

# Großes Tropfen in kleinen Kanälen

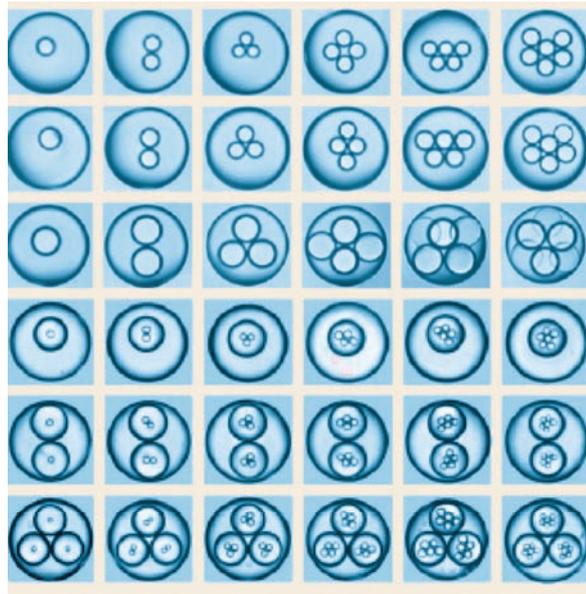
Die Mikrofluidik bietet großes Potenzial für Industrie und biologische Anwendungen.

Christian Holtze

Tropfende Wasserhähne können einen zur Weißglut bringen. Doch nach dem gleichen Prinzip, nach dem sich einzelne Tropfen vom Wasserhahn lösen, lassen sich Tropfen in neuartigen Emulgierv Verfahren erzeugen. Dank Mikrometerkleiner Kanäle ist es dabei möglich, Tröpfchen gleicher Größe gezielt herzustellen, sie mit Substanzen zu befüllen, in anderen Tropfen einzuschließen oder sie miteinander zu verschmelzen. Bislang kommen diese Techniken vorwiegend in der Grundlagenforschung zum Einsatz, doch gibt es erste Ansätze, sie in der Biotechnologie und Kosmetikindustrie kommerziell zu nutzen.

Seit jeher sind Emulsionen wichtig für den Menschen: Schon Babys wissen die Muttermilch zu schätzen, noch lange bevor sie Geschmack an Butter und Käse und als Erwachsene an Getränken wie Ouzo finden und in zunehmendem Alter mit Cremes gegen Fältchen vorgehen. Auch wirtschaftlich sind Emulsionen bedeutsam, vom Pflanzenschutz über die Lederveredelung und Papierchemie bis zur Kunststoffherstellung. Stets handelt es sich um Tröpfchen einer Flüssigkeit (z. B. eines Öls) in einer damit nicht mischbaren anderen (z. B. Wasser). Kleine Emulsionströpfchen entstehen durch Scherung – sei es durch Schütteln einer Vinaigrette oder durch die Hochdruckhomogenisierung von Milch. Die so hergestellten Tröpfchen haben jedoch stets eine breite Größenverteilung. Erst in den letzten Jahren sind Methoden entwickelt worden, mit denen sich exakt gleich große („monodisperse“) Tröpfchen herstellen lassen. Dazu ist es erforderlich, die einzelnen Flüssigphasen in Kanälen mit Durchmessern von weniger als 100 µm gezielt zusammenzuführen. Diese Technik bezeichnet man als mikrofluidische Emulgierung.

Monodisperse Tröpfchen können als Vorläufer für monodisperse, feste Partikel dienen, die z. B. als Abstandhalter zwischen zwei Scheiben in Flüssigkristallanzeigen zum Einsatz kommen. Sie könnten auch für Medikamente interessant sein: Tröpfchen und Partikel, die in die Blutbahn gespritzt werden, dürfen nur wenige Mikrometer klein sein, da sie sonst kleine Blutgefäße verstopfen können. Da sich monodisperse Emulsionen mikrofluidisch bislang nur in kleinen Mengen herstellen lassen, findet Forschung dazu überwiegend im Grundlagenbereich statt. Seit einigen Jahren gibt es Start-up-Unternehmen, die diese Tech-



aus [1]

Die herausragende Kontrolle der mikrofluidischen Emulgierung erlaubt es, Tröpfchen in exakter Zahl und Größe in anderen Tröpfchen einzuschließen.

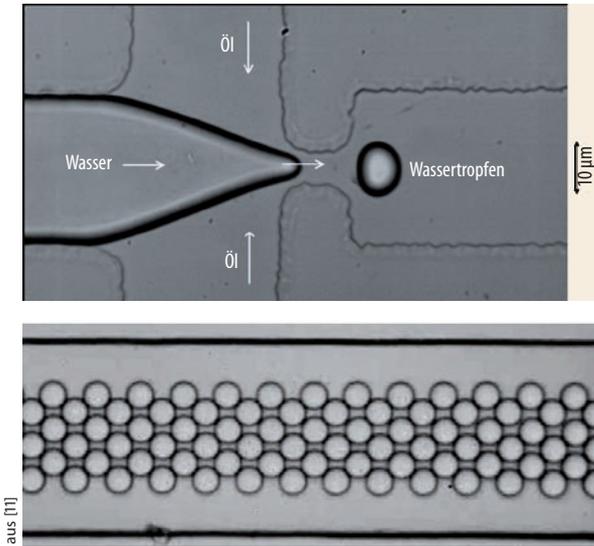
nologie kommerziell nutzen wollen. Sie konzentrieren sich vor allem auf Gebiete mit großer Wertschöpfung, wie die Pharmabranche, Kosmetik und Biotechnologie.

