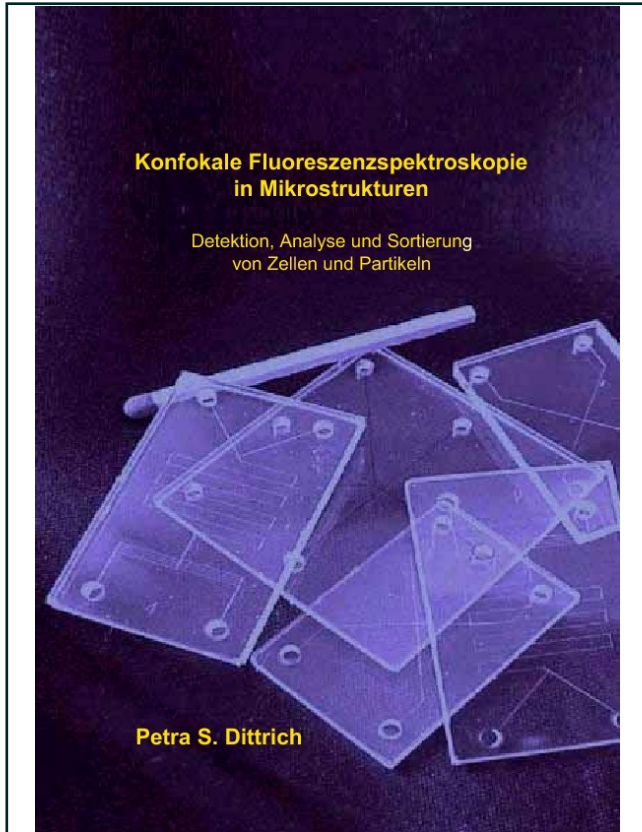




Petra Dittrich (Autor)

# **Konfokale Fluoreszenzspektroskopie in Mikrostrukturen: Detektion, Analyse und Sortierung von Zellen und Partikeln**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3124>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,  
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

# Kapitel 1

## Einleitung

In vielen Bereichen des alltäglichen Lebens ist die Miniaturisierung von großer Bedeutung: Das wohl imponierendste Beispiel ist die Verkleinerung elektronischer Rechner, die mit steigender Leistung auf immer geringerem Raum untergebracht werden können (z.B. Laptops und *Personal digital assistants* PDAs).

Dank des großen Bedarfs der elektronischen Industrie an miniaturisierten Bauteilen ist die Verfügbarkeit und der Fortschritt zur Herstellung von Mikrostrukturen (*Microelectromechanical Systems*, MEMS) seit einigen Jahren rasant vorangeschritten. Mittlerweile sind die technischen Voraussetzungen gegeben, definierte zwei- und dreidimensionale künstliche Strukturierungen im Mikrometer- und sogar Nanometerbereich herzustellen [1, 2, 3], die in ihren Dimensionen mit kleinsten biologischen „Bauteilen“ wie Zellen und Zellkompartimenten bzw. sogar mit biologischen Makromolekülen wie Proteinen und DNA vergleichbar sind (Abb. 1.1).

Miniaturisierte Strukturen, die *makroskopisch* eine Größe von wenigen cm aufweisen, in denen wiederum die *mikroskopischen* Strukturierungen integriert sind, stellen gewissermaßen eine Schnittstelle dar, die auf Basis eines handhabbaren Chips die Manipulation kleinster Moleküle und Teilchen ermöglicht.

Ein großes Interesse besteht sowohl an mikrostrukturierten Oberflächen, sowie insbesondere auch an mikrodimensionierten Kanalsystemen. Ähnlich wie die Miniaturisierung elektronischer Rechner von Raum- auf Taschenformat, besteht die Hoffnung, innerhalb eines Mikrochips ein transportables, vollständiges (chemisches) Labor unterzubringen (*lab-on-a-chip* [4, 5], *stand-alone chips*, oder auch: *Honey, I shrunk the lab* [6]). In einem solchen Kanalsystem lässt sich nicht allein die *Durchführung* mehrschrittiger chemischer Reaktionen verwirklichen, auch die *Separierung* und *Analyse* der Reaktionsprodukte kann integriert werden - ein Konzept, das Anfang der 90er Jahre unter dem Begriff  $\mu$ TAS (*micro total analysis system*) von Manz et al. [7, 8, 9] vorgestellt wurde.

