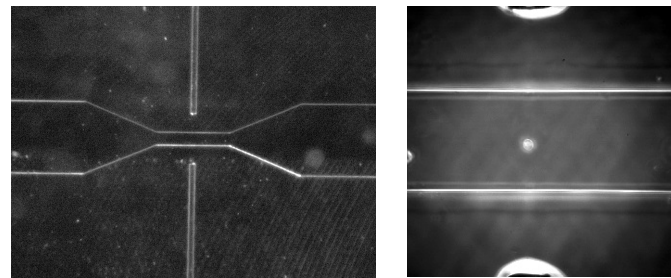
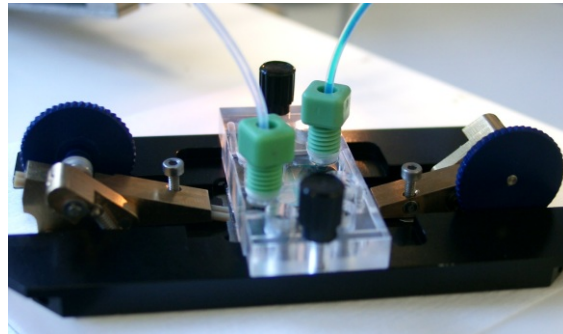


## Laser-Manipulation von Zellen

Suspendierte Zellen lassen sich mit einer so genannten "optischen Pinzette" (*Laser-Tweezer*) manipulieren. Den benötigten Lichtwellenleiter kann man sowohl senkrecht zur Flusszelle als auch in der Kanalebene anordnen. Im letzteren Fall können Lichtleiter (Single-Mode-Fasern) durch einen Kanal in der Größe der Lichtwellenleiter exakt positioniert werden (Bild rechts). Die Laser-Lichtleiter werden mithilfe einer mechanischen Führung durch Drehen einer Rändelschraube (Abb. unten) in den Kanal geleitet.



Diese Anordnung der optischen Fasern wurde in einem mikrofluidischen "optischen Stretcher" benutzt, einer neuartigen Lichtfalle, bei der eine Zelle zunächst zwischen zwei exakt gegenläufigen divergenten Laserstrahlen gefangen wird (Bild oben rechts). Durch Erhöhung der Laserleistung wird sie dann auseinandergezogen. Die Verformbarkeit des Cytoskeletts ist ein Maß für den Entwicklungsgrad: undifferenzierte Zellen sind weicher als differenzierte.

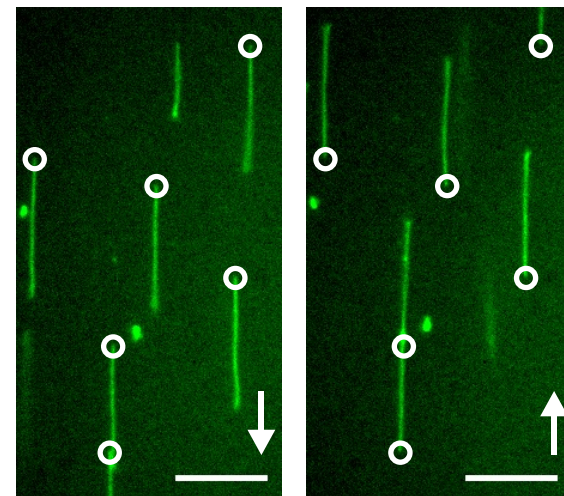
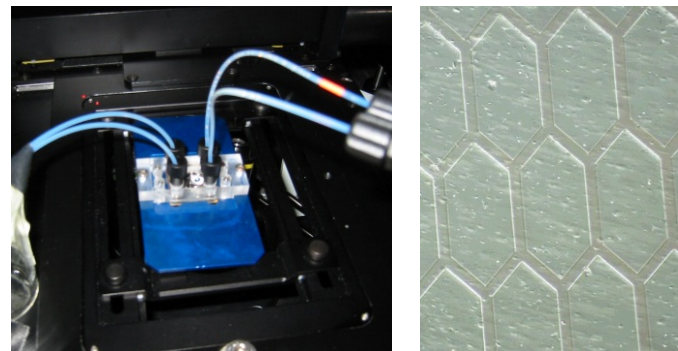
Diese Methode kann man zum automatischen Aufspüren von Krebs- oder Stammzellen nutzen. Außer der markierungsfreien *Diagnose* ist auch eine *Sortierung* der Zellen und somit eine schnelle Anreicherung von aus Geweben möglich (gemeinsames Projekt mit der Universität Leipzig).

## Weitere Laboranwendungen

Von unseren Kunden und Kooperationspartnern wurden unter anderem folgende Projekte umgesetzt:

- Untersuchung verschiedenfarbiger fluoreszierender Partikel (z. B. Bakterien) in einem fokussierten Strahl, u. a. mit der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS; Bild links unten)
- Erzeugung von lateralen Konzentrationsgradienten in Mikrokanälen mit einem wabenartigen Mikromischer (Bild unten rechts; Kanalbreite 50  $\mu\text{m}$ )
- Nanostrukturierung durch Manipulation einzelner Biopolymere (z. B. DNA und Motorproteine) im gerichteten Fluss (Bild rechts)
- Oberflächenplasmonresonanz (SPR)