Wie aber entstehen die monodispersen Tröpfchen? In Mikrokanälen herrschen besondere Strömungsbedingungen: Im Gegensatz zum Fördern und Mischen von Flüssigkeiten im großen Maßstab treten dort keine Verwirbelungen und Turbulenzen auf. Unabhängig davon, ob der Kanalquerschnitt rund oder eckig ist, gibt es allein aufgrund der Abmessungen des Kanals keine konvektive Vermischung senkrecht zur Strömungsrichtung, die Strömung ist laminar. Daher sind die Bedingungen bei der Bildung jedes Tropfens gleich, was die exakt einheitliche Tröpfchengröße ermöglicht.

## KOMPAKT

- In Mikrokanälen lassen sich dank der besonderen Strömungsbedingungen in sehr großer Zahl gleich große Tropfen herstellen.
- Dazu führt man zwei nicht mischbare Flüssigkeiten, z. B. Öl und Wasser, in einen Auslasskanal. Aufgrund der Grenzflächenspannung reißt der Wasserstrahl ab, sodass Tropfen entstehen, die von Öl umgeben sind.
- Durch mehrfache Emulgierung bilden sich Tropfen innerhalb von Tropfen. Sie sind für die Verkapselung reizvoll, bislang industriell aber nicht von großer Bedeutung.
- In den Tropfen lassen sich auch Zellen oder DNA-Sequenzen einschließen, um diese gezielt zu untersuchen.

Dr. Christian Holtze, BASF SE, GVC/F-J550, 67056 Ludwigshafen



**Abb. 1** Werden Wasser und Öl im Gleichstrom in den Auslasskanal geführt, so reißt der Wasserstrom ab (oben). Dabei entstehen Wassertropfchen gleicher Größe (unten).

1) Rayleigh und Plateau haben bereits vor über 130 Jahren beschrieben, wie eine nach ihnen benannte Instabilität zum Aufbruch eines Wasserstrahls in Tröpfchen führt. Dafür sind die unterschiedlichen Krümmungsradien der Grenzfläche in Strömungsrichtung und senkrecht dazu verantwortlich.

Damit Tröpfchen entstehen können, müssen zwei miteinander nicht mischbare Flüssigkeiten zusammenfließen. In Mikrokanälen führt man dazu Wasser und Öl aus unterschiedlichen Behältern im Gleichstrom in einen Auslasskanal (**Abb. 1**). An der Verengung im Mikrokanal reißt der Wasserstrom in Tropfen auf. Das Öl spült die Wassertropfen einen nach dem anderen in den Auslasskanal [1–3]. Strömt das Wasser langsam, reißen die Tröpfchen direkt am Ausgang des Wasserkanals ab (**Abb. 2**). Bei höherer Geschwindigkeit bildet sich ein Wasserstrahl, der erst im Auslasskanal in Tröpfchen aufreißt – ähnlich wie beim Wasserstrahl eines Gartenschlauchs.

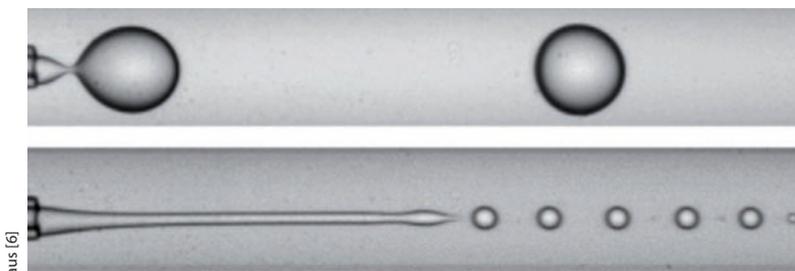
Treibende Kraft für das Aufreißen eines kontinuierlichen Wasserstroms in einzelne Tröpfchen ist die Grenzflächenspannung zwischen Wasser und Öl: Da Wasser und Öl sich nicht mögen, ist es thermodynamisch günstig, die Grenzfläche zwischen den beiden Phasen so klein wie möglich zu halten. Die Grenzfläche von vielen kugelförmigen Tröpfchen ist kleiner als die eines langen, zylindrischen Wasserstrahls, der von Öl umgeben ist. Der Radius des zylindrischen Wasserstrahls ist deutlich kleiner als derjenige der Tröpfchen (**Abb. 2**).<sup>1)</sup> Unabhängig davon, ob im Badezimmer, im Garten oder in Mikrokanälen – in allen Fällen sind die physikalischen Prinzipien gleich. In Mikrokanälen bilden sich die mit Abstand kleinsten Tröpfchen. Überdies steigt die Geschwindigkeit, mit der die Tröpfchen abreißen, erheblich an, je kleiner der Durchmesser der Tröpfchen ist. Pro Sekunde können sich so 1000 bis

100 000 mikrometerkleine Tröpfchen bilden, was sich nur mit Hochgeschwindigkeitskameras unter dem Mikroskop beobachten lässt.

