ein wasserunlösliches hydrophobes Polypropylenoxid, links und rechts davon sitzen wasserlösliche hydrophile Polyethylenoxide. Daraus ergibt sich der amphiphile Charakter des Moleküls.

Das Tensid besitzt die Fähigkeiten, zum einen die Oberflächenspannung einer Flüssigkeit stark zu reduzieren und zum anderen die Dispersion zwischen zwei Flüssigkeiten oder zwischen Flüssigkeit und Feststoff überhaupt erst zu ermöglichen (z.B. Spülmittel für Wasser und Fett). Mortimer (2010)

Tenside werden in der Biologie eingesetzt, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Unspezifische Bindungen sind z.B. die Anlagerung von Streptavidin an einer hydrophoben Teflonoberfläche, eine spezifische Bindung ist die Anlagerung des Streptavidins an Biotin auf einer mit Biotin funktionalisierten Teflonoberfläche. (s. Abschnitte 4.3.2 und 5.2.4)

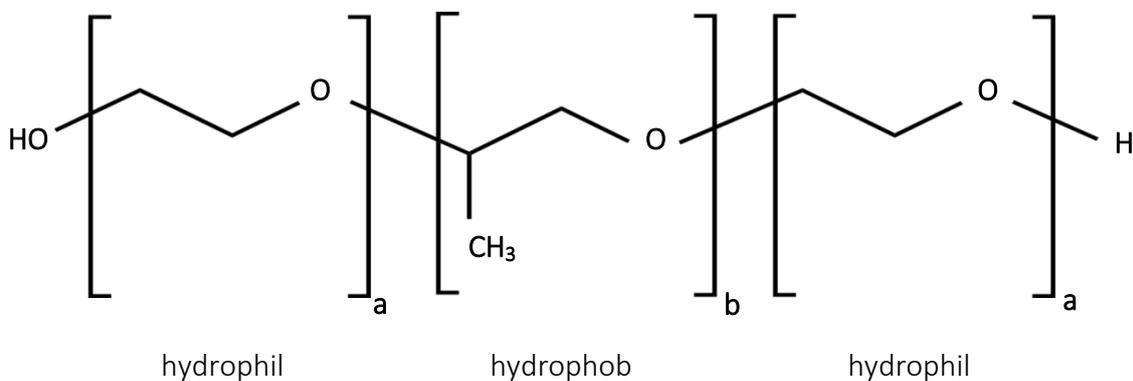


Abbildung 2.7: Chemische Struktur von Poloxameren

Für Poloxamere gelten die Indizes $a = 2-130$ und $b = 15-67$. Ein unter dem Handelsnamen Pluronic erhältliches Poloxamer wurde im Rahmen dieser Arbeit häufig verwendet. Bild: Jü (2016)

In der digitalen Mikrofluidik wird der Begriff „Biofouling“ als Bezeichnung für unspezifische Bindungen im Zusammenhang mit hydrophoben Oberflächen verwendet. Dieser Effekt beschreibt eine lokale Abnahme der Hydrophobie. Das Biofouling wirkt sich auf das Verhalten der Flüssigkeiten, speziell die Beweglichkeit von Tropfen in einem digitalen Mikrofluidikchip aus. Der Einsatz eines geeigneten Tensids reduziert oder unterdrückt diesen Effekt. Berthier (2012).

In Tabelle 2.2 und Abbildung 2.8 wird eine Verdünnungsreihe von Pluronic 64 in Wasser gezeigt. Der größte Effekt ($\Delta\theta \approx -20^\circ$) auf den Kontaktwinkel tritt zwischen 0-0,02 vol% auf, der Einfluss nimmt logarithmisch ab.

Die Reduzierung der Oberflächenspannung kann, wie später ersichtlich wird (s. Abschnitte 2.3.4, 2.5, 4.2 und 5.2.4), auch nützlich sein. Ein Wassertropfen mit hoher Oberflächenspannung (ohne Tensid) bewegt sich zwar sehr schnell in einem DMF-Chip, aber das Trennen und Mischen von Tropfen mit geringerer Oberflächenspannung (mit Tensid) ist leichter und reproduzierbarer.

Diese physikalischen und chemischen Grundlagen sind wichtig für das Verständnis des Abschnitts 2.3.2, für das Experiment in Kapitel 5 und allgemein den richtigen Einsatz eines Tensids in der digitalen Mikrofluidik, deren technische Grundlagen in den folgenden Abschnitten erläutert werden.

Tabelle 2.2: Verdünnungsreihe von Pluronic 64 in Wasser

Es wurden die Kontaktwinkel von 5 µl Tropfen gemessen.

	Θ (Mittelwert) Grad	σ Grad	Konzentration vol%
$\Delta\Theta \approx -20^\circ$ {	119,8	1,7	0,00
	97,8	1,4	0,02
	96,3	1,4	0,04
	94,2	1,7	0,08
	93,2	0,9	0,16
	92,1	0,7	0,31
	90,9	2,0	0,63
	88,9	0,3	1,25
	86,7	1,0	2,50
	84,3	2,0	5,00

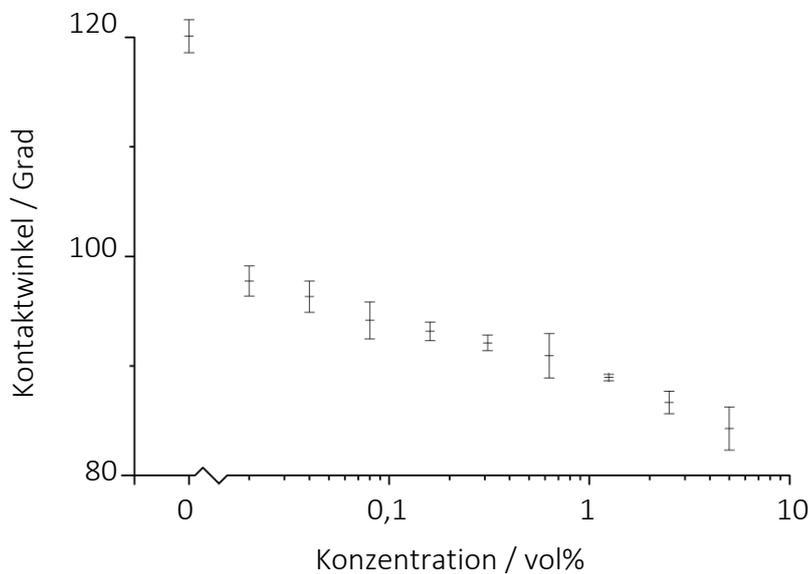


Abbildung 2.8: Grafische Darstellung der Verdünnungsreihe von Pluronic 64 in Wasser.

Der statische Kontaktwinkel Θ_0 im Vergleich zur Konzentration von Pluronic 64 in Wasser auf einer Teflon AF 1600 Oberfläche.

2.3 Wirkprinzipien in der digitalen Mikrofluidik (DMF)

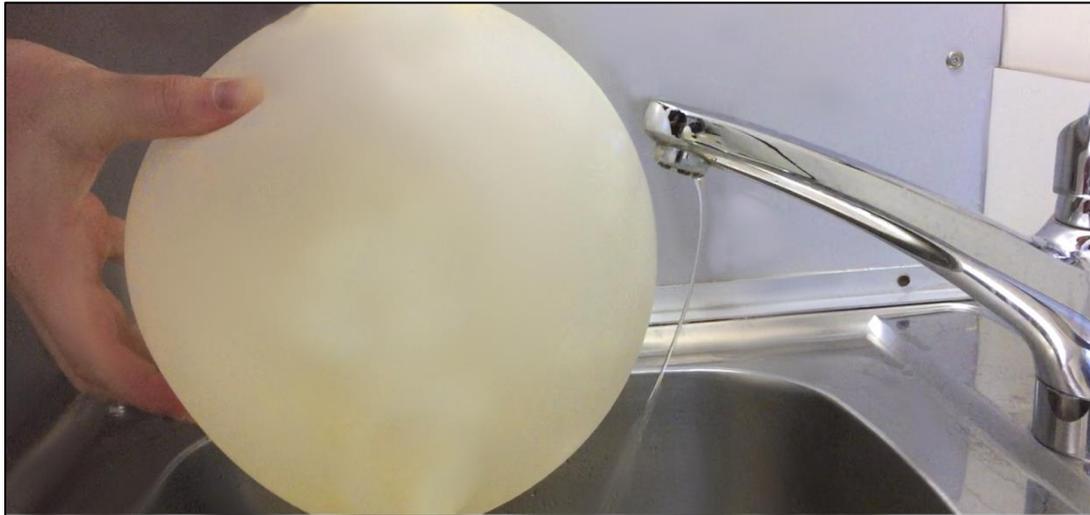


Abbildung 2.9: Ablenkung eines Wasserstrahls durch elektrostatische Kraft

Ein digitaler Mikrofluidikchip bewegt Tropfen mittels eines elektrischen Feldes, das Prinzip ist vergleichbar mit einem statisch aufgeladenen Ballon, der einen Wasserstrahl ablenkt.

In der klassischen Betrachtung wurde angenommen, dass die Bewegung eines Tropfens auf Basis des Elektrobenetzungseffekts aus der Kontaktwinkeländerung und einer dadurch induzierten Kraft durch einen Druckunterschied resultiert. Wird ein ausreichend starkes elektrisches Feld nur auf einer Seite des Tropfens angelegt, so wird er sich in die Richtung bewegen (vgl. Abbildung 2.9). Würde das Feld über das homogen über das ganze Tropfenvolumen verteilt sein, dann stellt sich auch hier der Elektrobenetzungseffekt ein. Die Kontaktwinkeländerung ist jedoch nur ein Nebeneffekt und nicht die treibende Kraft. Berthier (2012), Jones (2002), Mugele et al. (2005)

In einem DMF-System lassen sich auch Flüssigkeiten mit sehr geringer Oberflächenspannung bewegen, die keine oder nur eine geringe Kontaktwinkeländerung zeigen. Genauer betrachtet setzt sich die elektrostatische Kraft auf ein Fluid innerhalb des DMF-Systems aus zwei Komponenten zusammen: Elektrobenetzung auf Dielektrika (EWOD, engl. „electrowetting on dielectrics“) und Dielektrophorese (DEP). Fan et al. (2011) geht näher auf das Thema ein und benutzt diese Grundlagen um zwei sehr unterschiedliche Flüssigkeiten zu bewegen. Ein Wassertropfen wird vornehmlich durch die EWOD-Kraft F_{EWOD} bewegt und ein Silikonöltropfen durch die DEP-Kraft F_{DEP} .

Normalerweise würde ein Silikonöl als zweite umgebene Phase statt Luft Anwendung finden, damit sich Wassertropfen leichter bewegen lassen. Der EWOD-Effekt tritt schon bei geringen Spannungen zwischen 10V und 300V auf, der DEP-Effekt zeigt sich erst bei vielen 100V oder einigen 1000V. Daher hat ein normales DMF-System keinen Effekt auf das Silikonöl, dieses jedoch den besagten positiven Effekt auf das DMF-System.

2.3.1 Dielektrophorese und Elektrobenetzung

Berthier (2012) benennt zwei physikalische Effekte, die für die Bewegung eines Tropfens innerhalb eines DMF-Systems verantwortlich sein können: der Elektrobenetzungseffekt auf einer dielektrischen Schicht (EWOD) und die Flüssigkeitsdielektrophorese („liquid dielectrophoresis“ LDEP)

EWOD ist in erster Linie ein Grenzflächenphänomen zwischen einer Flüssigkeit und einer elektrisch leitfähigen, festen Oberfläche. Demgegenüber steht die DEP als ein auf das gesamte Flüssigkeitsvolumen wirkender Effekt, der durch ein inhomogenes elektrisches Feld die Flüssigkeit polarisiert. Berthier (2012), Po-Weng et al. (2006)

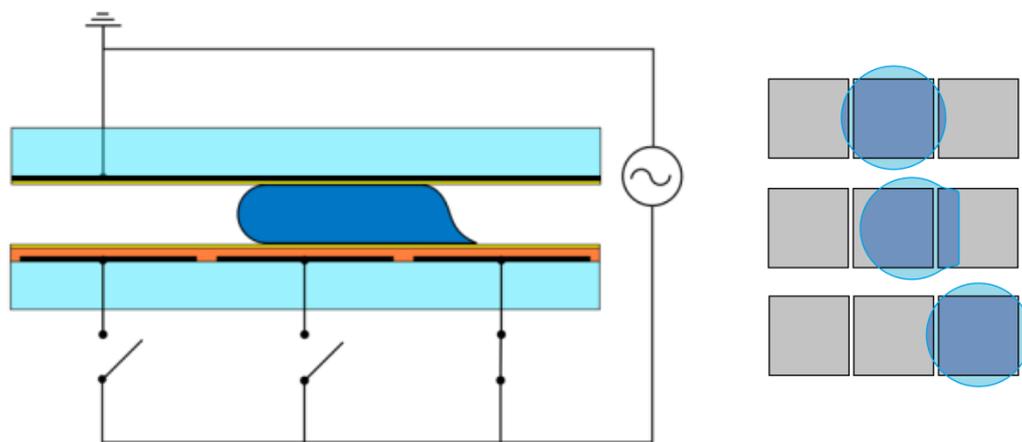


Abbildung 2.10: Tropfenbewegung in einem DMF-Chip

Das elektrische Feld zwischen der rechten Bodenelektrode (schwarz) und der Deckelelektrode (schwarz) auf dem Boden- und Deckelglas (blau) lässt einen Wassertropfen von der mittleren Elektrode aus nach rechts wandern. Die Elektroden sind isoliert durch ein Dielektrikum (orange) und die Innenseiten von Boden und Deckel sind hydrophob beschichtet (gelb).

Der EWOD Effekt resultiert aus elektrostatischen Kräften nahe des Triplepunkts der drei Phasengrenzen am Tropfen. Ein EWOD basiertes DMF-System wird mit Spannungen bis maximal 200-300V betrieben, wobei Gleichstrom oder Wechselstrom bis zu wenigen 10.000Hz verwendet wird. Innerhalb des Tropfens ist das elektrische Feld nahezu null.

LDEP resultiert aus der ponderomotorischen Kraft auf das flüssige, dielektrische Medium. Ein LDEP basiertes DMF-System wird mit Spannungen zwischen 300 und mehreren Tausend Volt betrieben, wobei Wechselstrom mit Frequenzen zwischen 50 kHz bis 200 kHz verwendet werden muss. Das Feld innerhalb des Tropfens kann nicht als Null angenommen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein DMF-System aufgebaut (vgl. Abbildung 2.10), das mit maximal 300V und maximal 50kHz arbeitet. Für detaillierte Informationen zum LDEP sei auf Berthier (2012) verwiesen.

2.3.2 Aktor-Kraft

Die Bewegung der Tropfen ist entweder das Resultat der elektrostatischen Coulombkraft zwischen Elektrode und Ladungsträgern der Tropfenoberfläche einer elektrisch leitfähigen Flüssigkeit oder zwischen (induzierten) Dipolen des gesamten Tropfenvolumens bei dielektrischen Flüssigkeiten. Abdelgawad et al. (2009)

Die Herleitung der Aktor-Kraft geschieht in diesem Falls (vgl. Berthier (2012) für andere Ansätze) über das Modellsystem eines Plattenkondensators, dessen „obere Platte“ die Grenzfläche des Wassertropfens und dessen „untere Platte“ die Elektrode eines DMF-Chips ist. Ein Dielektrikum trennt Tropfen und Elektrode.

Die Idee ist, dass das System während der Tropfenbewegung eine Änderung der Energie, die dem Kondensator zugeschrieben werden kann, erfährt. Die Kapazität C eines Plattenkondensators errechnet sich nach

$$C = \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot \frac{x \cdot y}{d} \quad , \quad (2.4)$$

wobei ϵ_0 die Dielektrizitätskonstante des Vakuums, ϵ_r die relative Permittivität des Dielektrikums und $x \cdot y$ die Breite und Länge der einfachen Kontaktfläche zwischen Bodenplatte und Deckelplatte (Tropfen und Elektrode) ist.

Es kann vereinfachend angenommen werden, dass der Tropfen während der Bewegung in etwa die in Abbildung 2.11 gezeigte Form hat, d.h. die Vorschubfront ist linear und hat die konstante Länge L .

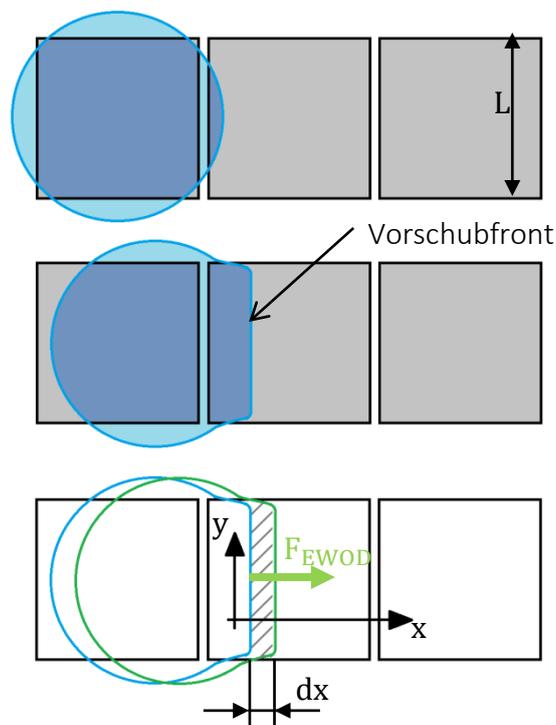


Abbildung 2.11: Modelldarstellung der Tropfenbewegung in einem digitalen Mikrofluidik System

Die Aktor-Kraft $F_{\text{EWO}}D$ bewegt den Wassertropfen in x-Richtung von links auf die mittlere Elektrode und verdrängt die Luft. Die Kapazität des Systems zwischen Deckelektrode (durchsichtig und daher in der Draufsicht nicht zu sehen) und mittlerer Elektrode nimmt zu, bis diese vollständig bedeckt ist. Die Elektrode erstreckt sich in x-y-Richtung jeweils über die Länge L . Die Bodenelektroden sind isoliert mit einem Dielektrikum der Dicke d und der relativen Permittivität ϵ_r . Damit lässt sich die Kapazität C über das Modellsystem eines Plattenkondensators angeben. Die Energie im System ist abhängig von elektrischer Spannung und Kapazität. Die Energieänderung dW ist dementsprechend abhängig von der Positionsänderung des Tropfens in x-Richtung dx .

Die Energie des Modellsystems ergibt sich mit der angelegten Spannung U nach

$$W = \frac{1}{2} \cdot C \cdot U^2 \quad (2.5)$$

und mit Gleichung 2.4 und $y = L$ erhält man

$$W = \frac{1}{2} \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot \frac{x \cdot L}{d} \cdot U^2 \quad (2.6)$$

Die einzige Veränderliche auf der rechten Seite in Gleichung 2.6 während der Bewegung ist x . Die Änderung der Energie kann daher beschrieben werden nach

$$dW = \frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot L \cdot U^2}{2 \cdot d} \cdot dx \quad (2.7)$$

Die Energie W lässt sich auch interpretieren als Kraft F mal Weg s

$$W = F \cdot s \quad (2.8)$$

und demnach ergibt sich eine Kraft als ein Weg-Differential der Energie

$$\frac{dW}{ds} = F \quad (2.9)$$

Es wird die auf Elektrobenetzung (EWOD) basierte Aktor-Kraft F_{EWOD} definiert nach

$$F_{EWOD} := \frac{dW}{dx} = \frac{d}{dx} \frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot x \cdot L \cdot U^2}{2 \cdot d} \quad (2.10)$$

und erhalten somit

$$F_{EWOD} = \frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot U^2}{2 \cdot d} \cdot L \quad (2.11)$$

Die Aktor-Kraft, die letztendlich zur Tropfenmanipulation in der digitalen Mikrofluidik eingesetzt werden kann, ist abhängig von der Kapazität C des Systems Tropfen-Elektrode und der angelegten elektrischen Spannung U . Berthier (2012), Chatterjee et al. (2009), Jones et al. (2004)

Im folgenden Abschnitt wird kurz auf die Betrachtung eines Elektrobenetzungssystems eingegangen, wie es z.B. für eine Flüssiglinse benötigt wird. Dies ist zum technischen Verständnis der Funktionsweise eines DMF-Systems sinnvoll.

2.3.3 Die Verbindung zur Young-Lippmann Gleichung

Die Kraft F_{EWOD} ist über die Länge L verteilt. L verläuft entlang der 3-Phasengrenze zwischen dem Tropfen, dem umgebendem Fluid und dem Feststoff. Wird nur ein Punkt auf dieser Linie betrachtet, kann das System mit der Young'schen Gleichung wie in Abschnitt 2.2.2 über einen Triplepunkt und die daran angreifenden Oberflächenspannungen³ dargestellt werden. Hier wird jetzt zusätzlich eine Abhängigkeit der elektrischen Spannung mit einbezogen.

Die Abbildung 2.12 zeigt eine vereinfachte schematische Darstellung des Modellsystems der Elektrobenetzung. Die Vergrößerung zeigt das realistische Aussehen des Triplepunkts, aber für die folgenden Überlegungen wird das vereinfachte Modell von oben verwendet, wie es auch in Abbildung 2.4 zu sehen ist.

Die Oberflächenspannungen γ können wie die Kräfte F nach Gleichung 2.2 aus Abschnitt 2.2.2 in Beziehung gesetzt werden. Das Interface zwischen Flüssigkeit und Umgebungsmedium γ_{1-g} und zwischen Umgebungsmedium und Feststoff γ_{g-s} verändert sich nicht durch die angelegte Spannung:

$$\cos \theta_U = \frac{\gamma_{g-s} - \gamma_{1-s}(U)}{\gamma_{1-g}} \quad (2.12)$$

³ Zu beachten: Oberflächenspannung ist definiert als Kraft pro Weg

Die Kräfte im Trippelpunkt resultieren aus den Oberflächenspannungen des Systems im Grundzustand und dem Elektrobenetzungsanteil zusammen, denn F_{EWOD} kann einfach als zusätzliche Kraft betrachtet werden, oder als „Elektrobenetzungs-Oberflächenspannung“:

$$\gamma_{EWOD} = \frac{F_{EWOD}}{L} \quad (2.13)$$

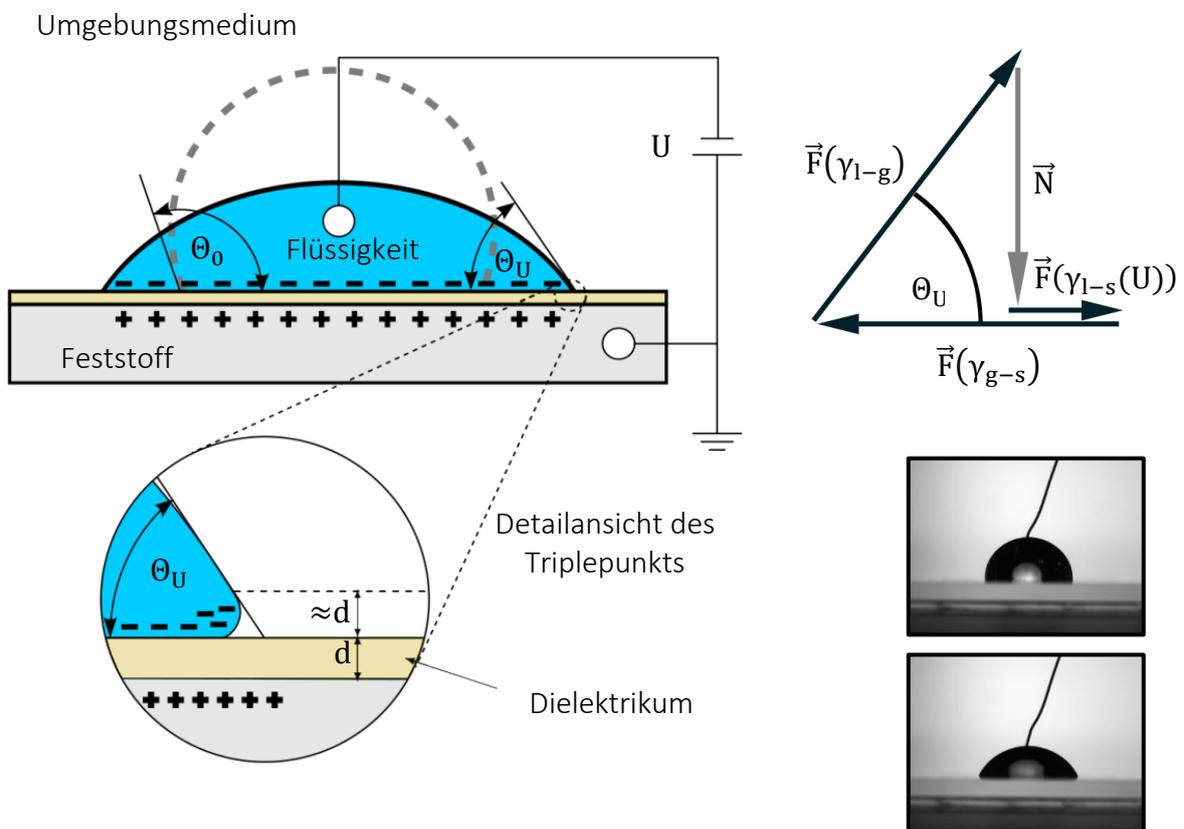


Abbildung 2.12: Der Elektrobenetzungseffekt auf Dielektrika

θ_0 ist der Kontaktwinkel des ruhenden Tropfens. Der Elektrobenetzungseffekt induziert den Kontaktwinkel θ_U in Abhängigkeit der angelegten elektrischen Spannung U . Die Fotos zeigen einen Tropfen bei deaktivierter Spannung (90° , oben) und bei 200 V (60° , unten).

Das Kräftegleichgewicht des Systems bei aktivierter Spannung muss sich auch umschreiben lassen als die Summe der Kräfte im statischen System ohne elektrische Spannung plus einer weiteren Komponente, der Elektrobenetzungskraft oder vielmehr der zugeordneten Elektrobenetzungs-Oberflächenspannung γ_{EWOD} :

$$\vec{\gamma}(U) = \vec{\gamma}(0) + \vec{\gamma}_{EWOD} \quad (2.14)$$

Relevant sind nur horizontale Komponenten. Umschreiben der Gleichung 2.12 ergibt:

$$\gamma_{l-s}(U) = \gamma_{g-s} - \cos \theta_U \cdot \gamma_{l-g} \quad (2.15)$$

Mit $U = 0$ ergibt sich für den statischen Kontaktwinkel θ_0 die Young'sche Gleichung (2.3)

$$\cos \theta_0 = \frac{\gamma_{g-s} - \gamma_{l-s}(0)}{\gamma_{l-g}} \quad (2.16)$$

und somit

$$\gamma_{l-s}(0) = \gamma_{g-s} - \cos \theta_0 \cdot \gamma_{l-g} \quad (2.17)$$

Einsetzen von Gleichung 2.15 und 2.17 in Gleichung 2.14 und umformen ergibt

$$\gamma_{g-s} - \cos \theta_U \cdot \gamma_{l-g} = \gamma_{g-s} - \cos \theta_0 \cdot \gamma_{l-g} + \gamma_{EWOD} \quad (2.18)$$

$$\cos \theta_U = \cos \theta_0 - \frac{\gamma_{EWOD}}{\gamma_{l-g}} \quad (2.19)$$

und schlussendlich ergibt Einsetzen von 2.13 und 2.11 die Young-Lippmann Gleichung

$$\cos \theta_U = \cos \theta_0 + \frac{\epsilon_r \cdot \epsilon_0 \cdot U^2}{2 \cdot \gamma_{l-g} \cdot d} \quad (2.20)$$

2.3.4 Eine technische Interpretation der Young-Lippmann Gleichung und der Elektrobenetzungskraft

Siebzig Jahre nach Thomas Young (1805), der mit der Young'schen Gleichung (2.3) den Kontaktwinkel beschrieb, veröffentlichte Gabriel Lippmann (1875) eine Arbeit über Elektrizität und Kapillareffekt, die die Grundlage der heutigen digitalen Mikrofluidik bildet. Eine Übersetzung aus dem ursprünglich Französischen ins Englische findet sich in Mugele et al. (2005).

Die Young-Lippmann Gleichung (2.20) ist eine vereinfachte Darstellung eines komplexeren physikalischen Sachverhalts und kann auf verschiedenen Wegen hergeleitet werden, wie z.B. im vorherigen Abschnitt über die Elektrobenetzungskraft. Berge (1993), Berthier (2012)

Sie beschreibt aber weder den Sättigungseffekt der Kontaktwinkeländerung, der bei höheren elektrischen Spannungen auftritt, noch leitet sich aus ihr ab, weshalb ein elektrisches Feld auch Tropfen bewegen kann, deren Kontaktwinkel sich nicht ändert.

Unabhängig von der Herleitung lässt sich an Hand der Interpretation des Modellsystems und der dazu gehörenden Gleichung sehr anschaulich zeigen, welche physikalischen Einflussgrößen vorliegen. Das hilft dem Anwender, das mikrofluidische System zu optimieren.

Die Änderung des Kontaktwinkels $\cos \theta_U$ entspricht einer Energieänderung im System Tropfen (Verformung, Polarisierung, Ladungsträgerwanderung etc.). Bei sonst konstanten Randbedingungen wird im Folgenden die Auswirkung einer Änderung der einzelnen Variablen beschrieben.

Statischer Kontaktwinkel

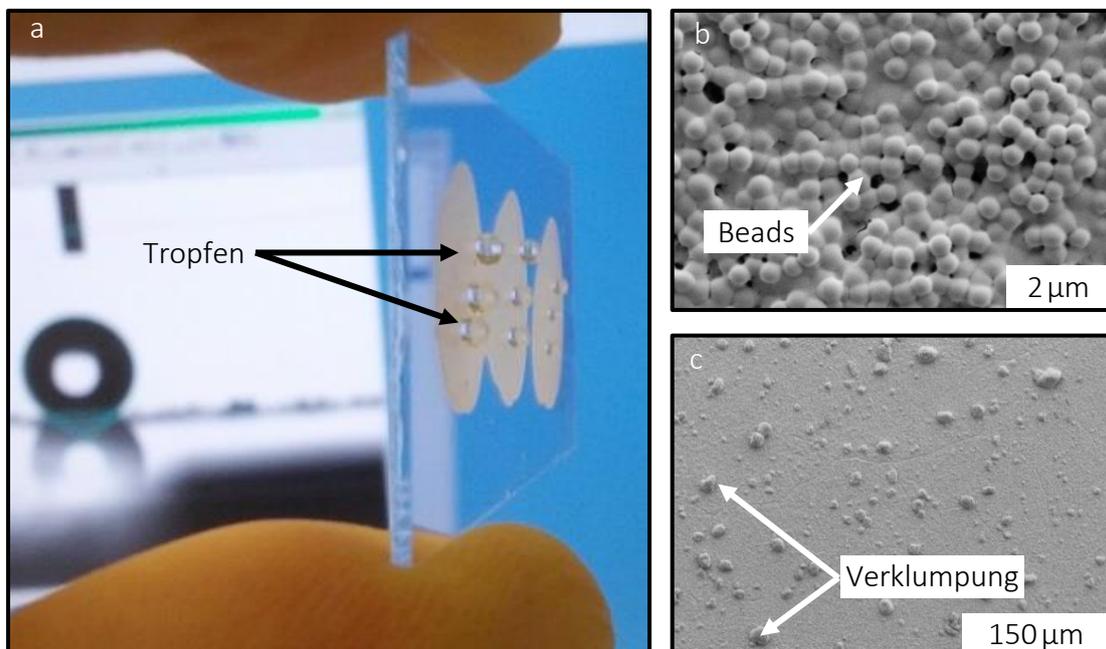


Abbildung 2.13: Abhängigkeiten von Hydrophobie, Kontaktwinkel und Adhäsion

Fotografische und REM-Aufnahmen der Oberfläche in verschiedenen Vergrößerungen zeigen etwa 500 nm kleine Polystyrol-Beads. a) Die Tropfen rollen nicht von der mikrostrukturierten Oberfläche (graue Flächen) des Objektträgers. b) Die Beads erzeugen diese hydrophobe Oberfläche. c) Jedoch bleibt ein Tropfen an größeren Verklumpungen dieser Beads hängen.

Ein großer statischer Kontaktwinkel (engl. auch „Young’s angle“) Θ_0 der Flüssigkeit auf der Oberfläche im neutralen Zustand (keine elektrische Spannung, keine statische Aufladung, kein Tensid usw.) ermöglicht eine größere Kontaktwinkeländerung als ein kleiner Θ_0 bei gleicher Spannungsänderung.

Die Kraft zwischen Elektrode und Tropfen weist nur eine sehr geringe horizontale Komponente auf. Damit diese ausreicht, um den Tropfen zu bewegen, muss das System Oberflächenbeschichtung und Tropfen eine möglichst geringe Adhäsion aufweisen. Diese Eigenschaft geht meistens mit einem großen Kontaktwinkel einher (vgl. Lotusblatt), aber nicht immer umgekehrt (vgl. Rosenblatt). Der Rosenblatt Effekt zeichnet sich durch große Kontaktwinkel aber gleichzeitig hohe Adhäsion aus. (s. Abbildung 2.13 und auch Abschnitt 2.2.3)

Für eine Elektrobenetzungsanwendung wie einer Flüssiglinse (s. Abschnitt 2.4) ist die Änderung des Kontaktwinkels, die daraus folgende Formänderung und die somit steuerbare Brennweite der Tropfenlinse. Bei einer Anwendung in der digitalen Mikrofluidik steht die translatorische Beweglichkeit des Tropfens im Vordergrund.

Permittivität und Schichtdicke des Dielektrikums

Eine Änderung von ϵ_0 ist nicht möglich und ϵ_r ergibt sich aus der Wahl der Materialien zwischen Elektrode und Tropfen.

Für die hydrophobe Beschichtung ist nur die Oberfläche relevant und kann daher beliebig dünn ausgelegt werden, nicht jedoch die dielektrische Beschichtung. Als hydrophobe Beschichtung wird meistens ein Fluorpolymer wie Teflon verwendet, dessen ϵ_r mit einem Wert von etwa 2,1 sehr klein ist. Eine Teflonschicht von 20-100 nm reicht aus, um die hydrophoben Eigenschaften flächendeckend zu garantieren, und kann problemlos hergestellt werden. Die dielektrische Schicht hat in der Regel eine Dicke im Mikrometerbereich, wodurch der Einfluss auf das ϵ_r des Gesamtsystems vernachlässigt werden kann.

Teflon ist chemisch inert und bildet eine geschlossene Schicht. Somit ist die Materialwahl für das Dielektrikum relativ frei und kann an vorhandene Laborausstattung oder benötigte Eigenschaften wie optische Transparenz oder geringe elektrische Spannungen angepasst werden.

Die zweite wichtige Eigenschaft des dielektrischen Materials ist seine elektrische Durchschlagsfestigkeit. Wird das Material zu dünn aufgetragen, dann zerstört die elektrische Spannung die Schicht und somit den Chip.

Je größer ϵ_r ist, desto weniger Spannung ist notwendig, um die zur Tropfenbewegung notwendige elektrische Feldstärke zu erreichen. Je dünner die dielektrische Schicht ist, desto weniger Spannung ist notwendig, um die zur Tropfenbewegung notwendige elektrische Feldstärke zu erreichen.

Bei sehr langem Kontakt (Tage oder möglicherweise auch nur Stunden) zwischen Flüssigkeit und der sehr dünnen hydrophilen Oberfläche muss jedoch auch mit einer (chemischen) Wechselwirkung zwischen Flüssigkeit und Dielektrikum gerechnet werden.

Phasengrenze Tropfen und umgebendes Fluid

Die Phasengrenze zwischen Tropfen und Füllermedium, sei es Luft, Vakuum oder eine weitere, mit dem Tropfen nicht mischbare, flüssige Phase (z.B. Wassertropfen in Silikonöl), geht in die Formel durch γ_{l-g} ein (s. auch Abschnitt 2.2.3).

Im Falle des ruhenden Tropfens bei Elektrobenetzungsanwendungen ist die Veränderung der Phasengrenze zwischen Tropfen und Umgebungsmedium im Rahmen der Young-Lippmann-Gleichung im Grunde nur eine weitere Möglichkeit, den Kontaktwinkel θ_0 zu beeinflussen. Technische Relevanz hat das Umgebungsmedium, wenn es darum geht, den Tropfen als zusammenhängendes Volumen zu stabilisieren, z.B. wenn die Flüssiglinse geschüttelt wird. Und im Falle eines Elektrobenetzungsdisplays, ist nicht der Wassertropfen gefärbt, sondern das Umgebungsmedium Öl.

Der technisch einfachste Aufbau eines digitalen Mikrofluidik Chips benutzt als Umgebungsmedium Luft, da hier u.a. auf aufwendige Dichtungen oder Bondprozesse zum Halten des niederviskosen Umgebungsmediums verzichtet werden kann. Für die experimentelle Anwendung ist zu berücksichtigen, dass eine zweite flüssige Phase leichter zu Querkontamination führt als Tropfen, die sich im Umgebungsmedium Luft befinden.

Auch wenn es wesentlich leichter ist, einen Wassertropfen in einem silikonölgefüllten Chip zu bewegen, so sollte der Aufwand nur betrieben werden, wenn die Tropfenbewegung anders nicht möglich ist. Gründe können etwa eine limitierte elektrische Spannung oder eine sonst zu hohe Adhäsion zwischen Tropfen und Chipoberfläche sein.

Grenzen des Modells: Sättigungseffekt

Die Young-Lippmann Gleichung beschreibt die Kontaktwinkeländerung nur für einen gewissen Bereich der elektrischen Feldstärke. Bei größeren Spannungen und somit Feldstärken tritt ein Sättigungseffekt ein (vgl. Abbildung 2.14).

Berthier (2012) bespricht verschiedene mögliche Theorien zur Beschreibung des Effektes. Dabei werden u.a. Faktoren wie Ladungsüberhöhung (engl. „charge trapping“), lokale Verringerung der Oberflächenspannung und ein variabler elektrischer Widerstand innerhalb der Flüssigkeit thematisiert. Ali et al. (2015) hingegen beschreibt den Sättigungseffekt mit der Abstoßung von Ladungen an den Grenzflächen des Tropfens.

Besonders an spitzen Ecken und scharfen Kanten wie der 3-Phasengrenze von Tropfen, Dielektrikum und Umgebungsmedium entstehen starke elektrische Felder (vgl. Feldüberhöhung an Elektroden in der Hochspannungstechnik). In Papathanasiou et al. (2005) wird beschrieben, dass der Sättigungseffekt eintritt, wenn die lokale elektrische Feldstärke die Durchschlagfestigkeit des dielektrischen Materials übersteigt. Die theoretischen Voraussagen und Rechenmodelle würden zu den experimentellen Ergebnissen passen.

Darauf aufbauend haben Drygiannakis et al. (2009) den EWOD Effekt basierend auf Gleichungen der hydrostatischen Kapillarität simuliert, um verlässliche Vorhersagen des Kontaktwinkels nahe des Sättigungsbereiches in Abhängigkeit der angelegten elektrischen Spannung machen zu können.

Auch wenn der dielektrische Durchbruch und der Sättigungseffekt nicht direkt miteinander zusammenhängen, muss jedoch insbesondere der grundlegende Effekt der Feldüberhöhung beachtet werden, wenn etwa sehr dünne Dielektrika für die DMF-Chips vorgesehen sein sollten. Der Sättigungseffekt an sich ist für ein DMF-System nicht direkt relevant, da es weniger auf die Tropfenverformung, als auf die Tropfenttranslation ankommt.

Die Tropfenbewegung kann eher durch eine minimal adhäsive Oberfläche (Abrollwinkel) verbessert werden, als durch einen großen statischen Kontaktwinkel θ_0 .

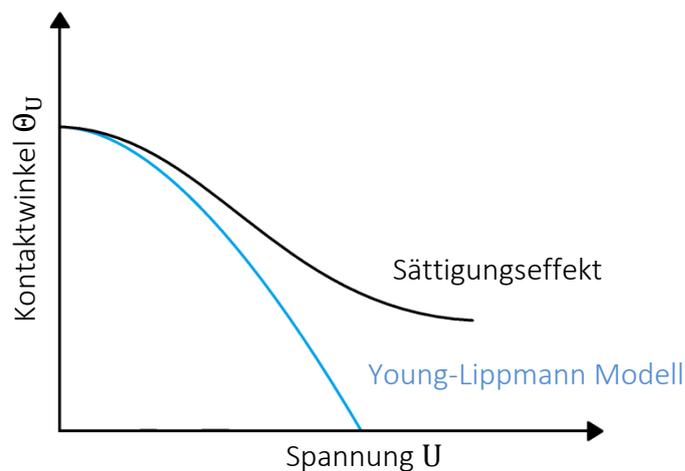


Abbildung 2.14: Abhängigkeit von Kontaktwinkel und elektrischer Spannung

Die Young-Lippmann Gleichung sagt einen parabelförmigen Verlauf voraus. In der Realität tritt eine asymptotisch verlaufende Sättigung auf. Nach Berthier (2012)

2.3.5 Hysterese, Abrollwinkel und minimale Aktor-Spannung

Ein Tropfen wird über zwei Kontaktwinkel beschrieben: der statische und der dynamische. Der statische Kontaktwinkel liegt vor, wenn ein unbewegter Tropfen auf einer Oberfläche ruht. Angenommen, es lägen keinerlei Spannungen, Reibungskräfte oder Adhäsionskräfte mit Ausnahme der Oberflächenspannungen vor, dann würde jeder Tropfen sofort eine Form entsprechend seines statischen Kontaktwinkels einnehmen.

Realistisch betrachtet muss ein Tropfen jedoch erst mit einer Pipette abgesetzt werden oder durch Kondensation entstehen, was auch einer Fluidbewegung und somit natürlich eine, dynamischen Prozess entspricht. Dabei ist zu erkennen, dass der dynamische Kontaktwinkel eines Tropfens eine Hysterese beschreibt, die durch einen Fortschreitwinkel und einen Rückzugswinkel begrenzt ist.

Wird das Tropfenvolumen erhöht, so muss sich auch seine Kontaktfläche zum Feststoff vergrößern und dementsprechend wandert die 3-Phasengrenze weiter in Richtung Umgebungsmedium. Dies geschieht jedoch nicht sofort, sondern erst mit Erreichen des Fortschreitwinkels. Zuvor sind Spannungen und Kräfte im Tropfen nicht groß genug, um die Adhäsionskräfte zu überwinden (vgl. Haftreibung und Rollreibung in der Mechanik).

Ähnlich verhält es sich mit dem Rückzugswinkel. Wird der Tropfen abgepumpt, so verkleinert sich der Kontaktwinkel bis zum Erreichen des Rückzugswinkels, bevor sich die Grundfläche verringert.

Eben diese Hysterese lässt sich auch bei einem eine schiefe Ebene hinabrollenden Tropfen beobachten: Der talseitige Kontaktwinkel entspricht dem Fortschreitwinkel und der bergseitige Kontaktwinkel entspricht dem Rückzugswinkel. Und schlussendlich ist der eine Ebene hinabrollende Tropfen direkt vergleichbar mit einem innerhalb eines DMF-Systems bewegten Tropfen. Dessen Kontaktwinkel zeigt eine Hysterese zwischen steigender bzw. sinkender aber im Moment der Messung gleicher Spannung (s. Abbildung 2.15).

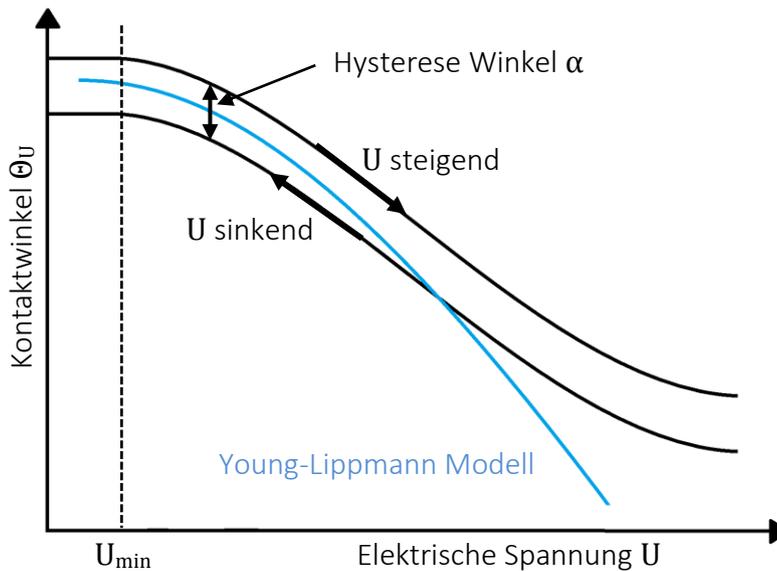


Abbildung 2.15: Die Hysterese des Kontaktwinkels

Stark vereinfachte Darstellung der Hysterese des Young-Lippmann Kontaktwinkels über einer angelegten elektrischen Spannung U . Der Kontaktwinkel bei zunehmender Spannung ist nicht gleich dem bei sinkender, aber gleicher Spannung. Nach Berthier (2012)

Berthier (2012) fasst für die zur Tropfenbewegung in einem DMF-System vereinfachend zusammen, dass eine große (elektrische) Kapazität C des Systems, eine geringe Oberflächenspannung γ des Tropfens, eine möglichst hydrophobe Oberfläche und somit ein großer statischer Kontaktwinkel Θ_0 und eine kleine Hysterese α die benötigte elektrische Spannung U minimieren:

$$U_{\min} \approx 2 \sqrt{\frac{\gamma \cdot \alpha \cdot \sin \Theta_0}{C}} \quad (2.21)$$

Mit dieser Gleichung (2.21) und der technischen Interpretation der Young-Lippmann Gleichung (s. Abschnitt 2.3.4) können die Prinzipien des Aufbaus eines DMF-Chips verstanden werden.

Wie jedes technische Element sollte auch der DMF-Chip möglichst einfach hinsichtlich Material, Herstellungsmethoden und Kosten gehalten werden, aber dennoch die notwendigen Leistungen wie Aktor-Kraft und Funktionalität erbringen.

2.4 Digitale Mikrofluidik und Elektrobenetzung

Häufig werden die Begriffe „Elektrobenetzung“ und „Digitale Mikrofluidik“ bzw. „electrowetting“ und „digital microfluidics“ nicht differenziert oder falsch verwendet. So soll der folgende Abschnitt helfen, um die Unterschiede zu verstehen.

Eine sehr umfassende Abhandlung über die Grundlagen der digitalen Mikrofluidik von der Oberflächenspannung bis hin zur Simulation des Sättigungseffekts der Elektrobenetzung findet sich im Buch „*Micro-Drops and Digital Microfluidics*“ von Jean Berthier (2012). Er beschreibt ausführlich über die Details der zugrundeliegenden physikalischen Wirkprinzipien, die zum Verständnis der Elektrobenetzung und zur Konstruktion eines digitalen Mikrofluidikchips benötigt werden.

Elektrobenetzung

Bei der Elektrobenetzung steht die Verformung des Tropfens im Vordergrund, um einen sekundären Effekt zu erzielen. Bei der Flüssiglense von Varioptic⁴ ändert sich die Brennweite (s. Abbildung 2.16), bei dem Elektrobenetzungsdisplay von Liquavista legt sich ein gefärbter Tropfen über einen Bildschirmpixel und ändert dessen Farbe. Wird das E-Feld deaktiviert, fallen diese Systeme in ihren Ausgangszustand zurück. Für diese Anwendungen wird meist eine Flüssigkeit mit hoher Oberflächenspannung benötigt. Die Elektrobenetzung ist sowohl der grundlegende physikalische Effekt als auch der Namensgeber dieser Anwendungen.



Abbildung 2.16: Flüssiglense basierend auf dem Electrowetting-Effekt

Ein Tropfen als eine verformbare optische Linse, deren Brennweite f mit einer elektrischen Spannung U reguliert werden kann. Diese Linsensysteme ändern elektrisch die Benetzung des Tropfens auf einer Oberfläche. Bild Mitte: Mit freundlicher Genehmigung der Firma Varioptic.

Digitale Mikrofluidik

In der digitalen Mikrofluidik hingegen steht die Translation (und auch Manipulationen wie Trennen und Mischen) der Tropfen im Vordergrund. Sei es, um wie mit einer Pipette in einem normalen Labor zwei Chemikalien zu dosieren und zu mischen, oder um einen Wassertropfen innerhalb eines Mikrofluidikchips zu einem Sensor zu bewegen.

Die Translation wird immer mittels eines Gradienten im elektrischen Feld, aber mittels unterschiedlicher elektromechanischer Effekte erreicht: Für Flüssigkeiten mit hoher Oberflächen-

⁴ Varioptic, Bâtiment Tony Garnier, 24 rue Jean Baldassini, 69007 Lyon, Frankreich. <http://www.varioptic.com/> Dezember 2016

spannung (z.B. Wasser) ist der Elektrobenetzungseffekt (EWOD) verantwortlich, für Flüssigkeiten mit niedriger Oberflächenspannung (z.B. Silikonöl, Ethanol) der Dielektrophorese-Effekt (DEP). Wird das E-Feld deaktiviert, bleiben die Tropfen auf ihrer neuen Position.

Die Anwendungen sowohl unter dem Begriff der Elektrobenetzung als auch der Digitalen Mikrofluidik haben gemein, dass beide durch ein elektrisches Feld eine Kraft auf einen Tropfen ausüben. Jedoch DMF-Chips (Abbildung 2.17) als Elektrobenetzungs-Chips zu bezeichnen, kann falsch interpretiert werden.

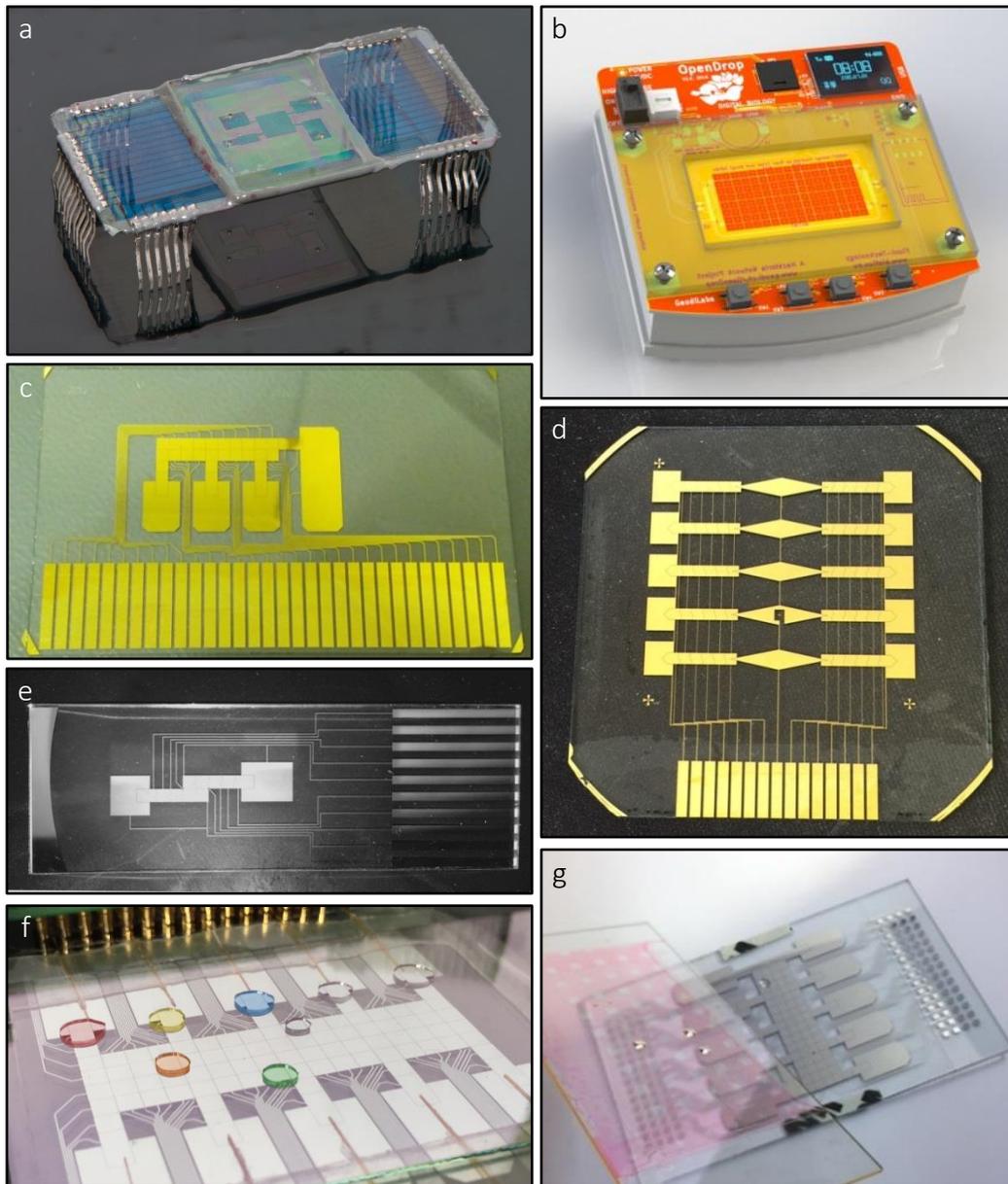


Abbildung 2.17: Beispiele für DMF-Chips

a) Deckel und Boden aus ITO beschichtetem Glas (von der Ecken und Bartels Mikrotechnik) b) OpenDrop ist ein offenes System basierend auf einem Leiterplatte. Mit freundlicher Genehmigung von Urs Gaudenz (GaudiLabs (2016)) c-e) Verschiedene Bodensubstrate aus dieser Arbeit, Chrom und Gold auf Glas. f) DMF-Chip zur TALEN Synthese und g) mit integrierten Sensoren, Elektrodendesign basiert auf Jebail et al. (2010).

2.4.1 Prinzip des DMF-Chip Aufbaus

Die digitale Mikrofluidik (DMF) ermöglicht die diskrete Steuerung kleinster Tröpfchen mit Volumina bis hinunter zu Nano- oder Pikolitern mittels elektrostatischer Kräfte auf einem mikrofluidischen Chip. Es gibt zwei Hauptarten, in die DMF-Chips unterteilt werden können: offene und geschlossene digitale Mikrofluidik (s. Abbildung 2.18). Berthier (2012)

Der offene Aufbau besitzt kein Deckelsubstrat, d.h. der Tropfen liegt frei auf der Oberfläche des Bodensubstrats und bildet die typische Tropfenform aus. Bei dem offenen Aufbau wird das E-Feld zwischen zwei Aktor-Elektroden aufgebaut oder zwischen einer Aktor-Elektrode und einem Draht, der parallel zum Bodensubstrat verläuft - ähnlich dem Deckelsubstrat. In jedem Fall ist dieses E-Feld inhomogen.

Die elektrische Feldstärke und somit die Aktor-Kraft F_{EWOD} ist beim Chip Typ aus Abbildung 2.18a gering im Vergleich zu den anderen Typen bei gleicher Spannung U . Tropfenmanipulationen lassen sich hier nur erschwert durchführen. Berthier (2012)

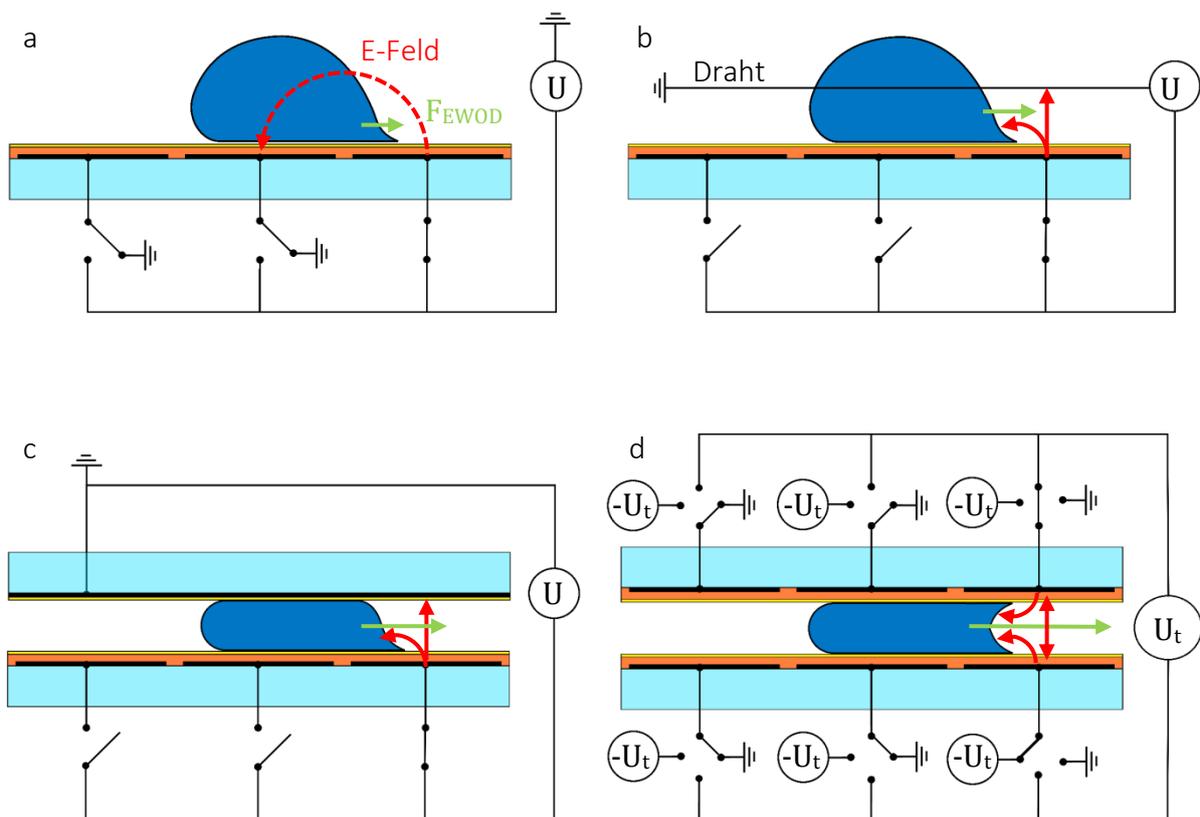


Abbildung 2.18: Vier unterschiedliche DMF-Chip Typen

a) Offener Chip ohne gegenüberliegende Gegenelektrode. Die Aktor-Kraft F_{EWOD} bei gleicher Spannung U ist dementsprechend klein. b) Offener Chip mit Draht als Gegenelektrode und größerer Kraft. c) Gedeckeltes System mit einer flächigen Gegenelektrode. d) Elektrodenmatrix auf Boden und Deckel ermöglicht auch Interferenz von E-Feldern.

Bei gleicher elektrischer Spannung (und Materialien) kann bei dem geschlossenen Aufbau ein stärkeres Feld erzeugt werden, als bei einem offenen Aufbau. Außerdem lässt sich so ein abgedichtetes Volumen erzeugen, um z.B. Kontamination der Fluide oder auch der Umgebung zu vermeiden, oder um die Verdunstung zu reduzieren. Andererseits erlaubt der offene Aufbau einen direkten Zugriff auf die Fluide und somit ein einfaches Interface zwischen DMF-Technik und etwa Pipettier-Robotern.

Der geschlossene Aufbau lässt sich beliebig komplex erweitern. Es ist z.B. möglich, sowohl Boden als auch Deckel mit einer Elektrodenmatrix aus individuell beschaltbaren Elektroden zu entwerfen. Werden drei Potentiale (U_t , $-U_t$, Erde) verwendet, so lassen sich Interferenzeffekte nutzen (vgl. Abschnitt 3.3.3). Ob dies sinnvoll oder notwendig ist, muss jedoch für jeden Anwendungsfall entschieden werden.

Der geläufigste Aufbau (s. Abbildung 2.18c und Abbildung 2.19) besteht aus einem Bodensubstrat mit einer Matrix aus Elektroden, die individuell angesteuert werden können, und einem Deckelsubstrat, das eine transparente Gegenelektrode aufweist.

2.4.2 Der geschlossene DMF-Chip

Bei einem geschlossenen Aufbau befindet sich der Tropfen in einem in guter Näherung homogenen E-Feld, induziert durch die Aktor-Elektrode im Boden und die Gegenelektrode im Deckel. Dabei kann die Gegenelektrode im Deckel sowohl den gesamten Fluidikbereich überdecken (s. Abbildung 2.18c), wodurch das Deckelsubstrat sehr einfach gehalten ist und Platz zur Integration zusätzlicher Funktionen bietet (vgl. Kapitel 5), als auch eine Matrix aus einzeln ansteuerbaren Elektroden aufweisen (s. Abbildung 2.18d).

Ein Dielektrikum isoliert die Elektroden des Bodensubstrats. Ein hydrophobes, chemisch inertes Material auf Boden- und Deckelsubstrat bildet jeweils die oberste Schicht. Boden und Deckel werden planparallel durch einen Spacer auf Abstand gehalten und dieser Zwischenraum bildet die Fluidikkammer.

Dieses System lässt sich mit verschiedenen Komponenten erweitern (s. Abschnitt 2.6). Das Material der Elektroden ist relativ frei wählbar und kann in der Regel nach den zur Verfügung stehenden Fertigungsverfahren ausgewählt werden. Auf die Herstellungsmethoden für Elektroden, Dielektrika und hydrophobe Schichten wird kurz in den Abschnitten 2.6 und 3.3 eingegangen.

Entscheidend für die Wahl der Dielektrika ist das Verständnis ihrer Eigenschaften, Bedeutung und Problematiken innerhalb eines DMF-Chips.

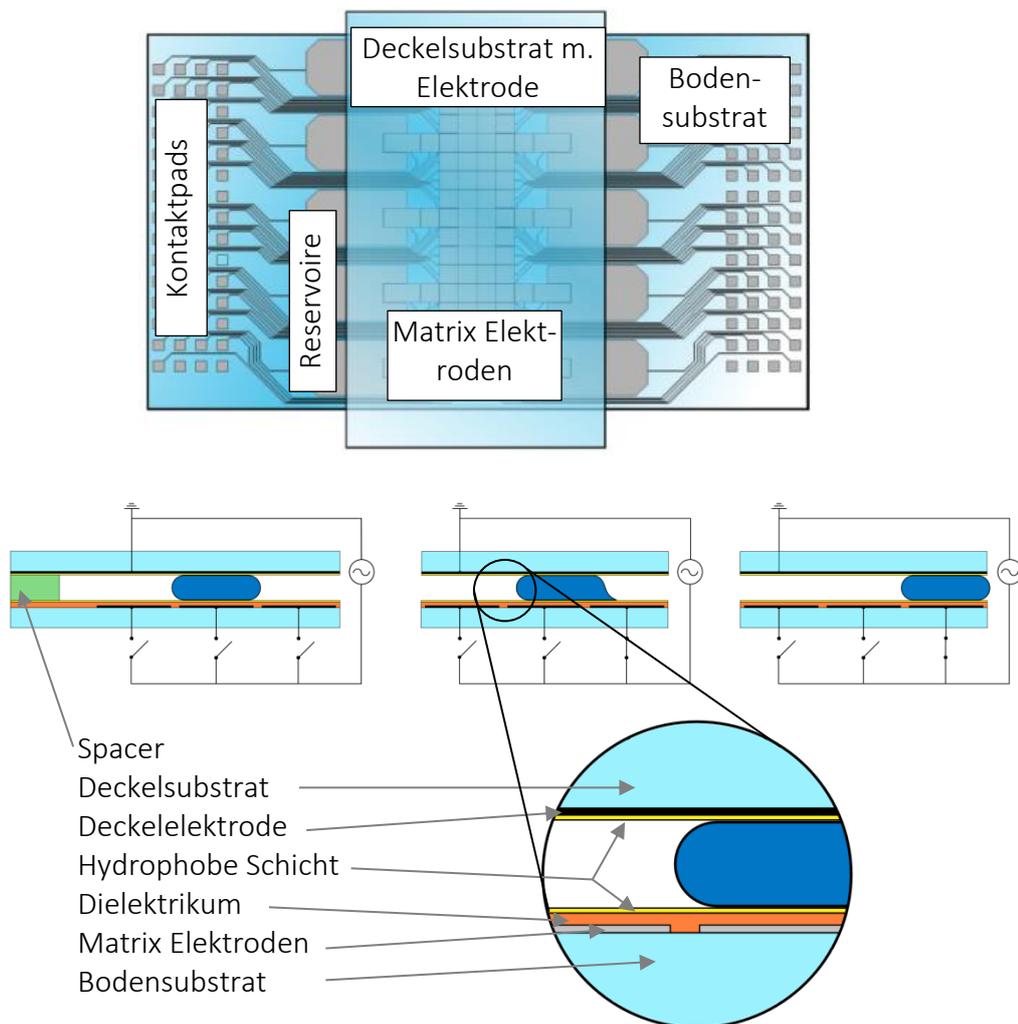


Abbildung 2.19: Schematische Aufbau eines geschlossenen DMF-Chips

Ein DMF-Chip in Draufsicht (oben, Elektrodendesign nach Jebrail et al. (2010)) und Seitenansicht (unten). Das gängigste DMF-System besteht aus einer Elektrodenmatrix (individuell mit elektrischer Spannung ansteuerbar) auf dem Boden und einer einzigen großen Deckelelektrode (Erde).

2.4.3 Dielektrische Materialien

Die wichtigste Anforderung⁵ an die dielektrische Schicht ist die absolute Pinholefreiheit. Schon der kleinste Defekt wie ein Staubpartikel zerstört die Isolierung, es kommt zur Elektrolyse, zur Zerstörung der Probe, der Elektroden und somit des gesamten Chip Experiments.

Eine dickere Beschichtung von 5-20 μm erhöht zwar deutlich die zur Tropfenbewegung benötigte elektrische Spannung, ebenso steigt aber auch die Wahrscheinlichkeit, keinerlei Pinholes zu produzieren. Größere Staubpartikel und Schäden lassen sich leicht erkennen und kleinere durch Waschprozesse zuverlässig entfernen. Partikel im Bereich von 1-2 μm stören eine

⁵ The key is no pinholes - the thicker the dielectric is, the better your chances of this. (persönliche Mitteilung von Aaron Wheeler, 22.09.2014)

5-20 μm starke Schicht kaum. Zusätzlich sollte die Schichtdicke einen gewissen Sicherheitsfaktor hinsichtlich der Durchschlagsfestigkeit aufweisen.

Bei sehr kleinen DMF-Chips bzw. Elektroden, etwa für Pikoliter Tropfen auf 20 μm Elektroden wie in Lin et al. (2012), muss unter viel strengeren Produktionsbedingungen gearbeitet werden, sodass sich Dünnschichten aus ONO ($\text{SiO}_x\text{-Si}_y\text{N}_z\text{-SiO}_x$), SiO_2 oder Si_xN_y gut integrieren lassen. Bei gängigen DMF-Chips, die für ein normales (Mikrofluidik-)Labor gedacht und leichter herzustellen sind, können 5-15 μm dicke Dielektrika wie beispielsweise Folien aus PET (Roll-to-Roll oder Laminieren), dauerhafte Beschichtungen aus SU-8 (Spincoating), wieder entfernbare Schichten aus Cyanoethyl Pullulan (Spincoating) oder stabiles, biokompatibles Parylen (CVD) verwendet werden. Chen et al. (2014), Kumarand et al. (2012), Lee et al. (2011)

Die Tabelle 2.3 gibt einen Überblick über eine kleine Auswahl an Dielektrika und einiger relevanter Eigenschaften (vgl. Abschnitte 2.3.4 und 2.4.2), die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Entscheidend sind, wie zuvor beschrieben, die (relative) Permittivität ϵ_r und die Durchschlagsfestigkeit E_{BD} . Die relative Permittivität, geht nach Gleichung 2.11 linear in die Aktor-Kraft ein. Die Durchschlagsfestigkeit geht indirekt in die Formel ein.