Neben der Mikromechanik und der Mikrooptik hat sich daher insbesondere die Mikrofluidik zu einem interdisziplinären Wissenschaftsgebiet der Physik, Chemie, Material- und Ingenieurwissenschaften entwickelt, mit den Zielen, die theoretischen Eigenschaften von

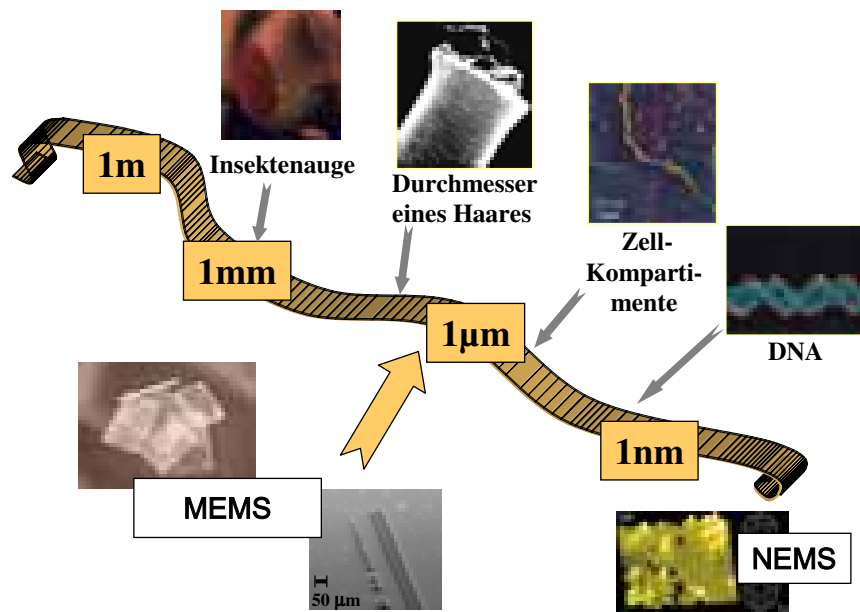


Abb. 1.1: Vergleich künstlicher Strukturierungen mit den Dimensionen biologischer Teilchen und Moleküle.

Flusssystemen und Flüssigkeiten in mikrostrukturierten Kanälen - mit Dimensionen von einigen wenigen bis einigen hundert Mikrometer - zu verstehen und die Realisierung eines *on-chip*-Labores experimentell zu verwirklichen [10, 11, 12, 13].

Durch die Miniaturisierung des Reaktions- und Analysenraumes entstehen sowohl für wissenschaftliche als auch für die industrielle Verwendungen vielfältige Vorteile [14, 15, 16]:

- *Beschleunigung von Reaktionsprozessen*: Durch Parallelisierung und automatisierte Kontrolle von Reaktionsabläufen, ebenso aufgrund hoher Durchsatzraten bzw. geringer Transportzeiten kann die zur Reaktion/Analyse benötigte Zeit reduziert werden. Ebenso ist eine effiziente Reaktionsdurchführung möglich, z.B durch gezielten und schnellen Wärmeaustausch, denn durch das große Verhältnis von Oberfläche zu Volumen in miniaturisierten Kanälen ist sowohl die Wärmeableitung in exothermen Reaktionen als auch eine präzise Erhitzung der Reaktionslösung möglich.
- *Reduzierung des Probenvolumens*: Das geringe Gesamtvolumen des Reaktionsraumes in Mikrometerdimensionen führt zur Verringerung des Probenverbrauches im Picoliterbereich, verbunden mit einer geringen Entstehung von unerwünschten Nebenprodukten. Dieses ist vor allem wichtig für biologische und biochemische Applikationen, in denen zumeist nur geringe Mengen der Probensubstanz zur Verfügung stehen, desweiteren aber auch aus sicherheitstechnischen Aspekten, wenn aggressi-

ve oder toxische Substanzen eingesetzt werden oder als (Zwischen-)Produkte entstehen.

- *Sensitive Detektionsmöglichkeiten*: Durch die Anpassung der Größe des Reaktionsraumes an die Größe der Messsubstanzen ist die Möglichkeit gegeben, hohe Nachweissensitivitäten in kurzen Analysezeiten zu erreichen [10].
- *Kostenreduktion*: Insgesamt besteht ein großes wirtschaftliches Interesse an der Miniaturisierung, da die Kosten für Reaktionsprozesse deutlich reduziert werden können. Auch die Mikrochips selbst haben einen geringen Preis - sofern sie in hohen Stückzahlen hergestellt und günstige Materialien wie z.B. Kunststoffe eingesetzt werden - und eignen sich damit zur Einmal-Verwendung, wie es z.B. für den Einsatz in der (vor allem diagnostischen) Medizin erforderlich ist [5, 17, 18].

Im Vordergrund biologischer Applikationen steht neben der Reaktionsdurchführung in Mikrofluidik-Chips, wie z.B. der Polymerasekettenreaktion [19, 20], vor allem die Separation und Analyse biologischer Makromoleküle und Zellen. Viele Bemühungen sind auf die Auftrennung unterschiedlicher DNA-Fragmente, einschließlich der Größenbestimmung [21, 22, 23] dieser Fragmente, und sogar auf die Sequenzierung [24] gerichtet. Aber auch Proteine [25, 26] können in Mikrokanälen oder -kapillaren analysiert werden, ebenso wie Zellen, z.B. zur Charakterisierung bestimmter Zellfunktionen [27].