### Die Grenzfläche macht's

Die Wassertropfchen und das umgebende Öl sind als Wasser-in-Öl- oder als inverse Emulsion bekannt. Tauscht man Wasser und Öl im Mikrokanalsystem gegeneinander aus, entstehen die viel weiter verbreiteten Öl-in-Wasser- oder direkten Emulsionen. Entscheidend für ihre Herstellung sind häufig die Benetzungseigenschaften der Mikrokanalwände: Nur wenn die kontinuierliche Phase – das ist in **Abb. 1** die Ölphase, die die Tröpfchen umgibt – bevorzugt die Wände benetzt, entstehen Emulsionen. Andernfalls zerfließen die Wassertropfchen an der Wand und strömen neben dem Öl durch den Kanal. Die Benetzbarkeit lässt sich vorübergehend durch Plasmabehandlung oder Adsorption von Tensiden einstellen bzw. permanent durch chemische Anbindung von Molekülen mit geeigneter Polarität. Sogar Glasschichten kann man an den Mikrokanalwänden abscheiden (**Abb. 3**) [4]. Dazu wird in den Kanälen mittels eines sog. Sol-Gel-Verfahrens Siliziumdioxid erzeugt, das die Benetzbarkeit der Kanäle für Wasser einstellt und sie chemisch widerstandsfähig gegen Lösungsmittel macht. Die Oberflächeneigenschaften der Mikrokanäle sind weniger wichtig, wenn die Tröpfchen von allen Seiten von der kontinuierlichen Phase umgeben sind und nicht mit den Wänden in Kontakt kommen. Dies lässt sich in mikrofluidischen Kanalsystemen erreichen, die aus Glaskapillaren gebaut sind [1].

Für die Anwendung müssen Tröpfchen stabil sein und dürfen beim Zusammenstoß nicht miteinander verschmelzen. Diese sog. Koaleszenz ist getrieben durch das Bestreben des Systems, die Grenzfläche zwischen Öl und Wasser zu verringern und so in einen thermodynamisch günstigeren Zustand zu gelangen. Geeignete Tenside – also Moleküle, die sich an der Grenzfläche zwischen Wasser und Öl anlagern und eine abstoßende Wechselwirkung zwischen den Tröpfchen hervorrufen – verhindern Koaleszenz [5]. Im Gegensatz zu herkömmlichen industriellen Verfahren bewegen sich die Tröpfchen bei der mikrofluidischen Emulgierung eines nach dem anderen durch den Ausflusskanal, sodass sie für eine relativ lange Zeit nicht zusammenstoßen. Dadurch können auch solche Tenside zum Einsatz kommen, die in herkömmlichen Emulgierv Verfahren nicht schnell genug an der Grenzfläche adsorbieren würden, um die Koaleszenz zu verhindern.



**Abb. 2** Je nach Strömungsgeschwindigkeit der Phasen reißt der Tropfen wie bei einem tropfenden Wasserhahn im Tropfenregime (dripping, oben) oder im Strahlregime (jetting, unten) ab.

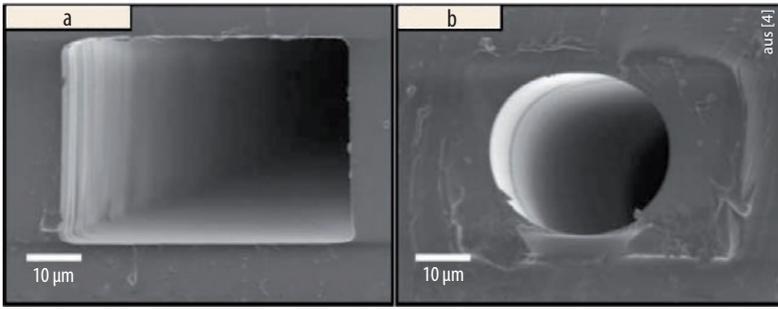


Abb. 3 Mikrokanalwandungen (a) lassen sich mit einer Glasschicht überziehen (b). Diese kann man hydrophob oder hydrophil funktionalisieren, was wichtig ist für die Herstellung von Wasser-in-Öl-, Öl-in-Wasser- und mehrfachen Emulsionen.

### Tropfen im Tropfen

Die mikrofluidische Emulgierung bietet eine hervorragende Kontrolle über die Tröpfchenbildung und erlaubt es, komplexe Tröpfchen zu erzeugen: doppelte (Abb. 4a) oder mehrfache Emulsionen (Abb. auf S. 43). Das sind einzelne oder mehrere Wassertröpfchen in größeren Öltröpfchen, die ihrerseits in einer kontinuierlichen Wasserphase emulgiert sind. Doppelte Emulsionen sind für die Mikroverkapselung interessant, da die inneren Wassertröpfchen durch einen Ölfilm von der äußeren Wasserphase getrennt sind. Mikrokapseln bieten gegenüber großen Kapseln den Vorteil, dass sie sich gut in flüssige und fließfähige Produkte einarbeiten lassen. In vielen Bereichen kann es einen erheblichen Mehrwert schaffen, bestimmte Stoffe zu verkapseln und später freizusetzen: So ließen sich medizinische oder Pflanzenschutz-Wirkstoffe gezielt oder über lange Zeit gleichmäßig freisetzen. Empfindliche Nahrungszusatzstoffe und Zellkulturen (z. B. im Joghurt) wären geschützt, bis der Verbraucher sie zu sich nimmt. Im Zement könnten Mikrokapseln eine beschleunigte oder verbesserte Aushärtung bewirken.

