

Kleine Volumenströme in der Medizintechnik

Workshop

Kombination von miniaturisierter Frei-Fluss-Elektrophorese und Spektroskopie

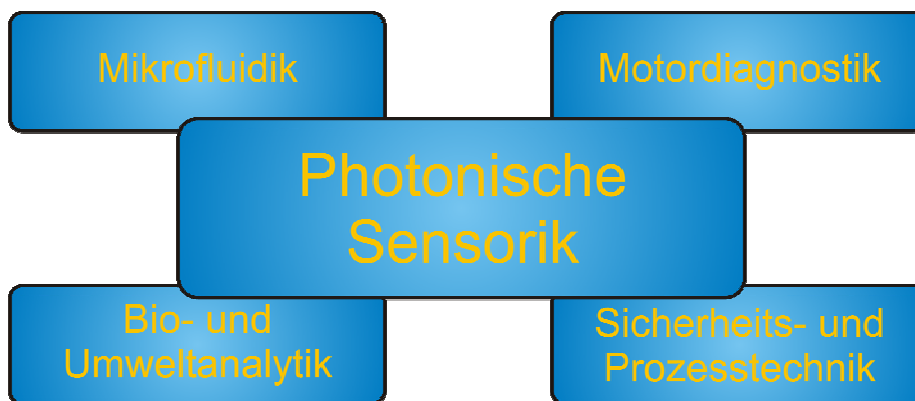
Fachhochschule Lübeck
16.06.2010

Hainer Wackerbarth

Laser-Laboratorium Göttingen e.V.
Hans-Adolf-Krebs Weg 1
D-37077 Göttingen



Forschungsfelder



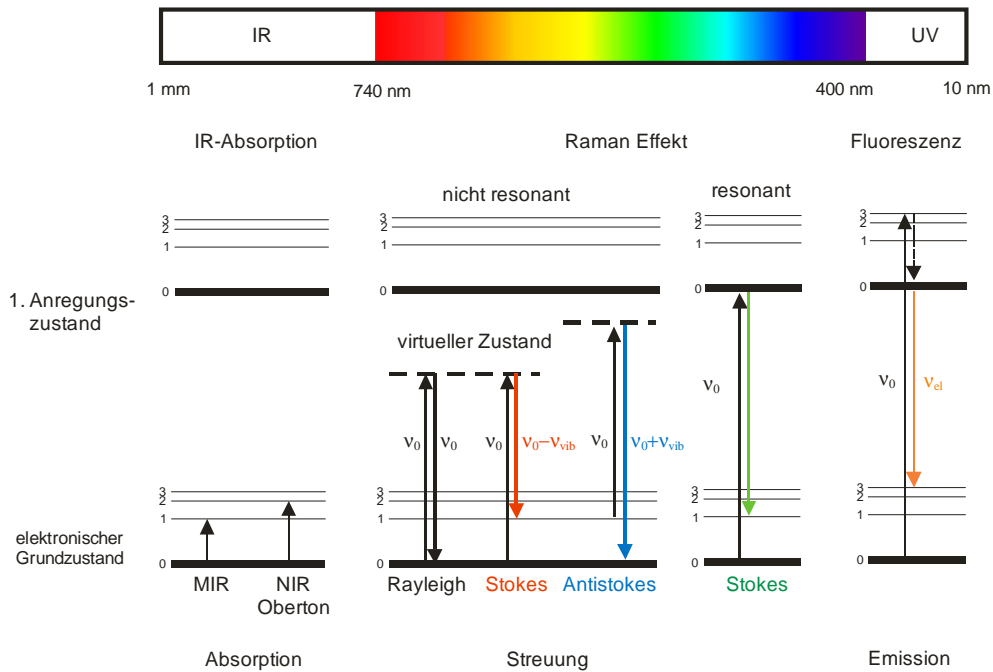
Zielsetzung der Abteilung:

- Entwicklung innovativer optischer Mess- und Analyseverfahren für technologische Applikationen

Aktuelle Mitarbeiterzahl: 13

- Technologietransfer in Form von Dienstleistungen (Auftragsuntersuchungen für die Industrie)

Optische Spektroskopie

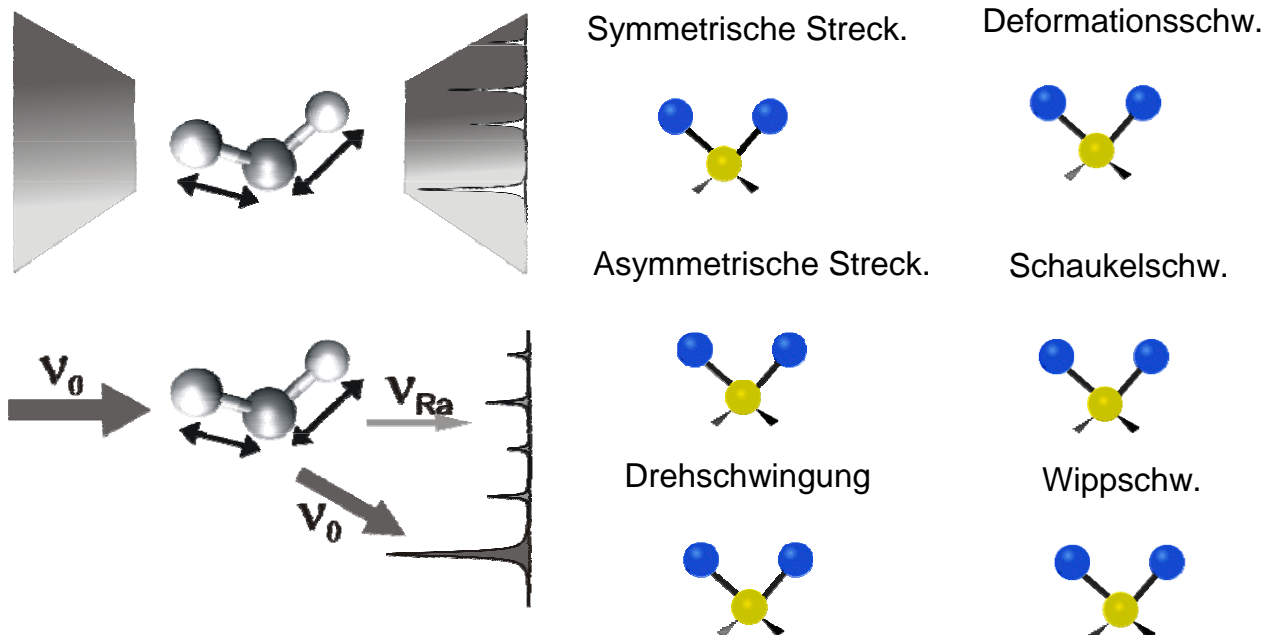


16.06.2010

Hainer Wackerbarth, Workshop FH Lübeck

3

Molekulare Schwingungen



16.06.2010

Hainer Wackerbarth, Workshop FH Lübeck

4

BMBF-Projekt Neuartige Analyse- und Prozessüberwachungstechnologie mit Querschnittcharakter

Laser-
Laboratorium
Göttingen e.V.