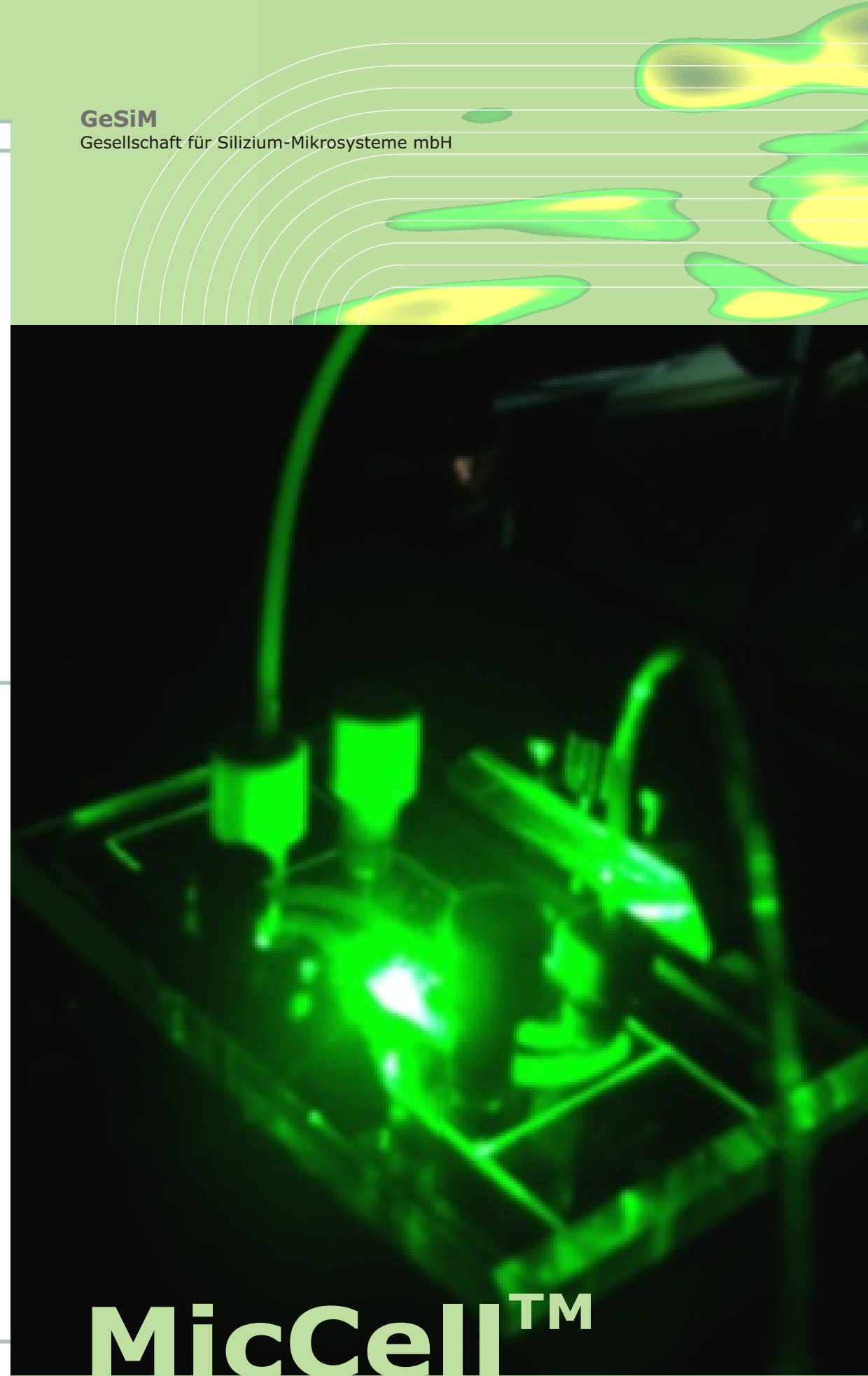
Weiteren Anwendungen sind nur durch Ihre Phantasie Grenzen gesetzt.



-DNA heftet sich mit einem Ende (Kreise) an das Deckglas und wird bei einem Fluss von 0,5  $\mu\text{l/s}$  in Pfeilrichtung gestreckt. Bei Flussumkehr klappen die DNA-Moleküle innerhalb einer Sekunde um. Diese Technik lässt sich z. B. zur Erzeugung von Nanodrähten einsetzen. Bilder zur Verfügung gestellt von S. Diez, MPI-CBG, Dresden. Balken: 10  $\mu\text{m}$ .

### Literatur

Gast, F.-U. et al. (2006) The microscopy cell (MicCell), a versatile modular flowthrough system for cell biology, biomaterial research, and nanotechnology. *Microfluidics and Nanofluidics* 2, 21-36



# MicCell™

Modulares Mikroperfusionssystem für das Mikroskop

## Die MicCell™

Die Untersuchung von Biomolekülen oder Zellen beinhaltet oft deren Immobilisierung an Oberflächen. Mikrofluidische Durchflusssysteme eignen sich nur dann dafür, wenn man die Kanäle reversibel öffnen und schließen kann, möglichst ohne mit Klebeband zu fummeln. Wünschenswert wäre auch ein *modulares Fluidiksystem*, das sich leicht für verschiedene Analysemethoden (z. B. elektrochemische oder optische) umbauen lässt und zudem gründlich *gereinigt* werden kann.

Zu diesem Zweck hat GeSiM Perfusionskammern mit abnehmbarem Deckglas für das Mikroskop entwickelt. Durch ein neues, patentiertes Verfahren sind die Flusszellen in Sekunden montiert und können im Cell-Imaging oder in Einzelmolekülfluoreszenz-Experimenten eingesetzt werden. Wenn nötig, lassen sich auch elektrische Signale verarbeiten oder Lichtleiter montieren. Eine computergesteuerte Makrofluidik rundet das System ab.