Für die mikrofluidische Doppel- und Mehrfachemulgierung stellt man zunächst eine Wasser-in-Öl-Emulsion her (Abb. 4) [1, 6]. Das innere Wassertröpfchen bleibt in der Folge unverändert; die umgebende Ölphase wird in der kontinuierlichen Wasserphase emulgiert. Dieses Verfahren ist sehr gut reproduzierbar: Die inneren Wassertröpfchen sind exakt gleich groß und gleich weit voneinander entfernt. Dadurch erreichen sie die zweite Emulgierereinheit in immer gleichen Zeitabständen. Da diese ebenfalls nach einheitlichen Zeitabständen Öltröpfchen erzeugt, können doppelte Emulsionen mit immer genau einem inneren Tröpfchen entstehen. Voraussetzung ist, dass die beiden Emulgierereinheiten genau aufeinander abgestimmt sind. Dieser Prozess funktioniert besonders zuverlässig, da der innere Wassertropfen den Abriss des äußeren Öltröpfchens an der

zweiten Emulgierereinheit beeinflusst. Das ermöglicht sehr dünne Ölschalen. Stellt man die Verhältnisse der Strömungsgeschwindigkeiten geeignet ein, so kann der Ölfilm auch erst nach jedem zweiten, dritten oder vierten inneren Tröpfchen abreißen. Es bilden sich mehrfache Emulsionen, deren Tröpfchengröße von den Strömungsgeschwindigkeiten abhängt (Abb. auf S. 43) [1, 6]. Den gleichen Prinzipien folgend können auch Tröpfchen im Tröpfchen hergestellt werden (Abb. 4) [7]. Praktisch dürfte doppelten Emulsionen für die Mikroverkapselung der größte Nutzen zukommen.

Ein Vorteil der Emulgierung in Mikrokanälen liegt in der sehr geringen Scherung. Bei herkömmlichen Doppelemulgierungsmethoden werden zunächst bei sehr großer Scherung die inneren Wassertröpfchen im Öl und dann bei schwächerer Scherung die Öltröpfchen in der kontinuierlichen Wasserphase emulgiert. Im zweiten Schritt können die bereits hergestellten Wassertröpfchen mit der kontinuierlichen Wasserphase verschmelzen. Im Gegensatz dazu bleiben bei der mikrofluidischen Emulgierung bei geeigneter Wahl der Einsatzstoffe alle Kern-Schale-Tröpfchen intakt. Die innere und äußere Wasserphase können unterschiedlich zusammengesetzt sein, weil sie aus verschiedenen Reservoirs stammen. Das Verfahren bietet dadurch eine hundertprozentige Verkapselungseffizienz.

### Viel tropft viel

Die mikrofluidische Emulgierung bietet viele Vorteile bei der Kontrolle über Tröpfchengröße und -architektur. Da es sich aber um eine Mikrotechnologie handelt, sind die herstellbaren Mengen in einem Kanal mit wenigen bis einigen hundert Mikrolitern pro Stunde winzig – ein bis heute ungelöstes Problem bei der technischen Nutzung des Verfahrens für die Produktion von Emulsionen. Da der Kanaldurchmesser maßgeb-



Abb. 4 Für doppelte Emulsionen (a) wird zunächst eine Wasser-in-Öl-Emulsion hergestellt (links, mit langgezogenen Tröpfchen), die in einer kontinuierlichen

Wasser-Phase emulgiert wird. So entstehen Wassertröpfchen, die von einer Ölschale umgeben sind. Durch wiederholte Emulgierung von doppelten Emulsi-

onen in jeweils mit der äußersten Schale unmischbaren Flüssigkeiten sind sogar Fünffachemulsionen möglich (b).

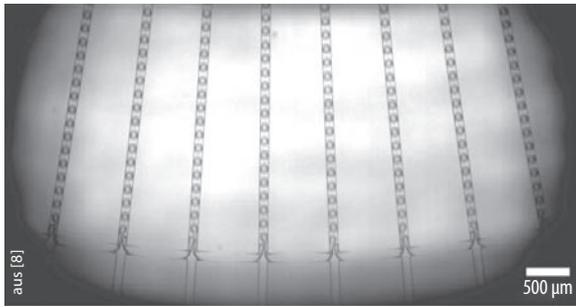


Abb. 5 Zahlreiche parallel angeordnete Mikrokanäle ermöglichen deutlich größere Produktmengen.

lich die Tröpfchengröße beeinflusst, kann man ihn nicht einfach vergrößern, um die Produktivität zu steigern. Somit bleibt für größere Emulsionsmengen lediglich die Parallelisierung von Mikrokanälen, das sog. „Numbering up“. Ein Apparat speist dazu eine Vielzahl von Kanälen aus gemeinsamen Reservoirs [8]. Dadurch ist für jede eingesetzte Phase genau eine Pumpe erforderlich. Direkte oder inverse Emulsionen lassen sich mit zwei Pumpen herstellen, eine für Wasser und eine für Öl (Abb. 5). Hierbei sind bis zu 128 Mikrokanäle kreisförmig angeordnet und produzieren gleichzeitig Emulsionströpfchen. Die Mikrokanäle in dieser Arbeit wurden mittels weicher Lithographie produziert – ein in diesem Feld weit verbreitetes Druckverfahren, das es erlaubt, in kürzester Zeit komplexe Mikrokanalsysteme in Silikongummi herzustellen.<sup>2)</sup>

Die parallelen Kanäle lassen sich auch gitterförmig anordnen [9]. Abhängig von der Tröpfchengröße können jedoch auch solche Apparaturen nur Produktmengen von bis zu 100 Millilitern pro Stunde produzieren, was noch weit von den 1000 Tonnen entfernt ist, die jährlich im industriellen Maßstab bei Emulsionsprodukten üblich sind.