Probenentnahme vor Ort

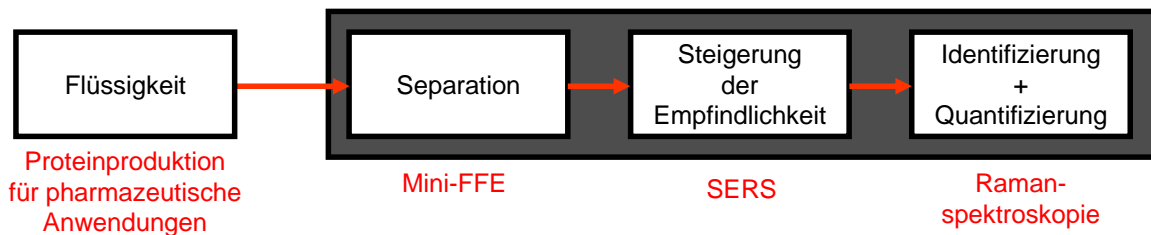
Stand der Technik: Analyse mit *Offline*-Verfahren



Analyse im Labor:

- Chromatographie (GC, HPLC)
- Massenspektrometrie
- Immunoassay (ELISA, RIA)

Online-Analyse-Überwachungssystem



16.06.2010

Hainer Wackerbarth, Workshop FH Lübeck

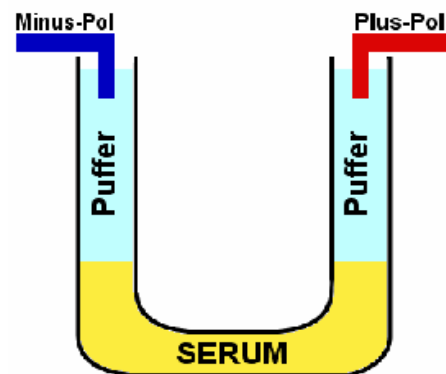
5

Miniaturisierte Frei-Fluss Elektrophorese

Laser-
Laboratorium
Göttingen e.V.

Trägerfreie Elektrophorese

- ▶ Erste trägerfreie (Flüssigkeiten ohne Trägermaterial) Elektrophorese in den 30er Jahren durch Arne Tiselius (Nobelpreis Chemie 1948)
- ▶ Auftrennung menschlichen Serums in 4 Hauptkomponenten (Albumin, α -, β -, γ -Globuline)
- ▶ Prinzip von elektrophoretischen Trennungen: Transport von Ionen in einer Lösung unter Einfluss einer elektrischen Feldes
- ▶ Aus dem Serum wandern Proteine ihrer Ladung entsprechend in den Puffer hinein
- ▶ Wanderung lässt sich mit einem durch das Glasrohr durchtretenden Lichtstrahl beobachten (Proteine verändern die Lichtbrechung)



www.med4you.at

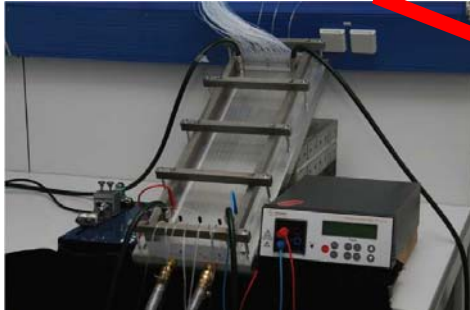
16.06.2010

Hainer Wackerbarth, Workshop FH Lübeck

6

Voruntersuchungen am LLG

Makro-FFE (Eigenbau)



Übertragung der Erkenntnisse
von Makro- in Mini-FFE



Beispieltrennung
in Mini-FFE



Miniaturisierte Frei-Fluss Elektrophorese

Vorteile von miniaturisierter Frei-Fluss-Elektrophorese im Gegensatz zu groß-skaliger Frei-Fluss-Elektrophorese

- ▶ Es werden nur geringe Proben- und Puffermengen benötigt (nl - μ l) → preisgünstig, ermöglicht Untersuchung von medizinischen Proben, die oft nur in geringen Mengen vorhanden sind
- ▶ Erheblich verkürzte Analysezeit und verbesserte Trenneffizienz
- ▶ Verhinderung von „Joule heating“ durch eine geringere Stromstärke und ein größeres Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis → keine zusätzliche Kühlvorrichtung nötig

Herausforderung

- ▶ Verhinderung vom Eintritt von Gasblasen in den Separationsraum, die während der Elektrolyse an den Elektroden entstehen

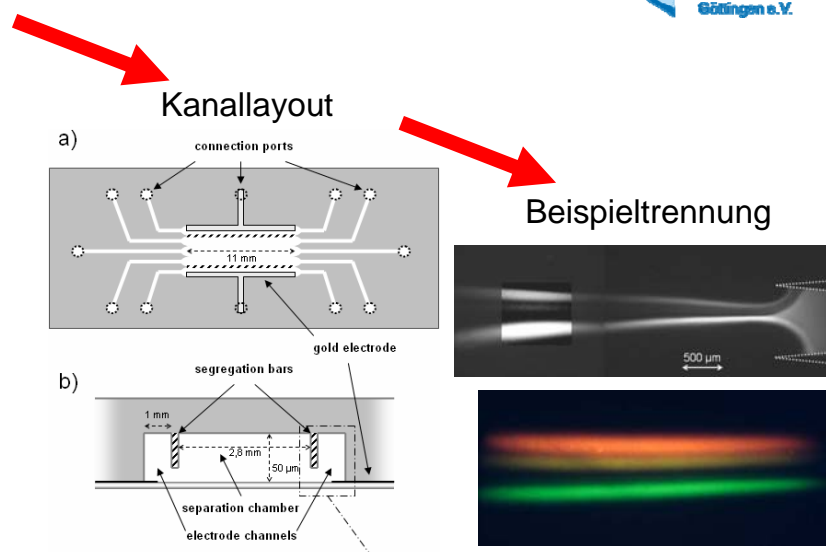
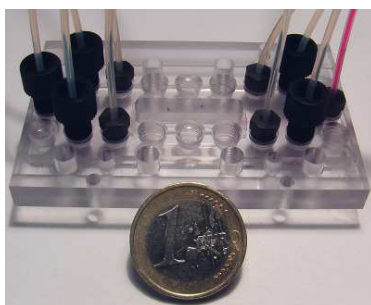
Anforderungen Chip-Architektur

- ▶ E-Feld senkrecht zu einem dünnen druckgetriebenen Träger-Elektrolyt-Fluss zwischen zwei nicht leitenden Platten
- ▶ Integration von Elektroden
- ▶ Verhinderung des Eindringens der Blasen in Separationsraum (Trennsteg vs. Membran)

µFFE-Herstellungsverfahren

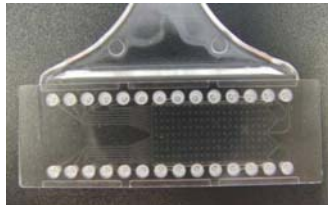
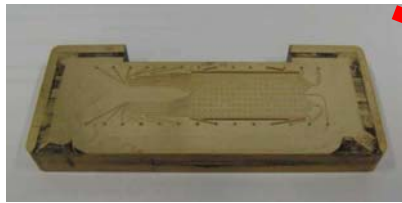
- ▶ Basierend auf MicCell Plattformtechnologie (GeSim)
- ▶ Abformtechnik (microfluidic ChipShop)
- ▶ Multilaminationstechnik (LLG)

