

Integration fluoreszenter Temperatursensoren und resistiver Mikroheizer in mikrofluidische Durchflussreaktoren

Christian Höra¹, Zhe Shu², Erik Beckert², Stefan Nagl¹, Detlev Belder¹

¹ Universität Leipzig, Institut für Analytische Chemie, Linnéstr. 3, 04103 Leipzig/ D
e-mail: belder@uni-leipzig.de

² Fraunhofer-Institut für Angewandte Optik und Feinmechanik (IOF), Albert-Einstein-Str. 7
07745 Jena/ D

Kurzfassung

Für eine effiziente Prozesskontrolle bei chemischen Reaktionen ist eine präzise Temperatursteuerung und -messung entscheidend. In miniaturisierten Durchflussreaktoren ist die Temperierung von Prozessmedien durch integrierte, miniaturisierte Heizelemente möglich, die Bestimmung der lokalen Temperatur konnte jedoch bisher nur durch Punktmessungen, invasiv oder mittels IR-Thermometrie erfolgen. In diesem Zusammenhang ist die Verwendung fluoreszierender Temperatursensorschichten besonders attraktiv, da diese die lokale Temperatur orts aufgelöst in Echtzeit mit Submikrometerauflösung mittels optischer Mikroskopie im sichtbaren Bereich erfassen können. In dieser Arbeit wird die Integration einer fluoreszierenden Temperatursensorschicht und resistiver Mikroheizelemente in mikrofluidische Reaktoren sowie deren Anwendung für die Temperaturregelung und -Überwachung während einer on-chip enzymatischen Umsetzung präsentiert. Der Herstellungsprozess beinhaltet nasschemisches Ätzen, Photolithographie, Softlithographie und Rakelbeschichtung. Diese multifunktionellen Chips ermöglichen sowohl Temperaturregelung als auch die mikroskopische Abbildung der lokalen Temperatur in mikrofluidischen Reaktoren, wodurch die Temperaturabhängigkeit chemischer und biologischer Reaktionen im Mikromaßstab untersucht werden kann. Dies wird anhand einer temperaturabhängigen tryptischen Spaltung coumarinmodifizierter Peptide, bei der ein fluoreszierendes Produkt entsteht, demonstriert.

Schlagwörter: Durchflussreaktor, Temperaturregelung, Mikrofluidik, fluoreszente Temperatursensoren, enzymatische Reaktion.

Einleitung

Mikrofluidische Durchflussreaktoren (Abb. 1) sind die Kolben und Schläuche des 21. Jahrhunderts. Sie ermöglichen höhere Reaktionsgeschwindigkeiten, eine verbesserte Kontrolle von Prozessparametern und eröffnen neue Synthesewege da sie das Verwenden von reaktiven Zwischenstufen ermöglichen. Auch können deutlich kleinere Mengen wertvoller Chemikalien und Biomaterialien für die Erforschung neuer Reaktionswege eingesetzt werden. Außerdem bieten miniaturisierte Plattformen mehr Sicherheit in Bezug auf giftige oder hochreaktive Verbindungen. Die „Lab on a chip“ (LOC) Technologie versucht, diese Leistungssteigerung (mehr Funktion auf kleinerem Raum) auf breite Bereiche der Chemie, wie die Synthese und Analyse, zu übertragen. Ziel ist die Eingliederung und Automatisierung aller Verfahrensschritte eines synthetischen und

anschließend analytischen Prozesses auf einem miniaturisierten Gerät, dem Mikrochip.

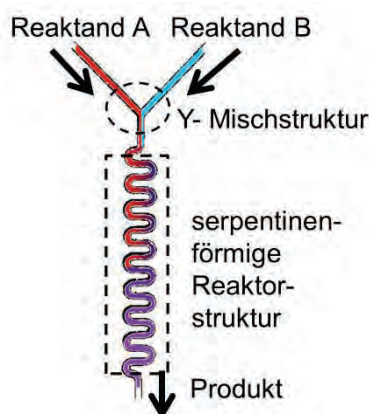


Abbildung 1: Beispielhaftes Design und Funktionsweise eines miniaturisierten Durchflussreaktors