Es wird die Eignung Q definiert, die Durchschlagsfestigkeit und Permittivität ins Verhältnis setzt und auf das von Teflon normiert ist:

$$Q = \frac{E_{BD}}{\epsilon_r} \cdot \frac{\epsilon_{r,\text{Teflon}}}{E_{BD,\text{Teflon}}} \quad (2.22)$$

Tabelle 2.3: Auswahl dielektrischer Materialien

Zur besseren Vergleichbarkeit der Eignung Q , ist diese auf Teflon normiert. Der untere Bereich der Tabelle gibt einen Überblick über die benötigte Schichtdicke d in Abhängigkeit von U und E_{BD} .

Materialien	Teflon	Kapton	Ta ₂ O ₅	Parylen-C	CEP	ONO	SU-8	PET
ϵ_r	2,1	3,4	24	3,1	18	4,9	3,2	3,4
E_{BD} / [kV/mm]	300	200	625	185	80	850	110	300
Q	1	2,4	35,7	1,4	3,4	9,9	0,8	2,4
Spannung U V	minimale Schichtdicke d_{\min} in Abhängigkeit der angelegten Spannung nm							
15	50	75	24	81	188	18	136	50
30	100	150	48	162	375	35	273	100
60	200	300	96	324	750	71	545	200
100	333	500	160	541	1250	118	909	333
150	500	750	240	811	1875	176	1364	500
200	667	1000	320	1081	2500	235	1818	667
300	1000	1500	480	1622	3750	353	2727	1000
500	1667	2500	800	2703	6250	588	4545	1667
700	2333	3500	1120	3784	8750	824	6364	2333
1000	3333	5000	1600	5405	12500	1176	9091	3333

Wird ein mehrschichtiger (d_i) Aufbau von Dielektrika (ϵ_i) verwendet, wie es in der Regel immer der Fall ist (Berthier (2012)), da Teflon zusätzlich zum eigentlichen Dielektrikum als hydrophobe Schicht hinzukommt, kann die spezifische Kapazität des Gesamtsystems berechnet werden nach

$$c = \frac{\epsilon_0}{\sum_{i=1,n} \frac{d_i}{\epsilon_i}} \quad (2.23)$$

Gängige DMF-Chips, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, haben spezifische Kapazitäten in der Größenordnung um $c \approx 2 \cdot 10^{-5} \cdot [F \cdot m^{-2}]$. Berthier (2012)

Es ergeben sich für die Auswahl des oder der Materialien die zwei Fragen: Wie dünn muss das Dielektrikum bei seiner gegebenen Permittivität ausgelegt werden, damit bei gegebener elektrischer Spannung eine ausreichende Aktor-Kraft erzielt werden kann? Wie dick muss und kann dieses Dielektrikum entsprechend seiner Durchschlagsfestigkeit ausgelegt werden, damit seine Stabilität gewährleistet bleibt?

Die Werte für die minimal notwendige Schichtdicke des Dielektrikums d_{\min} sind nur theoretische Richtwerte, um eine Vorstellung der benötigten Größenordnung zu bekommen. Sollte ein extrem kleines DMF-System angestrebt sein, dann beschreiben Drygiannakis et al. (2009) z.B. den Zusammenhang zwischen Durchschlagsfestigkeit, Chargetrapping und Sättigungseffekt. Als praktischen Hinweis sei hier erwähnt, dass eine Verdoppelung von d_{\min} eine sichere Grundlage bildet.

Aber in der Regel ist es nicht wichtig, einen DMF-Chip im Grenzbereich eines Dielektrikums zu betreiben, um eine zuverlässige Tropfenbewegung zur ermöglichen.

2.5 Grundlegende Tropfenmanipulationen

Im Folgenden werden einfache Funktionen von Beladung eines Reservoirs, über Tropfenmischung auf der Matrix bis hin zum Räumen der Matrix in ein Abfallreservoir anhand des Chipdesigns 10R4xDMF (s. Abschnitt 3.3.1) gezeigt, das für die meisten Anwendungen und Abbildungen dieser Arbeit verwendet wurde. Diese Funktionen lassen sich mit jedem normalen DMF-Chip durchführen.

Mit Hilfe zusätzlicher Komponenten, wie z.B. einem Magneten zum Trennen von Tropfen und magnetischen Partikeln, oder Kapillaren zum automatisierten Entnahme eines fertigen Produkts, kann das System erweitert werden (s. Kapitel **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

Jede Elektrode entspricht einer eindeutigen (digitalen) Tropfenposition und einem von ihrer Fläche abhängigen definierten Tropfenvolumen (s. Abbildung 2.20a). Ein ausreichend großes Flüssigkeitsvolumen wird immer alle aktivierten Elektroden benetzen (Abbildung 2.20b Trennen).

Werden nun die Matrixelektroden in bestimmter Reihenfolge angesteuert, können die elektrostatischen Kräfte Tropfen bewegen, trennen, zusammenführen und mischen. Die Elektroden übernehmen verschiedene Aufgaben. Sie sind über Leiterbahnen mit den Kontaktpads verbunden, welche zum Einkoppeln der elektrischen Spannung dienen.

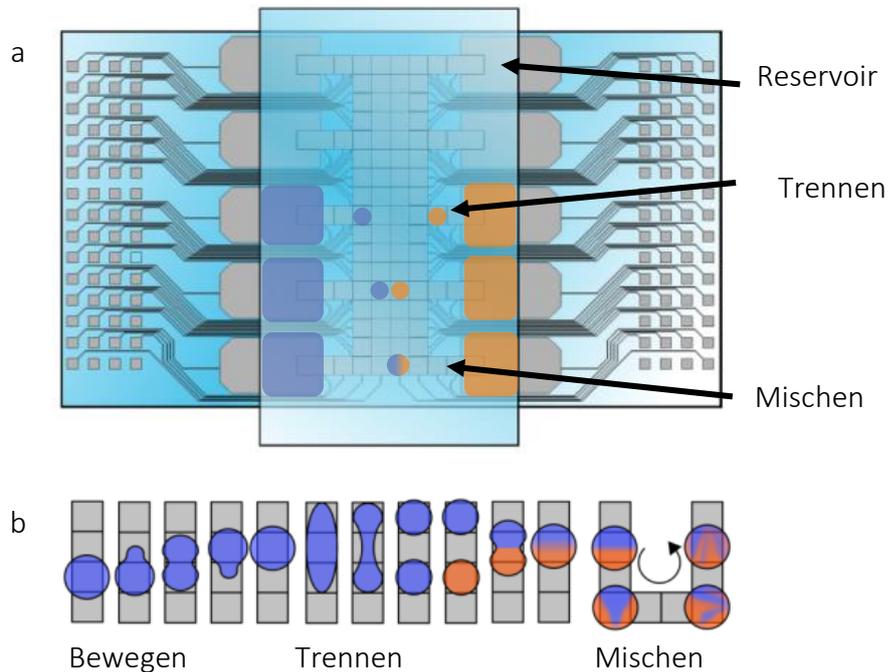


Abbildung 2.20: Basisoperationen: Bewegen, Trennen und Mischen

Verschiedene Aufgaben benötigen verschiedene Elektrodendesigns. Reservoir-elektroden sollen eine möglichst große Fluidmenge vorhalten und im Zusammenspiel mit den angrenzenden Elektroden ein präzises Dispensieren ermöglichen. Auf den Matrixelektroden lassen sich Tropfen bewegen, Trennen und Mischen.

Die Matrixelektroden bilden die Reaktionskammer, in der kleine Tropfen diskret bewegt und gemischt werden können. Die Reservoir-elektroden haben eine deutlich größere Fläche, um einen großen Tropfen vorzuhalten, von dem bei Bedarf kleinere abgetrennt werden können. Das Tropfenvolumen der für die Reaktionskammer abgetrennten Tropfen ist abhängig von der zur Trennung verwendeten Elektrodenfläche(n).

Der Tropfen wird sich der Elektrodenkontur soweit anpassen, bis sich ein Gleichgewicht zwischen der aus der Oberflächenspannung resultierenden Kraft und der Elektrobenetzungskraft eingestellt hat. Je größer der Tropfen, desto eher nimmt er die Form der unterliegenden Elektrode an (vgl. Reservoir und Matrix Tropfen in Abbildung 2.20a). Dieses Verhalten kann z.B. zu Problemen führen, wenn die Zuleitungen zu groß sind. Der Tropfen wird auch einen Teil der Fläche der Zuleitung benetzen und somit ein ungewollt größeres Volumen beim Dispensieren erhalten oder sein Schwerpunkt nach einer Bewegung an einer falschen Position zur Ruhe kommen.

2.5.1 Elektrodendesign

Wie schon in Abbildung 2.19 zu sehen ist, haben die Elektroden unterschiedliche Formen. Genau genommen besteht die Elektrode aus Kontaktpad, Zuleitung und der eigentlichen Aktor-Fläche. Die Kontaktpads spielen im Folgenden keine Rolle, da sie im Gegensatz zu den Zuleitungen und Aktor-Flächen nicht an oder im Fluidikbereich zu finden sind.

Diese Arbeit behandelt ausschließlich DMF-Chips, deren Elektroden auf einer Ebene mit den Zuleitungen und Kontaktpads liegen. Mehrschichtige Systeme mit den vorhandenen Mitteln lithografisch herzustellen wäre zu aufwendig gewesen. Alternativen wie Leiterplatten hätten nicht die notwendige Präzision erreicht.

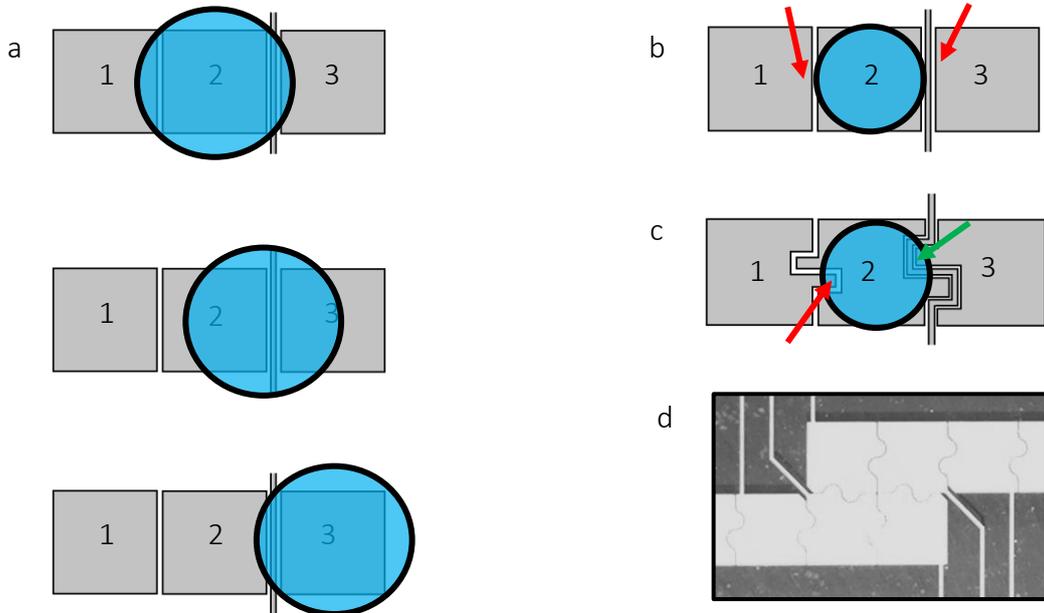


Abbildung 2.21: Tropfenbewegung über Elektrodenzwischenräume hinweg

- a) Tropfentransport zwischen den Elektroden 1, 2 und 3. b) Kleine Tropfen überlappen ggf. nicht auf die nächsten Elektroden 1 und 3. c-d) Eine Interdigitalstruktur ermöglicht auch kleinere Tropfen zu transportieren.

Befindet sich wie in Abbildung 2.21a zu sehen ein Tropfen mittig auf der Elektrode 2, wird er problemlos auf die Elektroden 1 oder 3 bewegt werden können. Ist das Tropfenvolumen jedoch zu klein oder ist der Tropfen schlecht positioniert (Abbildung 2.21b), dann befindet er sich möglicherweise nicht nahe genug an Elektrode 1 oder 3. Die Anwesenheit eines weiteren Störfaktors wie einer Zuleitung zwischen Elektrode 2 und 3 Zuleitung behindert die Tropfenbewegung noch mehr. Wird die Elektrode 3 aktiviert, so würde dieser Tropfen aufgrund der quasi nicht vorhandenen Wechselwirkung mit dem elektrischen Feld von 3 auf seiner Position 2 verharren.

Um dem Problem technisch zu begegnen, kann z.B. eine Interdigitalstruktur (s. Abbildung 2.21c und d) verwendet werden. Jetzt kann der Tropfen bewegt werden. Hierbei muss jedoch wieder beachtet werden, dass im Falle eines kleinen Verhältnisses von Oberflächenspannung und Volumen der Tropfen die Tropfenkontur eine nur schwer kalkulierbare Form annimmt.

Weitere Informationen zum Elektrodendesign können u.a. in Berthier (2012), Nikapitiya et al. (2014), Samiei et al. (2015) und Guan et al. (2016) nachgeschlagen werden.

Für ein flexibel ausgelegtes DMF-System wie im Rahmen dieser Arbeit (Elektrodengrößen von ca. 5 mm^2 und Tropfenvolumen von $0,5\text{-}5 \mu\text{l}$) genügt in der Regel ein einfaches rechteckiges

oder quadratisches Elektrodendesign. Die damit möglichen grundlegenden Tropfenmanipulationen werden im Folgenden gezeigt.

2.5.2 Beladung und Dispensen

Zum Reservoir beladen wird in Abbildung 2.22 an der Kante des Deckelsubstrats ein roter Tropfen auf der Reservoirelektrode des Bodensubstrats abgesetzt. Je nach Kontaktwinkel und Oberflächenspannung kann der Tropfen selbständig (komplett, teilweise oder gar nicht) in den Spalt fließen (s. roter und grüner Tropfen Abbildung 2.22a). Sobald die Reservoirelektrode aktiviert wird, wandert der Tropfen bei ausreichender elektrischer Spannung in den Spalt zwischen Boden und Deckel (Abbildung 2.22b und c). Ist der Tropfen vollständig im Spalt, so wird er dort unabhängig davon verweilen, ob die Elektrode aktiviert bleibt (roter Tropfen Abbildung 2.22c) oder nicht (grüner Tropfen Abbildung 2.22c). Alternativen zur (automatisierten) Beladung und Entleerung der Reservoirs stellen etwa Mikropumpen und Kapillaren dar, oder gänzlich andersartige Systeme wie in Shah et al. (2013). Dort wird ein Reservoir mit einer undefinierten Flüssigkeitsmenge gefüllt und anschließend geleert, wobei eine Elektrode eine definierte Menge im DMF-Chip zurückhält.

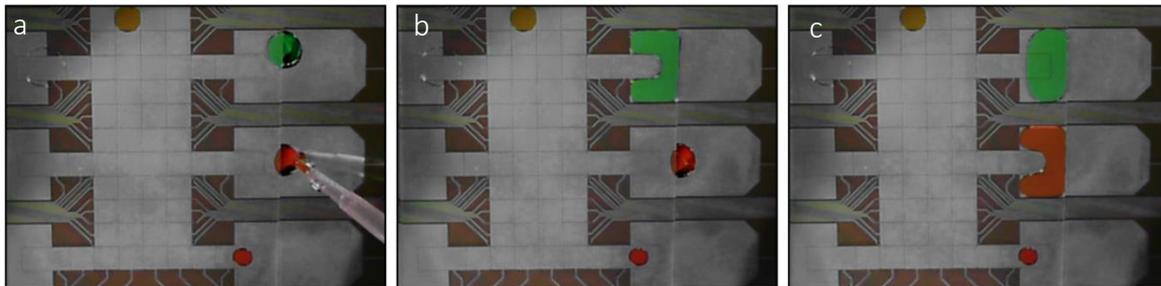


Abbildung 2.22: Befüllung der Reservoirs

a-c) Zeitliche Abfolge. Ein Tropfen wird an dem Spalt zwischen Deckel und Boden abgesetzt und durch das elektrische Feld in den Chip gezogen.

Wenn nicht die gesamte Menge aus einem Reservoir benötigt wird, was in aller Regel der Fall ist, dann muss ein definiertes Volumen aus diesem entnommen werden. Das bedeutet meist das Dispensieren, also die asymmetrische Trennung aus dem Reservoir (s. Abbildung 2.23).

Die abtrennbaren Volumina sind vereinfacht betrachtet diskret, da sie in erster Linie von der Elektrodenfläche und dem Spalt zwischen Boden und Deckel abhängen. Abweichungen entstehen etwa durch unterschiedliche Abrisspunkte oder Oberflächenspannungen der Flüssigkeiten. Dies muss bei der Entwicklung eines Protokolls, bei dem es auf absolute Präzision der Volumina ankommt, berücksichtigt werden.

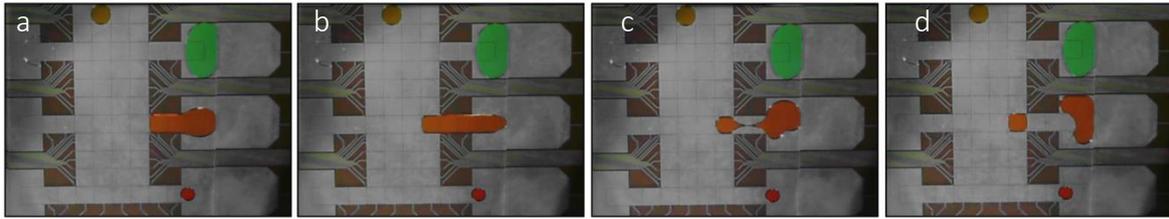


Abbildung 2.23: Dispensen aus einem Reservoir

a-c) Zeitliche Abfolge. Das Dispensen aus einem Reservoir bedeutet eine definierte asymmetrische Trennung des Fluidvolumens.

Auch hier lässt sich mit entsprechendem Aufwand mehr Präzision erreichen: Der Abrisspunkt ist besser kontrollierbar, wenn nach Banerjee et al. (2012) das elektrische Feld langsam gesenkt wird, oder nach Nikapitiya et al. (2014) ein speziell angepasstes Elektrodendesign gewählt wird.

Eine gänzlich andere elegante Alternative zum Dispensen bieten die „virtuellen“ Microwells aus Eydelnant et al. (2012) und die „echten“ Microwells (s. Abschnitt 6.1).

2.5.3 Mischen

Der nächste Schritt nach dem Dispensen verschiedener Reagenzien ist, abgesehen vom trivialen Bewegen, das Zusammenführen und das Vermischen zweier Tropfen.

Beim Zusammenführen und Mischen auf der Matrix in Abbildung 2.24 ist deutlich das Verschwimmen der Grenze zwischen Rot und Grün zu beobachten. Nach nur einem Umlauf ist ein (nahezu) vollständig durchmischter Tropfen zu sehen. Die Bilder wurden in einem zeitlichen Abstand von ca. 1 s aufgenommen. Der Prozess lässt sich jedoch nahezu beliebig schnell umsetzen, sofern die Schaltung der Elektronik (z.B. USB-Antwortzeit, Relaismechanik) und die Tropfenbeweglichkeit (siehe Abschnitt 2.5.6) eine entsprechende Geschwindigkeit zulassen.

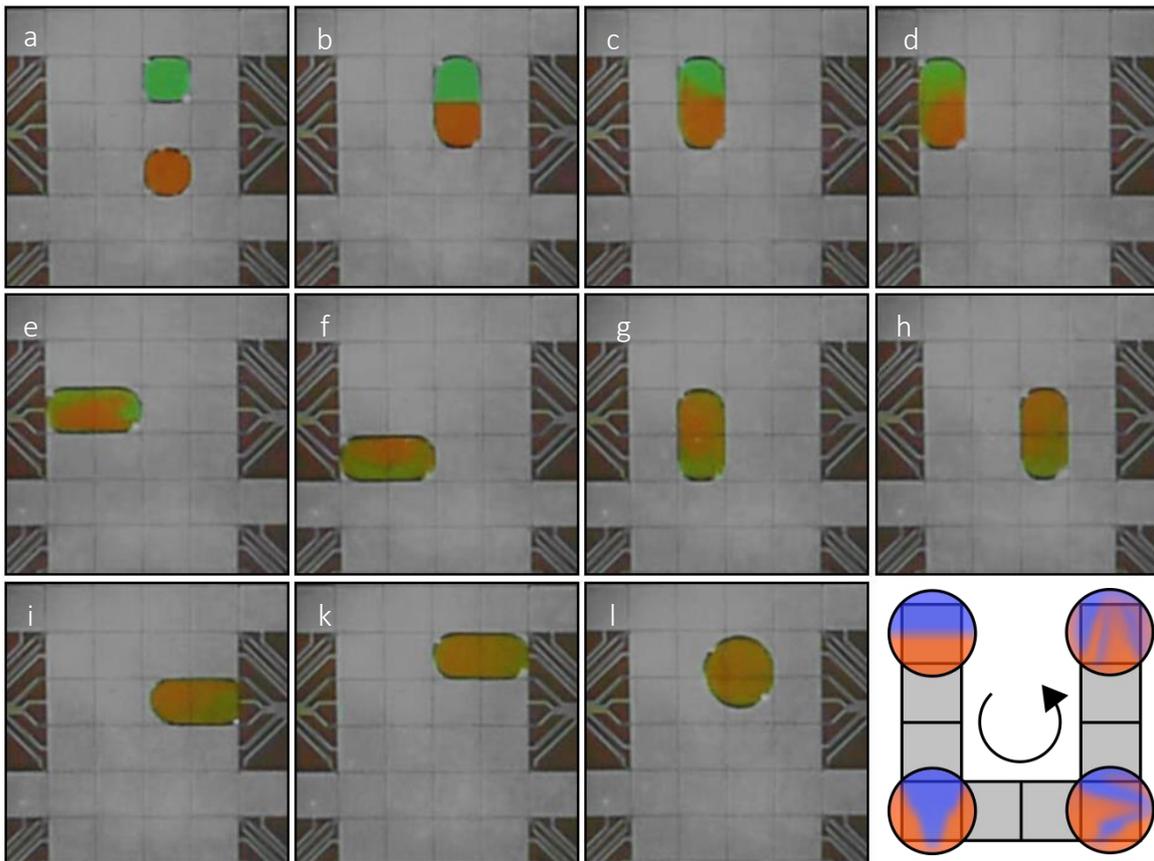


Abbildung 2.24: Mischen zweier Tropfen

a-b) Nach dem Zusammenführen reicht aufgrund der kleinen Kontaktfläche die Diffusion allein nicht zum Mischen aus. c-d) Auch eine einfache lineare Bewegung ist auch nicht immer ausreichend, vor allem, wenn diese parallel zur Kontaktlinie verläuft. e-l) Ein häufiger Wechsel der Richtung um 90 Grad ist effektiv (vgl. schematische Darstellung).

Eine andere Möglichkeit der aktiven Tropfenmischung kann z.B. nach Hong et al. (2012) über extern angeregte Resonanz, oder über einen von außen bewegten „Rührfischschwarm“ aus magnetischen Partikeln (s. Abschnitt 6.4) erreicht werden.

2.5.4 Tropfentrennung auf der Matrix

Wird nach der Durchmischung nur ein Teil für den nächsten Prozessschritt benötigt, so kann auf der Matrix ein Tropfen in bestimmten Verhältnissen aufgeteilt werden. Zur Vereinfachung sei angenommen, dass die Tropfenvolumina hier und in den folgenden Abbildungen ein ganzes Vielfaches des kleinstmöglichen noch bewegbaren Tropfenvolumens V_0 entsprechen.

Für die symmetrische Tropfentrennung (s. Abbildung 2.25) auf der Matrix im Verhältnis 1:1 wird ein Tropfen des Volumens $2 \cdot V_0$ mittig auf drei in einer Linie angeordneten Elektroden bewegt. Danach wird er über die drei Elektroden gestreckt und die mittlere Elektrode deaktiviert (Abbildung 2.25c, Hantelform mit mittigem Abrisspunkt). Je nach Flüssigkeit reicht dies noch nicht zur Trennung. Zur Unterstützung kann jeweils eine weitere Elektrode links oder rechts neben den äußeren Elektroden aktiviert werden, wodurch sich auch asymmetrisch Trennen lässt (s. Abbildung 2.26 und Abbildung 2.27). Auch eine diagonale Trennung kann sinnvoll sein, wenn es Volumen und Flüssigkeitseigenschaften erfordern.

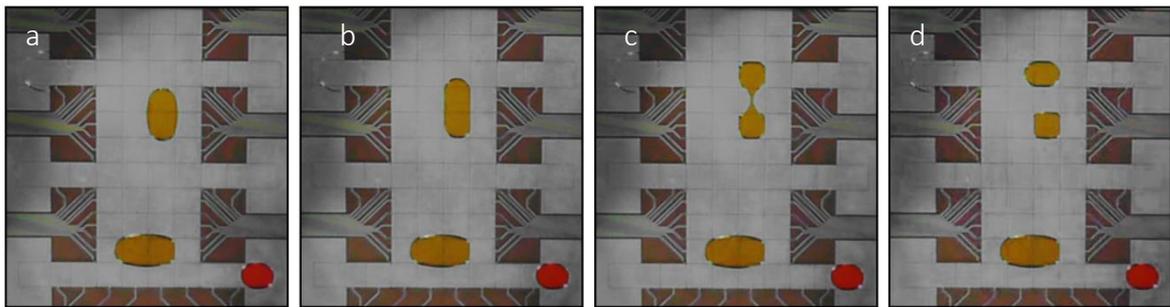


Abbildung 2.25: Symmetrische Tropfentrennung auf der Elektrodenmatrix

a-d) Zeitliche Abfolge. Der Tropfen wird über drei Elektroden gestreckt (a-c) und durch Deaktivierung der mittleren Elektrode getrennt (d).

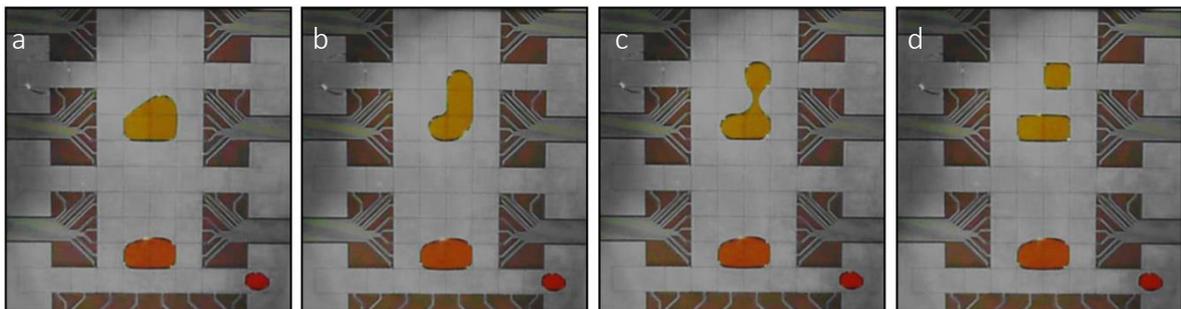


Abbildung 2.26: Asymmetrische Tropfentrennung auf der Matrix im Verhältnis 1:2

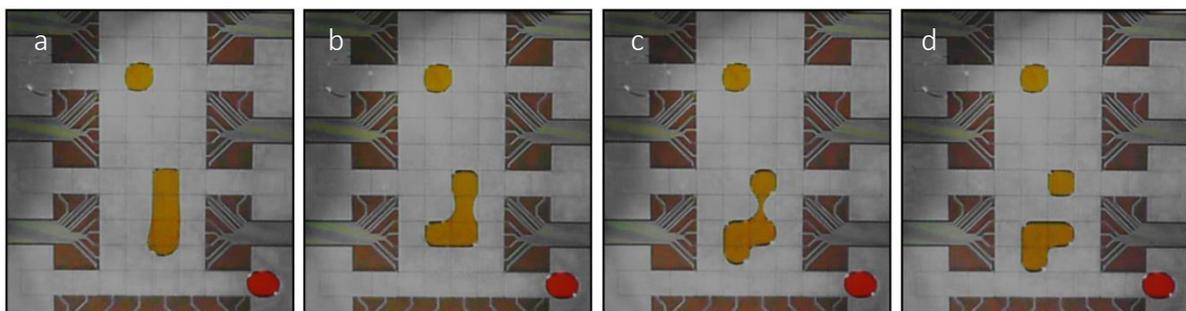


Abbildung 2.27: Asymmetrische Tropfentrennung auf der Matrix im Verhältnis 1:3

2.5.5 Ausschleusen

Der einfachste Fall der Entnahme ist die Entsorgung von einer nicht mehr benötigten Flüssigkeit. Dafür werden die Tropfen in ein Reservoir bewegt und bei Überfüllung z.B. mittels eines

Vlies abgesogen (s. Abbildung 2.28). Ebenso wie bei der Reservoirbeladung kann die Flüssigkeit auch hier unter entsprechendem Aufwand extrahiert werden (Kapillaren, Pumpen).

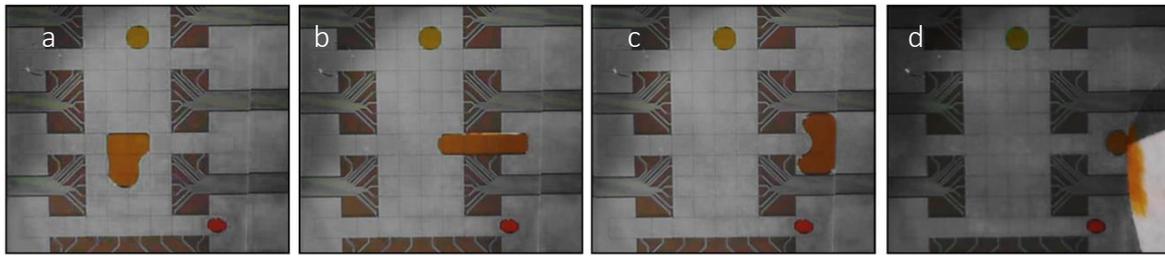


Abbildung 2.28: Ausschluss: Fluidoutput in ein Reservoir

a-c) Ein Tropfen wird in ein Reservoir bewegt. Das fertige Produkt kann nun mittels Pipette oder Kapillare entnommen werden. d) Abfallprodukte können z.B. mit einem Saugvlies aufgenommen werden.

Je nach Versuchsprotokoll verbleibt ein Zwischenprodukt (Tropfen) im Chip, oder kann als Endprodukt entnommen werden. Die einfachste Methode ist, den Chip zu öffnen und den Tropfen abzupipettieren. Dies ist nur bei nicht dauerhaft gebondeten Chips möglich.

Dauerhaft gebondete Chips sind notwendig, wenn etwa Silikonöl als zweite flüssige Phase statt Luft verwendet wird. Soll der Chip weiterverwendet werden, dann könnte das Endprodukt wieder über eine Kapillare entnommen werden. Solche Ansätze sollten wenn möglich vermieden werden, damit die Anwendung der Technologie entsprechend einfach bleibt.

2.5.6 Charakterisierung von Flüssigkeiten in DMF-Systemen

Beweglichkeit

Wie in Berthier (2012) und in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, erfüllen Tenside in Biologie und Chemie viele Funktionen. Unter anderem können sie die Emulsion etwa von Öl und Wasser in eine Lösung umwandeln, unspezifische Bindungen reduzieren (Biofouling), oder auch die Adhäsion von Flüssigkeiten an festen Oberflächen reduzieren. Besonders die letzten beiden Beispiele sind für die digitale Mikrofluidik relevant.

Beispielsweise führt eine Beimengung von Pluronic 64 in eine Lösung von Streptavidin in PBS dazu, dass der Tropfen überhaupt beweglich bleibt. Ohne das Tensid würde das Biofouling sofort dazu führen, dass die Oberfläche hydrophil wird und die Adhäsion zu PBS nicht mehr durch die Elektrobenetzungskraft F_{EWOD} überwunden werden kann.

Ein reiner Wassertropfen erreicht eine höhere Maximalgeschwindigkeit als ein mit unterschiedlichen Tensiden versetzter Tropfen bei gleicher elektrischer Feldstärke (s. Abbildung 2.29). Jedoch ist durch das Tensid die Haftung und somit die zum Start der Tropfenbewegung minimal notwendige elektrische Feldstärke geringer. Detaillierte Informationen finden sich in

Berthier (2012), der auf viele Aspekte wie Tropfenkinetik, alternative Modelle zur Beschreibung der Tropfenbewegung und auch deren Berechnung und Simulation eingeht.

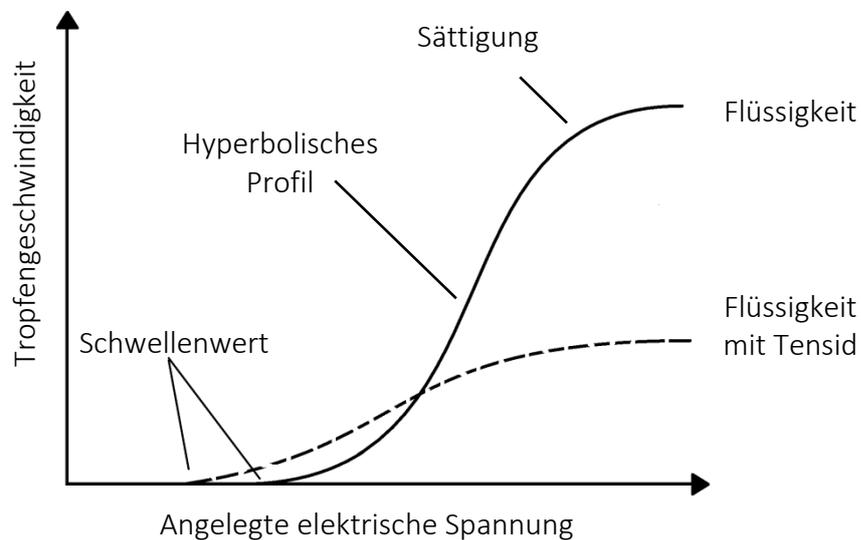


Abbildung 2.29: Tropfengeschwindigkeit in Abhängigkeit der elektrischen Spannung

Eine Flüssigkeit mit Tensid (gestrichelte Linie) und ohne Tensid (durchgezogene Linie). Der Schwellenwert für die einsetzende Tropfenbewegung ist niedriger bei Tensideinsatz, aber ebenso die maximal erreichbare Tropfengeschwindigkeit. Abbildung nach Berthier (2012)

Vergleichbarkeit

Um eine gute Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen DMF-Chips oder verschiedenen Flüssigkeiten (Optimieren der Tropfenbeweglichkeit) zu haben, ist es sinnvoll, eine Referenzmessung mit Wasser bei sonst gleichen Bedingungen (Zeit, Atmosphäre, DMF-Chip) durchzuführen.

Die Kurven in den Diagrammen der Abbildung 2.30 zeigen die Messwerte der Kapazität zwischen Boden und Deckelektrode (vgl. Abschnitt 2.3.3) in Abhängigkeit der Zeit einer einzelnen Tropfenbewegung (1. bis 50. Bewegung).

Die Endposition des Tropfens ist erreicht, wenn die Kurve $C(t)$ ihr Plateau erreicht. Die Höhe des Plateaus ist im Gegensatz zur Maximalgeschwindigkeit sehr stabil, aber der Beginn des Plateaus ist im Grunde willkürlich zu setzen, da sich die Kurve diesem asymptotisch nähert.

Die Tropfenbeweglichkeit könnte durch die Maximalgeschwindigkeit des Tropfens oder durch die Zeit, die zum Erreichen der nächsten Position notwendig ist, also seiner durchschnittlichen Geschwindigkeit, charakterisiert werden.

Die Geschwindigkeit ist die zeitliche Ableitung der Kurve $C(t)$ aus der Kapazitätsmessung über der Zeit, die Messwerte sind diskret und somit ist die Berechnung der Geschwindigkeit sensibel gegenüber Fluktuationen. Jedoch ist sie auch ein eindeutiger Wert, das (lokale) Maximum der Ableitung.

Anstatt Chips über einen empfindlichen oder nicht eindeutig festzulegenden Wert zu vergleichen, ist ein Diagramm mit der Gegenüberstellung der Bewegungskurven aus wiederholten Versuchen vorzuziehen (Abbildung 2.30 a bis c).

Abbildung 2.30a zeigt den Verlauf der Kurve von $C(t)$ einer Pufferlösung. Ein stetiger Verlauf der Kurven der Messwerte der jeweiligen Bewegung bedeutet, dass sich die Flüssigkeit gut bewegen lässt. Die relativ gleichbleibende Form und Größe der Kurven untereinander bedeutet, dass die Beweglichkeit stabil bleibt. Die Flüssigkeit ist im betrachteten Zeitraum für die DMF geeignet.

Abbildung 2.30b zeigt dieselbe Flüssigkeit, der jedoch ein Tensid (z.B. ein Polysorbat) beigemischt wurde. Ein stetiger Verlauf der Kurven der Messwerte der Bewegungen (1. bis 5.) bedeutet, dass sich die Flüssigkeit gut bewegen lässt. Die starke Abweichung in Form und Größe der späteren Kurven (25. bis 50.) bedeutet, dass die Beweglichkeit abnimmt. Das Tensid führt zu einer Verschlechterung ist in dieser Konzentration und für diese im betrachteten Zeitraum gesehen für die DMF ungeeignet.

Abbildung 2.30c zeigt die Flüssigkeit aus Abbildung 2.30a, der jetzt das andere Tensid (z.B. ein Poloxamer) beigemischt wurde. Ein stetiger Verlauf der Kurven der Messwerte der Bewegungen (1. bis 50.) bedeutet, dass sich die Flüssigkeit gut bewegen lässt. Die relativ gleichbleibende Form und Größe der Kurven untereinander bedeutet, dass die Beweglichkeit stabil bleibt. Das Tensid ist in dieser Konzentration und für diese Flüssigkeit im betrachteten Zeitraum für die DMF geeignet.

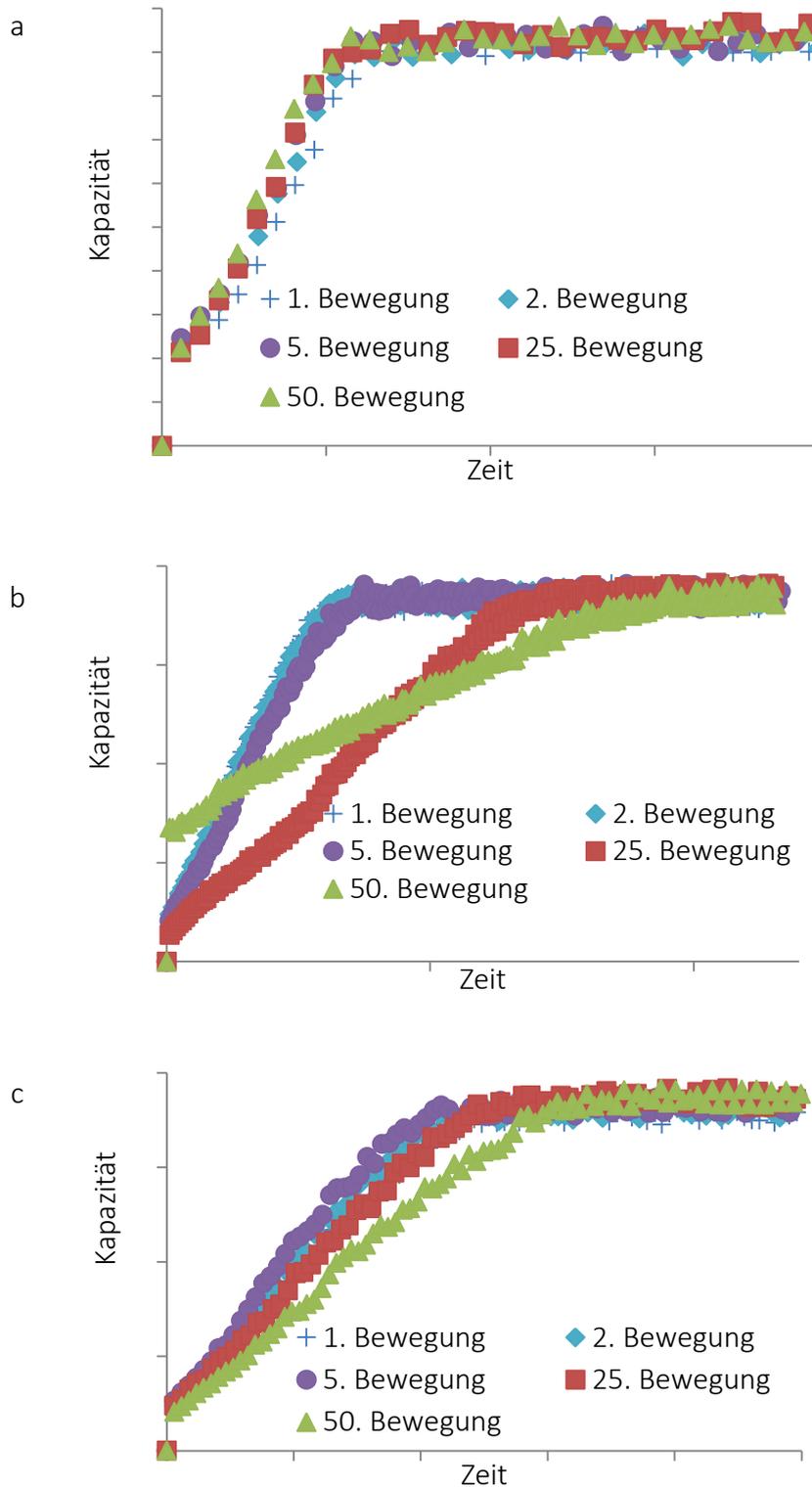


Abbildung 2.30: Auswahl des richtigen Tensids

Eine Pufferlösung (a) bewegt sich sehr schnell und zeigt keine Tendenz zum Biofouling. Wird ein Tensid benötigt ist die richtige Wahl basierend auf chemischen, biologischen und nicht zuletzt technischen Gründen entscheidend. b) Die Verminderung der Tropfenbeweglichkeit bedeutet, dass ein Tensid ungeeignet ist. c) Die konstant gute Tropfenbeweglichkeit wird durch ein geeignetes Tensid erreicht.

Bewegbarkeit verschiedener Flüssigkeiten

Wenn ein Experiment oder Protokoll für ein DMF-System entworfen wird, ist es sinnvoll zuvor zu wissen, welche Flüssigkeiten überhaupt DMF-gesiguet sind. Für Personen aus DMF-fachfremden Gebieten wie Biologie oder Chemie stellen die nachfolgenden Tabellen eine große Hilfe dar. Die Daten in Tabelle 2.4 wurden von Chatterjee et al. (2006) gemessen (^a) bzw. (*) aus Sekundärquellen zusammengetragen. Sie beinhaltet in dieser Spaltenreihenfolge die Namen der Flüssigkeiten, deren relative Permittivität, elektrische Leitfähigkeit, Oberflächenspannung, Kontaktwinkeländerung und Bewegbarkeit.

Tabelle 2.4: Bewegbarkeit verschiedener Flüssigkeiten

(+) bewegbar bzw. (-) nicht bewegbar unter „normalen“ DMF-Bedingungen (nur EWOD-Effekt). Übernommen und übersetzt aus Chatterjee et al. (2006).

Flüssigkeit	ϵ_r^a	κ^a S/m	γ^a mN/m	$\Delta\theta^a$ Grad	Bew.
Formamid	111,0	$3,5 \cdot 10^{-3}$	57	$16,1 \pm 0,4^*$	+
Wasser	80,1	$8,7 \cdot 10^{-4*}$	72	$30,0 \pm 0,0^*$	+
Ameisensäure	51,1	$7,0 \cdot 10^{-3}$	37	$26,3 \pm 2,0^*$	+
Dimethylsulfoxid	47,2	$3,0 \cdot 10^{-5}$	43	$15,3 \pm 0,3^*$	+
Dimethylformamid (DMF)	38,3	$3,2 \cdot 10^{-5}$	37	$6,9 \pm 2,0^*$	+
Acetonitril	36,6	$1,9 \cdot 10^{-5}$	29	$9,8 \pm 0,6^*$	+
Methanol	33,0	$1,7 \cdot 10^{-4*}$	22	$9,8 \pm 1,0^*$	+
Ethanol	25,3	$7,4 \cdot 10^{-5*}$	22	$10,5 \pm 0,7^*$	+
Aceton	21,0	$5,0 \cdot 10^{-7}$	23	$6,4 \pm 0,2^*$	+
Piperidin	4,3	$1,0 \cdot 10^{-5}$	29	$8,9 \pm 0,6^*$	+
1-Pentanol	15,1	$8,0 \cdot 10^{-7}$	25	$12,8 \pm 0,8^*$	+
1-Hexanol	13,0	$1,6 \cdot 10^{-5*}$	26	$14,6 \pm 0,7^*$	+
Dichlormethan	8,9	$1,0 \cdot 10^{-7}$	27	$3,7 \pm 0,6^*$	+
Dibrommethan	7,8	$2,6 \cdot 10^{-6*}$	39	$7,3 \pm 1,0^*$	+
Tetrahydrofuran	7,5	$5,0 \cdot 10^{-8*}$	26	$4,9 \pm 0,9^*$	+
m-Dichlorobenzen	5,0		35	$0,1 \pm 0,1^*$	+
Chloroform	4,8	$7,0 \cdot 10^{-8}$	27	$0,5 \pm 0,4^*$	+
65% Toluol, 35% 1-hexanol	3,7 [*]	$3,0 \cdot 10^{-8*}$	28 [*]	$6,1 \pm 3,0^*$	+
70% Toluol, 30% 1-hexanol	3,4 [*]		28 [*]	$0,3 \pm 0,3^*$	+
4-Methyl-3-heptanol	3,3		25	$0,1 \pm 0,3^*$	+
75% Toluol, 25% 1-hexanol	3,1 [*]		28 [*]	$0,0 \pm 0,2^*$	+
4.7 mM TBATFB in Toluol	2,3 [*]	$1,8 \cdot 10^{-7*}$	28 [*]	$5,6 \pm 0,6^*$	+
80% Toluol, 20% 1-hexanol	2,9 [*]		28 [*]	$0,1 \pm 0,3^*$	-
4-Methyl-4-heptanol	2,9		25	$0,2 \pm 0,2^*$	-
Toluol	2,4 [*]	$8,0 \cdot 10^{-14}$	28	$0,2 \pm 0,4^*$	-
Tetrachlormethan	2,2	$4,0 \cdot 10^{-16}$	26	$1,0 \pm 0,0^*$	-
Cyclohexan	2,0	$7,0 \cdot 10^{-16}$	25	$0,2 \pm 0,5^*$	-
Decan	1,8 [*]		23	$0,5 \pm 0,6^*$	-
p-Dichlorobenzen in Toluol	1,5 [*]				-

Hier ist bemerkenswert, dass trotz kaum vorhandener Kontaktwinkeländerung u.a. Chloroform bewegt werden kann und andere Flüssigkeiten wie Cyclohexan hingegen nicht.

Die Tabelle 2.5 aus Dubois et al. (2006) zeigt eine Liste der Bewegbarkeit ionischer Flüssigkeiten bei Raumtemperatur im Vergleich zu Wasser innerhalb eines DMF-Systems. Es handelt sich hier um ein offenes DMF-System mit Elektroden von $800 \times 800 \mu\text{m}^2$. Die Tabelle beinhaltet in dieser Spaltenreihenfolge die Namen der Flüssigkeiten, deren Oberflächenspannung, statischen Kontaktwinkel und Kontaktwinkelbereich in Abhängigkeit der minimalen und maximalen Spannung, bei der die Tropfen bewegbar waren.

Nicht nur für das spätere Experiment selbst, sondern auch für die Herstellung der DMF-Chips ist es relevant zu wissen, in welchem Bereich die notwendigen Flüssigkeiten bewegbar sind und wie dementsprechend der DMF-Chip ausgelegt werden muss (z.B. Schichtdicke des Dielektrikum und Spannungsversorgung).

Tabelle 2.5: Bewegbarkeit ionischer Flüssigkeiten
Übernommen und übersetzt aus Dubois et al. (2006).

Flüssigkeit	γ mN/m	θ_0 Grad	θ_U Grad	U_{\min} V	U_{\max} V
[tmba][NTf ₂]	34,5	77,0	30-45	18	48
[bmin][BF ₄]	46,3	94,2	40-45	22	58
[bmin][PF ₆]	43,6	94,8	30-40	26	58
[bmin][NTf ₂]	33,9	76,5	30-35	18	53
[teba][NTf ₂]	-	76,5	30-32	18	48
[emin][NTf ₂]	-	81,1	35-40	23	58
[C ₈ H ₁₉ BrN][NTf ₂]	-	85,7	30-35	27	48
[C ₇ H ₁₆ NO ₂][NTf ₂]	-	89,5	31-36	30	58
[C ₂₅ H ₅₄][OTf]	-	79,5	30-35	22	53
[C ₆ H ₁₆ NO][NTf ₂]	-	89,1	30-35	28	58
[C ₉ H ₁₇ NO ₂][NTf ₂]	37,4	85,1	28-30	21	63
[C ₁₀ H ₂₀ NO ₃][NTf ₂]	39,4	86,6	33-40	22	58
destilliertes Wasser	72,5	110,0	85-90	40	63
NH ₄ HCO ₃ 25 mM + 0,05% Tween 20	65,7	98,0	50-55	23	65
NH ₄ HCO ₃ 25 mM + 1% Tween 20	38,0	81,0	-	20	-

2.6 Herstellungsmethoden für DMF-Chips

Das Bodensubstrat eines normalen DMF-Chips besteht in der Regel aus vier Komponenten: Leitstützstruktur, Elektroden, Dielektrikum und hydrophobe Beschichtung. Im Prinzip kommen die Flüssigkeiten im Chip nur mit der obersten, der hydrophoben Beschichtung in Kontakt, weswegen für alles andere eine relativ flexible Materialauswahl getroffen werden kann. Alle Materialien und Herstellungsprozesse müssen natürlich miteinander kompatibel sein.

Ein Stoff kann aus der Gas- oder Plasmaphase z.B. über CVD, Sputtern und Elektronenstrahlverdampfung abgeschieden, als Flüssigkeit durch (Inkjet-)Druck, Spincoating, Dipcoating und Spraycoating aufgetragen, oder als Feststoff geklebt und laminiert werden. Mittels Spincoating werden etwa Polymere sowohl als Resist für die Lithografie temporär aufgetragen, als auch dauerhaft als Dielektrikum verwendet.

Ein stabiles, elektrisch isolierendes Substrat bildet die Leitstützstruktur. Hier eignet sich Glas in besonderer Weise. Es ist chemisch inert, biokompatibel, durchsichtig und kann mit einer glatten Oberfläche hergestellt werden. Alternativ können auch diverse Kunststoffe oder Siliziumwafer geeignet sein, wenn es die Herstellung oder die sonstigen Randbedingungen wie z.B. Kosten oder physikalische Eigenschaften verlangen.

In erster Linie ist das Substrat aber nur der mechanische Träger für die elektrisch leitende Schicht, aus der die Elektrodenstrukturen erzeugt werden, und muss lediglich für alle folgenden Prozessschritte geeignet sein. Wird die Elektrodenstruktur lithografisch hergestellt, dann muss das Substrat stabil gegenüber allen Lösemitteln der Waschschritte und Säuren der Ätzprozesse sein.

Materialien

Gängige Elektrodenmaterialien sind Gold, Chrom, Silber, ITO oder Kupfer. Diese müssen auf das Basissubstrat aufgebracht werden. Für Goldelektroden auf Glas wird in der Regel Haftvermittler (z.B. Chrom) benötigt, aber es könnten dann auch direkt Chromelektroden verwendet werden. Sputtern, CVD und Elektronenstrahlverdampfer sind Techniken zum Erzeugen dünner Schichten (wenige Nanometer bis mehrere Mikrometer) aus diesen Materialien.

Diese Techniken wurden in dieser Arbeit nicht verwendet. Für die per Lithografieprozess strukturierten Elektroden wurden zwar in der Regel Chrom-beschichtete Glaswafer verwendet, welche von einer externen Quelle bezogen wurden.

Inkjetdruck und Papier-Chips

Eine interessante Entwicklung, die in den letzten Jahren zunehmend beliebter wurde, ist Papier-basierte (digitale) Mikrofluidik. Dabei wird die Elektrodenstruktur per Inkjetdruck erzeugt (s. Abschnitt 6.1). Dazu muss die leitfähige Tinte (z.B. durch Zusatz von Silberpartikeln) auf dem Material haften und ein gutes Druckbild erzeugen können. Papier als Material ist kostengünstig, hat aber nur eine geringe mechanische Stabilität verglichen mit Glas oder Kunststoff. Diesem Nachteil kann z.B. durch späteres Aufkleben auf ein festes Substrat begegnet werden.

Leiterplatten

Die größte Chance zur günstigen, individuellen Massenfertigung bietet die Leiterplattenindustrie. Hier lassen sich auch mehrlagige Leiterbahnen und somit große Felder von Aktor-Elektroden realisieren. Ein Problem stellt jedoch die kostengünstige Produktion von entsprechend feinstrukturierten Elektroden dar.

Für eine gute Tropfensteuerung sollten die Zwischenräume der Elektroden etwa $30\mu\text{m}$ bis höchstens $50\mu\text{m}$ breit sein. Das ist technisch an sich kein Problem, da mit Lithografie gearbeitet werden kann. Jedoch handelt es sich dabei immer noch um Spezialanfertigungen, die nicht den gängigen Strukturgrößen der Massenfertigung der Leiterplattentechnik entsprechen, welche eher bei $100\mu\text{m}$ liegen. Somit bleibt abzuwarten, ob sich in diesem Bereich in Zukunft kommerzielle Zulieferer positionieren können oder wollen.

Laser

Das direkte Schreiben mit Lasern ist für ein Einzelstück die schnellste Methode, aber bereits der zweite oder dritte Chip würde den Zeitvorteil verlieren. Anstatt die Elektrodenstruktur des Chips direkt per Laser zu schreiben, kann ebenso eine Maske für die Lithografie geschrieben werden. Kommerziell verfügbare Drucktechniken zur Maskenherstellung enden bei Strukturgrößen um $10\mu\text{m}$, einfach zugängliche Druckerlösungen enden bei Strukturgrößen von etwa $50\mu\text{m}$.

Lithografie

Die am weitesten verbreitete Technik zur Herstellung der Elektrodenstruktur von DMF-Chips, bleibt immer noch die Lithografie, einem der Standardherstellungsprozesse der Mikrosystemtechnik. Lithografie weist eine hohe Präzision und Reproduzierbarkeit auf. Strukturgrößen bis in den einstelligen Mikrometerbereich sind problemlos möglich. Mit Elektronenstrahlschreibern lassen sich auch Strukturen im Nanometerbereich realisieren, die jedoch für die digitale Mikrofluidik nicht von Relevanz sind.

Die Herstellungstechniken sollen hier nicht näher erläutert werden, aber es finden sich alle notwendigen Parameter zur Reproduktion der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Prozesse (s. z.B. Abschnitte 3.3, 4.1, 5.2). Für Details zu den Grundlagen der verwendeten Herstellungstechniken sei auf entsprechende Fachliteratur wie z.B. Mohr et al. (2005) verwiesen.



Abbildung 2.31: Skalierbarkeit verschiedener Herstellungsschritte eines DMF-Chips

Während die Belichtung bei der lithografischen Herstellung und das abschließende Vereinzeln mit einzelnen Wafern erfolgen müssen, können die übrigen Schritte im Batchbetrieb erfolgen.

2.7 Stand der DMF-Technik und Ansatzpunkte zur Weiterentwicklung

Die Digitale Mikrofluidik bietet zunächst einmal nur Fluidhandling innerhalb eines Lab-on-Chip-Systems. Um die Möglichkeiten dieses „Mini-Labors“ zu erweitern, werden im Folgenden vorhandene Methoden zum Handling einer festen Phase im Reaktionssystem, zum Elektroden-unabhängigen Dispensieren, zur Erweiterung zu einem DMF- μ TAS System und der Anwendungen im Bereich der synthetischen Biologie vorgestellt.

2.7.1 Magnetische Partikel

Protokolle aus Chemie- und Biologiellaboren verwenden neben Pipetten und Mikroreaktionsgefäßen auch magnetische Partikel (Beads), welche sich aus den verwendeten Flüssigkeiten mittels Magnetfeld ausfällen lassen (Long et al. (2009)). Auf deren Oberfläche können sich Bestandteile der Lösungen anlagern, um diese aus einer Flüssigkeit zu extrahieren und in eine andere zu übertragen, oder um auf der Partikeloberfläche selbst eine Reaktion zu initiieren.

Auch innerhalb eines DMF-Chips lassen sich für Reaktionen an festen Oberflächen magnetische Partikel verwenden, die anschließend mittels Magnetfeld (F_B) aus einem Tropfen ausgefällt und auf dem Boden fixiert werden, während der Tropfen mittels des elektrischen Feldes (F_{EWOD}) wegbewegt wird (s. Abbildung 2.32). Anschließend können die Partikel von einem weiteren Tropfen aufgesammelt und resuspendiert werden. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, nicht nur flüssige, sondern auch feste Phasen in dem DMF-System zu steuern und das lediglich unter Zuhilfenahme eines einfachen Permanentmagneten.

Bisher wurden entweder Magnete oder eine längliche magnetische Linse nach Choi et al. (2013) zur Magnetfeldverstärkung verwendet und an einer festen Position unter einem DMF-Chip positioniert.

DMF-Chips sind sehr flexibel in der Steuerung von Flüssigkeiten. Das sollte in ähnlicher Weise auch auf die Steuerung von magnetischen Partikeln übertragen werden. Daher wird in Abschnitt 6.4 ein neues System zur Steuerung magnetischer Partikel in DMF-Chips vorgestellt.

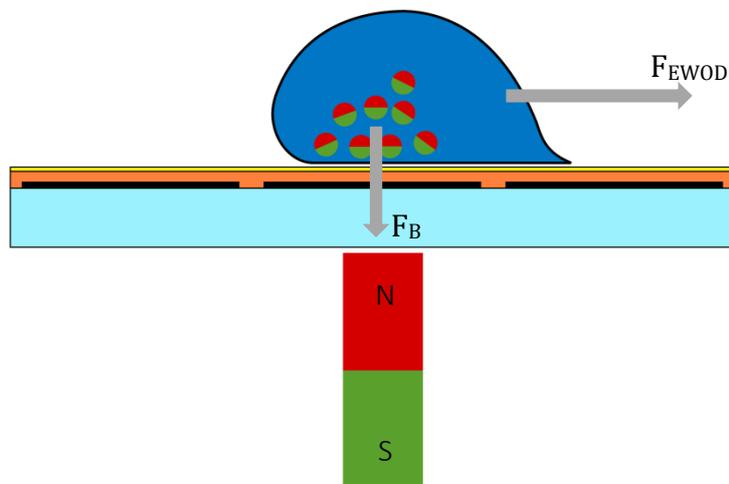


Abbildung 2.32: Magnet und DMF-Chip trennen magnetisierbare Partikel und Tropfen

2.7.2 Passives Dispensieren: (Virtuelle) Wells

Eine Alternative zu den Partikeln als Reaktionsfläche sind speziell beschichtete Flächen („Spots“) auf der ansonsten hydrophoben Chipoberfläche (s. Abbildung 2.33). Auf diesen lässt sich wie auf den Partikeln Oberflächenchemie betreiben. Ng et al. (2015a)

Diese Spots sind im Gegensatz zu den Partikeln unbeweglich. Dafür bietet sich aber ihr Einsatz als „virtuelle“ Microwells nach Eydelnant et al. (2012) an. Dies sind Löcher in der hydrophoben Schicht, deren Grundfläche etwa die Größenordnung der Elektroden besitzt. Wird ein Tropfen an diesen Spot herangeführt, wird er diesen umgehend benetzen.

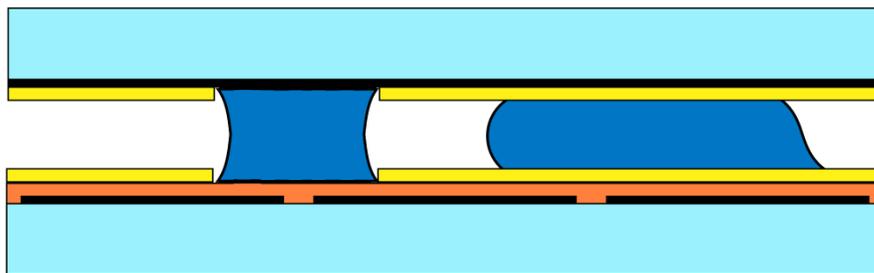


Abbildung 2.33: Prinzip des hydrophilen Spots als „virtuelles“ Microwell

Löcher in der hydrophoben Schicht (gelb) bilden hydrophile Spots. Die elektrostatischen Kräfte des DMF-Systems reichen nicht aus, um die Flüssigkeit aus dem hydrophilen Spot zu ziehen. Jedoch kann das überschüssige Volumen abgetrennt werden. Damit ergibt sich eine Methode zur Dosierung unabhängig der Elektrodengröße.

Auch wenn das Microwell nicht von Flüssigkeit befreit werden kann, von Verdunstung einmal abgesehen, so kann diese sehr wohl ausgetauscht werden. Angenommen ein weiterer, mindestens gleichgroßer Tropfen wird von der einen Seite zu dem auf dem Spot festgesetzten ersten Tropfen geführt. Die Tropfen werden sich zu einem größeren verbinden. Jetzt wird auf der anderen Seite eine Elektrode aktiviert.

Der Tropfen wird sich insgesamt Richtung der aktivierten Elektrode bewegen, weil es energetisch keinen Unterschied macht, ob nun die ursprüngliche Flüssigkeit des ersten oder zweiten Tropfens den Spot benetzt, wohl aber, ob die Elektrode benetzt ist. Wird versucht, den Tropfen weiter zu bewegen, wird ein Teil des Volumens abreißen und weiterwandern (ursprüngliche Flüssigkeit auf dem hydrophilen Spot), wohingegen der andere Teil (der später hinzugefügte Tropfen) auf dem hydrophilen Spot verbleibt. Das Fluid über dem Spot wurde somit ausgetauscht. Barbulovic-Nad et al. (2010), Eydelnant et al. (2012), Witters et al. (2013)

Eine andere Form von „echten“ Microwells wird in von der Ecken et al. (2017) vorgeschlagen (Kapitel 5 und Abschnitt 6.1). Die Spots sind nicht mehr hydrophile Bereiche auf der Oberfläche, sondern zylindrische Löcher gleicher Grundfläche innerhalb des Substrats mit einer Tiefe der Größenordnung von 5-20 μm .

In Kapitel 5 und Abschnitt 6.1 werden die „echten“ Microwells und ihre Vorteile gegenüber den „virtuellen“ Microwells beschrieben: Die Flüssigkeit kann vollständig entfernt werden; die Oberflächenbeschichtung ist durchgängig und ermöglicht so z.B. eine gänzlich inerte, biokompatible Oberfläche.

2.7.3 Sensorik

Falls einfache Laboraufgaben im Submikroliterbereich auf einem DMF-Chip durchzuführen sind, bietet eine Mikroskopkamera die einfachste Möglichkeit die Tropfen innerhalb des DMF-Systems optisch zu verfolgen.

Eine indirekte Methode ist durch die Messung der elektrischen Kapazität zwischen Boden- und Deckelektrode gegeben. Ein Tropfen erhöht die Kapazität um bis zu mehreren Größenordnungen im Vergleich zu Luft. Damit lassen sich die Tropfenpositionen bestimmen und deren Volumen und Bewegung überwachen. Integrierte Sensoren bieten weitaus mehr Möglichkeiten.

Werden zusätzlich frei liegende und mit den Tropfen in elektrischem Kontakt stehende Elektroden in den Chip integriert, so lassen sich direkt elektrische Leitfähigkeit, Ströme und Spannungen messen. Dryden et al. (2013) verwendet diese zur Voltametrie.

Ceyssens et al. (2013) und Choi et al. (2015) benutzten optische Fasern innerhalb der DMF-Reaktionskammer für Transmissions- oder spektroskopische Messungen. Während hier lediglich einzelne Polymer- oder Glasfasern in das freie Volumen der Reaktionskammer gelegt werden, ist die Integration eines Dünnschichtfotodetektors deutlich komplizierter. Luan et al. (2012)

Wird wie in diesem Fall der DMF-Chip oder Teile des selbigen modifiziert bzw. der Sensor direkt auf diesen hergestellt, so findet dies in der Regel auf dem Deckelsubstrat statt. Dessen grundlegender Aufbau ist im Vergleich zum Bodensubstrat weitaus einfacher und dadurch auch die Integration weiterer Komponenten. So verwenden auch Arce et al. (2012) in das Deckelsubstrat integrierte siliziumbasierte nanophotonische Mikroringresonatoren für Labelfreie Detektion von Biomolekülen.

Während die beiden letzten Beispiele Anschlüsse bzw. Punkte zum Ein- und Auskoppeln der Lichtsignale benötigen, wurde in dieser Arbeit ein Multisensor-Chip entwickelt, der Whispering Gallery Mode Mikrokelch Laser (WGMML) und digitale Mikrofluidik vereint. In Kapitel 5 wird beschrieben, wie das neue System eine markerfreie Detektion von Biomolekülen bei gleichzeitig deutlich vereinfachter Integration der Sensoren ermöglicht, welche darüber hinaus keinen physischen Kontakt zum externen Analysesystem benötigen. Die WGMML werden von außerhalb des DMF-Chips angeregt werden und ihr emittiertes Licht wiederum außerhalb detektiert. (s. Abbildung 2.34) von der Ecken et al. (2017)

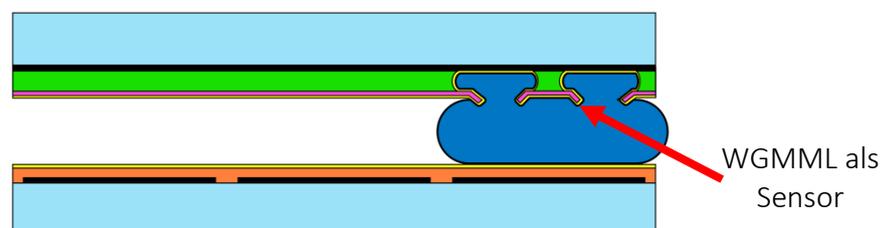


Abbildung 2.34: Integration von Sensoren in einen DMF-Chip

Im Deckelsubstrat sind Whispering Gallery Mode Mikrokelch Laser (WGMML) als Sensoren integriert. Die WGMML können kleinste Molekülkonzentrationen messen und die DMF bewegt kleinste Flüssigkeitsmengen.