Basierend auf MicCell Plattformtechnologie (GeSim)

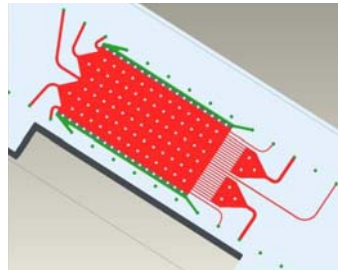


- ▶ Trennsteg
- ▶ PDMS-Au-Kontaktfitting
- ▶ Material PDMS (Abformtechnik) auf Glas ohne Sauerstoffplasma
- ▶ Grundkörper Polycarbonat

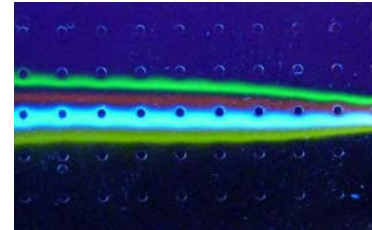
Spritzguss



Kanallayout

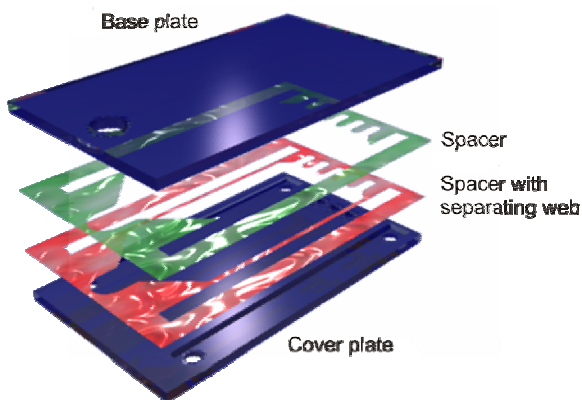


Beispieltrennung

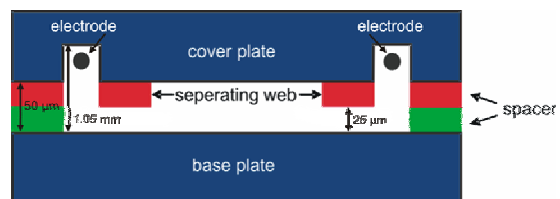


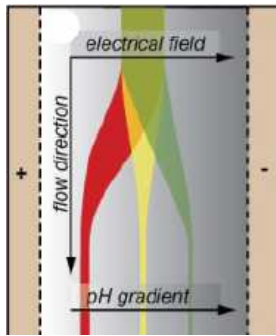
- ▶ Trennsteg oder Schattenmasken und Metallisierung (IOF)
⇒ Trennsteg kommerziell sinnvollere Lösung
- ▶ Stützstrukturen im Trennbett
- ▶ Material Cyclo-Olefin-Polymer oder Polycarbonat

Multilaminationstechnik mit Transferklebebändern

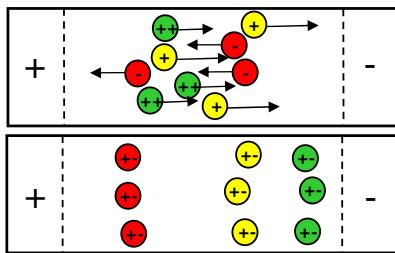


- ▶ Trennsteg
- ▶ Material: Polymethylmethacrylat und Transferklebebänder
- ▶ Fassungsvermögen: 14 μ l
- ▶ Pt-Elektroden, Stromstärke: 0,5 mA





Quelle: D. Kohlheyer, Microfluidic free-flow-electrophoresis for proteomics-on-a-chip, 2008



Verdünnte
H₃PO₄

Verdünnte
NaOH

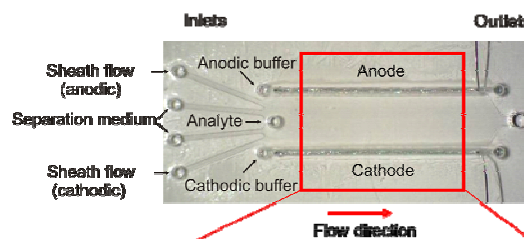
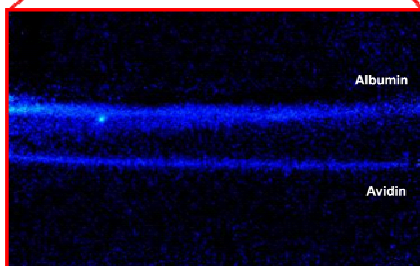
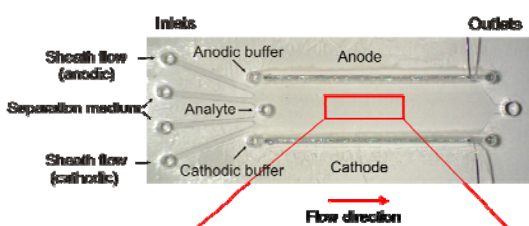
Isoelektrische Fokussierung

- ▶ Auftrennung von **amphoter**en Stoffen (Proteinen) aufgrund ihres relativen Gehalts an sauren und basischen Aminosäureresten
- ▶ Trägermedium: Gemisch synthetischer Ampholyte
- ▶ Linearer pH-Gradient senkrecht zur Flussrichtung
- ▶ Komponenten wandern im pH-Gradienten bis zu dem Punkt, an dem ihr pI dem lokalen pH-Wert des Trägermediums entspricht
- ▶ E-Feld **fokussiert** jedes einzelne Protein im pH-Bereich seines spezifischen pI, $\mu_{ep}(pI) = 0$

→ μ_{ep} abhängig von Art und Höhe der Ladung, Radius, Struktur

Ziel: Hohe Auflösung → schmale Zonen mit scharfen Grenzen

Isoelektrische Fokussierung



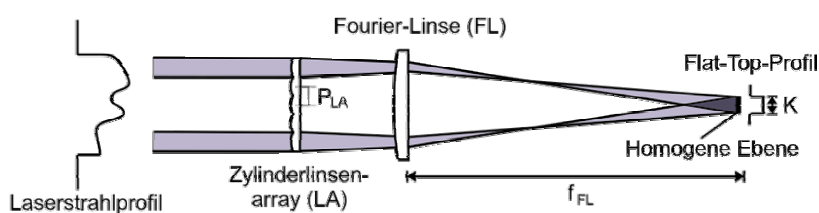
- ▶ Isoelektrische Fokussierung von Albumin (FITC) und Avidin (Alexa Fluor 488), 270 $\mu\text{mol/l}$

- ▶ Isoelektrische Fokussierung von Albumin (Bromphenolblau) und Methylenblau, 300 $\mu\text{mol/l}$

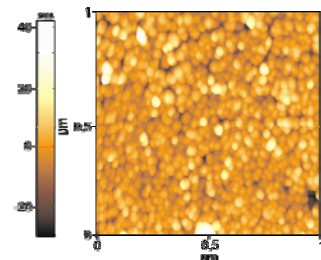
Herstellung SERS-aktiver Substrate

- ▶ SERS-Effekt (engl. Surface enhanced Raman Scattering)
- ▶ SERS-Effekt bei Metallen mit hohen Reflexionsvermögen (Ag, Au, Cu,)
- ▶ Hinsichtlich der Adsorbate keine Einschränkungen
- ▶ Verstärkungsmechanismus Resonanz von Oberflächenplasmonen und Anregungswellenlänge