Die Temperatur ist in vielen Bereichen der Natur und Technik von Bedeutung. Fast alle

physikalischen und chemischen Eigenschaften von Stoffen und fast jede chemische Reaktion ist temperaturabhängig. Im technischen Bereich ist die Temperatur ein wichtiger Zustandsparameter, von dem viele andere Größen und Prozesse abhängen. Um solche Prozesse optimal ablaufen zu lassen, muss die Temperatur in der Regel innerhalb enger Toleranzen eingestellt werden. Dies kann durch Heizungen bzw. Kühlaggregate geschehen, sofern geeignete Temperatursensoren zur Verfügung stehen, um einen Regelkreis zu realisieren. Es existieren heute eine Reihe unterschiedlicher Sensoren, die sich in Messsicherheit, Messbereich, Ansprechzeit, Handhabung und Preis unterscheiden und auf verschiedenen Messprinzipien, wie beispielsweise Widerstandsmessung, Thermoelektrizität und Messung von Infrarotstrahlung basieren. Viele dieser Methoden sind schlecht für die Implementierung in mikrofluidische Systeme geeignet. Sie lassen sich nur schlecht miniaturisieren und erlauben zudem größtenteils nur punktuelle Messungen. Einen vielversprechenden Ansatz bieten allerdings Verfahren, die sich auf die temperaturabhängige Lumineszenzlebensdauer bzw. -intensität lumineszierender Stoffe stützen.

Chipfabrikation und experimenteller Aufbau

In dieser Arbeit wird die kombinierte Integration einer fluoreszierenden Temperatursensorschicht und resistiver Mikroheizelemente in mikrofluidische Reaktor칩s sowie deren Anwendung für die Temperaturregelung und Überwachung während einer on-chip enzymatischen Reaktion präsentiert. Mit dieser Methode ist es möglich, die Temperatur des Prozessmediums im gesamten Mikrochip orts aufgelöst zu bestimmen. Der entwickelte Fertigungsprozess der mikrofluidischen Chips ist schematisch in Abb. 2 dargestellt.

Die Reaktorstruktur wurde mittels nasschemischen Ätzens in einen Glasträger eingebracht. Dafür wurde vorher photolithographisch eine Flußsäure(HF)-resistente Maske aufgebracht. Die so vorbereiteten Chips wurden nachfolgend in einer 13%igen gepufferten und mittels Magnetrührwerk durchmischten, HF-Lösung behandelt. Im nächsten Schritt wurde die temperatursensorische Schicht in die resultierenden Kanäle integriert. Dafür wurde die Beschichtungslösung (8 % Polyacrylonitril (PAN), in DMSO (w/w). Darin wurde dann 1 % Dichlorotris(1,10-phenanthrolin)-ruthenium(II)-hydrat ($\text{Ru}(\text{phe})_3$) (w/w) im Verhältnis zum PAN

