

Integration fluoreszenter Mikrosensoren in mikrofluidische Elektrophoreseplattformen mittels Tintenstrahldruck und Photopolymerisation

C. Herzog¹, E. Beckert², S. Nagl¹

¹ Institut für Analytische Chemie, Universität Leipzig, Leipzig/ Deutschland,
nagl@chemie.uni-leipzig.de

² Fraunhofer-Institut für Angewandte Optik und Feinmechanik (IOF), Jena/ Deutschland

Kurzfassung:

In der vorliegenden Arbeit konnten optische, Chemosensoren erfolgreich in mikrofluidische Elektrophoreseplattformen integriert werden. Die Sensoren zeigen Änderungen von verschiedenen Umgebungsparametern wie pH-Wert, Temperatur oder Sauerstoffgehalt durch eine Veränderung ihrer Lumineszenzintensität in mikroelektrophoretischen Trennverfahren an. Diese Eigenschaften werden im Mikrochip zur Visualisierung von chemischen Spezies genutzt. Die Immobilisierung der verwendeten Indikatoren in mikrochipintegrierten Sensorschichten konnte ohne Verlust der optischen Eigenschaften durch kovalente Bindung oder Einbettung in polymere Netzwerke erreicht werden. Die Mikrofabrikation von Sensorstrukturen erfolgte zum einen mittels Tintenstrahldruck und zum anderen via Photopolymerisation. Somit können orts aufgelöst sowohl linienförmige Sensorstrukturen oder -arrays als auch planare Sensorschichten erzeugt werden. Die Integration von pH-Sensoren in mikrofluidische Chips für freiflussisoelektrische Fokussierung erlaubt die Echtzeitüberwachung des lokalen pH-Werts im Trennbett. Damit konnte die Quantifizierung des isoelektrischen Punkts verschiedener untersuchten Analyten realisiert werden. Zur Beobachtung von Elektrolysephänomenen bzw. der Joule'schen Wärmeentwicklung während der Elektrophorese wurden mikrochipintegrierte Sauerstoffsensoren bzw. Temperatursensoren entwickelt. Solche multifunktionellen mikrofluidischen Chips ermöglichen die Kombination von Trennverfahren mit integrierter Überwachung von Umgebungsparametern.

Schlüsselwörter: integrierte Mikrosensoren, mikrofluidische Freiflusselektrophorese, optische Chemosensoren, isoelektrische Fokussierung

Einleitung

Die Miniaturisierung chemischer Analysensysteme bietet einzigartige Vorteile wie höhere Effizienz, Sicherheit, Portabilität und Umweltfreundlichkeit. Die mikrofluidische Freiflusselektrophorese (μ FFE) ist eine milde Trennmethode für biologische und chemische Spezies und ermöglicht die kontinuierliche Auftrennung von Gemischen, auch im präparativen Maßstab. Jedoch müssen zur Verfolgung von Analyten und Umgebungsparametern meist externe Marker oder indirekte, *off-line* Methoden angewendet werden. Durch Integration von optischen, Chemosensoren in solche Systeme soll die *on-chip* Überwachung von mehreren Prozessparametern simultan zur Auftrennung ermöglichen. Dazu müssen allerdings die Sensormatrizen präzise, orts aufgelöst und mit

hoher Stabilität in funktionelle Mikrochipplattformen eingebracht werden, ohne dabei deren optische Eigenschaften zu verändern. In diesem Zusammenhang werden in dieser Arbeit Fabrikationsmethoden basierend auf Tintenstrahldruck und Photopolymerisation entwickelt (Abb. 1).

Mikrochipfabrikation

Die Herstellung der multifunktionellen Mikrochips basiert auf einer Kombination von Photolithographie und Tintenstrahldruck. Im ersten Schritt wird ein Temperatur- oder Sauerstoffindikator in einer polymeren Schicht immobilisiert. Dazu wird eine Lösung aus Metalloporphyrinen (z. B. Pd-TFPP) bzw. Rutheniumtrisphenantrolin in Oligoethylenglykoldiacryl und Photoinitiator auf einen Glaträger aufgebracht und unter UV-Licht auspolymerisiert (Abb. 1a).

