

Die Vision des schrumpfenden Labors: Mikrofluidische Lösungen für analytische Anwendungen in den Life Sciences

M. Kautt, MIKRO; S. Halstenberg, IAI; D. Moss FGS; A. Guber, D. Herrmann, A. Muslija, IMT

Passt ein Analysenlabor auf einen Chip?

Die Miniaturisierung von Analysetechniken und analytischen Methoden ist kein Selbstzweck. Vielmehr handelt es sich um einen Trend, der einerseits der Notwendigkeit, zunehmend sparsamer mit Reaktionslösungen umzugehen, unterliegt und andererseits eine Reihe von analytischen Vorteilen erschließt, die konventionellen Techniken aufgrund ihrer makroskopischen Dimension verschlossen sind. So ist es auch kein Wunder, dass im aktuellen Trendbericht zur Analytischen Chemie 2001 in den „Blauen Blättern“ (Nachrichten aus der Chemie) neben biochemischen Nachweismethoden die „verstärkte Nutzung miniaturisierter Techniken, selbst in Gebieten, die bislang als Domäne des klassischen Apparatebaus galten“, beobachtet werden [1]. Bis dann aber die Vision eines Laboratoriums auf einem Chip – als sog. „lab-on-a-chip“ bezeichnet und vergleichbar zu den Prozessorchips der Computerindustrie gemeint – realisiert sein wird, bleibt noch einiges zu tun. Fest steht jedoch bereits heute, über ein Jahrzehnt nachdem zum ersten Mal das Konzept der auch als „ μ TAS¹⁾“ bezeichneten Analyseneinheiten formuliert wurde [2], dass mikrotechnische und hier insbesondere mikrofluidische Prozesse den Schlüssel zum Aufbau neuartiger miniaturisierter Analysenverfahren bilden. Und dass diese wahrscheinlich die Methoden der Umwelt- Lebensmittel- und anderer Analytiken bis

¹⁾ Miniaturized Total Analysis System

hin zur medizinischen Diagnostik verändern werden [3].

Die Miniaturisierung von analytischen Verfahren verspricht dabei ganz allgemein eine Reihe von Vorteilen, wie

- Verkürzung von Analysenzeiten,
- Erhöhung der Qualität der Analysenergebnisse,
- Parallelisierung von funktionalen Komponenten und Integration von Funktionen,
- Verringerung des Bedarfs an Probe und Reagenzien und somit weniger anfallender Abfall,
- Verminderung entstehender Kosten,
- Portabilität miniaturisierter Systeme.

Wobei natürlich nicht übersehen werden darf, dass Miniaturisierung alleine nicht gleich alles besser macht. Hier sind auf die jeweiligen Anwendungen abgestimmte Lösungen zu entwickeln und gleichermaßen eine einzelfallabhängige Priorisierung der vorstehenden möglichen Vorteile vorzunehmen. So sind nicht alle Vorteile immer in Einklang zu bringen. Beispielsweise ist es eher unwahrscheinlich, dass eine mikrotechnische Analyseneinheit, die mehrere Funktionen integriert, auch gleichzeitig sehr kostengünstig ist, wenngleich sie aber wahrscheinlich eine bessere analytische Leistung im Vergleich zu einem Aufbau zeigt, der aus Einzelkomponenten besteht.

Ein unbestritten positives Beispiel für den Nutzen der Miniaturisie-

rung in der Analytik stellt die chromatographische Trennung dar. So ist die bei Kombination miniaturisierter Kanalgeometrien mit elektrokinetischen Effekten erreichbare erhöhte Trennleistung durch eine Verringerung charakteristischer Dimensionen bedingt und ermöglicht damit die Steigerung der Qualität des Analyseergebnisses [4]. Wobei festgestellt werden muss, dass diese auch von der Empfindlichkeit der eingesetzten Detektionsverfahren abhängt.

Um abschließend die eingangs gestellte Frage zu beantworten: Heute passt ein Analysenlabor wohl noch nicht auf einen Chip. Aber wie Abb. 1 zeigt, passt eine mögliche Einzelkomponente eines künftigen mikrofluidischen Analysenchips immerhin schon mal auf einen Finger. So werden denn gemeinsame Entwicklungen an der Schnittstelle von Mikrofluidik und Nanotechnik sowie Biosensorik, Mikroelektronik und Informatik in Zukunft Neuerungen insbesondere in den Bereichen Simulation, Fertigungsverfahren, Oberflächenmodifikation und Nachweismethoden generieren, die uns dem Labor im Chipformat damit näher kommen lassen.