Laserbeschuss dünner Edelmetallschichten



AFM der nanoskaligen Substratoberfläche

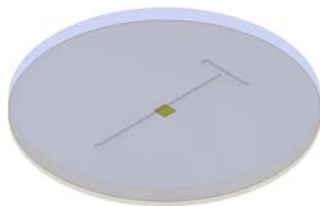


16.06.2010

Hainer Wackerbarth, Workshop FH Lübeck

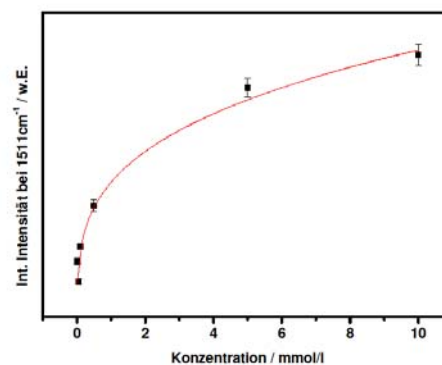
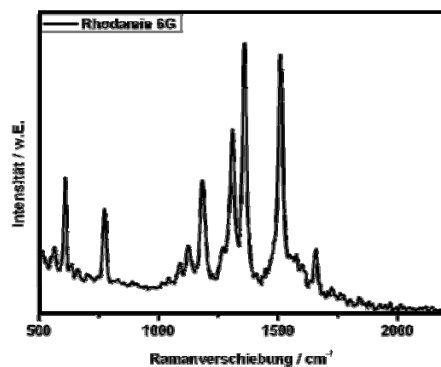
15

SERS-Nachweis zur Analyse der Inhaltsstoffe flüssiger Gemische



Integration SERS-aktiver Oberfläche in Mikrokanal

Konzentrationsreihe von Rhodamin 6G



16.06.2010

Hainer Wackerbarth, Workshop FH Lübeck

16

2D-Molecular Tagging Velocimetry (MTV) und planare Ramanstreuung zur Charakterisierung mikrofluidischer Mischungsvorgänge

im Rahmen des DFG-Schwerpunktprogrammes 1147
"Bildgebende Messverfahren zur Strömungsanalyse"

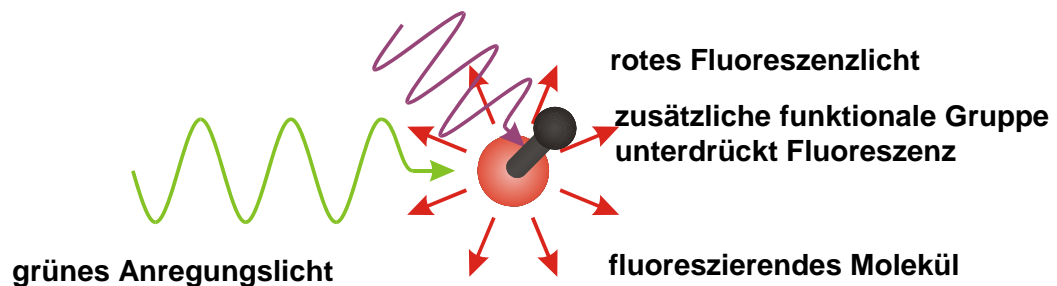
16.06.2010

Hainer Wackerbarth, Workshop FH Lübeck

17

Funktionsweise von „caged dyes“

Photolyse durch UV-Licht
spaltet funktionale Gruppe ab



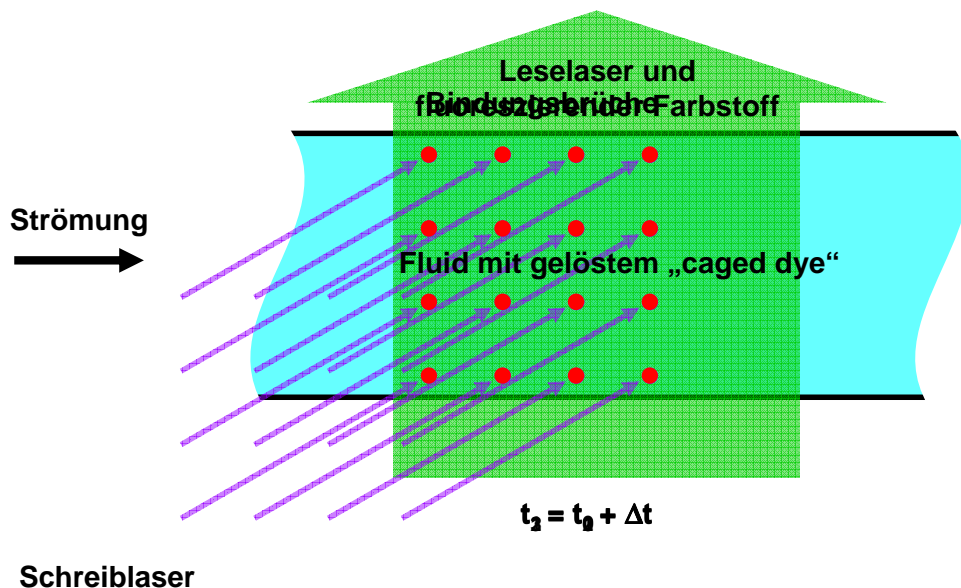
Alternative Tagging-Methoden:

- **thermisches** Tagging (Infrarotstrahlung)
- Photobleaching, **Intensitätsreduktion**
- chromophore Farbstoffe, **Farbänderung**
- **Phosphoreszenz**