2.7.4 Stand der Technik

Die digitale Mikrofluidik (DMF) bietet einen attraktiven Ansatz für rekonfigurierbare Lab-on-Chip-Systeme, die mittels elektrostatischer Kräfte einzelne Tropfen unabhängig voneinander auf einem Feld von Elektroden steuern. Neben den grundlegenden Manipulationen wie Bewegen, Trennen/Dosieren, Zusammenführen und Mischen, sind chemische und physikalische Analysen in-situ von entscheidender Bedeutung für die Durchführung kontrollierter Reaktionen in solchen Systemen. Abdelgawad et al. (2008), Fair (2007), Ng et al. (2012)

Hierzu können integrierte mikrooptische Bauelemente verwendet werden, um großzahlige Felder aus hochempfindlichen Sensoren zu erzeugen, die individuell angesprochen eine parallele Detektion einer Vielzahl von Analyten ermöglichen. Obgleich in den letzten Jahren Fortschritte im Bereich der mikrooptischen Biosensoren zu verzeichnen waren, existieren nur wenige Beispiele, in denen diese auch in DMF-Systeme integriert wurden. Cooper (2002), Estevez et al. (2012), Sun et al. (2012)

In-situ spektroskopische Analyse in DMF-Systemen wurde basierend auf konventionellen Lichtquellen und Spektrometern demonstriert, wobei dedizierte optische Fasern das Licht in das Messsystem und das Fluid über physischen Kontakt ein- und auskoppeln. Choi et al. (2015)

Wenn für Absorptionsmessungen der Lichteinfall parallel zur Tropfenebene verläuft, erhöht sich die Weglänge beträchtlich und erhöht somit die Sensitivität im Vergleich zur konventionellen senkrechten Lichteinkopplung. Srinivasan et al. (2004), Wijethunga et al. (2011)

Spektroskopische Messmethoden benötigen jedoch immer noch eine Markierung der Zielmoleküle und sind daher eingeschränkt bei der Detektion einzelner Analyten im zu testenden Tropfen. Ähnliche Beschränkungen bringen Versuche mit miniaturisierten optischen Bauelementen wie lichtemittierenden Dioden (LED) oder Fotodetektoren in direkter Umgebung einer DMF-Zelle mit sich, die zu Absorptions- bzw. Chemolumineszenzmessungen verwendet wurden. Luan et al. (2012), Shamsi et al. (2016), Srinivasan et al. (2004)

Die Möglichkeit einer markerfreien in-situ Detektion in DMF-Systemen wurde mit Plasmon-Polarisation (SPR) Sensoren auf dem Deckelsubstrat eines DMF-Systems demonstriert, aber auch dieser Ansatz ist auf die Detektion eines Analyten pro DMF-Zelle beschränkt. Malic et al. (2010)

Einen alternativen Ansatz stellt die Integration von Mikroresonatoren in DMF-Systeme dar. Diese mikroskopischen Resonatoren benötigen nur eine sehr kleine Grundfläche und es lassen sich großzahlige Sensorarrays in Bereich eines einzelnen Elektrodenfeldes unterbringen, die somit eine simultane Detektion multipler Analyten in einem einzelnen Tropfen ermöglichen. Bisher wurden nur Resonator-basierte Sensoren in DMF-Systemen mit maximal zwölf Elementen demonstriert und diese konnten lediglich zur Messung von Brechungsindizes verwendet werden. Arce et al. (2012), Luan et al. (2012), Royal et al. (2013)

Eine markerfreie Detektion von Biomolekülen mittels Mikroresonatoren in DMF-Systemen wurde noch nicht erreicht. Außerdem basierten frühere Experimente auf durch Wellenleiter gekoppelten passiven Elementen, die mit Wellenlängen im Infrarotbereich arbeiten, was die Sensitivität in Wasser nachteilig beeinflusst. Zhu et al. (2008)

2.7.5 Anwendungsmöglichkeiten der DMF

Ein wichtiger Prozess in der synthetischen Biologie ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, „polymerase chain reaction“), die zur in-vitro Vervielfältigung von Erbsubstanz benötigt wird. Dabei wird das Fluid, das die Erbsubstanz und die Reaktanten enthält, iterativ erwärmt und gekühlt. Im Unterschied zu einem kugelförmigen Tropfen oder einem vollen Mikroreaktionsgefäß, ist das Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis eines flachen Tropfens im DMF-Chip signifikant größer. Damit kann dieser deutlich effizienter und schneller erwärmt und gekühlt werden.

Diesen Vorteil der DMF gegenüber normaler Mikrofluidik bzw. einem normalen Labor für eine PCR machten sich Chang et al. (2006) zu Nutze. Verfeinert wurde diese Arbeit von Sista et al. (2008), die eine 40-Zyklus Echtzeit-PCR in 12 min realisieren konnten, der normalerweise 1 h oder länger dauert. Sie integrierten Heiz- und Kühlzonen in ihr DMF-System. Hua et al. (2010) entwickelten daraus eine Plattform zur automatisierten PCR und parallelen Probendetektion.

Weitere Arbeiten im Themenfeld der DNA und DMF beschreiben die Durchführung einer parallelen „ultra-micro DNA ligation“ auf einem DMF-Chip. Liu et al. (2008) zeigen hingegen ein Proof of Concept einer DNA-Sequenzierung in Pikolitertropfen. Yehezkel et al. (2016) verwendeten eine kommerziell erhältliche und zur DNA-Sequenzierung entwickelte DMF-Plattform⁶, um diese zur Zell-freien Klonierung von DNA-Bibliotheken zu zweckentfremden.

Bisher wurde jedoch kein mikrofluidisches System zur on-Demand Konstruktion von TALEN (Briggs et al. (2012), Cermak et al. (2011) oder CRISPR/Cas (Jinek et al. (2012)) verwendet, welches als Grundlage für ein späteres integriertes, automatisiertes Gesamtsystem zum DNA-Editing (s. Abbildung 2.35) dienen könnte.

In Kapitel 3.3.6 wird ein DMF-Chip und ein System (s. Abschnitt 6.4) zur Kontrolle von magnetischen Partikeln verwendet. Basierend auf einem Protokoll nach Briggs et al. (2012) wurde damit erstmals die Bindedomäne eines TALEN auf einem DMF-System mikrofluidisch hergestellt und somit eine Möglichkeit zur Automatisierung bei gleichzeitig reduziertem Probenvolumen präsentiert.

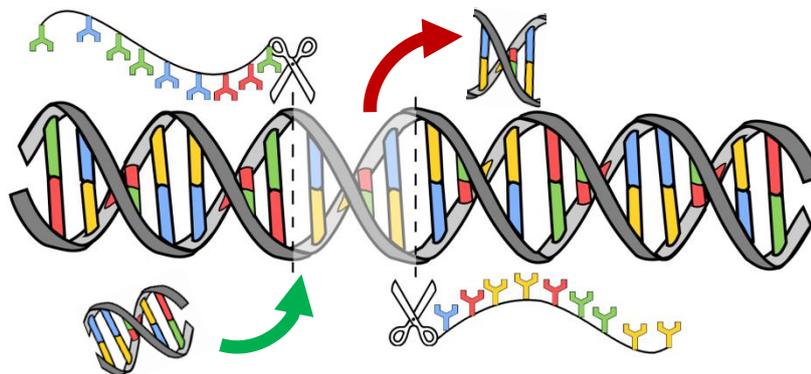


Abbildung 2.35: TALEN zur Editierung eines DNA-Strangs

Das „Zielsuchsystem“ TALE mit Nuklease bindet spezifisch an und schneidet die DNA, um z.B. die Integration eines künstlichen DNA-Stücks zu ermöglichen. (Basierend auf gemeinfreiem Werk, public domain)

⁶ NeoPrep Library Prep System <http://www.illumina.com/systems/neoprep-library-system.html> Dezember 2016

3 Entwicklung von Versuchsstand und DMF-Chips basierend auf dem Stand der Technik

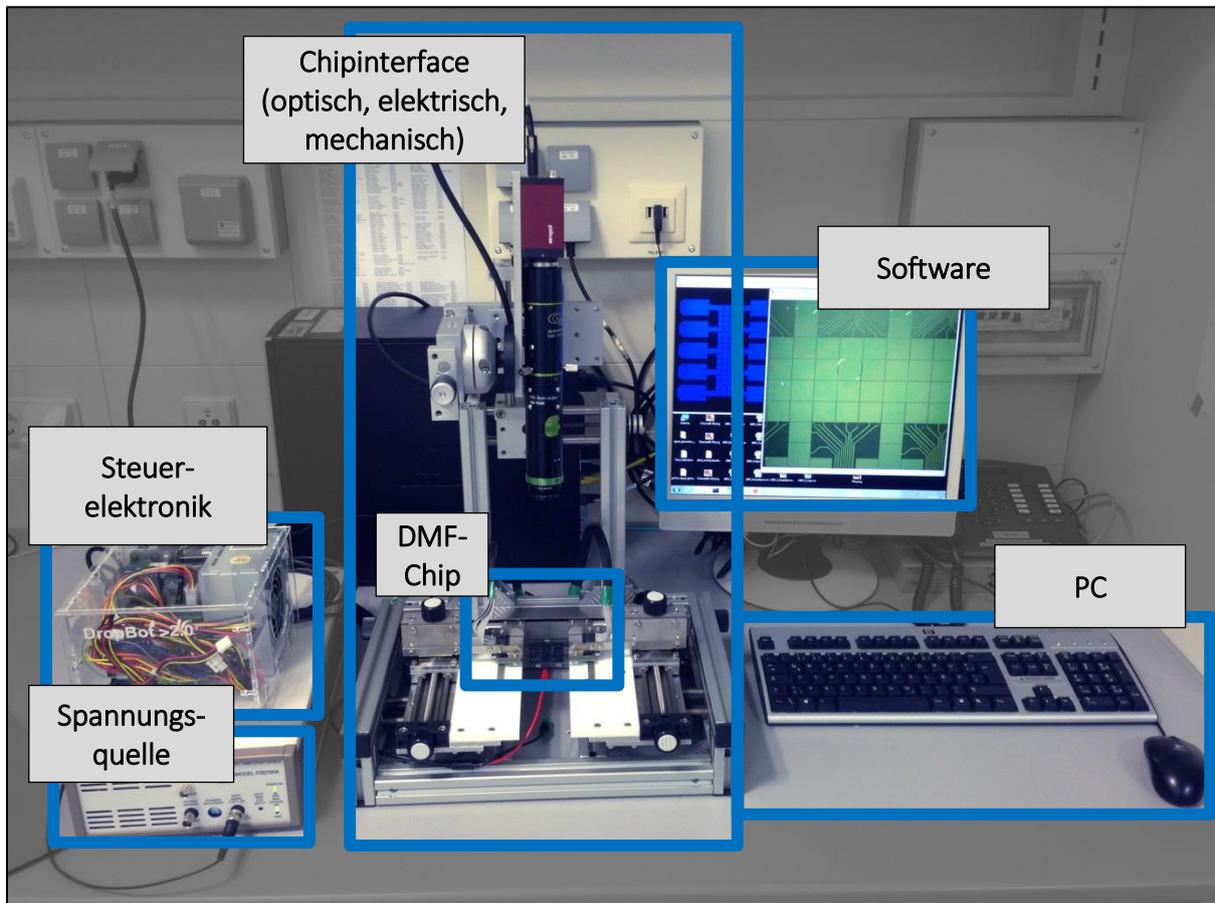


Abbildung 3.1: Übersicht des Versuchsstands

Der realisierte DMF-Versuchsstand besteht aus drei Hauptgruppen: 1. Chipinterface, 2. Steuerelektronik, Spannungsquelle, PC und Software, 3. DMF-Chip

Der in dieser Arbeit verwendete Versuchsstand besteht im Wesentlichen aus den folgenden Komponenten: DMF-Chip, Chipinterface, Steuerelektronik und Spannungsquelle, PC und Software. Die verschiedenen Komponenten des Versuchsstands aus Abbildung 3.1 wurden zum Teil neu entwickelt, auf bestehender Technologie aufgebaut oder aus freien Quellen übernommen.

Jedes an Mikrofluidik interessierte Labor kann prinzipiell digitale Mikrofluidik einsetzen. Der Vorteil gegenüber Kanalmikrofluidik ist die diskrete und direkte Kontrolle der Flüssigkeiten. Mit kaufbaren DMF-Chips könnte eine Forschungsgruppe sehr leicht in die DMF-Technik einsteigen, weil sie sich nur um Experimentdesign und nicht mehr über Herstellung von Hardware Gedanken machen müsste.

DMF sollte als ein Tool gesehen werden, wie eine Pipette, aber mit der Möglichkeit, auch im Nano- oder sogar Pikoliterbereich, Flüssigkeiten zu dosieren und manipulieren. DMF-Technik erfreute sich in den letzten zehn Jahren steigender Beliebtheit, hat aber, bis auf wenige Ausnahmen, nicht den Sprung vom Testobjekt zur breiten Anwendung geschafft.

Auch sind bisher keine kommerziellen Anbieter bekannt, die solche einfachen und kostengünstigen DMF-Chips anbieten. Zur erwähnen wäre lediglich die Firma Illumina, die mit Neo-Prep⁷ ein kommerzielles, für Labore konzipiertes, integriertes DMF-System anbieten, das einen sehr spezialisierten und daher nicht für allgemeine Anwendungen geeigneten DMF-Chip beinhaltet. Außerdem liegen diese integrierten Chips in einem Preisbereich zwischen 400€ und 900€. Riegel (2015)

Für erste orientierende Versuche ist kein komplexes, automatisiertes Relaissystem zur Ansteuerung der Elektrodenmatrix notwendig; dieses könnte aber leicht in Form des Open Source Projektes „DropBot“ (Fobel et al. (2013)) beschafft werden.

3.1 Chipinterface

Das Chipinterface vereint ein Testbett zur elektrischen und mechanischen Kontaktierung, eine Kamera als optische Schnittstelle und Vorrichtungen zur Positionierung der Komponenten und des DMF-Chips.

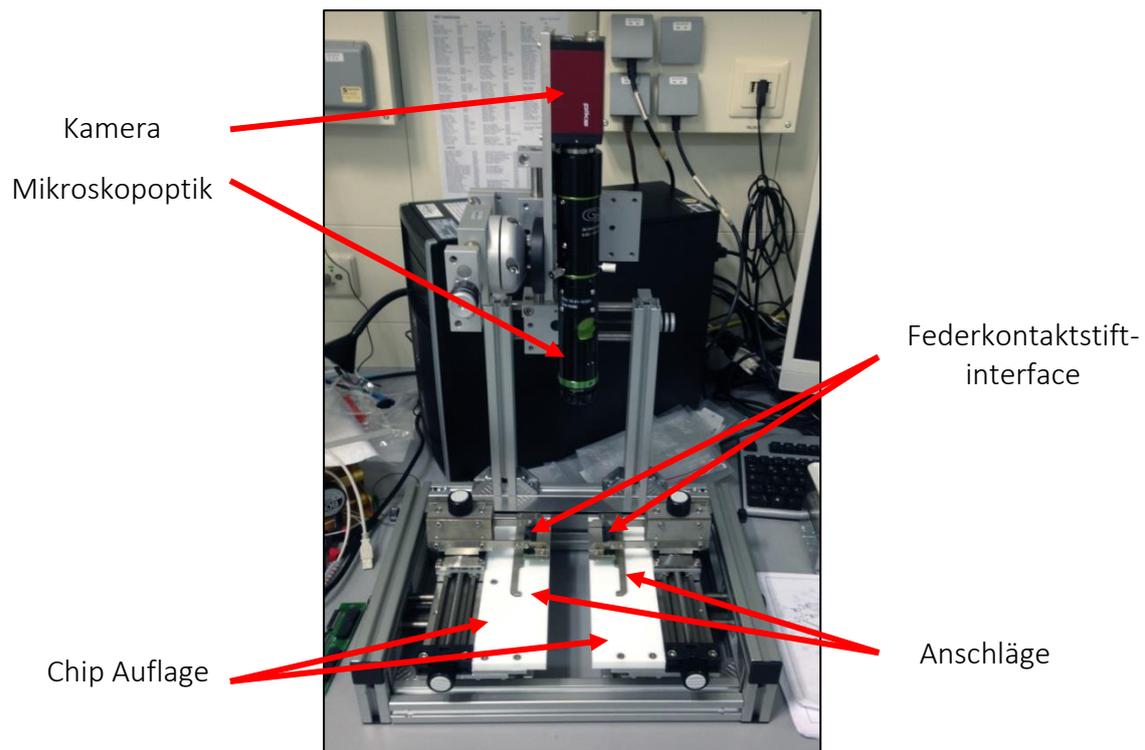


Abbildung 3.2: Chipinterface

Das Chipinterface, bestehend aus Mikroskopkamera mit XYZ-Traverse, verstellbarem mechanischen Klemminterface zur Positionierung, Fixierung und elektrischen Kontaktierung der DMF-Chips, aufgebaut aus flexibel erweiterbaren Aluminiumprofilen.

⁷ <http://www.illumina.com/systems/neoprep-library-system.html> November 2016

Das Interface wurde so konstruiert, dass es verschiedene Chipgrößen und Formen von Objektträgergröße bis hin zu 6 Zoll Wafern aufnehmen kann (s. Abbildung 3.2). Die weißen Flächen sind in der Ebene verstellbare Auflagen aus Teflon für die DMF-Chips. Zwei Metallkammern bieten eindeutige Anschläge für die Platzierung der Chips. Links und rechts sitzen zwei Halterungen für Leiterplatten mit je 60 Federkontaktstiften zur elektrischen Kontaktierung der Kontaktpads. Doll (2015)

Der Aufbau ist modular, sodass auch neue Komponenten integriert werden können (z.B. die Steuerung einer magnetischen Linse in Abschnitt 6.4).

3.2 Steuerelektronik, Spannungsquelle, PC und Software

Die Steuerelektronik dient zur Ansteuerung und Spannungsversorgung der Elektroden des DMF-Chips. Um die Elektroden flexibel und parallel zu beschalten, muss die Elektronik entsprechend viele Kanäle bieten (32 für einfache und >100 für komplexere DMF-Chips). Zunächst wurde die einfache, aber robuste IMT DMF Box gebaut.

3.2.1 IMT DMF Box

Die Peripherie der IMT DMF Box besteht aus einem Funktionsgenerator, einem optionalen Oszilloskop und einem leistungsstärkeren Hochspannungsverstärker, als dem in der Box untergebrachten Verstärker (Falco Systems WMA-02 für Spannungen bis $\pm 175\text{V}$). Verbaut in der Box darüber hinaus ist ein Relaisystem (vier Achtfach-Relaiskarten ausgelegt für 230VAC), das über eine PC-Software gesteuert 32 einzelnen Kanäle verwalten kann. Segadlo (2015)

Das mechanische und elektrische Interface zwischen DMF-Chip und Steuerelektronik ist ein Leiterplattensockel (engl. „card edge connector“), der den DMF-Chip kontaktiert und mechanisch arretiert, wodurch er schnell und leicht zu wechseln ist. Jedoch benötigt dieser Anschluss typ DMF-Chips mit außen liegenden, einreihigen Kontaktpads (vgl. Abschnitt 3.3.1), das bei großer Elektrodenzahl unweigerlich zu Platzproblemen führen wird. Für eine größere Elektrodenanzahl wurde der DropBot (Fobel et al. (2013)) eingesetzt. (s. Abbildung 3.3)

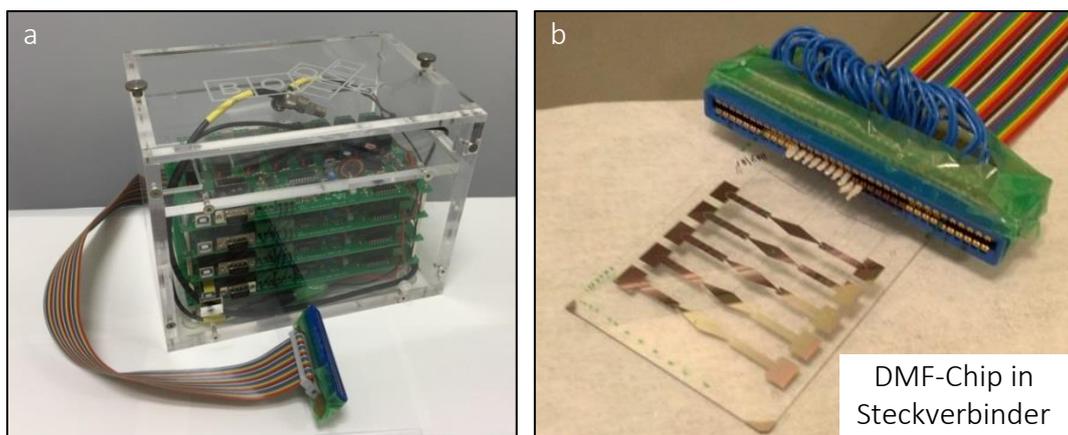


Abbildung 3.3: 32-Kanal Steuerelektronik mit kompaktem Chipinterface

a) Die IMT DMF Box ist aufgebaut aus vier kostengünstigen Relaiskarten mit je acht (mechanischen) Relais. b) Ein Leiterplattensockel dient als Interface.

3.2.2 DropBot

Der „DropBot“ bis Version 2.0 (Abbildung 3.4b) und die Software „MicroDrop“ (Abbildung 3.1) bis zur Version 1.0 (Fobel et al. (2013)) stehen als Open Source zur Verfügung, ebenso wie die CAD-Dateien für ein z.B. per 3D-Druck herstellbares Chip-Interface (Abbildung 3.4b).

Der Arduino-basierte DropBot besitzt in seiner Standardausführung 120 individuell über die Software MicroDrop ansteuerbare Kanäle. Die Elektronik ist auf maximal 300V ausgelegt. Als Feedback dient die Messung der Kapazität zwischen Erde (in der Regel die Deckelektrode) und der jeweils angesteuerten Bodenelektrode der Chips. Damit lassen sich Tropfenbewegungen verfolgen. Mit der Einbindung einer zu MicroDrop kompatiblen Webcam ist eine direkte Kontrolle der Tropfenbewegungen per Mausklick möglich. Diese können als Protokollläufe aufgezeichnet und später automatisch ausgeführt werden. Doll (2015)

Weitere Details zu DropBot, MicroDrop und Open Source Hardware für die (digitale) Mikrofluidik können etwa Fobel et al. (2013), den Webseiten der Wheeler Microfluidic Laboratories⁸ oder denen der Gaudi Labs⁹ entnommen werden.

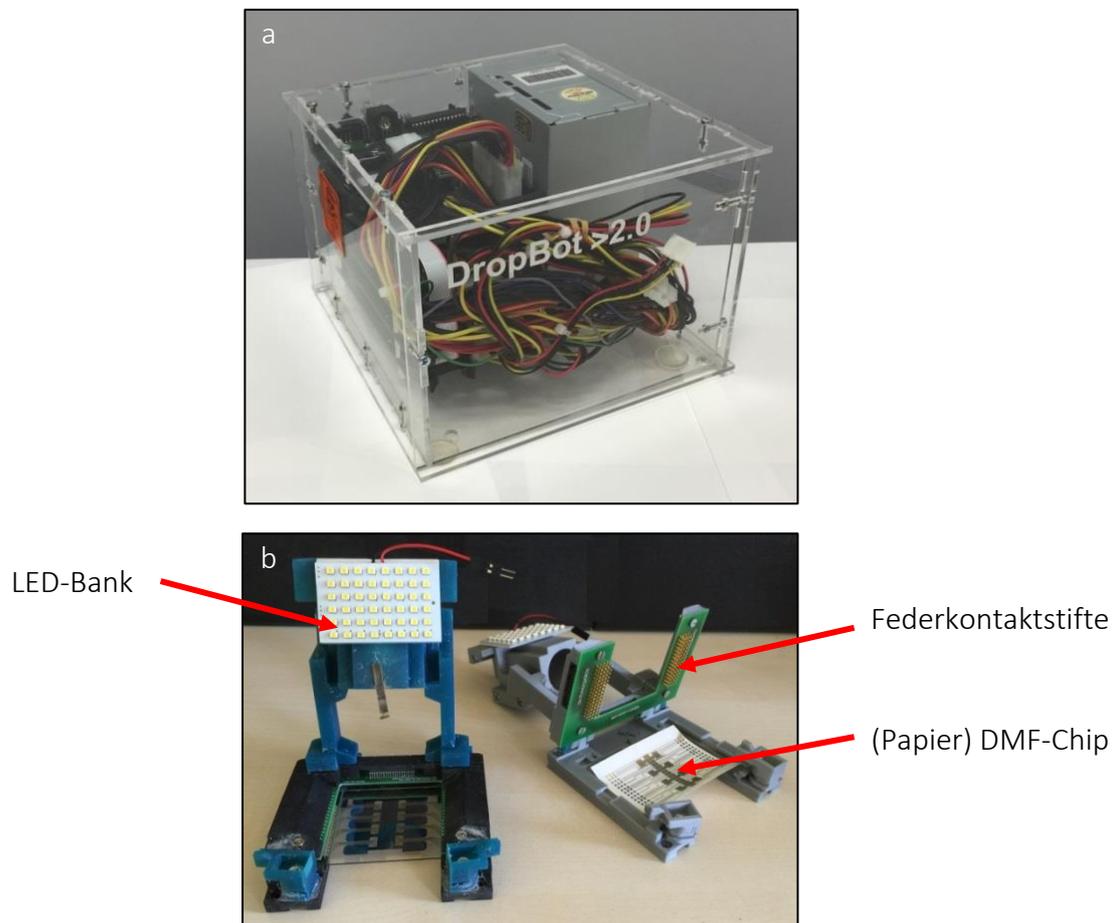


Abbildung 3.4: DropBot und kompaktes Chipinterface

a) DropBot und b) kompaktes, über Federkontaktstifte elektrisch kontaktierendes Chip-Interface nach Fobel et al. (2013), links geschlossen, rechts geöffnet.

⁸ November 2016 DropBot kommerziell <http://www.sci-bots.com/> und DropBot Open Source <http://microfluidics.utoronto.ca/trac/dropbot/wiki/BuildInstructions>

⁹ November 2016: OpenDrop http://www.gaudi.ch/GaudiLabs/?page_id=392

3.3 Entwicklung der DMF-Chips

Ein DMF-Chip besteht in der Regel aus einem Bodensubstrat, das die Elektrodenmatrix beinhaltet und einem Deckelsubstrat, das nur eine große (durchsichtige) Gegenelektrode besitzt (s. Abschnitt 2.4).

Das Bodensubstrat des Chips besteht aus mindestens vier Schichten: Basissubstrat aus z.B. Glas für die mechanische Stabilität, Elektrodenstruktur z.B. aus Chrom für die elektrischen Felder zu Tropfensteuerung, dielektrische Schicht (z.B. Parylen) zur Isolierung und Teflon als hydrophobe, chemisch inerte und biokompatible oberste Schicht.

Das Deckelsubstrat ist in der Regel ein mit ITO und Teflon beschichtetes Glas. ITO-Glas ist ein Standardprodukt und lässt sich auch mit hydrophoben Schichten (Teflon) leicht in großen Stückzahlen herstellen. Aufgrund des einfachen Aufbaus des Deckels, wird dieser in der Regel für Modifikationen am Chip verwendet, z.B. zur Integration von Sensoren (s. Kapitel 5) oder hydrophiler Spots (s. Abschnitt 6.1). Hingegen wird das aufwendig produzierte Bodensubstrat oft in seiner Standardform belassen.

Das Material für Basissubstrat, Elektroden und Dielektrikum ist relativ flexibel wählbar und lässt sich somit an eigene Herstellungsprozesse anpassen. Das Erzeugen einer Chromschicht kann ebenso als Volumenprozess gefahren werden, wie das Aufbringen von Dielektrikum oder hydrophober Schicht (CVD, Dipcoating, Spraycoating, Sputtern etc.).

Die Elektrodenstrukturierung stellt sowohl den Flaschenhals in der Prozessfolge als auch den größten Kostenfaktor dar. Bei einer IMT-internen Kostenanalyse wurde geschätzt, dass in einem Reinraum mit entsprechender Ausstattung (Spincoater, Hotplate, Lithografie System, Personal, Chemikalien) und unter der Berücksichtigung der DMF-Chip spezifischen Materialkosten und Lithografiemaske, die Kosten für einen Chip bei 500 Euro liegen, bzw. in Kleinstserie produziert jeder weitere Chip bei 200 Euro kostet. Riegel (2015)

Kleinstserie bedeutet hier, dass eine Anzahl von 5-10 DMF-Chips den normalen Arbeitsablauf im Reinraum nicht unterbricht, Personal und Gerätschaften nicht langfristig bindet und nur irrelevante Mengen der vorhandenen Chemikalien (z.B. Resistlack) verwendet werden. Die Eigenversorgung mit DMF-Chips ist somit gut möglich, wenngleich auch nicht kosteneffizient. Größere Produktionsmengen, wie etwa für den Verkauf oder die Versorgung von anderen Instituten, sollten nicht auf Lithografie aufbauen.

Standardisiert hergestellte DMF-Chips als Produkt wären derzeit eindeutig für die Forschung gedacht, aber mit der Vision, dass dadurch mehr Forschung und somit der Sprung der DMF-Technologie in die Industrie ermöglicht wird, das wiederum z.B. neuartige Point-of-Care-Testing-Systeme ermöglichen könnte.

Sehr vielversprechend sind Versuche, DMF-Chips in Roll-to-Roll-Prozessen herzustellen oder zumindest die Elektrodenstruktur mit Drucktechnik herzustellen. Die Drucktechnik bietet die technische Möglichkeit zur Lösung des Herstellungsproblems und somit eine kostengünstige einfache Versorgung von Forschungsgruppen weltweit mit DMF-Chips und schlussendlich die Verbreitung der DMF-Technik. Die prinzipielle Machbarkeit wurde in Cooney et al. (2006), Fobel et al. (2014) und Dixon et al. (2016) gezeigt. Entsprechende Versuche fanden auch im Rahmen dieser Arbeit statt.

Die Herstellung der meisten der folgenden Elektrodenstrukturen wurde hier mittels Lithografie realisiert, da das nötige Knowhow sowie die Technik am IMT zur Verfügung standen.

3.3.1 Auswahl der Methode zur Elektrodenstrukturierung

Wird sich mit der Entwicklung der digitalen Mikrofluidik im Zeitraum über die letzten zehn Jahre auseinander gesetzt und das Design der DMF-Chips verschiedener Gruppen weltweit verglichen, so ist oft eine Ähnlichkeit zum Design der DMF-Chips aus Jebrail et al. (2010) zu sehen. Das hat einen ganz einfachen Grund: Für ein Experiment werden in der Regel immer mehrere Fluidreservoirire und eine Misch- und Operationsmatrix aus Elektroden benötigt (vgl. 10R4xDMF in Abbildung 3.9). Das Bewegen, Trennen, Mischen, Reagieren, Separieren etc. findet auf einer Art zentralen Schachbrettmuster statt, dessen Elektroden elektrisch kontaktiert werden müssen. Daher ergibt sich meist ein auf den ersten Blick gleich aussehendes Design.

Im Folgenden werden verschiedene Ansätze zur Elektrodenherstellung mittels Drucktechnik, Laser-Strukturierung und Lithografie beschrieben. Schlussendlich fiel die Wahl auf die Lithografie. Damit lassen sich, mit im Vergleich zwar langen Iterationszyklen vom Maskendesign bis zum fertigen DMF-Chip, dafür aber mit hoher Präzision, Strukturen auch im einstelligen Mikrometerbereich erzeugen.

Drucken

Die Anforderungen an die Herstellung sind im Besonderen die minimalen Strukturgrößen. So sollten Zwischenräume zwischen den Elektroden für DMF-Chip Layouts wie dem 10R4xDMF (ausgelegt auf 0,5-2 μ l Tropfen) in Abbildung 3.9 etwa 20 μ m erreichen, oder weniger, wenn die DMF-Chips herunterskaliert werden sollen. An dieser Stelle stößt die Drucktechnik an ihre Grenzen und es ist noch erhebliche Entwicklungsarbeit zu leisten, bevor eine Produktion von Strukturen unter 50-80 μ m möglich erzielt werden kann.

DMF-Chips könnten im großen Maßstab als Rolle-zu-Rolle Druckprozess hergestellt werden. Das Basissubstrat liegt als Meterware vor, darauf folgt das Drucken der Elektrodenstruktur, anschließend ein Tauchbad, ein Rollbeschichter, ein Sprühbeschichter oder eine laminierte Folie als dielektrische Schicht und abschließend ein Tauchbad oder Sprühbeschichter für die hydrophobe Schicht. Danach folgt die Vereinzelung.

Alternativ könnte auch direkt nach dem Druck vereinzelt werden und ein Dielektrikum per CVD-Verfahren beschichtet werden. Solange es sich wie beim CVD um einen Volumenprozess handelt und nicht um einen schlechter skalierbaren, seriellen Prozess wie Spincoating, lässt sich auch ein hoher Durchsatz effizient erreichen.

Die erfolgreichen Versuche mit der Drucktechnik werden in Abschnitt 6.1 besprochen. Die Vorteile sind die Skalierbarkeit, ebenso wie die Möglichkeit zum Rapid-Prototyping. Die Laserstrukturierung bietet eine interessante Alternative im Rapid-Prototyping-Bereich.

Laser-Strukturierung

Um eine ITO-Schicht zu strukturieren, bieten sich zwei Möglichkeiten an. Die Strukturen lassen sich lithografisch (Resistlack, Belichtung, Ätzen) oder das direkte Abtragen mit einem Laser erzeugen. Die lithografische Methode rentiert sich erst ab einer gewissen Stückzahl, für Einzelstücke und Versuchsreihen mit wechselnden Designs eignen sich Rapid-Prototyping-Methoden wie die Laser-Ablation weit mehr.

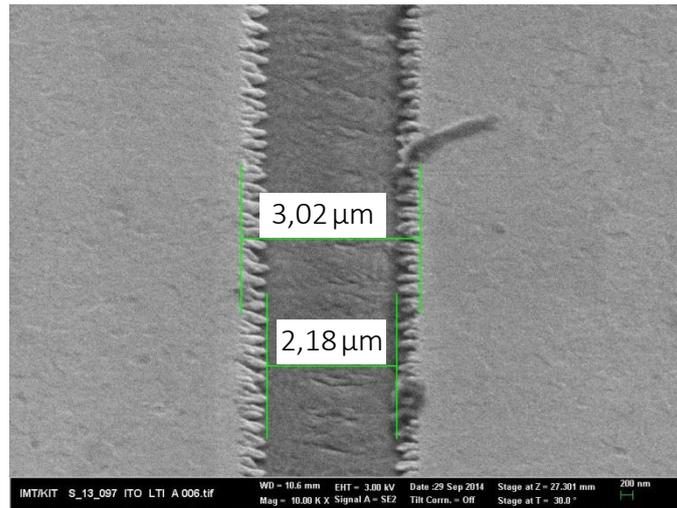


Abbildung 3.5: Laser-Ablation mit Femtosekunden-Laser

Die hellgrauen Bereiche links und rechts sind eine 150 nm dünne Schicht aus ITO auf einem Glassubstrat, dem dunkelgrauer Bereich in der Mitte. Es ließen sich Gräben von ca. 3 μm Breite herstellen, wobei eine zahnförmige Struktur zu erkennen ist. Der tatsächlich von ITO befreite Bereich ist etwa 2 μm breit. Die Parameter: Energiedichte 0,3 J/cm², Wellenlänge 550 nm, Pulsüberlappung 86 %.

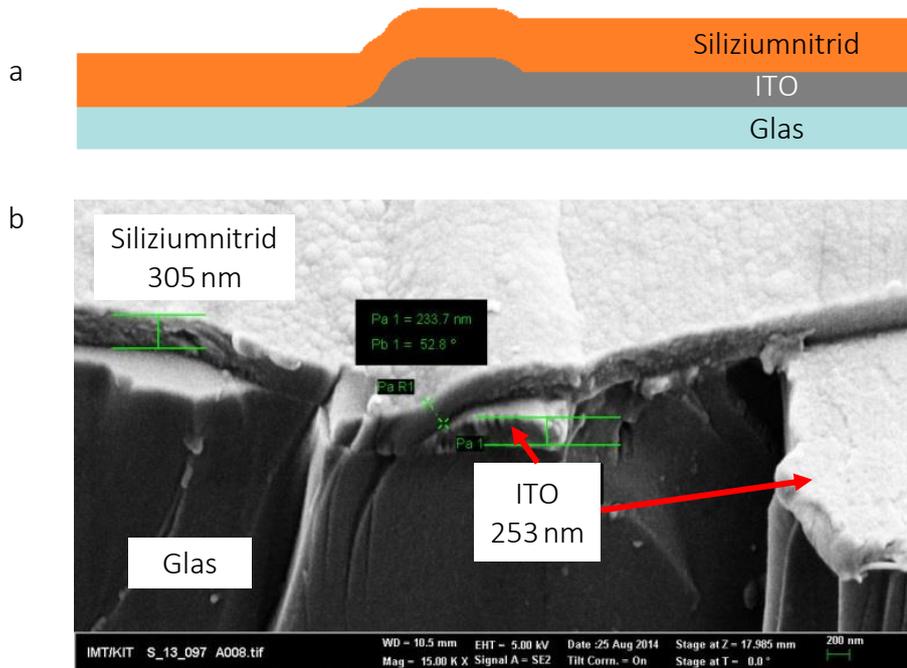


Abbildung 3.6: Laserstrukturiertes (Fa. Lasermicronics) ITO mit Siliziumnitrid (Fa. iX-factory)

a) schematische Seitenansicht und b) REM: Glas mit laserstrukturierter ITO Schicht (150 nm) und anschließender Siliziumnitrid Beschichtung (300 nm). Mittig zu erkennen ist eine Wulst am Rand des Grabens (links), in dem das ITO vom Glas entfernt wurde. Auf der rechten Seite ist die ITO Schicht unterhalb des Siliziumnitrids noch vorhanden.

Für Versuche stand ein Lasersystem des Lichttechnischen Instituts (LTI) am KIT zur Verfügung. Die Bearbeitungsparameter und Messergebnisse sind in der Bildunterschrift von Abbildung 3.5 gelistet, das eine REM Aufnahme einer ITO Schicht auf Glas (Delta Technologies, Limited) zeigt. Entlang einer Linie wurde die ITO Schicht vollständig mit dem Laser abgetragen (Laser-Ablation), ohne dass es am Rand zur Bildung einer Wulst aus aufgeschmolzenem Material kam. Dieser Probe wird anschließend eine andere Probe (ITO Schicht laserstrukturiert von Lasermicronics, Garbsen) gegenübergestellt.

Der wesentliche Unterschied der Proben vom LTI im Vergleich zu den Proben von Lasermicronics ist, dass die Seiten der Gräben nicht erhaben sind. Diese seitliche Erhöhung übertrug sich auch in die 300 nm dielektrische Schicht aus Siliziumnitrid (iX-factory, neuer Name Micronit, Dortmund). Möglicherweise wurde hier ein schwächerer Laser mit erhöhter Pulsdauer verwendet, der zu einem Aufweichen des umliegenden Materials führte, anstatt zu einem reinen Abtragen zu führen. (s. Abbildung 3.6)

Diese Erhöhung von höchstens wenigen 100 nm sollte jedoch auch bei Elektroden in der Größenordnung von unter 100 μm nicht ins Gewicht fallen. In den Experimenten dieser Arbeit haben sich erst Erhöhungen im Mikrometerbereich als relevant erwiesen, die meist auf Verunreinigungen, Blasen, Beschädigungen oder auch Rückstände (vgl. Microwells in Abschnitt 6.2.1) während des Herstellungsprozess zurückzuführen sind.

Eine Laserstrukturierung lässt sich schnell umsetzen, sobald die Systemparameter einmal eingestellt sind. Die Herstellung eines oder zweier Chips mag sich lohnen, aber schon ab dem dritten Chip ist es effizienter, einen Lithografieprozess zu verwenden, da hierbei nur einmal eine Maske geschrieben werden muss. Die darauffolgenden Belichtungsschritte bearbeiten die gesamte Chipfläche in einem Schritt, während der Laser beim direkten Schreiben (oder beim Erstellen einer Maske) ein langwieriger Prozess ist, in dem die Fläche Zeile für Zeile bearbeitet wird.

Mit Ausnahme der gedruckten Papier-DMF-Chips (Abschnitt 6.1) und eines extern hergestellten DMF-Chips mit alternativen Elektrodenstrukturen (Abschnitt 3.3.3) wurden alle DMF-chips lithografisch hergestellt. Details zu den Prozessparametern finden sich in Anhang A.

3.3.2 Verwendete Elektrodenstrukturen

In diesem Abschnitt werden sieben DMF-Chip Designs vorgestellt, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurden. Die Erklärungen sollen dabei helfen, ein Verständnis für die verschiedenen Designs zu entwickeln, damit in nachfolgende Arbeiten leichter fällt, eigene Designs für DMF-Chips zu entwerfen,

MFT1

Der MFT1-Chip (s. Abbildung 3.7) bietet ein sehr einfaches Design, dessen Elektrodengrößen sich an Abständen der Microwells gängiger Mikrotiterplatten (z.B. 2,25 mm) orientieren. Hiermit kann die Beweglichkeit von Fluiden getestet werden. Pro Chip stehen zehn getrennte Bereiche zur Verfügung, so dass sich die Messungen nicht gegenseitig stören, da jedes Mal eine frische Oberfläche verwendet werden kann.

Das Design ist nur dazu gedacht, einen Tropfen linear zu bewegen und die Möglichkeit zum Dosieren aus einem Reservoir zu testen. Jede der zehn Elektrodenreihen besteht aus sieben Elektroden. Die Reihen sind auf ihrer jeweiligen Seite untereinander parallel geschaltet, um die Kontaktanzahl zu reduzieren. Mit dem rautenförmigen Waste-Reservoir in der Mitte ergeben sich insgesamt 15 unabhängige Kontakte.

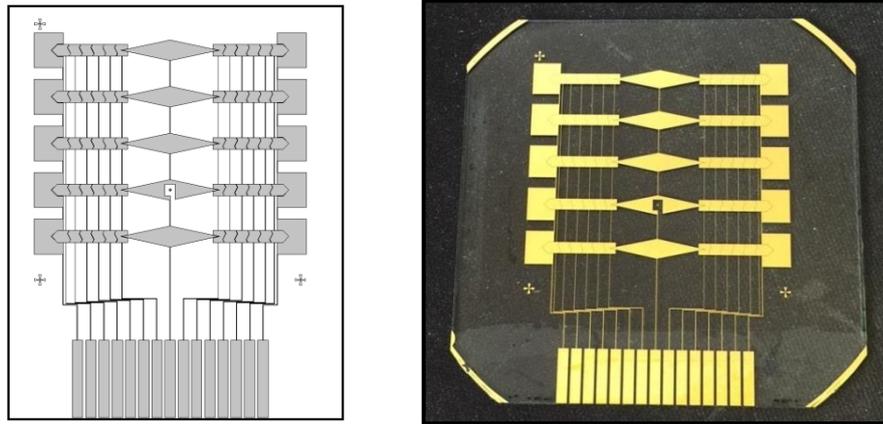


Abbildung 3.7: MFT1 Elektrodendesign

Zwei mal fünf untereinander kontaktierte Reihen mit je sieben Elektroden inklusive Reservoir. Die Elektroden wurden lithografisch hergestellt, ein 4 Zoll Glaswafer mit 100 nm Gold auf 10 nm Chrom war die Basis. Als Dielektrikum wurde eine 4,2 μm Schicht aus mr-L 5005 verwendet. Die hydrophobe Schicht aus Teflon AF 1600 ist zwischen 20-100 nm dünn.

Das Elektrodendesign ist einschichtig, d.h. alle Leiterbahnen, Aktor-Flächen und Kontaktpads liegen auf derselben Ebene. Die geringe Anzahl an Kontakten ermöglicht die Verbindung über einen Leiterplattensockel und somit einen schnell wechselbaren Chip bei robuster Kontaktierung. Der Nachteil ist die geringe Flexibilität des Elektrodendesigns, da außer Bewegen und Dosieren keine Fluidoperationen durchgeführt werden können.

Im nächsten Schritt sollte ein flexibles Elektrodendesign entworfen werden, das alle Fluidoperationen ermöglicht, aber gleichzeitig nur wenige Kontakte hat.

4R32ch

Der 4R32ch-Chip (s. Abbildung 3.8) besitzt 32 Kontakte, wovon zwölf zu den vier Reservoiren und weitere 20 zu der zweireihigen Matrix führen. Er ist zum Testen der grundlegenden Fluidmanipulationen Dosieren, Bewegen, Mischen und Trennen gedacht und kann wie der MFT1 über einen Leiterplattensockel kontaktiert werden. Im Gegensatz zum MFT1 besitzt der 4R32ch eine Elektrodenmatrix, weshalb er für (einfache) Protokolle verwendet werden kann.

Auch hier ist das Elektrodendesign einschichtig. Ebenso sind alle Elektroden im Fluidsystem direkt mit einer Leiterbahn zu erreichen, ohne dass diese zwischen anderen Elektroden hindurchgelegt werden muss, oder ein mehrlagiges System benötigen.

Um einen flexiblen DMF-Chip zu entwerfen, bedarf es deutlich mehr Elektroden. Das führt zu der Problematik, dass eine lineare Kontaktierung über den Leiterplattensockel den Chip zu groß werden ließe. Hier ist bereits zu sehen, dass die Kontaktpads bezogen auf die Kante des Chips mehr Platz benötigen, als das Fluidsystem. Der Pitch beträgt 2,54 mm, könnte aber auf 1,27 mm reduziert werden, da es sich um in der Elektronik gängige Größen handelt. Jedoch steigt mit kleineren Abständen die notwendige Genauigkeit der Kontaktierung und erschwert manuelles Löten oder Kleben.

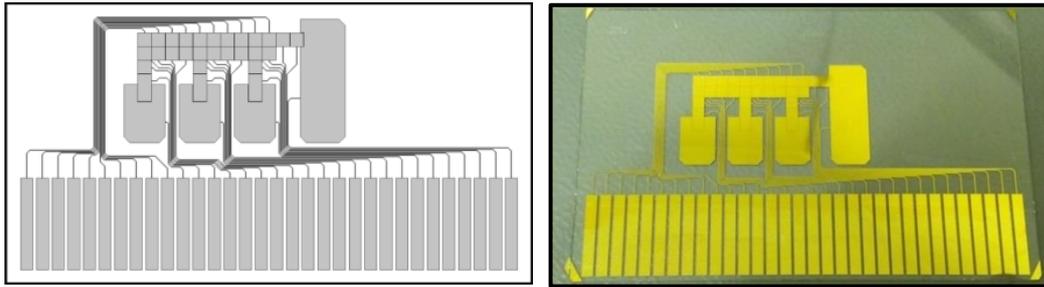


Abbildung 3.8: 4R32ch Elektrodendesign

32 Elektroden bilden vier Reservoir und eine zweireihige Elektrodenmatrix. 4 Zoll 1 mm Glaswafer, 100 nm Gold auf 10 nm Chrom. Dielektrikum 4,2 μm mr-L 5005, hydrophobe Schicht 20-100 nm Teflon AF 1600.

10R4xDMF

Der 10R4xDMF-Chip besitzt 98 Kontakte (zehn Reservoiren mit je zwei Dosierelektroden und eine 4x17 Matrix), ist für die DropBot-Steuerelektronik und ein mechanisches und elektrisches Interface ausgelegt, das im Rahmen einer am IMT durchgeführten Diplomarbeit (Doll (2015)) entwickelt wurde (s. Abbildung 3.9). Das Design ist angelehnt an Jebrail et al. (2010).

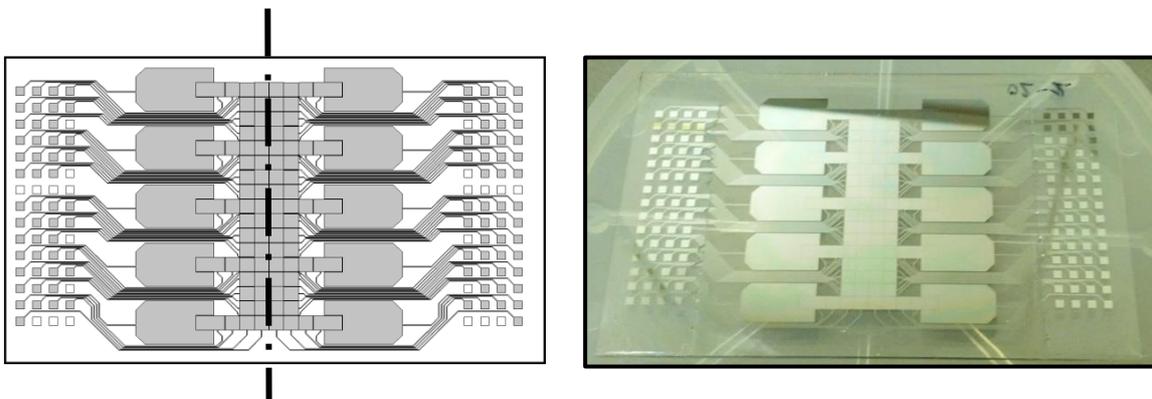


Abbildung 3.9: 10R4xDMF Elektrodendesign

Das (achsensymmetrische, s. links) Elektrodenlayout 10R4xDMF wurde in dieser Arbeit am häufigsten verwendet. Es basiert auf Jebrail et al. (2010).

Wiederum liegt ein einschichtiges Elektrodendesign vor. Alle Elektroden im Fluidsystem sind mit jeweils einer eigenen Leiterbahn kontaktiert. Aber für die 4x17 Matrix mussten die Leiterbahnen zwischen äußeren, aber direkt aneinander angrenzenden Elektroden geführt werden (s. Abbildung 3.10). Dies hat einen negativen Effekt auf die Tropfenbeweglichkeit.

Hier gibt es verschiedene Lösungsansätze. Es kann das Elektrodendesign optimiert werden oder es kann ein mehrlagiges Substrat gewählt werden. Auf Details zum Design von Elektroden und (zwischenliegenden) Leiterbahnen wurde in Abschnitt 2.5.1 eingegangen.

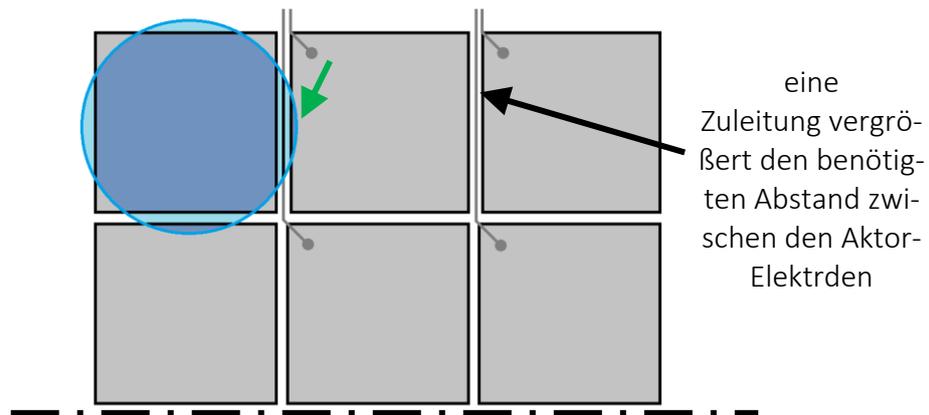


Abbildung 3.10: Eine Zuleitung zwischen Elektroden

Eine Zuleitung zwischen zwei Elektroden vergrößert deren Abstand. Der Tropfen überlappt jedoch auch noch die Nachbarelektrode (grüner Pfeil). Der Tropfen bleibt bewegbar.

Würde eine Erhöhung von vier auf sechs Reihen angestrebt werden (s. Abbildung 3.11), so müssten zwei Zuleitungen zwischen jeder der Elektroden der äußeren Reihe hindurchgeführt werden. Mit einfachen, maskenbasierten lithografischen Methoden lassen sich problemlos Strukturen von $10\mu\text{m}$ herstellen. Mit einem Elektronenstrahlschreiber sind deutlich kleinere Strukturen möglich, aber der Aufwand ist weitaus höher. Auch sollte bedacht werden, dass bei sinkendem Abstand ($<10\mu\text{m}$) zwischen den Elektroden die Gefahr eines dielektrischen Durchbruchs zwischen diesen steigt.

Zwei Zuleitungen und drei Freiräume lägen zwischen zwei äußeren Elektroden, d.h. es muss ein Abstand von mindestens $50\mu\text{m}$ von einem Tropfen überwunden werden. Die Elektroden der inneren Reihen können dichter aneinander liegen und sind somit auch größer. Eine sinusförmige Kontur, der auch die Zuleitungen und deren Freiräume folgen, lässt einen Tropfen leichter auf die benachbarten Elektroden überlappen und somit auch bewegen.

Jedoch muss die Frage gestellt werden, ob sechs Reihen den Mehraufwand wert sind. Drei Reihen reichen aus, um Tropfen ohne Berührung aneinander vorbeizubewegen, aber verlangen auch zwischen den Elektroden liegende Zuleitungen. Vier Reihen stellen keinen Mehraufwand zu drei Reihen dar. Sechs Reihen bieten mehr Platz, um auch größere Tropfen (aneinander vorbei) zu bewegen, oder mehrere Tropfen gleichzeitig. Aber sie eröffnen nicht unbedingt eine grundlegend neue Möglichkeit, wie es zwischen zwei und drei Reihen der Fall ist.

Insgesamt stellt eine Vier-Reihen-Matrix einen guten Kompromiss zwischen einfacher Herstellung, Anforderungen an die Präzision, Flexibilität der Tropfenbewegung und deren Beweglichkeit dar. Zehn Reservoirs passen zur Breite und Anzahl der möglichen Elektroden und ihrer Kontaktpads. Ein Pitch von $2,25\text{mm}$ für die Matrixelektroden entspricht den Abständen der Wells einer Mikrotiterplatte mit 1536 Wells, ein $2,54\text{mm}$ Pitch für die Kontaktpads entspricht einem gängigen Maß von elektronischen Bauteilen und 120 unabhängige Kontakte liefert der DropBot Elektronik, daraus leitete sich die ungefähre Fläche ab.

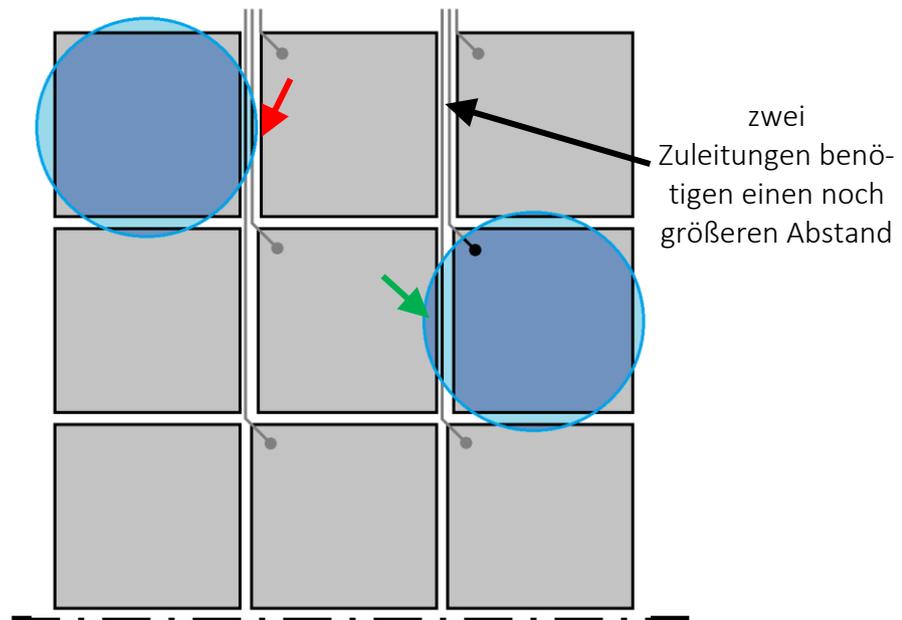


Abbildung 3.11: Zwei Zuleitungen zwischen Elektroden

Zwei Zuleitungen zwischen zwei Elektroden erhöht deren Abstand der äußeren Reihe noch weiter, auch im Vergleich zur zweiten Reihe. Der Tropfen befindet sich nun nicht mehr nahe genug an der nächsten Elektrode (roter Pfeil), daher kann diese nicht genügend Kraft auf diesen ausüben. Der Tropfen bleibt hängen.

Auf einen 4 Zoll Wafer würde maximal ein Chip passen; auf einem 6 Zoll Wafer könnten zwei Chips untergebracht werden. Daraus ergab sich das Design des 10R4xDMF, dessen Ähnlichkeit zur Jebrail et al. (2010) unverkennbar ist, aber eben auch eine logische und optimierte Lösung darstellt. Dieses Design bietet viele Freiheiten bei angemessenem Herstellungsaufwand.

NMR1

Der NMR1 Chip bietet zwölf Elektrodenfelder bei zehn Kontakten. Um Platz bei der Kontaktierung zu sparen, wurden zweimal jeweils zwei Elektroden verbunden. Bei diesem Vorgehen ist darauf zu achten, dass nur Aktor-Flächen verbunden werden, deren gleichzeitige Betätigung keinen negativen Einfluss auf die Tropfensteuerung hat.

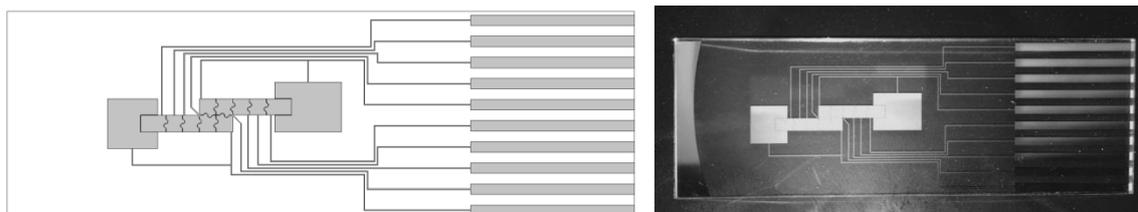


Abbildung 3.12: NMR1 Elektrodendesign

Der NMR1 hat nur 10 Kontakte, aber 12 Elektrodenfelder.

Die Chipbreite ist so ausgelegt, dass sie in ein vorhandenes NMR-System passt. Durch die seitlichen Kontaktpads können nicht magnetisierbare IC Anschlussstifte zur Kontaktierung verlötet oder verklebt werden.

MFT-DIY

Der MFT-DIY-Chip („do it yourself“, Abbildung 3.13) besitzt eine zweireihige Matrix mit vier Reservoirien und davon unabhängig zusätzlich vier einzelne Rundwege mit jeweils neun Elektroden für Tropfenbeweglichkeitsversuche (s. Abschnitt 2.5.6).

Das Design hat zwei Besonderheiten: Zum einen entspricht die Anordnung der Kontaktpads denen der zugeordneten Elektroden in Form und Reihenfolge, wodurch sie leicht manuell zu bedienen sind. Steht keine programmierbare Steuerelektronik zur Verfügung, so lassen sich beispielsweise zwei Messspitzen zweckentfremden, um eine elektrische Spannung an den Kontaktpads einzukoppeln. Außerdem haben die Kontaktpads ein Raster von 2,54 mm und sind geeignet für ein Federkontaktstiftinterface.

Zum anderen ist das Design, also der Verlauf aller Konturen, rechtwinklig, was es deutlich leichter macht, diese Strukturen auf Inkjet-Druckern mit leitfähiger Tinte zu produzieren. Je nach Auflösung des Drucksystem kann das Spaltmaß zwischen den Elektroden angepasst werden.

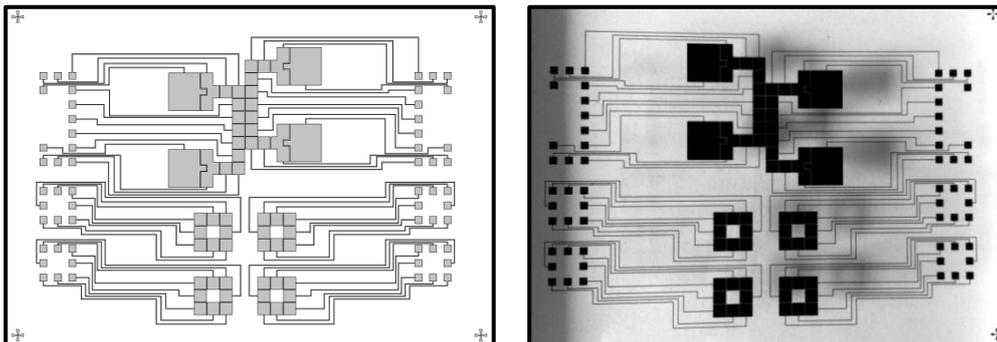


Abbildung 3.13: MFT-DIY Elektrodendesign

Ein für Inkjetdruck optimiertes Design eines DMF-Chips. Ein Spaltmaß von $100\ \mu\text{m}$ zwischen den Elektroden ist in der Regel gut zu drucken, aber die Zuverlässigkeit der Tropfenbewegung kann bei einem zu geringen Abstand zwischen Boden und Deckel nachlassen. Rechte Winkel sorgen für präzisere Ergebnisse beim Druck, da der Transfer der Kontur der CAD-Datei zum gedruckten Pixel leichter ist.

Zugunsten von geringeren Anforderungen an die Herstellungsparameter wird auf eine vierreihige Matrix verzichtet. Dies schränkt die Möglichkeiten im Vergleich zum 10R4xDMF ein. Der entscheidende Punkt ist, ein einfaches, praktisches, leicht selbst zu adaptierendes Design zu bieten, das nicht so abhängig vom Versuchsstand oder Herstellungsverfahren ist.

MFT-DIY2

Eine geringe Druckauflösung bedingt entsprechend große Abstände zwischen den Elektroden (hier z.B. $100\ \mu\text{m}$). Das führt dazu, dass sich Tropfen manchmal nicht ausreichend nahe der Nachbarelektroden befinden, was seine Bewegung behindert oder verhindert.

Für den MFT-DIY2 (s. Abbildung 3.14) wurde der MFT-DIY um rechteckige Wellenkonturen zwischen den Elektroden erweitert. Diese sind auch bei einer größeren Auflösung leichter druckbar, als beispielsweise die Sinuswellenkonturen des NMR1 Designs. Diese Strukturen sorgen für eine bessere Überlappung von Tropfen und Nachbar-elektrode. (vgl. Abschnitt 2.5.1)

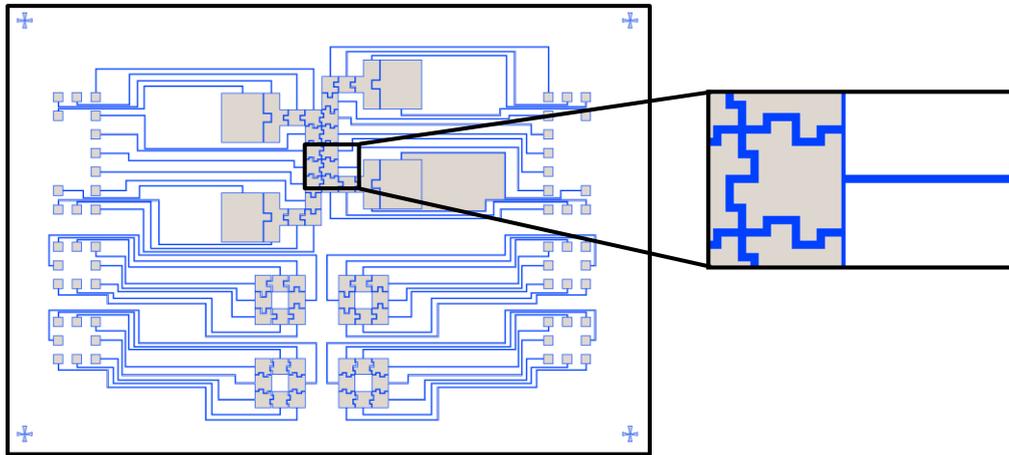


Abbildung 3.14: MFT-DIY2 Elektrodendesign

Der MFT-DIY2 entspricht dem Design vom MFT-DIY, besitzt aber zusätzlich eine rechteckige Wellenkontur zwischen den Elektroden.

Die Elektroden der Reservoirs und die zum Dosieren benötigten Elektroden sind symmetrisch ausgelegt. Dies begünstigt eine präzisere Tropfengenerierung durch die verlässlichere Position des Abrisspunktes.

MFT-S

Die drei Elektroden des MFT-S weisen ein Spaltmaß von $20\ \mu\text{m}$ auf. Nach jeweils drei Elektroden „schlängelt“ sich eine Zuleitung zwischen zwei Elektroden durch den Rundweg. Diese besitzt eine Breite von $20\ \mu\text{m}$, ebenso wie die Zwischenräume. Durch das Design ergeben sich effektiv 12 Felder. Der damit nun zu überwindende Spalt ist $60\ \mu\text{m}$ breit. Durch eine sinusähnliche Kontur mit einer Amplitude von $500\ \mu\text{m}$ wird die Überlappung der Tropfen auf die angrenzenden Elektroden unterstützt. (s. Abschnitt 3.3.3 und Yang et al. (2008))

Lediglich drei Kontakte (plus Erde auf dem Deckel) reichen für eine eindeutige Bewegung aus. Es handelt sich um einen minimalistischen Test Chip, auf dem neue Flüssigkeiten bei gleichbleibenden Chipmaterialien, oder bekannte Flüssigkeiten (z.B. destilliertes Wasser) bei Variation der Chipmaterialien einfach getestet und optimiert werden können.

Manche Flüssigkeiten führen z.B. zu unverzüglichem Biofouling, obwohl sie theoretisch sehr gut zu bewegen sind. Bei PBS mit darin gelöstem Streptavidin kann die Zugabe von einem Tensid (in dem Fall Pluronic 64) das Biofouling komplett verhindern und darüber hinaus auch die Beweglichkeit verbessern (vgl. Abschnitt 5.3.2).

Im nächsten Abschnitt wird genauer auf die zugrundeliegende Designidee dieses Layouts eingegangen.

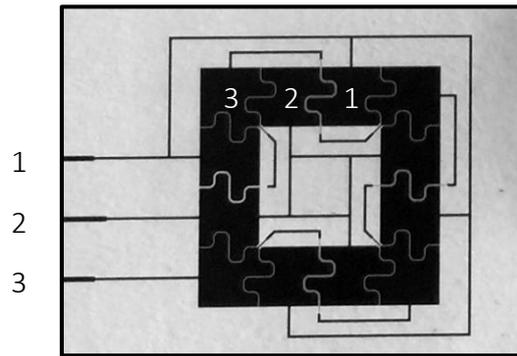


Abbildung 3.15: MFT-S Elektrodendesign

Das Design des MFT-S besitzt einen Rundweg aus 12 Elektroden, um Versuche zur Tropfenbeweglichkeit durchführen zu können.

3.3.3 Alternative Elektrodenstrukturen

Ein DMF-Chip besitzt eine Vielzahl von Elektroden. Die Ansteuerung von Elektroden kann entweder individuell erfolgen (z.B. DMF Layout 10R4xDMF in Abschnitt 3.3.1), wenn genügend Platz für eine komplexe Kontaktierung vorhanden ist, oder es können Elektroden untereinander verbunden werden (z.B. DMF Layout MFT1), um Fläche einzusparen und die Chipkontaktierung einfacher zu gestalten.

Spielen Preis und Aufwand keine Rolle, dann ist es immer besser, die Elektroden individuell zu kontaktieren, um maximal mögliche Funktionsfreiheit zu erhalten. Sollen jedoch kostengünstige Chip hergestellt werden (z.B. gedruckte Papier-Chips wie in Abschnitt 6.1), so wird es eher auf eine zweidimensionale, also einschichtige Anordnung von Elektroden, Kontaktpads und Zuleitungen hinauslaufen. Dies führt bei steigendem Bedarf von Elektroden zu einem Anwachsen an notwendigen Kontakten am Interface von DMF-Chip zu Elektronik und auch zu einer wachsenden Anzahl an Zuleitungen. Je mehr Fluide auf dem Chip verwaltet werden müssen, desto mehr und ggf. längere Transportwege sind notwendig.