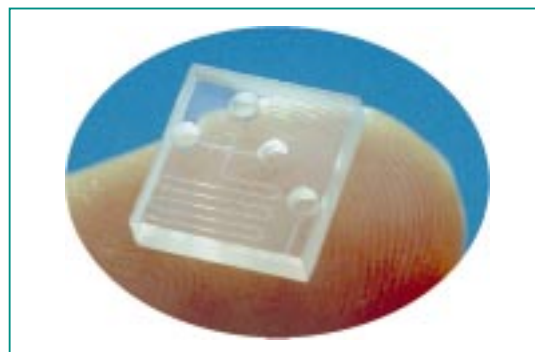


Abb. 1: Kapillar-Elektrophorese-Einheit in Kunststoff abgeformt und zum Größenvergleich auf einem Finger platziert.

Modellierung des Verhaltens von strömenden Flüssigkeiten in Mikrokapillaren

Unter Mikrokapillaren versteht man allgemein geschlossene Kanäle, deren (in der Mikrosystemtechnik meist rechteckiger) Querschnitt etwa in der Größenordnung eines menschlichen Haares liegt (rd. 60 μm). Sie bilden die Grundlage für mikrofluidische Komponenten, die neben den Kapillaren noch weitere funktionstragende Teile besitzen, deren geometrische Abmessungen im Bereich zwischen 10 und einigen 100 Mikrometern liegen. Solche mikrofluidischen Systeme für bioanalytische Anwendungen werden typischerweise planar aufgebaut. Man spricht hier oft von sogenannten „Analysenchips“. Abb. 1 zeigt eine Einheit eines weiter unten beschriebenen Analysenchips im Vergleich zu den papillaren Linien eines Fingers.

Effiziente Simulationsverfahren für komplexe mikrofluidische Situationen

Beim Entwurf von fluidischen Mikrosystemen bzw. -komponenten reduziert der Einsatz rechnergestützter Werkzeuge den Entwicklungsaufwand bedeutend und hilft, die gewünschten Fließeigenschaften vorherzusagen und reproduzierbar einzustellen.

Dringt eine Flüssigkeit in einen strukturierten Mikrokanal ein und drängt dabei ein anderes Fluid aus dem Kanal heraus, so muss eine transiente, d. h. sich während der Betrachtung verändernde, Mehrphasenströmung betrachtet werden unter Berücksichtigung der freien Oberfläche und der Kapillarkraft. Das Vorschreiten der Flüssigkeit geht mit einer Änderung der Grenzflächenform einher und ist damit aufgrund der meist hohen Komplexität der Geometrie analytisch nicht hinreichend erfassbar. Zur

Nachbildung des Strömungsverhaltens können nun jedoch Simulationsmethoden, wie z. B. die Finite Volumen Methode (FVM), eingesetzt werden, die eine hohe Diskretisierung des Strömungsraums vornehmen und so in ihren Ergebnissen analytischen Lösungen hinreichend nahe kommen.

Um den hohen zeitlichen Aufwand bei der Simulation komplexer Geometrien zu reduzieren, wurde am Forschungszentrum ein Konzept zur Erstellung eines geeigneten Gesamtmodells erarbeitet [5]. Dabei wird das Strömungsproblem in mehrere Bereiche unterteilt, wobei für jeden Bereich Modelle auf physikalischer Modellebene (z.B. FVM-Modelle) erstellt werden. Aus den Simulationsergebnissen werden Modelle einer höheren Modellebene, z. B. Netzwerkmodelle, verbessert oder generiert. Das bedeutet, dass sich die Komplexität des Gesamtproblems zunächst durch die Aufteilung in mehrere untergeordnete Bereiche reduziert. Nachfolgend werden die Simulationsergebnisse dazu eingesetzt, das Gesamtproblem auf einer höheren Modellebene, z. B. mit einem Netzwerkmodell, zu beschreiben. Im Gegensatz zu den Modellen auf physikalischer Ebene besitzt das höhere Modell des Gesamtproblems einen geringeren Simulationsaufwand. Dies führt somit in kürzerer Zeit zu nutzbaren Ergebnissen.