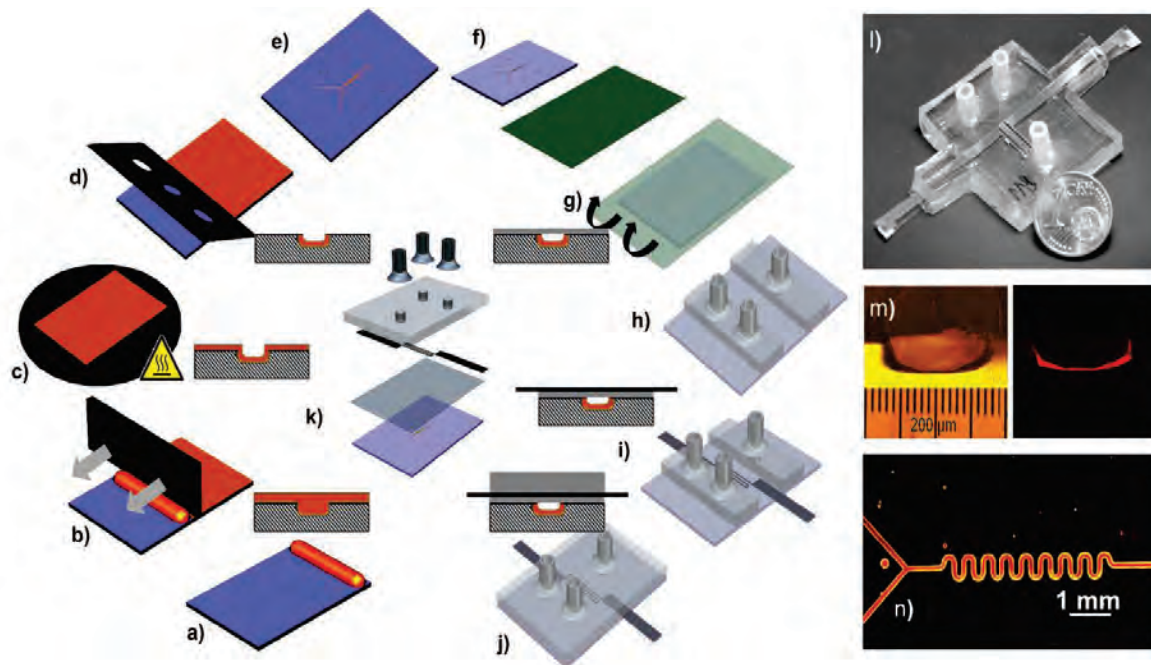


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses der Mikrochips mit integrierter Temperatursensorschicht und Mikroheizelementen; (a) Auftragen einer Beschichtungslösung auf die strukturierten Glasgrundkörper, (b) gleichmäßige Verteilung der Lösung mittels Rakeln, (c) Ausheizen der Sensorschicht, (d) Entfernen der Überstände mit Hilfe einer Rasierklinge, (e) strukturierter Glasträger mit integrierter Sensorschicht, (f-g), Aufbringen der PDMS-Deckschicht mittels Plasmabonding, (h) Aufbringen der Fluidikkontakte, (i-j) Implementierung der Mikroheizelemente, (k) Explosionsdarstellung eines fertigen Mikrochips, (l) Fotografie eines Mikrochips, (m) Fluoreszenzaufnahme des Kanalquerschnitts (20x Mikroskopobjektiv), (n) Fluoreszenzaufnahme der integrierten Sensorschicht (1x Mikroskopobjektiv)

gelöst) zunächst am Rande der geätzten Struktur aufgetragen (Abb. 2a) und mittels eines automatischen Rakels gleichmäßig auf der Oberfläche des mikrostrukturierten Glasträgers verteilt (Abb. 2b). Die beschichtete Glasplatte wurde dann sofort auf 70 °C für 10 min auf einer Heizplatte (Abb. 2c) erhitzt. Während dieses Vorgangs verdampft das Lösungsmittel, so dass eine dünne Schicht des Sensormaterials zurückbleibt.

Die Sensorschicht auf der Oberfläche des Glasträgers außerhalb der Kanäle wurde mit einer Rasierklinge (Abb. 2d) entfernt. Anschließend wurde eine PDMS Deckschicht (250 µm auf PET-Trägerfolie) mittels Plasmaverbindung aufgebracht (Abb. 2f-g). Vor dem Aufbringen der Fluidikanschlüsse (Abb. 2h) wurden mit Hilfe einer Nadel Zugangsöffnungen in die PDMS-Deckschicht eingebracht, um einen Zugang zur mikrofluidischen Reaktionsstruktur zu erhalten. Silbrenanopartikelbasierte Mikroheizelemente wurden per Tintenstrahldruck auf eine PET-Folie gedruckt, gesintert und in den Chip durch Eingießen mit PDMS implementiert (Abb. 2i-j). Mit diesem Verfahren zur Integration lumineszenter Sensorschichten wurde auch eine optische Sauerstoffsensorschicht in eine Mikroreaktorplattform implementiert und für die Echtzeitbeobachtung einer metallionen-katalysierten Oxidation genutzt.^[1]