Das Layout des Systems lässt sich in weiten Grenzen variieren. So können verschiedene Materialien verwendet und Mikroventile und Mikroelektroden integriert werden. Durch den modularen Aufbau lassen sich auch die ausgefallensten Verfahren in Screening, Diagnostik und Nanotechnologie verwirklichen.

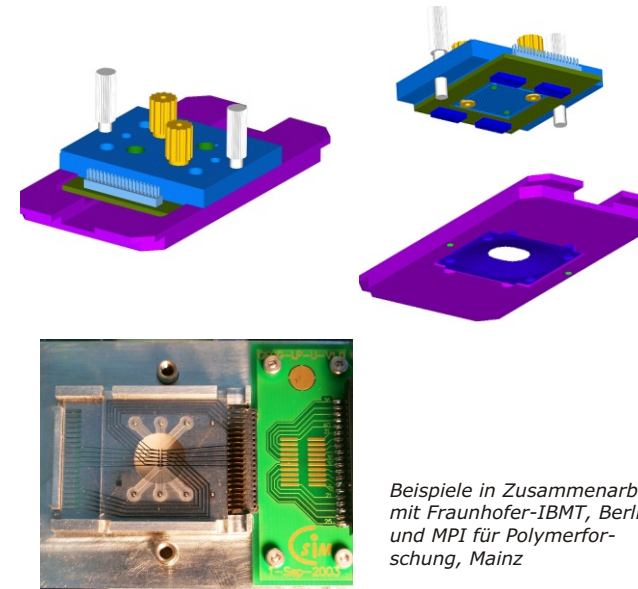
## Mögliche Anwendungen

- Halbautomatisches Drug-Screening mit adhären Zellen oder Gewebeschnitten im Mikroskop
- Wechselwirkung von Zellen o. ä. mit immobilisierten Proteinen, Oligosacchariden, Lipiden und anderen Liganden
- Vitalitätstests (z. B. für Krebszellen) und andere zellphysiologische Tests
- Zelladhäsionstests mit präparierten Oberflächen
- Laser-Manipulation von Zellen im Durchfluss: z. B. mit dem "optischen Stretcher" (zur Krebsdiagnostik und zur Isolierung von Stammzellen)
- DNA-Transfektion im Durchfluss
- Messung der Homogenität von Partikeln und Sortierung nach Größe
- Einzelmolekülnachweis mit fluoreszierenden Biomolekülen (Fluoreszenz-korrelationspektroskopie, Rezeptor-Liganden-Bindungstests, Motorprotein-Kinetik, Hybridisierungskinetik auf Microarrays usw.)
- Kapillarelektrophorese (CE)
- Applikation hydrodynamischer Flussfelder (z. B. Ausrichtung von Makromolekülen, Kraftmessungen, Nanotechnologie)
- Herstellung von lateralen Konzentrationsgradienten im Kanal
- Aktivitätsmessungen von Zellen auf Mikroelektroden-Arrays
- Rapid Prototyping von Mikroreaktorsystemen (z. B. zur chemischen Synthese oder zum "Stopped flow") mit PDMS-Strukturen
- Untersuchung nicht-transparenter Substrate im Fluss mit dem drehbaren "Sample Carrier" usw.

## Mikroelektroden

Mikroelektroden zum Heizen und Messen werden in unserem Reinraum auf Glas oder Silizium strukturiert und an den Stellen, an denen Kontakt mit Medium vermieden werden muss, durch Bedampfen mit SiO<sub>2</sub> passiviert.

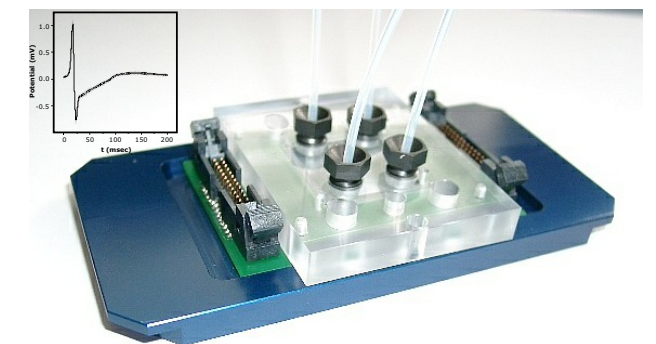
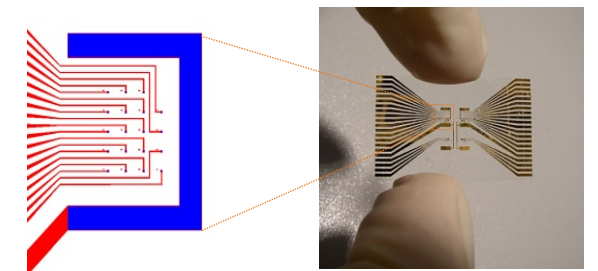
In der zusammengebauten MicCell werden die Elektroden über Federkontakte kontaktiert und die Signale über eine Leiterplatte (im Bild grün) zu Steckern geleitet. Falls auch die Channel Plate aus Glas ist, kann man Elektroden sowohl an der Ober- als auch an der Unterseite der Kanäle ansteuern.