Zur Unterteilung des Strömungsgebietes in die zu modellierenden Bereiche wird die Symmetrie der Struktur ausgenutzt (siehe Abb. 2). Ein entsprechendes parametrisierbares FVM-Modell wird erstellt, das in den vom Entwickler vorgegebenen Parametern vari-

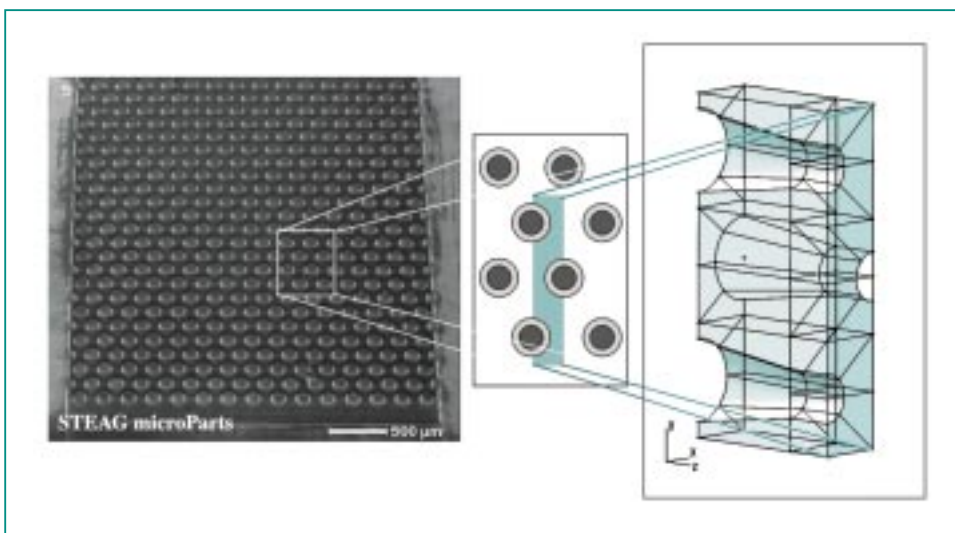


Abb. 2: Funktionseinheit (Ausschnitt) eines als medizinischer Teststreifen vorgesehenen Analysenchips (Abbildung mit freundlicher Genehmigung der STEAG microParts GmbH, Dortmund).

iert werden kann. Die Generierung des Modells aus den Geometrieangaben erfolgt dann automatisch. So können in dem abgebildeten Beispiel verschiedene Geometrieparameter, die die Säulenstruktur die (z. B. Säulenhöhe, Säulendurchmesser) beschreiben.

Vor der Durchführung einer Simulation sind die Eingabe- und Ausgabegrößen festzulegen. Wenn wie im Falle einer einphasigen Strömung die Abhängigkeit des resultierenden Volumenstroms von der anliegenden Druckdifferenz erfasst werden soll (Abb. 3 a), dann dienen als Referenzdaten zur Erstellung des höheren Modells Simulationsergebnisse für unterschiedliche Druckdifferenzen und unterschiedliche Säulenhöhen (Abb. 3 b).

Weitere Arbeiten zur modellhaften Beschreibung und zur Simulation von Strömungen in Kapillaren sind dem Beitrag von Ehrhard et al., ebenfalls in diesem Band, zu entnehmen [6].

Mikrofluidische Dünnschichtzelle für das High-Throughput-Screening

High-Throughput-Screening (zu Deutsch etwa „Hochdurchsatz-Ausleseprüfung“) ist eines der Schlagworte bei der Suche nach besseren Wirkstoffen für neue Medikamente. Allgemein versteht man darunter das vollautomatisierte Testen vieler niedermolekularer Verbindungen auf bestimmte biologische Wirkungen hin.

Das am Forschungszentrum entwickelte Screening-Verfahren nutzt aus, dass eine Interaktion zwischen einem Arzneimittelkandidat und einem sogenannten „Targetprotein“ zu einem Komplex führt und sich hierdurch Änderungen in den Schwingungseigenschaften der Moleküle ergeben. Diese Molekül-Schwingungen können mittels FTIR-Spektroskopie (von Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie) bestimmt werden. Vergleicht man nun zwei

Zustände, wie etwa das Summenspektrum aus ungemischten Target- und Arzneimittelkandidat-Lösungen mit dem Spektrum der Mischung, muss im Falle einer Interaktion, die dann einen starken Hinweis auf die mögliche Eignung des Kandidaten als Wirkstoff geben würde, ein anderes Spektrum resultieren (Abb. 4). Da es sich auch bei einer Interaktion nur um sehr kleine strukturelle Änderungen handeln wird, wurde mit der sogenannten Differenzspektroskopie eine empfindliche Methode entwickelt, die auch kleinste Unterschiede noch sichtbar macht.