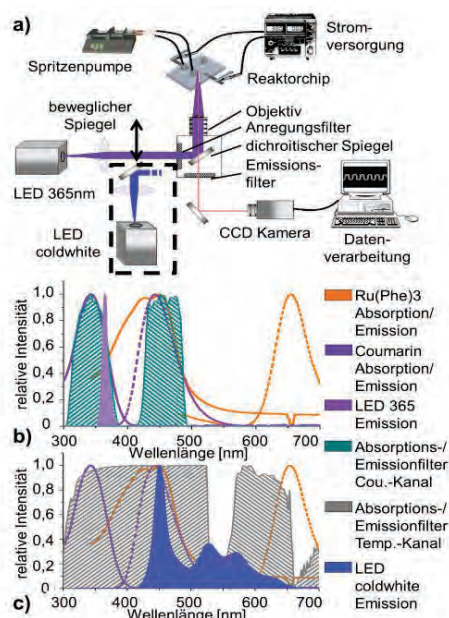


Abbildung 3: (a) Experimenteller Aufbau und spektrale Kanäle (b) von Coumarin 120 sowie (c) von Ru(phe)₃ in der Temperatursensorschicht

Die optischen Aufnahmen erfolgten an einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Abb. 3a) mit LED-Anregung und CCD-Kamera-Detektion. Die Temperatursensorschicht wurde bei

470 nm angeregt (LED coldwhite) und im gelben bis roten Spektralbereich detektiert (Abb. 3c), Reaktionsprodukte wurden mit einer 365 nm UV-LED angeregt und im blauen Spektralbereich detektiert (Abb. 3b).

Die Sensorschichtdicken wurden mittels taktiler Oberflächenprofilometrie mit Mikrochips ohne Deckelplatten (Abb. 2e) ermittelt.

Die temperatursensorische Schicht der Mikrochips wurde in einer dafür gefertigten Kammer, welche mit Hilfe eines Thermostaten temperiert wurde, über Fluoreszenzintensitätsmessungen kalibriert.

Ergebnisse

Die Sensorschichtdicke wurde mit Hilfe eines Oberflächenprofilometers untersucht. Es konnten reproduzierbar dünne, gleichmäßige Schichten des Sensormaterials in die geätzten Vertiefungen eingebracht werden. Die Schichtdicke kann dabei präzise über den PAN-Gehalt in der Beschichtungslösung (Abb. 4a) bzw. über die Anzahl der Beschichtungen (Abb. 4b) eingestellt werden.

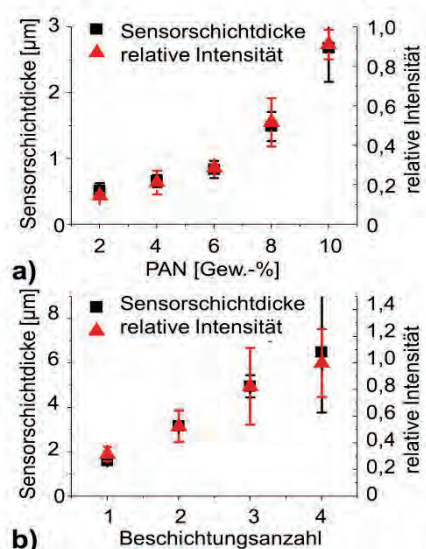


Abbildung 4: (a) Dicke der Sensorschicht in Abhängigkeit vom PAN-Anteil in der Beschichtungslösung, (b) Dicke der Sensorschicht abhängig von der Anzahl der Beschichtungen (8 Gew.-% PAN)

Zur Kalibration der temperatursensorischen Schicht wurden die Chips in einer Kammer fixiert und die Fluoreszenz in einem Temperaturbereich zwischen 25 °C und 70 °C gemessen. Die Fluoreszenzintensität der Sensorschicht zeigte eine lineare Abhängigkeit zur Temperatur mit einer Abnahme von ca. 1,6 % pro K (Abb. 5a). Die niedrigste nachweisbare Temperaturdifferenz mit diesem Aufbau beträgt 0,3 K.