### Labor im Tropfen

Viel Aufsehen hat die Anwendung mikrofluidisch emulgierter Wassertröpfchen in Ölen für biologische Experimente erregt. Die Tröpfchen dienen hierbei als miniaturisierte Reagenzgläser, Mikrotiterplatten oder Agar-Substrate<sup>3)</sup>, um Zellen zu züchten und zu selektieren oder um Versuche *in vitro* an DNA oder Proteinen auszuführen. Dabei sind üblicherweise die für den Versuch benötigten Substanzen im Tröpfchen eingeschlossen. Nach einer bestimmten Inkubationszeit lassen sich die Tröpfchen analysieren und sortieren [10] oder mit anderen Tröpfchen verschmelzen, um nachträglich Reagenzien zuzuführen [11]. Die Zahl der durchführbaren Experimente ist gewaltig, denn sie berechnet sich aus der Tröpfchenerzeugungsrate, die im Bereich von 1000 pro Sekunde liegt, und der Dauer des Versuches. Dieser Ansatz dürfte die ultimative Miniaturisierung von Experimenten darstellen, die bei Volumina im Bereich von Pikolitern selbst bei großen Versuchszahlen mit geringen Mengen der oft teuren Einsatzstoffe auskommen. Überdies ist es möglich, die geringen Stoffmen-

gen, welche die einzelnen Zellen oder DNA-Sequenzen im Verlauf des Experimentes erzeugen, nachzuweisen: Da sie im Tröpfchen eingeschlossen sind, reicht ihre Konzentration im kleinen Tröpfchenvolumen für die Detektion aus. Da sich diese Substanzen im selben Tröpfchen befinden wie die Zellen oder DNA-Sequenzen, lassen sie sich überdies diesen direkt zuordnen.

Im Gegensatz zu Versuchen, die direkt in Mikrokanälen ablaufen, enthalten die Wassertröpfchen alle interessierenden Substanzen in ihrem Inneren. Dadurch berühren diese nicht die Mikrokanalwände und können daran nicht haften bleiben. So ist eine Kreuzkontamination zwischen aufeinanderfolgenden Versuchen im selben Kanal ausgeschlossen. Zudem bewegen sich die Wassertröpfchen als Einheit durch die Mikrokanäle. Dies unterdrückt die Rückvermischung, die bei laminarer Strömung einphasiger Flüssigkeiten in Mikrokanälen problematisch ist.

Als kontinuierliche Phase dienen häufig perfluorierte Trägeröle. Sie mischen sich weder mit polaren, in der Wasserphase gelösten noch mit unpolaren, fettlöslichen Substanzen und bilden somit eine gute Barriere für die Diffusion biologischer Substanzen von einem Tröpfchen in ein anderes. Dies verhindert die Kreuzkontamination. Perfluorierte Öle sind ungiftig, nicht reaktiv und bieten unterschiedlichen Gasen sehr gute Löslichkeit. Daher kann Sauerstoff, den die meisten Zellen zum Leben brauchen, in die Tröpfchen diffundieren. Solche Öle sind überdies kompatibel mit dem Silikongummi, aus dem die für biologische Experimente üblicherweise verwendeten mikrofluidischen Anlagen bestehen.

Geeignete Tenside erlauben es, die Tröpfchen sogar bei den harschen Bedingungen von Temperaturzyklen für die Polymerase-Kettenreaktion zu stabilisieren [5]. Sie halten die Tröpfchen über lange Zeit stabil gegen Koaleszenz – sogar, wenn die Tröpfchen während der Inkubation außerhalb von mikrofluidischen Anlagen dicht aneinandergedrängt sind, weil sie wegen ihrer

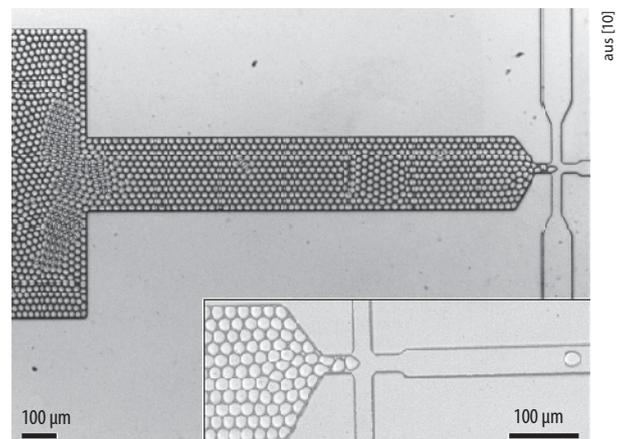


Abb. 6 Tröpfchen, die außerhalb des mikrofluidischen Chips inkubiert wurden, steigen zur Oberfläche auf und sind durch wenig Öl voneinander getrennt. Injiziert man solche konzentrierten Emulsionen in einen mikrofluidischen Chip und führt von beiden Seiten Öl zu, so spült es die Tröpfchen in gleichmäßigem Abstand in den Mikrokanal. Dadurch sind tröpfchengenau weitere Prozessschritte in mikrofluidischen Anlagen möglich.