Das Verfahren nutzt dabei also intrinsische optische Eigenschaften der Proteine im mittleren Infrarot-Spektralbereich aus, so dass eine Detektion von Protein-Arzneimittel-Wechselwirkungen ohne zusätzliche Markierung, Färbung oder Immobilisierung möglich ist. Exemplarisch sind in Abb. 5 anhand der Wechselwirkung zwischen dem Enzym Trypsin und

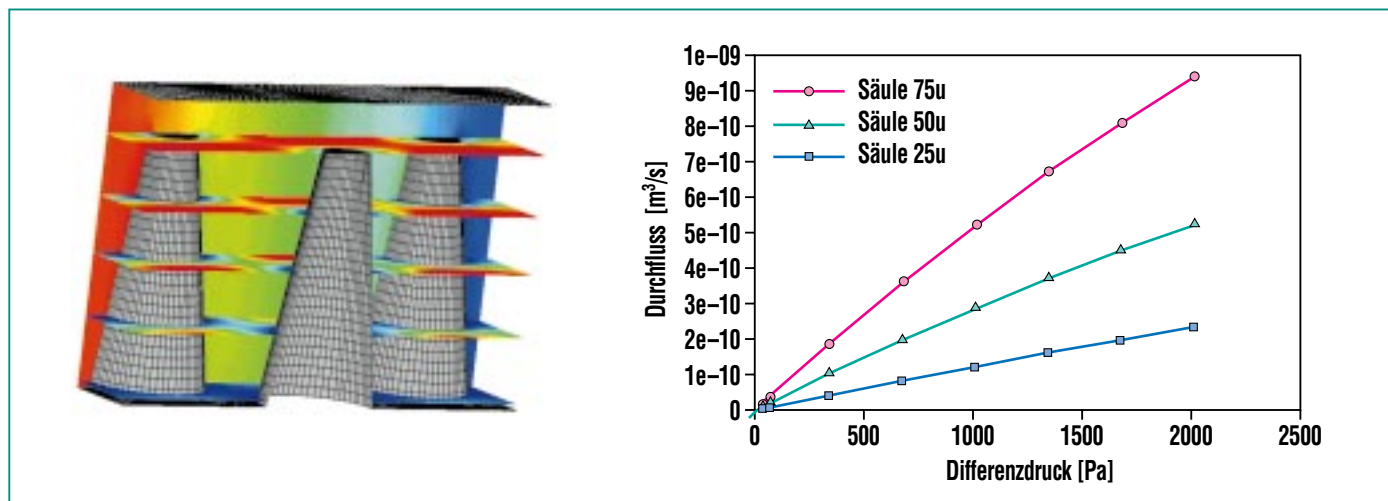


Abb. 3: a) Darstellung des simulierten Volumenstroms zwischen den Säulen in Abhängigkeit der Druckdifferenz; b) Simulationsergebnisse für unterschiedliche Druckdifferenzen unterschiedliche Säulenhöhen. Diese dienen als Referenzdaten zur Erstellung des höheren Modells.