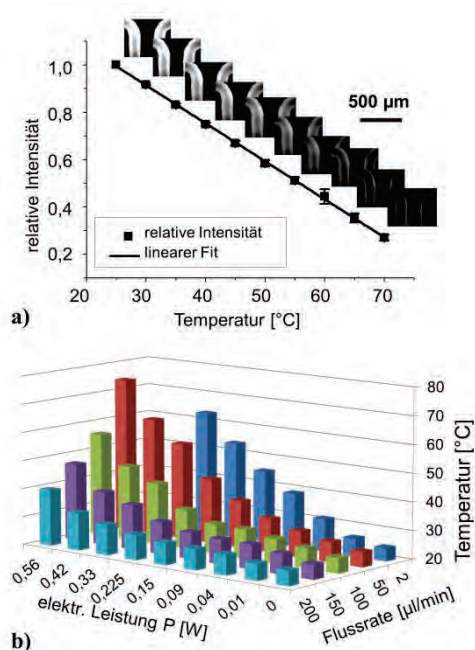


Abbildung 5: (a) Kalibrierkurve der Sensorschicht, (b) Temperatur im Mikroreaktorchip aufgetragen gegen die in die Heizstruktur eingebrachte elektrische Leistung bei verschiedenen Flussraten

Die durch die integrierten Mikroheizelemente erzeugte lokale Temperatur im Reaktor wurde bei verschiedenen Flussraten mit hydrodynamisch injiziertem PBS-Puffer (150 µM, pH 7,5) untersucht. Die Lumineszenzantwort der Sensorschicht wurde auf einer Fläche von 0,35 mm² aufgenommen und mit Hilfe der Kalibrationsdaten in ein Temperatursignal umgewandelt. Abb. 5b zeigt die resultierende Temperatur im Mikroreaktor in Abhängigkeit von der Flussrate und der in die

Mikroheizer eingebrachten elektrischen Energie. Wie zu erwarten, steigt die Wärmeübertragung auf die Flüssigkeit bei niedrigeren Strömungsgeschwindigkeiten und höheren elektrischen Leistungen die in das Heizelement eingebracht wurden.

Bei einer Flussrate von 2 µl/min, die auch für die folgenden enzymbasierten Experimente verwendet wurde, kann die Temperatur (T) als folgende Funktion (1) der eingebrachten elektrischen Leistung (P) betrachtet werden:

$$T [^{\circ}\text{C}] = (119,04 \pm 3,80) \cdot P [\text{W}] + (24,69 \pm 0,05) \quad (1)$$

Anschließend wurde die Temperaturabhängigkeit in einer Modellreaktion (tryptische Spaltung modifizierter Peptide) mit Hilfe dieser Reaktoren untersucht. Eine schematische Darstellung der enzymatischen Umwandlung, bei der das fluoreszierende Produkt Coumarin 120 entsteht, und des Mikrochiplayouts sind in Abbildung 6a dargestellt. In vorausgehenden Experimenten wurde festgestellt, dass das abgespaltene Fluorophor eine temperaturunabhängige Emission im verwendeten Temperaturbereich (Abweichungen < 0,8 %) aufweist.

Über einen der beiden Zuleitungs Kanäle wurde eine 0,5 mM Peptidlösung, über den anderen eine 20,8 µM Trypsinlösung (jeweils in 150 µM PBS-Puffer, pH = 7,5) in die Reaktorstruktur eingeleitet. Bei einer Flussrate von 2 µl/min konnte eine optimale Vermischung der beiden Lösungen erzielt werden. Die Reaktionsprodukte wurden auf einer Fläche von ca. 0,35 mm² nahe dem Auslass des Reaktors überwacht (Abb. 6c). Die Reaktion wurde