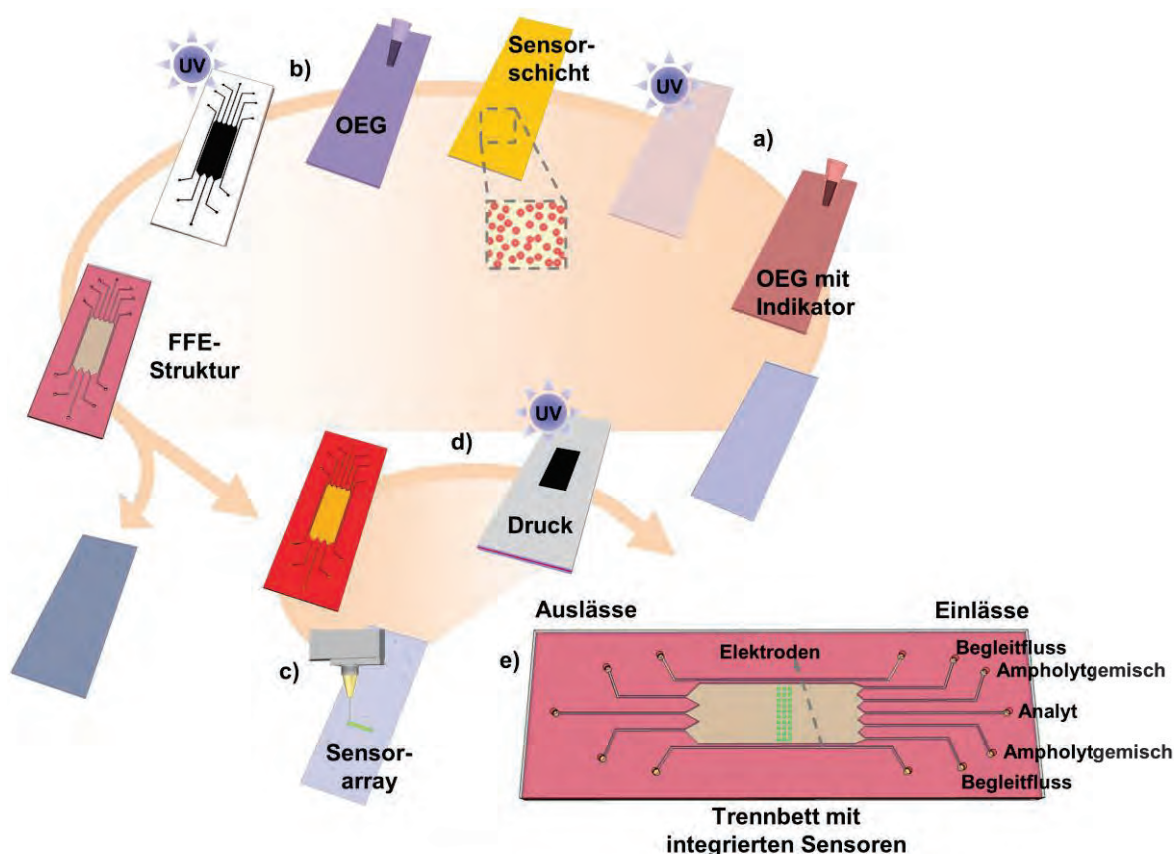


Abb. 1. Fertigungsprozess von μ FFE-Chips mit integrierten Mikrosensoren: (a) Photopolymerisation der Sensorschicht, (b) Photopolymerisation der μ FFE-Struktur, (c) Tintenstrahl-Druck von Sensorstrukturen, (d) Verbindung von bedruckter Deckelplatte mit der mikrofluidischen Struktur (e) komplettierter multifunktionaler Mikrochip.

In einem weiteren Schritt erfolgt die Fabrikation der mikrofluidischen Struktur aus Oligoethylenglykoldiacrylat mit Hilfe eines Photoinitiators und einer Photomaske unter UV-Belichtung (Abb. 1b). Als letzter Schritt erfolgt die Integration der mittels Tintenstrahl-Druck hergestellten Sensorstrukturen zur pH-Wert-Detektion (Abb. 1c). Dazu wird die bisherige Deckelplatte gegen einen vorbereiteten Glsträger mit dem Sensor ausgetauscht. Anschließend erfolgt erneut ein Photopolymerisationsschritt zum Verbinden der beiden Komponenten (Abb. 1d). Der Tintenstrahl-Druck erfolgt unter Nutzung eines automatisierten, piezoelektrischen Dosierventils. Hierbei wird eine Lösung bestehend aus einem pH-sensitiven Fluoresceinderivat und Polyhydroxyethylmethacrylat in einem Gemisch aus Ethanol und Wasser über eine Dosiernadel auf eine Glasoberfläche aufgebracht. Der gesamte Herstellungszyklus ist in Abb. 1 dargestellt.