Diesem Problem kann begegnet werden, indem die Kontaktierung mehrschichtig verläuft (z.B. Leiterplatten), oder indem die Kontaktierung der Elektroden intelligent zusammengefasst wird. Die folgenden Designvorschläge sind für eine einschichtige Elektroden- und Zuleitungsstruktur gedacht.

Interferenz zwischen Boden- und Deckelektroden

Für die meisten DMF-Anwendungen ist ein geschlossenes System vorzuziehen. Wie bereits beschrieben (s. Abschnitt 2.4), ist das Elektrodenmaterial des Deckelsubstrats normalerweise unstrukturiert. Jedoch lassen sich durch geschickte Überlappung und Ansteuerung von Deckel- und Bodenstrukturen nützliche Effekte erzielen. Das Elektrodenlayout in Abbildung 3.16 kommt mit je zwei Elektroden auf Boden und Deckel aus, um theoretisch beliebig lange und auch kreuzende (s. Abbildung 3.18) Transportweg zu ermöglichen.

Die Ansteuerung zwischen Boden- und Deckelektroden besitzt drei Zustände: $U(t)$, $-U(t)$ und Erde. Die Elektrodenfelder sind etwa doppelt so lang wie breit (Abbildung 3.16a). Deckel und Boden werden so versetzt, dass sie die Anordnung auf dem Boden wie in Abbildung 3.16 b

und c „quadratisch“ überlappen. Die Quadrate bilden „virtuelle“ Elektroden, d.h. es lassen sich individuelle elektrische Feldstärken einstellen. Jedes Quadrat entspricht einer möglichen Tropfenposition.

Werden diese Elektroden mit den Potential aus Abbildung 3.16d angesteuert, so lässt sich jeweils ein Tropfen innerhalb von jeweils 4 Feldern eindeutig positionieren. Einzig das Quadrat mit Null-Feld legt keine eindeutige Fließrichtung für den Tropfen fest. Wird die Beschaltung von Boden und Deckel gemäß Abbildung 3.17 verändert, lassen sich ein oder mehrere Tropfen auf diesem Transport wegbewegen.

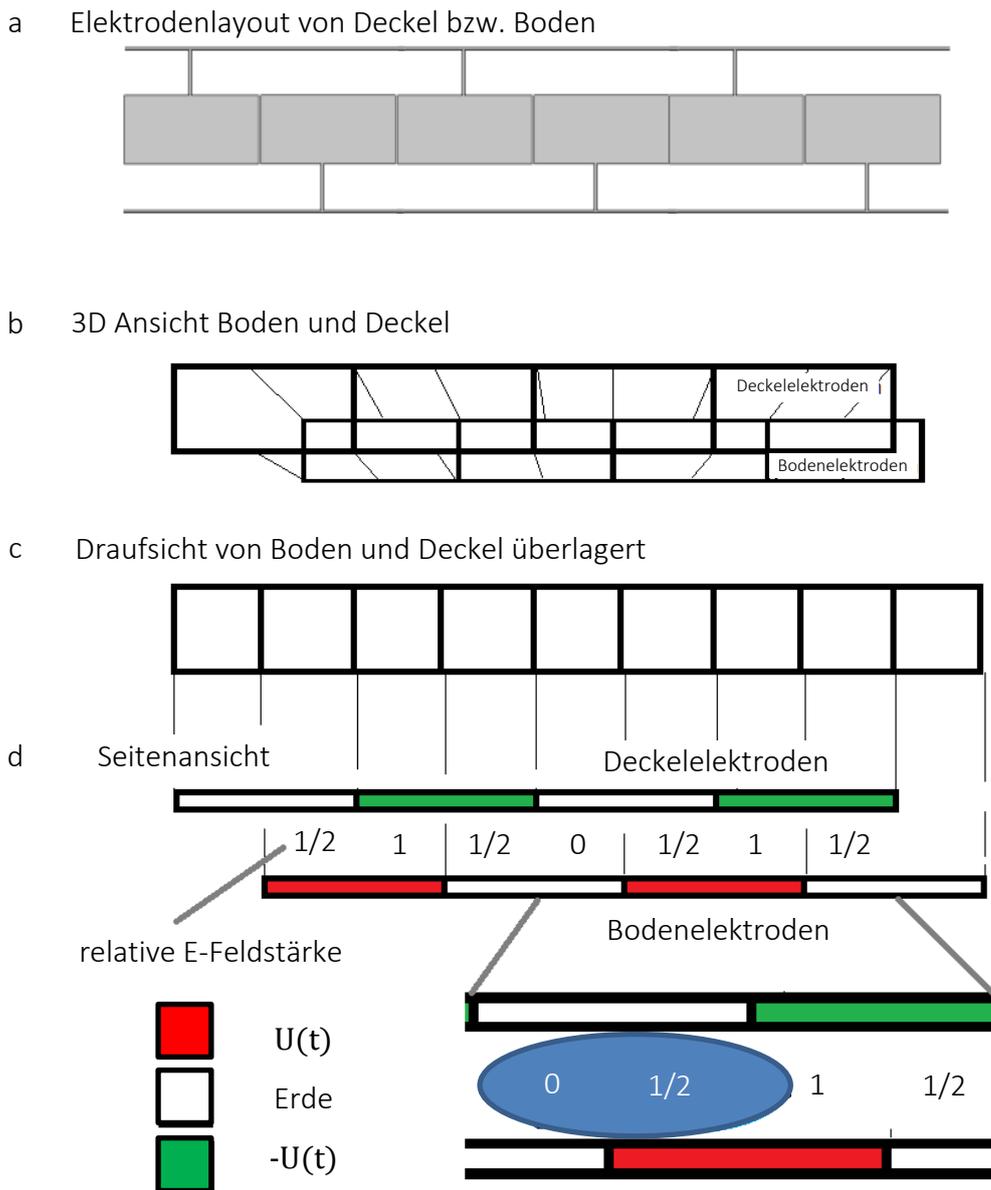


Abbildung 3.16: Interferenz zwischen Boden- und Deckelelektroden

Verschiedene Ansichten sich überlappender Elektrodenstrukturen auf Boden und Deckel. Die drei Potentiale (0, $\frac{1}{2}$, 1) der Elektroden positionieren einen Tropfen eindeutig innerhalb von vier Feldern

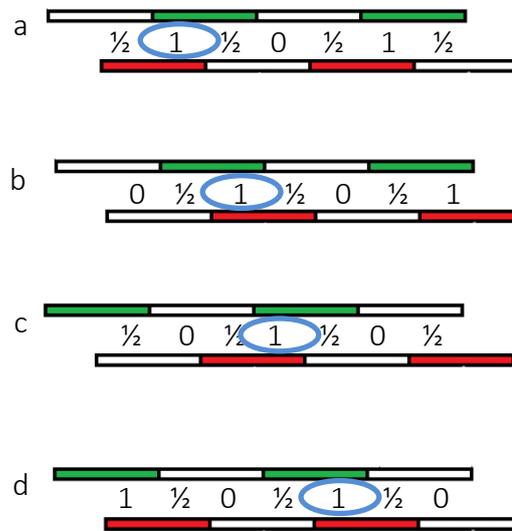


Abbildung 3.17: Beschaltungszustände für Boden- und Deckelektroden

a-d) Die Abfolge der verschiedenen Beschaltungszustände der Elektroden zum Bewegen eines Tropfens: Erde = weiß, $U(t)$ = rot, $-U(t)$ = grün

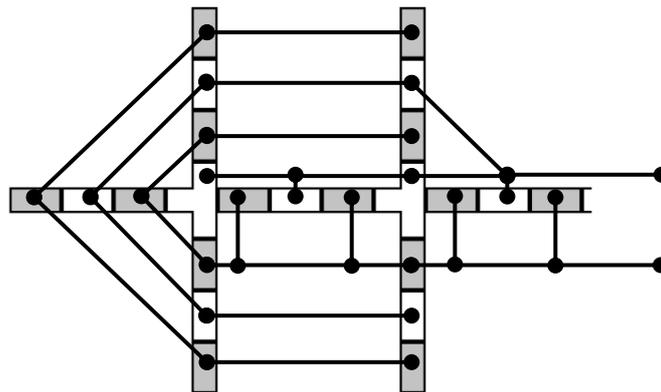


Abbildung 3.18: Schaltskizze für Zuleitungen und Elektroden

Auch als Kreuzungsanordnung lassen sich Zuleitungen so verlegen, dass nur zwei Kontakte benötigt werden.

Bisher wurde nur eine lineare Anordnung beschrieben, aber auch eine kreuzende Anordnung ist mit zwei Kontakten möglich (s. Abbildung 3.18). In Abbildung 3.19 werden Elektrodenstrukturen und deren Beschaltung (Farben nach Abbildung 3.16d) auf Deckel (1. Zeile) und Boden (2. Zeile) von sich kreuzenden Wegen gezeigt. Die relative Feldstärke (3. Zeile) zeigt das Ergebnis der Überlappung von Boden und Deckel. Die Veränderung der Beschaltungszustände von Spalte eins bis vier lässt erkennen, dass ein Bewegen von Tropfen ermöglicht wird. Die Einschränkung ist jedoch, dass nur in eine Richtung bewegt werden kann, weil bei der Umkehr der Reihenfolge der Beschaltungszustände keine eindeutige Bewegungsrichtung am Kreuzungspunkt möglich ist.

Mit Elektrodenanordnungen dieser Art auf Boden und Deckel lassen sich sehr viele Kontakte am Interface zwischen DMF-Chip und Elektronik einsparen. von der Ecken et al. (2016a)

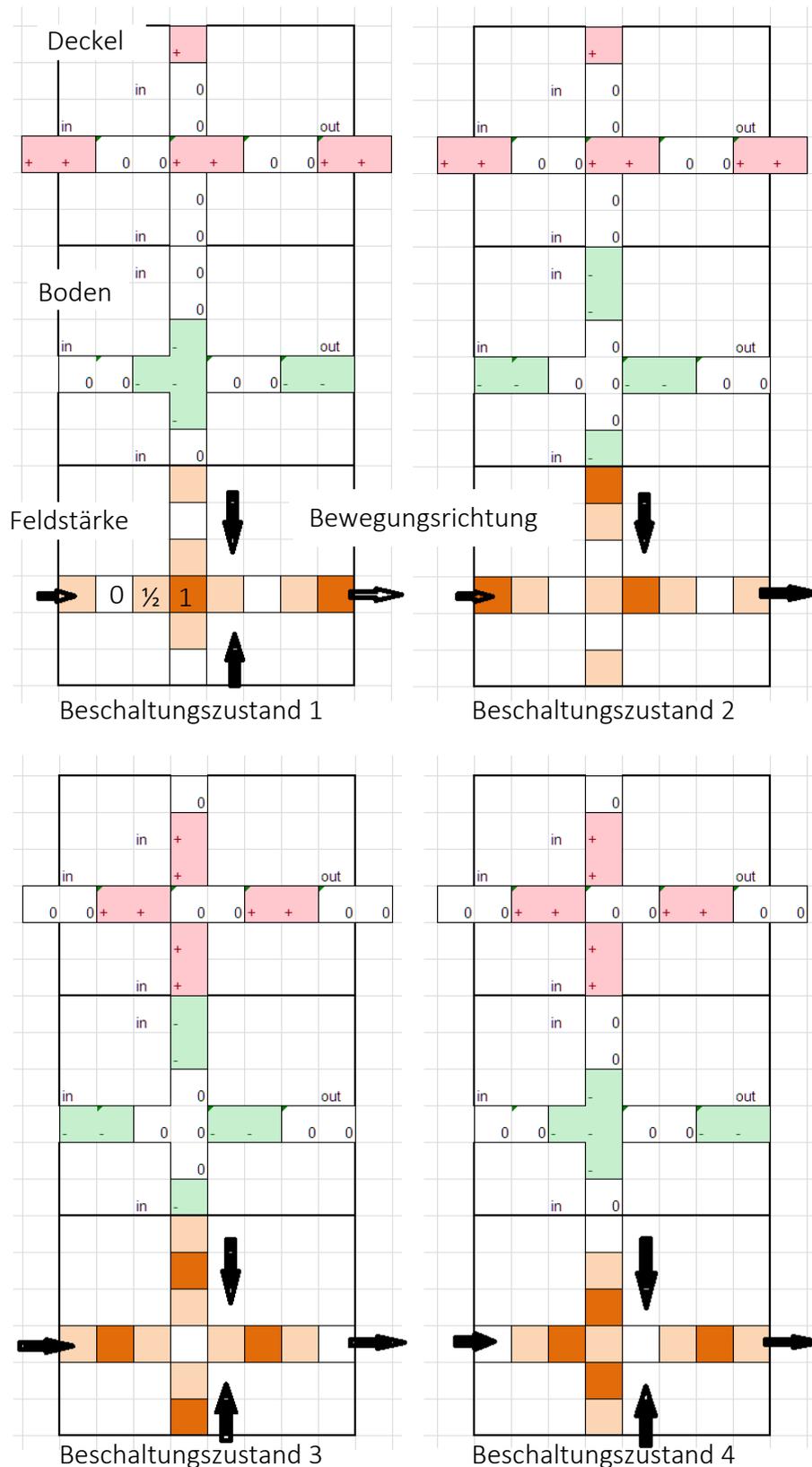


Abbildung 3.19: Beschaltungszustände für Boden- und Deckelelektroden bei Kreuzanordnung

Beschaltungszustände für Tropfentransport an Kreuzungen. Transport ist nur in eine Richtung möglich. Für beliebige Transportrichtung müssen alle Arme zusätzlich eine unabhängig angesteuerte Elektrode erhalten. Der Tropfen bewegt sich immer zur größten Feldstärke hin (0..1/2..1).

Transportwege mit drei Bodenelektroden

Wie im vorherigen Abschnitt dient das folgende Elektrodenlayout dazu, Kontakte und Fläche einzusparen, wenn lange Transportwege notwendig sind. Das nächste Elektrodenlayout kommt mit drei Kontakten auf dem Boden aus und benötigt nur die normale Gegenelektrode auf dem Deckel. von der Ecken et al. (2016a), Yang et al. (2008)

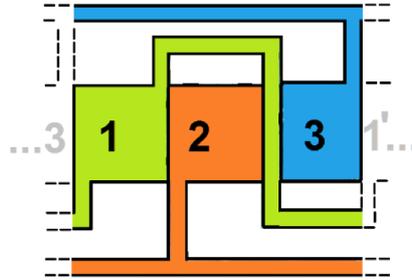


Abbildung 3.20: Iteratives Element einer Elektrodenanordnung

Diese Anordnung lässt sich beliebig oft aneinander reihen, um einen langen Transportweg mit nur drei elektrischen Kontakten zu erzeugen.

Die Abbildung 3.20 zeigt ein Elektrodendesign mit drei elektrisch voneinander isolierten Elektroden und 1 (grün), 2 (orange) und 3 (blau) und den jeweiligen Zuleitungen derselben Farbe. Die in der Grafik gezeigte Anordnung lässt sich beliebig oft aneinander reihen. Die Flächen 2 und 3 bestehen aus einer langen Zuleitung (oberhalb bzw. unterhalb verlaufend) und davon abgehend seriell angeordnet die hier quadratischen Elektroden in der Mitte. Bei 1 verhält es sich etwas anders. Hier sind Zuleitung und Elektrode in Reihe. Daher entspricht das grüne Elektrodenquadrat ebenfalls einer Zuleitung für später angereihte Elektrodenflächen.

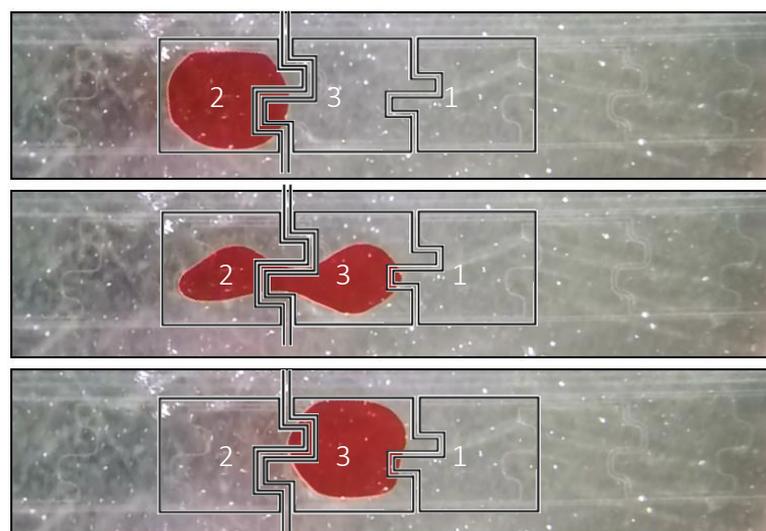


Abbildung 3.21: Ein Tropfen passiert die den Transportweg kreuzende Zuleitung

Das Design wurde auf einem Bodensubstrat mit ITO-Schicht umgesetzt. Daher sind die Strukturen im Gegensatz zu Chromelektroden nur schwer zu erkennen.

Befindet sich wie in Abbildung 3.20 ein Tropfen auf Elektrode 2, dann bewirkt das Aktivieren von Elektrode 3 (2 und 1 deaktiviert) ein Wandern des Tropfens nach 3. Wird jetzt Elektrode 1 aktiviert und direkt oder kurze Zeit später 3 deaktiviert (2 ist weiterhin deaktiviert), so wandert der Tropfen zu 1. Bewegen von links nach rechts erfolgt demnach durch das Aktivierungsmuster „1-2-3-1-2-3...“, Bewegen in die Gegenrichtung entsprechend umgekehrt.

Das Design wurde auf einem ITO Glas Chip erfolgreich getestet, wobei eine Elektrodenkontur entsprechend Abschnitt 2.5.1 ergänzt wurde. (s. Abbildung 3.21). von der Ecken et al. (2016a)

Anwendungsmöglichkeiten

Die gezeigten Elektroden- und Zuleitungsdesigns ermöglichen es, quasi beliebig lange Flüssigkeitstransportwege auf DMF-Chips mit nur vier Kontakten zu konstruieren. Dies bietet Vorteile bei der Unterbringung von Zuleitungen und Elektroden auf einer Ebene. Dadurch können viele verschiedene Flüssigkeiten, wie sie z.B. in Kapitel 3.3.6 benötigt werden, leicht auf einem DMF-Chip transportiert werden. Auch wird der Produktionsaufwand des Chips verringert und somit die Kosten, da mit einschichtigen elektrischen Strukturen auf den Substraten gearbeitet werden kann und nur wenige Kontakte im Interface benötigt werden. Dabei ist Bewegen in beide Richtungen möglich. Die Tropfen sind eindeutig positioniert, im Gegensatz zu etwa dem Elektrodendesign in Yasuda et al. (2010).

Im Rahmen der Arbeiten zur TALEN-Synthese (s. Kapitel 4), wird eine Mikrofluidikplattform benötigt, die 31 verschiedene Flüssigkeiten nacheinander, aber in je nach Programm wechselnder Reihenfolge in eine Reaktionskammer transportieren muss. Den Großteil des DMF-Chips werden somit Reservoirs und Transportkanäle bilden. Die Reaktionskammer kann mit wenigen Elektroden realisiert werden. Jedes Reservoir benötigt einen gewissen Platz, dieser macht wiederum längere Transportwege unumgänglich. Außerdem sollten nicht alle Flüssigkeiten über ein und denselben Transportweg geleitet werden, da es sonst leichter zu Querkontaminationen kommen kann. Soll der Chip nicht nur aus Transportwegen und Kontaktpins bestehen, so ist ein optimiertes Transportsystem durch geschicktes Elektrodendesign sinnvoll.

3.3.4 Verwendete Dielektrika

Viele gängige Polymere wie PET oder auch als Resist verwendete Polymere wie SU-8 haben eine Permittivität von ca. 3-4. Teflon liegt mit einer Permittivität von 2,1 relativ gesehen deutlich darunter.

Mit entsprechendem Aufwand wie Gasphasenabscheidung, lassen sich die Materialien mit höherer Durchschlagsfestigkeit oder Permittivität wie Parylen-C, Siliziumoxid-Siliziumnitrid-Siliziumoxid (ONO) oder Tantalpentoxid (Ta_2O_5) in hoher Qualität auftragen. Mit Spincoating und somit wesentlich einfacher können Teflon, SU-8 und Cyanoethyl Pullulan (CEP) verarbeitet werden.

Das zur Verfügung stehende Teflon in Lösung ermöglicht Schichten bis etwa 1 μm . Eine Anlage für Parylen-C bis maximal 300 nm Schichtdicke wäre am IMT vorhanden gewesen. Beides erreicht jedoch keine ausreichende Durchschlagsfestigkeit.

Bei Folienmaterialien wie PET muss beachtet werden, dass auch die 10-80 μm breiten Zwischenräume der Elektroden z.B. mit Klebstoff ausgefüllt werden müssen, da Luft eine Durchschlagsfestigkeit von nur 1 V/ μm hat.

Wird die Durchschlagsfestigkeit der Materialien auf das Verhältnis von Durchschlagsfestigkeit und Permittivität von Teflon normiert (vgl. Gleichung 2.22 in Abschnitt 2.4.3), so ist zu erken-

nen, dass der Resist SU-8 schlechte Werte für Durchschlagsfestigkeit und Permittivität aufweist. Jedoch kann SU-8 in quasi beliebigen Schichtdicken von 1-100µm verarbeitet werden und auch Technik sowie Knowhow standen am IMT zur Verfügung. CEP ist ein vielversprechendes Material, aber es gab am IMT bisher keine praktische Erfahrung. Daher wurde SU-8 als sicherster Ansatz für die Produktion der DMF-Chips ausgewählt.

SU-8

SU-8 ist ein Negativ-Resist der Firma MicroChem Corp. Die Firma micro resist technology GmbH stellt u.a. SU-8 ähnliche Resiste her, von denen die Typen mr-L 5005 und mr-X 10 im Rahmen dieser Arbeit als Dielektrika eingesetzt wurden.

Der mr-L 5005 wurde für 4,2µm dünne Schichten verwendet, während mr-X 10 für Schichtdicken zwischen 7 und 10µm geeigneter ist. Die dielektrischen Eigenschaften wurden nicht gemessen, aber sollen sich laut Herstellerangabe nicht von anderen SU-8 Resisten unterscheiden (s. Tabelle 2.3).

Die 4,2µm dicke mr-L 5005 Schicht wird auf dem Spincoater bei 3000rpm für 60s mit 1500rpm/s erzeugt. Darauf wird der Chip bei 95°C für 10min gebacken, abgekühlt und nach einer Ruhezeit von wenigen Minuten mit 1000mJ UV-Licht flutbelichtet. Der mr-L 5005 wurde nur zu Schichten von 4,2µm verarbeitet, da früh auf den Resist mr-X 10 gewechselt wurde.

Eine Dielektrikumsschicht aus mr-X 10 wird bei gleichen Bedingungen hergestellt, jedoch wurden die Schichtdicken entsprechend der Spinkurve angepasst. Mit diesem Resist können präzise Schichtdicken von 4-15µm hergestellt werden.

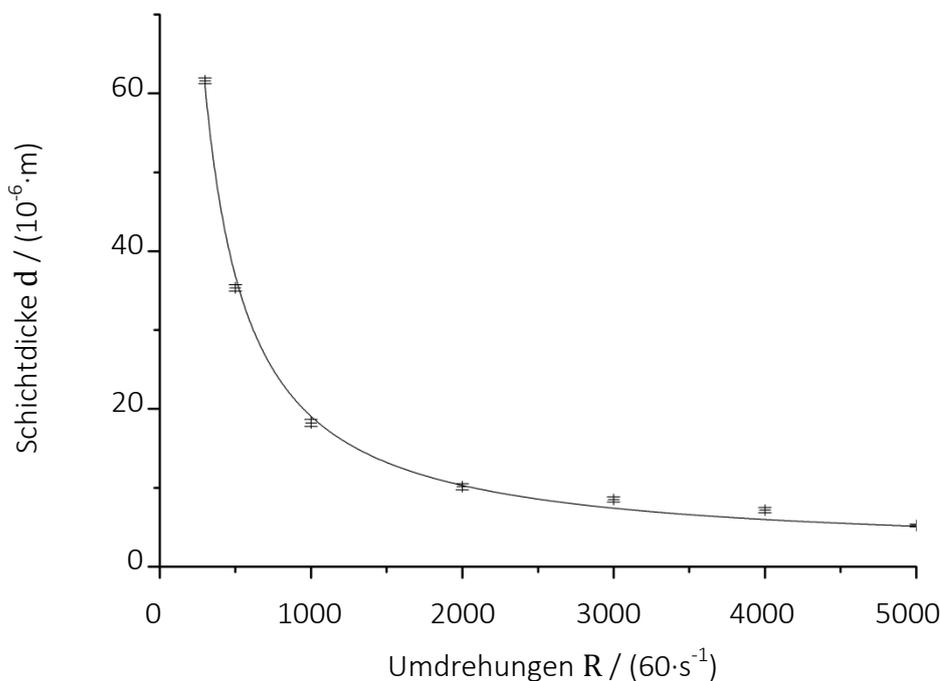


Abbildung 3.22: Spinkurve von mr-X MP 10

Der Resist mr-X MP 10 eignet sich für Schichtdicken von 5-15µm. Die Spinkurve kann beschrieben werden als $d = (1,8 \cdot 10^{-6} + 0,02 \cdot R^{-1,02}) \cdot [m]$.

Cyanoethyl Pullulan

Cyanoethyl Pullulan (CEP) hat eine für ein Polymer ungewöhnlich hohe relative Permittivität von 15-20. Es wurden verschiedene Lösungsmittel getestet, da Dimethylformamid (DMF¹⁰), das in praktisch allen Veröffentlichungen (z.B. Chen et al. (2014), Dixon et al. (2016), Xu et al. (2013)) genannt wurde, sehr giftig ist und nicht im vorhandenen Reinraum verwendet werden durfte. Propylencarbonat¹¹ erwies sich als ein exzellentes alternatives Lösungsmittel zu Dimethylformamid¹². Es besitzt einen geringeren Dampfdruck und ist außerdem gesundheitlich relativ unbedenklich. Es ließen sich Lösungen von bis zu 30 wt% herstellen und diese auch mittels Spincoating zu großflächig homogenen Schichten verarbeiten.

Die Spincoating Versuche zeigen stabile und präzise Spinkurven. Der geringe Dampfdruck führt zu kaum relevanter Verdunstung, weshalb die Schichtdicke reziprok zur Drehgeschwindigkeit angenommen werden kann (s. Abbildung A.1 und Abbildung 3.23).

Auch gleichmäßige Schichtdicken wurden auf den rechteckigen 50 mm × 80 mm Testsubstraten gemessen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus insgesamt drei Messwerten von drei Messpunkten P1 bis P3. P1 liegt mittig auf dem Substrat und somit auf der Achse des Spincoaters. P2 liegt auf halber Strecke zwischen Substratmitte und der Mitte der kurzen Kante. P3 liegt 10 mm entfernt von der kurzen Kante auf der Geraden durch P1 und P2.

Erste Versuche mit 1,5 µm CEP auf den DMF-Chips waren nur bedingt erfolgreich. Die benötigte Spannung zum Bewegen eines Wassertropfens fiel im Vergleich zu 4,2 µm mr-L 5005 von 120V auf unter 40V ab, was ein sehr gutes Ergebnis ist und dem erwarteten Größenbereich entspricht. Allerdings zeigten sich innerhalb kürzester Zeit Durchbrüche.

Verschiedene Gründe könnten dafür verantwortlich sein: mechanische Belastung im Testbett, Zersetzung der Schicht durch verwendete Fluide (Wasser, aber auch TALEN Synthese Fluide), (Zer-)Störungen beim Beschichten mit Teflon oder allgemein hohe Fehlerraten (Pinholes, Luftblasen, Partikel) bei der Produktion.

Eine Messung mit dem Weißlichtinterferometer an einem durchgebrannten DMF-Chip zeigte eine sehr aufgeraute Oberfläche mit Gräben von vielen 100 nm (vgl. Schichtdicke 1500 nm), wobei eine frische Probe höchstens eine Rauheit R_a von 5 nm aufweist.

Um dem Problem direkt zu begegnen, wurden dickere Schichten von 5-10 µm CEP erzeugt. Dafür eignet sich eine 30 wt% Lösung, die jedoch grenzwertig hinsichtlich der Löslichkeit ist. Zudem gestaltet sich wiederum das Filtern vor dem Spincoating als sehr schwer. Eine zu geringe Porengröße lässt die extrem viskose Lösung nicht hindurch, hingegen ist die Filterwirkung großer Poren möglicherweise nicht mehr ausreichend, weshalb Staubpartikel teilweise in der Schicht verbleiben können.

Auch wenn die DMF-Chips mit einer 10 µm CEP Schicht innerhalb 1 h Betrieb noch Ausfallraten (dielektrischer Durchbruch) von über 50 % hatten, so blieben die übrigen 50 % stabil und konnten erfolgreich in den Experimenten zur Integration von Whispering Gallery Mode Mikrokelch Lasern (WGMML) eingesetzt werden (s. Kapitel 5).

¹⁰ Um Verwirrung zu vermeiden, wurde entschieden, weder die Chemikalie noch ihre Abkürzung zu verwenden.

¹¹ Propylencarbonat: Dampfdruck 4 Pa bei RT, verursacht schwere Augenreizung.

¹² Dimethylformamid: Dampfdruck 377 Pa bei RT, fortpflanzungsgefährdend, leicht- bzw. hoch-entzündlich, verursacht schwere Augenreizung, gefährlich beim Einatmen.

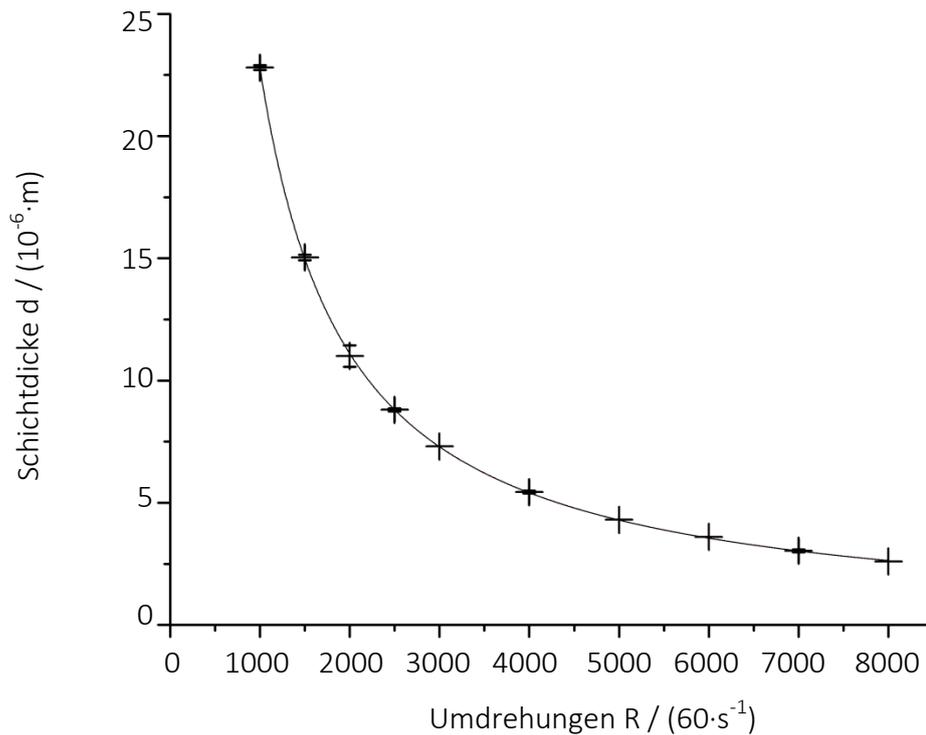


Abbildung 3.23: Spinkurve von 30 wt% CEP in Propylencarbonat

30 wt% CEP in Propylencarbonat eignet sich für Schichtdicken von 3-15 μm . Die Spinkurve kann beschrieben werden als $d = 29,53 \cdot R^{-1,04} \cdot [\text{m}]$.

3.3.5 Hydrophobe Beschichtung

Teflon eignet sich zwar nicht besonders als Dielektrikum, bietet sich aber als hervorragende hydrophobe Beschichtung an, da es sich leicht auf alle gängigen Dielektrika aufbringen lässt.

Alle hydrophoben Beschichtungen im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Teflon AF 1600 von DuPont hergestellt. Das Teflon wird in Konzentrationen zwischen 0,5-3 wt% in Fluoriniert FC-40 gelöst. Damit lassen sich Schichten zwischen 20 nm und wenigen 100 nm herstellen. Höhere Konzentrationen von über 3 wt% bis zu 10 wt% lassen sich ansetzen, aber nicht zu einer homogenen, großflächigen Beschichtung verarbeiten.

Eine 1 wt% Lösung bildet bei 1000 rpm für 60 s mit 150 rpm/s nach dem Verdunsten des Lösungsmittels eine etwa 80-100 nm dünne und großflächig homogene Schicht (s. Abbildung 3.24). Das FC-40 verdunstet sichtbar schon während des Spinvorgangs, es besitzt einen Dampfdruck 287 Pa. Daher ist es schwer, einen Kurvenverlauf für die Funktion der Schichtdicke in Abhängigkeit der Drehgeschwindigkeit vorauszusagen.

Nach dem Spincoating sollte das Teflon über die Glasübergangstemperatur erhitzt werden, damit ein Reflow Prozess einsetzt. Teflon AF 1600 hat eine Glasübergangstemperatur von 160 °C. Daher wurden die meisten DMF-Chips auf einer Hotplate bei 165-170 °C für 10 min gebacken.

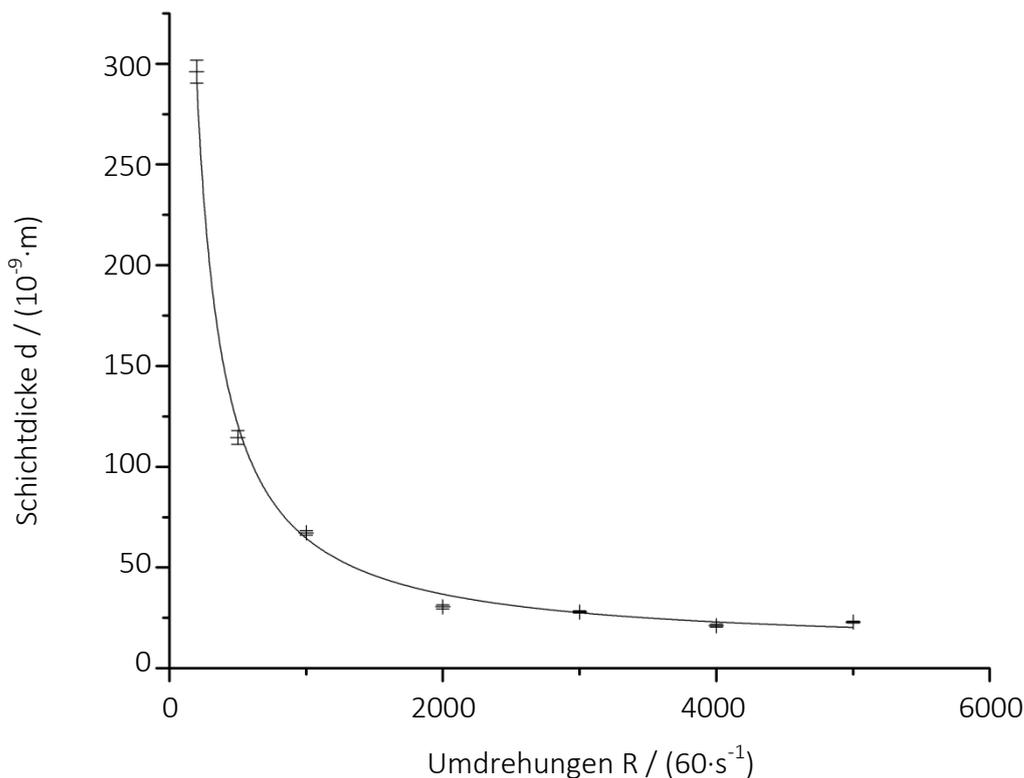


Abbildung 3.24: Spinkurve von 1 wt% Teflon AF 1600 in Fluorinert FC-40

1 wt% Teflon AF 1600 in Fluorinert FC-40 eignet sich für Schichtdicken von 20-100 nm. Schichtdicken unterhalb von 50 nm sind schlecht reproduzierbar. Die Spinkurve kann beschrieben werden als $d = (9,55 + 61323 \cdot R^{-1,02}) \cdot 10^{-9} \cdot [m]$.

Eine Ausnahme bildeten Versuche mit PET-Folie auf bedruckten DMF-Chips aus Papier. Temperaturen ab 100-150 °C erzeugten zu starke innere Spannungen in der Folie und führten zum Verziehen und Verbiegen der Papier-Chips.

Prinzipiell lässt sich auch eine Teflonschicht ohne Reflow einsetzen, aber die Erfahrung zeigt, dass nach längerer Zeit (Stunden bis Tage) die Hydrophobie abnimmt und es so zur Verringerung der Tropfenbeweglichkeit kommen kann. Kurzfristig stellt das jedoch kein Problem dar (vgl. Tabelle 3.1).

In Abbildung 3.25 ist eine REM-Aufnahme eines Glassubstrats (gewöhnlicher Objektträger) zu sehen, auf dem sich eine Teflonschicht von etwa 100 nm befindet. Die Schicht wurde mit einer Skalpellklinge zerkratzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Teflonschicht komplett durchgeschnitten wurde und das Glas nicht beschädigt wird. Dies wurde mit Rasterkraftmikroskop (AFM) und Weißlichtinterferometer (WLI) zuvor überprüft. Die Skalpellklingen beschädigen nicht die Glasoberfläche.

Messungen mit dem Weißlichtinterferometer haben gezeigt, dass Teflon eine extrem glatte Oberfläche bildet, die der Qualität der unterliegenden Glasoberfläche entspricht. Das Teflon verhält sich wie eine hauchdünne Folie, die sich mechanisch von der Glasoberfläche lösen lässt. Die Filamente an den Rändern der Kratzer lassen erkennen, dass das Teflon nicht einfach eingeschnitten wurde, sondern auch weggedrückt, teils abgerissen, oder wie oben links

zu sehen ähnlich einer leicht adhäsiven Folie vom Glas abgezogen wurde. Die Teflonoberfläche übersteht problemlos die Berührung mit Fingern oder Laborhandschuhen. Erst starke Scherkräfte beim Wischen mit einem Labortuch oder das leichte Berühren mit spitzen und harten Gegenständen (Skalpell) zerstören die Oberfläche.

Tabelle 3.1: Kontaktwinkel eines 3 μl Wassertropfens auf verschiedenen Teflonoberflächen

Kontaktwinkel wenige Stunden nach dem Spincoating. Kontaktwinkelmessungen sind sehr empfindlich und sind nicht ohne weiteres mit Messungen anderer Quellen (Personen, Geräte) vergleichbar.

	Statisch Grad	Vorrückwinkel Grad	Rückzugswinkel Grad
An Luft getrocknet, Raumtemperatur	121,7	124,8	114,3
Heizplatte 30s 170°C	122,1	125,4	115,7
Heizplatte 600s 170°C	122,3	124,0	114,5

Daher lässt sich die Oberfläche mit Aceton, Isopropanol, Wasser und Druckluft sehr gut und zerstörungsfrei reinigen. Das Teflon kann mit einem Labortuch leicht entfernt werden, wenn das Dielektrikum entsprechend stabil ist. SU-8 stellt kein Problem dar, ebenso leicht lässt sich eine PET-Folie vom Teflon befreien. Das CEP bildete eine weichere Schicht, die leicht zerkratzt werden kann. Aber dafür lässt sich CEP auch vollständig entfernen (Aceton als Lösemittel) und leicht neu auftragen.

Bei genauerer Betrachtung lassen sich mehrere Rechtecke in der Teflonoberfläche am oberen Rand der REM-Aufnahme in Abbildung 3.25 erkennen. Diese entsprechen den Bereichen, in welchen zuvor von dieser REM-Aufnahme bereits andere Aufnahmen angefertigt wurden. Bei den Rechtecken handelt es sich nicht um optische Effekte, sondern stellen sich als physikalische vorhandene Vertiefungen im Teflon heraus. Weitere Informationen zur Strukturierung von Teflon mit Elektronenstrahlen können Karre et al. (2009), Khan et al. (2008) und Shaali et al. (2015) entnommen werden.

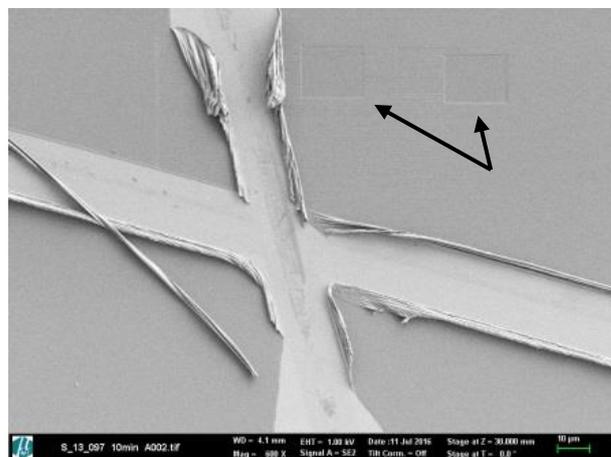


Abbildung 3.25: REM-Aufnahme einer mit Skalpell angekratzten Teflonschicht auf Objektträger

Die schwach sichtbaren Rechtecke (Pfeile) sind durch vorherige REM-Aufnahmen entstandene Vertiefungen in der Teflonschicht.

3.3.6 Prüfung der Schichtdicken

Die REM-Aufnahme (s. Abbildung 3.26) zeigt die vier Schichten eines DMF-Chips. Zuoberst befindet sich die hydrophobe Beschichtung aus Teflon. Darunter liegt das Dielektrikum aus mr-L 5005. Diesem folgte die elektrisch leitfähige Schicht aus Chrom. Das Basissubstrat besteht aus Glas. Die Chromschicht kann als hell leuchtende Linie zwischen Glas (unterste Schicht) und Dielektrikum (dickste, sich vom Glas deutlich absetzende Schicht) erkannt werden. In der linken unteren Ecke fehlt ein dreieckiges Stück der Dielektrikumsschicht, darunter kommt (sehr hell) die Chromschicht zum Vorschein. Die Teflonschicht erscheint als filigrane, ausgefranste Folie über der Dielektrikumsschicht.

Die Teflonschicht ist mit den zu erwartenden 20-100 nm um ein bis zwei Größenordnung kleiner als die Dielektrikumsschicht. Die Dielektrikumsschicht (hier mr-L 5005) hat laut Spin-Kurve eine Stärke von $4,2\ \mu\text{m}$, bei den Parametern Geschwindigkeit 3000 rpm, Beschleunigung 1500 rpm/s und Zeit 60s. Unter Berücksichtigung des Winkels der REM Aufnahmen stimmt die Größenordnung ($3\text{-}5\ \mu\text{m}$). Die Chrom-Schicht ist laut Hersteller 200 nm dick. Auch diese Angabe erscheint durch den Vergleich der Dielektrikumsschicht richtig.

Diese Aufnahme bestätigt die auch mit anderen Methoden wie Weißlichtinterferometer, Profilometer und Ellipsometer zuvor ermittelten Größen (-ordnungen) der Materialschichten.

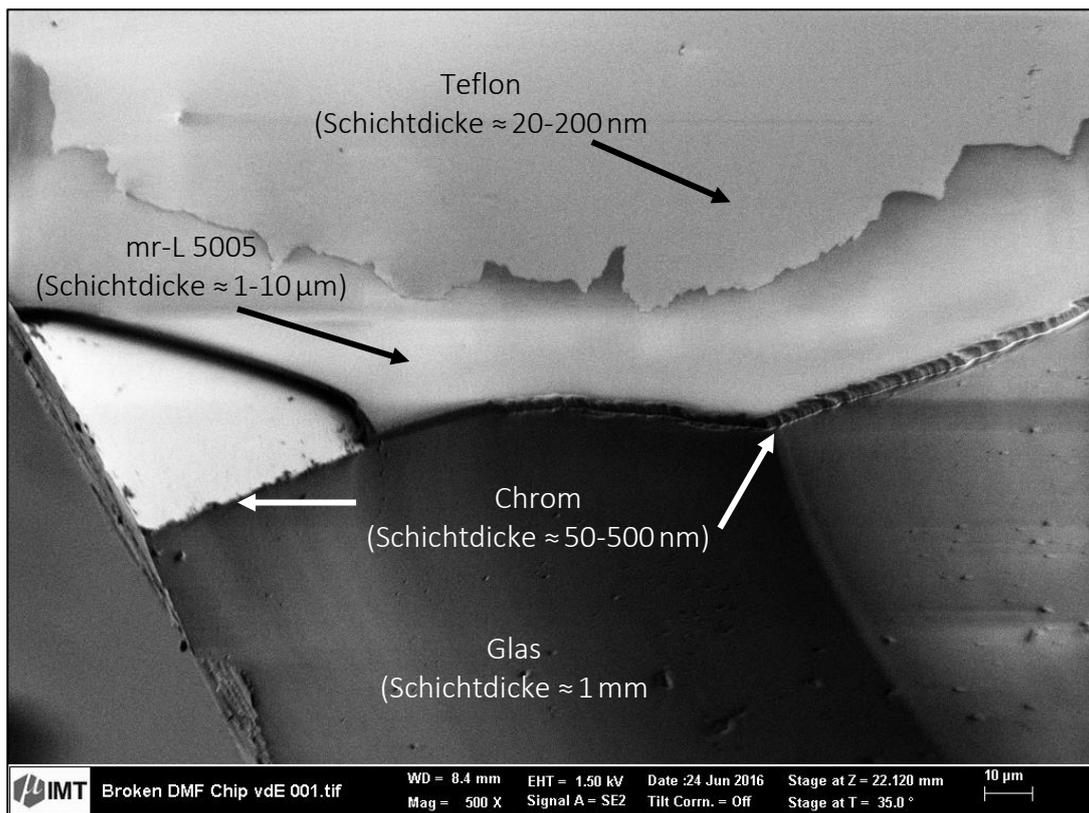


Abbildung 3.26: REM-Aufnahme der Bruchkante eines DMF-Chips zeigt dessen Schichtdicken

Der Chip besteht aus 1 mm Glas als mechanisch stabiles Basissubstrat, einer Chromschicht (200 nm laut Hersteller), einer dielektrischen Schicht aus mr-L 5005 ($4,2\ \mu\text{m}$) und einer Teflonschicht von 50-100 nm (Messewerte schwanken je nach Gerät: Weißlichtinterferometer, Profilometer und Ellipsometer). Der Bildausschnitt hat eine horizontale Ausdehnung von ca. $200\ \mu\text{m}$.

4 Frei programmierbare Synthese einer TALEN-Bindedomäne auf der DMF-Plattform

Der verwendete DMF-Chip hat das Elektrodenlayout 10R4xDMF (s. Abschnitt 3.3.1 und Abbildung 4.1), bestehend aus 98 Elektroden. Davon sind 68 Matrixelektroden ($2,23 \times 2,23 \text{ mm}^2$ mit $2,25 \text{ mm}$ Pitch), zehn Reservoir Elektroden mit je zwei Dosierelektroden. Das Grunddesign basiert auf Jebrail et al. (2010).

Nicht alle Flüssigkeiten waren - obgleich mit DMF handhabbar - von vornherein für DMF geeignet. Wasser stellt die Referenz dar und ließ sich unter allen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Flüssigkeiten am schnellsten und stabilsten bewegen. DNA-Repeat-, Terminator- und Blocker-Lösungen besitzen die gleiche Beweglichkeit wie Wasser. Der „Rapid Ligation“ RL-Puffer besitzt eine schlechtere, aber stabile Beweglichkeit. Der „Binding-and-Wash“ BW-Puffer war in seiner ursprünglichen Zusammensetzung ungeeignet. Ligase ist gänzlich unbeweglich auf den verwendeten DMF-Chips.

Sechs Proben wurden, wie im Ablaufdiagramm (vgl. Abbildung 1.1 und Abbildung 4.7h) schematisch gezeigt und in Abschnitt 2.1 bereits beschrieben, hergestellt und werden im Folgenden beschrieben. Vier der Proben wurden auf dem DMF-Chip erzeugt (Probe „DMF₁“ bis „DMF₄“ mit Pluronic 64), während die Probe „M_P“ mit Pluronic 64 und die Probe „M_T“ mit Tween 20 als Referenz auf konventionelle Weise manuell hergestellt wurden. Die zur Tropfenmanipulation auf dem DMF-Chip verwendeten Spannungen lagen zwischen 100V und 200V bei einer Frequenz von 10kHz (s. Abbildung 4.7). Die Ergebnisse der Gelelektrophoreseprüfung als Nachweis der erfolgreichen Ligation werden im Abschnitt 4.3.3 gezeigt.

4.1 Der verwendete DMF-Chip

Das Bodensubstrat wurde auf einem 1mm Borofloat Wafer mit einer 200nm PVD Chromschicht (Active Business Company GmbH) hergestellt. Das Chrom wurde lithografisch strukturiert (UV Maske von Compugraphics Jena GmbH, Resistlack AZ1505 und Chromium Etchant N°1 vom MicroChemicals GmbH). Die Kontaktpads wurden mit selbstklebender Kaptonfolie abgedeckt. Die dielektrische Schicht wurde aus mr-L 5005 (ähnlich SU-8, micro resist technology GmbH) mittels Spincoating ($4,2 \mu\text{m}$: 3000 rpm, 1500 rpm/s, 60s) aufgebracht. Die Kaptonfolie wurde entfernt und der Resistlack bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$ über 10 min ausgehärtet und anschließend flutbelichtet. Mit einer neuen Kaptonfolie wurden die Kontaktpads abgeklebt und die hydrophobe Schicht aus 1 wt% Teflon AF 1600 (DuPont) in Fluorinert FC-40 (Sigma-Aldrich) via Spincoating (1000 rpm, 150 rpm/s, 60s) erzeugt und auf einer Heizplatte ausgehärtet ($165 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 min).

Das Deckelsubstrat besteht aus einem einseitig mit ITO-beschichteten Glasstreifen (Delta Technologies, Limited), der die gleiche hydrophobe Beschichtung wie das Bodensubstrat erhält. Zusätzlich wurden auch die Seiten in Teflonlösung getaucht, um die Befüllung von der Seite zu optimieren. Ohne diese Seitenbeschichtung kann es passieren, dass die elektrostatischen Kräfte nicht ausreichen, um den Tropfen vollends zwischen Boden und Deckel zu ziehen, da dieser an den hydrophilen Seiten des Deckels hängen bleibt (s. Abschnitt 2.5).

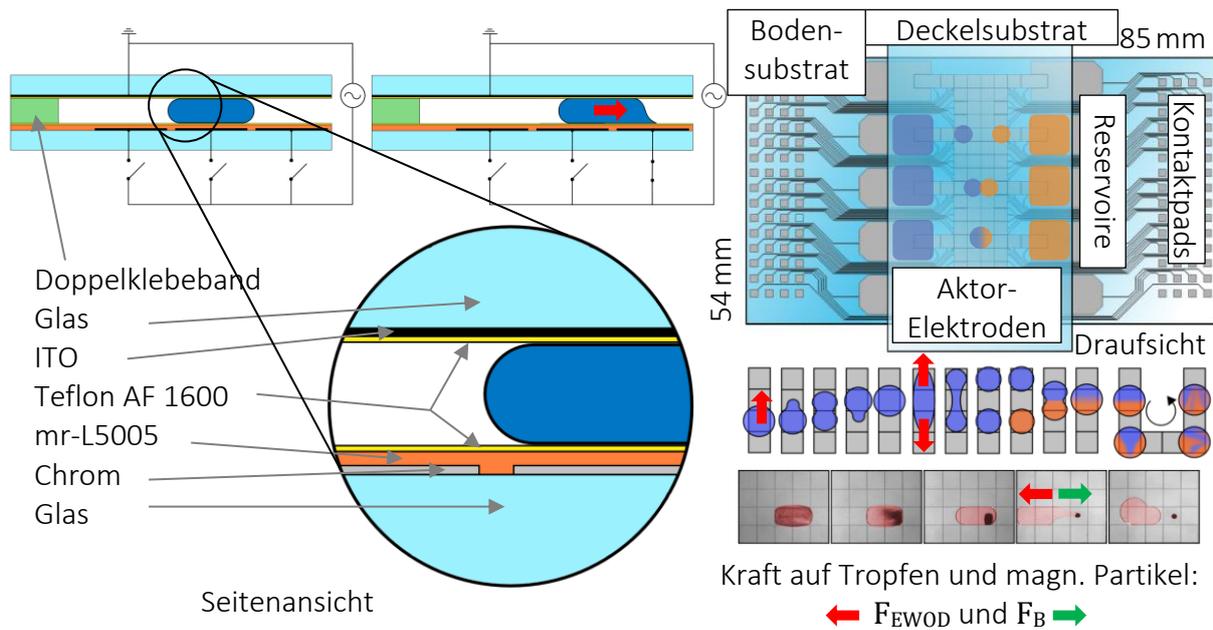


Abbildung 4.1: Funktionalität und Aufbau des DMF-Chips zur Umsetzung des ICA-Protokolls

Das Chipdesign basiert auf Jebrail et al. (2010). Neben der standardmäßigen Tropfenbewegung muss auch ein externes System zur Kontrolle der magnetischen Beads implementiert sein.

Der Abstandhalter und das Chip Bonding werden mit doppelseitigem Klebeband (Scotchtape von 3M, hier $130\ \mu\text{m}$) realisiert, das eine einfache und wieder trennbare Verbindung mit definiertem Abstand zwischen Deckel- und Bodensubstrat erzeugt.

4.2 Optimierung der Tropfenbeweglichkeit

Das Tensid Tween 20 aus dem originalen ICA-Protokoll wurde durch Pluronic 64 ersetzt. Es war anzunehmen¹³, dass der Austausch des Tensids hinsichtlich der Ligation keine Probleme verursachen sollte. Die Ergebnisse zeigten (Abbildung 4.7 und Abbildung 4.7) keine negativen Auswirkungen auf den Erfolg der Ligationen mit Tween 20 und Pluronic 64, aber es konnte eine große Verbesserung der Tropfenbeweglichkeit erzielt werden.

Ein Tropfen wurde 50 Mal über vier Elektroden hin und wieder zurück bewegt. Die Kapazität einer Elektrode ist über die Zeit in den Graphen in den folgenden Abbildungen (Abbildung 4.2 bis Abbildung 4.5) aufgetragen. Zu sehen ist die 1., 2., 5., 25. und 50. Messung bzw. Überquerung einer Elektrode in gleicher Richtung. Die sich erhöhende Zeit zum vollständigen Bedecken der Elektrode ist ein Indikator des Biofouling (s. Abschnitte 2.2.3 und 2.5.6). Als Referenz wird hier eine Messung mit destilliertem Wasser auf demselben Chip abgebildet (kein Biofouling, ca. 70 ms für 2,25 mm). Geringfügige Zunahmen der Geschwindigkeit lassen sich auf die Verdunstung der Tropfen zurückführen.

¹³ Der Autor von Briggs et al. (2012) äußerte sich auf Anfrage, dass das Tensid Tween 20 nur der Reduzierung unspezifischer Bindungen während des Ligationsprozesses dient. Dies entspricht dem Biofouling in der DMF.

Für jede Bewegung zwischen zwei Elektroden wurde eine Wartezeit von 1 s gesetzt und die „Feedback Results“ wurden in der DropBot Software aktiviert. Das bedeutet, dass, auch wenn die Bewegung an sich schneller abläuft, insgesamt von der Aktivierung der Elektrode bis zur Deaktivierung 1 s gewartet wird. Und es bedeutet ferner, dass, sollte die Bewegung länger als 1 s dauern, die Software auf die Beendigung der Bewegung wartet, bevor die Elektrode deaktiviert wird. Die Beendigung der Bewegung errechnet die Software aus der Kapazitätsänderung, die abhängig von der vom Tropfen bedeckten Elektrodenfläche bzw. dem darüber von ihm ausgefüllten Volumen ist.

50 Wiederholungen mit je 6 Bewegungen ergeben eine Gesamtzeit von mindestens 5 min. Diese Gesamtzeit ist nicht willkürlich gewählt. Es wurde vorher gemessen, dass die Bewegungszeit des BW-Puffers bis zu knapp über 1 s anwachsen kann. Daher wurde 1 s gewählt, um besonders zu Anfang genügend Sicherheit für eine unterbrechungsfreie Messung zu haben. Für eine Messung mit reinem Wasser, oder Wasser mit geringer Zugabe von Tensid (z.B. 0,05 vol% Pluronic 64) dürfte eine Gesamtzeit von 500 ms ausreichend sein.

Der für die Messungen der Tropfenbeweglichkeit verwendete DMF-Chip hat das Layout 10R4xDMF. Die dielektrische Schicht bestand aus 9 µm mr-X 10 Resistlack und die hydrophobe Schicht aus 100 nm Teflon AF 1600. Der Abstand zwischen Boden und Deckel betrug 130 µm.

Um eine Vergleichbarkeit zu anderen DMF-Chips oder Flüssigkeiten zu haben, ist es sinnvoll, eine Referenzmessung mit Wasser (Abbildung 4.2) bei sonst gleichen Bedingungen durchzuführen. Und um eine Aussage der Wirkung der Tenside auf die Tropfenkinetik zu erhalten, wurde ein BW-Puffer¹⁴ ohne Tensid zum Vergleich herangezogen (Abbildung 4.3).

Die BW-Puffer mit Tween 20 (Abbildung 4.4) bzw. Pluronic 64 (Abbildung 4.5) sind 0,5-fach konzentrierte BW-Puffer, der Tensid-freie Puffer (Abbildung 4.3) ist zweifach konzentriert. Die Tropfengröße war 1,1 µl und diese wurden mit einer Wechselspannung von 160 V und 10 kHz bewegt.

Die ursprünglich 500 ms lange Bewegungszeit für 2,25 mm, gemessen auf derselben Elektrode, verdoppelte sich nach 50 Wiederholungen bei der Verwendung von Tween 20 (Abbildung 4.4). Mit Pluronic 64 trat nicht nur kein relevantes Biofouling mehr auf (100 ms zusätzlich bei anfänglichen 250 ms), sondern es verkürzte sich auch die Gesamtzeit der Bewegungen mit Pluronic 64 (250-350 ms auf 2,25 mm) im Vergleich zu Tween 20 (500-1000 ms auf 2,25 mm).

In Abbildung 4.6 sind die Bewegungskurven der jeweils 2. Bewegung der vier verglichenen Flüssigkeiten gegenübergestellt. Ein Tensid reduziert deutlich die Bewegungsgeschwindigkeit (Erreichen des Plateaus), wie es nach Abschnitt 2.2.3 zu erwarten war. Es ist interessant zu sehen, wie entscheidend die Wahl des richtigen Tensids und ggf. dessen Konzentration ist.

Der 0,5x-BW-Puffer (2x-BW-Puffer und Wasser im Verhältnis 1:3 gemischt) mit Tween 20 bewegt sich deutlich langsamer, als der reine Puffer, der sich wiederum gleich dem reinen Wasser verhält. Das Pluronic 64 zeigt insgesamt das bessere Ergebnis in Form einer besseren Beweglichkeit über die Zeit und auch einer höheren Geschwindigkeit und somit auf lange Sicht möglicherweise relevant verkürzten Versuchszeit.

¹⁴ Bedeutung von 0,5x und 2x konzentriert: 0,5x-konzentriert = 1 Teil 2x-BW-konzentriert + 3 Teile Wasser

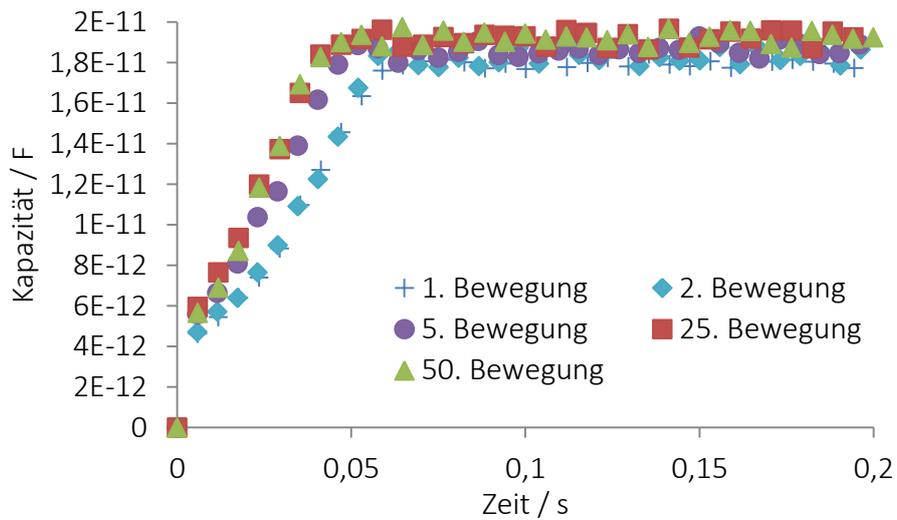


Abbildung 4.2: Tropfenbeweglichkeitsmessung von H₂O als Referenz

160 V Aktuationsspannung, 10 kHz Wechselstromfrequenz, 1,5 µl Tropfenvolumen, 2,25 mm Bewegungsdistanz bzw. Pitchabstand der Elektroden, 130 µm Abstand zwischen Boden und Deckel, 9 µm mr-X 10 als Dielektrikum und 100 nm Teflon AF 1600 als hydrophobe Beschichtung. Die 2. Bewegung hatte eine mittlere Geschwindigkeit von 38 (±4)mm/s.

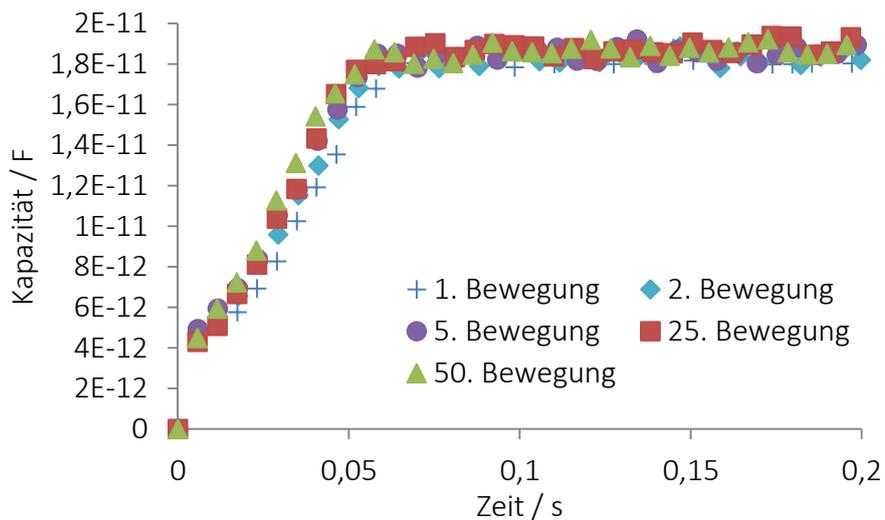


Abbildung 4.3: Tropfenbeweglichkeitsmessung von 2xBW-Puffer

160 V, 10 kHz, 1,5 µl, 2,25 mm, 130 µm, 9 µm mr-X 10, 100 nm Teflon AF 1600. Der 2xPuffer bewegt sich genauso gut wie reines Wasser. Die 2. Bewegung hatte eine mittlere Geschwindigkeit von 38 (±4)mm/s.

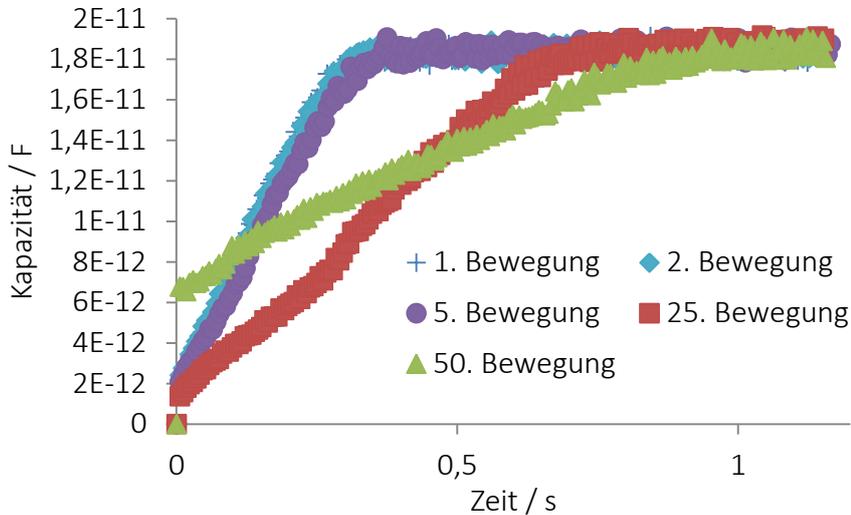


Abbildung 4.4: Tropfenbeweglichkeitsmessung von 0,5x BW-Puffer mit 0,05 vol% Tween 20

160 V, 10 kHz, 1,5 μ l, 2,25 mm, 130 μ m, 9 μ m mr-X 10, 100 nm Teflon AF 1600. Die 2. Bewegung hatte eine mittlere Geschwindigkeit von 6,4 (\pm 0,6)mm/s. Die 50. Bewegung hatte eine mittlere Geschwindigkeit von 2,3 (\pm 0,2)mm/s. Tween 20 ist hier nicht geeignet als Tensid in DMF-Chips.

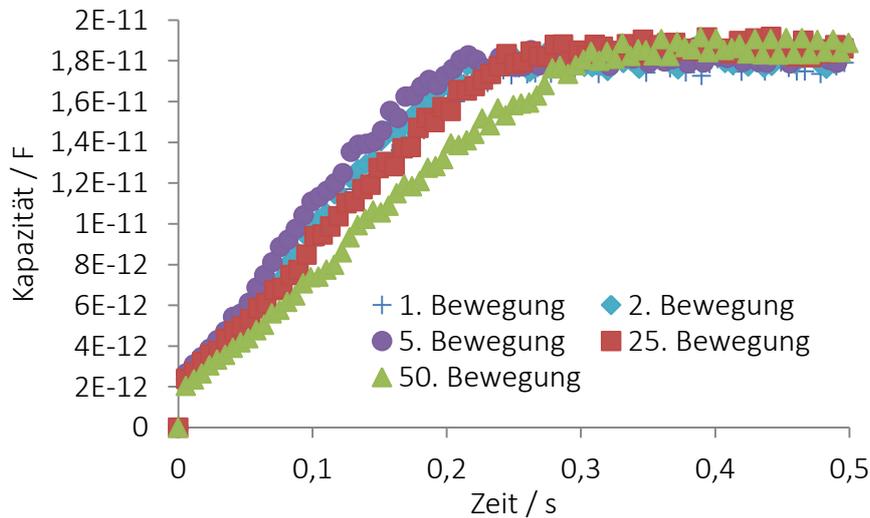


Abbildung 4.5: Tropfenbeweglichkeitsmessung von 0,5x BW-Puffer mit 0,05vol% Pluronic 64

160V, 10kHz, 1,5 μ l, 2,25 mm, 130 μ m, 9 μ m mr-X 10, 100 nm Teflon AF 1600. Die 2. Bewegung hatte eine mittlere Geschwindigkeit von 10 (\pm 1)mm/s. Die 50. Bewegung hatte eine mittlere Geschwindigkeit von 8 (\pm 1)mm/s. Der Puffer in Verbindung mit Pluronic 64 zeigt nur eine geringfügige Verschlechterung der Tropfenbeweglichkeit. Pluronic 64 ist aus Sicht der DMF ein besserer Ersatz für Tween 20.