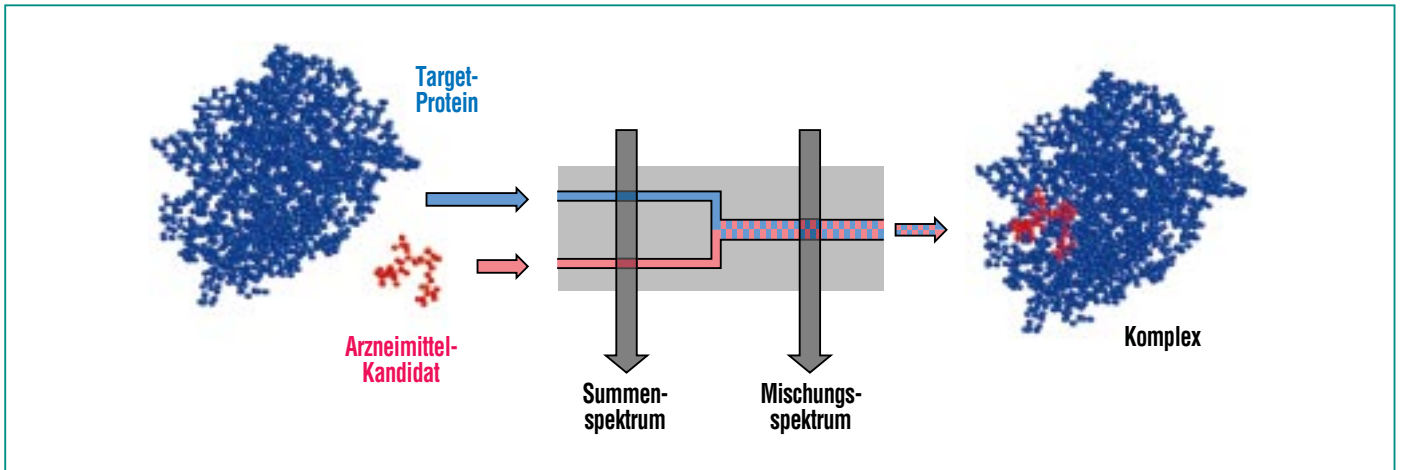


Abb. 4: Prinzip des Nachweises der Komplexbildung zwischen Proteinen und Arzneimittel-Kandidaten mittels FTIR-Spektroskopie. Aufgrund der Komplexbildung unterscheiden sich das Summenspektrum und das Mischungsspektrum.

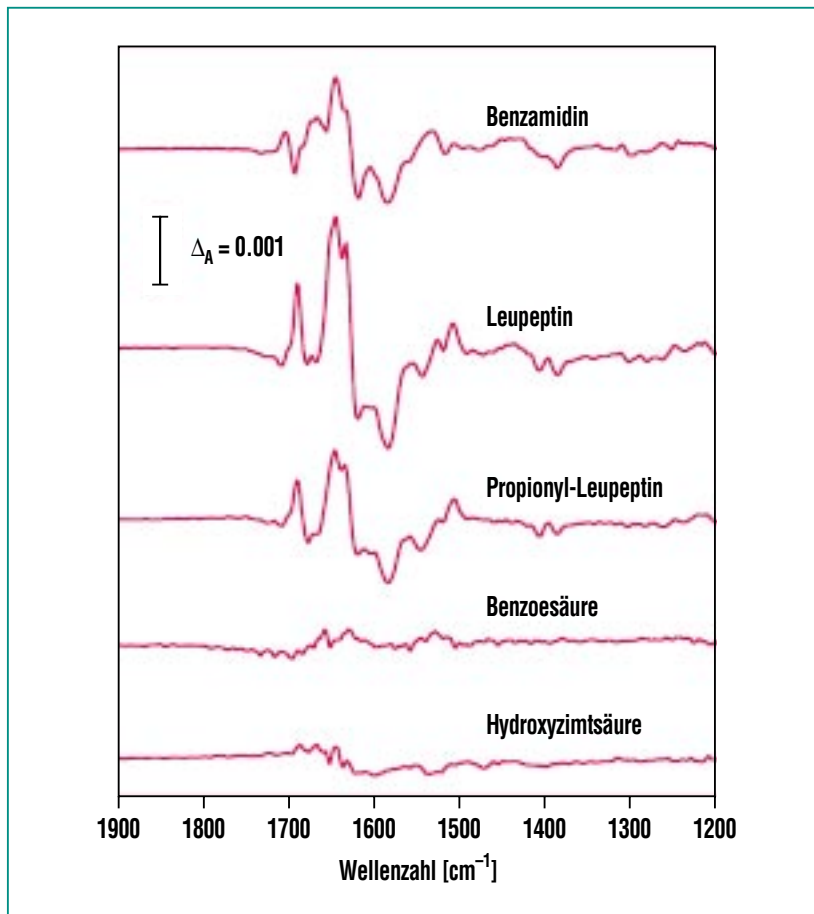


Abb. 5: FTIR-Differenzspektren, die durch Mischung des Enzyms Trypsin mit Hemmstoffen (obere 3 Spektren) bzw. mit Kontrollsubstanzen (untere 2 Spektren) erhalten wurden.

fünf verschiedenen niedermolekularen Verbindungen die resultierenden Differenzspektren gezeigt.