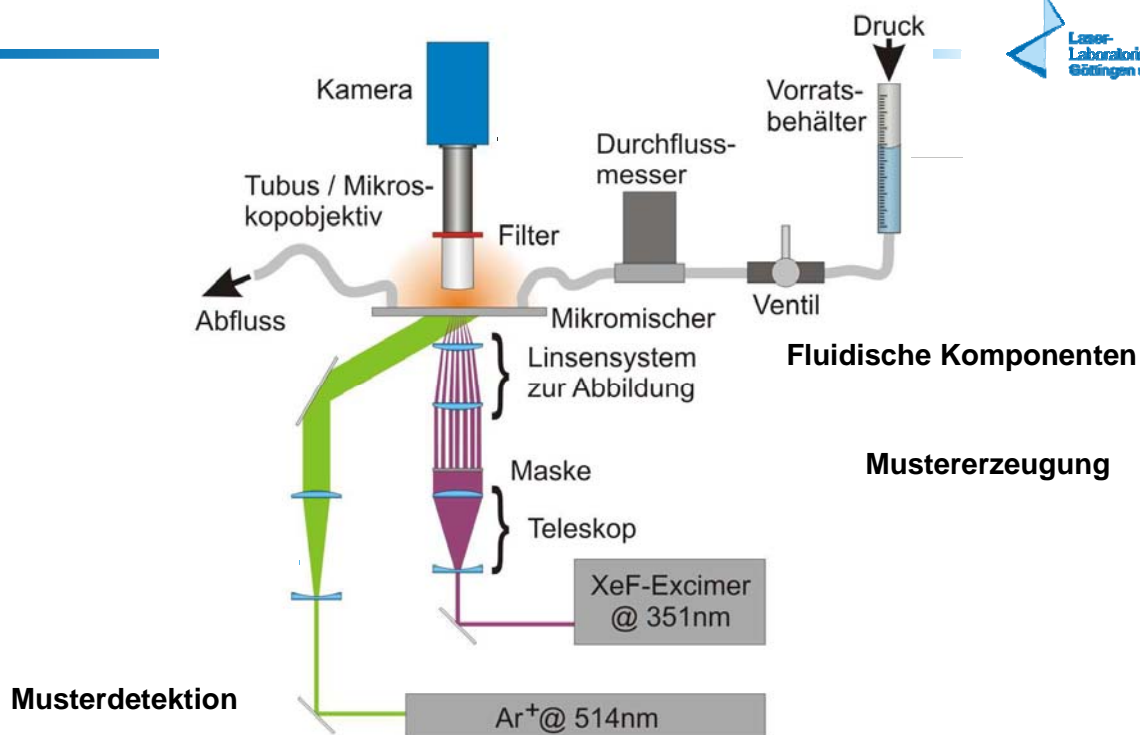
16.06.2010

Hainer Wackerbarth, Workshop FH Lübeck

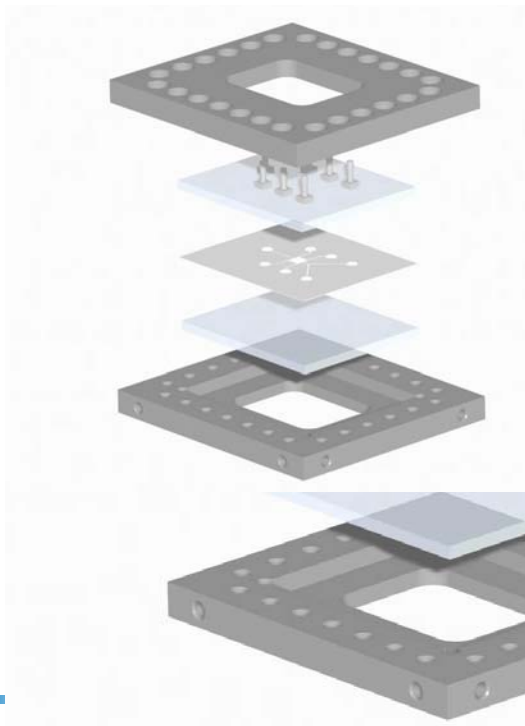
18



Experimenteller Aufbau zur Erfassung von 2D-MTV-Sequenzen

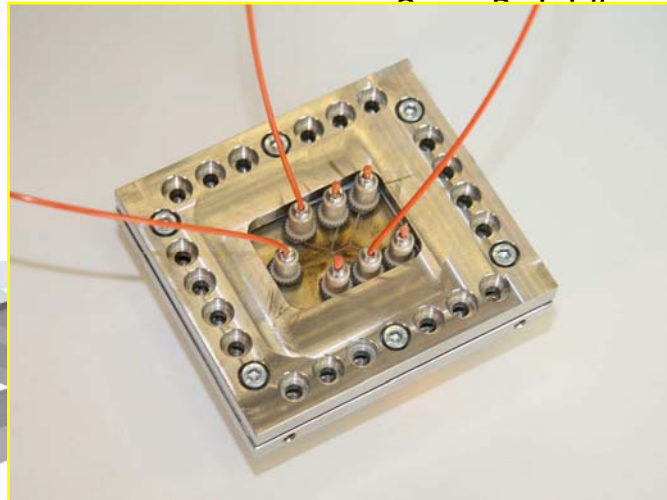


Sandwich-Technik



Vorteile:

- modular
- schnell modifizierbar
- gut optisch zugänglich
- einfache Handhabung (z.B. Reinigung)