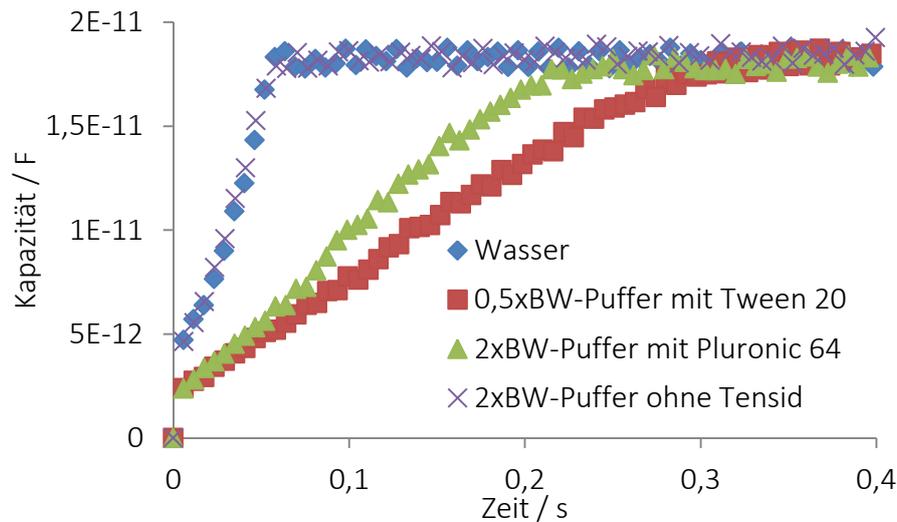


Abbildung 4.6: Vergleich der Tropfenbeweglichkeit

Die zuvor getesteten Flüssigkeiten werden anhand ihrer 2. Bewegung verglichen. Der Einsatz eines Tensids reduziert wie zu erwarten die Geschwindigkeit der Tropfenbewegung, aber kann dafür Stabilität hinsichtlich der Beweglichkeit bieten.

Der 0,5xBW Puffer sowie der 2xBW Puffer mit der originalen Zusammensetzung (2x konzentriert: 1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH8,0, 1 mM EDTA, 0,2 vol% Tween 20) blieb manchmal auf der Chipoberfläche hängen und zeigte immer eine abnehmende Tropfenbeweglichkeit auf von ihm bereits einmal passierten Elektroden. Das für DMF ungeeignete Verhalten konnte auf das Tensid Tween 20 zurückgeführt werden. Durch dessen Austausch mit Pluronic 64 konnte seine Beweglichkeit ausreichend verbessert werden.

RL-Puffer („Rapid Ligation Puffer“: 132 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 2 mM ATP, 15 % PEG 6000 pH 7,6) war langsam aber konstant bewegbar. T7 Ligase hingegen konnte nicht bewegt werden. Basierend auf dem ICA-Protokoll können Ligase mit Wasser und RL-Puffer zuvor vermischt werden, aber müssen dann binnen einer Stunde verwendet werden. Das Ergebnis ist der gut bewegliche „Ligase Mix“, für den keine Optimierung notwendig war.

4.3 Ligation der Bindedomäne im DMF-Chip

Für jede der sechs Proben wurden die Flüssigkeiten wie folgt vorbereitet: Von 5 µl Suspension bestehend aus Puffer und Streptavidin beschichteten magnetische Partikeln M-270 von der Firma Life Technologies wurden die Partikel abgetrennt.

Es wurden ein 0,5xBW-Puffer und 2xBW-Puffer mit Tween 20 und 0,5xBW-Puffer und ein 2xBW Puffer mit Pluronic 64 hergestellt. Die BW-Puffer wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Partikel wurden zwei Mal in 50 µl zweifach konzentriertem BW-Puffer („2xBW-Puffer“: 1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH8,0, 1 mM EDTA, 0,2 vol% Pluronic 64) gewaschen und anschließend in 5 µl 2xBW-Puffer resuspendiert.

Um das erste Kettenelement, das im Initiator enthalten ist, auf der mit Streptavidin beschichteten Oberfläche anzukoppeln, wurden 5 µl einer 10 µM Lösung von Initiator-Oligonukleotiden beigefügt, auf einem Vortexmischer für 30 min gemischt. Die Partikel wurden wieder ausgefällt und zweimal in 0,5xBW Puffer, der einem 2xBW-Puffer verdünnt in Wasser im Verhältnis 1:3 entspricht, gewaschen und in einem Mikroreaktionsgefäß in 0,5xBW Puffer resuspendiert. Das Mikroreaktionsgefäß mitsamt Inhalt wird anschließend auf Eis gelagert.

Der benötigte Ligase Mix besteht aus 10 Teilen RL Puffer, einem Teil T7 Ligase und fünf Teilen H₂O und wurde ebenso Eis gelagert wie die DNA-Repeats, die Blocker und die Terminatoren.

4.3.1 DMF-Proben mit Pluronic 64

Der Arbeitsablauf, der in Kapitel 1 beschrieben wurde, kann auf einem DMF-Chip nach den Schritten a bis g entsprechend der Abbildung 4.7 a bis g durchgeführt werden.

Der folgende Abschnitt beschreibt das praktische Experiment auf dem DMF-Chip und nimmt zur Verdeutlichung Bezug auf die Abbildung 4.7 a bis g. Die Tropfen wurden entsprechend des Diagramms der Protokollschritte (vgl. Abbildung 4.7h mit Abbildung 1.1) nachträglich digital eingefärbt. Es wurden insgesamt vier Proben (DMF₁, DMF₂, DMF₃ und DMF₄) nach demselben Vorgehen hergestellt, wie es im Folgenden protokolliert ist.

Schritt a: Die vorbereiteten Beads (schwarze Punkte bzw. Schemen) wurden in 5 µl BW-Puffer resuspendiert und auf dem DMF-Chip dosiert (roter Tropfen, teilweise zu sehen in a, vollständig in f bis g). Ein 1 µl Tropfen (gelb), bestehend aus einer 1:1 Mischung aus DNA-Repeat A und H₂O, um das Mischungsverhältnis zum Ligase Mix bei fehlender Blocker Lösung einzuhalten, wurde auf dem Chip dosiert. 4 µl des Ligase Mix (blauer Tropfen) aus T7 Ligase, RL-Puffer und H₂O werden auf dem Chip dosiert.

Schritt b: Die magnetischen Partikel werden mit Hilfe der magnetischen Linse ausgefällt und vom BW Puffer getrennt. Der Ligase Mix (blau) wird mit dem Tropfen (gelb) aus DNA-Repeats und Wasser in einem 5 µl Tropfen (grün) vereint und gemischt.

Schritt c und d: Die magnetischen Partikel werden vom dem 5 µl Tropfen (grün) aufgenommen, durch eine Kreisbewegung des Tropfens gleichmäßig in diesem verteilt und die Suspension anschließend für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Schritt e: Die magnetischen Partikel (schwarz) und der Tropfen (grün) werden getrennt, wobei aber signifikante Rückstände (<0,1 µl) der Flüssigkeit an den Partikel haften bleiben.

Schritt f und g: Die Partikel mit den flüssigen Rückständen (schwarz, grün) werden mit einem 5 µl Tropfen BW-Puffer (rot) aufgenommen, vermischt und anschließend wieder abgetrennt; dieser Waschschrift wurde zweimal durchgeführt, um die Konzentration der Rückstände (grün) hinreichend zu reduzieren. Ein weiterer Tropfen aus 5 µl BW-Puffer (rot) nimmt die Partikel auf. Die Suspension aus Partikel und BW-Puffer bildet die Basis für den nächsten Iterationsschritt (a' bis g').

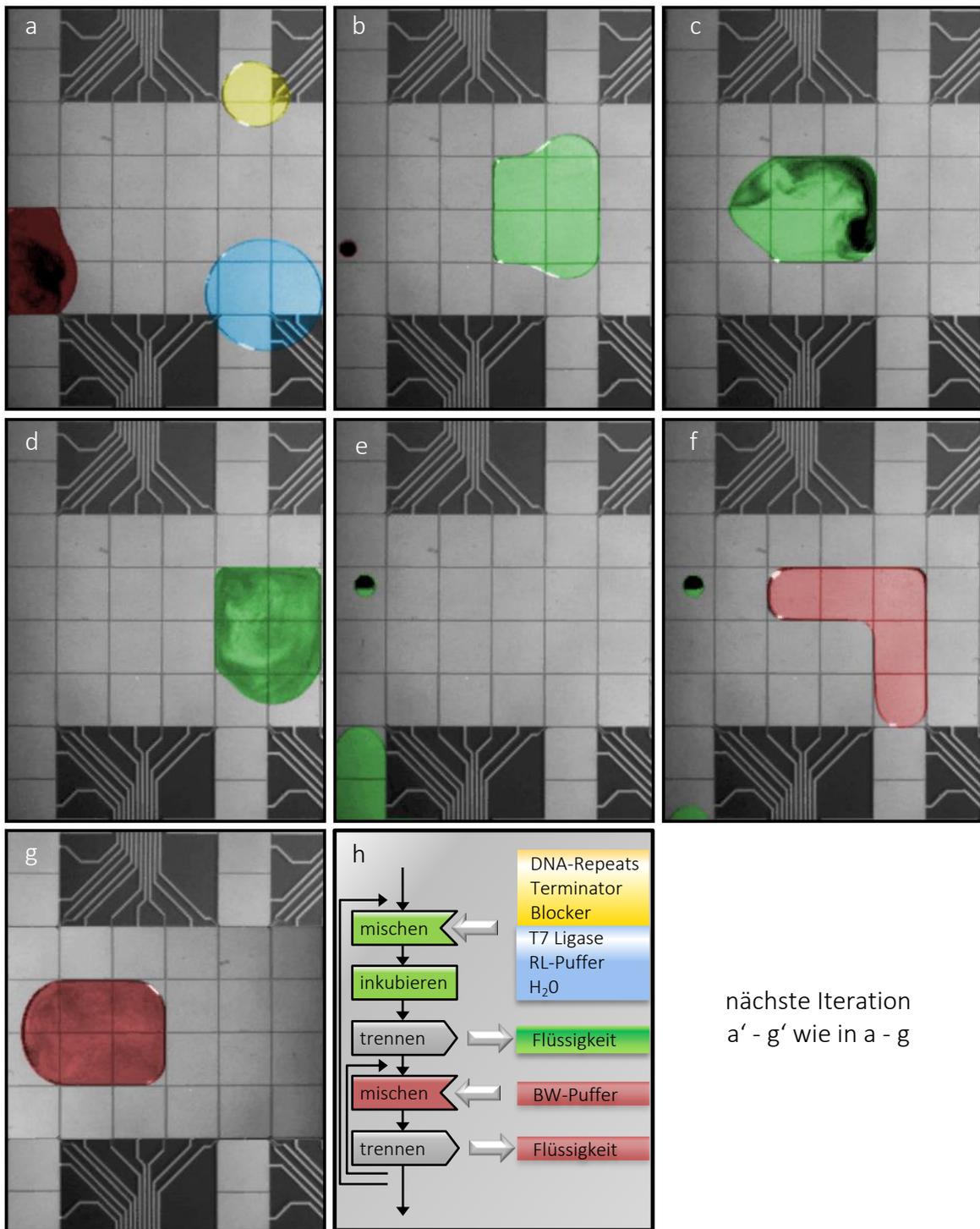


Abbildung 4.7: Ablauf der ICA-Ligation auf dem DMF-Chip

Die Tropfen (a bis g) wurden digital eingefärbt um der Illustration der Protokollschritte (h) zu entsprechen, das auf Abbildung 1.1 basiert. Alle Flüssigkeiten inklusive der magnetischen Partikel waren bewegbar und die iterative Ligation nach Briggs et al. (2012) konnte auf einem DMF-Chip erfolgreich durchgeführt werden. Die dielektrische Schicht bestand im Gegensatz zu den Tropfenbeweglichkeitsmessungen aus 4,2 μm mr-L 5005.

Schritt a': Die vorbereiteten Beads (schwarze Punkte bzw. Schemen) wurden in 5 μl BW-Puffer resuspendiert und auf dem DMF-Chip dosiert (roter Tropfen, teilweise zu sehen in a, vollständig in f bis g). Ein 1 μl Tropfen (gelb), bestehend aus einer 1:1 Mischung aus Terminator B und Blocker B wurde auf dem Chip dosiert. 4 μl des Ligase Mix (blauer Tropfen) aus T7 Ligase, RL-Puffer und H_2O werden auf dem Chip dosiert. (Abbildung 4.7a)

Schritt b': Die magnetischen Partikel werden mit Hilfe der magnetischen Linse ausgefällt und vom BW Puffer getrennt. Der Ligase Mix (blau) wird mit dem Tropfen (gelb) aus Terminatoren B und Blockern B in einem 5 μl Tropfen (grün) vereint und gemischt.

Schritt c' und d': Die magnetischen Partikel werden vom dem 5 μl Tropfen (grün) aufgenommen, durch eine Kreisbewegung des Tropfens gleichmäßig in diesem verteilt und die Suspension anschließend für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Schritt e': Die magnetischen Partikel (schwarz) und der Tropfen (grün) werden getrennt, wobei aber signifikante Rückstände ($<0,1 \mu\text{l}$) der Flüssigkeit an den Partikel haften verbleiben.

Schritt f' und g': Die Partikel mit den flüssigen Rückständen (schwarz, grün) werden mit einem 5 μl Tropfen BW-Puffer (rot) aufgenommen und vermischt und anschließend wieder abgetrennt; dieser Waschschritt wurde zweimal durchgeführt, um die Konzentration der Rückstände (grün) hinreichend zu reduzieren. Ein weiterer Tropfen aus 5 μl BW-Puffer (rot) nimmt die Partikel auf. Dieser Tropfen stellt das Endprodukt der Reaktion auf dem DMF-Chip dar. Dessen Deckelsubstrat wurde entfernt und der Tropfen mit einer Pipette aufgenommen.

4.3.2 Manuelle Referenzproben mit Tween 20 und Pluronic 64

Die manuellen Referenzproben (M_P und M_T), also nicht auf einem DMF-Chip durchgeführten Ligationen, erfüllen zwei Aufgaben. Zum einen sollen sie den Vergleich zwischen dem im Originalprotokoll aufgeführten Tween 20 (Probe M_T) und dem aufgrund der besseren Tropfenbeweglichkeit alternativen Tensid Pluronic 64 (Probe M_P) aus den Vorversuchen ermöglichen. Und zum anderen sollen die Ergebnisse der DMF-Proben mit diesen manuellen hergestellten Proben verglichen werden können.

Die manuellen Proben M_P und M_T wurden nach dem gleichen Ablauf hergestellt, wie die DMF-Proben, allerdings klassisch mit Pipetten, Mikroreaktionsgefäßen und Magnet-Rack und mit doppelten Fluidvolumina (10 μl), entsprechend dem Originalprotokoll: 5 μl RL-Puffer, 0,5 μl T7 Ligase, insgesamt 2 μl der entsprechenden Blocker und DNA-Repeats bzw. 2 μl der Terminatoren, 2,5 μl H_2O .

Die assemblierten Molekülketten aus allen sechs Proben sollten eine Länge von drei Monomeren (300 bp s. Abbildung 4.8) aufweisen (Initiator, DNA-Repeat und Terminator). Um dies zu überprüfen, wird eine Gelelektrophorese benötigt, die der Elution und PCR vorangeht.

4.3.3 Vergleich der Proben

Die Beads einer jeden der sechs Proben wurden jeweils zwei Mal in 50 μl H_2O in Mikroreaktionsgefäßen gewaschen (mit Magneten ausfällen und Flüssigkeit abpipettieren) und anschließend in 0,01 vol% Tween 20 in H_2O resuspendiert. Die sechs Suspensionen wurden für 3 min auf 95 °C gehalten, um die Molekülketten zu eluieren.

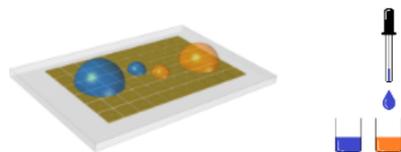
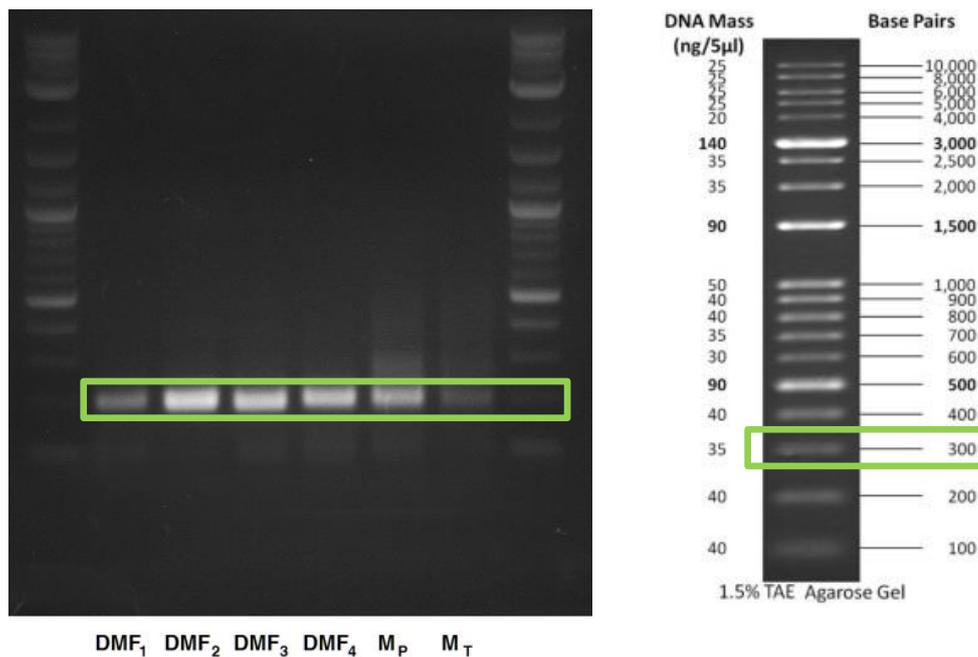


Abbildung 4.8: Ergebnis der Gelelektrophorese

Vergleich der manuellen Proben M_T (das originale Tensid Tween 20) und M_P (Pluronic 64) mit den vier DMF-Proben. Die gleiche Masse der sechs Proben zeigt, dass die Ligation der Bindedomäne auch auf einem DMF-Chip möglich ist und dass Pluronic 64 einen vorteilhaften Ersatz für Tween 20 darstellt, um eine Verbesserung der Fluidbeweglichkeit zu erzielen.

Die PCR der sechs Proben wurde bei 98 °C für 2 min initialisiert. Es folgten 28 Wiederholungen eines Zyklus bestehend aus jeweils drei zeitlich festgelegten Temperaturniveaus: 95 °C für 20s, dann 60 °C für 30s, dann 72 °C für 4s.

Nach der PCR wurden die TALEs in ein 1,5% TAE (TRIS-Acetat-EDTA) Agarose Gel gegeben (Abbildung 4.8). Die Massen der DMF-Proben (DMF_{1-4}) und die der manuellen Proben (M_P und M_T) erwiesen sich als gleich. Daraus lässt sich auf eine erfolgreiche Ligation schließen und zeigt die Machbarkeit einer Automatisierung der TALEN-Synthese auf DMF-Chips.

5 Integration von Whispering Gallery Mode Mikrokelch Lasern in digitale Mikrofluidik-Chips

In diesem Projekt wird die Integration eines großzahligen optischen Sensorarrays in eine einzelne Funktionszelle eines DMF-Systems demonstriert. Es wurden Whispering Gallery Mode Mikrokelch Laser (WGMML) in Felder von 10x10 Elementen hergestellt. Ein Feld hat eine Grundfläche von 1,9x1,9 mm². Die WGMML (s. Abbildung 5.1) können leicht in großer Anzahl hergestellt werden, indem ein Prozess aus kostengünstigem Spincoating, maskenbasierter optischer Lithografie, nasschemischem Ätzen und thermischem Reflow nach Wienhold et al. (2015) verwendet wird. Der hier gezeigte Sensorchip beinhaltet 50 dieser Sensorarrays und besitzt folglich eine Gesamtzahl von 5.000 integrierten Sensoren. von der Ecken et al. (2017)

Das Anregen und Auslesen (s. Abbildung 5.1a) der WGMML wird über eine einfache, frei im Raum befindliche Optik erreicht, die eine effiziente und parallele Adressierung auch großzahliger Felder ermöglicht. Die WGMML arbeiten im sichtbaren Spektrum des Lichts und eignen sich hervorragend für Messungen in wässriger Umgebung.

Die Funktionsfähigkeit des Systems wird sowohl für die Brechungsindexmessung im Tropfenvolumen von Glycerollösungen als auch für die markerfreie Detektion von Streptavidin mittels einer biotinylierten Resonatoroberfläche demonstriert.

5.1 Synergie von WGMML und DMF

Die markerfreie Detektion mittels WGMML, die erste kennzeichnende Technologie des integrierten Systems, basiert auf der Interaktion des evaneszenten Feldes der optischen Moden mit dem umgebenden Medium. Veränderungen in der Zusammensetzung und die optischen Eigenschaften des Umgebungsmediums führen zur Verschiebung der Resonanzwellenlängen des Mikroresonators, welche mit einer entsprechend präzisen Apparatur ausgelesen werden kann. Hervorgerufen wird die Phasenverschiebung des Wellenlängenspektrums entweder durch die Bindung von Molekülen auf Oberfläche der WGMML, oder durch eine Veränderung des Brechungsindex des umgebenden Volumens (Vollmer et al. (2008)). Die Phasenverschiebung wird durch die Messung der Transferfunktion des WGMML detektiert. Die Detektionsgrenze eines WGMML-Sensors hängt von der Linienbreite der Resonanz im Frequenzspektrum ab, wobei schmale Linienbreiten notwendig sind, um eine niedrige Detektionsgrenze zu erreichen. Foreman et al. (2015), Luchansky et al. (2011)

Die hier verwendeten WGMML sind durch einen Sockel vom Substrat getrennt, wodurch der thermische Reflow und somit ein hoher Qualitätsfaktor ermöglicht wird. Grossmann et al. (2010), Wienhold et al. (2015)

Die Ein- und Auskopplung von Licht in passive optische Elemente via evaneszenter Kopplung wird durch abgeschrägte optisch leitende Fasern erreicht. Die akkurate Herstellung einer abgeschrägten Faser ist ein schwieriger Prozess und deren Positionierung verlangt eine hohe Präzision. Zudem wird die Stabilität der Faser durch das Bewegen der Flüssigkeit beeinflusst (Su et al. (2016)). Daher ist diese Methode ungeeignet für die Massenproduktion, für die Integration in Fluidiksysteme und für die parallele Mehrkanaldetektion.

Um diese Defizite zu überwinden, werden mit Laserfarbstoff dotierte Resonatoren verwendet, die kontaktlose Anregung und kontaktloses Auslesen ermöglichen (Abbildung 5.1a). Grossmann et al. (2010)

Aufgrund des hohen Qualitätsfaktors der Resonatoren weisen WGMML eine niedrige Laserschwelle auf, wodurch eine Anregung durch Dioden-Laser möglich ist (Wienhold et al. (2015)). Des Weiteren ist die Linienbreite der Intensitätsspeaks des Laser-Spektrums schmaler als die der Resonanz-Linienbreite der passiven Gegenstücke (Coldren et al. (2012)). Diese Bauelemente können in großzahligen Feldern und mit geringeren Kosten als vergleichbare Siliziumbasierte Elemente hergestellt werden. Wienhold et al. (2015)

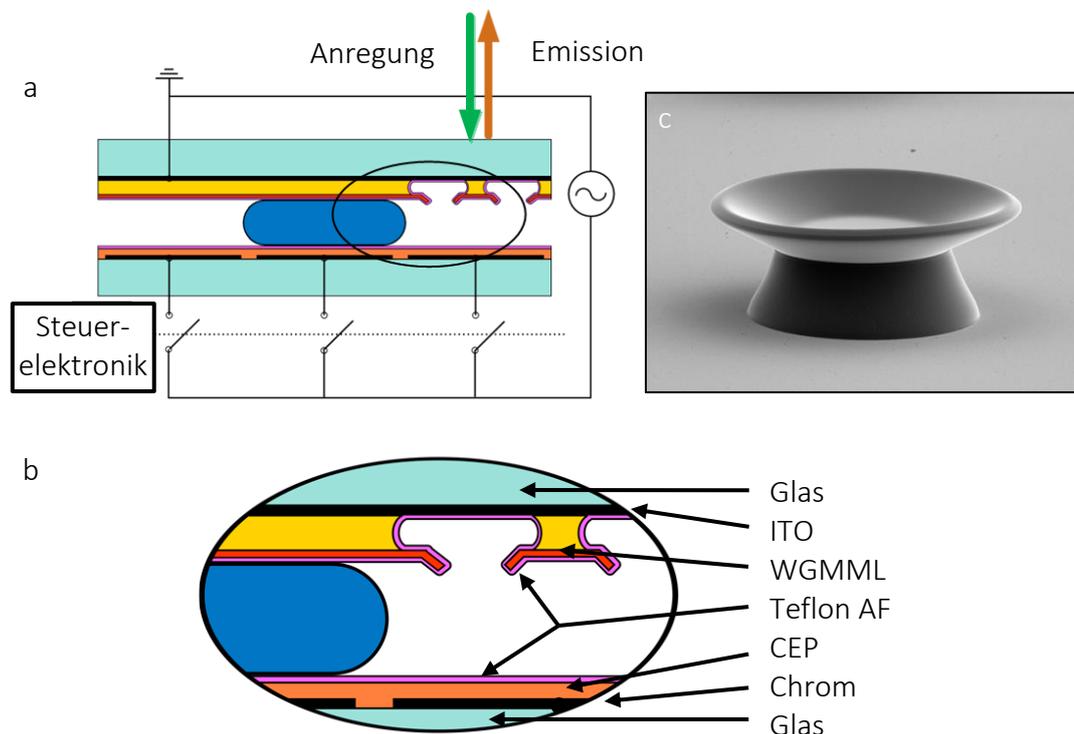


Abbildung 5.1: Funktionalität und Aufbau des DMF-Chips mit integrierten WGMML

a) Querschnitt durch den digitalen Mikrofluidik Chip mit integrierten Whispering Gallery Mode Mikrokelch Laser (WGMML). b) Eine Vergrößerung des DMF-Chips im Sensorfeld. (Bilder: Wondimu und von der Ecken) c) REM-Aufnahme eines WGMML. Seine Höhe beträgt etwa 8 µm. Wienhold et al. (2015)

Der zweite kennzeichnende Technologieteil des integrierten Systems ist ein digitaler Mikrofluidik-Chip. Die DMF-Technik ermöglicht das Steuern von Tropfen mit Volumen bis in den Pikoliterbereich (Lin et al. (2012)), wobei gängige Systeme wie dieses für den Bereich um einen Mikroliter ausgelegt sind. Für Messungen an solch kleinen Volumina eignen sich WGMML, da ihr Detektionssignal nicht vom Probenvolumen abhängt (White et al. (2008)).

Abbildung 5.1 zeigt ein seitliches Schnittbild des integrierten Systems. Es besteht aus einem Deckel- und einem Bodensubstrat. Das Deckelsubstrat ist ein einseitig mit ITO-beschichtetes Glas. Darauf wurden die WGMML, wie in Abbildung 5.2 gezeigt, hergestellt. Glas und ITO sind

optisch transparent und ermöglichen das berührungslose Pumpen der Laser und das Auslesen ihrer Signale. Auf dem Bodensubstrat befindet sich die Elektrodenmatrix der Aktor-Elektroden, die lokal begrenzte elektrische Felder mit der Gegenelektrode im Deckel erzeugt, die elektrostatische Kräfte zur Tropfenmanipulation induzieren. Die Elektroden auf dem Boden sind durch ein Dielektrikum elektrisch isoliert. Durch hydrophobe Beschichtungen auf Boden und Deckel reduzieren sich die Adhäsionskräfte zwischen Tropfen und Oberfläche soweit, dass die horizontale Komponente der elektrostatischen Kräfte (s. Abschnitt 2.3.2) die Bewegung der Tropfen ermöglicht.

Die Produktion der WGML auf ein Deckelsubstrat des DMF-Systems erfolgt über einen linearen Produktionsprozess und ist somit einfach in jeden gängigen DMF-Chip zu integrieren.

5.2 Der integrierte DMF-Chip

Der integrierte Chip besteht aus einem Deckelsubstrat, auf welchem sich die Whispering Gallery Mode Mikrokelch Laser (WGML) innerhalb von Microwells (s. Abschnitt 6.1) befinden, und einem Bodensubstrat mit den Aktor-Elektroden zur Flüssigkeitssteuerung.

5.2.1 Deckelsubstrat

Das Sensorfeld aus WGML auf dem Deckelsubstrat wurde nach der Methode aus Wienhold et al. (2015) hergestellt, die dies auf im Prinzip beliebigen Oberflächen ermöglicht (s. Ausblick Kapitel 7). In Abbildung 5.2a sind die Herstellungsschritte aufgezeigt.

Das Grundsubstrat, ein einseitig mit ITO beschichteter 75 mmx37,5 mm Glas-Chip (Delta Technologies LTD), wird mit Isopropanol und destilliertem Wasser gereinigt. Die erste Beschichtung besteht aus 3 μm Polymethylglutarimide (PMGI), ein Liftoff Photoresist (MicroChem Corp.), das mittels Spincoating aufgetragen wird. Darüber folgt eine Beschichtung aus 1,2 μm PMMA (MicroChem Corp.), dem der Laser-Farbstoff Pyrromethene 597 (Radiant Dyes Laser & Accessories GmbH) zugesetzt ist. Die Probe wird mit tiefem UV-Licht (DUV) der Dosis 4000 mJ/cm^2 belichtet. Methylisobutylketon und Isopropanol im Mischungsverhältnis 1:1 entwickelt das PMMA, wodurch sich die PMMA-Scheiben auf der PMGI-Schicht ausbilden. Darauf folgend wird das PMGI selektiv mit 101A Developer (MicroChem Corp.) geätzt, wobei die PMMA-Plättchen als Maske dienen und 10 μm unterätzt werden. Die PMMA-Plättchen liegen dadurch frei auf Sockeln aus PMGI.

Die hydrophobe Beschichtung des Deckelsubstrats besteht aus einer geschlossenen, also auch die Sensorfelder bedeckenden 100 nm dünnen Teflon AF 1600 (DuPont) Schicht (Abbildung 5.2c). Dafür wird eine Lösung aus 1 wt% Teflon AF 1600 in FC-40 (VWR) mittels Spincoating (1000 rpm, 150 rpm/s, 60 s) aufgetragen und bei 125 °C für 10 min gebacken. Dabei verdunstet das Lösungsmittel FC-40 und ein Reflow-Prozess der Resonatoren setzt ein, wodurch deren Kontur und Oberfläche eine hohe Qualität erzielen. Weder optisch noch unter dem REM lassen sich Unebenheiten erkennen (Abbildung 5.2d). Außerdem induzieren interne Spannungen die Verformung der Plättchen zu Kelchen, indem sich deren Ränder nach oben biegen (Abbildung 5.2a i bis v).

Das Teflon AF 1600 hat eine Glasübergangstemperatur von 160 °C, weshalb es hier nicht zu einem Reflow kommt. Durch den fehlenden Reflow des Teflons kann sich dessen Hydrophobie mit der Zeit (mehrere Stunden bis wenige Tage) verringern, was sich jedoch im Rahmen dieses Experimentes nicht relevant bemerkbar macht.

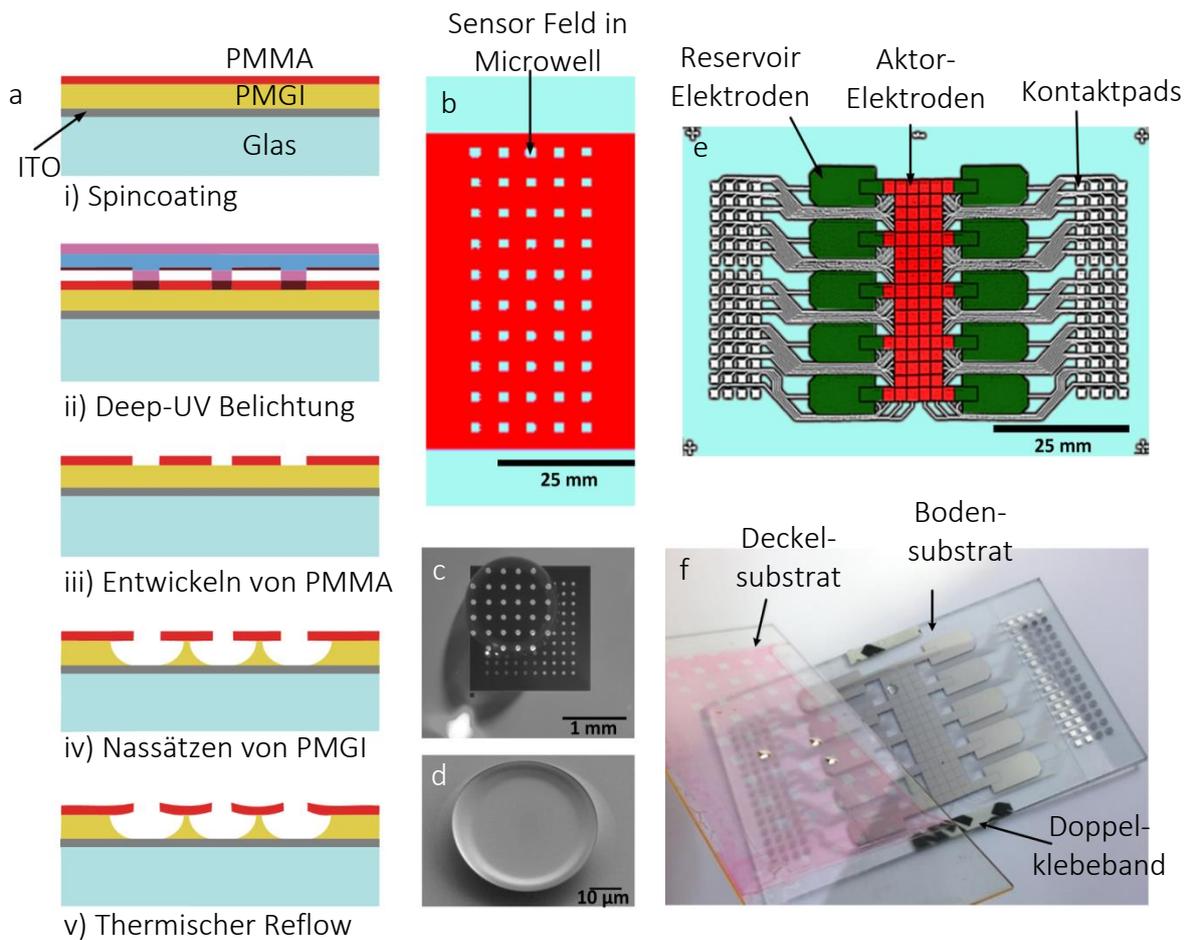


Abbildung 5.2: Herstellung der WGMML auf dem Deckelsubstrat

a) Das WGMML-Feld wird durch optische Lithografie auf dem Deckelsubstrat erzeugt. b) Deckelsubstrat: Jedes Quadrat enthält ein Feld von 10×10 WGMML. Die rote Umrandung ist die PMMA-Beschichtung. Über die roten Bereiche können Tropfen ungehindert bewegt werden, auch wenn diese zusätzliche Schicht eine Erhöhung der benötigten elektrischen Spannung bedingt. c) Obere Ansicht des Laser Feldes mit einem Wassertropfen. d) REM-Bild eines einzelnen WGMML von oben. e) Bodensubstrat: Die Aktuationselektroden (rot) und die Reservoir-Elektroden (grün) sind über Zuleitungen mit den Kontaktpads (weiß) verbunden. DMF-Chip Design 10R4xDMF s. Abschnitt 3.3.1 und Jebrail et al. (2010). f) Das Deckelsubstrat wurde mit einem $190 \mu\text{m}$ dicken doppelseitigen Klebeband mit dem Bodensubstrat verbunden. (Bilder: Wondimu und von der Ecken)

Eine weitere Eigenschaft der Sensorfelder rührt durch eine Randüberhöhung her, die ebenso wie die Wölbung der WGMML gebildet wird (Abbildung 5.2a i bis v). Diese Randüberhöhung bildet eine Barriere und formt zusammen mit der Vertiefung um die WGMML einen Microwell (s. Abschnitt 6.1). Die Barriere erlaubt einerseits eine effiziente Bewegung der Tropfen um die Sensorfelder herum und andererseits eine Möglichkeit zum Dosieren von Flüssigkeit unabhängig von der Elektrodengröße. Im Vergleich zu den „virtuellen“ Microwells aus Eydelnant et al. (2012), die aus einem hydrophilen Spot - also einem Loch im Teflon - bestehen, sind die „echten“ Microwells geometrisch geformt und können, wie im Experiment geschehen, mit Teflon beschichtet werden.

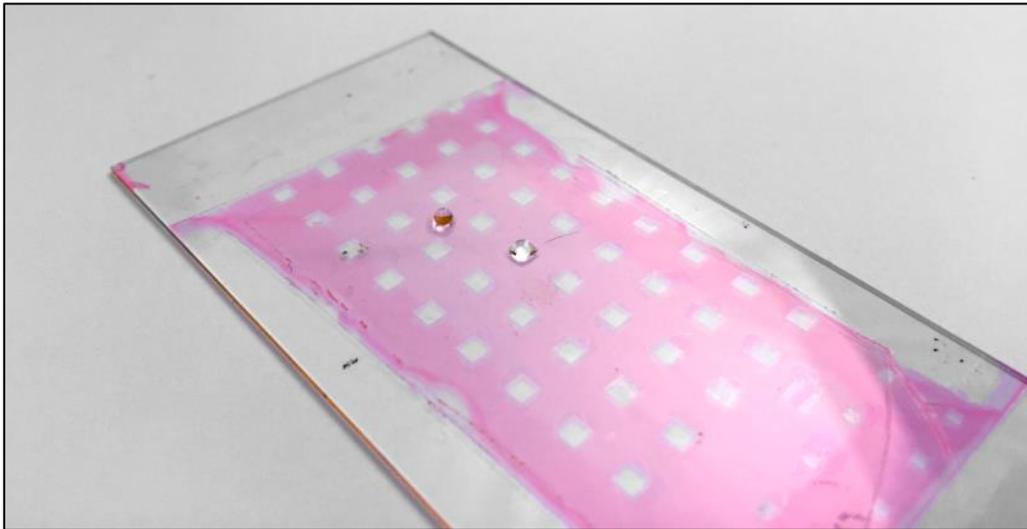


Abbildung 5.3: Deckelsubstrat mit WGMML-Feldern

Glas als mechanisch stabile Basis mit der durchsichtigen ITO Schicht als Gegenelektrode, den pinkfarbenen großflächigen Rückständen der Herstellung der ebenfalls pinkfarbenen, 8µm großen WGMML, die in den durchsichtigen Quadraten hier nicht zu sehen sind. Die Quadrate sind die „echten“ Microwells (s. Abschnitt 6.1): etwa 8µm tiefe Vertiefungen mit etwa 2 mm Kantenlänge und 100 Stück der erhabenen WGMML. Über allem liegt noch eine Schicht aus Teflon AF als hydrophobe Schicht. (Bild: Wondimu und von der Ecken)

Die an dieser Stelle des Experiments als Nebenprodukt entstandenen Microwells, sowie ihre zufällig entdeckten für die digitale Mikrofluidik praktischen Eigenschaften, werden in Abschnitt 6.1 beschrieben.

5.2.2 Oberflächenfunktionalisierung

Die Oberfläche wurde für 2 h mit 1,4 mM biotinyliertem BSA (Bovine Serum Albumin) inkubiert und mit 1% BS in PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) für 20 min geblockt, um unspezifische Bindungen zu unterbinden. Um die Oberflächenfunktionalisierung zu überprüfen, wurde die Oberfläche für 30 min Cy3-markiertem Streptavidin ausgesetzt. Zur Kontrolle wurde ein zweites Substrat mit Teflon beschichtet und derselben Prozedur, jedoch ohne die Biotinylierung, unterzogen (s. Tabelle 5.1).

„1fach“ verdünntes PBS vermischt mit 0,2 vol% des Tensids Pluronic 64 (VWR) wurde als Pufferlösung und als Basis aller Analyten eingesetzt. Die Verwendung des Tensids verbessert die Tropfenbeweglichkeit und verringert unspezifische Bindung auf DMF-Chips (s. Abschnitte 2.2.3 und 5.3.2). Die Streptavidinkonzentration für Beweglichkeitsversuche und zur Kontaktwinkelmessung betrug 30 µg/ml.

Die Mikroskopaufnahmen in Abbildung 5.4 zeigen Fluoreszenzbilder, wobei die rote Fläche die Streptavidinbeschichtung anzeigt, die der Biotinfunktionalisierung entspricht. Dies beweist die erfolgreiche Funktionalisierung der Oberfläche durch das verwendete Protokoll.

Tabelle 5.1: Name, Funktionalisierung und Fluoreszenzmarker der drei Proben.

Probenbezeichnung	Funktionalisierung	Fluoreszenzmarker
Funktionalisiert	BSA-Biotin	Cy3 Streptavidin
Kontrolle 1	-	Cy3 Streptavidin
Kontrolle 2	-	-

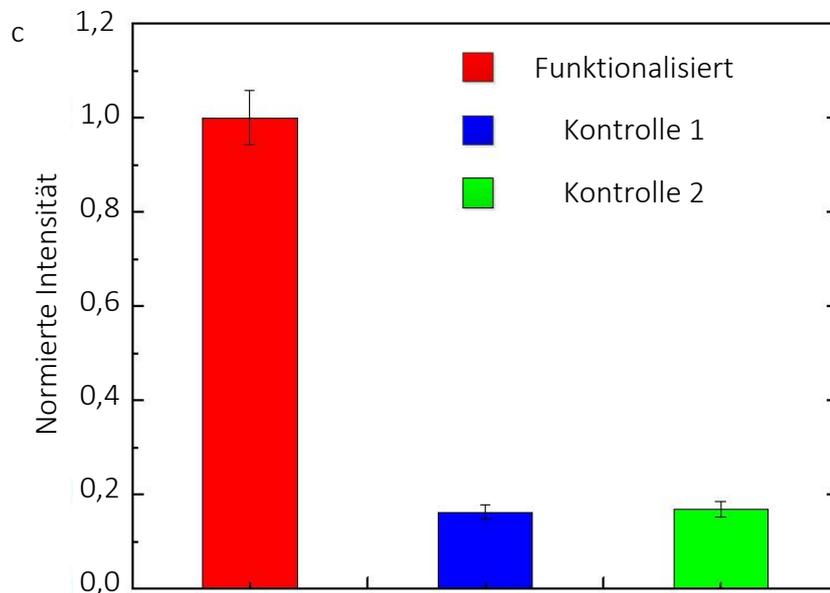
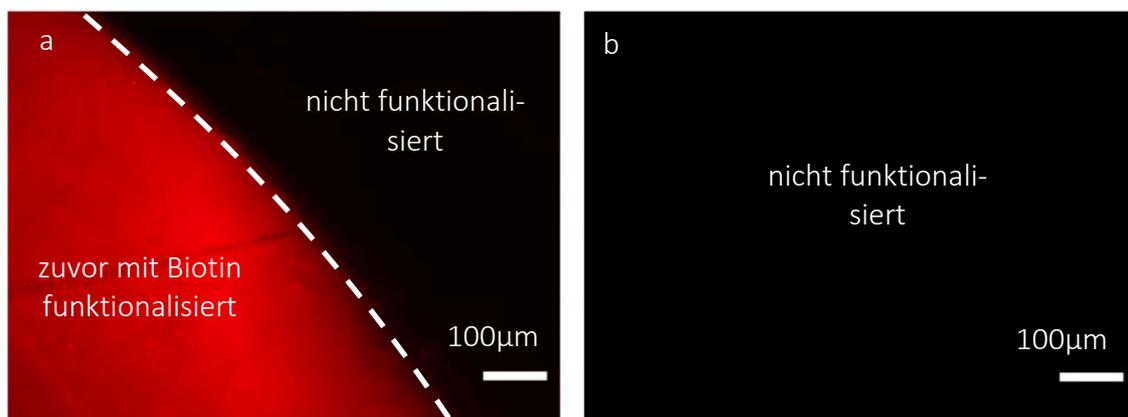


Abbildung 5.4: Funktionalisierung der Teflon-beschichteten Oberfläche

Mittels Fluoreszenzmikroskopie verifiziert. a) Ausschnitt der teilweise funktionalisierten Probe emittiert in diesem Bereich rotes Licht. b) Die Kontrollprobe zeigt keine Emission. c) Die normierten Intensitäten der Proben nebeneinander aufgetragen (Bild: Wondimu und von der Ecken)

5.2.3 Bodensubstrat

Als Basis für das Bodensubstrat dient ein 1 mm dicker Borofloat-Wafer mit einer 200 nm PVD-Chromschicht (Active Business Company GmbH). Die Aktor-Elektroden ($2,23 \times 2,23 \text{ mm}^2$ mit 2,25 mm Pitch, Abbildung 3.9, Abschnitt 3.3.1, Jebrail et al. (2010)) wurden via UV-Lithografie hergestellt. Die Substrate wurden mit AZ1505 (Microchemicals GmbH) beschichtet und per UV-Lithografie belichtet. Nach der Entwicklung wurden die Elektrodenstrukturen mit Chromium Etchant N°1 (MicroChemicals GmbH) geätzt.

Das Bodensubstrat wurde anschließend mit $7 \mu\text{m}$ Cyanoethyl Pullulan (CEP) als Dielektrikum beschichtet (s. Abschnitt 3.3.4 und Chen et al. (2014)), wobei die Kontaktpads mit Kaptonfolie abgeklebt wurden. Eine 30 wt%-ige Lösung aus Cyanoresin-S (Biddle Sawyer Corp.) in Propylencarbonat (VWR International GmbH) wurde dafür mittels Spincoater aufgebracht (Vorverteilen: 500 rpm, 100 rpm/s, 30 s. Finale Schichtdicke: 3100 rpm, 1000 rpm/s, 60 s). Die Kaptonfolie wurde entfernt und die frische CEP-Schicht wurde für 30 s ruhen gelassen und danach über Nacht bei 100°C gehärtet.

Die hydrophobe Beschichtung des Bodensubstrats erfolgte wie es auch im Abschnitt 5.2.1 zum Deckelsubstrat beschrieben wurde.

5.2.4 Inspektion der WGMMML

Im Unterschied zum normalen Herstellungsprozess (Wienhold et al. (2015)) der WGMMML wurde hier zuerst das Teflon aufgetragen und erst dann der Reflow durchgeführt, der den WGMMML ihre Form und somit physikalischen Eigenschaften verleiht.

Daher wurde die Struktur der Chipoberfläche und die erfolgreiche Herstellung der WGMMML mit einem Weißlichtinterferometer (WLI) geprüft. Mit einem WLI lässt sich ein Höhenprofil mit Genauigkeiten im Nanometerbereich messen, wobei sich auch große Flächen von mehreren Quadratzentimetern in verhältnismäßig kurzer Zeit - verglichen mit einem REM - vermessen lassen.

Die Abbildung 5.5a zeigt ein Höhenprofil eines WGMMML (vgl. Abbildung 5.5b) und der umgebenden Fläche (ca. $100 \times 200 \mu\text{m}^2$) in Farbdarstellung. Darin liegt eine horizontale und eine vertikale Messlinie, deren Höhenprofil in Abbildung 5.5c und Abbildung 5.5d aufgetragen ist. Das Höhenprofil gemittelt im roten Bereich (R) repräsentiert das Nulllevel und die Mittelung über den grünen Bereich das Messlevel (M).

Der Mikrokelch (repräsentativ für das gesamte Sensorfeld) hat eine Plateauhöhe von ca. $5,2 \mu\text{m}$ und eine Randhöhe von ca. $6,4 \mu\text{m}$ bezogen auf den Boden. Das entspricht auch den Werten der Messung der Randüberhöhung der Außenkontur der Microwells (s. Abschnitt 6.1).

Die Unebenheiten im Untergrund („Flecken“ auf der blauen Fläche) liegen unter 100 nm . Die Korona um den Mikrokelch ist ebenso auf den REM Bildern zu erkennen, wobei die Riffelung auf optisch bedingte Messfehler hindeutet.

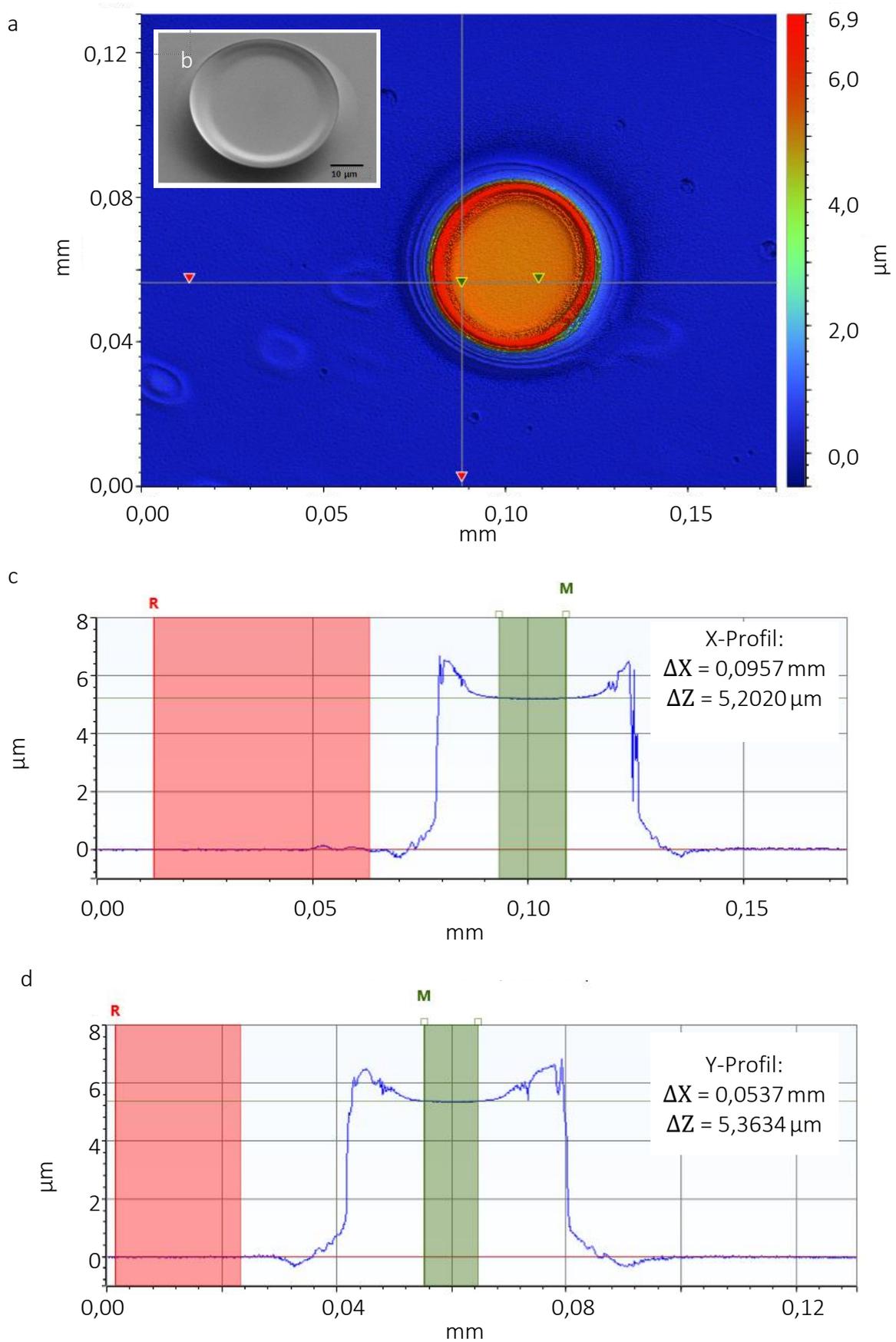


Abbildung 5.5: WLI -Messung eines WGMMML

a) WLI-Aufnahme eines WGMMML, Farbdarstellung des Höhenprofils. b) REM-Aufnahme eines WGMMML. c-d) Schnittprofil entlang der Linien durch die flächige Darstellung. (Bild: Wondimu und von der Ecken)

5.3 Optimierung der Tropfenbeweglichkeit

Zur Charakterisierung der Chips und zur Optimierung der Tropfenbeweglichkeit wurden die für das Experiment notwendigen Flüssigkeiten und verschiedenen möglichen Tenside (z.B. Poloxamer, Polysorbate, Octoxinol) unter identischen Bedingungen (u.a. Spannung, Frequenz, Tropfenvolumen) auf dem gleichen Chip (vor allem Elektrodenlayout und dielektrische Schicht) verglichen. Als Referenz diente wiederum destilliertes Wasser. Das Deckelsubstrat war ein Standard ITO Glas mit Teflonschicht.

Die Tropfenbeweglichkeit kann wie erwähnt (s. Abschnitt 2.5.6) durch die Maximalgeschwindigkeit des Tropfens oder durch die Zeit, die zum Erreichen der nächsten Position notwendig ist, also seiner durchschnittlichen Geschwindigkeit, charakterisiert werden. Die Geschwindigkeit ist die Ableitung der Kurve $C(t)$ aus der Kapazitätsmessung über die Zeit, ergo ist die Geschwindigkeit sensibel gegenüber Fluktuationen. Jedoch ist sie auch als (lokales) Maximum ein eindeutiger Wert. Die Endposition des Tropfens ist erreicht, wenn die Kurve $C(t)$ ihr Plateau erreicht. Die Höhe des Plateaus ist im Gegensatz zur Maximalgeschwindigkeit sehr stabil, aber der Beginn des Plateaus ist im Grunde willkürlich zu setzen, da sich die Kurve diesem asymptotisch nähert. Anstatt Chips über einen empfindlichen oder einen willkürlich definierten Wert zu vergleichen, ist ein Diagramm mit der Gegenüberstellung der Bewegungskurven aus wiederholten Versuchen vorzuziehen.

5.3.1 Referenzmessung zur Chip Charakterisierung

Zur Charakterisierung des verwendeten DMF-Chips wurde ein Wassertropfen von $1,5\ \mu\text{l}$ über vier Aktor-Elektroden 50 Mal hin und wieder zurück bewegt. Das Diagramm in Abbildung 5.6 zeigt die 1., 2., 5., 25. und 50. Bewegung in derselben Richtung eines Wassertropfens auf eine der vier Elektroden herauf. Der Messwert ist die Kapazität dieser Elektrode, die dem Grad der Benetzung der Elektrodenfläche bzw. vielmehr dem Füllen des Volumens zwischen Aktor-Elektrode und Deckelelektrode mit Wasser entspricht, und wird über der Zeit aufgetragen. Das Erreichen des Plateaus zeigt an, dass die Bewegung abgeschlossen ist.

Der zu messende Tropfen wurde neben der Elektrode abgesetzt, die auch zur 1. Bewegung aktiviert wird. Daher kann der Verlauf für die Bewertung ignoriert werden. Aufschlussreich wird es ab der 2. Bewegung auf diese Elektrode. Hier scheint es, dass die Tropfenbeweglichkeit mit der Zeit ein wenig zunimmt und die benötigte Zeit zur vollständigen Benetzung der Elektrode mit der Zeit sinkt. Dieses Verhalten lässt sich leicht durch die Graphen „2.“ bis „50.“ erklären. Die Gesamtzeit der 50 Wiederholungen beträgt etwa 10 min und ein Teil (etwa 5-10% bei normalen Laborbedingungen, 20-25 °C und 40-60% relativer Luftfeuchte) des Tropfens verdunstet in dieser Zeit, was auch den realistischen Arbeitsbedingungen dieses DMF-Systems im späteren Einsatz mit den WGMML entspricht.

Es zeigte sich auch, dass für jede praktische Messung der Tropfenbeweglichkeit und somit bei der Bewertung der Tropfenbeweglichkeit zu beachten ist, dass schon geringe Fehler in der Parallelität zwischen Deckel und Boden zu verfälschten Ergebnissen führen. Ebenso können Unebenheiten der Schichten zu Störungen führen.

Das gesamte System besitzt viele unbestimmte Fehlerquellen. Beispiele dafür sind z.B. unterschiedliche Elektroden- und Zuleitungsformen auf dem Chip, Ungenauigkeiten der Kontaktierung und der Kabellängen oder unbekannte Einflüsse innerhalb der Elektronik wie defekte Relais oder parasitäre Ströme.

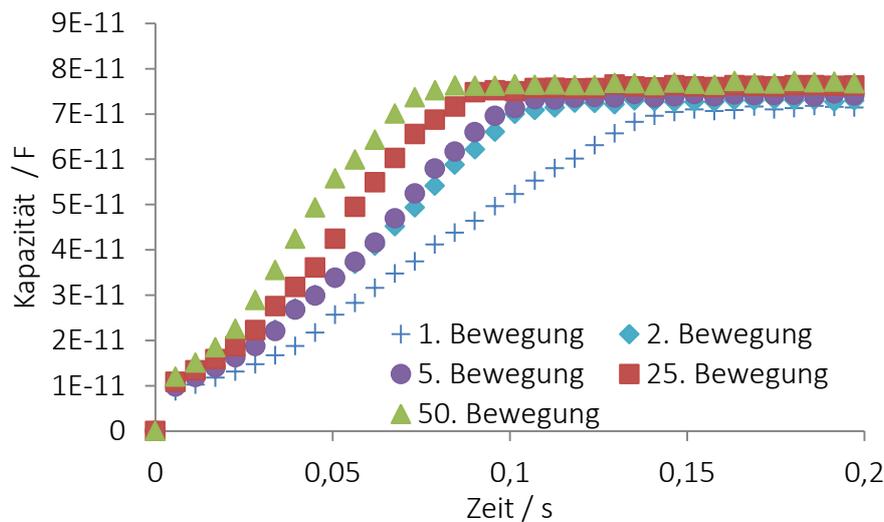


Abbildung 5.6: Tropfenbeweglichkeitsmessung von H₂O als Referenz

65 V, 1 kHz, 1,5 μ l, 2,25 mm, 190 μ m, 7 μ m CEP, 100 nm Teflon AF 1600. 3 μ l Tropfen Kontaktwinkel $\theta_0 = 121 (\pm 1)^\circ$. Die 2. Bewegung hatte eine mittlere Geschwindigkeit von 23 (± 2) mm/s.

Für eine präzisere, quantitative Messung könnte mit einer geschlossenen Kammer und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit gemessen werden. Der Aufwand einer solchen Vermessung macht nur Sinn, um die Qualität in größeren Batches zu gewährleisten. Die hier durchgeführten Messungen dienen in erster Linie der Verbesserung der Beweglichkeit der Tropfen und nicht der exakten quantitativen Charakterisierung der DMF-Chip-Produktion.

Bei der ersten (Elektro-)Benetzung wird sich die Oberfläche und somit die Tropfenbeweglichkeit im Vergleich zu allen folgenden am stärksten verändern. Es können z.B. wasserlösliche Verunreinigungen auf der Oberfläche vorhanden sein, die danach folgende Bewegungen nicht mehr beeinflussen. Oder es können, wie im nächsten Abschnitt beschrieben, Moleküle im Tropfen auf der Teflonoberfläche adsorbieren und das Biofouling starten. Luk et al. (2012), Vergauwe et al. (2011)

5.3.2 Biofouling durch Streptavidin

Der vorherige Versuch wurde mit einem PBS-Tropfen von 1,5 μ l wiederholt, der neben der zuerst aktivierten Elektrode abgesetzt wurde (s. Abbildung A.2). Die Tropfenbeweglichkeit nimmt mit der Zeit zu, was auch hier wieder auf Verdunstungseffekte zurückzuführen ist. Insgesamt bewegt sich der PBS-Tropfen schneller als der Wassertropfen. PBS verhält sich wie destilliertes Wasser aus dem vorherigen Versuch. Kapazität, Geschwindigkeit, Verdunstungseffekte und Beweglichkeit bei der ersten (Elektro-)Benetzung sind im Prinzip gleich.

Als nächstes wurde ein PBS Tropfen mit der später vorgesehenen Maximalkonzentration des Streptavidins von 30 μ g/ml untersucht (s. Abbildung 5.7). Wie zuvor wurde ein Tropfen von 1,5 μ l neben der zuerst zu aktivierenden Elektrode abgesetzt und versucht zu bewegen. Es war eine einzelne Bewegung auf diese Elektrode möglich, jedoch war es nicht mehr möglich, den Tropfen von dort weg zu bewegen.

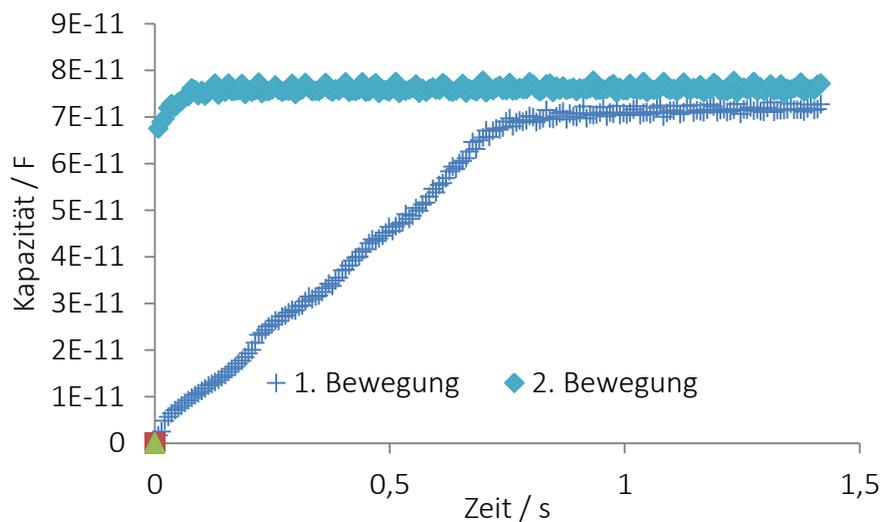


Abbildung 5.7: Tropfenbeweglichkeitsmessung von PBS mit 30µg/ml Streptavidin

65 V, 1 kHz, 1,5 µl, 2,25 mm, 190 µm, 7 µm CEP, 100 nm Teflon AF 1600. Die 1. Bewegung hatte eine mittlere Geschwindigkeit von 3,2 (±0,3)mm/s. Verglichen mit reinem PBS bereits eine deutliche Verschlechterung.

Die Kurve der 1. Bewegung (s. Abbildung 5.7) zeigt die Tropfenbewegung auf eine freie, unbenutzte Elektrode. Sobald die Elektrode „Elektro-benetzt“ wurde, setzte sofort das Biofouling ein. Das Streptavidin setzte sich auf der Oberfläche ab und die Hydrophobie soweit herab, dass der DMF-Chip nicht mehr zum Bewegen des Tropfens im Stande war.

Seine Startposition konnte der Tropfen problemlos verlassen, obwohl er auf dieser mehrere Minuten verweilt hat, bevor die Messung gestartet wurde. Von dieser bewegte sich der Tropfen sich jedoch nicht mehr vollständig weg. Es ist anzunehmen, dass das elektrische Feld zu einer beschleunigten Adsorption des Streptavidin auf der Chipoberfläche, also zum Biofouling, führte.

PBS mit 30µg/ml Streptavidin ist prinzipiell mit DMF kompatibel („1. Bewegung“ Abbildung 5.7), jedoch in dieser Form ungeeignet („2. Bewegung“ Abbildung 5.7). Mit Hilfe eines Tensids sollte darauf folgend die Tropfenbeweglichkeit verbessert werden.

5.3.3 Tenside zur Optimierung der Tropfenbeweglichkeit

Es wurden zwei Tenside getestet, um die Tropfenbeweglichkeit von PBS mit Streptavidin (30µg/ml) zu verbessern bzw. überhaupt erst herzustellen. Gezeigt werden die Ergebnisse von Pluronic 64 (Sigma-Aldrich Co.) und $F_2CH(CF_2)_3CH_2OH$ (2,2,3,3,4,4,5,5-Octafluoro-1-pentanol, CAS Nummer 355-80-6). Die Messungen der Tenside in reinem PBS ermöglichen eine Aussage über ihre (ggf. negative) Wirkung und die Messungen in Verbindung mit Streptavidin eine Aussage über ihr Potential zur Verbesserung der Tropfenbeweglichkeit.

Der Tropfen aus PBS mit 0,2 vol% Pluronic 64 (Abbildung A.3) bewegt sich langsamer als reines PBS (Abbildung A.2) und der Tropfen mit 0,1 vol% $F_2CH(CF_2)_3CH_2OH$ deutlich schneller (Abbildung A.4). Die Kontaktwinkel θ_0 auf dem Chip liegen bei 121° für PBS und Wasser, bei 92° für PBS mit Pluronic 64 und bei 107° für PBS mit $F_2CH(CF_2)_3CH_2OH$. Das Streptavidin hat keinen Einfluss auf den Kontaktwinkel eines ruhenden Tropfens (Tabelle 5.2).

Tabelle 5.2: Übersicht der Proben zur Tensidbewertung

Der Hauptbestandteil der Proben im späteren Experiment ist PBS. Darin gelöst ist Streptavidin, welches im späteren Verlauf von den WGMMML detektiert werden soll. Für den Betrieb des DMF-Chips muss eine ausreichende Tropfenbeweglichkeit garantiert werden. Wasser dient als Vergleich der Tropfenbeweglichkeit zum PBS. Zwei Tenside werden hinsichtlich einer Verbesserung der Tropfenbeweglichkeit untersucht.

Fluid 3 µl Tropfen	Streptavidin µg/ml	Tensid	Konzentration vol%	θ_0 Grad	Fehler (+/-) °
Wasser	-	-	-	121	1
	-	Pluronic 64	0,2	93	1
PBS	-	-	-	121	1
	-	Pluronic 64	0,2	92	1
	-	F ₂ CH(CF ₂) ₃ CH ₂ OH	0,1	107	1
	30	-	-	121	1
	30	Pluronic 64	0,2	93	1
	30	F ₂ CH(CF ₂) ₃ CH ₂ OH	0,1	107	1

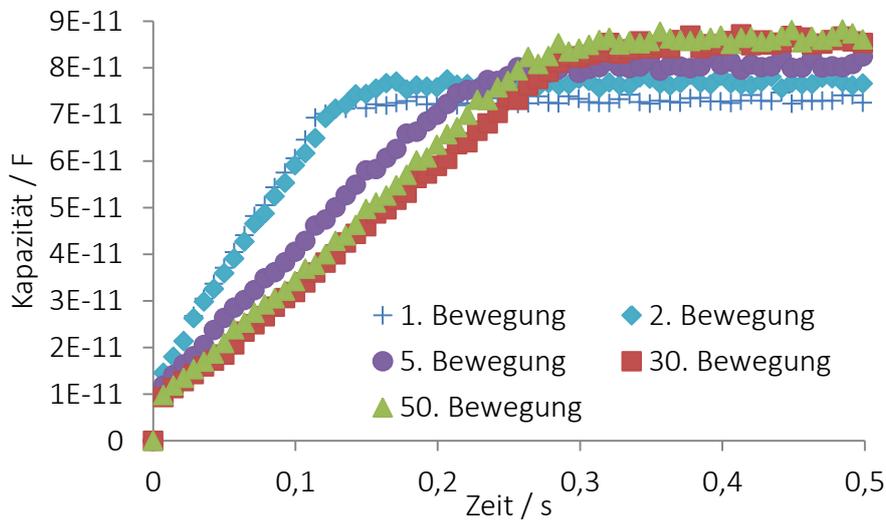


Abbildung 5.8: Tropfenbeweglichkeitsmessung von PBS mit 30 µg/ml Streptavidin und 0,2 vol% Pluronic 64

65 V, 1 kHz, 1,5 µl, 2,25 mm, 190 µm, 7 µm CEP, 100 nm Teflon AF 1600. Kontaktwinkel 3 µl Tropfen $\theta_0 = 121 (\pm 1)^\circ$. Die Tropfenbeweglichkeit ist nur geringfügig langsamer im Vergleich zu PBS mit Pluronic ohne Streptavidin. Pluronic 64 in einer Konzentration von 0,2 vol% zeigt ein gutes Ergebnis und wurde daher später für das eigentliche Experiment eingesetzt. Die 2. Bewegung hatte eine mittlere Geschwindigkeit von $15 (\pm 2)$ mm/s.