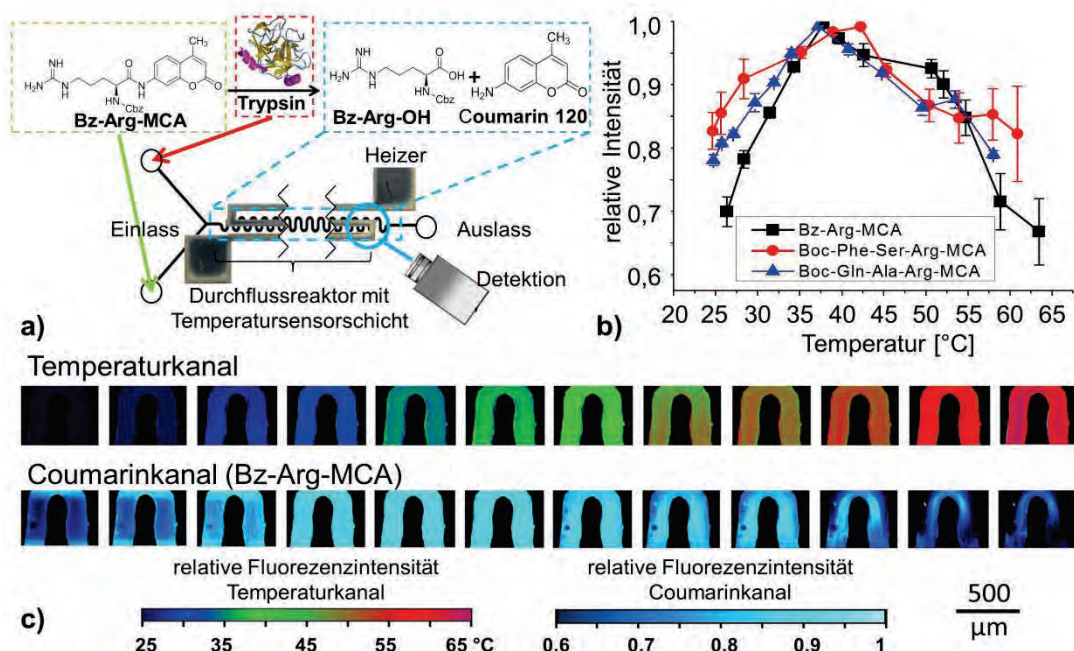


Abbildung 6: (a) Schematische Darstellung der enzymatischen Reaktion und des Mikrochiplayouts, (b) temperaturabhängige tryptische Spaltung verschiedener mit Coumarin-120 modifizierter Peptide, (c) Falschfarben-Fluoreszenzaufnahmen des Temperatur- und des Coumarinkanals.

kontinuierlich für drei Minuten aufgezeichnet, anschließend wurde die Temperatur schrittweise erhöht.

Mit diesem System wurden drei verschiedene Coumarin 120-markierte Peptide untersucht (Abb. 6b). Für alle drei Substrate konnte bei der Reaktion mit Trypsin eine Temperaturabhängigkeit nachgewiesen werden. Die Temperatur-Fluoreszenzintensitäts-Auftragungen zeigten einen ähnlichen Trend für die verschiedenen Substrate mit lokalen Maxima zwischen 37,2 °C und 42,2 °C. Für die Peptide Bz-Arg-MCA und Boc-Gln-Ala-Arg-MCA wurde ein maximaler Umsatz bei 37,8 °C bzw. 37,2 °C, für Boc-Phe-Ser-Arg-MCA bei 42,2 °C beobachtet.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnten funktionale Durchflussreaktormikrochips mit integrierten Mikroheizelementen und fluoreszierenden, temperatursensorischen Schichten erfolgreich entwickelt und zur Überwachung temperaturabhängiger enzymatischer Transformationen eingesetzt werden. Die Verwendung temperaturempfindlicher Luminophore, welche in einer für andere Stoffe undurchlässigen Matrix eingebettet sind, ist attraktiv, da die lokale Temperatur orts aufgelöst in Echtzeit mit Submikrometerauflösung mittels optischer Mikroskopie im sichtbaren Bereich bestimmt werden kann. Im Gegensatz zu vielen etablierten Methoden müssen keine Additive zugesetzt oder aufwendig komplizierte Elektronik integriert werden. Außerdem steht die Sensorschicht bei dem hier vorgestellten Verfahren in direktem Kontakt mit der Flüssigkeit im Mikroreaktor. Dadurch verfügen die entwickelten Mikrochips über ein großes Potential in vielfältigen Applikation wie beispielsweise bei PCR- oder ELISA-basierten Techniken oder organischen Mikrosynthesen.

Referenzen

- [1] L. Gittlin, C. Hoera, R. J. Meier, S. Nagl, D. Belder, *Lab Chip* 13, 4134–4141 (2013); DOI: 10.1039/c3lc50387a