Die beiden eingesetzten Techniken zur gezielten Generierung von chip-integrierten Mikrosensoren eröffnen vielfältige Applikationsmöglichkeiten.

Experimenteller Aufbau

Die Beobachtung und Detektion einer isoelektrischen Fokussierung der Analyten in einem multifunktionalen Mikrochip erfolgte an einem inversen Fluoreszenzmikroskop. Als Anregungslichtquelle wurde eine Quecksilberhochdruckdampfampe verwendet. Die verschiedenen spektralen Kanäle für die Lumineszenzanregung/-emission der untersuchten Analyten, des pH-Sensorarrays und sauerstoff- und temperatursensorischer Schichten. (Abb. 2) Die Detektion der Lumineszenzemission erfolgt mittels einer CCD-Kamera. Über die gewählten Indikatoren und Marker kann eine spektrale Separation erreicht und somit eine simultane Detektion der einzelnen Parameter realisiert werden.

Die mikrofluidische Struktur (Abb. 1e) eines Chips für die freiflussisoelektrische Fokussierung besteht aus einem Trennbett, einem Analyteinlass und je zwei Einlässen für Ampholytgemisch sowie Begleitströme. In der gewählten Struktur besitzt der Aufbau drei Auslässe, um die getrennten Analyten auch separiert aufzufangen. Weiterhin befinden sich neben dem Trennbett ein Anoden- und ein

Kathodenkanal mit entsprechenden Ein- und Auslässen, um das elektrische Feld einzukoppeln. Das Ampholytgemisch ermöglicht die Ausbildung eines pH-Gradienten im Trennbett und ist somit essentiell, um eine isoelektrische Fokussierung der Analyten zu erreichen.

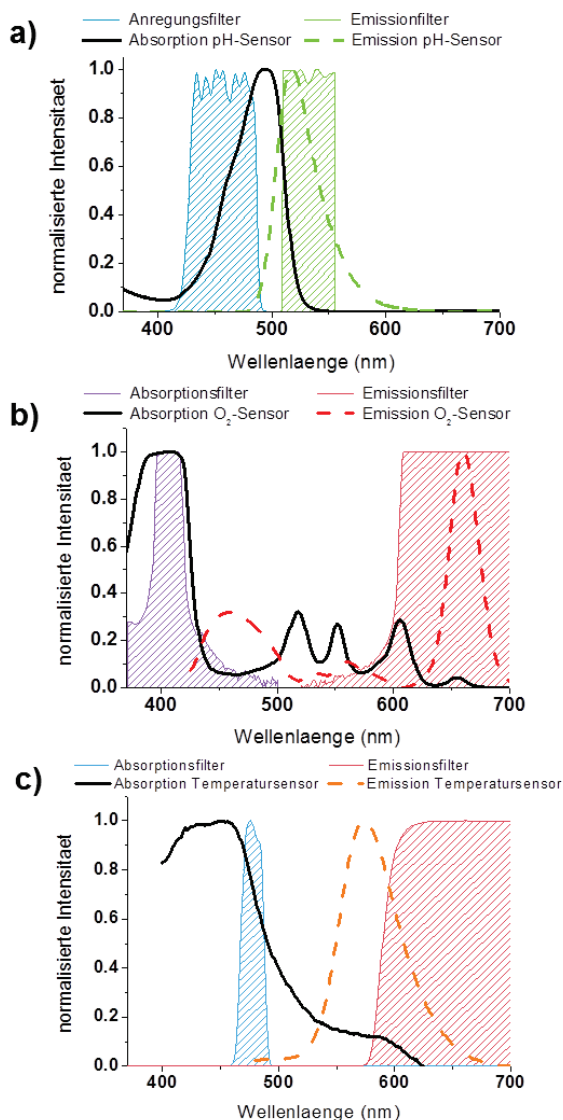


Abb. 2. Optisches Setup: Anregungs- und Emissionsspektren sowie durch Filter selektierte spektrale Kanäle der mikrochipintegrierten Sensoren. (a) pH-Sensoren, (b) Sauerstoffsensoren sowie (c) Temperatursensoren

Charakterisierung der Sensoren

Mittels Tintenstrahldruck konnten sowohl Sensorarrays als auch linienförmige pH-Sensorstrukturen aus verschiedenen Materialien generiert und nachfolgend in μ FEE-Chips integriert werden. Mit diesem Verfahren können Sensorstrukturen mit einer Höhe von 0,4 – 1,7 μ m, welche den Fluss im Trennbett nicht signifikant stören und gute Sensitivität für pH-Änderungen aufweisen, erzeugt werden

(Abb. 2a). Das Verfahren ermöglicht die Immobilisierung der Indikatoren und die Integration von Sensorstrukturen in Mikrochips ohne den Verlust der Eigenschaften des pH-sensitiven Farbstoffes. Dies wird anhand der Kalibrationskurve in Abb. 3 deutlich. Die Fluoreszenzintensität der Marker zeigt sowohl vor als auch nach der Integration in einen mikrofluidischen Chip eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert (Abb. 3).