Das $F_2CH(CF_2)_3CH_2OH$ zeigt keine ausreichende Wirkung (Abbildung A.5) gegen das Biofouling. Hingegen ist die Tropfenbeweglichkeit von PBS mit $30\ \mu\text{g/ml}$ Streptavidin und $0,2\ \text{vol}\%$ Pluronic 64 (Abbildung 5.8) äquivalent zu der von PBS mit $0,2\ \text{vol}\%$ Pluronic 64 (Abbildung A.3). Die Beweglichkeit stabilisiert sich nach den ersten Bewegungen. Daher fiel die Wahl auf Pluronic 64.

5.3.4 Der Einfluss von Pluronic 64

Es wurden Kontaktwinkelmessungen auf einem mit Teflon beschichteten und mit WGMLL-Feldern versehenem Deckelsubstrat durchgeführt, um den Einfluss von Pluronic 64 auf die PBS-, Streptavidin-, BSA- und Biotin-Biofoulingeffekte zu untersuchen, welche zu einer abnehmenden Tropfenbeweglichkeit führten.

Abbildung 5.9 und Tabelle A.1 zeigen die zusammengefassten Messergebnisse. Ein Tropfen destilliertes Wasser ($3\ \mu\text{l}$) auf einer planen, unmodifizierten Teflonoberfläche (Spot 1-4) weist einen Kontaktwinkel von etwa 121° auf. Auf einer mit Biotin und BSA funktionalisierten Oberfläche (Spot 5-8) liegt der Kontaktwinkel des gleichen Tropfens bei etwa 105° .

Die acht Spots wurden anschließend auf unterschiedliche Weise weiterbehandelt (s. Tabelle 5.3). Dafür wurden die Oberflächen unterschiedlich lange mit zwei Lösungen (PBS mit Streptavidin) behandelt, wobei die eine zusätzlich $0,1\ \text{vol}\%$ Pluronic 64 enthielt. Danach erfolgte wieder eine Kontaktwinkelmessung mit destilliertem Wasser bei gleichen Bedingungen wie zuvor.

Die Messergebnisse auf Spot 1 zeigen, dass Pluronic die unspezifischen Bindungen zwischen Streptavidin und Teflon unterdrückt. Es liegt kein verringerter Kontaktwinkel und somit kein Biofouling vor. Die Spots 2 bis 4 zeigen hingegen ein mit der Inkubationszeit steigendes Biofouling, wobei sich hier kein Pluronic in der Lösung befand. Eine Bewegung von Tropfen über solche Spots hinweg war auf dem DMF-Chip nicht möglich.

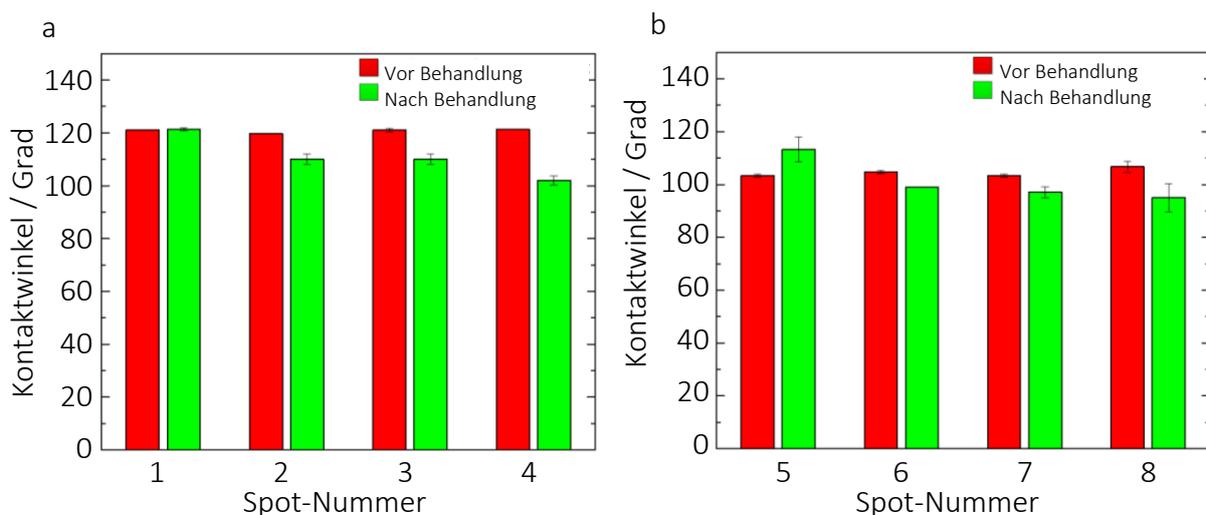


Abbildung 5.9: Kontaktwinkel von $3\ \mu\text{l}$ Tropfen aus destilliertem Wasser

Auf unmodifizierten (a) und mit Biotin und BSA funktionalisierten (b) Spots eines Deckelsubstrats. (Bild: Wondimu und von der Ecken)

Tabelle 5.3: Oberflächenbehandlungen vor der zweiten Kontaktwinkelmessung

Spot	Behandlungszeit	verwendete Lösung
1 und 5	20 min	PBS + 30 µg/ml Streptavidin + 0,1 vol% Pluronic 64
2 und 6	1 min	PBS + 30 µg/ml Streptavidin
3 und 7	5 min	PBS + 30 µg/ml Streptavidin
4 und 8	20 min	PBS + 30 µg/ml Streptavidin

In den Beweglichkeitstests der Streptavidinlösung (ohne Pluronic 64) war es möglich, einen Tropfen von seiner Startelektrode wegzubewegen, auf welcher das elektrische Feld zuvor nie aktiviert war. Der relevante Punkt ist, dass der Tropfen auf der nächsten Elektrode hängen blieb, auf welcher das elektrische Feld aktiviert wurde, um den Tropfen zu bewegen.

Die benötigte Zeit, um einen Tropfen auf seiner Startposition mittels Pipette abzusetzen, den DMF-Chip zu schließen und die Messung zu starten, liegt bei etwa 30-60s. Dieser Wartezeit wird mit der einminütigen Behandlung auf den Spots 2 und 6 Rechnung getragen.

Die Beobachtung führt zu einem interessanten Ergebnis: Der „self“-Biofouling Effekt des Streptavidins in der/den ersten Minute/n ist nicht ausreichend, dass ein Tropfen hängen bleibt, da er wie in Abbildung 5.7 zu sehen von seiner Startposition wegbewegt werden konnte. Hingegen scheint das elektrische Feld den Biofouling Effekt drastisch zu beschleunigen, sodass der Tropfen zwar auf die Nachbarelektrode bewegt, jedoch nicht mehr über diese hinweg bewegt werden kann, mit der er lediglich 1-2s in Kontakt war.

Auf den funktionalisierten Spots 6 bis 8 reduzierte die Behandlung mit der PBS-Streptavidinlösung (ohne Pluronic 64) den Kontaktwinkel weiter. Jedoch erzielte die Behandlung des Spots Nummer 5 mit der Pluronic enthaltenen Lösung eine Erhöhung des Kontaktwinkels auf 115°. Die Ursache dafür ist nicht vollständig klar. Jedoch ergibt sich hieraus ein vorteilhafter Effekt für die Tropfenbeweglichkeit.

5.4 Messaufbau

Das integrierte System wurde durch Messungen der Tropfenbeweglichkeit, der Brechungsindexsensitivität und der spezifischen Bindung von Streptavidin an der biotinylierten Oberfläche der WGMMML charakterisiert. Der Versuchsstand beinhaltet darüber hinaus ein System zur Anregung der WGMMML und zur Aufzeichnung der emittierten Spektren dieser sowie ein System zur Tropfensteuerung (s. Abbildung 5.10a).

Der integrierte Chip wurde auf einer translatorischen Halterung montiert, um die WGMMML in den Strahl des Pump Lasers zu bewegen und auszurichten. Die WGMMML wurden mittels eines frequenzverdoppelten gepulsten Nd:YLF-Lasers (CL523, CrystaLaser) bei einer Wellenlänge von 523nm durch ein 20-fach Objektiv angeregt und ihr Emissionsspektrum durch das Decelsubstrat hindurch aufgezeichnet.

Die Emissionen der WGMMML wurden zu einem Spektrometer (Shamrock 500i, Andor, Auflösung ca. 10µm) geleitet, das mit einem Czerny-Turner Monochromator und einer via Peltier-Element gekühlten CCD-Kamera (CCD 2) ausgestattet ist. Ein Teil des emittierten Lichts wurde über einen Splitter in eine andere CCD-Kamera (CCD 1) geführt, um eine optische Kontrolle der Ausrichtung von WGMMML und Pump Laser zu ermöglichen.

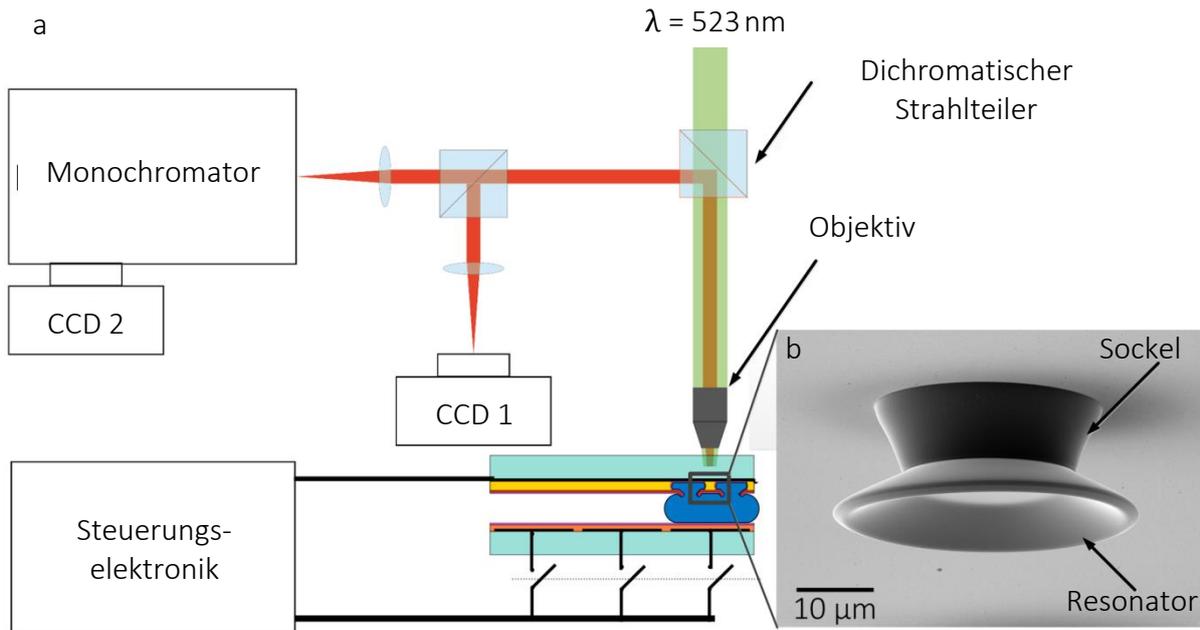


Abbildung 5.10: Messaufbau des WGMML Versuchs

a) Die WGMML werden mittels eines grünen Lasers durch das Deckelsubstrat hindurch angeregt. Ihre zu Rot hin verschobene Emission wird mit derselben Optik aufgenommen und zu einem Monochromator zur Spektralanalyse geleitet. Weder Ein- noch Auskopplung des Signals benötigt ein physisch kontaktiertes Interface (Bild: Wondimu und von der Ecken) b) REM Bild eines einzelnen WGMML aus Wienhold et al. (2015).

5.5 Bestimmung des Brechungsindex

Das Experiment zur Bestimmung des Brechungsindex ist notwendig, um die Sensitivität der WGMML des integrierten Chips für den Brechungsindex des umgebenden Mediums zu ermitteln. Außerdem verifiziert der Versuch die Funktionalität des Tropfenaustauschs auf den Sensorfeldern. Dafür wurden Lösungen mit unterschiedlichen Brechungsindizes RI_n von 1,3324 bis 1,3352 aus destilliertem Wasser und Glycerol angemischt. Es wurden abwechselnd Tropfen dieser Lösungen, in aufsteigender Reihenfolge ihrer Brechungsindizes, und destillierten Wassers, als Nulllinie der Messung der Spektralverschiebung durch die Tropfen mit hohem Brechungsindex, in die Microwells (s. Abschnitt 6.1) bewegt.

In den meisten Fällen ist die Empfindlichkeit (S) eines Biosensors über die des physischen Sensors definiert. Im vorliegenden Setup ist dies die Verschiebung der Resonanz-Wellenlänge um eine Einheit der Veränderung des Brechungsindex (RIU , engl. „Refractive Index Unit“). Bildlich gesprochen handelt es sich um Position und Verschiebung von Peaks im Emissionsspektrum.

Die Messungen des Gesamtsystems weisen die Standardabweichung σ auf. Die Erfassungsgrenze (DL) (engl. „Detection Limit“) bezeichnet die kleinste noch messbare Verschiebung dieser Peaks und errechnet sich nach:

$$DL = 3 \cdot \frac{\sigma}{S} \quad (5.1)$$

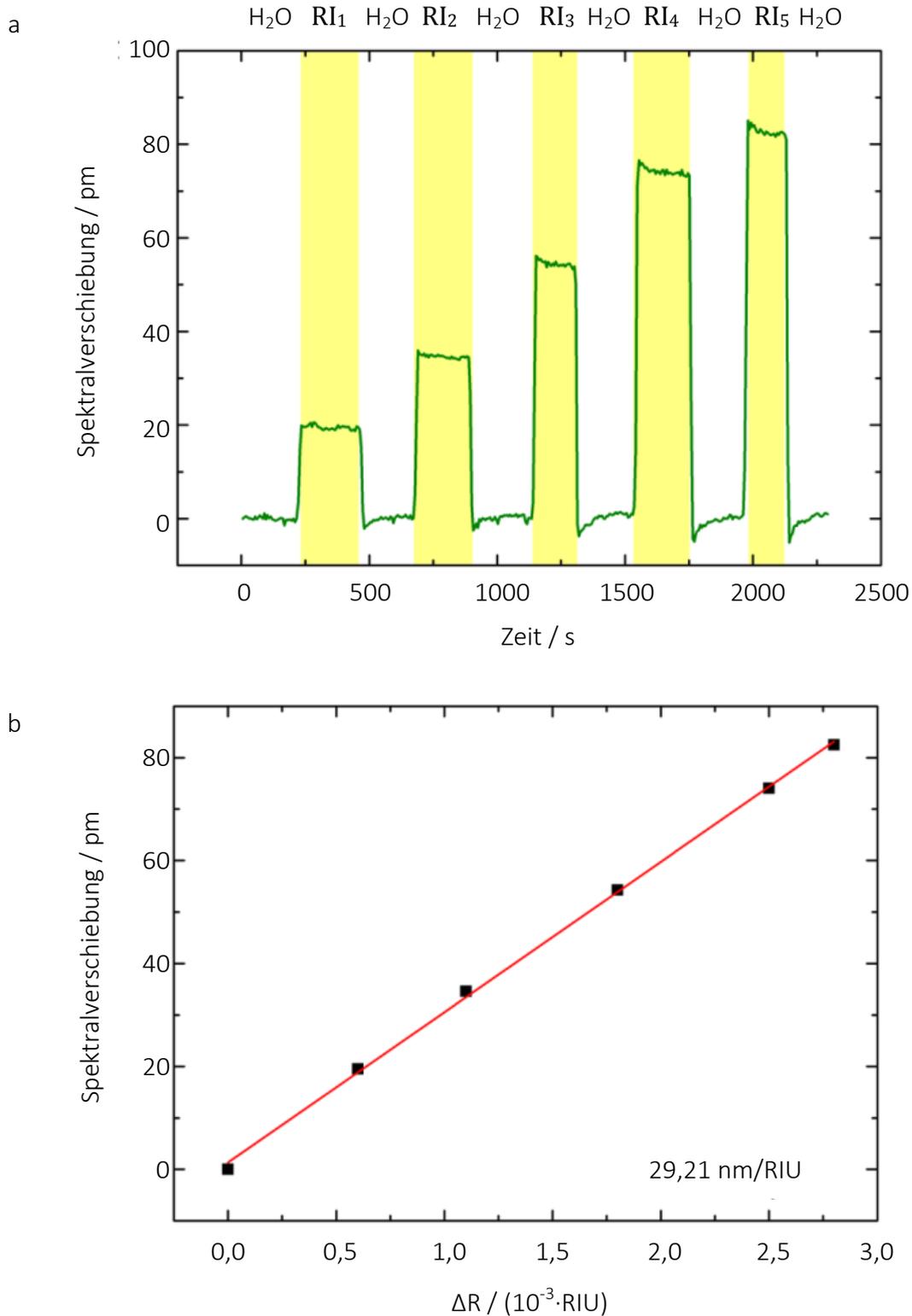


Abbildung 5.11: Brechungsindex und Empfindlichkeit

a) Verschiedene Tropfen mit steigendem Brechungsindex RI_n wurden abwechselnd mit Wassertropfen auf den Sensor bewegt. $\text{RI}_1 < \text{RI}_2 < \text{RI}_3 < \text{RI}_4 < \text{RI}_5$. b) Die Empfindlichkeit gegenüber dem Brechungsindex des Messaufbaus beträgt 29,21 nm/RIU. (Bild: Wondimu und von der Ecken)

Die Erfassungsgrenze DL ist abhängig von den verwendeten Systemkomponenten. Den grundlegendsten Einfluss auf die Erfassungsgrenze hat die Auflösung des Spektrometers. Der für das Tracking der Peaks angewandte Algorithmus stellt den nächsten wichtigen Einflussfaktor dar. Darüber hinaus tragen Schwankungen allgemeiner Umgebungsbedingungen wie Temperatur oder systembedingter Ungenauigkeiten wie der Pumplaserleistung zur Messgenauigkeit bei.

Die Verschiebung der Peaks im Spektrum der WGMML bei deren Kontakt mit unterschiedlichen Tropfen ist proportional zur Differenz der Brechungsindizes (Abbildung 5.11a). Die relative Verschiebung des Spektrums aufgetragen gegen die Veränderung des Brechungsindex wurde mit Wasser als Referenzlösung gemessen und zeigt ein lineares Verhalten (Abbildung 5.11b). Die Messung mit den WGMML zeigt eine Brechungsindexempfindlichkeit von 29 nm/RIU . Nach Gleichung 5.1 ergibt sich für das System eine Erfassungsgrenze von $4,7 \cdot 10^{-5} \text{ RIU}$.

5.6 Markerfreie Detektion von Streptavidin

Die gezielte Detektion von (Bio-)Molekülen in einem Analyten hängt von der Funktionalisierung der WGMML-Oberfläche mit einer an das Zielmolekül spezifisch bindenden Beschichtung (Sonde) ab. In Falle des zu detektierenden Streptavidins fällt die Wahl auf Biotin, deren Bindung untereinander eine der stärksten bekannten nichtkovalenten Bindungen in der Biologie darstellt. Zu diesem Zweck wurde die Resonatoroberfläche mit biotinyliertem BSA funktionalisiert. Das BSA wird von der unpolaren Teflonoberfläche adsorbiert und verankert das Biotin somit auf den WGMML. Darauf wiederum kann das Streptavidin andocken.

Tropfen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Streptavidin wurden zum funktionalisierten WGMML-Sensorfeld geführt. Die Bindung des Streptavidins an die WGMML wurde mit dem Spektrografen aufgezeichnet (Abbildung 5.12a). Als Machbarkeitsnachweis wurde ein Tropfen der höchsten Streptavidinkonzentration ($30 \mu\text{g/ml}$) auf dem DMF-Chip auf $15 \mu\text{g/ml}$ verdünnt und währenddessen gemessen.

Der abweichende (langsamer ansteigende) Verlauf der $15 \mu\text{g/ml}$ Kurve in Abbildung 5.12a (grün) rührt von der unvollständigen Vermischung des $30 \mu\text{g/ml}$ Tropfens mit dem reinen PBS-Tropfen und bildet die fortschreitende Verdünnung durch Diffusion ab. Dies ist jedoch unproblematisch, da sich der Verlauf der Kurve dem der anderen anpasst, woraus geschlossen werden kann, dass es zur vollständigen Durchmischung kam. Ebenso wird dies durch die Lage des zugehörigen Messwertes auf der Ausgleichsgeraden in Abbildung 5.12b bestätigt.

Das Sensorfeedback zeigt nach weniger als 10 min eine Sättigung und jede weitere Verschiebung des Signals lässt sich auf unspezifische Absorption zurückführen. Der stabile Verlauf der Verschiebung des Sensorsignals wurde benutzt, um eine Kalibrierungskurve der spektralen Empfindlichkeit aufzunehmen. Nach der Korrektur der unspezifischen Absorption konnte eine Empfindlichkeit des Systems von $3,54 \text{ pm}/(\mu\text{g/ml})$ ermittelt werden.

Unter Berücksichtigung des Konzentrationskurvenverlaufs ergibt sich eine Erfassungsgrenze, also eine minimal detektierbare absolute Menge, des Systems von 380 ng/ml für Streptavidin. Das bedeutet für eine Tropfengröße von $5 \mu\text{l}$ eine Erfassungsgrenze von $1,9 \text{ ng}$ Streptavidin im DMF-WGMML-System. Das System von Bog et al. (2015) hat zwar eine Erfassungsgrenze von nur 134 ng/ml und somit höhere Empfindlichkeit. Da im konventionellen mikrofluidischen WGMML-System mindestens ein 1 ml zur Messung benötigt wird, liegt aufgrund des 200fachen Volumens die absolute Erfassungsgrenze von 134 ng deutlich höher.

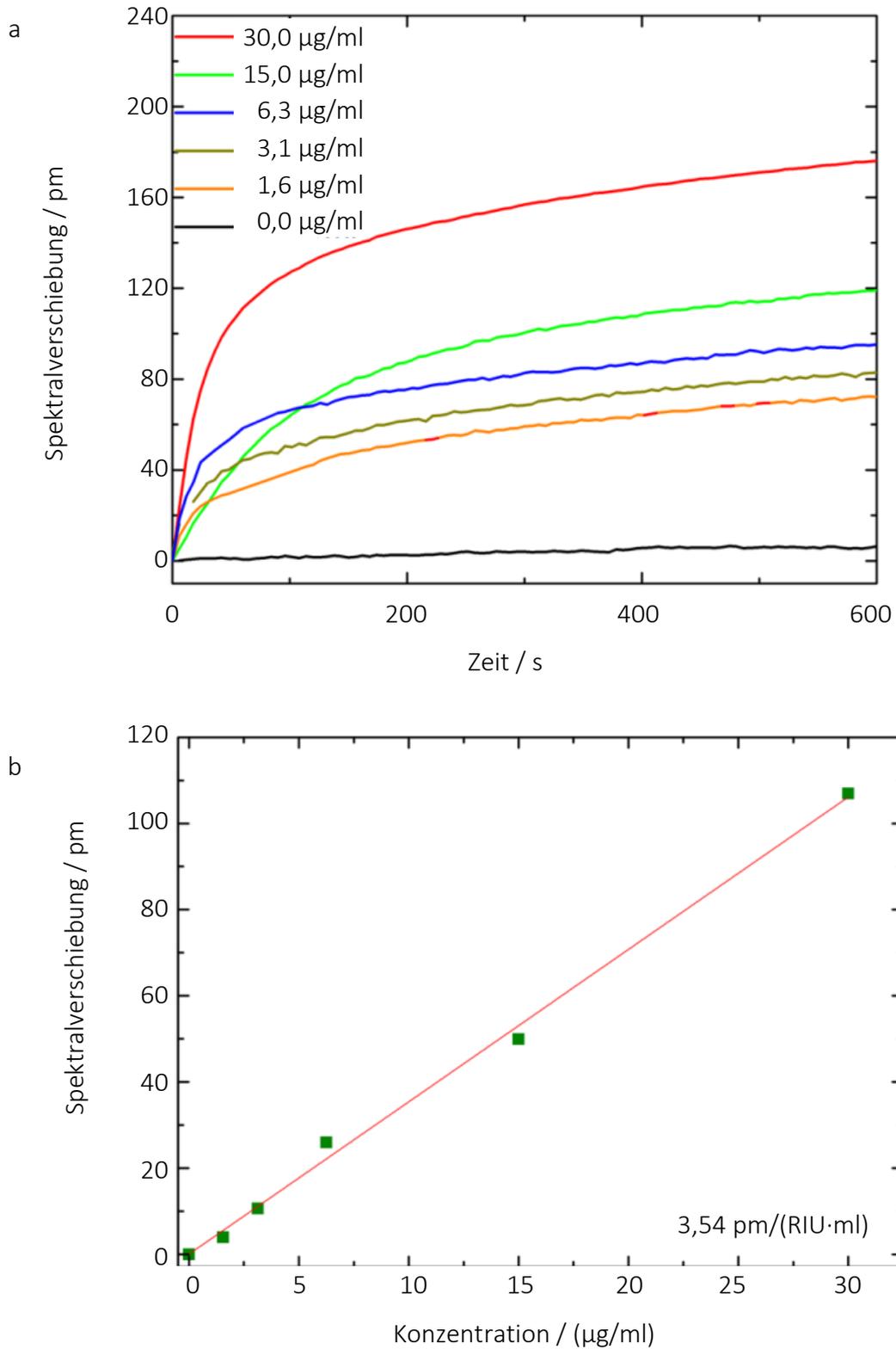


Abbildung 5.12: Detektion der Streptavidinkonzentration

a) Verschiedene Konzentrationen von Streptavidin in PBS wurden auf dem integrierten Chip gemessen. Die 15 µg/ml Kurve zeigt zu Anfang langsamere Absorption durch Diffusionseffekte aufgrund von unvollständiger Durchmischung. b) Die Empfindlichkeit von 3,54 pm/(RIU·ml) ergibt sich nach Korrektur der Kurven bzgl. unspezifischer Absorption. (Bild: Wondimu und von der Ecken)

6 Weiterentwicklungen der DMF-Technik

Verschiedene Ideen, Neuerungen und Verbesserungen wurden rund um DMF-Chip und den Versuchsstand untersucht. Papier-Chips bieten einen kostengünstigen und einfachen Einstieg in die DMF, die echten Microwells helfen beim Dosieren unabhängig vom Elektrodendesign, die Zwischenfolie ermöglicht leichtere (De-)Assemblierung und Konnektivität zu anderen Fluidsystemen und die magnetische Linse bietet eine bessere Kontrolle von magnetischen Partikeln.

6.1 Papier-Chips

Die DMF-Chips selbst sind zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht als kommerzielles Produkt, sondern nur als Eigenanfertigung (Materialkosten in der Größenordnung um 50€ pro Chip), oder als sehr teure Sonderanfertigung (mehrere 100€ pro Chip) von einem entsprechend ausgestatteten Labor verfügbar. Riegel (2015), Samiei et al. (2016)

Auf Papier gedruckte Elektroden als Basis und eine Folie als Dielektrikum bieten eine kostengünstige Alternative. Die Ideen aus diesem Abschnitt zur Lösung der Problematik wurden in von der Ecken et al. (2016b) vorgestellt.

6.1.1 Konzept

Der Grundgedanke, eine einfache Möglichkeit zu bieten, um die DMF-Technologie auszuprobieren, besteht darin, auf Papier oder Folie gedruckte oder mittels PCB-Technik hergestellte Elektrodenstrukturen zu verwenden. Beide Methoden sind sehr schnell umzusetzen. Insbesondere der Ansatz per Drucktechnik ist interessant, da es möglich ist, Tintenstrahldrucker mit z.B. Silbertinte zu betreiben. (s. Abbildung 6.1)

Bei der Wahl des Dielektrikums, sollte nach Möglichkeit ohne teures Laborequipment gearbeitet werden können. Gerätschaften wie Sputter-Anlagen, CVD-Prozesse, Vakuumöfen usw. hat nicht jedes Labor. Eine dünne PET-Folie von 10µm Stärke ist sehr günstig, leicht zu bearbeiten (z.B. Schere), reißfest, dielektrisch stabil und als qualitativ sehr hochwertige Massware kommerziell verfügbar. Diese Folie kann mit einem niederviskosen Klebstoff mit dem Elektrodenmaterial verklebt werden. Alternativ kann direkt auf die PET-Folie gedruckt werden, welche dann wiederum mit einem stabilen Substrat verklebt werden könnte. Dixon et al. (2016), Fobel et al. (2014), Yang et al. (2009)

Teflon AF, Cytop oder Fluoropel sind kommerziell erhältliche hydrophobe Beschichtungen. Während Teflon AF und Cytop nach dem Beschichten (Dip- oder Spincoating) zur besseren Oberflächenqualität einem Reflowprozess unterzogen werden sollten, ist dies bei FluoroPel nicht unbedingt nötig. Der Reflow für erstere erfordert das Aufheizen über die Glasübergangstemperatur, was bei Teflon AF 1600 eine Temperatur von über 160°C bedeutet. Darunter leiden sowohl Papier-Chip als auch die (PET-)Folie.

Einerseits verliert das Teflon ohne den Reflow nach ein paar Stunden an Qualität, wodurch die Hydrophobie abnimmt. Andererseits ist dies nicht besonders relevant, da es hier um einfache Einwegchips handelt, die darüber hinaus auch nur zum Ausprobieren der Technologie dienen sollen.

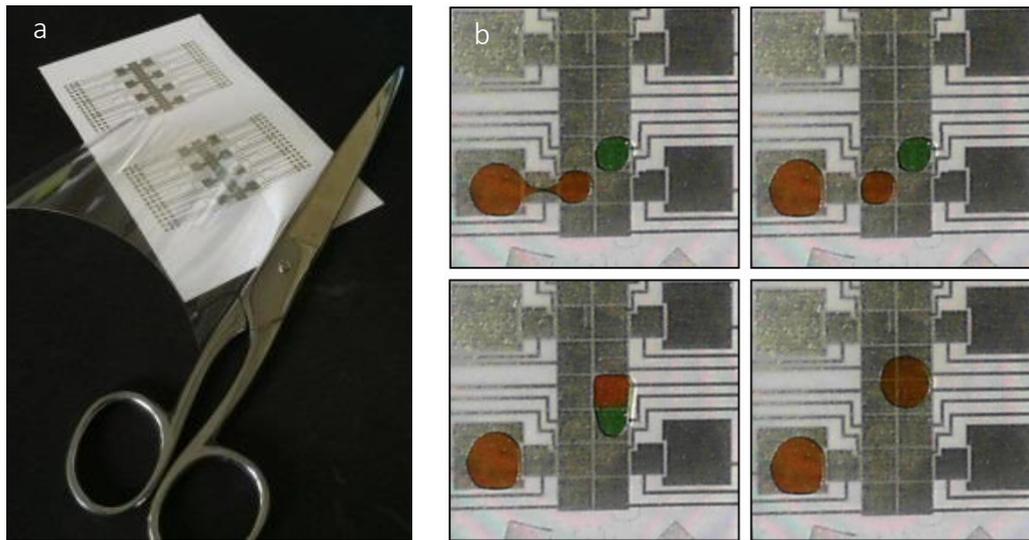


Abbildung 6.1: Einfach zu fertigende DMF-Chips aus Papier und PET-Folie

Die Motivation für diese DMF-Chips war, dass sie extrem einfach zu fertigen sind. Das bedeutet, dass keinerlei mikrotechnisches Laborequipment nötig sein darf. a) Benötigt werden auf Papier oder Folie gedruckte Elektrodenstrukturen (z.B. ein mit leitfähiger Tinte leicht zu modifizierender Drucker). Eine etwa $10\ \mu\text{m}$ dünne PET-Folie und dünnflüssiger Klebstoff. Und Fluoropel oder Teflon AF als hydrophobe Schicht. b) Das Ergebnis sind funktionierende DMF-Chips, die in kleinen Mengen in kürzester Zeit (wenige Minuten) gefertigt werden können und so einen einfachen Versuch in der digitalen Mikrofluidik durchzuführen. von der Ecken et al. (2016b)

6.1.2 Umsetzung und Funktionstest

Die Elektrodenstruktur wurde in Kooperation mit dem Holst Centre in Eindhoven als eine ca. $20\ \mu\text{m}$ dicke Schicht mit Silbertinte auf ein Lumi Silk Papier auf einem PixDro LP50 Drucker mit einem Konica Minolta Druckkopf (KM512SH) gedruckt.

Die dielektrische Schicht war eine $12\ \mu\text{m}$ PET Folie (Mitsubishi Polyester Film) mit einer Durchschlagsfestigkeit von $4,5\ \text{kV}$. Verklebt wurden Folie und Papier mit einem UV-härtenden Klebstoff (DELO-PHOTOBOND PB437). Das Deckelsubstrat (ITO-Glas, Delta Technologies) und des Bodensubstrats wurden mit $100\ \text{nm}$ $1\ \text{wt}\%$ Teflon AF 1600 (DuPont) beschichtet ($1000\ \text{rpm}$, $150\ \text{rpm/s}$, $60\ \text{s}$) und bei Raumtemperatur getrocknet. Angesteuert wurden die fertigen DMF-Chips mit dem DropBot und dem HV-Verstärker Trek PZD700A-1-H-CE (Acal BFi). von der Ecken et al. (2016b)

Die Funktionstests zeigten bei keinem der Chips einen dielektrischen Durchbruch, die Stabilität der PET-Folien ist wie erwartet sehr hoch. Die Beweglichkeit der Tropfen ist nur durchschnittlich, was auf Unebenheiten der Papier-Chips, daraus resultierend eine Keilbildung zwischen den Substraten und auch den fehlenden Reflow des Teflons zurückzuführen ist, aber die Beweglichkeit ist stabil. (s. Abbildung 6.2)

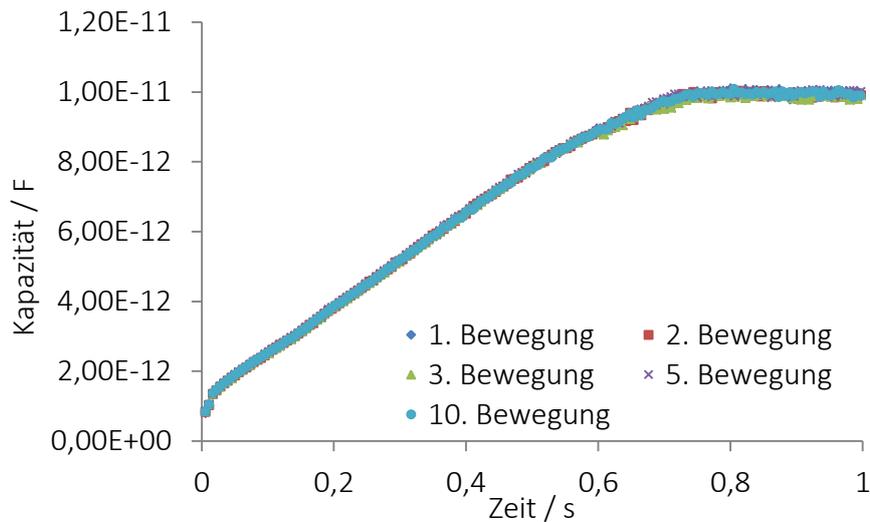


Abbildung 6.2: Tropfenbeweglichkeitsmessung von Wasser auf Papier-Chip

150 V Aktor-Spannung, 1 kHz Wechselstromfrequenz, 1 μl Tropfenvolumen, 2,45 mm Bewegungsdistanz bzw. Pitch der Elektroden, 190 μm Abstand zwischen Boden und Deckel, 12 μm PET als Dielektrikum und 100 nm Teflon AF 1600 als hydrophobe Beschichtung. Die Bewegung hat eine mittlere Geschwindigkeit von 3,3 ($\pm 0,3$) mm/s.

Ein Tropfen von 1 μl Wasser konnte mit einer Aktor-Spannung von unter 100V bewegt werden, eine zuverlässige Bewegung fand zwischen 120V und 150V statt. Für mögliche biologische Anwendungen wurden der 2xRL-Puffer und der „Easy Vector“ eines pGEM-T Easy Vector System (Promega) auf dem Chip bewegt. Für die Verwendung dieses Systems wird auch Ligase, Wasser und eine PCR Probe benötigt. Ligase alleine ist nicht, aber mit Wasser gemischt bewegbar (s. Abschnitt 4.2). Ein PCR-Produkt wird in einer Pufferlösung aufbewahrt, die in der Regel auch mit DMF kompatibel ist oder entsprechend angepasst werden kann. Die Systemkomponenten konnten mit Spannungen zwischen 120V und 180V bewegt, getrennt und gemischt werden.

6.2 Echte Microwells

Um innerhalb eines DMF-Chips ein Flüssigkeitsvolumen definiert zu trennen und somit zu dosieren, muss das Elektrodendesign schon bei der Herstellung an die notwendigen Tropfenvolumina angepasst werden, da das abgetrennte Tropfenvolumen direkt abhängig von der Grundfläche der Elektrode ist (s. Abschnitte 2.3, 2.7.2 und 2.5). Eine beliebige Änderung der Dosierung ist auf einem DMF-Chip nicht möglich, zumindest nicht während des Betriebs. Und eine Veränderung des Elektrodendesigns bedeutet eine Änderung an einem der ersten Herstellungsschritte eines DMF-Chips.

Für das Dosierungsproblem wurde in den letzten Jahren häufig ein hydrophiler Spot, oder auch „virtuelles“ Microwell (s. Abschnitt 2.7.2), verwendet, d.h. in der hydrophoben Schicht wird ein Loch gelassen. Wenn nun ein Tropfen an diesen hydrophilen Spot herangeführt wird, wird er diesen benetzen. Die Haftung zwischen Tropfen und Spot ist so groß, dass die elektrostatischen Kräfte (F_{EWOD} s. Abschnitt 2.3.2) diesen nicht mehr wegbewegen können bzw. es eher zu einem Zerreißen des Tropfen kommt, als dass er sich von dem hydrophilen Spot löst.

Das vollständige Entleeren eines „virtuellen“ Microwells ist nicht möglich, lediglich der Austausch mit einem anderen Tropfen. Eydelnant et al. (2012), Witters et al. (2013)

Die hydrophilen Spots in Form von Löchern in der hydrophoben Schicht sind sehr leicht herzustellen, weisen aber den besagten Nachteil auf. Die andere Möglichkeit, Fluidvolumina zu dosieren wäre eine Anpassung der Elektrodenstruktur. Dafür müsste aber das deutlich komplizierter herzustellende Bodensubstrat geändert werden. Eine Elektrodenfläche entspricht dem kleinsten dosierbaren Tropfen.

Das Prinzip dieser „virtuellen“ Microwells wurde im Grundlagenkapitel in Abschnitt 2.7.2 erklärt. Hier wird das Thema wieder aufgegriffen und um die im Rahmen der Veröffentlichung von der Ecken et al. (2017), beschrieben in Kapitel 5, verwendete Herstellungstechnik erweitert, die unbeabsichtigter Weise zu den „echten Microwells“ führte.

6.2.1 Microwells als Nebenprodukt der WGMML-Herstellung

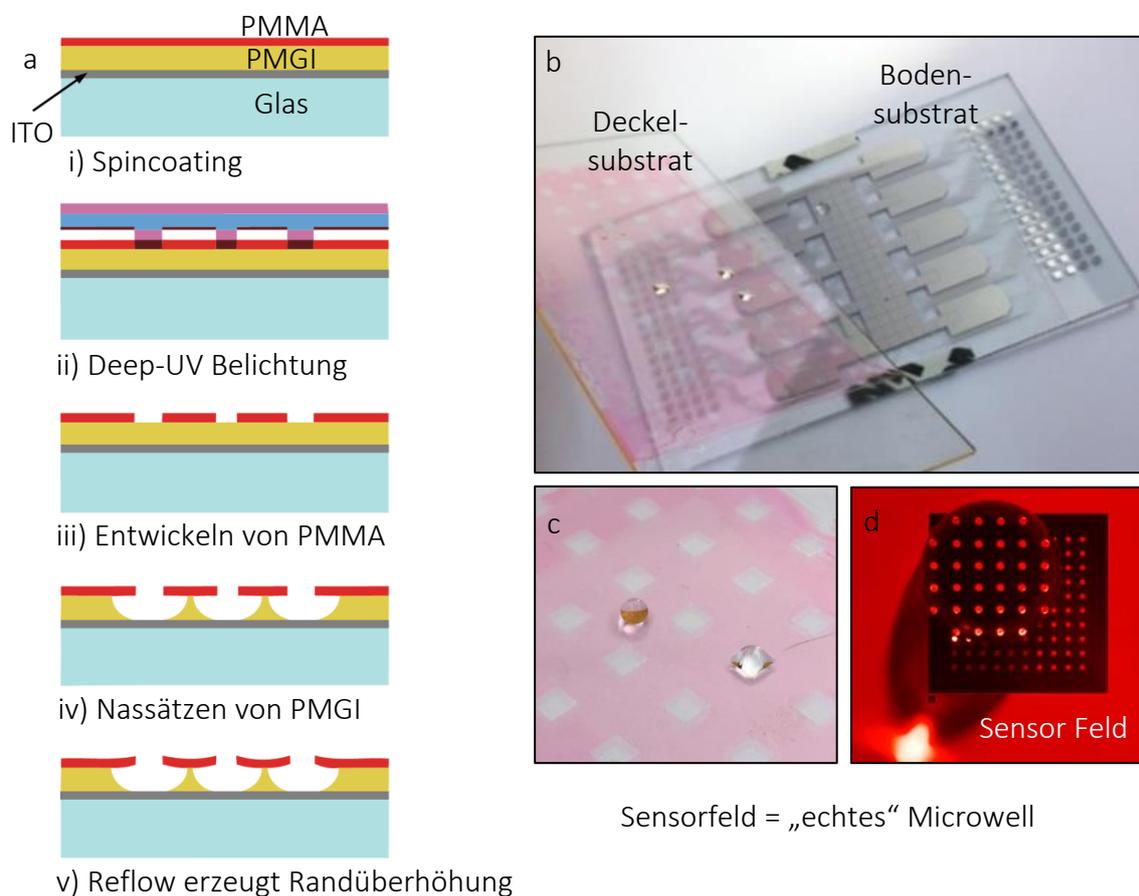


Abbildung 6.3: Herstellung der Microwells durch den WGMML-Prozess

a) Das WGMML-Feld wird durch optische Lithografie auf dem Deckelsubstrat erzeugt. b) Deckelsubstrat: Jedes Quadrat von $1,9\text{ mm} \times 1,9\text{ mm} \times 6\text{ }\mu\text{m}$ enthält ein Feld von 10×10 WGMML (Durchmesser und Höhe ca. $10\text{ }\mu\text{m}$). Die rote Umrandung ist die PMMA-Beschichtung. Jebrail et al. (2010) c) Das Deckelsubstrat mit Wassertropfen in Kugel- und „Rechteck“-Form. d) Nachbearbeitete Nahaufnahme eines Sensorfeldes mit kugelförmigen Tropfen. (Bild: Wondimu und von der Ecken)

Die Herstellung des Deckelsubstrats, das die Microwells enthält, wird im Detail in Kapitel 5 beschrieben. An dieser Stelle wird nur ein Ausschnitt (s. Abbildung 6.3) gezeigt, der zum Verständnis erforderlich ist. Die Microwells beinhalten zwar 100 WGMML-Sensoren, diese machen aber weniger als 10% des Volumens aus (vgl. Abbildung 6.3a i bis v mit Abbildung 6.3d).

6.2.2 Unerwartetes Verhalten der WGMML-Felder

Beim Betrieb der Chips im Rahmen der Experimente zum Biosensing (Kapitel 5) zeigten sich vier interessante Effekte. Erstens wichen die Tropfen einerseits den quadratischen Feldern der WGMML aus (vgl. Abbildung 6.3 c bis d und Abbildung 6.4), als seien dies hydrophobere Bereiche im Vergleich zur Umgebung. Zweitens wirkten diese Bereiche andererseits, sobald das quadratische Feld durch das Anlegen einer höheren Spannung doch benetzt wurde, wie hydrophile Spots (s. Abbildung 6.5). Zum dritten konnten Tropfen mit Hilfe der Spots getrennt werden, und es blieb ein der Spotgröße entsprechendes Volumen zurück (Abbildung 6.6). Und viertens wurde beobachtet, dass Tropfen bei 120V wieder aus dem WGMML-Feld herausgezogen werden konnten.

Die Lichtbedingungen und somit die Bildqualität während des eigentlichen Experiments waren sehr schlecht. Außerdem wurde kein Livevideo aufgezeichnet, da nur die Auswahl zwischen hinterlegtem Livebild (extrem vereinfachte Bedienung) oder Aufzeichnung (für das eigentliche WGMML-Experiment kein relevantes Messergebnis) bestand.

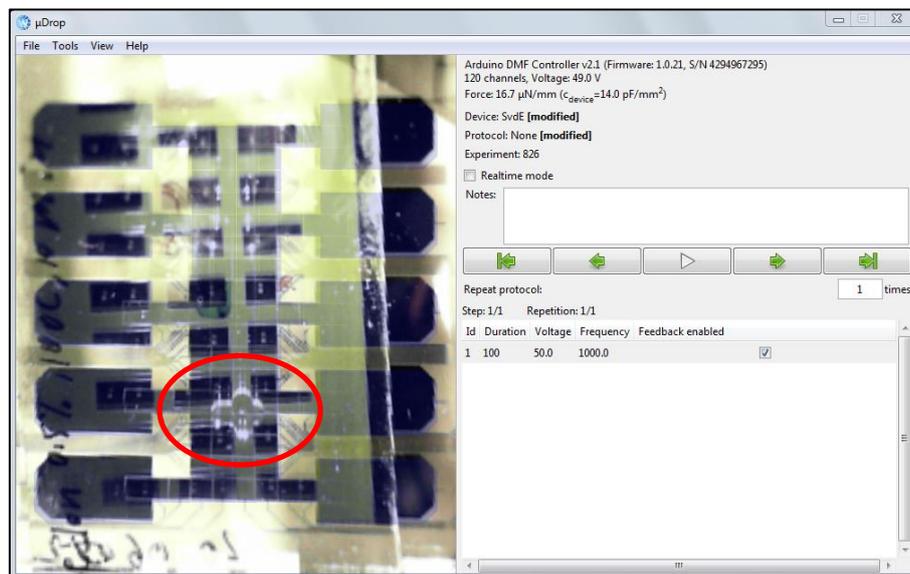


Abbildung 6.4: Hydrophober Barriere-Effekt der leeren Microwells

Der Screenshot zeigt die DropBot Software MicroDrop mit im Steuerfenster hinterlegtem Livevideo. Hier ist zu sehen, wie ein mit 50 V bewegter Tropfen eher eine Kreuzform annimmt, als sich in die hier dunklen Quadrate (WGMML-Felder vgl. Abbildung 6.3 c bis d) hinein zu begeben. Die Spots haben hier hydrophoben Charakter relativ zur Umgebung.

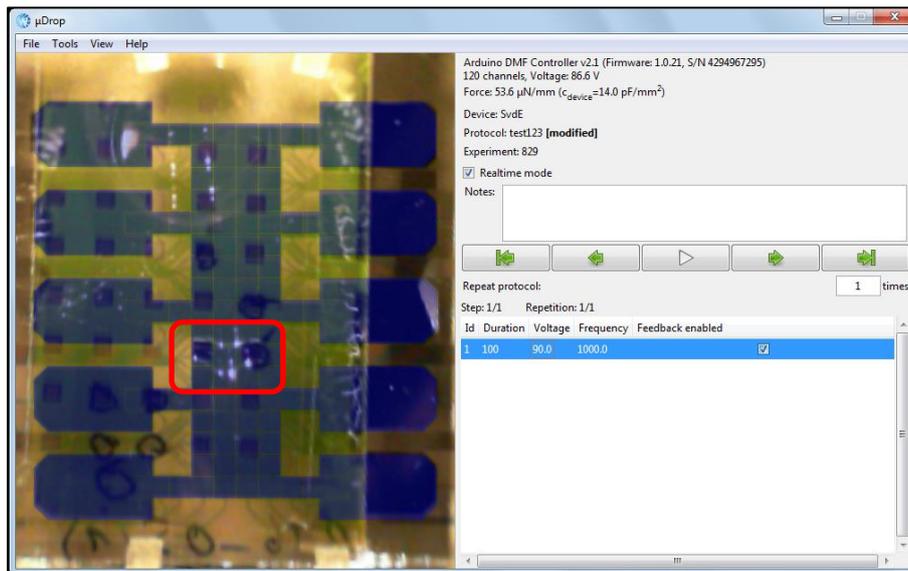


Abbildung 6.5: Hydrophiles Verhalten der gefüllten Microwells

Wird der Tropfen mit 90 V angesteuert, so benetzt er auch die WGMML-Felder. Die Quadrate erscheinen aufgrund geänderter Licht- und Kamerabedingungen kleiner als in der vorherigen Abbildung, der Chip ist jedoch derselbe. Interessanterweise haben die Spots jetzt einen hydrophilen Charakter relativ zur Umgebung.

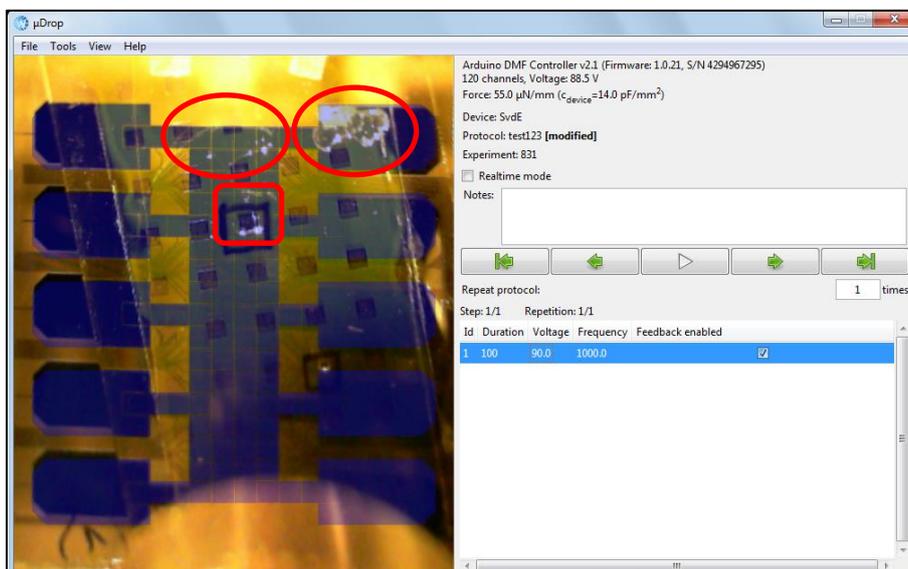


Abbildung 6.6: Definierte Tropfentrennung (Dispensen) durch Microwells

Nur sehr schwer zu erkennen ist (unten) ein rechteckiger Tropfen, von dem ein größerer Tropfen bei 90 V abgetrennt wurde (oben links), bevor dieser ins Abfallreservoir (oben rechts) bewegt wurde.

6.2.3 Untersuchung und Analyse

Um dieses Verhalten genauer abzubilden, wurde das Setup nachgestellt und unter besseren Lichtbedingungen aufgenommen. Abbildung 6.7a zeigt ein Foto eines Ausschnitts des DMF-Chips. Abbildung 6.7b ist eine REM-Aufnahme der Ecke eines Microwells. Darin eingezeichnet ist eine Linie (X_1 - X_2) zu sehen, deren Höhenprofile mit einem AFM ermittelt wurde und in Abbildung 6.7c dargestellt ist. Eine $5\ \mu\text{m}$ hohe Polymerschicht mit der $1\ \mu\text{m}$ hohen Randüberhöhung umgibt die Felder der WGMML auf dem Deckelsubstrat und bildet die ca. $1,9\text{mm} \times 1,9\text{mm} \times 6\ \mu\text{m}$ großen Microwells. Eine Kontaktwinkelmessung zeigte (Ergebnisse in Abschnitt 5.2.2 Tabelle 5.1), dass die Hydrophobie der Oberfläche innerhalb wie außerhalb der Microwells im Rahmen der Messungengenauigkeit identisch ist. von der Ecken et al. (2017)

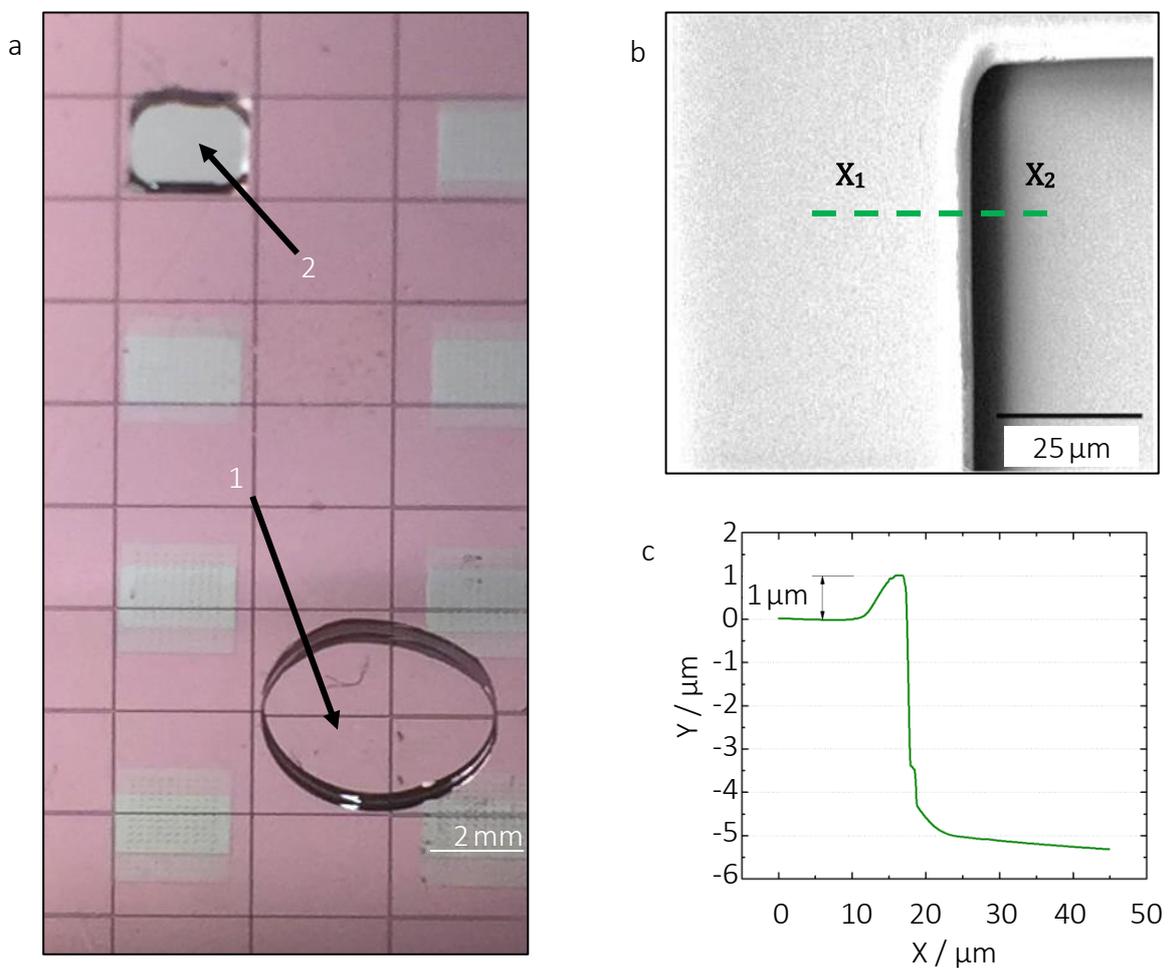


Abbildung 6.7: Analyse der Geometrie der Microwells

a) Draufsicht auf den DMF-Chip, WGMML-Feldern (weiße Quadrate) und den Polymerresten der WGMML-Herstellung (rosa Bereich) auf dem Deckelsubstrat. Ein großer Tropfen (1) außerhalb und ein kleiner, sich der Microwell-Form anpassender Tropfen (2). b) zeigt eine REM-Aufnahme der Ecke eines Microwells und c) den mittels AFM gemessenen Verlauf des Höhenprofils über die Kante eines Microwells hinweg ($X_1 - X_2$) Bild: Wondimu und von der Ecken

Eine zusätzliche Randüberhöhung von $1\ \mu\text{m}$ ist zu erkennen (Abbildung 6.7c), die durch den thermischen Reflowprozess entsteht. Somit bildet sich eine passive Barriere von $1\ \mu\text{m}$ von außen und $6\ \mu\text{m}$ von innen betrachtet.

Nach von der Ecken et al. (2017) verhält und erklärt sich das Verhalten des Systems wie folgt: Um diese Barriere mit einem Tropfen zu überwinden, muss eine bestimmte elektrische Spannung überschritten werden, die höher ist als die für die normale Bewegung auf dem DMF-Chip. Diese erhöhte Spannung ist notwendig, um die Energie für die zusätzliche Verformung (durch die Engstelle der Randüberhöhung hindurch) bereitzustellen.

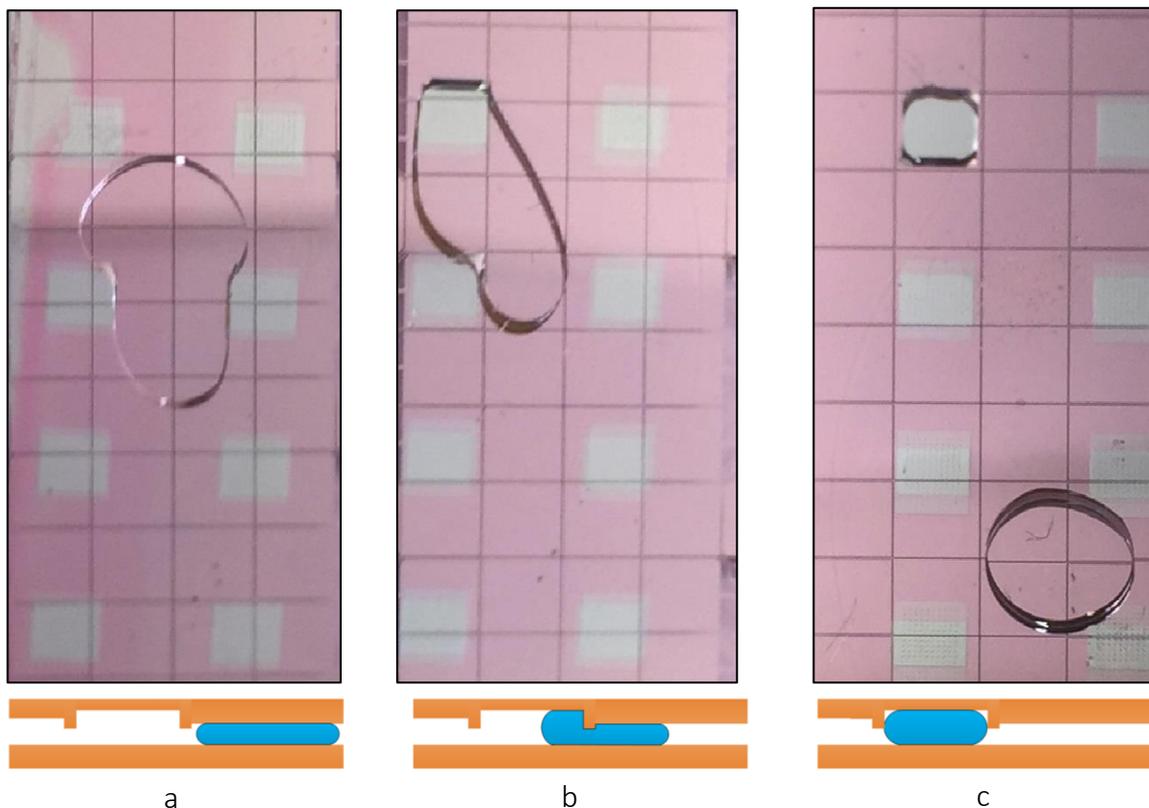


Abbildung 6.8: Mögliche Erklärung der hydrophoben/hydrophilen Effekte

a) Die Randüberhöhung um das Quadrat herum wirkt wie eine Barriere. Der Tropfen kann nicht ohne weiteres in den Spot eindringen (Energiepotential muss überwunden werden, in Form von Verformungsenergie bzw. Oberflächenenergie). Der Tropfen kann leicht um die Spots geführt werden (50-70 V). b) Um den Tropfen hineinzubewegen, wird eine höhere Spannung (90 V) benötigt. Wenn sich der Tropfen oder ein Teil von ihm im Spot befindet, dann hat der Tropfen in diesem Bereich ein geringeres Verhältnis von Oberfläche zu Volumen, seine Verformungsenergie ist lokal minimal. c) Wird versucht, den Tropfen wegzubewegen (Spannung auf benachbarte Elektroden 90 V), so wird ein Teil (großer Tropfen im Bild) abreißen und wie im Falle der „hydrophilen Spots“ ein definiertes Volumen zurücklassen (kleiner Tropfen im Bild). Soll auch dieser Resttropfen wieder herausbewegt werden, so wird eine noch höhere Spannung (120 V) benötigt. Bild: Wondimu und von der Ecken

Das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen und somit die absolute Oberflächenenergie des Tropfens steigen solange, bis er den höchsten Punkt der Barriere passiert. Sobald der Tropfen die Barriere und den Wall überwunden und das Microwell gefüllt hat, erreicht das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen und die absolute Oberflächenenergie ein lokales Minimum.

Die Microwells in Verbindung mit der umgebenden Fläche und der Randüberhöhungen erleichtern die kontrollierte Tropfenbewegung und verhindern unbeabsichtigten Kontakt zwischen Tropfen und Sensorfeldinnerem. Die Fläche außerhalb der Sensorfelder dient quasi als „Umgehungsstraße“, die Tropfen um die Sensorfelder herumführt. Eine Spannung von 50V bis 70V ist ausreichend, um die Tropfen auf den Umgebungsflächen zu bewegen.

Jedoch ist es auch möglich, die Tropfen in die Sensorfelder zu bewegen, sobald die diesen unterliegende Elektrode mit höherer Spannung ($90V \pm 10V$) angesteuert wird. Diese zusätzliche Spannung ist notwendig zur Überwindung der Barriere, die durch den thermischen Reflowprozess während der WGMML-Fabrikation erzeugt wurde, und der damit verbundenen zusätzlichen Verformung und Oberflächenvergrößerung des Tropfens.

Sobald der Tropfen das Microwell bedeckt, verhält sich diese Fläche wie ein hydrophiler Spot. Der Tropfen bleibt eher in der Form und auf der Position innerhalb des Microwells als von der normalen Aktor-Spannung von in diesem Fall 70V wegbewegt zu werden. Wenn der Tropfen größer als ca. 2 Elektrodenfelder ist, dann kann er gesplittet und der abgetrennte Teil wegbewegt werden. Ein definiertes Volumen bleibt innerhalb des Microwells zurück.

Ein Tropfen innerhalb des Microwells hat ein geringeres Oberfläche zu Volumen Verhältnis als außerhalb, was in einer höheren absoluten Oberflächenenergie resultiert. Wahrscheinlich ist dadurch die noch höhere Spannung (über 120V) notwendig, um den Tropfen aus dem Microwell hinauszuziehen. von der Ecken et al. (2017)

6.2.4 Vergleich von „echten“ und „virtuellen“ Microwells

Das „virtuelle“ Microwell nach Eydelnant et al. (2012) und Witters et al. (2013) ist ein durchgehendes Loch mit einem Durchmesser in der Größenordnung um 0,5-4mm in der etwa 100nm hydrophoben Teflonschicht. Diese Microwells haben die Aufgaben, erstens eine Dosierung von Flüssigkeitsmengen unabhängig der Elektrodengröße zu ermöglichen und zweitens einen Spot für das Einbringen eines Feststoffes etwa zur Funktionalisierung zu bieten.

Wenn nun ein Tropfen an diesen hydrophilen Spot herangeführt wird, wird er diesen benetzen. Die Haftung zwischen Tropfen und Spot ist so groß, dass die elektrostatischen Kräfte diesen nicht mehr wegbewegen können. Die einzige Möglichkeit besteht im Austausch des Tropfens, d.h. ein anderer Tropfen wird hingeführt und schiebt den vorhandenen weg. Aber es bleibt immer ein gleichgroßer Rest des neuen Tropfens dort hängen.

Die „echten“ Microwells sind Löcher mit Randüberhöhung mit Durchmessern in der Größenordnung um 0,5-4 mm und einer Tiefe im Bereich von 5-10 μm , letztere also zwei bis drei Größenordnungen mehr im Vergleich zum „virtuellen“ Microwell. Teflon ist als hydrophobe, chemisch inerte und biokompatible Beschichtung sehr geeignet für Chemie und Biologie - es sei denn, es müsste z.B. mit fluorinierten Lösemitteln gearbeitet werden. Die Microwells sind komplett mit Teflon beschichtet. Es können hier auch erhabene Strukturen wie z.B. WGMML platziert werden und bei Bedarf kann die Oberfläche auch immer noch funktionalisiert werden. von der Ecken et al. (2017)

Auf diese ähnliche, je nach Anwendung vorteilhafte Lösung sind von der Ecken et al. (2017) gestoßen, die sowohl Eigenschaften eines hydrophilen Spots besitzt (leichte Dosierung), als auch noch die Möglichkeit bietet, den Tropfen wieder herauszuziehen (höhere, aber für den DMF-Chip unproblematische, elektrische Spannung notwendig) und dazu noch eine Barriere in beide Richtungen bietet, die praktischer Weise eine zusätzliche Sicherheit bei der Kontrolle der Tropfenbewegung bedeutet. Und der Tropfen auch wieder herausbewegt werden.

Das besondere an der DMF ist bekanntlich die Freiheit, Tropfen diskret und unabhängig steuern zu können. Die „echten“ Microwells erlauben eventuell diese Freiheit, die bei den „virtuellen“ Microwells nicht gegeben ist, zukünftig dazu zu gewinnen.

6.3 Zwischenfolie mit integrierten Kapillaren

Der nächste Abschnitt beschreibt die Vorteile eine ebenso einfachen und kostengünstigen PDMS-Folie, deren besonderes Merkmal - eingegossene Glaskapillaren - eine Verbindung zwischen DMF-Chip und normaler Mikrofluidik bietet.