Man erkennt nur in drei Fällen ein ausgeprägtes Differenzspektrum, was auf eine Interaktion hindeutet. Die als Kontrollsubstanzen eingesetzten Säuren zeigen keine nennenswerten Differenzen, also auch keine Interaktion.

Trotz der analytischen Leistungsfähigkeit des Verfahrens ließ erst eine mikrotechnische Entwicklung die FTIR-Differenzspektroskopie zu einer auch kommerziell beachteten Technik werden. So muss nämlich bei wässrigen Lösungen – und hierum handelt es sich im Pharmascreening üblicherweise – die starke Absorption von Infrarotlicht durch das als Lösungsmittel dienende Wasser berücksichtigt werden. Daher müssen die Messungen bei einer optischen Weglänge und damit Schichtdicke einer Messzelle von höchstens 10 µm erfolgen. Das Fördern von wässrigen Proteinlösungen durch derart dünne

Schichten erzeugt jedoch Drücke in der Messzelle bis etwa 25 bar. Da nun die Strukturänderungen im Protein, und daher auch die zu erfassenden Spektraländerungen, extrem klein sind, bedeutet dies, dass es auch bei hohem Druck zu keiner Änderung der Schichtdicke kommen darf. Bereits eine Schichtdickenänderung von 10 nm würde zu einem unakzeptabel großen Störsignal führen. Hierzu musste eine neuartige mikrofluidische Durchflusszelle entwickelt werden, die zwischenzeitlich unter den Namen AquaSpec™ von einem Startup-Unternehmen, an dem auch zwei ehemalige Doktoranden des Forschungszentrums beteiligt sind, vertrieben wird (Abb. 6).

Eine Mikrotiterplatte aus Kunststoff mit 96 integrierten mikrofluidischen Strukturen

Für die Entwicklung neuer Medikamente werden heute in der pharmazeutischen Industrie typischerweise mehr als 100.000 Substanzen pro Woche auf ihre Wirksamkeit hin überprüft. Dabei kommen vorzugsweise Mikrotiterplatten aus Kunststoff als großflächige Testplattformen zum Einsatz. Diese enthalten auf einer standardisierten Grundfläche von 125 mm x 85 mm, mehrere hundert bzw. tausend individuelle, miniaturisierte Reaktionskammern, sogenannte Wells. Konventionelle, am Markt befindliche Mikrotiterplatten besitzen 96, 384 oder 1536 Wells, wobei das Well-Volumen zwischen 1 ml und 12 µl liegt. Dabei stellt generell das Handling von sehr kleinen Probenvolumina im Mikroliter-Bereich ein erhebli-

ches Problem dar, da Verdunstungseffekte immer mehr zum Tragen kommen. Durch den Einsatz von gekammerten mikrofluidischen Kanalsystemen anstelle der offenen Wells werden die Verdunstungseffekte deutlich minimiert. Das bietet zudem die Möglichkeit, in den Mikrokanälen kleinste Probenmengen aufzuarbeiten, zu trennen oder sie mit weiteren Substanzen zu vermischen. Diese als Lab-on-a-Chip bezeichneten Systeme zeichnen sich aufgrund der kleinen Kanalabmessungen auch durch einen sehr geringen Chemikalienverbrauch aus.

Mit mikrotechnischen Fertigungsmethoden konnten erstmalig Mikrotiterplatten im Standardformat aus Kunststoff mit 96 gleichzeitig ausgebildeten mikrofluidischen Strukturen realisiert werden (Abb. 7), die in ihrem prinzipiellen Aufbau Kapillarelektrophorese-Einheiten entsprechen. Die Wahl von Kunststoff, im Vergleich zu anderen in der Mikrosystem-

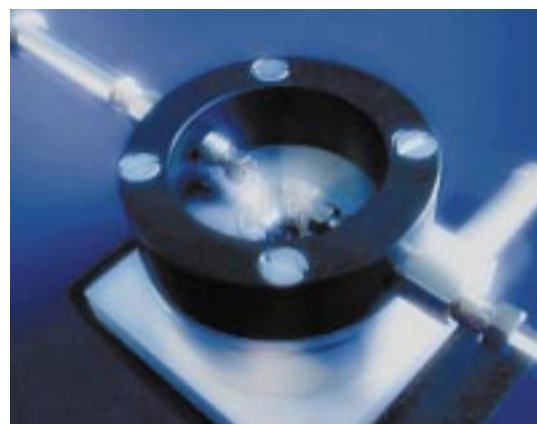


Abb. 6: AquaSpec™-Zelle (Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Fa. micro-biolytics, Freiburg).