2) vgl. T. Pohl und S. Herminghaus, Physik Journal, Januar 2003, S. 35

3) Auf einer Mikrotiterplatte befinden sich zahlreiche voneinander isolierte Gefäße, in denen sich z. B. Zellen in großer Zahl kultivieren und testen lassen. Agar-Substrate sind mit Gelen ausgegossene Petrischalen, in denen Zellkulturen gezüchtet werden. Die Zellen ernähren sich von Nährstoffen, die in den Gelen enthalten sind.

geringeren Dichte zur Oberfläche der perfluorierten Ölphase aufsteigen (Abb. 6). Gleichzeitig stellen die Tenside sicher, dass biologische Moleküle nicht durch Adsorption an der Grenzfläche ihre Aktivität verlieren und dass Zellen nicht mit den Tröpfchengrenzflächen wechselwirken.

## Zielgerichtet entwickelt

In mikrofluidischen Kanalsystemen lassen sich viele Funktionen integrieren, die unterschiedliche Prozessschritte erlauben. So können ganze Experimente auf einem mikrofluidischen Chip<sup>4)</sup> stattfinden. Dabei ist für den Chip eine mitunter aufwändige Infrastruktur erforderlich, die Pumpen, Flüssigkeitsbehälter, Mikroskope und oft Laser, Fluoreszenzdetektoren, Generatoren von elektrischen Feldern, Steuerungscomputer etc. einschließt. Ein Beispiel eines solchen Systems ist die gerichtete Evolution einzelner DNA-Sequenzen [12].

Ziel der gerichteten Evolution ist es, diejenigen DNA-Sequenzen zu selektieren, die besonders wünschenswerte Erbinformationen enthalten. Das kann z. B. eine große enzymatische Aktivität von Proteinen sein, die durch die entsprechende Sequenz kodiert ist. Enzyme sind dem Endverbraucher aus Waschmitteln bekannt. Die Industrie strebt danach, ihre Selektivität, Aktivität, Robustheit und Lebensdauer zu verbessern.

Für eine künstliche (*in vitro*) Evolution betrachtet man nicht das ganze Genom einer Zelle, sondern nur einen kleinen Abschnitt daraus, der z. B. ein spezielles Enzym kodiert. Aus dieser Ursprungssequenz werden durch Vervielfältigung und Mutation viele DNA-Sequenzen erzeugt, die sich zwar ähneln, aber doch unterschiedlich sind – eine Sequenz-Bibliothek. Die Sequenzen dieser Bibliothek werden einzeln in Tröpfchen eingeschlossen. Bei geeigneter Verdünnung geschieht dies statistisch – viele Tröpfchen enthalten gar keine DNA-Sequenzen, einige Tröpfchen eine Sequenz und sehr wenige Tröpfchen mehrere DNA-Sequenzen. Doch DNA-Sequenzen selbst sind nicht als Enzyme wirksam – sie sind lediglich der Bauplan für Proteine, die enzymatisch aktiv sind. Daher ist es in der künstlichen Evolution nötig, mit den DNA-Sequenzen zusammen eine geeignete Mischung von Reagenzien für den Proteinbau im Tröpfchen einzuschließen.

Nach der Tröpfchenbildung werden im zweiten Prozessschritt die eingeschlossenen Substanzen durch Verengungen im Mikrokanal, die kleiner sind als der Tropfendurchmesser und welche die Tropfen förmlich „kneten“, durchmischt. Im dritten Schritt gelangen die Tröpfchen in einen ersten Inkubationsraum, wo sie verbleiben, bis die Übertragung der DNA-Sequenzen in Proteine abgeschlossen ist. Der Inkubationsraum ist geeignet temperiert und befindet sich auf dem Chip oder in einem Gefäß außerhalb der Anlage. In einem vierten Schritt führt man Substrate zu, die bei enzymatischer Aktivität der Proteine chemisch umgesetzt werden und ein detektierbares Signal hervorrufen. Dies kann genau kontrolliert innerhalb des mikrofluidischen Kanalsys-

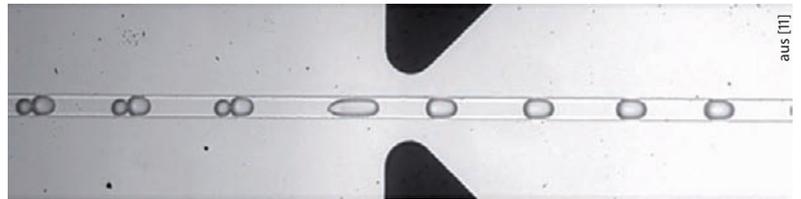


Abb. 7 Zwei Tröpfchen können mithilfe elektrischer Wechselfelder miteinander verschmolzen werden. Die dunklen Bereiche zu beiden Seiten des Kanals sind die Elektroden.