Die Idee war, ein kleines integriertes, aber auch leicht (de-)montierbares und somit wiederverwendbares Chipsystem zu entwerfen. Bei manuellem Betrieb wird ein Fluid an der Seite eines Chips positioniert und durch das elektrische Feld unter den Deckel gezogen. Für eine automatische Befüllung müssten Zuleitungen in den Chip gelegt werden. Diese müssten jedoch auch leicht zu positionieren sein. Weiterhin kann es sinnvoll sein, den Chip abdichten zu können, wenn z.B. ein Füllermedium verwendet werden soll, oder der Fluidikbereich gegen Luftaustausch und somit Verdunstung geschützt werden muss.

6.3.1 Konzept

Normalerweise sind DMF-Chips permanent verklebt oder es wird leicht zu lösendes doppelseitiges Klebeband verwendet. Eine PDMS-Abstandsfolie mit eingegossenen Kapillaren, eingeklemmt zwischen Boden und Deckel, ermöglicht eine leichtere Chip (De-)Montage und externe Flüssigkeitseinleitung. Eine Kapillare mit einem Außendurchmesser von 100-150 μm passt in diesem Fall zu dem Boden-Deckel-Abstand von 150-250 μm . Der hier vorgestellte Ansatz ermöglicht eine luftdichte, geklemmte Verbindung zwischen Chipteilen und Folie. Zusätzlich bieten die Kapillaren eine schnelle Verbindung mit z.B. Spritzenpumpen. Die Dichtigkeit wird jedoch für Füllermedien (s. Abschnitt 2.3.4) niedriger Oberflächenspannung wie Silikonöl nicht ausreichen, da diese unverzüglich durch jeden Spalt nach außen fließen würden. Hier kann nur ein dichtes und daher kaum leicht wieder zu lösendes Bondverfahren Abhilfe schaffen.

Die Positionierung der Kapillaren zueinander und zu den Reservoir Elektroden innerhalb des Chips wird durch das definierte Eingießen der Kapillaren in der Gussform erreicht. Die Kapillaren außerhalb der Folie hängen frei und können somit leicht um Hindernisse wie Federkontaktstifte herumgeführt werden.

6.3.2 Umsetzung

Die Gussform wurde nach der schematischen Darstellung in Abbildung 6.9 aus leicht zu bearbeitendem PMMA hergestellt. Eine höhere Präzision und Langlebigkeit kann etwa durch Messing- oder Aluminiumformwerkzeuge erreicht werden, sind aber für den Laborversuch nicht notwendig gewesen.

Nach dem Befüllen mit flüssigem PDMS wird eine (z.B. PET-) Folie aufgelegt gelegt und dann mit einer Platte verpresst. Überschüssiges PDMS fließt seitlich heraus und wird in den Überläufen (s. Abbildung 6.9) aufgefangen. Das Aushärten kann bei Raumtemperatur über Nacht auf dem Labortisch oder innerhalb weniger Stunden im Ofen stattfinden.

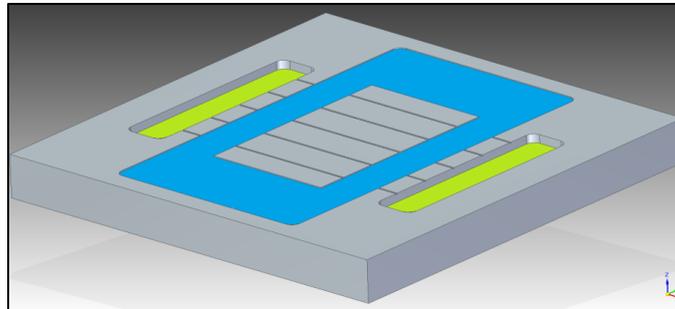


Abbildung 6.9: 3D-CAD der PMMA-Gussform für die PDMS-Folie

Die Folie wird im blauen Bereich geformt und die grünen Bereiche sind Überläufe. Die Kapillaren werden durch dünne Nuten in Position gehalten.

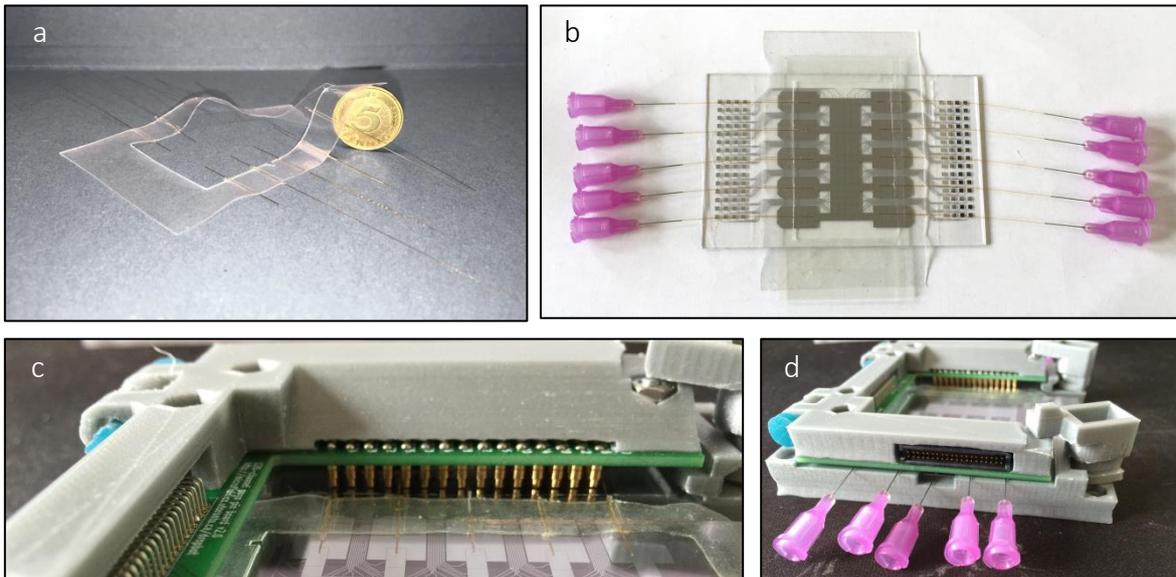


Abbildung 6.10: Zwischenfolie aus PDMS mit Glaskapillaren

a) Eine Folie mit eingelassenen Kapillaren soll das präzise Einbringen eines Fluids in den Chip ermöglichen. b) Sie soll sowohl als Dichtung als auch als Abstandhalter (Spacer) zwischen Boden und Deckel dienen. c-d) Die Kapillaren sind innerhalb des Chips durch die Folie fixiert, aber außerhalb können sie frei verlegt werden, z.B. um Kontaktpins herum oder durch das Gehäuse eines Testbetts. An den Enden können Dosiernadeln ein Interface zu Spritzenpumpen bieten.

Die Kapillaren können dabei nicht mit PDMS volllaufen, weil sie im späteren DMF-Fluidikbereich erst nach dem Aushärten des PDMS zugeschnitten werden. Die äußeren Enden ragen über die Form hinweg und sind daher auch geschützt.

Die fertige Folie wird aus der Form entfernt, die Kapillaren in der Mitte und an den Seiten werden zugeschnitten (Abbildung 6.10a) und mit Dosiernadeln verklebt (Abbildung 6.10b). Die Kapillaren sind so ausgelegt, dass sie frei zwischen Hindernissen wie den Federkontaktstiften des elektronischen DMF-Chip Interfaces verlegt werden können. Die runden Stiftköpfe drücken die Kapillaren von selbst zur Seite, ohne dass die Kapillaren von Hand um die Stifte herumgeführt werden müssen.

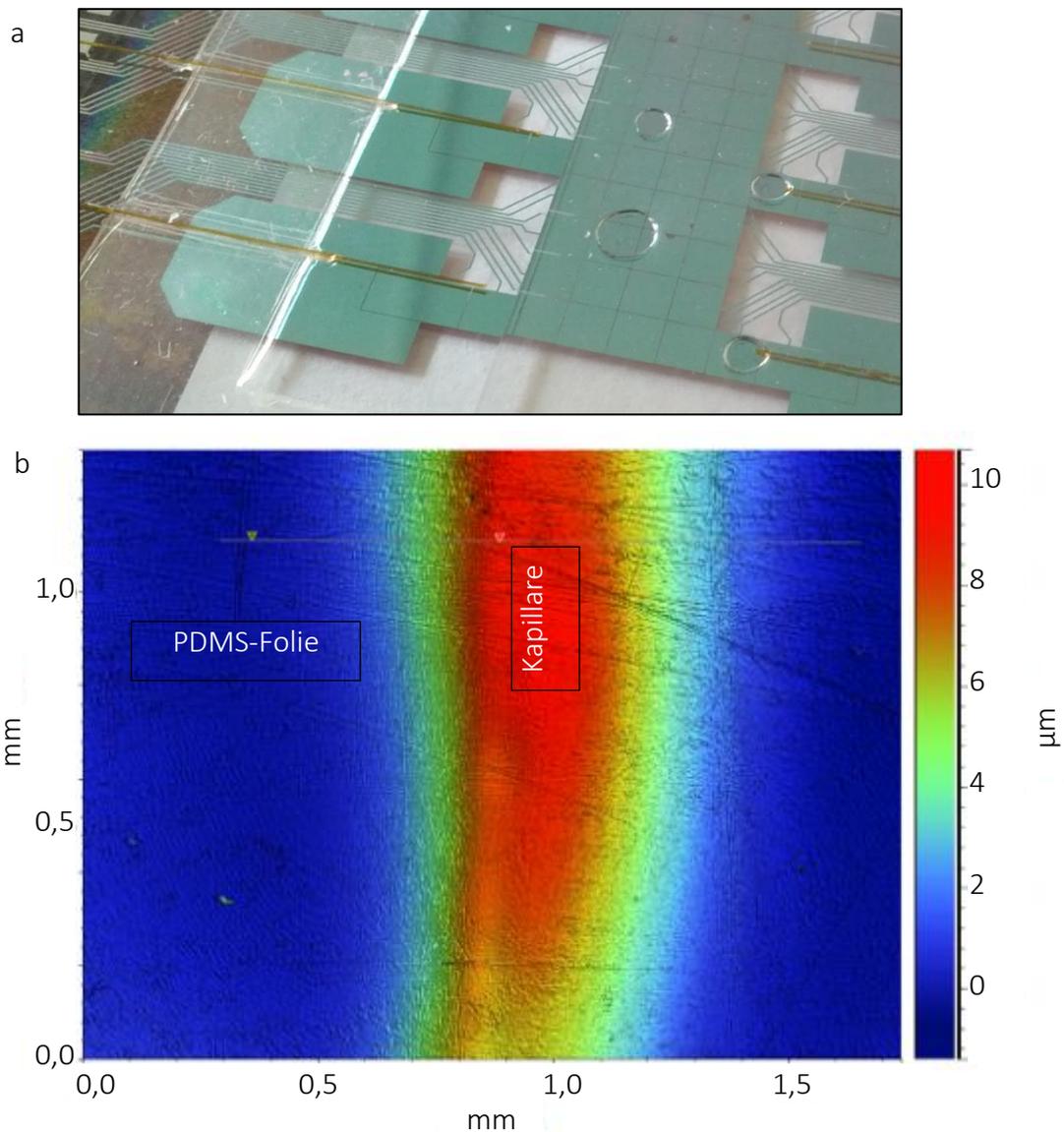


Abbildung 6.11: Oberflächenanalyse der Zwischenfolie

- a) Die Folie muss nur einmal positioniert werden, um eine beliebige Anzahl von Kapillaren an ihre Zielposition zu bringen und zu halten.
- b) WLI -Aufnahme eines 20 mm × 20 mm Ausschnitts der Folie im Bereich einer Kapillare.

Zur Abdichtung des Fluidikbereichs und zur Vermeidung einer Keilbildung, die die Tropfenkontrolle sehr erschweren würde, ist eine möglichst flache und planparallele Oberfläche zu bevorzugen. Die Messung hat gezeigt, dass auf die Kapillaren-freie Fläche bezogen maximal eine Erhöhung um 5% zu erwarten ist.

In Abbildung 6.11 ist ein Ausschnitt einer fertigen Folie zu sehen, die mit einem WLI auf ihre Oberflächenbeschaffenheit hin untersucht wurde. Die Kapillare von etwa 150 μm Außendurchmesser wurde in der 200 μm dünnen Folie verarbeitet. Es konnten Ausbeulungen von etwa bis zu 10 μm (max. $\approx 5\%$ der Folienstärke) gemessen werden.

6.4 Steuerung magnetischer Partikel in DMF-Systemen

Long et al. (2009) geben eine Übersicht über die Möglichkeiten, Tropfen mit magnetischen Partikeln zu steuern. Ng et al. (2012) zeigen die Verwendung magnetischer Partikel für Immunoassays in DMF-Chips und Choi et al. (2013) beschreiben eine unbewegliche magnetische Linse, die magnetische Partikel nur an einer festgelegten Linie sammeln und festhalten bzw. freigeben kann (Ein/Aus).

Die Prämisse, ein flexibles DMF-System zu entwickeln, brachte die Idee, eine in XYZ-Richtung bewegliche magnetische Linse zu implementieren. Zum einen wäre diese Linse unabhängig vom späteren Elektrodendesign eines DMF-Chips, zum anderen könnten alle Positionen eines Chips angefahren werden. Und ein weiterer Vorteil wäre die Möglichkeit, magnetische Partikel nicht nur zusammenzuziehen, sondern auf eine Kraft parallel zur Chipfläche auszuüben, um die Partikel direkt zu steuern.

6.4.1 Magnetische Linse

Magnetische Partikel und Tropfen sollen auf einem Chip getrennt werden (s. Abbildung 6.12). Damit vornehmlich nur ein einzelner Tropfen bzw. vielmehr die Beads eines bestimmten Tropfens ein starkes B-Feld erfahren, sollte dieses fokussiert werden.

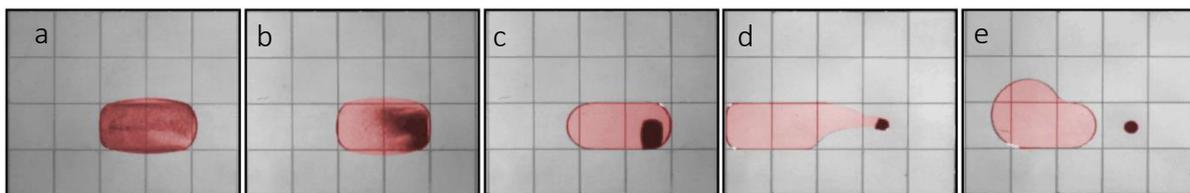


Abbildung 6.12: Demonstration der Funktion der magnetischen Linse

a-c) Das B-Feld der magnetischen Linse konzentriert die magnetischen Partikel (schwarz) in einem kleinen Punkt innerhalb des Tropfens (rot), indem die Linse senkrecht auf den Chip zu bewegt wird. d) Der Tropfen wird durch das E-Feld der aktivierten Elektroden wegbewegt. e) Die flüssige Phase wurde nahezu vollständig von der festen Phase getrennt.

Dafür eignet sich eine magnetische Linse, wie sie von Choi et al. (2013) vorgeschlagen wurde. Das ursprüngliche Design sieht vor, dass magnetische Partikel senkrecht auf eine entlang einer komplette Elektrodenreihe verlaufenden geraden Linie fokussiert werden. Damit lassen sich viele Tropfen parallel verarbeiten.

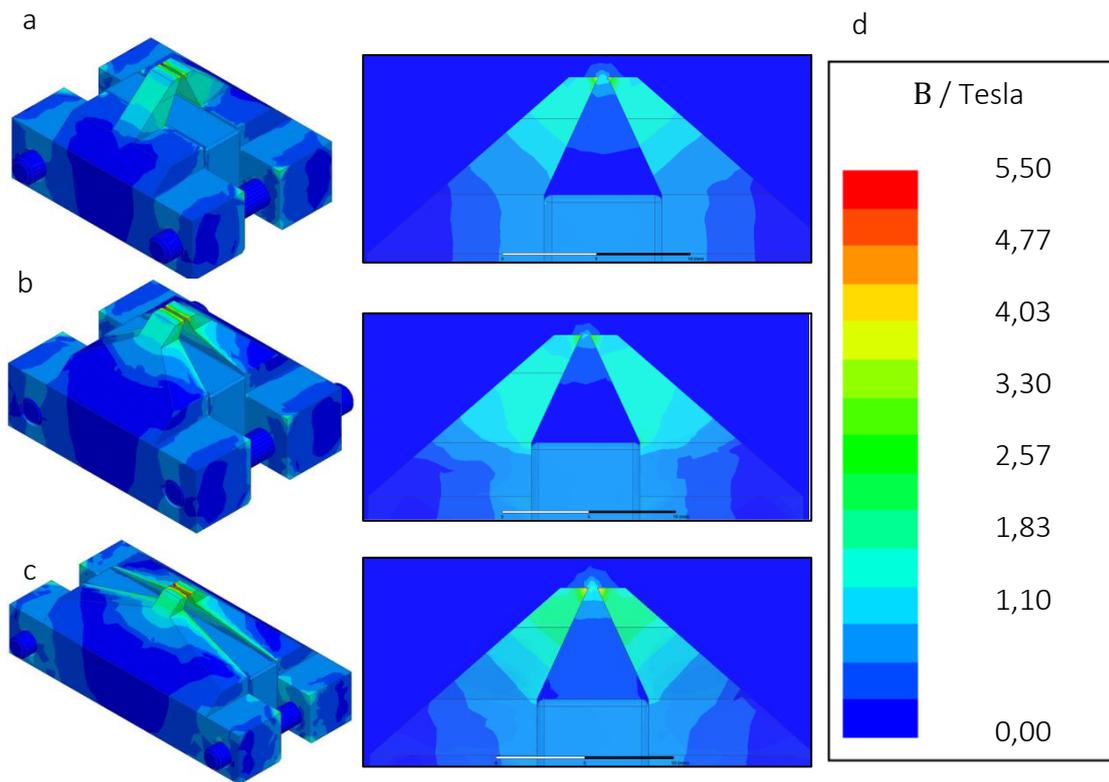


Abbildung 6.13: Simulation verschiedener Linsendesigns

a) Ein dünner Doppelsteg führt den magnetischen Fluss zur Spitze. b) Es ist effektiver für die Führung des magnetischen Flusses, wenn mehr Material am Steg vorhanden ist. c) Das Magnetfeld ließe sich weiter verstärken, wenn die Basis verbreitert wird und zwei Magnete aufnimmt.

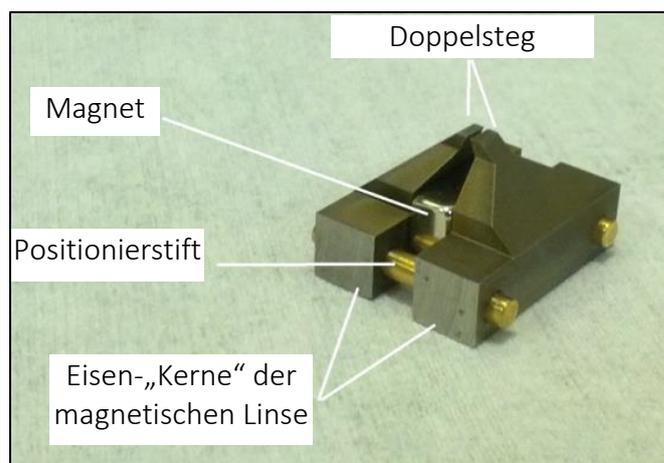


Abbildung 6.14: Foto der magnetischen Linse

Die Wahl fiel auf die Version aus Abbildung 6.13b. Der Eisen-„Kern“ der magnetischen Linse wurde aus dem Baustahl S235 hergestellt. Die Positionierstifte sind aus nicht magnetisierbarem Messing.

Das dort entwickelte Design wurde verkleinert und angepasst, damit nicht entlang einer Linie, sondern nach Möglichkeit nur in einem kleinen Bereich um eine Elektrode herum ein relevantes Magnetfeld induziert wird. Zuvor wurden verschiedene Designideen für die Form des Eisen-„Kerns“ simuliert. Eine Auswahl wird in Abbildung 6.13 gezeigt. Die später gefertigte Linse ist in Abbildung 6.14 abgebildet.

6.4.2 Aufbau des XYZ-Tisches

Es wurde ein XYZ-Tisch auf Basis eines älteren Systems von Voigt et al. (2014) weiterentwickelt. Die Ansteuerung erfolgt über einen Arduino und ist dadurch kompatibel zu einer Vielzahl von Plattformen wie z.B. dem ebenfalls Arduino-gesteuerten DropBot (s. Abschnitt 3.2.2). Aufbau und Umsetzung des XYZ-Tisches können Abbildung 6.15, Abbildung 6.16 und im Detail Ohmer (2016) entnommen werden.

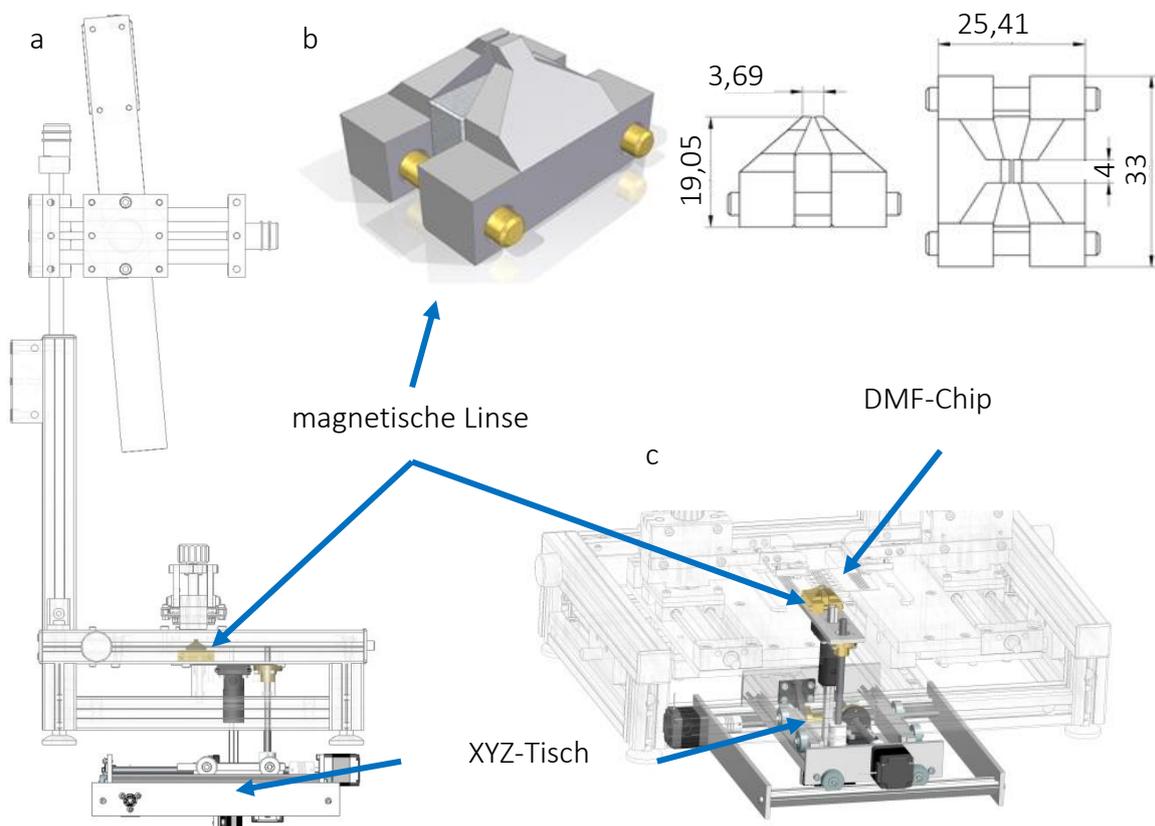


Abbildung 6.15: Schema der Integration der Erweiterung in den Versuchsstand

a) Seitenansicht des Testbetts (schwarz weiß) und des neu hinzugekommenen XYZ Tisches. b) Die magnetische Linse und ihre Abmessungen in mm (Jonas Ohmer 2016) und c) ihre Positionierung im Versuchsstand.

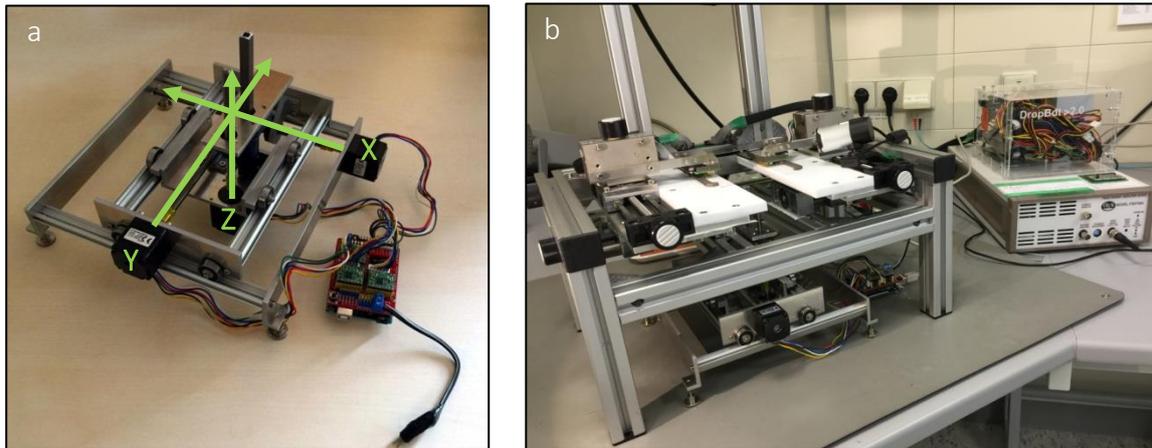


Abbildung 6.16: Integration der magnetischen Linse und des XYZ-Tisches in den Versuchsstand

a) Der XYZ-Tisch angeschlossen und gesteuert von einem Arduino. b) Integration des neuen Systems in den Versuchsstand aus DropBot und Testbett.

6.4.3 Ein neuer Freiheitsgrad: Steuerung magnetischer Partikel

DMF-Chips bewegen Tropfen auf einer Oberfläche. Bisher wurden in diesen Tropfen enthaltene magnetische Partikel nur ausgefällt, indem ein Magnet die Partikel festhält und ein E-Feld den Tropfen wegbewegt. Mittels einer magnetischen Linse (Choi et al. (2013)) lassen sich die Partikel effektiver sammeln.

Das hier vorgestellte System bringt einen neuen Freiheitsgrad für den DMF-Chip, indem jetzt auch magnetische Partikel aktiv gesteuert werden können, so wie es der DMF-Chip bereits mit Tropfen zu tun im Stande ist.

Mit dem neu entwickelten System aus XYZ-Tisch und magnetischer Linse lassen sich jetzt die magnetischen Partikel innerhalb eines Tropfens als Ganzes bewegen. Eine praktische Anwendung ergibt sich daraus, dass manchmal Tropfen irreversibel festsitzen, etwa durch Biofouling (s. Abschnitt 2.2.3) oder einen dielektrischen Durchbruch (s. Abschnitt 2.4.3).

Wenn die Partikel aus dem festsitzenden Tropfen gerettet werden sollen, dann kann ein zweiter Tropfen neben dem festhängenden platziert und mit diesem verbunden werden. Mit Hilfe der Linse lassen sich die Partikel sammeln und in den neuen Tropfen hinüberziehen. Das gemeinsame Tropfenvolumen wäre nun groß genug, um den Tropfen zu splitten und damit sind die Partikel wieder frei. Abbildung 6.17 zeigt einen lang gezogenen Tropfen (rote gestrichelte Linie). Der rechte Bereich sei der ursprüngliche festsitzende Tropfen, der linke sei ein „Rettungstropfen“. Durch den dünnen Mittelbereich werden die Partikel mit der magnetischen Linse hindurchgezogen. Anschließend werden die Tropfen getrennt.

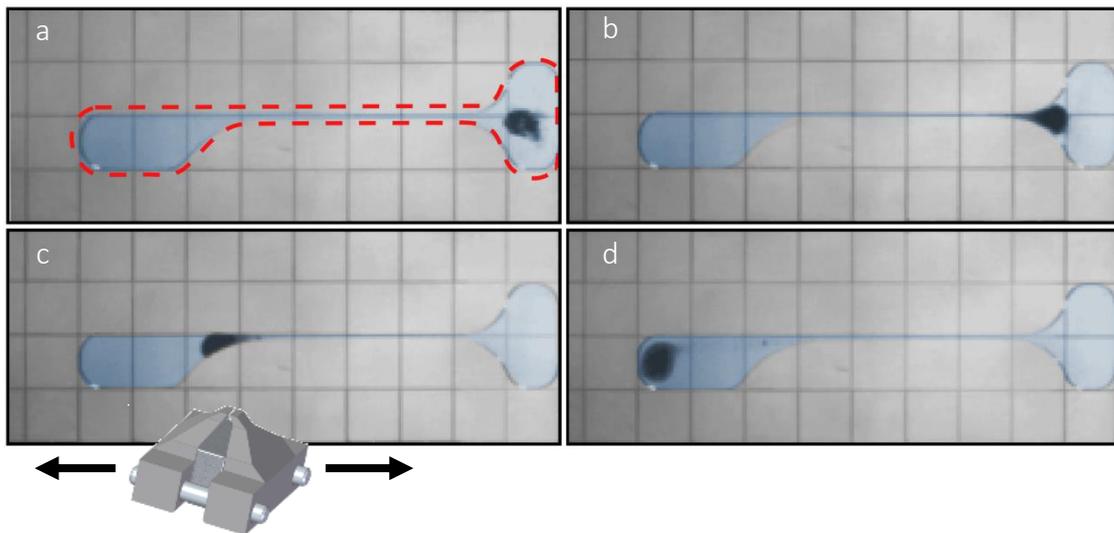


Abbildung 6.17: Bewegen der Partikel mit Hilfe der magnetischen Linse

a-d) Wenn z.B. der blaue Tropfen (digital nachbearbeitet) auf einem Chip hängenbleibt, sei es durch Biofouling oder dielektrischen Durchbruch, so kann der relevante Inhalt in Form der magnetischen Partikel aus diesem befreit werden. Die Linse sammelt die Partikel und führt diese durch diesen (übertrieben lang gezogenen) Tropfen von rechts nach links, heraus aus der problematischen Zone.

Eine andere Möglichkeit durch die bewegliche Linse wäre der Einsatz von magnetischen Partikeln als Rührfischchen(-schwarm). Zwei zueinander gebrachte Tropfen ließen sich nun auch effektiv mischen, ohne dass dazu die Elektroden aktiviert werden müssen. Dies könnte notwendig sein, wenn die Reaktion kein elektrisches Feld erfahren darf, oder wenn der resultierende Tropfen (gewollt oder ungewollt: vgl. Abschnitt über Biofouling von Streptavidin in Abschnitt 5.3.2) nicht mehr bewegbar ist. Dies wurde jedoch nicht weiter verfolgt.

6.4.4 Ein weiterer Freiheitsgrad: Ausschleusen der Partikel

Eine wichtige und sehr praktische Funktion, die durch das System ermöglicht wird, ist das Hinausführen von magnetischen Partikeln und einer geringen Flüssigkeitsmenge aus dem Chip, ohne dass das Deckelsubstrat entfernt werden muss. Dies könnte den Chip beschädigen, unabhängig davon würde es jeden Fall zu einer Unterbrechung des Experiments führen. Das gewünschte Produkt könnte einerseits die Flüssigkeit selber sein, oder z.B. eine Proteinkette, die sich auf den Beads befindet. Ohmer (2016)

Abbildung 6.18 zeigt das Funktionsprinzip. Mit der magnetischen Linse kann ein Tropfen mit den konzentrierten magnetischen Partikeln aus dem Chip herausgezogen und außerhalb des Chips an eine beliebige, definierte Position gefahren werden. Dort könnte ein Pipettier-Roboter das Produkt aufnehmen. Somit ergibt sich eine neue, einfache und sehr flexible Schnittstelle zwischen (automatisierter) digitaler Mikrofluidik und klassischen (automatischen) Pipettier-Systemen.

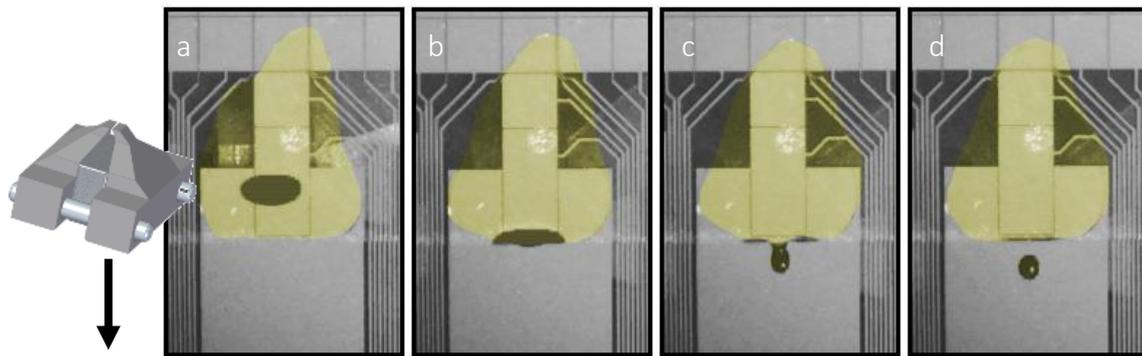


Abbildung 6.18: Ausschleusen der Partikel mit der magnetischen Linse

a-b) Die magnetische Linse konzentriert die Beads und wird anschließend parallel zum Chip Richtung der Kante des Deckelsubstrats geführt. c) Die magnetischen Partikel werden aus dem Spalt hinausgezogen. d) Die Suspension kann nun mit einer Pipette aufgenommen werden, ohne dass das Experiment unterbrochen oder der Chip geöffnet werden musste.

Das Herausführen des Produktes ließe sich auch mit einer dünnen Kapillare - angeschlossen an eine Pipette oder Spritzenpumpe - erzielen, die bei Bedarf in den Spalt zwischen Deckel und Boden eingeführt wird. Das Handling wäre jedoch umständlicher als bei einem flexiblen, programmierbaren und automatisierbaren Pipettier-Roboter. Auch könnte die hydrophobe Oberfläche Kratzer bekommen, die die Bewegung der Tropfen hemmt oder verhindern.

In Abschnitt 6.3 wurde ein ähnlicher Ansatz vorgestellt, bei dem Kapillaren aber dauerhaft im Chip platziert werden, und so ein Interface z.B. für Spritzenpumpen geschaffen wird. Das dort gezeigte System ist unabhängig vom Vorhandensein magnetischer Partikel.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel der Arbeit war die Adaptierung eines komplexen Laborprotokolls der synthetischen Biologie zur Ligation einer TALEN-Bindedomäne in einem mikrofluidischen System, um zukünftig eine Automatisierung und somit eine on-Demand Hochdurchsatz-Assemblierung von TALEN zu ermöglichen. Ein großer Nachteil der gängigen Kanalmikrofluidik ist, dass ihr Aufbau schnell sehr komplex wird, wenn viele Flüssigkeiten frei verwaltet werden sollen. Der besondere Vorteil der DMF-Technologie ist ihre Fähigkeit, Tropfen individuell in einem frei programmierbaren Mikrofluidikchip ohne Pumpen, Ventile oder komplizierte Kanalstrukturen steuern zu können.

Mikrofluidische Umsetzung eines Biosynthese-Protokolls

Ein DMF-Chip System bietet die idealen Voraussetzungen, ein komplexes Protokoll wie den ICA-Ligationsprozess mikrofluidisch umzusetzen und zu automatisieren. Alle 31 Flüssigkeiten des ICA-Protokolls können in einem beliebigen Ablauf gesteuert werden. Durch die Verwendung des Tensids Pluronic 64 anstatt Tween 20 konnte das sogenannte Biofouling unterbunden und die Tropfenbeweglichkeit signifikant verbessert werden, ohne die Ligation negativ zu beeinflussen. Es wurde eine DNA-Bindedomäne aus drei Elementen assembliert, um die Kompatibilität des ICA-Protokolls mit der DMF-Technologie nachzuweisen.

Die erfolgreiche DNA-Assemblierung durch das ICA-Protokoll auf einem DMF-Chip wurde hier gezeigt. In Kombination mit u.a. PCR auf DMF-Chips (Shih et al. (2015), Sista et al. (2008), Yehezkel et al. (2016)) könnte in Zukunft ein vollständig automatisiertes, DMF-basiertes System z.B. eine DNA-Editierung ermöglichen.

Dies ist ein gutes Beispiel für die vielfältigen Möglichkeiten der DMF-Technologie. Sub- μl Dosierung mittels Pipetten ist unhandlich. Das ICA-Protokoll wurde nicht für die DMF-Technologie entwickelt, aber es war leicht zu adaptieren und profitiert von dessen Potential: große Anzahl von Flüssigkeiten, mischen und trennen von Flüssigkeit und Feststoffen (magnetischen Partikel), kleinste Volumen und frei programmierbare Fluidverwaltung. Dies hätte ansonsten in einem extrem komplexen Kanalmikrofluidik-System resultiert.

Hier wurde die DMF-Technologie verwendet, um ein komplexes Protokoll aus der synthetischen Biologie in einem mikrofluidischen System zu automatisieren, dessen Umsetzung in einem klassischen mikrofluidischen System einen enormen technischen Aufwand verursacht hätte. Berthier (2012)

Die DMF-Proben wurden mit einem im Vergleich zum Originalprotokoll um 50% reduzierten Volumen erstellt. Das auf dem hier verwendeten DMF-Chip kleinste gut kontrollierbare Volumen ist etwa $0,5\ \mu\text{l}$ ($100\ \mu\text{m}$ Spalthöhe und $5\ \text{mm}^2$ Elektrodenfläche).

Eine weitere Miniaturisierung könnte technisch durch kleinere Elektroden und Microwells (vgl. Abschnitt 6.1) umgesetzt werden, aber es wäre nur für ein vollständig integriertes, automatisches System sinnvoll. Darauf wurde aber aufgrund des zeitlichen Rahmens des Projekts verzichtet, sodass die Ressourcen für neue Ideen zur Verwendung der DMF-Technologie eingesetzt werden konnten.

Integration von Sensoren in digitale Mikrofluidik Chips

In diesem Projekt konnte die erstmalige Herstellung und Integration von WGMMML-Sensorfeldern in ein DMF-System präsentieren werden. Zusätzlich wurde die Integration von „echten“ Microwells in ein DMF-System zum passiven Dosieren von Tropfen innerhalb der Sensorfelder gezeigt. Das System wird als ein Modell zur Messung von Biomolekülen genutzt. Dazu wurde ein Lab-on-Chip (LoC) zum Biosensing entwickelt, das digitale Mikrofluidik (DMF) und Whispering Gallery Mode Mikrokelch Laser (WGMMML) in einem Chip integriert. Die WGMMML-Felder zur Analyse wurden auf dem Deckelsubstrat des DMF-Chips hergestellt, während das Bodensubstrat die Elektroden zur Tropfenbewegung bereitstellt. Von der Ecken et al. (2017) sind der Meinung, dass dieses Konzept eine gleichzeitige Messung vielfältiger Biomoleküle bei minimalen Probenmengen innerhalb eines automatisierten Lab-on-Chip Systems ermöglicht.

Die Microwells (s. Abschnitt 6.1), in denen sich die Sensorfelder befinden, zeigen praktische Eigenschaften, die die Tropfenmanipulation unterstützen. Die Randüberhöhung dieser Felder dient als hydrophobe Barriere und verhindert damit einerseits die ungewollte Benetzung der Sensorfelder. Andererseits zeigt die Vertiefung der Felder in Zusammenhang mit der umgebenden Randüberhöhung ein hydrophiles Verhalten, sobald der Tropfen im Inneren liegt. Diese „echten“ Microwells haben im Gegensatz zu hydrophilen Spots („virtuelle“ Microwells) den Vorteil, dass sich der Tropfen auch wieder durch die Aktor-Elektroden - mit höherer aber weiterhin praktikabler Spannung beschaltet - hinausbewegen lässt.

Die Empfindlichkeit zur Messung des Brechungsindex mit diesem System beträgt 29 nm/RIU. Basierend auf der Empfindlichkeit und dem Störsignallevel errechnet sich die Erfassungsgrenze des Systems zu $4,7 \cdot 10^{-5}$ RIU. Den Funktionsnachweis des integrierten Chips lieferte die Messung von unterschiedlichen Streptavidinkonzentrationen innerhalb der Tropfen, indem auf den Mikrokelchlasern immobilisiertes Biotin mit dem Streptavidin eine spezifische Bindung einging. Die Oberfläche wurde dafür zuvor mit biotinyliertem BSA funktionalisiert. Das System besitzt eine Empfindlichkeit von 3,54 pm/($\mu\text{g/ml}$) für Streptavidin.

Die Funktionsfähigkeit des Systems wird sowohl für die Brechungsindexmessung im Tropfenvolumen von Glycerollösungen als auch für die markerfreie Detektion von Streptavidin mittels einer biotinylierten Resonatoroberfläche demonstriert. Erstmals wurden optische Resonatoren für die markerfreie Detektion von Biomolekülen in DMF-Systemen eingesetzt. Diese Methode kann zu einer vielseitigen Biosensorplattform erweitert werden, die die gebündelte Detektion einer großen Bandbreite klinisch relevanter Biomoleküle in einem einzigen mikrofluidischen System vereint. Wiegele et al. (2014)

Verschiedene Elemente des Systems können zukünftig verbessert werden, um eine portable, zuverlässige Point-of-Care Diagnostik, wie sie insbesondere in der Medizin benötigt wird, zu realisieren. Dixon et al. (2016), Ng et al. (2015b)

Die Reaktionszeit der Sensoren könnte weiter reduziert werden, indem die Tropfen während der Messung aktiv gemischt werden (Wildgen et al. (2015)). Die parallele Messung unterschiedlicher Analyten kann durch lokal differenzierte Funktionalisierung etwa durch „polymer pen lithography“ (Wiegele et al. (2014)) erreicht werden.

Der Einfluss von umgebungsbedingten Störsignalen auf die Messung kann durch eine korrelierte Vergleichsmessung mit einem zweiten, nicht funktionalisierten, sondern passivierten WGMMML reduziert werden. Bog et al. (2015), Wienhold et al. (2015)

Eine neue und interessante Idee ist, die WGMML auf (Klebe-)Folien zu produzieren. Die WGMML werden großflächig hergestellt, funktionalisiert, danach oder auch zuvor in kleinere Felder vereinzelt und anschließend als Folienstück einfach aufgeklebt.

Sind die Folien hinreichend dünn, ließen sie sich leicht in bestehende mikrofluidische Systeme integrieren. So würde z.B. eine 10 µm dicke Folie in einem DMF-System wie diesem problemlos zwischen Deckel- und Bodensubstrat (100-200 µm) passen, ohne die Tropfenbewegung relevant zu stören. Ebenso bestünde die Möglichkeit, die Folie selbst als Dielektrikum einzusetzen, und somit einige Arbeitsschritte bei der Herstellung einzusparen.

Ein Versuch zeigte bereits, dass es problemlos möglich ist, den Prozess auf einer 7,5 µm Kaptonfolie umzusetzen und die Felder zu vereinzeln.

Die praktische Handhabung dieser vereinzelt, extrem kleinen und dünnen Folienstücke (z.B. 2 mm x 2 mm x 20 µm) ist jedoch eine große Herausforderung. Es ist kaum möglich, diese mechanisch und durch direkte Berührung auf eine Oberfläche zu drücken. Dies würde die WGMML zerstören.

Eine Möglichkeit zur Lösung des Problems könnte sein, die Folien auf der Zieloberfläche abzuliegen und nur punktuell zu fixieren. Das flächige Andrücken geschieht in diesem Fall über Druckluft. Alternativ wäre auch ein wohldosierter Spot von niederviskosem Klebstoff möglich, der das Folienstück über Kapillarkraft flach zieht und fixiert.

Vorteile „echter“ Microwells im DMF-Chip

Die „echten“ Microwells in DMF-Chips entstanden unbeabsichtigt, auch waren sie für die Durchführung des WGMML-Experiments in Kapitel 5, obgleich praktisch, nicht notwendig. Eine genaue Untersuchung und Weiterführung der Idee fand im Rahmen dieser Arbeit nicht statt. Es folgen Vorschläge und Ideen zur Fertigung und zum Design.

Wenn die Microwells so produziert werden wie im ursprünglichen Fall (s. Abschnitte 5.2 und 6.2) als Nebenprodukt der WGMML, dann befinden sich die Strukturen über der ITO Schicht. Aber die ITO-Schicht ist die notwendige Gegenelektrode zur Elektrodenmatrix auf dem Boden. Von Nachteil ist, dass eine höhere Spannung benötigt wird (s. Abschnitte 2.3.2 bis 2.3.4).

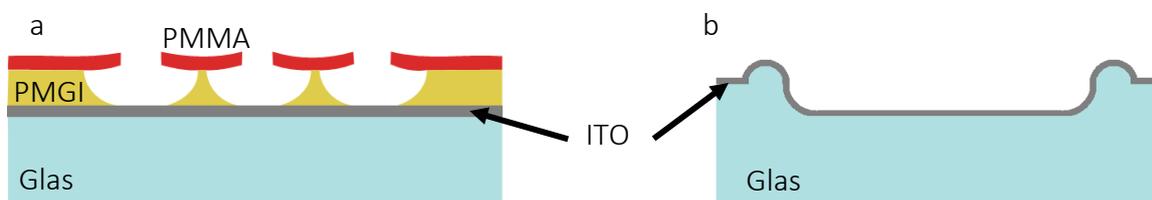


Abbildung 7.1: Notwendige Designänderungen zur Abformung und Beschichtung

- a) Unterätzte Strukturen können nur schwer beschichtet und abgeformt werden.
- b) Entformbare Substrate können per Spritzguss hergestellt werden. Jedoch bietet Glas den Vorteil, dass es z.B. weitaus temperaturbeständiger und auch biokompatibler ist. Außerdem ist für ein DMF System eine Gegenelektrode direkt unter dem Teflon besser. (Bild: Wondimu und von der Ecken)

Das DMF-System kann für geringere Aktor-Spannungen ausgelegt werden, indem der Fabrikationsprozess aus der Microwell-Herstellung entsprechend optimiert wird. Die Microwells können in einem Schritt direkt in das Deckelsubstrat integriert werden, wenn etwa die Rapid-Prototyping Methode für Glas von Kotz et al. (2016), oder Heißprägen bei Kunststoffen angewendet wird. Im Gegensatz zu den unterätzten Strukturen der WGMML-Herstellung aus Abbildung 6.3 könnte eine runde und stetige Barriere, die diese Herstellungsmethoden verlangen, auch der Tropfenbeweglichkeit zuträglich sein. Die Abscheidung von ITO auf der Oberfläche würde die Aktor-Spannung im Gegensatz zum WGMML DMF-Chip signifikant herabsetzen (s. Abschnitte 2.3.2 bis 2.3.4), auf welchem das ITO sich unterhalb der Polymerschichten befindet, die schlechte dielektrische Eigenschaften besitzen. von der Ecken et al. (2017)

Die Struktur in Abbildung 7.1a mit ITO geschlossen zu beschichten ist problematisch, weil verschiedene Bereiche unterätzt sind. Besser ist eine stetige, oder zumindest nach oben offene Form wie in Abbildung 7.1b. So wird die Oberfläche kompatibler zu diversen Beschichtungsverfahren (s. Abschnitt 2.4), wie der Inkjet-Technik zum direkten Drucken von Elektrodenstrukturen. Außerdem kann ein solch geformtes Substrat leichter reproduziert werden, weil eine Entformbarkeit für Prägeprozesse gegeben ist.

In Abbildung 7.2a ist Positionierung von Bodensubstrat mit Elektrodenmatrix und Deckelsubstrat mit Microwells dargestellt. Die Größen sind willkürlich gewählt, die Seiten der quadratischen Elektroden haben die Länge L und die der quadratischen Microwells die Länge $0,5 \cdot L$. Damit diese geringe, also kleiner als eine Elektrodenfläche, Fluidmenge aus dem Microwell entfernt werden kann, sollte dessen Fläche an eine Nachbar-elektrode angrenzen oder ganz leicht überlagern. Damit kann deren E-Feld eine ausreichende Kraft auf den Tropfen ausüben (Abbildung 7.2 d und e).

Wenn der große Tropfen weggeführt wird, von dem eine kleine definierte Menge im Microwell zurückbleiben soll, dann ist zum Zeitpunkt des Abreißens keine dem Microwell benachbarte Elektrode aktiviert (Abbildung 7.2d und c), da sonst auch das Microwell geleert werden könnte. Zum Abreißen zwischen Haupt- und Microwell-Tropfen führt die Haltekraft zwischen Microwell und Microwell-Tropfen und die elektrostatische Kraft zwischen weiter entfernter Elektrode und Haupt-Tropfen.

Ein weiterer Effekt, der genutzt werden könnte, um den Tropfen während des Abreißens im Microwell zu halten, lässt sich aus der Beschreibung der Elektrobenetzungskraft F_{EWOD} ableiten. Aus Gleichung 2.11 aus Abschnitt 2.3.2 lässt sich erkennen, dass die EWOD-Kraft auf einen Tropfen proportional zur Länge L der Vorschubfront ist. Die Länge der Vorschubfront lässt sich für den Haupttropfen einfach verdoppeln, indem senkrecht zur Zugrichtung zwei Elektroden aktiviert werden (s. Abbildung 7.3). Die elektrische Spannung muss jetzt so eingestellt werden, dass einerseits die Haltekraft einer einzelnen Elektrode allein nicht ausreicht, um einen Tropfen beim Abreißen (F_{Abriss}) festzuhalten, dies aber andererseits im Bereich des Microwells sehr wohl möglich ist. Auf den kleinen Tropfen wirkt eine Kombination aus $F_{EWOD}(0,5 \cdot L)$ und der Kraft F_y , die der Tropfen aufgrund der Vergrößerung seiner Oberfläche (resultierend aus der Oberflächenspannung) dem Verlassen des Microwells entgegensetzt. Auf den Haupttropfen wirkt die Kraft $F_{EWOD}(2 \cdot L)$.

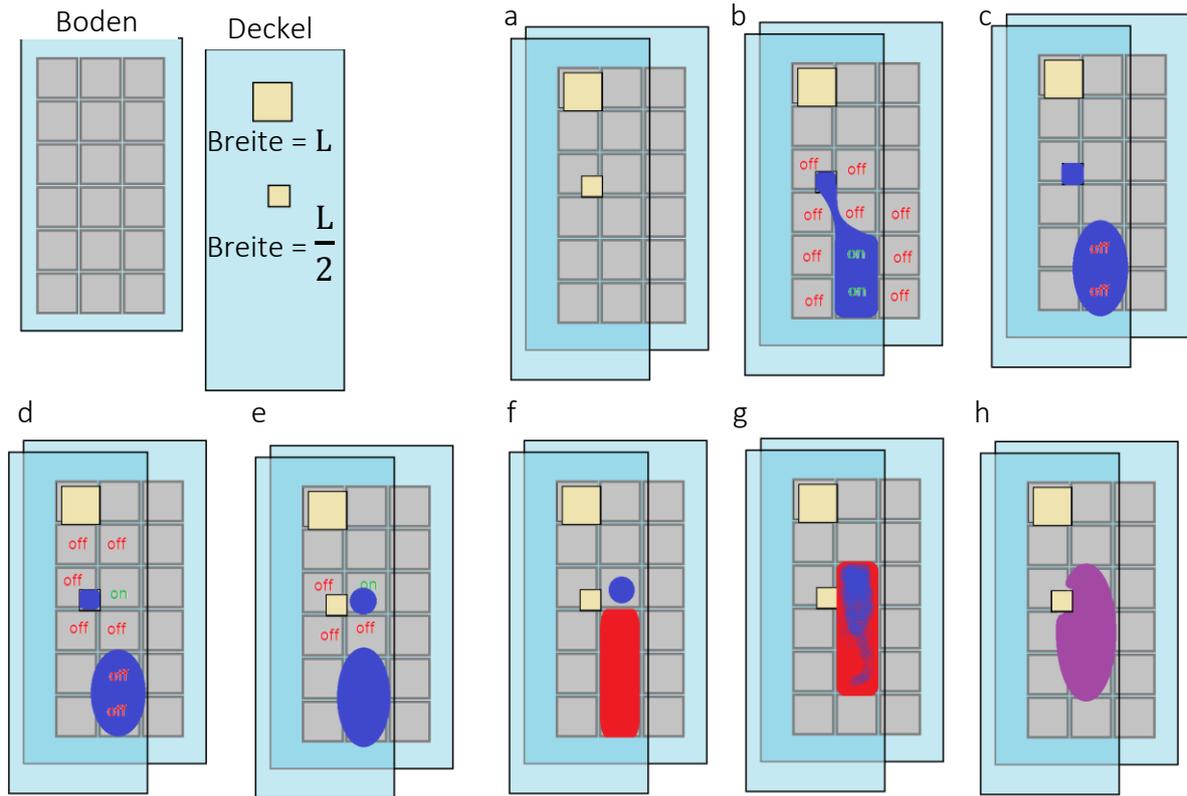


Abbildung 7.2: Überlegungen zur Microwell-Integration

Hellblau = Glas, Grau = Bodenelektroden (on/off), Gelb = Microwells und Dunkelblau = Tropfen. Boden und Deckel werden so positioniert, dass das kleine Microwell (Breite = $0,5 \cdot L$) in der Ecke einer Elektrode (Breite = L , ebenso wie großes Microwell) liegt und an drei weitere angrenzt. Die Bildfolge zeigt, wie eine Fluidmenge (blau) kleiner als durch bloße Elektrodenverwendung abgespalten werden könnte im Microwell (b-d), aus diesem entfernt (e) und anschließend von einem anderen Tropfen (rot) aufgenommen und vermischt (lila) werden könnte (f-h), ohne dass ein Restvolumen wie bei „virtuellen“ Microwells zurückbleibt.

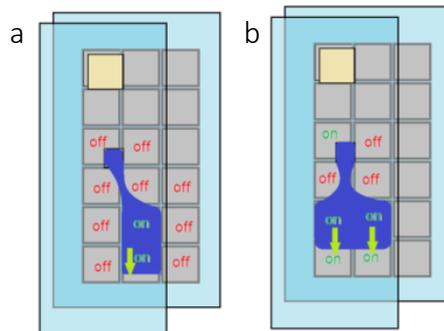


Abbildung 7.3: Zugkraft und Haltekraft am Tropfen im Microwell

Möglichkeit zu Erhöhung der Haltekraft F_y im Microwell bzw. der Zugkraft am Tropfen F_{EWOD} . F_{EWOD} greift nur an der Tropfenfront an. a) Zwei hintereinanderliegende Elektroden erhöhen nicht F_{EWOD} . b) Zwei parallel angeordnete aktivierte Elektroden verdoppeln F_{EWOD} . Verläuft die Tropfenkontur entlang des Microwells, addieren sich hier die F_y und F_{EWOD} .

Es kommt zur Tropfentrennung, wenn gilt:

$$F_{EWOD}(L) < F_{Abriss} \quad \text{und} \quad (7.1)$$
$$F_{EWOD}(0,5 \cdot L) + F_{\gamma} > F_{Abriss} < F_{EWOD}(2 \cdot L)$$

Chip-to-World Interfaces

Eine andere Möglichkeit der Dosierung könnte das Einbringen eines definierten Volumens in die DMF-Chips darstellen. Dies und eine vereinfachte Konnektivität kann eine mit Kapillaren erweiterte Zwischenfolie bieten. Die hier gezeigte PDMS-Folie mit ihren eingegossenen Kapillaren bietet einen einfachen, kostengünstigen und somit einwegtauglichen Ansatz für ein Fluidikinterface zwischen DMF-Chip und umgebenden Fluidikkomponenten und -geräten.

Die Folie funktioniert zuverlässig und auch der Einsatz innerhalb der Chips gestaltet sich sehr leicht. Es müssen zukünftig aber noch Optimierungen bei der Herstellung vorgenommen werden, um eine wirklich plane und planparallele PDMS-Folie zu erhalten.

Die Erhöhung der PDMS-Folie um die Kapillaren herum könnte aufgrund der PET-Folie während der Herstellung entstehen, weil diese oben auflag und durch die Schwerkraft durchhing und somit das PDMS verdrängt haben könnte (s. Abbildung 7.4a). Die PET-Folie vereinfacht das Entformen. Eine Lösung könnte sein, die geklemmten Formeinsätze umzudrehen, sodass die PET-Folie unten flach aufliegt (s. Abbildung 7.4b). Eine alternative Methode zur Herstellung könnte das Heißprägen mit Polymerfolien und gleichzeitige Einpressen der Glaskapillaren darstellen.

Einen weiteren Freiheitsgrad zusätzlich zur Steuerung von Tropfen innerhalb eines DMF-Chips und andererseits ein weiteres Chip-to-World-Interface ergibt sich aus der Möglichkeit, magnetische Partikel innerhalb der Flüssigkeiten aktiv zu steuern und auch aus dem Chip auszuscheiden.

Choi et al. (2013) beschreiben eine unbewegliche magnetische Linse, die magnetische Partikel nur an einer festgelegten Linie sammeln und festhalten bzw. freigeben kann (Ein/Aus). Diese magnetische Linse wurde angepasst, mit einer Punktfokussierung relevant verändert und auf einem präzise ansteuerbaren XYZ-Tisch platziert. Das System ermöglicht neue Freiheitsgrade für die Ansteuerung von Fluidik und magnetischen Partikeln in DMF-Chips und die Integration dieser in gängige Technik.

Durch die Punktfokussierung können Tropfen an beliebiger Stelle angesteuert werden. Eine gesteuerte Bewegung der Tropfen durch die magnetische Kraft auf die enthaltenen Partikel ist jetzt ebenso möglich, wie das Extrahieren von Partikeln aus dem Tropfen. Dieser neue Ansatz erlaubt den Einsatz unabhängig vom Chip Design.

Wenn magnetische Partikel eingesetzt werden, dann findet die entscheidende (bio-)chemische Reaktion in der Regel immer auf deren Oberfläche statt und daher sind meistens die Partikel für den weiteren Arbeitsablauf von Bedeutung und nicht die Tropfen. Das Ausschleusen dieser gestaltet sich mit der neuen punktfokussierten magnetischen Linse sehr einfach und ermöglicht das Abpipettieren der Partikel, ohne den DMF-Chip öffnen zu müssen.

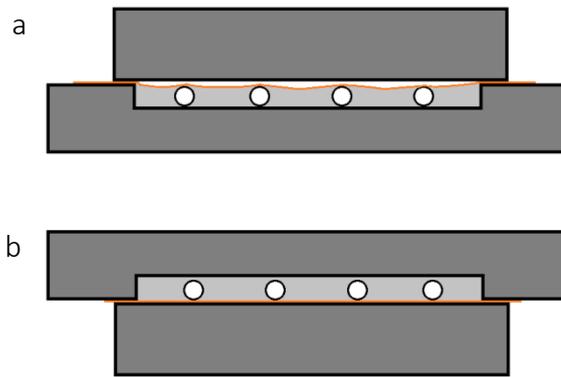


Abbildung 7.4: Überlegungen zur Verbesserung der Folienqualität

- a) Unebenheiten um die Kapillaren könnten eine Folge der verwendeten PET-Folie sein. b) Wenn die zum Entformen nötige PET-Folie unten liegt, sollte sich eine bessere plane Oberfläche erreichen lassen.

Ein integriertes System im Format einer Mikrotiterplatte mit Fluidikinterface, elektrischem Klemminterface, magnetischer Linse und einem Einweg-Chip ist möglich, wenn die Z-Achse eingespart werden könnte und dennoch die neuen Funktionen erhalten blieben.

Die hier gezeigte magnetische Linse muss etwa 4-5 cm von einem Tropfen entfernt sein, um zu verhindern, dass sich die darin enthaltenen magnetischen Partikel sichtbar an den B-Feldlinien orientieren. Die Z-Achse entspricht dem Ein/Aus des Magnetfeldes und erfordert einen entsprechend großen Bauraum. Denkbar wäre hier der Einsatz eines Elektromagneten. Dadurch könnte die Z-Achse eingespart werden und das System viel flacher gestaltet werden.

Anstatt eines Elektromagneten könnte auch ein Permanentmagnet eingesetzt werden. Dieser käme ohne Z-Achse aus, wenn er schnell genug in X-Y Richtung bewegt wird. Die Zeit der Wechselwirkung auf Tropfen auf dem Weg zum Zielpunkt muss dann so gering sein, dass deren magnetische Partikel nicht relevant beeinflusst werden.

Zugang zur DMF-Technik

Die digitale Mikrofluidik ermöglicht das einfache, frei programmierbare Handling von Tropfen, ähnlich wie eine Pipette in einem normalen Labor. Wenn eine Arbeitsgruppe keinerlei DMF-Equipment besitzt, dann steht sie insbesondere vor dem Problem der Chipherstellung. Die Flüssigkeiten für ein Experiment können als gegeben angesehen werden.

Eine Elektronik zur Ansteuerung der Chips kann von einem Elektroniker in kürzester Zeit gebaut werden (s. Abschnitt 3.2), ebenso stehen Open Source und kommerzielle Systeme zur Verfügung¹⁵ zur Verfügung. Der OpenDrop besitzt zwar eine Elektrodenmatrix, allerdings fehlen die dielektrische Schicht und die hydrophobe Beschichtung. Fobel et al. (2013)

Sollte eine Forschungsgruppe sich entscheiden, die DMF-Technik in ihr Labor dauerhaft zu integrieren, dann ist es an diesem Punkt ratsam, in die eigene Produktion oder einen produzierenden Partner zu investieren. Das Problem für neue Forschungsgruppen besteht darin, dass diese Chips nicht als Standardprodukte erhältlich sind. Samiei et al. (2016)

¹⁵ November 2016: OpenDrop http://www.gaudi.ch/GaudiLabs/?page_id=392 und DropBot kommerziell <http://www.sci-bots.com/> und DropBot Open Source <http://microfluidics.utoronto.ca/trac/dropbot/wiki/BuildInstructions>

Während bei der Anschaffung eines DropBot und sonstiger Hardware wie PC und Hochspannungsverstärker der zeitliche und kostenmäßige Rahmen überschaubar ist (wenige Wochen, 2.000-10.000€), müssen für die DMF-Chips erst noch Forschungs- und Entwicklungskosten und -aufwand einkalkuliert werden.

Bei Eigenanfertigung sollten Materialkosten in der Größenordnung um 50€ pro Chip kalkuliert werden, alternativ könnten die DMF-Chips als teure Sonderanfertigung (mehrere 100€ pro Chip) von einem entsprechend ausgestatteten Institut oder Firma bezogen werden.

Bisher wurde von lithografischen Herstellungsmethoden ausgegangen, weil diese durch die Verwendung für die DMF-Technik in den letzten zehn Jahren entsprechend erprobt sind.

Drucktechniken und Folienlaminierung sind leicht skalierbar: von Rolle-zu-Rolle-Herstellung bis hin zu Kleinstserien. Die Materialkosten für eine Massenproduktion des Papier-basierten, checkkartengroßen Bodensubstrats belaufen sich auf unter 0,05€. Wenn Verschnitt und prozessbedingte Verluste wie z.B. während des Spincoatings mit einbezogen werden, dann sind 2€ eine realistische Kalkulation bei einer Eigenproduktion. Die Materialkosten des verwendeten Deckelsubstrats sind höher, aber es kann wiederverwendet werden (anfängliche Kosten ca. 5€, selbstständiges Recycling ca. 2€ pro Deckelsubstrat). Alternativ bieten sich mit PEDOT oder ITO beschichtete stabile Folien als kostengünstiges Einweg-Deckelsubstrat an.

Die Druck- und Folientechnik, wie in von der Ecken et al. (2016b) und Abschnitt 6.1 vorgestellt, oder alternativ die Leiterplattentechnik, brächten massive Zeit- und Kostenersparnisse und ermöglichen somit die standardisierte Massenherstellung von DMF-Chips. Mit dem Papier-DMF-Chip konnte beispielsweise eine mögliche Kombination von flexiblem Elektrodenlayout, einfacher Produktion, geringen Kosten und zuverlässiger Funktion realisiert werden.

Dadurch ergibt sich ein günstiger und einfacher Zugang zur DMF-Technik für neue interessierte Forschungsgruppen auch ohne eigene Fertigungsstrecke (u.a. Reinraum, etc.). Die Verbreitung der Nutzung der DMF in der Wissenschaft wird dadurch unterstützt und ermöglicht die Weiterentwicklung der DMF-Technologie. Dies führt letzten Endes zur Nutzbarmachung für andere Anwendungsbereiche, wie z.B. Point-of-Care-Testing, bei denen es auf Zeit- und Kostenersparnis sowie reduzierte Proben- und Analyse-mengen bei gleichzeitiger Automatisierbarkeit ankommt.

Zukünftig sollten Laborprotokolle speziell für die DMF-Technologie entwickelt werden, anstatt sie nur zu adaptieren. Aber dafür muss die DMF-Technologie einfacher zugänglich werden und darf nicht nur den „digital microfluidic natives“ zur Verfügung stehen und muss leicht zu bedienen sein.

Verlässliche, kostengünstige DMF-Chips wie massenproduzierte Papier-Chips, kleine Verbesserungen wie die „virtuellen“ oder „echten“ Microwells, einfache und flexible Chip-to-World-Interfaces, Open Source Hard- und Software wie „Dropbot“ und „Microdrop“, Integration und Synergie zwischen Technologien wie DMF und WGMLL, sowie der weltweite freie Zugriff auf wissenschaftliche Publikationen bringen uns diesem Ziel näher.

A. Anhang

Abbildungen und Tabellen

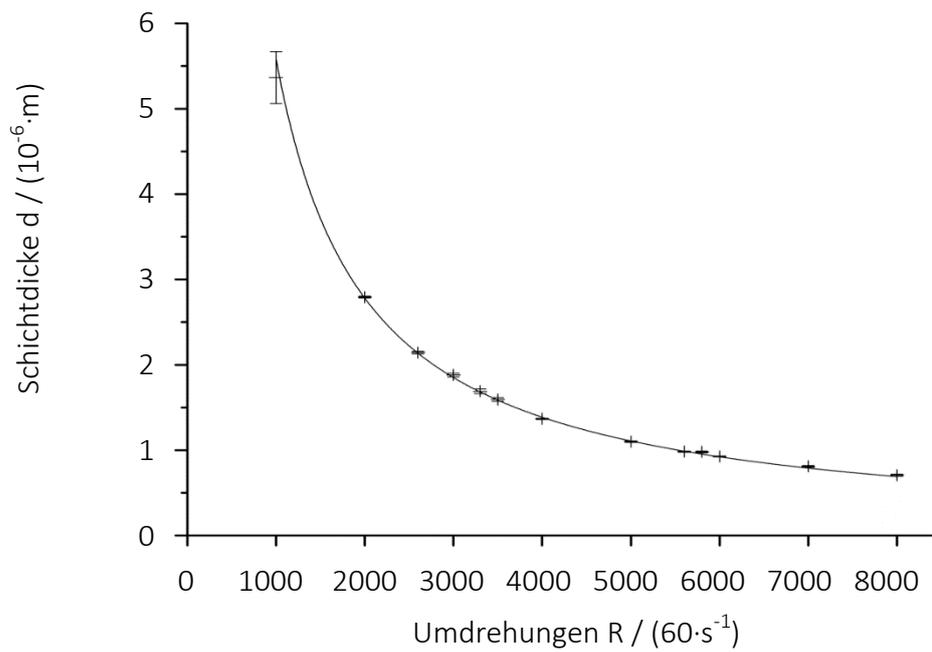


Abbildung A.1: Spinkurve von 20 wt% CEP in Propylencarbonat

Diese Konzentration eignet sich für Schichtdicken von 1-3 μm . Die Spinkurve kann beschrieben werden als $d = 5,78 \cdot R^{-1,00} \cdot [\text{m}]$.