Beispiele in Zusammenarbeit mit Fraunhofer-IBMT, Berlin, und MPI für Polymerforschung, Mainz

## Mikroelektroden-Arrays (MEAs)

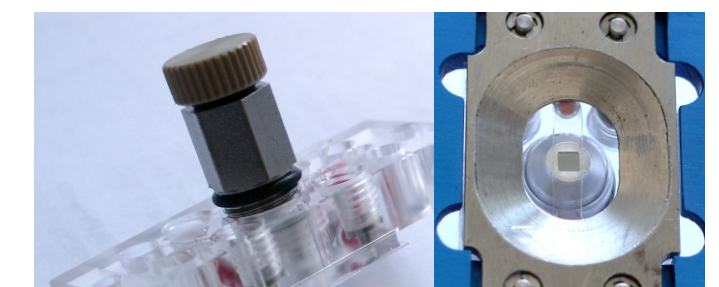
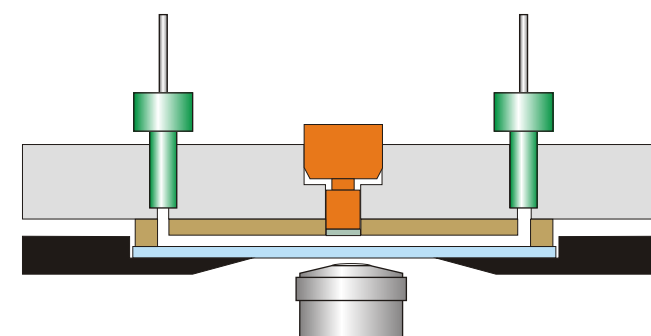
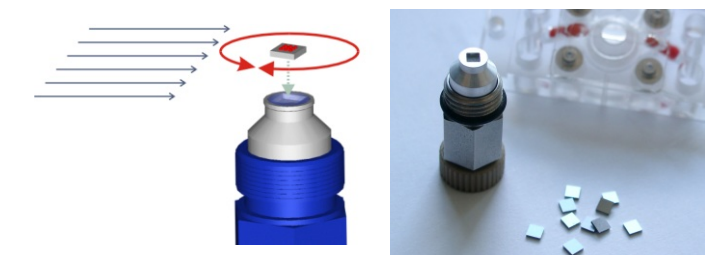
Zum Messen der Signale von Herzmuskel- oder Nervenzellen kann man die Zellen auf Deckgläsern mit Mikroelektroden-Arrays (s. Bilder unten) wachsen lassen, die anschließend in einen Durchflusskanal eingebaut werden. Das gezeigte Flusssystem kann elektrische Potenziale verarbeiten, während man gleichzeitig die Zellen im Mikroskop beobachtet.



## Probenhalter (Sample Carrier) für undurchsichtige Objekte

Der MicCell-Kanal ist normalerweise durchsichtig und ermöglicht daher die rückseitige Beleuchtung von Objekten. Mithilfe eines drehbaren Probenhalters ("Sample Carrier", orange im Schema unten) können jedoch auch undurchsichtige Objekte in den Probenkanal eingeführt und im Fluss beobachtet werden, z. B. zur Materialprüfung.

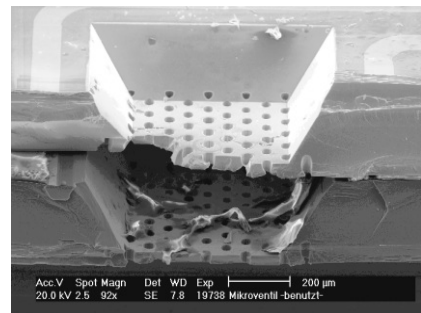
GeSiM bietet eine solche Durchflusszelle für Objekte bis zu einer Größe von 2,5x2,5 mm an. Da Probe und Probenhalter nicht transparent sind, muss das Licht von unten in den Strahlengang eingekoppelt werden. Der Clou: Die Probe kann volle 360° um die optische Achse gedreht werden, so dass Objekte unter jedem Winkel angeströmt werden können.



## Hydrogel-Mikroventil

Um zeitabhängig Lösungen zuzumischen, z. B. zum Starten und Stoppen von Reaktionen, muss ein totvolumenfreies Mikroventil in den Kanal eingebaut werden. Das von GeSiM entwickelte patentierte Hydrogelventil enthält Partikel aus einem Hydrogel, die sich unterhalb von 34 °C durch Wasser-einlagerung massiv ausdehnen und dadurch den Kanal verschließen. Erwärmung über diese Schalttemperatur öffnet das Ventil schlagartig, wodurch Substanzen in den Hauptkanal eingesaugt werden können.

Von diesem Ventil gibt es mehrere Versionen (s. separate Broschüre), aber in der MicCell verwendet werden in erster Linie solche, in denen die geheizte Aktorkammer mittels durchgeätzter Löcher senkrecht durchströmt wird, so dass das Ventil in einem Standard-Fitting (UNF 1/4-28) Platz hat, das direkt in ein MicCell-Eingangsloch geschraubt wird.



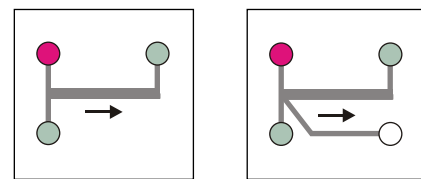
Raster-EM-Bild einer geöffneten Aktorkammer mit dehydratisierten Hydrogelpartikeln