technik gängigen Materialien, erlaubt dabei den Zugang zu potentiell kostengünstigen Analysenchips. Neben der allgemein für eine kommerzielle Nutzung erforderlichen hohen Wirtschaftlichkeit eröffnet sich hierdurch, die Möglichkeit, komplexe mikrofluidische Komponenten auch als Einwegkomponente zu ge- und verbrauchen. Hier bietet Kunststoff einerseits die Möglichkeit, bis zu 2 Größenordnungen günstiger sein

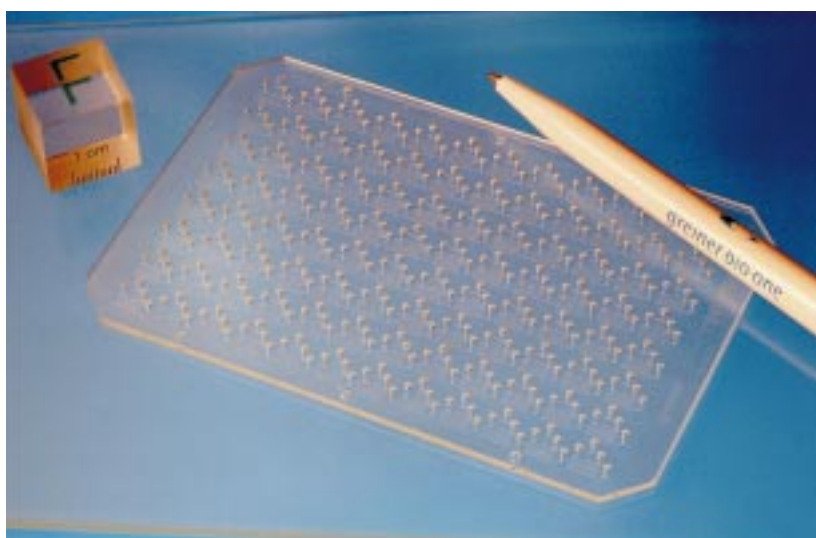


Abb. 6: AquaSpec™-Zelle (Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Fa. micro-biolytics, Freiburg).

zu können als mit anderen Materialien [7]. Andererseits zeichnen sich Kunststoffe durch eine für Massenprodukte vorteilhafte hohe Toleranz gegenüber mechanischer Belastung, eine hohe Materialvielfalt und die Möglichkeit zur vielseitigen Modifizierung der Oberflächen aus.



Abb. 8: Die elektrische Kontaktierung der vier Reservoirs jeder mikrofluidischen CE-Struktur erfolgt durch aufgedampfte Leiterbahnen aus Gold (Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Firma Greiner Bio-One, Frickenhausen).

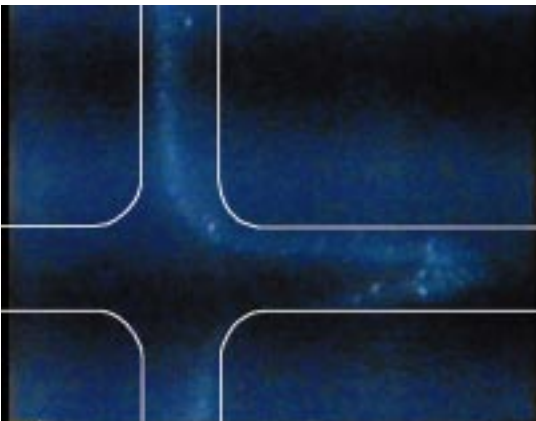


Abb. 9: Der im Kreuzungsbereich generierte Pfropf einer Farbstoff/DNA-Mischung wandert nach dem Anlegen einer elektrischen Spannung nach rechts in den Trennkanal. An der unteren Kanalseite erfolgte ein Abriss, während von oben noch Substanz mitgezogen wird.