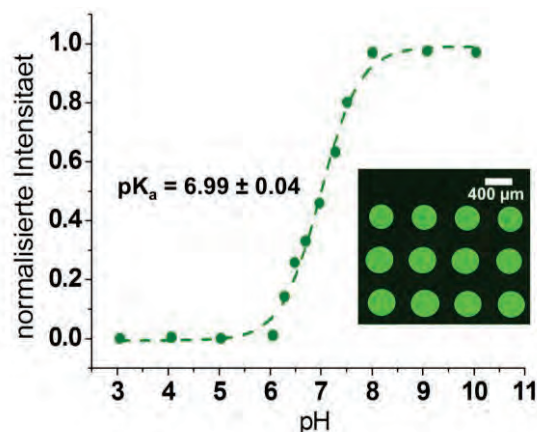


Abb. 3. pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz eines mittels Tintenstrahldruck hergestellten chipintegrierten pH-Mikrosensors (Fluoresceinisothiocyanat kovalant gebunden an Polyhydroxyethylmethacrylat), rechts: Falschfarbenfluoreszenzbild eines Ausschnitts des Sensorarrays)

Weiterhin weist ein solcher Sensor ein schnelles Ansprechen auf eine Änderung des lokalen pH-Werts von wenigen Sekunden bis Sekundenbruchteilen auf. Die Ansprechzeit t_{95} beträgt für die Änderung von basisch (Britton Robinson Puffer (BRP), pH 10) zu sauer (BRP pH 3) $0,27 \pm 0,06$ s und $1,62 \pm 0,19$ s von sauer zu basisch. Dies erlaubt die pH-Beobachtung im Chip ohne nennenswerte Verzögerung.

Flächige Temperatur- und Sauerstoffsensoren können mittels Photopolymerisation von entsprechenden Indikatoren in acrylierten Oligoethylenglykolen (OEG) hergestellt werden (Abb. 1a).

Die Abhängigkeit der Lumineszenzintensität eines Sauerstoffsensors basierend auf einem Metalloporphyrin wurde untersucht und konnte mittels eines *two-site-model-fits* ausgewertet werden (Abb. 4). Die Nachweisgrenze (LOD_{99} : 1% der Ausgangsphosphoreszenz gelöscht) konnte mit 0,0772 g/L O_2 ermittelt werden, was auf eine gute Sensitivität des Mikrosensors hinweist. Diese Sensorschichten sollen die Untersuchung der Elektrolyse während einer freifluss-elektrophoretischen Trennung ermöglichen.

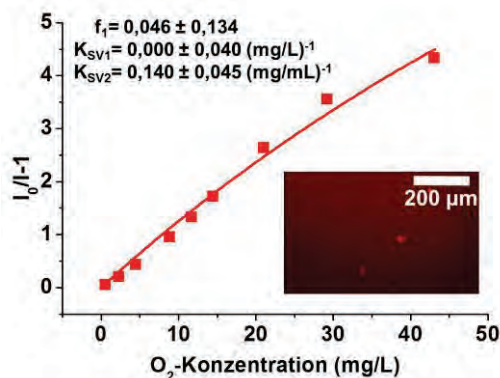


Fig. 4. Sauerstoffsensitivität einer photopolymerisierten Schicht von Palladium meso-tetrapentafluorophenylporphyrin in Oligoethylenglykoldiacrylat (Ausschnitt: Falschfarbenfluoreszenzbild der Schicht)

Ein Temperatursensor konnte ebenfalls erfolgreich als Schicht generiert werden. Dazu wurde der Indikator (Ruthenium-tris-1,10-phenanthrolin) durch Umhüllung mit Polyacrylnitril (PAN) in nanopartikuläre Form gebracht. Dies minimiert Kreuzsensitivitäten durch Sauerstoff. Die Nanopartikel wurden, wie im Kapitel Mikrochipfabrikation beschrieben, in einem Oligomer photopolymerisiert. Aus dem unten dargestellten Diagramm (Abb. 5) und einem ermittelten LOD_{99} von $0,89\text{ }^{\circ}\text{C}$ wird die prägnante Temperaturabhängigkeit der Lumineszenzintensität des Indikators mit steigender Temperatur deutlich. Die Integration eines solchen Sensors in miniaturisierte Elektrophoreseplattformen ermöglicht das Monitoring der Joule'schen Wärmeentwicklung, welche die analytische Stofftrennung während der Elektrophorese negativ beeinflusst.