### Spezifikationen des Aktors

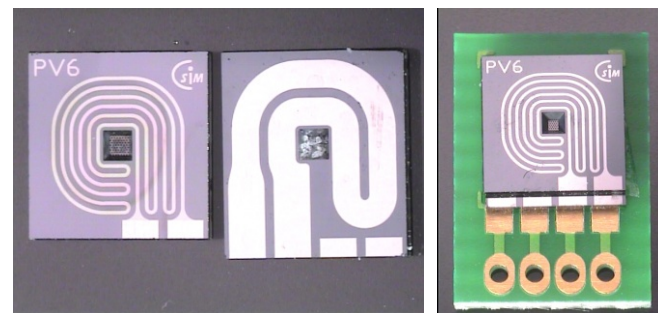
- Hydrogel polymerisiert aus gereinigtem *N*-Isopropylacrylamid (PNIPAAm)
- Standard-Phasenübergang bei 34 °C (einstellbar durch Vernetzungsgrad), bei Abkühlung mehr als zehnfacher Volumenanstieg ("normal geschlossenes Ventil")
- Heizleistung max. 250 mW bei 3,5 - 5 V, Heizung und Temperaturmessung über aufgedampfte Platinelektroden
- Schaltzeit ca. 1 - 3 Sekunden, mit Peltier-Kühlung etwa gleich schnell auch beim Schließen
- Druckdicht bis ca.  $6 \cdot 10^5$  Pa (6 bar)
- Benötigt wässrige Lösungen, toleriert aber < 15 % Methanol, Ethanol, Aceton < 5 % 1-Propanol



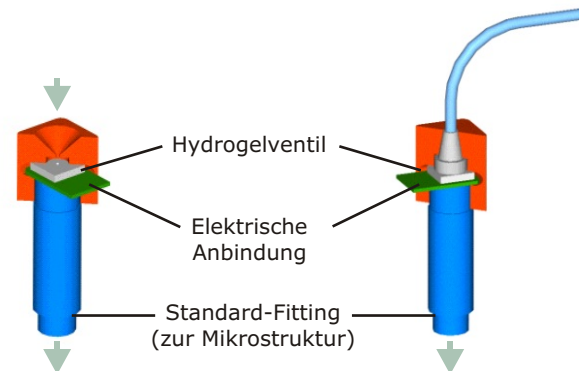
Das durch Weglassen einer gedruckten Leiterplatte autoklavierbare Hydrogelventil PV7 im MicCell-Deckel



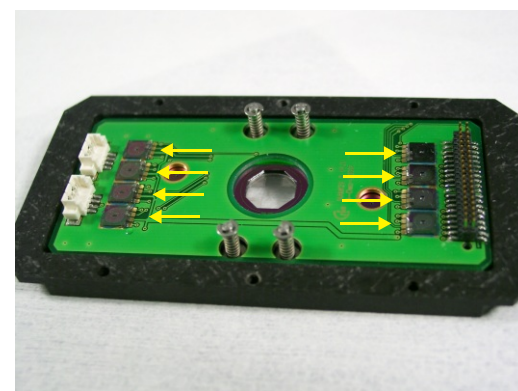
Probeninjektion in T- und K-Kanal. Die Anschlüsse des Hauptkanals sind grün markiert. Nach dem Verschließen der Zuführung lassen sich Proben über das rote Hydrogelventil einsaugen. Der K-Kanal (rechts) hat einen Extra-Ablauf (weiß), durch den das Totvolumen zwischen Ventil und Verzweigung gespült werden kann.



Mit Hydrogelpartikeln gefülltes Mikroventil, vor (links) und nach Montage (rechts)



Hydrogel-Partikelaktor mit minimalem Totvolumen (PV6) im Standard-UNF-Fitting. Links: Injektor für manuelle Probenaufnahme über einen Mikrotrichter, rechts: Probenaufnahme durch Kapillare (Innendurchmesser 25-762 µm).



Hydrodynamische Flusskammer mit acht über Hydrogelventile (Pfeile) gesteuerte Zu- und Abflüsse zur Erzeugung unterschiedlicher Flussrichtungen (in Zusammenarbeit mit der TU Dresden und der Firma Namos GmbH, Dresden)

## Zusammenbau

Das MicCell-Mikrosystem besteht aus

- der Kanalplatte (Channel Plate) aus PDMS oder Glas, auf der sich das mikrostrukturierte Kanalsystem befindet
- dem Deckglas

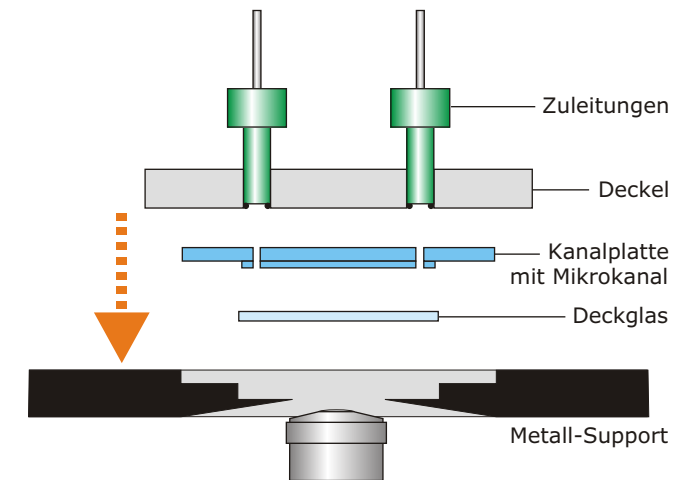
Der Mikrokanal wird durch ein Deckglas abgedeckt, welches zwischen Deckel (Polycarbonat, oben) und Support (Metall, unten) fest auf die Kanalplatte gedrückt wird. Die Flüssigkeit wird durch Öffnungen in der Kanalplatte zu- und abgeleitet.

Bahnbrechend ist der einfache Fluidikanschluss des Mikrokanals durch Standard-Fittings im MicCell-Deckel. Der Fluss wird durch externe Spritzenpumpen erzeugt ("Makrofluidik"), die viel zuverlässiger als mikrofluidische Pumpen sind.

Ein Lichtmikroskop gehört nicht zum Umfang der Lieferung.