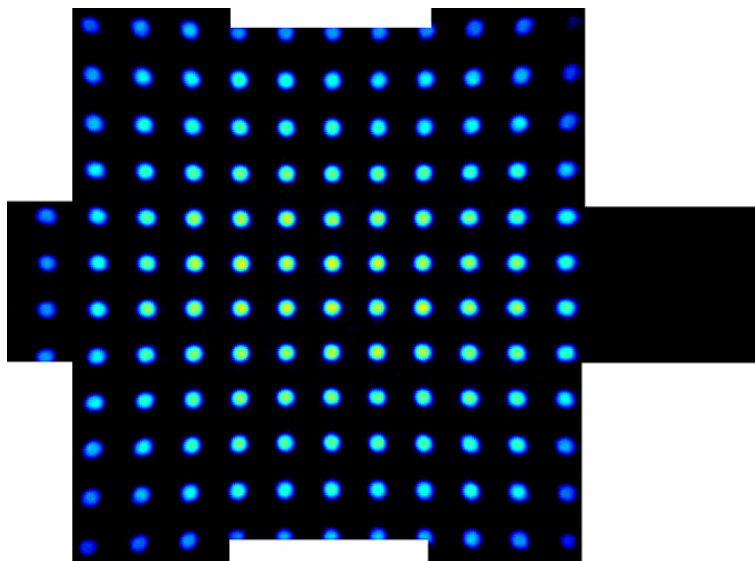
16.06.2010

Hainer Wackerbarth, Workshop FH Lübeck

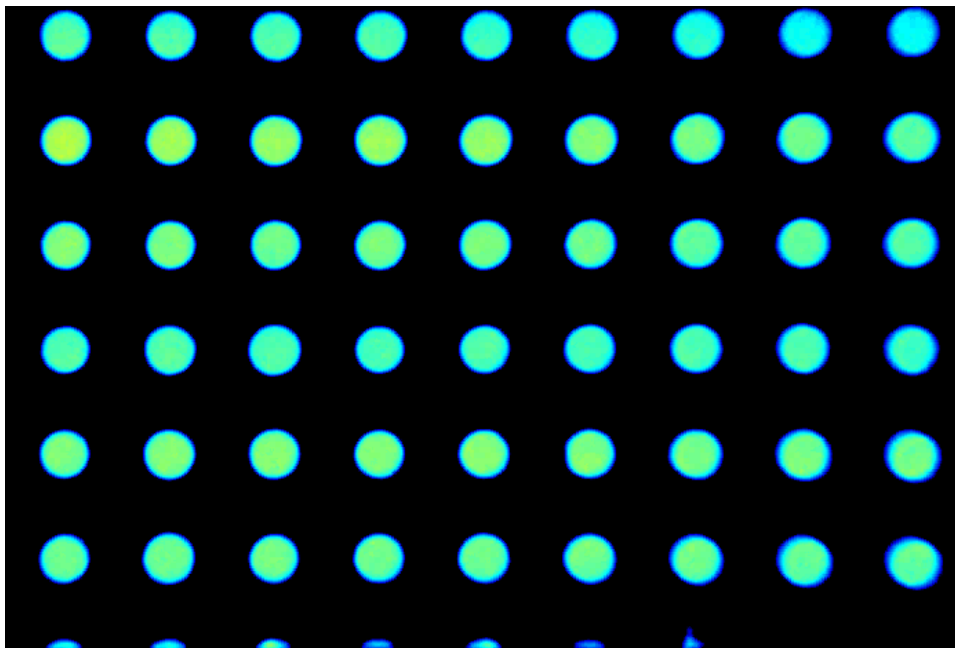
21

MTV – Bildsequenzen mit verschiedenen Masken

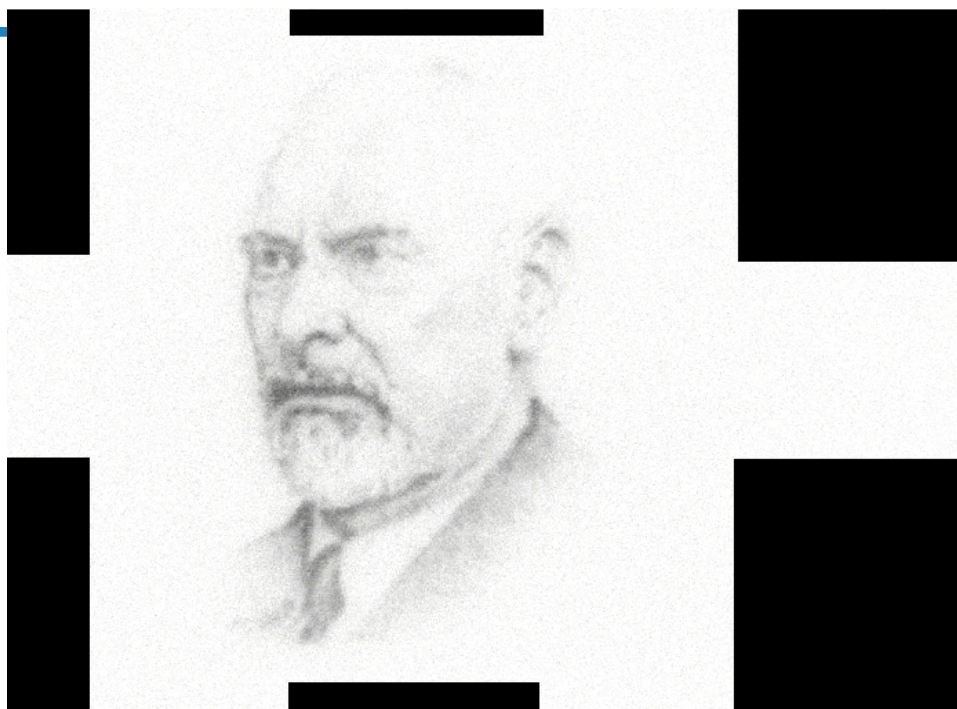
Punktdurchmesser: 160µm
Dichte: 480µm Rasterabstand



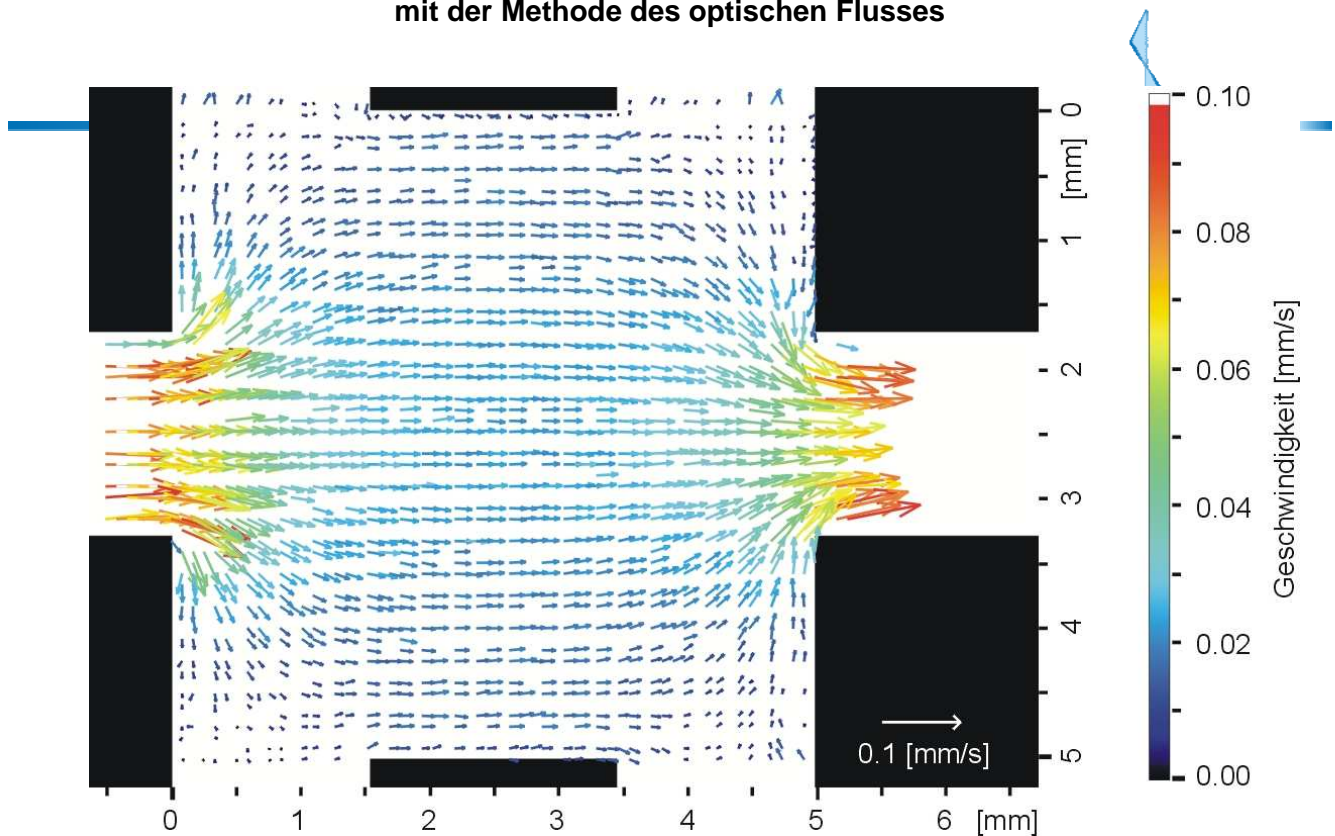
Aufnahmefrequenz 10Hz, Kammergröße 5mm, -tiefe 200µm
Seitenkanäle sind verschlossen



Ein „unterhaltsames“ Beispiel einer Mustergeometrie



Auswertung einer MTV – Bildsequenz des Mikromischers mit der Methode des optischen Flusses