Jede der 96 Mikrokanal-Strukturen besteht aus zwei sich kreuzenden Mikrokanälen, an deren Ende sich jeweils Zugangsöffnungen (Reservoirstrukturen) zur Aufnahme von Probenmaterial befinden. Die Kanäle sind jeweils 100 μm breit und 50 μm tief. Im Kreuzungsbereich beträgt das Volumen etwa 600 pl. Die Trennstrecke ist aus Platzgründen mäandrierend angeordnet und ist insgesamt 40 mm lang. Um das zu analysierende Probengemisch definiert bewegen und trennen zu können, werden elektrische Spannungen angelegt und über elektrische Leiterbahnen an die Reservoirs geführt.

Die elektrische Kontaktierung aller 384 Reservoirbereiche erfolgt über Leiterbahnen, die in die mikrostrukturierte Kunststoffplatte integriert sind (Abb. 8). Füllt man den langen Kanal mit Agarosegel, können durch Anlegen eines elektrischen Feldes geringe Mengen eines Probengemischs in das Kanalsystem eingeschleust und getrennt werden. Dies ist anhand des Standfotos einer Videosequenz in Abb. 9 gezeigt. Erfolgt dies bei allen 96 Strukturen zur selben Zeit, so können parallel Trennungen von Substanzgemischen durchgeführt werden.

Zusammenfassung

Es wurde gezeigt, wie neuartige rechnergestützte Simulationsmittel helfen, das Potenzial mikrofluidischer Strukturen zum Aufbau von neuartigen Analysenchips in vertretbarer Zeit und mit vertretbarem Rechenaufwand in konkreten Geometrien und Designvorschläge umzusetzen. Weiterhin wurden Beispiele vorgestellt, um

bereits heute die Menge an kostbarem Probenmaterial und die erforderliche Reaktandenmenge in einer Analyse zu reduzieren, bei gleichzeitiger Erhöhung der Zahl an Untersuchungen. Die Mikrofluidik wurde anhand von ersten Entwicklungsbeispielen vorgestellt als eine Schlüsseltechnik auf dem Weg zu hochintegrierten Analysensystemen, die in ihrer zukünftig vollständigen Ausprägung zu als μTAS oder Lab-on-a-Chip-Systeme bezeichneten Analyseverfahren führen sollen.

Danksagung

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung gilt der Dank der AutorInnen für die Förderung des Verbundprojektes OMID („Optimierung von Mikrosystemen für Diagnose- und Überwachungsanwendungen“), in dessen Verlauf die hier dargestellten Ergebnisse zur Simulation erarbeitet wurden. Weiterer Dank gilt den Projektpartnern STEAG microParts GmbH und Universität Bremen für Ihre hervorragenden Beiträge.

Die Arbeiten zur Entwicklung einer Dünnschichtzelle für die FTIR-Spektroskopie hätten ohne die Beiträge von Kathrin Fücksle, Ralf Masuch und Andreas Wolf (die beiden letztgenannten von der micro-biolytics GmbH, Freiburg) nicht zu den gezeigten Erfolgen führen können.

Wir bedanken uns bei Dr. Andreas Gerlach von der Greiner Bio-One GmbH für die sehr gute Zusammenarbeit und den Kollegen Dr. Mathias Hecke und Thomas Schaller für die unverzichtbare Unterstützung.

Literatur

- [1] R. Nießner, J. Broekaert, J. W. Einax, H. Emons, W. Engelwald, K. Heumann, H. Hutter, D. Knopp, R. Krska, U. Panne, U. Pyell, R. Salzer, F. Scheller, W. Stöcklein, N. Trautmann, M. Weller, *Nachr. Chemie* 50 (4/2001) 455-464 und 483-487
- [2] A. Manz, N. Graber, H. M. Widmer *Sensors and Actuators B1* (1990) 244-248
- [3] J. M. Ramsey *Nat. Biotech.* 17 (1999) 1061-1062
- [4] C. S. Effenhauser, in: A. Manz, H. Becker (Eds.) *Microsystem Technology in Chemistry and Life Sciences*, Springer Verlag Berlin Heidelberg (1998) 51-82
- [5] S. Halstenberg, H. Eggert, A. Quinte, K.-P. Scherer, *Sensor 2001 10th Int. Conf., Nürnberg, Germany*
- [6] P. Ehrhard, G. Janssens-Maenhout, I. Meisel, Thomas Schulenberg, *diese Nachrichten*
- [7] J. M. Wilkinson, *Microm. Dev.* 4 (3/1999) 1-3