### Bauteile

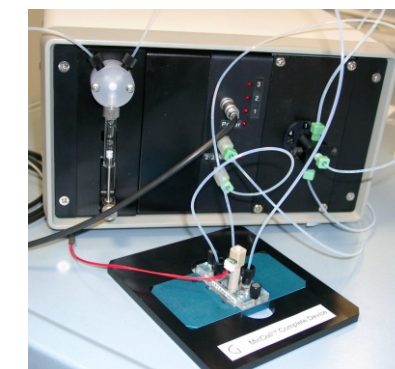
- Arbeitsplatte (Working Plate): Metalladapter zum Einbau der MicCell in praktisch alle Invers- und vielen Standard- und Stereomikroskope (erforderlich)
- Fluidprozessor: computergesteuerte Fluidik-Kontrollbox mit einer oder mehreren Spritzenpumpen, Selektorventil mit mehreren Eingängen, 2/2-Wege-Ventil und Steuerung für Hydrogelventil (empfohlen)
- Fluidschläuche mit kleinem Innendurchmesser (0,3 mm, 0,5 mm usw.), UNF-Fittings (1/4-28), O-Ringe
- Hydrogel-Mikroventile (s. hinten)
- Windows-Kontrollsoftware (s. u.): zum interaktiven Arbeiten und zur Prozessautomation mit dem Fluidprozessor (Fluss-Rampen, Ventilsteuerung, Temperaturkontrolle)
- Optional integrierbar: Mikromischer, Dünnschichtheizer und Thermosensoren, kalorimetrischer Flusssensor (GeSiM-Spezialität, s. Extra-Broschüre), Drucksensor, Mikroelektroden-Array, Impedanzsensor, "Sample Carrier"



MicCell-Aufbau. Zu sehen ist eine Kanalplatte aus Glas mit aufstrukturiertem Polymerkanal; normalerweise besteht sie aus abgeformtem PDMS. Befestigungselemente und Arbeitsplatte (Adapter zum Mikroskop) sind nicht gezeigt.



MicCell im Inversmikroskop mit Fluidprozessor (links), per Notebook gesteuert

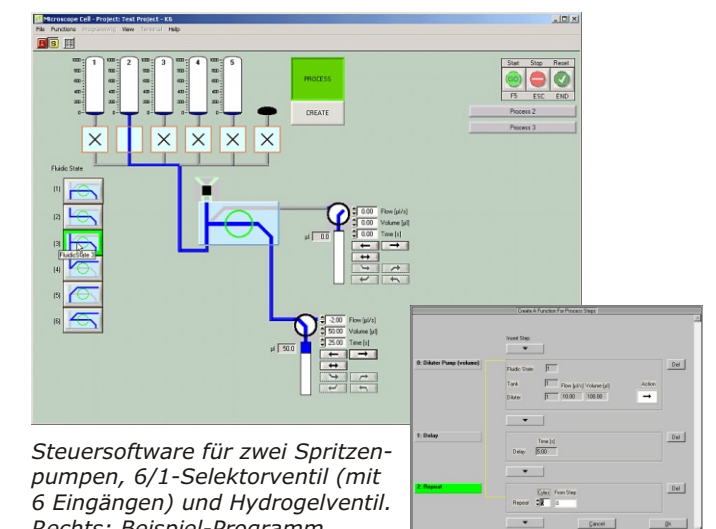


Standard-Fluidprozessor mit Spritzenpumpe (links), Hydrogelventilsteuerung und 2/2-Ventil (Mitte) sowie 4/1-Selektorventil (rechts). Vor dem Fluidprozessor sieht man eine MicCell eingebaut in die schwarze Adapterplatte, komplett mit Hydrogelventil und blauem Metall-Support.

## MicCell-Steuersoftware

Zum Spülen, Vorinkubieren und zeitgenauen Starten und Stoppen von Reaktionen können alle Einzelelemente (Spritzenpumpen, Ventile) sowie die Größe und Richtung des Flusses interaktiv mit einer Windows-Software kontrolliert werden. Zudem lassen sich komplexe Abläufe aus Einzelfunktionen (Pumpen und Ventile, Wartezeit, Wiederholungen) mittels einer einfachen Skriptsprache in automatische Prozesse einbauen (Beispiel in Abb. rechts unten).

Preisbewusste können die MicCell selbstverständlich auch mit eigener Peripherie betreiben, allerdings unter Verzicht auf den Komfort einer grafischen und programmierbaren Bedienung.



Steuersoftware für zwei Spritzenpumpen, 6/1-Selektorventil (mit 6 Eingängen) und Hydrogelventil. Rechts: Beispiel-Programm

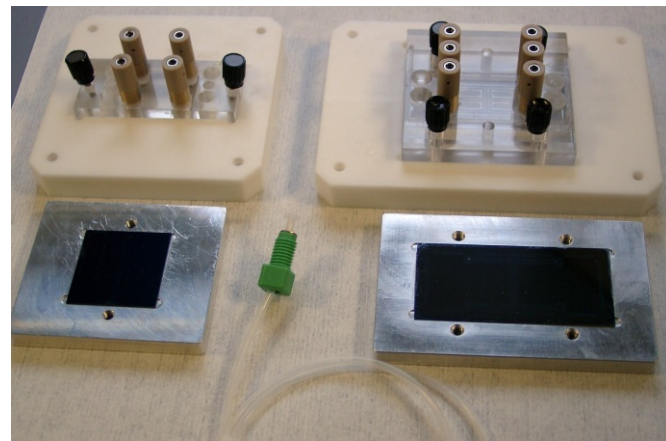
## PDMS-Kanalplatte (Channel Plate)

Zwar kann die Kanalplatte aus beliebigen Materialien gefertigt werden (Glas, Silizium, Keramik), aber das einfachste und beste Material ist PDMS (Polydimethylsiloxan), ein Silikon, das durch Mischen von zwei Komponenten vernetzt wird. Die PDMS-Mischung wird auf ein Abformwerkzeug (Master) aus Silizium aufgebracht und aushärten gelassen. Das weiche PDMS dichtet gegen das Deckglas besonders gut ab.