tems geschehen, indem man die Tröpfchen gezielt mit jeweils einem substrathaltigen Tröpfchen zur Koaleszenz bringt (Abb. 7). Das Substrat wird in einem erneuten Inkubationsschritt umgesetzt. Im Verlauf oder am Ende der Inkubation lässt sich die Produktkonzentration und somit die Güte der Enzyme bestimmen. Wenn fluoreszente oder fluorogene Substrate verwendet oder stark gefärbte Chemikalien verbraucht oder gebildet werden, lassen diese sich optisch nachweisen. Abhängig von der Signalintensität ist es nun möglich, die besten Sequenzen auszusortieren. Dazu verarbeitet ein Computer die optischen Signale für jedes Tröpfchen, das am Detektor vorbeiströmt, und steuert elektrische Felder so, dass die „guten“ Tröpfchen in einen Kanal gelangen und die „schlechten“ in einen anderen (Abb. 8). Die guten DNA-Sequenzen lassen sich vervielfältigen und nach erneuter Mutation einer zweiten Runde der gerichteten Evolution zuführen.

4) Ein mikrofluidischer Chip wird meist mit Druck- oder Ätzverfahren aus durchsichtigen Materialien (Silikon-gummi, Glas oder Plexiglas) hergestellt. Er enthält alle für einen Versuch notwendigen mikrofluidischen Kanäle, Tröpfchengeneratoren, Elektroden etc. Typische Chips sind einige Zentimeter breit und lang und einen halben Zentimeter dick. Auf der Oberseite oder am Rand befestigte Schläuche führen Flüssigkeiten zu.

## Zellen in Untersuchungshaft

Für die Untersuchung von lebenden Zellen (*in vivo*) bietet die Mikrofluidik anders nicht realisierbare Möglichkeiten [10, 13]. Durch Einschluss einzelner Zellen in Tröpfchen schafft man Mikro-Reagenzgläser, mit denen es erstmals möglich ist, Zellen vergleichend zu untersuchen. Um sehr viele Zellen gleichzeitig zu be-

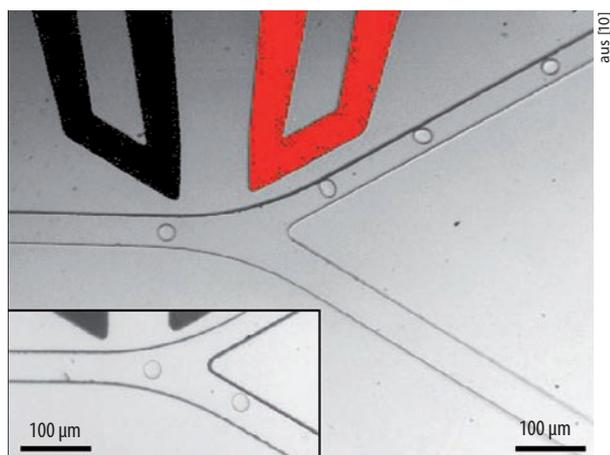


Abb. 8 Elektrische Felder erlauben es, Tröpfchen gezielt und sogar bei Frequenzen im Bereich von Kilohertz in unterschiedliche Auslasskanäle zu dirigieren. Ohne elektrisches Feld bewegen sich alle Tröpfchen in den unteren Ast (siehe Inset), da dort der Strömungswiderstand geringer ist als im oberen. Bei Anlegen eines Feldes werden sie zur Elektrode hingezogen und fließen in den oberen Ast, da die Dielektrizitätskonstante der Tröpfchen größer ist als die der umgebenden Ölphase.

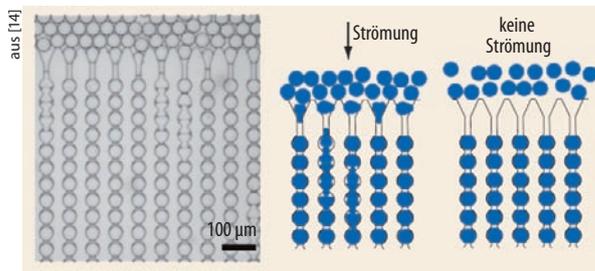


Abb. 9 Tropfen, die in Kanälen mit Erweiterungen positioniert sind, lassen sich über lange Zeiträume beobachten. Sie sortieren sich nach Abschalten der Strömung von selbst so, dass in jeder Kanalerweiterung exakt ein Tropfen sitzt.

obachten, stehen nahezu alle nötigen Prozessschritte bereit:

- Um die Entwicklung von bestimmten Zellen auf dem Chip über lange Zeiträume zu untersuchen, ist es sinnvoll, die Tropfen in bestimmten Positionen zu fixieren. (Abb. 9) [14]. Bei geeigneter Dimensionierung der Kanalerweiterungen ordnen sich die Tropfen automatisch so an, dass eines in jeder Kanalerweiterung sitzt. Ihre Oberflächenspannung hält sie über die gesamte Versuchsdauer in der jeweiligen Position.

- Die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff auf dem Chip gewährleistet ein Versorgungskanal, den eine dünne Membran aus Silikongummi von dem Kanal trennt, der die Tropfen und Zellen enthält. Sauerstoff diffundiert durch die Membran und den Ölfilm hindurch in die Tropfen, CO<sub>2</sub> wird in der gleichen Weise abgeführt.