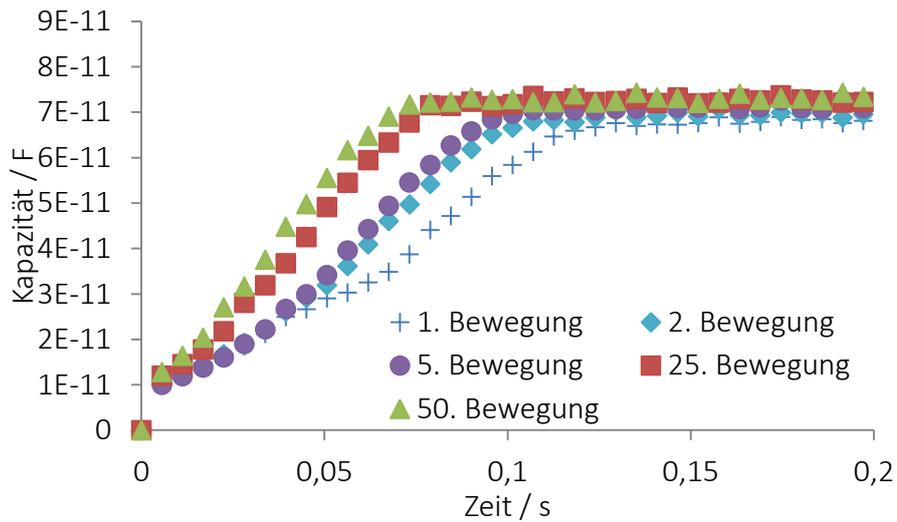


Abbildung A.2: Tropfenbeweglichkeitsmessung von PBS

65 V, 1 kHz, 1,5 μ l, 2,25 mm, 190 μ m, 7 μ m CEP, Teflon AF 1600. Kontaktwinkel 3 μ l Tropfen $\theta_0 = 121 (\pm 1)^\circ$. Die Tropfenbeweglichkeit von PBS ist sehr gut und zeigt keine Anzeichen von Biofouling. Die 2. Bewegung hatte eine mittlere Geschwindigkeit von 22 (± 2)mm/s.

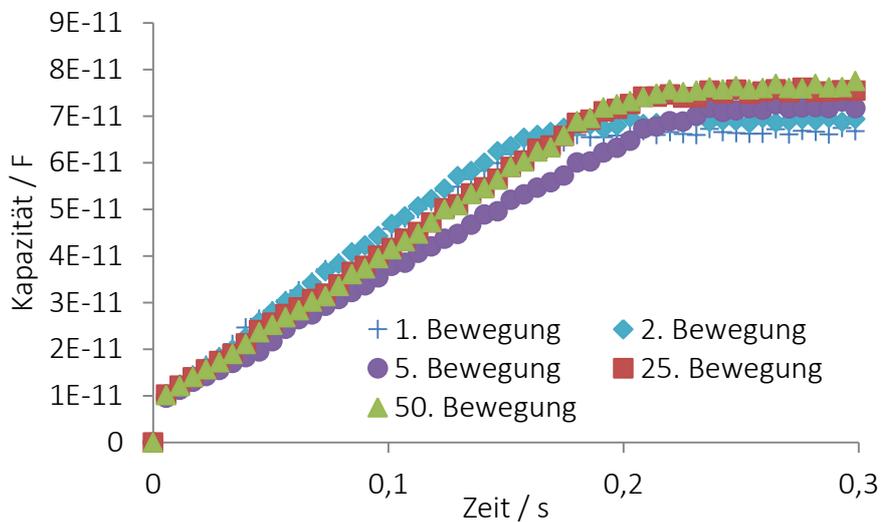


Abbildung A.3: Tropfenbeweglichkeitsmessung von PBS mit 0,2vol% Pluronic 64

65 V, 1 kHz, 1,5 μ l, 2,25 mm, 190 μ m, 7 μ m CEP, Teflon AF 1600. Kontaktwinkel 3 μ l Tropfen $\theta_0 = 92 (\pm 1)^\circ$. Der Tropfen bewegt sich etwa 60% langsamer als reines PBS, allerdings bleibt die Beweglichkeit relativ konstant. Die 2. Bewegung hatte eine mittlere Geschwindigkeit von 13 (± 1)mm/s.

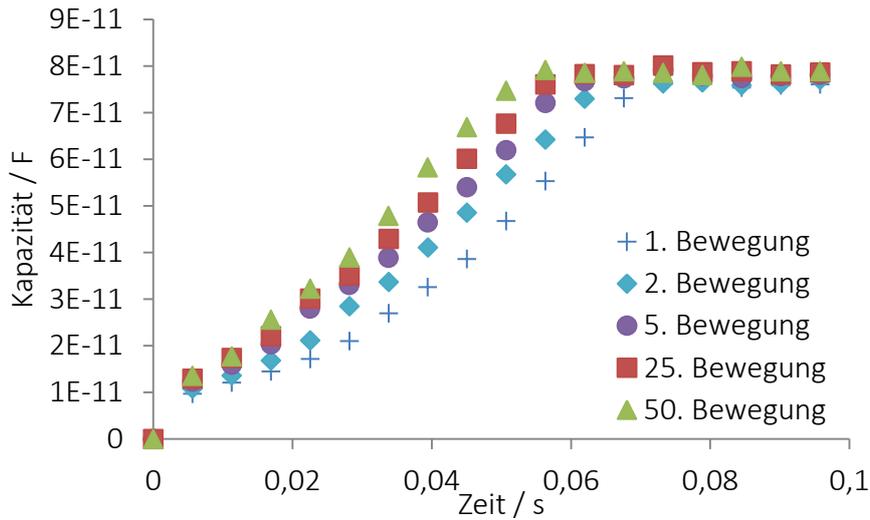


Abbildung A.4: Tropfenbeweglichkeitsmessung von PBS mit 0,1vol% $F_2CH(CF_2)_3CH_2OH$

65 V, 1 kHz, 1,5 μ l, 2,25 mm, 190 μ m, 7 μ m CEP, Teflon AF 1600. Kontaktwinkel 3 μ l Tropfen $\Theta_0 = 107(\pm 1)^\circ$. Die Tropfengeschwindigkeit ist höher als die des reinen PBS. Die Verbesserung der Tropfenbeweglichkeit ist auf Verdunstungseffekte zurückzuführen. Insgesamt ist die Beweglichkeit deutlich gesteigert im Vergleich zum mit Pluronic 64 versetzten PBS und auch zum reinen PBS. Die 2. Bewegung hatte eine mittlere Geschwindigkeit von 32,1 ($\pm 3,2$)mm/s.

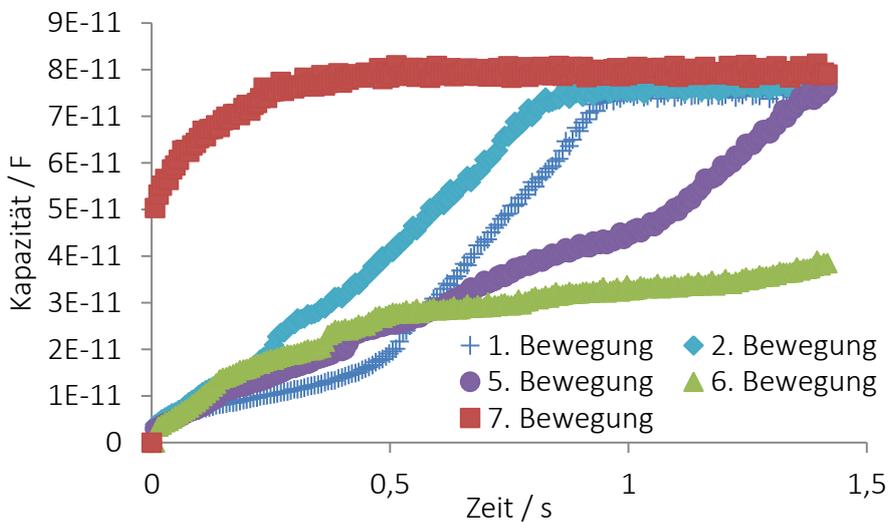


Abbildung A.5: Tropfenbeweglichkeitsmessung von PBS mit 30 μ g/ml Streptavidin und 0,1vol% $F_2CH(CF_2)_3CH_2OH$

65 V, 1 kHz, 1,5 μ l, 2,25 mm, 190 μ m, 7 μ m CEP, Teflon AF 1600. Kontaktwinkel 3 μ l Tropfen $\Theta_0 = 107(\pm 1)^\circ$. Zwischen der 1. und der 2. Überquerung der Messelektrode ist eine kurze Verbesserung der Tropfenbeweglichkeit zu erkennen. Diese nimmt jedoch mit der 5. Überquerung so stark ab, dass der Tropfen nach der 6. Überquerung hängen blieb. Dieses Tensid eignet sich nicht zur Kompensation des Biofouling. Die 2. Bewegung hatte eine mittlere Geschwindigkeit von 2,5 ($\pm 0,3$)mm/s.

Tabelle A.1: Kontaktwinkel von 3 µl destilliertem Wasser

Auf unmodifizierten (1 - 4) und funktionalisierten (5 - 8) Spots eines Deckelsubstrats. Es wurde zur Behandlung eine Ausgangslösung von PBS und 30 µg/ml Streptavidin verwendet, der für die Spots 1 und 5 zusätzlich 0,1 vol% Pluronic 64 beigemischt wurde.

Mittelwert dreier Mes- sungen	vor Streptavidin Lösung			nach Streptavidin Lösung		
	Spot	3 µl destilliertes Wasser Kontaktwinkel / Grad	σ / Grad	Wartezeit und Flüssigkeit (20 µl)	3 µl destilliertes Wasser Kontaktwinkel / Grad	σ / Grad
nicht funkt.	1	121,3	0,6	20 min PBS + Streptavidin + Pl64	121,3	0,6
Teflon AF	2	119,7	0,6	1 min PBS + Streptavidin	110,0	2,0
	3	121,0	0,0	5 min PBS + Streptavidin	102,0	1,7
	4	121,0	0,0	20 min PBS + Streptavidin	99,7	3,1
funkt.	5	106,7	2,1	20 min PBS + Streptavidin + Pl64	(113,3)*	(4,7)*
Teflon AF	6	104,7	0,6	1 min PBS + Streptavidin	99,0	0,0
	7	103,3	0,6	5 min PBS + Streptavidin	97,0	2,0
	8	103,3	0,6	20 min PBS + Streptavidin	95,0	5,3

*1. Messung 108° (2. 115°, 3. 117° -> Pluronic 64 scheint die Hydrophobie wiederherzustellen)

Komponenten des Versuchsstands

Der Versuchsstand kombiniert die optische Observation, elektrische Konnektivität für DMF-Chips und die Kontrolle magnetischer Partikel: Pike F-100C Kamera (Allied Vision Technologies GmbH,) mit dem Objektiv Fusion (Qioptiq, Inc., Fairport, USA), Hochspannungsverstärker Trek PZD700A-1-H-CE (Acal BFi Germany GmbH) und der „DropBot v2“ nach Fobel et al. (2013). Die Aktor-Elektroden des DMF-Chips wurden durch das DropBot System und die Software MicroDrop gesteuert (Fobel et al. (2013)). Die DropBot Elektronik wurde über ein Federkontaktstiftinterface mit den Kontaktpads des integrierten Chips verbunden. Eine Webcam (Microsoft LifeCam Studio) diente zur optischen Kontrolle der Tropfenbewegungen. MicroDrop besitzt eine Live-View Funktion zur Integration des Webcam Videostreams des integrierten Chips, wodurch ein einfaches Mensch-Maschine-Interface zur Tropfensteuerung durch den DropBot geboten wird. Ein Hochspannungsverstärker (Trek PZD700A, Trek Inc.) verstärkte die Signale des Frequenzgenerators des DropBot.

Magnetische Partikel wurden mit der magnetischen Linse auf einem 3-Achsen Tisch kontrolliert, deren Design eine Anpassung und Optimierung aus Choi et al. (2013) darstellt. Das verbesserte Design ermöglicht ein kompakteres, punktfokussiertes Magnetfeld, das magnetische Partikel nur im näheren Bereich um eine Elektrode herum signifikant beeinflusst. Dies ermöglicht, die magnetischen Partikel nicht nur auszufällen und festzuhalten, um sie von der Flüssigkeit zu trennen, sondern auch eine aktiv gesteuerte Bewegung innerhalb eines Tropfens oder die „Rettung“ aus einem festsitzenden Tropfen.

Für zukünftige Automatisierung, einfachere (De-)Assemblierung, Integration und Konnektivität wurde eine 200 µm PDMS Folie mit in diese eingegossenen 150 µm Kapillaren (Glas oder Kunststoff) entwickelt.

Die Verwendung der Zwischenfolie mit Kapillaren ermöglicht den Anschluss automatisierbarer Pumpsysteme und somit ein Chip-to-World Interface. Alternativ ermöglicht der Einsatz der magnetischen Linse die Extraktion der magnetischen Partikel und somit der darauf gebundenen Endprodukte aus dem Inneren des Chips. Die Partikel liegen auf der offenen Fläche des Bodensubstrats an definierter Position und können manuell per Pipette oder von einem Pipettier-Roboter aufgenommen werden. Beides ermöglicht eine flexible Einbindung des DMF-Systems in gängige Labortechnologien.

Um das Biofouling während der Tropfenbewegung zu reduzieren (Sarvothaman et al. (2015)) und damit die Tropfenbeweglichkeit zu optimieren und zu stabilisieren, wurde Pluronic 64 eingesetzt.

Alternative hydrophobe Beschichtungen

Neben Teflon AF gibt es andere Alternativen. Teflon AF, CYTOP und Fluoropel sind Produkte für den Laboreinsatz und immer vorzuziehen. Aber auch im KFZ Bereich erhältliche Produkte für Windschutzscheiben und Helmvisiere können für anfängliche Versuche eingesetzt werden, da selbst die kleinsten Gebinde der erstgenannten Produkte mehrere 100€ bis 1000€ kosten. Zu bemerken sei, dass Fluoropel auch ohne Reflow bzw. bei im Vergleich geringeren Temperaturen eine länger stabile Hydrophobie besitzt.

Laserstrukturierung von Elektroden in ITO

Für Versuche stand ein Lasersystem des Lichttechnischen Instituts (LTI) am KIT zur Verfügung, dessen Beschreibung, technische Daten und Parameter zur Verfügung gestellt und hier direkt übernommen wurden: Es handelt sich um ein „Ultrafast amplifier laser system (LIBRA)“. Der Laser basiert auf dem Prinzip der „Chirped Pulse Amplification“ (CPA). Er setzt sich zusammen aus einem Seedlaser (Ti:Sapphir Modenkopplung bei $\lambda=800\text{nm}$) und einem Pumplaser (Q-Switch bei $\lambda=527\text{nm}$), einem Pulsaufweiter, einem regenerativen Verstärker und einem Kompressor. Die Charakteristika des Austrittsstrahles: Pulsdauer 90fs, Pulsrate 5 kHz, mittlere Leistung 3,6mW, Pulsenergie 0,72 mJ, Pulsspitzenleistung 8GW, Wellenlänge 800nm. Details zur Funktionsweise des Systems können unter dem Begriff „Chirped Pulse Amplification“ z.B. in Strickland et al. (1985) nachgeschlagen werden.

Lithografische Strukturierung von Elektroden in Chrom

Alle DMF-Chips, deren Elektrodenstrukturen im Rahmen dieser Arbeit mittels Lithografie strukturiert wurden, sind auf Basis von 1 mm starken 4 Zoll bzw. 6 Zoll mit 200nm Chrom (CVD Prozess) beschichteten Glaswafern hergestellt worden.

Der erste Schritt ist die Reinigung der Chromoberfläche zur Vorbereitung der Beschichtungen für den Lithografieprozess. Der Wafer wird mit zuerst mit Aceton und dann mit Isopropanol gereinigt. Die Rückstände werden mit destilliertem Wasser entfernt und der Wafer mit Stickstoff getrocknet. Der Resistlack wird mittels Spincoating aufgetragen. Dafür wird der gereinigte Wafer auf dem Spincoater platziert und nochmals mit Stickstoff von Staubpartikeln befreit. Der Resistlack AZ 1505 ist ein Positiv-Resist und wurde von der Firma MicroChemicals GmbH bezogen. Eine $1,5\mu\text{m}$ Schicht ergeben die Spincoating-Parameter 500rpm, 1500rpm/s und 60s. Anschließend wird der Wafer für 5 min bei 95°C auf einer Heizplatte gebacken.

Nach einer Ruhezeit von wenigen Minuten und dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Resistschicht belichtet. Die Lithografiemasken (7 bzw. 5 Zoll Maske bei 6 bzw. 4 Zoll Wafer) werden im Mask Aligner positioniert und der Resist belichtet. Anschließend wird der Resist für 30s in einem Sprühentwickler mit einer Mischung aus AZ400K von MicroChemicals GmbH und Wasser im Mischverhältnis von 1:4 entwickelt. Auf die Entwicklung folgt ein Post-Bake Schritt, um stabilere Resiststrukturen beim folgenden Nassätzen zu erzeugen. Dafür wird der Wafer 2 min bei 110°C gebacken. Nach einer Ruhezeit von wenigen Minuten und dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Chromschicht mit „Chrom Etch N° 1“ von MicroChemicals GmbH für ca. 3 min nassgeätzt. Der erste Wafer benötigt etwa 3 min, der dritte oder vierte Wafer benötigt etwa 3,5 min. Dies sind nur Richtwerte und die Ätzzeit sollte für jeden Wafer angepasst werden.

Nach dem Waschen in destilliertes Wasser und Trocknen mit Stickstoff wird eine weitere Schicht aus AZ1505 wie zuvor beschrieben aufgetragen. Diese dient als Schutz gegen Beschädigungen durch Kratzer beim anschließenden Vereinzeln. Nach dem Vereinzeln wird der gesamte Resistlack mit AZ400K von MicroChemicals GmbH abgewaschen und die Chips werden mit destilliertem Wasser gewaschen.

B. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Technischer iterativer Ablauf der Ligationsschritte	2
Abbildung 1.2:	Ein in dieser Arbeit realisierter DMF-Chip im Testbett	3
Abbildung 1.3:	Nahaufnahme eines Wassertropfens auf einem offenen Deckelsubstrat	6
Abbildung 2.1:	Schematischer Ablauf der TALEN Ligation	10
Abbildung 2.2:	Ursache der Oberflächenspannung	12
Abbildung 2.3:	Die 3-Phasen-Grenze	13
Abbildung 2.4:	Kräftegleichgewicht im Tripelpunkt der 3-Phasengrenze	13
Abbildung 2.5:	Einfluss von Silikonöl auf die 3-Phasengrenze	15
Abbildung 2.6:	Verschiedene Tensidtypen	15
Abbildung 2.7:	Chemische Struktur von Poloxameren	16
Abbildung 2.8:	Grafische Darstellung der Verdünnungsreihe von Pluronic 64 in Wasser	17
Abbildung 2.9:	Ablenkung eines Wasserstrahls durch elektrostatische Kraft	18
Abbildung 2.10:	Tropfenbewegung in einem DMF-Chip	19
Abbildung 2.11:	Modelldarstellung der Tropfenbewegung in einem digitalen Mikrofluidik System	20
Abbildung 2.12:	Der Elektrobenetzungseffekt auf Dielektrika	23
Abbildung 2.13:	Abhängigkeiten von Hydrophobie, Kontaktwinkel und Adhäsion	25
Abbildung 2.14:	Abhängigkeit von Kontaktwinkel und elektrischer Spannung	28
Abbildung 2.15:	Die Hysterese des Kontaktwinkels	29
Abbildung 2.16:	Flüssiglinse basierend auf dem Electrowetting-Effekt	30
Abbildung 2.17:	Beispiele für DMF-Chips	31
Abbildung 2.18:	Vier unterschiedliche DMF-Chip Typen	32
Abbildung 2.19:	Schematische Aufbau eines geschlossenen DMF-Chips	34
Abbildung 2.20:	Basisoperationen: Bewegen, Trennen und Mischen	37
Abbildung 2.21:	Tropfenbewegung über Elektrodenzwischenräume hinweg	38
Abbildung 2.22:	Befüllung der Reservoirs	39
Abbildung 2.23:	Dispensen aus einem Reservoir	40
Abbildung 2.24:	Mischen zweier Tropfen	41

Abbildung 2.25: Symmetrische Tropfentrennung auf der Elektrodenmatrix	42
Abbildung 2.26: Asymmetrische Tropfentrennung auf der Matrix im Verhältnis 1:2	42
Abbildung 2.27: Asymmetrische Tropfentrennung auf der Matrix im Verhältnis 1:3	42
Abbildung 2.28: Ausschleusen: Fluidoutput in ein Reservoir	43
Abbildung 2.29: Tropfengeschwindigkeit in Abhängigkeit der elektrischen Spannung	44
Abbildung 2.30: Auswahl des richtigen Tensids	46
Abbildung 2.31: Skalierbarkeit verschiedener Herstellungsschritte eines DMF-Chips.....	50
Abbildung 2.32: Magnet und DMF-Chip trennen magnetisierbare Partikel und Tropfen.....	51
Abbildung 2.33: Prinzip des hydrophilen Spots als „virtuelles“ Microwell	52
Abbildung 2.34: Integration von Sensoren in einen DMF-Chip	53
Abbildung 2.35: TALEN zur Editierung eines DNA-Strangs	55
Abbildung 3.1: Übersicht des Versuchsstands.....	56
Abbildung 3.2: Chipinterface	57
Abbildung 3.3: 32-Kanal Steuerelektronik mit kompaktem Chipinterface	58
Abbildung 3.4: DropBot und kompaktes Chipinterface	59
Abbildung 3.5: Laser-Ablation mit Femtosekunden-Laser	62
Abbildung 3.6: Laserstrukturiertes (Fa. Lasermicronics) ITO mit Siliziumnitrid (Fa. iX-factory).....	62
Abbildung 3.7: MFT1 Elektrodendesign	64
Abbildung 3.8: 4R32ch Elektrodendesign	65
Abbildung 3.9: 10R4xDMF Elektrodendesign	65
Abbildung 3.10: Eine Zuleitung zwischen Elektroden	66
Abbildung 3.11: Zwei Zuleitungen zwischen Elektroden	67
Abbildung 3.12: NMR1 Elektrodendesign	67
Abbildung 3.13: MFT-DIY Elektrodendesign	68
Abbildung 3.14: MFT-DIY2 Elektrodendesign	69
Abbildung 3.15: MFT-S Elektrodendesign	70
Abbildung 3.16: Interferenz zwischen Boden- und Deckelektroden	71
Abbildung 3.17: Beschaltungszustände für Boden- und Deckelektroden	72
Abbildung 3.18: Schaltskizze für Zuleitungen und Elektroden	72
Abbildung 3.19: Beschaltungszustände für Boden- und Deckelektroden bei Kreuzanordnung	73

Abbildung 3.20: Iteratives Element einer Elektrodenanordnung	74
Abbildung 3.21: Ein Tropfen passiert die den Transportweg kreuzende Zuleitung	74
Abbildung 3.22: Spinkurve von mr-X MP 10	76
Abbildung 3.23: Spinkurve von 30 wt% CEP in Propylencarbonat	78
Abbildung 3.24: Spinkurve von 1 wt% Teflon AF 1600 in Fluoriniert FC-40	79
Abbildung 3.25: REM-Aufnahme einer mit Skalpell angekratzten Teflonschicht auf Objektträger.....	80
Abbildung 3.26: REM-Aufnahme der Bruchkante eines DMF-Chips zeigt dessen Schichtdicken	81
Abbildung 4.1: Funktionalität und Aufbau des DMF-Chips zur Umsetzung des ICA-Protokolls	83
Abbildung 4.2: Tropfenbeweglichkeitsmessung von H ₂ O als Referenz.....	85
Abbildung 4.3: Tropfenbeweglichkeitsmessung von 2xBW-Puffer	85
Abbildung 4.4: Tropfenbeweglichkeitsmessung von 0,5xBW-Puffer mit 0,05 vol% Tween 20.....	86
Abbildung 4.5: Tropfenbeweglichkeitsmessung von 0,5x BW-Puffer mit 0,05vol% Pluronic 64.....	86
Abbildung 4.6: Vergleich der Tropfenbeweglichkeit	87
Abbildung 4.7: Ablauf der ICA-Ligation auf dem DMF-Chip.....	89
Abbildung 4.8: Ergebnis der Gelelektrophorese	91
Abbildung 5.1: Funktionalität und Aufbau des DMF-Chips mit integrierten WGMLL	93
Abbildung 5.2: Herstellung der WGMLL auf dem Deckelsubstrat	95
Abbildung 5.3: Deckelsubstrat mit WGMLL-Feldern	96
Abbildung 5.4: Funktionalisierung der Teflon-beschichteten Oberfläche	97
Abbildung 5.5: WLI -Messung eines WGMLL	99
Abbildung 5.6: Tropfenbeweglichkeitsmessung von H ₂ O als Referenz.....	101
Abbildung 5.7: Tropfenbeweglichkeitsmessung von PBS mit 30µg/ml Streptavidin.....	102
Abbildung 5.8: Tropfenbeweglichkeitsmessung von PBS mit 30 µg/ml Streptavidin und 0,2 vol% Pluronic 64	103
Abbildung 5.9: Kontaktwinkel von 3 µl Tropfen aus destilliertem Wasser.....	104
Abbildung 5.10: Messaufbau des WGMLL Versuchs	106
Abbildung 5.11: Brechungsindex und Empfindlichkeit.....	107
Abbildung 5.12: Detektion der Streptavidinkonzentration	109
Abbildung 6.1: Einfach zu fertigende DMF-Chips aus Papier und PET-Folie.....	111
Abbildung 6.2: Tropfenbeweglichkeitsmessung von Wasser auf Papier-Chip.....	112
Abbildung 6.3: Herstellung der Microwells durch den WGMLL-Prozess.....	113

Abbildung 6.4:	Hydrophober Barriere-Effekt der leeren Microwells	114
Abbildung 6.5:	Hydrophiles Verhalten der gefüllten Microwells	115
Abbildung 6.6:	Definierte Tropfentrennung (Dispensen) durch Microwells	115
Abbildung 6.7:	Analyse der Geometrie der Microwells	116
Abbildung 6.8:	Mögliche Erklärung der hydrophoben/hydrophilen Effekte	117
Abbildung 6.9:	3D-CAD der PMMA-Gussform für die PDMS-Folie	120
Abbildung 6.10:	Zwischenfolie aus PDMS mit Glaskapillaren	120
Abbildung 6.11:	Oberflächenanalyse der Zwischenfolie	121
Abbildung 6.12:	Demonstration der Funktion der magnetischen Linse	122
Abbildung 6.13:	Simulation verschiedener Linsendesigns	123
Abbildung 6.14:	Foto der magnetischen Linse	123
Abbildung 6.15:	Schema der Integration der Erweiterung in den Versuchsstand	124
Abbildung 6.16:	Integration der magnetischen Linse und des XYZ-Tisches in den Versuchsstand	125
Abbildung 6.17:	Bewegen der Partikel mit Hilfe der magnetischen Linse	126
Abbildung 6.18:	Ausschleusen der Partikel mit der magnetischen Linse	127
Abbildung 7.1:	Notwendige Designänderungen zur Abformung und Beschichtung	130
Abbildung 7.2:	Überlegungen zur Microwell-Integration	132
Abbildung 7.3:	Zugkraft und Haltekraft am Tropfen im Microwell	132
Abbildung 7.4:	Überlegungen zur Verbesserung der Folienqualität	134
Abbildung A.1:	Spinkurve von 20 wt% CEP in Propylencarbonat	136
Abbildung A.2:	Tropfenbeweglichkeitsmessung von PBS	137
Abbildung A.3:	Tropfenbeweglichkeitsmessung von PBS mit 0,2vol% Pluronic 64	137
Abbildung A.4:	Tropfenbeweglichkeitsmessung von PBS mit 0,1vol% $F_2CH(CF_2)_3CH_2OH$	138
Abbildung A.5:	Tropfenbeweglichkeitsmessung von PBS mit 30 $\mu g/ml$ Streptavidin und 0,1vol% $F_2CH(CF_2)_3CH_2OH$	138

C. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Liste der 31 Flüssigkeiten im ICA-TALEN „Baukasten“	11
Tabelle 2.2:	Verdünnungsreihe von Pluronic 64 in Wasser	17
Tabelle 2.3:	Auswahl dielektrischer Materialien.....	35
Tabelle 2.4:	Bewegbarkeit verschiedener Flüssigkeiten	47
Tabelle 2.5:	Bewegbarkeit ionischer Flüssigkeiten	48
Tabelle 3.1:	Kontaktwinkel eines 3 µl Wassertropfens auf verschiedenen Teflonoberflächen.....	80
Tabelle 5.1:	Name, Funktionalisierung und Fluoreszenzmarker der drei Proben.	97
Tabelle 5.2:	Übersicht der Proben zur Tensidbewertung	103
Tabelle 5.3:	Oberflächenbehandlungen vor der zweiten Kontaktwinkelmessung	105
Tabelle A.1:	Kontaktwinkel von 3 µl destilliertem Wasser.....	139

D. Abkürzungen und Symbole

Abkürzung	Bedeutung
μTAS	Mikro totales Analysesystem und Name einer Konferenz
0,5x bzw. 2x	0,5-fach bzw. 2-fach konzentriert
AFM	Atomic force microscope, Rasterkraftmikroskop
Bew.	Bewegbarkeit (einer Flüssigkeit durch den EWOD-Effekt)
BSA	Bovines Serumalbumin
BW Puffer	Binding and wash Puffer
CC	Creative Commons
CCD	Charge-coupled Device, Sensor zur elektronischen Bildaufnahme
CEP	Cyanoethyl Pullulan
CPA	Chirped pulse amplification
CRISPR/Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CVD, PECVD	(Plasma-enhanced) Chemical vapour deposition, (Plasmaunterstützte) Chemische Gasphasenabscheidung
DEP	Dielektrophorese
DIY	Do it yourself
DMF	Digital microfluidics, Digitale Mikrofluidik
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DUV	Deep-UV, tiefes UV Licht
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E-Feld	Elektrisches Feld
EW	Electrowetting, Elektrobenetzung
EWOD	Electrowetting on dielectrics, Elektrobenetzung auf Dielektrika
g	Gas, gasförmig, Gas
ICA	Iterative capped assembly
IMT	Institut für Mikrostrukturtechnik
ITO	Indium tin oxide, Indiumzinnoxid
KIT	Karlsruher Institut für Technologie
l	Liquid, flüssig, Flüssigkeit
LASER	Light amplification by stimulated emission of radiation
LDEP	Liquid dielectrophoresis, Flüssigkeitsdielektrophorese
LED	Licht emittierende Diode
LoC	Lab on Chip, Labor auf einem Chip
mr-L, mr-X	Name eines Negativ Photoresists (ähnlich SU-8)
Nd:YLF	Laser, Neodym in Yttrium-Lithium-Fluorid Kristall
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Kernspinresonanz

Abkürzung	Bedeutung
ONO	Siliziumoxid-Siliziumnitrid-Siliziumoxid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	personal computer, persönlicher Rechner
PCB	Printed circuit board, Leiterplatte
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEDOT	Poly-3,4-ethylendioxythiophen, ein leitfähiges Polymer
PET	Polyethylenterephthalat
PMGI	Polymethylglutarimide
PMMA	Polymethylmethacrylat
REM	Rasterelektronenmikroskop
RI	Refractive index, Brechungsindex
RIU	Refractive index units, Einheit für Veränderung des Brechungsindex
RL Puffer	Rapid ligation Puffer
s	Solid, fest, Feststoff
SU-8	Name eines Negativ-Photoresists
TALEN	Transcription activator-like effector nuclease, transkriptions-aktivator-artige Effektor nuklease
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
vol%	Konzentration in Volumenprozent der Ausgangsstoffe
WGMMML	Whispering Gallery Mode Mikrokelch Laser
WLI	Weißlichtinterferometer
wt%	Konzentration in Gewichtsprozent

Index	Bedeutung
a	Anzahl, allgemeiner Index
Abriss	Teilen eines Tropfens
b	Anzahl, allgemeiner Index
EWOD	Electrowetting on dielectrics, Elektrobenetzung auf Dielektrika
g-s	Phasengrenze Umgebungsmedium-Feststoff
i	Zählindex
l-g	Phasengrenze Flüssigkeit-Umgebungsmedium (oft Gas)
l-s	Phasengrenze Flüssigkeit-Feststoff
min	Minimal, Minimum (absolut oder lokal)
n	Zählindex
P	Pluronic 64 (zur differenzierten Probenbezeichnung)
T	Tween 20 (zur differenzierten Probenbezeichnung)
x, X	Raumrichtung
y, Y	Raumrichtung
z, Z	Raumrichtung

Formelzeichen	Einheit	Bedeutung
<i>griechische Symbole</i>		
α	Grad	Hysteresewinkel
$\Delta\theta$	Grad	Winkeldifferenz
ϵ_0	$A \cdot s \cdot V^{-1} \cdot m^{-1}$	Elektrische Feldkonstante $\approx 8,85 \cdot 10^{-12} A \cdot s \cdot V^{-1} \cdot m^{-1}$
ϵ_r	-	Relative Permittivität
γ	$N \cdot m^{-1}$	Oberflächenspannung
κ	$S \cdot m^{-1}$	Elektrische Leitfähigkeit
θ	Grad	Kontaktwinkel
θ_0	Grad	Statischer Kontaktwinkel, "Young's Angle"
θ_U	Grad	Kontaktwinkel in Abhängigkeit elektrischer Spannung U
<i>lateinische Symbole</i>		
A	m^2	Fläche
C	F	Kapazität
c	$F \cdot m^{-2}$	Spezifische Kapazität
C(t)	F	Kapazität in Abhängigkeit der Zeit
d	m	(Schicht-) Dicke
DL	-	Detection Limit, Erfassungsgrenze, dimensionslose RIU
E_{BD}	$V \cdot m^{-1}$	Durchschlagsfestigkeit
F	N	Kraft
f_0	m	Brennweite, keine elektrische Spannung
F_{Abriss}	N	Kraft zum Teilen eines Tropfens
F_B	N	Magnetfeldkraft
F_{EWOD}	N	Elektrobenetzungskraft, Aktuator-Kraft eines DMF-Chips auf einen Tropfen
F_γ	N	Gegenkraft induziert durch eine Oberflächenvergrößerung eines Tropfens
f_U	m	Brennweite in Abhängigkeit der elektrischen Spannung
L	m	Länge, Elektrodenbreite /-länge
N	N	Normalkraft
Q	-	Eignung als Dielektrikum
R	-	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute, rpm)
s	m	Weg, Strecke
S	m	Empfindlichkeit (pro dimensionslose RIU)
σ	n.a.	Standardabweichung
U	V	Elektrische Spannung
$U_t, U(t)$	V	Elektrische Spannung mit Zeitabhängigkeit
V	m^3	Volumen
W	J	Energie
x, X	-	Raumrichtung
y, Y	-	Raumrichtung
z, Z	-	Raumrichtung

E. Quellenverzeichnis

Literatur

Abdelgawad et al. (2008)

M. Abdelgawad, S. L. S. Freire, H. Yang und A. R. Wheeler, 2008, *All-terrain droplet actuation, Lab on a chip*, **8**, 672-677.

Abdelgawad et al. (2009)

M. Abdelgawad, P. Park und A. R. Wheeler, 2009, *Optimization of device geometry in single-plate digital microfluidics, J Appl Phys*, **105**.

Ali et al. (2015)

H. A. A. Ali, H. A. Mohamed und M. Abdelgawad, 2015, *Repulsion-based model for contact angle saturation in electrowetting, Biomicrofluidics*, **9**.

Arce et al. (2012)

C. L. Arce, D. Witters, R. Puers, J. Lammertyn und P. Bienstman, 2012, *Silicon photonic sensors incorporated in a digital microfluidic system, Anal Bioanal Chem*, **404**, 2887-2894.

Banerjee et al. (2012)

A. Banerjee, Y. Liu, J. Heikenfeld und I. Papautsky, 2012, *Deterministic splitting of fluid volumes in electrowetting microfluidics, Lab on a chip*, **12**, 5138-5141.

Barbulovic-Nad et al. (2010)

I. Barbulovic-Nad, S. H. Au und A. R. Wheeler, 2010, *A microfluidic platform for complete mammalian cell culture, Lab on a chip*, **10**, 1536-1542.

Berge (1993)

B. Berge, 1993, *Electro Capillarité et mouillage de films isolants par l'eau, Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, **317**, 157-163.

Berthier (2012)

J. Berthier, 2012, *Microdrops and Digital Microfluidics*, William Andrew Publishing, ISBN 978-1-4557-2550-2.

Boch et al. (2009)

J. Boch, H. Scholze, S. Schornack, A. Landgraf, S. Hahn, S. Kay, T. Lahaye, A. Nickstadt und U. Bonas, 2009, *Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors, Science*, **326**, 1509-1512.

Bog et al. (2015)

U. Bog, F. Brinkmann, S. F. Wondimu, T. Wienhold, S. Kraemmer, C. Koos, H. Kalt, M. Hirtz, H. Fuchs, S. Koeber und T. Mappes, 2015, *Densely Packed Microgoblet Laser Pairs for Cross-Referenced Biomolecular Detection*, *Adv Sci*, **2**.

Briggs et al. (2012)

A. W. Briggs, X. Rios, R. Chari, L. Yang, F. Zhang, P. Mali und G. M. Church, 2012, *Iterative capped assembly: rapid and scalable synthesis of repeat-module DNA such as TAL effectors from individual monomers*, *Nucleic acids research*, **40**, e117.

Cathomen et al. (2008)

T. Cathomen und J. K. Joung, 2008, *Zinc-finger nucleases: The next generation emerges*, *Mol Ther*, **16**, 1200-1207.

Cermak et al. (2011)

T. Cermak, E. L. Doyle, M. Christian, L. Wang, Y. Zhang, C. Schmidt, J. A. Baller, N. V. Somia, A. J. Bogdanove und D. F. Voytas, 2011, *Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting*, *Nucleic acids research*, **39**.

Ceyssens et al. (2013)

F. Ceyssens, D. Witters, T. Van Grimbergen, K. Knez, J. Lammertyn und R. Puers, 2013, *Integrating optical waveguides in electrowetting-on-dielectric digital microfluidic chips*, *Sensor Actuat B-Chem*, **181**, 166-171.

Chang et al. (2006)

Y. H. Chang, G. B. Lee, F. C. Huang, Y. Y. Chen und J. L. Lin, 2006, *Integrated polymerase chain reaction chips utilizing digital microfluidics*, *Biomed Microdevices*, **8**, 215-225.

Chatterjee et al. (2006)

D. Chatterjee, B. Hetayothin, A. R. Wheeler, D. J. King und R. L. Garrell, 2006, *Droplet-based microfluidics with nonaqueous solvents and solutions*, *Lab on a chip*, **6**, 199-206.

Chatterjee et al. (2009)

D. Chatterjee, H. Shepherd und R. L. Garrell, 2009, *Electromechanical model for actuating liquids in a two-plate droplet microfluidic device*, *Lab on a chip*, **9**, 1219-1229.

Chen et al. (2014)

J. F. Chen, Y. H. Yu, K. D. Zhang, C. Y. Wu, A. Q. Liu und J. Zhou, 2014, *Study of cyanoethyl pullulan as insulator for electrowetting*, *Sensor Actuat B-Chem*, **199**, 183-189.

Choi et al. (2015)

K. Choi, J. M. Mudrik und A. R. Wheeler, 2015, *A guiding light: spectroscopy on digital microfluidic devices using in-plane optical fibre waveguides*, *Anal Bioanal Chem*, **407**, 7467-7475.

Choi et al. (2013)

K. Choi, A. H. C. Ng, R. Fobel, D. A. Chang-Yen, L. E. Yarnell, E. L. Pearson, C. M. Oleksak, A. T. Fischer, R. P. Luoma, J. M. Robinson, J. Audet und A. R. Wheeler, 2013, *Automated Digital Microfluidic Platform for Magnetic-Particle-Based Immunoassays with Optimization by Design of Experiments*, *Anal Chem*, **85**, 9638-9646.

Coldren et al. (2012)

L. A. Coldren, S. W. Corzine und M. L. Mashanovitch, 2012, *Diode lasers and photonic integrated circuits*, John Wiley & Sons, ISBN 1118148177.

Cooney et al. (2006)

C. G. Cooney, C. Y. Chen, M. R. Emerling, A. Nadim und J. D. Sterling, 2006, *Electrowetting droplet microfluidics on a single planar surface*, *Microfluidics and Nanofluidics*, **2**, 435-446.

Cooper (2002)

M. A. Cooper, 2002, *Optical biosensors in drug discovery*, *Nat Rev Drug Discov*, **1**, 515-528.

Dixon et al. (2016)

C. Dixon, A. H. Ng, R. Fobel, M. B. Miltenburg und A. R. Wheeler, 2016, *An inkjet printed, roll-coated digital microfluidic device for inexpensive, miniaturized diagnostic assays*, *Lab on a chip*, **16**, 4560-4568.

Doll (2015)

P. Doll, 2015, *Entwurf, Konstruktion und Inbetriebnahme eines Versuchsstandes zur Entwicklung auf Digitaler Mikrofluidik basierender LoC Systeme*, Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (KIT).

Dryden et al. (2013)

M. D. Dryden, D. D. Rackus, M. H. Shamsi und A. R. Wheeler, 2013, *Integrated digital microfluidic platform for voltammetric analysis*, *Anal Chem*, **85**, 8809-8816.

Drygiannakis et al. (2009)

A. I. Drygiannakis, A. G. Papathanasiou und A. G. Boudouvis, 2009, *On the Connection between Dielectric Breakdown Strength, Trapping of Charge, and Contact Angle Saturation in Electrowetting*, *Langmuir*, **25**, 147-152.

Dubois et al. (2006)

P. Dubois, G. Marchand, Y. Fouillet, J. Berthier, T. Douki, F. Hassine, S. Gmouh und M. Vaultier, 2006, *Ionic liquid droplet as e-microreactor*, *Anal Chem*, **78**, 4909-4917.

Estevez et al. (2012)

M. C. Estevez, J. Belenguer, S. Gomez-Montes, J. Miralles, A. M. Escuela, A. Montoya und L. M. Lechuga, 2012, *Indirect competitive immunoassay for the detection of fungicide Thiabendazole in whole orange samples by Surface Plasmon Resonance*, *Analyst*, **137**, 5659-5665.

Eydelnant et al. (2012)

I. A. Eydelnant, U. Uddayasankar, B. Y. Li, M. W. Liao und A. R. Wheeler, 2012, *Virtual microwells for digital microfluidic reagent dispensing and cell culture, Lab on a chip*, **12**, 750-757.

Fair (2007)

R. B. Fair, 2007, *Digital microfluidics: is a true lab-on-a-chip possible?*, *Microfluidics and Nanofluidics*, **3**, 245-281.

Fan et al. (2011)

S. K. Fan, Y. W. Hsu und C. H. Chen, 2011, *Encapsulated droplets with metered and removable oil shells by electrowetting and dielectrophoresis, Lab on a chip*, **11**, 2500-2508.

Fobel et al. (2013)

R. Fobel, C. Fobel und A. R. Wheeler, 2013, *DropBot: An open-source digital microfluidic control system with precise control of electrostatic driving force and instantaneous drop velocity measurement, Appl Phys Lett*, **102**, 193513-193515.

Fobel et al. (2014)

R. Fobel, A. E. Kirby, A. H. C. Ng, R. R. Farnood und A. R. Wheeler, 2014, *Paper Microfluidics Goes Digital, Adv Mater*, **26**, 2838-2843.

Foreman et al. (2015)

M. R. Foreman, J. D. Swaim und F. Vollmer, 2015, *Whispering gallery mode sensors, Adv Opt Photonics*, **7**, 168-240.

Fu et al. (2013)

Y. F. Fu, J. A. Foden, C. Khayter, M. L. Maeder, D. Reyon, J. K. Joung und J. D. Sander, 2013, *High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells, Nat Biotechnol*, **31**, 822-+.

Gaj et al. (2013)

T. Gaj, C. A. Gersbach und C. F. Barbas, 2013, *ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering, Trends Biotechnol*, **31**, 397-405.

Grossmann et al. (2010)

T. Grossmann, M. Hauser, T. Beck, C. Gohn-Kreuz, M. Karl, H. Kalt, C. Vannahme und T. Mappes, 2010, *High-Q conical polymeric microcavities, Appl Phys Lett*, **96**.

Guan et al. (2016)

Y. Guan, A. Y. Tong, N. Y. J. B. Nikapitiya und H. Moon, 2016, *Numerical modeling of microscale droplet dispensing in parallel-plate electrowetting-on-dielectric (EWOD) devices with various reservoir designs, Microfluidics and Nanofluidics*, **20**.

Hong et al. (2012)

F. J. Hong, D. D. Jiang und P. Cheng, 2012, *Frequency-dependent resonance and asymmetric droplet oscillation under ac electrowetting on coplanar electrodes, J Micromech Microeng*, **22**.

Hua et al. (2010)

Z. S. Hua, J. L. Rouse, A. E. Eckhardt, V. Srinivasan, V. K. Pamula, W. A. Schell, J. L. Benton, T. G. Mitchell und M. G. Pollack, 2010, *Multiplexed Real-Time Polymerase Chain Reaction on a Digital Microfluidic Platform*, *Anal Chem*, **82**, 2310-2316.

Jebrail et al. (2010)

M. J. Jebrail, A. H. C. Ng, V. Rai, R. Hili, A. K. Yudin und A. R. Wheeler, 2010, *Synchronized Synthesis of Peptide-Based Macrocycles by Digital Microfluidics*, *Angewandte Chemie International Edition*, **49**, 8625-8629.

Jinek et al. (2012)

M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna und E. Charpentier, 2012, *A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity*, *Science*, **337**, 816-821.

Jones (2002)

T. B. Jones, 2002, *On the relationship of dielectrophoresis and electrowetting*, *Langmuir*, **18**, 4437-4443.

Jones et al. (2004)

T. B. Jones, K. L. Wang und D. J. Yao, 2004, *Frequency-dependent electromechanics of aqueous liquids: Electrowetting and dielectrophoresis*, *Langmuir*, **20**, 2813-2818.

Karre et al. (2009)

V. Karre, P. D. Keathley, J. Guo und J. T. Hastings, 2009, *Direct Electron-Beam Patterning of Teflon AF*, *Ieee T Nanotechnol*, **8**, 139-141.

Khan et al. (2008)

M. S. Khan, D. Lehmann und G. Heinrich, 2008, *Modification of PTFE nanopowder by controlled electron beam irradiation: A useful approach for the development of PTFE coupled EPDM compounds*, *Express Polym Lett*, **2**, 284-293.

Knippers et al. (2015)

R. Knippers und A. Nordheim, 2015, *Molekulare Genetik*, Thieme Georg Verlag, ISBN 9783134770100.

Kotz et al. (2016)

F. Kotz, K. Plewa, W. Bauer, N. Schneider, N. Keller, T. Nargang, D. Helmer, K. Sachsenheimer, M. Schafer, M. Worgull, C. Greiner, C. Richter und B. E. Rapp, 2016, *Liquid Glass: A Facile Soft Replication Method for Structuring Glass*, *Adv Mater*.

Kumarand et al. (2012)

V. Kumarand und N. N. Sharma, 2012, *SU-8 as Hydrophobic and Dielectric Thin Film in Electrowetting-on-Dielectric Based Microfluidics Device*, *Journal of Nanotechnology*, **2012**, 6.

Lee et al. (2011)

J. K. Lee, K. W. Park, H. R. Kim und S. H. Kong, 2011, *Dielectrically stabilized electrowetting on AF1600/Si3N4/TiO2 dielectric composite film*, *Sensor Actuat B-Chem*, **160**, 1593-1598.

Lin et al. (2012)

Y. Y. Lin, E. R. F. Welch und R. B. Fair, 2012, *Low voltage picoliter droplet manipulation utilizing electrowetting-on-dielectric platforms*, *Sensor Actuat B-Chem*, **173**, 338-345.

Lippmann (1875)

G. Lippmann, 1875, *Relations entre les phénomènes électriques et capillaires*, *Annales de chimie et de physique*, **5**, 494-548.

Liu et al. (2008)

Y. J. Liu, D. J. Yao, H. C. Lin, W. Y. Chang und H. Y. Chang, 2008, *DNA ligation of ultramicro volume using an EWOD microfluidic system with coplanar electrodes*, *J Micromech Microeng*, **18**.

Long et al. (2009)

Z. C. Long, A. M. Shetty, M. J. Solomon und R. G. Larson, 2009, *Fundamentals of magnet-actuated droplet manipulation on an open hydrophobic surface*, *Lab on a chip*, **9**, 1567-1575.

Luan et al. (2012)

L. Luan, M. W. Royal, R. Evans, R. B. Fair und N. M. Jokerst, 2012, *Chip Scale Optical Microresonator Sensors Integrated With Embedded Thin Film Photodetectors on Electrowetting Digital Microfluidics Platforms*, *Ieee Sens J*, **12**.

Luchansky et al. (2011)

M. S. Luchansky und R. C. Bailey, 2011, *Rapid, Multiparameter Profiling of Cellular Secretion Using Silicon Photonic Microring Resonator Arrays*, *J Am Chem Soc*, **133**, 20500-20506.

Luk et al. (2012)

V. N. Luk, L. K. Fiddes, V. M. Luk, E. Kumacheva und A. R. Wheeler, 2012, *Digital microfluidic hydrogel microreactors for proteomics*, *Proteomics*, **12**, 1310-1318.

Malic et al. (2010)

L. Malic, D. Brassard, T. Veres und M. Tabrizian, 2010, *Integration and detection of biochemical assays in digital microfluidic LOC devices*, *Lab on a chip*, **10**, 418-431.

Mohr et al. (2005)

J. Mohr, W. Menz und O. Paul, 2005, *Mikrosystemtechnik für Ingenieure*, Wiley-VCH, ISBN 9783527305360.

Mortimer (2010)

U. M. C. E. Mortimer, 2010, *Chemie: Das Basiswissen der Chemie*, Thieme, ISBN 9783131517104.

Moscou et al. (2009)

M. J. Moscou und A. J. Bogdanove, 2009, *A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors*, *Science*, **326**, 1501.

Mugele et al. (2005)

F. Mugele und J.-C. Baret, 2005, *Electrowetting: from basics to applications*, *Journal of Physics: Condensed Matter*, **17**, R705-R774.

Ng et al. (2012)

A. H. Ng, K. Choi, R. P. Luoma, J. M. Robinson und A. R. Wheeler, 2012, *Digital microfluidic magnetic separation for particle-based immunoassays*, *Anal Chem*, **84**, 8805-8812.

Ng et al. (2015a)

A. H. Ng, M. Dean Chamberlain, H. Situ, V. Lee und A. R. Wheeler, 2015a, *Digital microfluidic immunocytochemistry in single cells*, *Nat Commun*, **6**, 7513.

Ng et al. (2015b)

A. H. C. Ng, M. Lee, K. Choi, A. T. Fischer, J. M. Robinson und A. R. Wheeler, 2015b, *Digital Microfluidic Platform for the Detection of Rubella Infection and Immunity: A Proof of Concept*, *Clin Chem*, **61**, 420-429.

Nikapitiya et al. (2014)

N. Y. J. B. Nikapitiya, S. M. You und H. Moon, 2014, *Droplet dispensing and splitting by electrowetting on dielectric digital microfluidics*, presented in part at the IEEE 27th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), 26-30 Jan. 2014, ISBN 9781479935086.

Ohmer (2016)

J. Ohmer, 2016, *Konstruktion und Inbetriebnahme eines Positioniersystems zur Manipulation magnetischer Partikel in der Digitalen Mikrofluidik*, Masterarbeit, Karlsruher Institut für Technologie.

Papathanasiou et al. (2005)

A. G. Papathanasiou und A. G. Boudouvis, 2005, *Manifestation of the connection between dielectric breakdown strength and contact angle saturation in electrowetting*, *Appl Phys Lett*, **86**.

Park et al. (2014)

C. Y. Park, J. Kim, J. Kweon, J. S. Son, J. S. Lee, J. E. Yoo, S. R. Cho, J. H. Kim, J. S. Kim und D. W. Kim, 2014, *Targeted inversion and reversion of the blood coagulation factor 8 gene in human iPS cells using TALENs*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, 9253-9258.

Po-Weng et al. (2006)

H. Po-Weng, W. Tsu-Te, L. Sheou-Wei, C. Yu-Chi und F. Shih-Kang, 2006, *Dielectrophoretic Cell Concentrator on EWOD-Based Chips*, presented in part at the 1st IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems Zhuhai, China, 18–21 January, ISBN.

Riegel (2015)

E. Riegel, 2015, *Die wirtschaftliche Bedeutung der Digitalen Mikrofluidik und Elektrobenetzung in Industrie und Forschung*, Bachelorarbeit, Hochschule Karlsruhe – Technik und Wirtschaft.

Royal et al. (2013)

M. W. Royal, N. M. Jokerst und R. B. Fair, 2013, *Droplet-Based Sensing: Optical Microresonator Sensors Embedded in Digital Electrowetting Microfluidics Systems*, *Ieee Sens J*, **13**, 4733-4742.

Samiei et al. (2015)

E. Samiei und M. Hoorfar, 2015, *Systematic analysis of geometrical based unequal droplet splitting in digital microfluidics*, *J Micromech Microeng*, **25**.

Samiei et al. (2016)

E. Samiei, M. Tabrizian und M. Hoorfar, 2016, *A review of digital microfluidics as portable platforms for lab-on-a-chip applications*, *Lab on a chip*, **16**, 2376-2396.

Sarvothaman et al. (2015)

M. K. Sarvothaman, K. S. Kim, B. Seale, P. M. Brodersen, G. C. Walker und A. R. Wheeler, 2015, *Dynamic Fluoroalkyl Polyethylene Glycol Co-Polymers: A New Strategy for Reducing Protein Adhesion in Lab-on-a-Chip Devices*, *Adv Funct Mater*, **25**, 506-515.

Segadlo (2015)

D. Segadlo, 2015, *Die Bestimmung und Optimierung der Tropfenbeweglichkeit von verschiedenen Flüssigkeiten auf einem digitalen Mikrofluidik-Chip*, Bachelorarbeit, Hochschule Reutlingen.

Shaali et al. (2015)

M. Shaali, S. Lara-Avila, P. Dommersnes, A. Ainla, S. Kubatkin und A. Jesorka, 2015, *Nanopatterning of mobile lipid monolayers on electron-beam-sculpted Teflon AF surfaces*, *ACS nano*, **9**, 1271-1279.

Shah et al. (2013)

G. J. Shah, H. Ding, S. Sadeghi, S. Chen, C. J. Kim und R. M. van Dam, 2013, *On-demand droplet loading for automated organic chemistry on digital microfluidics*, *Lab on a chip*, **13**, 2785-2795.

Shamsi et al. (2016)

M. H. Shamsi, K. Choi, A. H. C. Ng, M. D. Chamberlain und A. R. Wheeler, 2016, *Electrochemiluminescence on digital microfluidics for microRNA analysis*, *Biosensors & bioelectronics*, **77**, 845-852.

Shields et al. (2015)

C. W. Shields, C. D. Reyes und G. P. Lopez, 2015, *Microfluidic cell sorting: a review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation*, *Lab on a chip*, **15**, 1230-1249.

Shih et al. (2015)

S. C. C. Shih, G. Goyal, P. W. Kim, N. Koutsoubelis, J. D. Keasling, P. D. Adams, N. J. Hillson und A. K. Singh, 2015, *A Versatile Microfluidic Device for Automating Synthetic Biology*, *Acs Synth Biol*, **4**, 1151-1164.

Sista (2007)

R. Sista, 2007, *Development Of A Digital Microfluidic Lab-On-A-Chip For Automated Immunoassay With Magnetically Responsive Beads*, Dissertation, The Florida State University Famu-Fsu College Of Engineering.

Sista et al. (2008)

R. Sista, Z. S. Hua, P. Thwar, A. Sudarsan, V. Srinivasan, A. Eckhardt, M. Pollack und V. Pamula, 2008, *Development of a digital microfluidic platform for point of care testing, Lab on a chip*, **8**, 2091-2104.

Srinivasan et al. (2004)

V. Srinivasan, V. K. Pamula und R. B. Fair, 2004, *An integrated digital microfluidic lab-on-a-chip for clinical diagnostics on human physiological fluids, Lab on a chip*, **4**, 310-315.

Strickland et al. (1985)

D. Strickland und G. Mourou, 1985, *Compression of Amplified Chirped Optical Pulses, Opt Commun*, **56**, 219-221.

Su et al. (2016)

J. Su, A. F. G. Goldberg und B. M. Stoltz, 2016, *Label-free detection of single nanoparticles and biological molecules using microtoroid optical resonators, Light-Sci Appl*, **5**.

Sun et al. (2012)

M. T. Sun und H. X. Xu, 2012, *A Novel Application of Plasmonics: Plasmon-Driven Surface-Catalyzed Reactions, Small*, **8**, 2777-2786.

Tipler (1994)

P. A. Tipler, 1994, *Physik*, Spektrum Akademischer Verlag, ISBN 9783860251225.

Vergauwe et al. (2011)

N. Vergauwe, D. Witters, F. Ceyssens, S. Vermeir, B. Verbruggen, R. Puers und J. Lammertyn, 2011, *A versatile electrowetting-based digital microfluidic platform for quantitative homogeneous and heterogeneous bio-assays, J Micromech Microeng*, **21**.

Voigt et al. (2014)

A. Voigt und H. Padusinski, *Low-Cost-Fluoreszenzscanner Aufbau mit X-Y-Tisch*, Karlsruhe, Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT), unpublished work.

Vollmer et al. (2008)

US20060227331 A1, *Method and apparatus for measuring and monitoring optical properties based on a ring-resonator*, 2008.

von der Ecken et al. (2016a)

Deutschland Pat., DE102014100871 B4, *Digitale Mikrofluidikplattform*, 2016a.

von der Ecken et al. (2016b)

S. von der Ecken, D. Sánchez, P. Teunissen, H. Raat, R. Ahrens und A. E. Guber, 2016b, *LOW-COST AND EASY PRODUCIBLE PAPER-PRINTED DIGITAL MICROFLUIDIC CHIPS*, presented in part at the MicroTAS Dublin, Ireland, 9.-13. October 2016, ISBN 978-0-9798064-9-0.

von der Ecken et al. (2017)

S. von der Ecken und S. F. Wondimu, 2017, *Integration of digital microfluidics with whispering-gallery mode sensors for label-free detection of biomolecules*, Eingereicht bei *Lab-on-a-Chip*.

Wang et al. (2015)

X. L. Wang, Y. B. Wang, X. W. Wu, J. H. Wang, Y. J. Wang, Z. J. Qiu, T. Chang, H. Huang, R. J. Lin und H. K. Yee, 2015, *Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors*, *Nat Biotechnol*, **33**, 175-178.

White et al. (2008)

I. M. White und X. Fan, 2008, *On the performance quantification of resonant refractive index sensors*, *Opt Express*, **16**, 1020-1028.

Wiegele et al. (2014)

S. Wiegele, T. Beck, T. Grossmann, R. Schmager, J. Fischer, M. Mai, T. Wienhold, U. Bog, C. Friedmann, T. Mappes und H. Kalt, 2014, *Polymeric Whispering Gallery Mode Resonators for Biosensing Applications*, presented in part at the CLEO: Science and Innovations San Jose, California United States, 8.-13.06.2014, ISBN 978-1-55752-999-2.

Wienhold et al. (2015)

T. Wienhold, S. Kraemmer, S. F. Wondimu, T. Siegle, U. Bog, U. Weinzierl, S. Schmidt, H. Becker, H. Kalt, T. Mappes, S. Koeber und C. Koos, 2015, *All-polymer photonic sensing platform based on whispering-gallery mode microgoblet lasers*, *Lab on a chip*, **15**, 3800-3806.

Wijethunga et al. (2011)

P. A. L. Wijethunga, Y. S. Nanayakkara, P. Kunchala, D. W. Armstrong und H. Moon, 2011, *On-Chip Drop-to-Drop Liquid Microextraction Coupled with Real-Time Concentration Monitoring Technique*, *Anal Chem*, **83**, 1658-1664.

Wildgen et al. (2015)

S. M. Wildgen und R. C. Dunn, 2015, *Whispering Gallery Mode Resonators for Rapid Label-Free Biosensing in Small Volume Droplets*, *Biosensors*, **5**, 118-130.

Witters et al. (2013)

D. Witters, K. Knez, F. Ceysens, R. Puers und J. Lammertyn, 2013, *Digital microfluidics-enabled single-molecule detection by printing and sealing single magnetic beads in femtoliter droplets*, *Lab on a chip*, **13**, 2047-2054.

Xu et al. (2013)

W. T. Xu, C. Guo und S. W. Rhee, 2013, *High performance organic field-effect transistors using cyanoethyl pullulan (CEP) high-k polymer cross-linked with trimethylolpropane triglycidyl ether (TTE) at low temperatures*, *J Mater Chem C*, **1**, 3955-3960.

Yang et al. (2008)

H. Yang, S.-K. Fan und W. Hsu, 2008, *Connecting interface for modularization of digital microfluidics*, ISBN n.a.

Yang et al. (2009)

H. Yang, V. N. Luk, M. Abeigawad, I. Barbulovic-Nad und A. R. Wheeler, 2009, *A World-to-Chip Interface for Digital Microfluidics*, *Anal Chem*, **81**, 1061-1067.

Yasuda et al. (2010)

T. Yasuda und K. Imamura, 2010, *Bidirectional Droplet Transportation Using Ewod-Induced Wettability Gradient*, presented in part at the International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2010) Groningen, The Netherlands, 3-7 Okt. 2010, ISBN 9781618390622.

Yehezkel et al. (2016)

T. B. Yehezkel, A. Rival, O. Raz, R. Cohen, Z. Marx, M. Camara, J. F. Dubern, B. Koch, S. Heeb, N. Krasnogor, C. Delattre und E. Shapiro, 2016, *Synthesis and cell-free cloning of DNA libraries using programmable microfluidics*, *Nucleic acids research*, **44**, e35.

Young (1805)

T. Young, 1805, *An Essay on the Cohesion of Fluids*, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, **95**, 65-87.

Zhu et al. (2008)

H. Y. Zhu, I. M. White, J. D. Suter, M. Zourob und X. D. Fan, 2008, *Opto-fluidic micro-ring resonator for sensitive label-free viral detection*, *Analyst*, **133**, 356-360.

Bildquellen

GaudiLabs (2016)

Mit freundlicher Genehmigung von Urs Gaudenz unter (http://www.gaudi.ch/GaudiLabs/wp-content/uploads/OpenDropV2_2.jpg) „OpenDropV2_2“, <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.0/legalcode>

Roland (2016)

Roland.chem in der deutschsprachigen Wikipedia (<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:TensideHyrophilHydrophob.png>), „TensideHyro-philHydrophob“, Beschriftung geändert und ergänzt, <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/legalcode>

Jü (2016)

Jü (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Poloxamere_General_Formula_V2.svg), Beschriftung geändert und ergänzt, <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/legalcode>

Betreute studentische Arbeiten zum Thema der digitalen Mikrofluidik

Doll (2015)

P. Doll, 2015, *Entwurf, Konstruktion und Inbetriebnahme eines Versuchsstandes zur Entwicklung auf Digitaler Mikrofluidik basierender LoC Systeme*, Diplomarbeit (unveröffentlicht), Karlsruher Institut für Technologie (KIT).

Ohmer (2016)

J. Ohmer, 2016, *Konstruktion und Inbetriebnahme eines Positioniersystems zur Manipulation magnetischer Partikel in der Digitalen Mikrofluidik*, Masterarbeit (unveröffentlicht), Karlsruher Institut für Technologie.

Riegel (2015)

E. Riegel, 2015, *Die wirtschaftliche Bedeutung der Digitalen Mikrofluidik und Elektrobenetzung in Industrie und Forschung*, Bachelorarbeit (unveröffentlicht), Hochschule Karlsruhe – Technik und Wirtschaft.

Segadlo (2015)

D. Segadlo, 2015, *Die Bestimmung und Optimierung der Tropfenbeweglichkeit von verschiedenen Flüssigkeiten auf einem digitalen Mikrofluidik-Chip*, Bachelorarbeit (unveröffentlicht), Hochschule Reutlingen.

Eigene Arbeiten, Vorträge und Veröffentlichungen

S. von der Ecken, 2011, *Experimentelle Untersuchung des Primärzerfalls an einer ebenen Filmlegerdüse*, Studienarbeit (unveröffentlicht), Karlsruher Institut für Technologie (KIT).

S. von der Ecken, 2012, *Entwicklung einer Matrix-Ansteuerung für eine Elektrobenetzungs-Chipplattform zur Zellsortierung*, Diplomarbeit (unveröffentlicht), Karlsruher Institut für Technologie (KIT).

S. von der Ecken, 2014, *Development of a Digital Microfluidic System for Automated Synthesis of DNA by Iterative Capped Assembly*, Vortrag auf dem Status Meeting of the Helmholtz Initiative on Synthetic Biology, DKFZ Heidelberg.

S. von der Ecken, D. Segadlo, P. Doll, R. Ahrens, U. Strähle, A. Guber, 2015, *Entwicklung einer digitalen Mikrofluidik-Plattform zur Automatisierung eines DNA Ligations-Prozesses*, präsentiert als Teil des 6. MikroSystemTechnik Kongress 2015 in Karlsruhe.

S. von der Ecken, 2015, *Digital Microfluidics and its Application Possibilities in the Synthetic Biology*, Vortrag auf dem Status Meeting of the Helmholtz Initiative on Synthetic Biology, Karlsruher Institut für Technologie (KIT).

S. von der Ecken, 2015, *Digital Microfluidics - Flexible Handling of Small Amounts of Fluids in Lab-on-Chip Systems*, Vorlesungsbeitrag im BioMEMS-IV Seminar, 08.06.2015, Karlsruher Institut für Technologie (KIT).

S. von der Ecken, R. Ahrens und A. E. Guber, 2016, *Digital Microfluidics (DMF) - A versatile tool not only for the Digital Microfluidic Natives*, Vortrag auf der 13. Dortmunder MST-Konferenz, 20. und 21.09.2016

von der Ecken et al. (2016a)

Deutschland Pat., DE102014100871 B4, *Digitale Mikrofluidikplattform*, 2016a.

von der Ecken et al. (2016b)

S. von der Ecken, D. Sánchez, P. Teunissen, H. Raat, R. Ahrens und A. E. Guber, 2016b, *LOW-COST AND EASY PRODUCIBLE PAPER-PRINTED DIGITAL MICROFLUIDIC CHIPS*, presented in part at the MicroTAS Dublin, Ireland, 9.-13. October 2016, ISBN 978-0-9798064-9-0.

von der Ecken et al. (2017)

S. von der Ecken und S. F. Wondimu, 2017, *Integration of digital microfluidics with whispering-gallery mode sensors for label-free detection of biomolecules*, Eingereicht bei *Lab-on-a-Chip*.