PDMS-Abformen ist eine etablierte Labortechnik, die aber oft in Basterei ausartet. GeSiM hat hierfür eine professionelle Gießstation entwickelt, in der die Zu- und Ableitungen durchs PDMS mittels "Kanal-Spacer" freigehalten werden (s. Bild rechts). Das Besondere: der Deckel definiert beim Abformen nicht nur die PDMS-Dicke, sondern bildet in der fertig montierten Zelle auch die obere Andruckplatte und enthält alle Fluidikanschlüsse. Nach dem Härten muss man also nur noch den Master durch das Deckglas ersetzen, die richtigen Fittings eindrehen und kann loslegen. Die Kanalplatte kann mehrfach benutzt werden.

Anstatt eine Gießstation anzuschaffen, können Sie die PDMS-Kanalplatte auch bei GeSiM herstellen lassen (sogar hundert Stück pro Monat). Dabei werden die MicCell-Deckel recycelt.

Die PDMS-Kanalplatte kann wegen ihrer leichten Handhabung und ihrem flexiblen Gebrauch auch zum *Rapid Prototyping* dienen: Zur Herstellung eines neuen Kanals ist lediglich ein neuer Master nötig.



Gießstationen für Deckgläser der Größen 22x22 und 22x50 mm mit Metall-Grundplatte, Silizium-Master (schwarz), Teflon-Gehäuse (weiß), Polycarbonat-Deckel (durchsichtig) und Kanal-Spacer (braun)

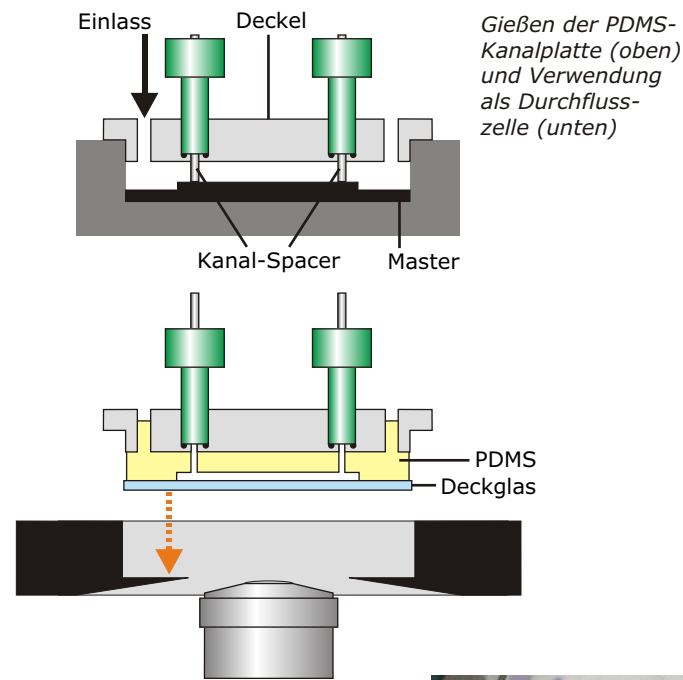
### Vorteile von PDMS

- Transparent und ohne Hintergrundfluoreszenz
- Leicht zu gießen
- Problemlos dichtend
- Biokompatibel (spätestens nach Plasmabehandlung)
- Kovalente Verbindung durch Plasmabehandlung

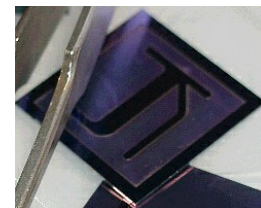
### Nachteile von PDMS

- Im Durchlicht schwacher Hintergrund
- Permeabel für kleine Moleküle wie Gase ( $O_2$ ,  $CO_2$ ), Alkohole usw. (eher vorteilhaft in der Zellbiologie)

### Prinzip



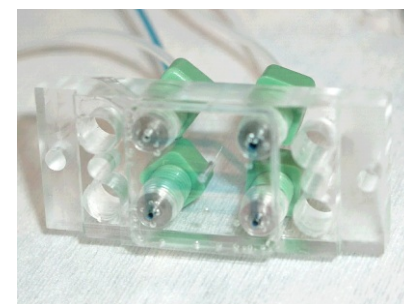
Gießen der PDMS-Kanalplatte (oben) und Verwendung als Durchflusszelle (unten)



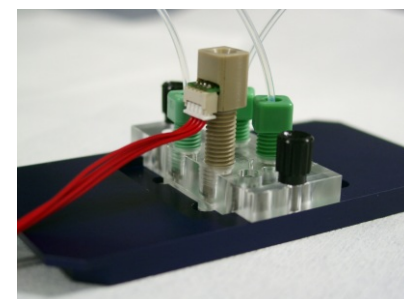
Silizium-Abformstruktur



PDMS-Abguss in der Gießstation. Der Silizium-Master befindet sich unter dem transparenten Deckel. Man beachte die Kanal-Spacer (braune Fittings).



Abgeformte PDMS-Kanalplatte mit Deckglas. Die Kanal-Spacer wurden durch grüne Fittings ersetzt.