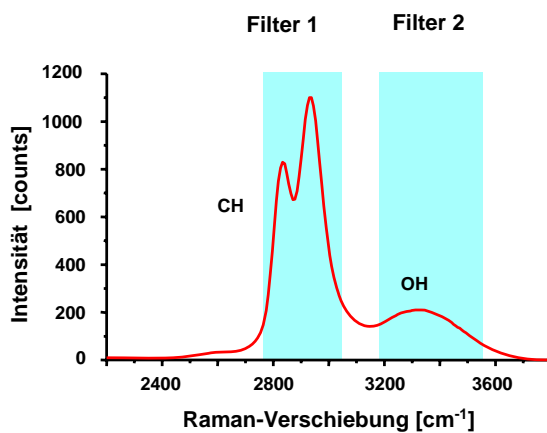


16.06.2010

Hainer Wackerbarth, Workshop FH Lübeck

25

Flächige Bestimmung von Konzentrationsverteilungen



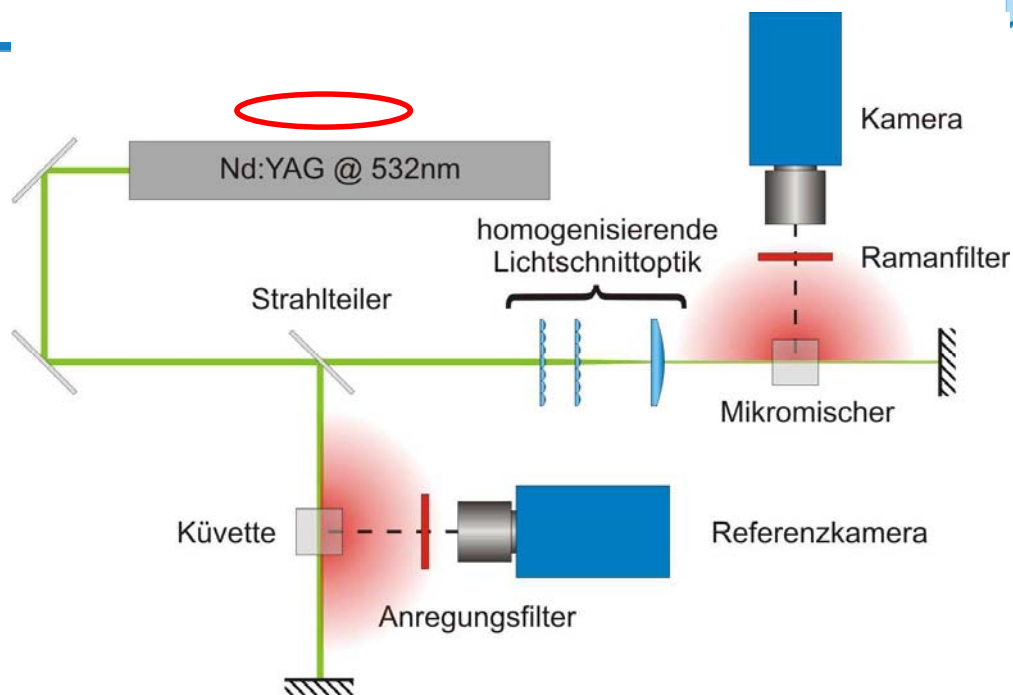
- Raman-Spektrum = **spektraler Fingerabdruck** des Gemisches
- quantitative Mischungsanalyse
- flächige Selektion durch Bandpassfilter
- Detektion mit CCD-Kamera

16.06.2010

Hainer Wackerbarth, Workshop FH Lübeck

26

Experimenteller Aufbau zur Erfassung von Konzentrationsfeldern

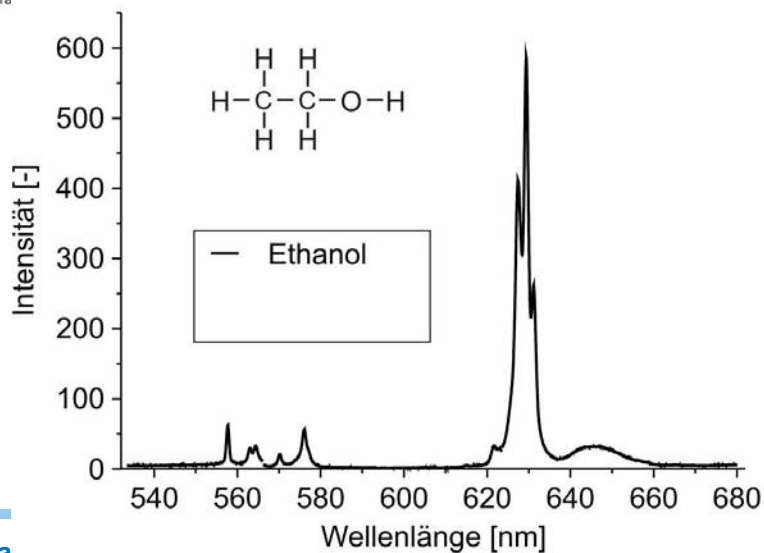
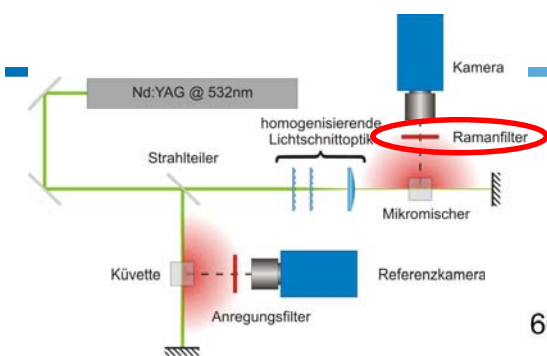