- Reagenzien lassen sich den inkubierten Tropfen zuführen, indem man Tropfen mit geeignetem Inhalt gezielt mit diesen verschmilzt. Eine elegante Methode ist es, die im gleichen Abstand hintereinander schwimmenden Tropfen eines Kanals zu verwenden, um damit aus einem seitwärts einmündenden Kanal Tropfen abzureißen. Diese bewegen sich in direktem Kontakt mit den inkubierten Tropfen durch den Kanal. In einem zweiten Schritt sorgen elektrische Wechselfelder dafür, dass die Tropfen verschmelzen (Abb. 7).

- Sollen besonders viele Tropfen lange inkubiert werden, kann es sinnvoll sein, die Tropfen mit den darin eingeschlossenen Zellen in separaten Gefäßen zu sammeln. Anschließend werden sie wieder in mikrofluidische Chips injiziert, um sie tröpfchengenau zu analysieren. Für die Reinjektion kommen die nach der Inkubation dicht gepackten Tropfen zum Einsatz. Passieren sie einen trichterförmigen Kanal, so sorgt eine zusätzliche Ölphase von beiden Seiten des Kanals für einen gleichmäßigen, frei wählbaren Abstand zwischen den Tropfen (Abb. 6) [10]. Das ermöglicht ihre weitere mikrofluidische Prozessierung, z. B. um die Tropfen zu analysieren oder nach Fluoreszenzsignal zu sortieren.

Ein besonderer Vorteil dieser biologischen Experimente ist, dass alle im Verlauf des Versuches erzeugten und verbrauchten Chemikalien im Tropfen eingeschlossen sind. Daher kann man diese Stoffe und ihre Konzentration genau der Zelle zuordnen, die sie

erzeugt hat. Ebenso sind die DNA-Sequenz, die von ihr kodierten Proteine und die optisch detektierbaren Reaktionsprodukte im gleichen Tropfen enthalten. Damit ist eine eindeutige Zuordnung des Messsignals zum Protein und zur kodierenden DNA-Sequenz möglich.

Die Mikrofluidik und die Möglichkeiten, einzelne Tropfen auf mikrofluidischen Chips zu prozessieren, erlauben eine zuvor unerreichte Miniaturisierung biologischer Experimente. Auf dem Mikrochip lassen sich in großer Geschwindigkeit und mit großer Empfindlichkeit Experimente *in vitro* und *in vivo* ausführen.

## Der lange Weg zum Markt

Dank der besonderen Strömungsbedingungen in Mikrokanälen lassen sich Emulsionstropfen mit extrem enger Größenverteilung und in komplexer Architektur herstellen. Zahlreiche parallele Kanäle erhöhen die Produktivität dieses Verfahrens, auch wenn der industrielle Maßstab noch in weiter Ferne liegt. Gegenwärtig nutzen überwiegend Start-up-Unternehmen die mikrofluidische Emulgierung. Da dies üblicherweise der erste Schritt von der akademischen Forschung zur kommerziellen Anwendung ist, steht zu erwarten, dass sich die Technologie im Laufe der nächsten Jahre am Markt etablieren und in der Kosmetik-, Pharma- und Nahrungsmittelindustrie sowie in der Biotechnologie neue Standards setzen wird.

### Literatur

- [1] L.-Y. Chu et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 8970 (2007)
- [2] D. R. Link, S. L. Anna, D. A. Weitz und H. A. Stone, *Phys. Rev. Lett.* **92**, 054503 (2004)
- [3] A. S. Utada et al., *MRS Bulletin* **32**, 702 (2007)
- [4] A. R. Abate et al., *Lab Chip* **8**, 516 (2008)
- [5] C. Holtze et al., *Lab Chip* **8**, 1632 (2008)
- [6] R. K. Shaha et al., *Materials Today* **11**, 18 (2008)
- [7] A. R. Abate und D. A. Weitz, *Small* **5**, 2030 (2009)
- [8] T. Nisisako und T. Torii, *Lab Chip* **8**, 287 (2008)
- [9] G. Tetradis-Meris et al., *Ind. Eng. Chem. Res.* **48** (19), 8881 (2009)
- [10] J.-C. Baret et al., *Lab Chip* **9**, 1817 (2009)
- [11] [www.seas.harvard.edu/weitzlab/index.html](http://www.seas.harvard.edu/weitzlab/index.html)
- [12] A. D. Griffiths und D. S. Tawfik, *Embo J* **22**, 24 (2003)
- [13] J. Clausell-Tormos et al., *Chemistry & Biology* **15**, 427 (2008)
- [14] C. H. J. Schmitz, A. C. Rowat, S. Köster und D. A. Weitz, *Lab Chip* **9**, 1 (2009)

### DER AUTOR

**Christian Holtze** (FV Chemische Physik und Polymerphysik und FV Oberflächenphysik) studierte Chemieingenieurwesen an der TU Berlin und promovierte 2005 am MPI für Kolloid- und Grenzflächenforschung (Potsdam) über Mini-Emulsionen. Nach einer mehrmonatigen Gastdozentur in Rumänien entdeckte er während eines fast zweijährigen Aufenthaltes an der School of Engineering and Applied Sciences in Harvard seine Leidenschaft für die Mikrofluidik. Seit 2007 ist er als Forscher bei der BASF angestellt und befasst sich dort mit Dispersionen jeder Art. In seiner Freizeit musiziert, reist und radelt er gern.