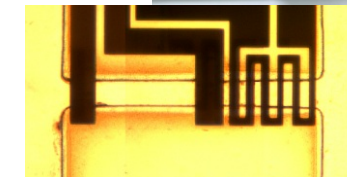
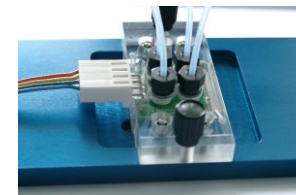


PDMS-Kanalplatte, montiert mit Deckglas auf Metall-Support, mit Hydrogelventil-Mikroinjektor

## Kundenspezifische Lösungen

Eine Spezialität von GeSiM ist, individuell auf Kundenwünsche einzugehen. Abgesehen von den vielen möglichen Kanalstrukturen und -materialien kann auch der ganze Aufbau in weiten Grenzen variieren. Für viele Probleme wurde bereits eine Lösung gefunden, darunter für Durchflusszellen, die ohne Mikroskop betrieben werden, z. B. mit Temperiereinheit zur Microarray-Hybridisierung oder zur Messung der Oberflächenplasmonresonanz (SPR). Auch Varianten für andere Mikroskope (wie Stereomikroskope) sowie die Integration von Mikroelektroden sind möglich.

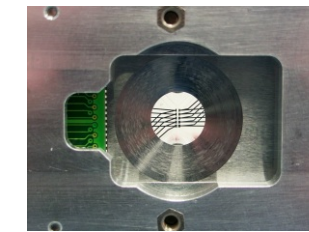
Es kommt daher eher selten vor, dass zwei ausgelieferte MicCells völlig identisch sind.



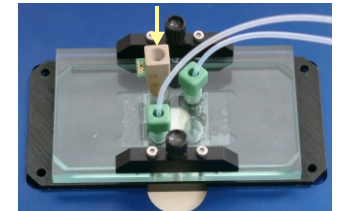
Mit Polymerwänden und Mikroelektroden...



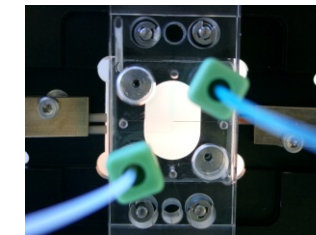
Für SPR...



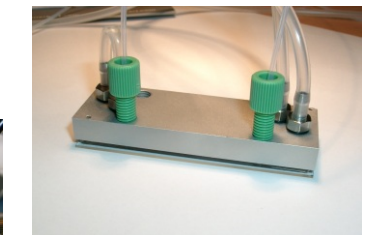
Mit Glaszelle und Elektroden auf beiden Seiten des Mikrokanals...



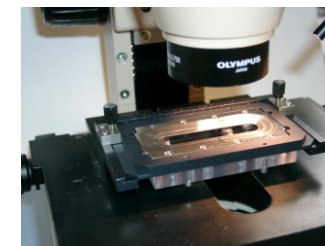
Mit T-Kanal aus Glas und Hydrogelventil-Injektor (Pfeil)...



Mit Lichtleitern...



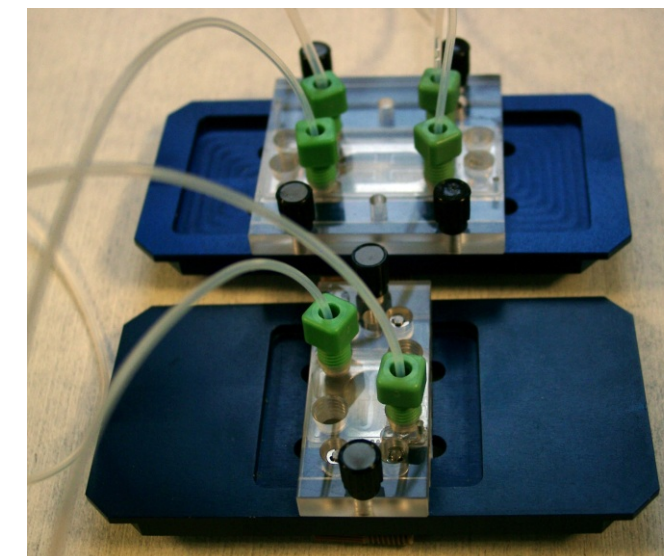
Zum Temperieren von Slides...



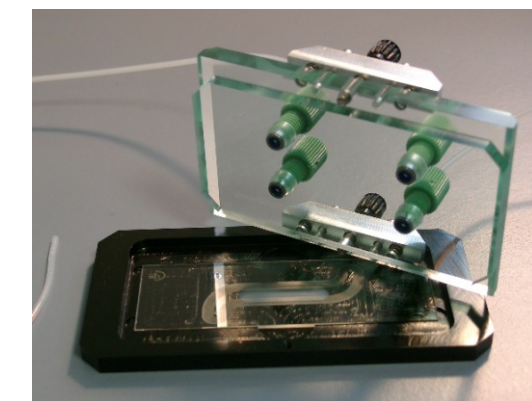
Im Stereomikroskop (siehe auch unten)...

## Verschieden große Fluidikkanäle

Für Kanalsysteme, die größer sind als ein normales Deckglas (22x22 mm), bis hin zur Größe eines Objektträgers, ist der Aufbau der MicCell etwas anders, wie hier gezeigt.



Standard-PDMS-MicCell für Deckgläser der Größe 22x50 mm (oben) und 22x22 mm (unten)



Deckglas 50x22 mm auf einem Polymerkanal auf einem Slide. Die Dichtung erfolgt hier über eine Schicht Silikonkautschuk, die auf die Kanalwände gesiebdruckt wurde.



Große PDMS-Kanalplatte für ein Stereomikroskop. Der Kanal wird von einem Objektträger verschlossen.