16.06.2010

Hainer Wackerbarth, Workshop FH Lübeck

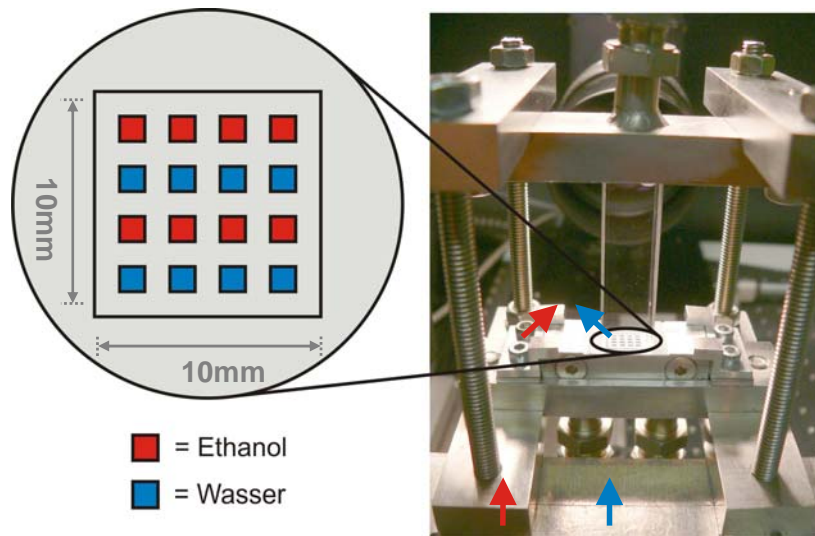
27

Auswahl eines geeigneten Ramanfilters



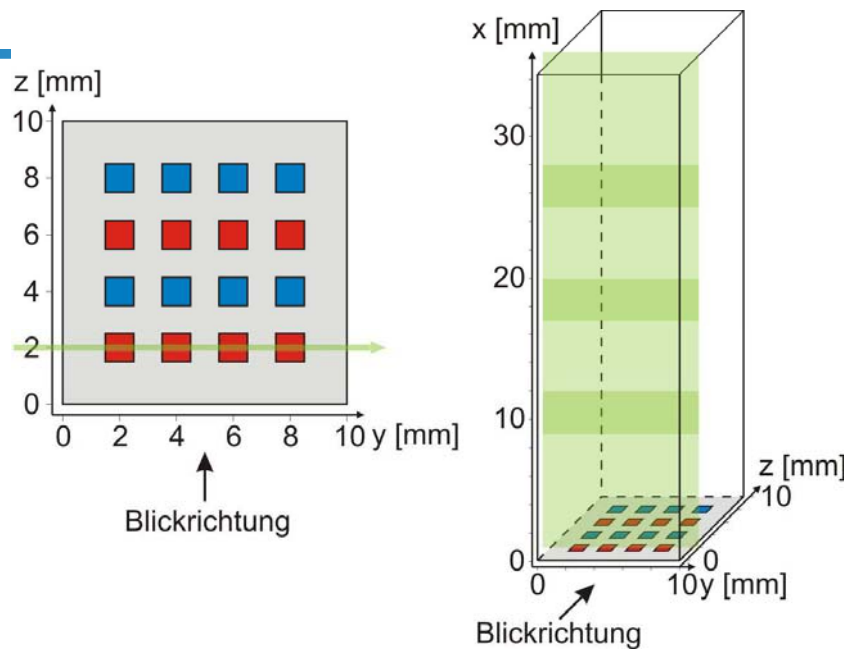
16.06.2010

Ha



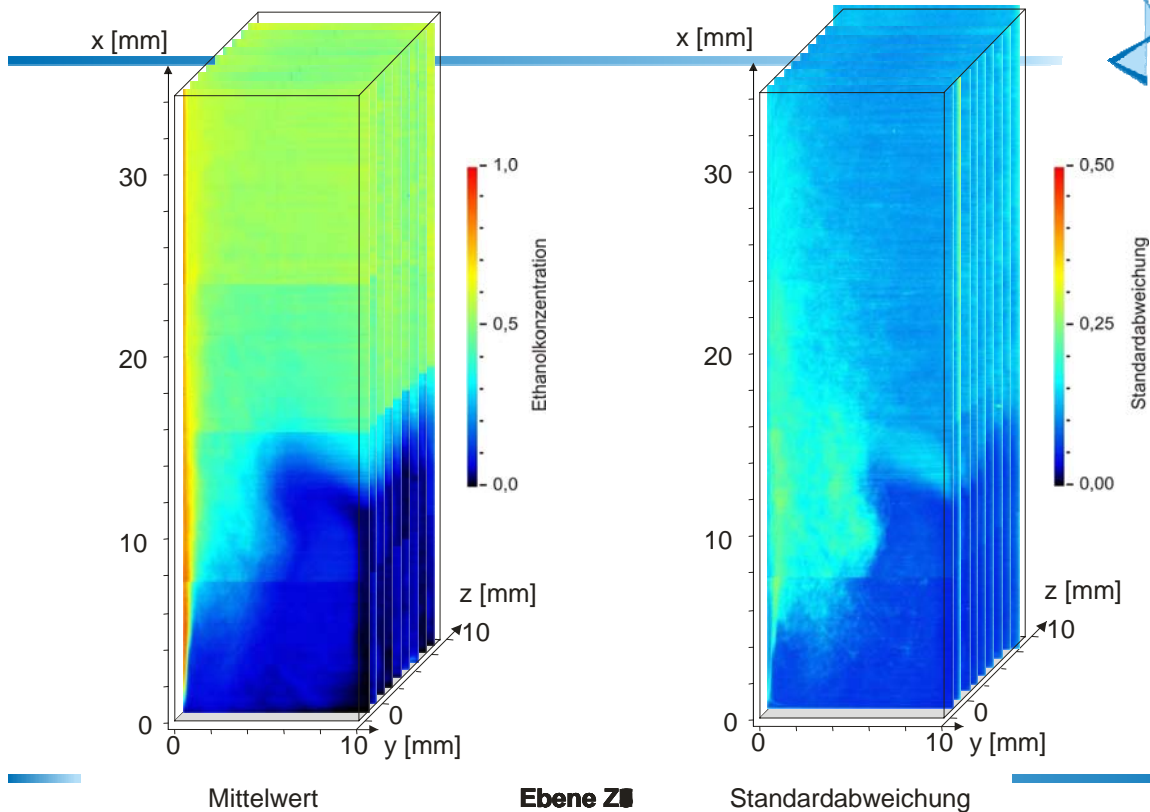
- Mikromischer zur Verfügung gestellt vom Institut für Mikroverfahrenstechnik des Forschungszentrums Karlsruhe

Messpositionen in der Mischstrecke des Multilaminationsmischers



- 9 Messpositionen in z-Richtung
 - 4 Messpositionen in x-Richtung
- insgesamt **36 Messpositionen** um die Mischstrecke abzurastern

Konzentrationsmessungen im Multilaminationsmischer



31

Zusammenfassung



2D-MTV

- **Neuartiges Tagging-Verfahren** für beliebige zweidimensionale Muster
- **Angepasste Algorithmen** auf Grundlage der Methode des optischen Flusses
- **zweidimensionale Geschwindigkeitsmessungen** in Mikrokanälen durch 2D-MTV

Planare Ramanstreuung

- **Intensitätsoptimierung** zur Messung im Einzelschuss erfolgreich
- **Präzise Quantitative Messungen** möglich
- Erfolgreiche **Vermessung eines realitätsnahen Mikromischers**

Funding:



BMBF Verbundprojekt Koordination „Neuartige Analyse- und Prozessüberwachungstechnologie mit Querschnittcharakter“

Projekt: „Ramanspektroskopisches Nachweissystem für miniaturisierte Frei-Fluss-Elektrophorese und Verbundkoordination“

DFG Schwerpunktprogramm: Bildgebende Messverfahren für die Strömungsanalyse

Projekt: „Entwicklung und Erprobung eines bildgebenden Messverfahrens zur simultanen flächigen Bestimmung von Mischungsverhältnis und Geschwindigkeitsfeld bei einphasigen Mischprozessen

Projekt: „Kombinatives 2D-Messverfahren zur simultanen quantitativen Bestimmung von Strömungsfeld, Mischungsbruch und Temperatur am Beispiel von Mikro-Fluidik-Anwendungen“

Die Gruppe:

Dr. Volker Beushausen
Dr. Konstantin Christou
Dipl-Ing. Alexander Göhmann
M.Sc Alexander Grosch
Dipl-Ing. Lars Gundrum
Dipl-Phys Wilhelm Hüttner
Dipl-Phys Britta Kreilein
Dr. Christoph Lentz

Dipl-Phys. Dominik Niedenzu
(Dr. Karsten Roetmann)
Dipl-Phys. Frank Rotter
Dipl-Ing. Christian Salb
Stefan Scholz
B.Sc.Maik Sowa
(Mike Wellhausen)
Bastian Zander

16.06.2010

Hainer Wackerbarth, Workshop FH Lübeck

33

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit



16.06.2010

Hainer Wackerbarth, Workshop FH Lübeck

34