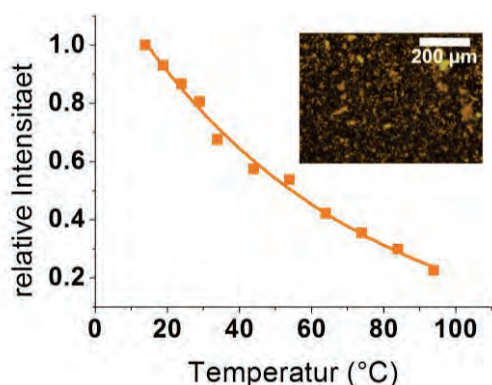


Abb. 5. Temperatursensitivität einer photopolymerisierten Schicht von Ruthenium-tris-1,10-phenanthrolin in PAN in Oligoethylenglykoldiacrylat (Ausschnitt: Falschfarbenfluoreszenzbild der Schicht)

Isoelektrische Fokussierung

Die generierten mikrofluidischen Freifluss-elektrophorese-Plattformen mit sensorischer Funktion wurden zur isoelektrischen

Fokussierung (IEF) von Proteinen verwendet. Die Proteine können im Mikromaßstab anhand ihres isoelektrischen Punkts (IP) aufgetrennt und der IP mittels des chip-integrierten pH-Sensors online quantifiziert werden (Abb. 6). Hier wurden die mit Chromeo P503 markierten Proteine Rinderserumalbumin (BSA), Conalbumin und Chymotrypsin aufgetrennt und ihre IPs in einem anderen Spektralbereich mithilfe des integrierten pH Sensorarrays erfasst. Es ergaben sich IP von 5,17 für BSA; 5,99 für Conalbumin und 7,71 für Chymotrypsin mit nur geringen Abweichungen von maximal 0,59 zu den aus der Literatur bekannten Werten.

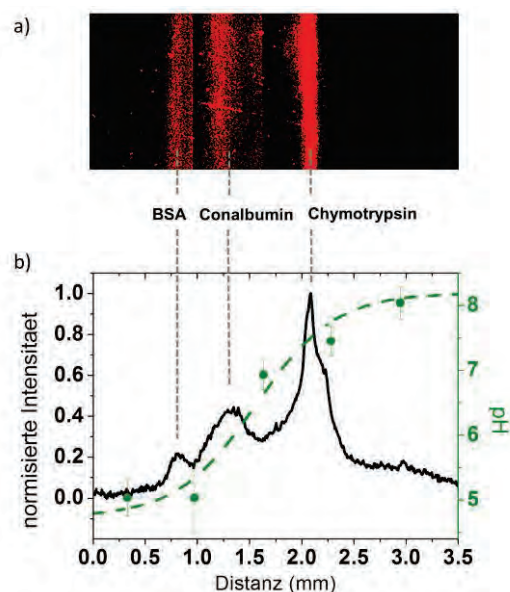


Abb. 6. a) Falschfarbenfluoreszenzbild der freifluss-isoelektrischen Fokussierung von fluoreszenzmarkierten Proteinen in einem multifunktionalen Mikrochip mit integrierter pH Überwachung. b) Darstellung der Trennung (schwarz) sowie dem von einem pH-Sensorarray angezeigten pH-Gradienten (grün).

Zusammenfassung

Die Integration von Sensorstrukturen in mikrofluidische Elektrophoresechips konnte durch zwei verschiedenen Methoden gezeigt werden. Zum einen ist mittels Tintenstrahl Druck gelungen, eine orts aufgelöste Immobilisierung eines pH-Sensors im Mikrochip gelungen. Darüber hinaus konnte auch die Generierung von Sensorschichten für Temperatur- und Sauerstoffmonitoring mittels Photopolymerisation realisiert werden.

Diese mikrochipintegrierten Sensoren erlauben eine räumlich aufgelöste Echtzeitüberwachung von analytisch bedeutsamen Prozessparametern und sollen zur Überwachung sowie Optimierung von miniaturisierten elektrophoretischen Trennprozessen verwendet werden.