In Mikrokanälen kann die *Separation* biologischer Makromoleküle und Teilchen durch unterschiedliche Methoden erreicht werden: Mit „passiven“ Trennverfahren lassen sich Teilchen und Moleküle nach ihren physikalischen Eigenschaften wie Ladung oder Größe isolieren. Am häufigsten eingesetzt werden kapillarelektrophoretische Verfahren [28, 29, 30, 31, 32], aber auch eine Auftrennung aufgrund unterschiedlicher Diffusionsgeschwindigkeiten durch das Einbringen von passiven Hindernissen [33, 34, 35] konnte bereits erfolgreich gezeigt werden.

Ein anderes Prinzip wird bei einem „aktiven“ Sortierungsverfahren verfolgt: Hierbei wird die Probe durch den Detektionspunkt geleitet und - abhängig vom Analyseresultat - in verschiedene Ausgangskanäle gelenkt. Die Realisierung dieser Sortierungsstrategie macht eine punktuelle Manipulation der Flüssigkeit [36, 37, 38] oder der Teilchen [39, 40] im Kanal erforderlich.

Für die *Analyse* der Probensubstanz in Mikrokanälen werden neben elektrochemischen und massenspektrometrischen Verfahren zumeist optische Methoden wie Absorptions-, Chemolumineszenz- und insbesondere Fluoreszenzmessungen eingesetzt [41], die weitgehend zerstörungsfrei und ohne mechanische Einwirkung auf die Probe erfolgen. Die hohe Sensitivität und Spezifität der Fluoreszenzspektroskopie - erreicht durch gezielte Anregung fluoreszierender Moleküle, die intrinsisch in vielen biologischen Proben enthalten sind oder an Reaktionssubstanzen angebunden werden können - erlaubt die direkte Analyse der Probensubstanz bezüglich inter- oder intramolekularer Wechselwirkungen, so dass Reaktionsmechanismen ebenso wie zellbiologische Funktionen aufgeklärt werden



können [42]. Als besonders wertvoll hat sich die Verwendung autofluoreszierender Proteine wie das grün-fluoreszierende GFP und das rot-fluoreszierende DsRed erwiesen, die durch molekularbiologische Methoden in die Zelle eingebracht und an beliebige Proteine angefügt werden können.

Die hohe Sensitivität der Fluoreszenzspektroskopie wird im konfokalen Aufbau weiter erhöht. Durch die Verwendung von Objektiven mit hoher Numerischer Apertur und speziellen Optiken innerhalb eines fokussierten Anregungsstrahles wird ein extrem kleines, definiertes Detektionsvolumen von Bruchteilen von Femtolitern erzeugt - das entspricht der Größenordnung von Bakterienzellen! -, so dass in Kombination mit empfindlichen Detektoren der Nachweis fluoreszierender Einzelteilchen beim Durchtritt durch dieses Detektionsvolumen erfolgen kann (*single molecule detection*, smd [43, 44, 45]). Die hohe räumliche Auflösung verbunden mit einem geringen Hintergrundsignal macht die konfokale Spektroskopie insbesondere für Messungen in miniaturisierten Kanälen besonders geeignet [46]. Im Gegensatz zu Ensemblemessungen, in denen die gemittelten spektroskopischen Eigenschaften bestimmt werden, lassen sich individuelle Charakteristiken von Teilchen evaluieren [47, 48].

Eine statistische Erfassung dieser Einzelmoleküldurchtritte kann durch Korrelationsanalyse erfolgen, in der die dynamischen Prozesse einzelner Moleküle in ihrer zeitlichen Entwicklung beschrieben werden [49, 50, 51]. Mittels der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie lassen sich Informationen über die Aufenthaltsdauer der Teilchen im Detektionsvolumen erhalten, die zur „Beweglichkeit“ der Teilchen bzw. zur Viskosität des Lösungsmittels korrespondiert. Damit können ebenfalls Reaktionen, in denen eine langsame irreversible Reaktion die Veränderung der Beweglichkeit bewirken (Spaltungs- oder Anlagerungsreaktionen) durch FCS erfasst werden, ebenso wie schnelle reversible Prozesse, die innerhalb der Durchtrittszeit erfolgen und mit einer Änderung der Fluoreszenzeigenschaften einhergehen [52, 53]. Für gerichtete Bewegungen wie sie im Fall fließender Lösungen durch die Mikrofluidik-Kanäle vorliegen, lässt sich durch FCS-Messungen die Flussgeschwindigkeit der Teilchen bestimmen [54].

Die Kombination dieser hochempfindlichen Detektionsmethoden mit der Verwendung miniaturisierter Reaktionskanäle sollte unter hohen Durchsatzraten und einer Nachweissensitivität auf Einzelmolekülniveau die Analyse großer Zellpopulationen oder Einzelteilchen ermöglichen, der vielfältige Einsatzmöglichkeiten in den Bereichen der Zellbiologie, Biotechnologie, der diagnostischen Medizin und der Wirkstoffentwicklung offenstehen [47, 55, 56].

## Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit wird das Ziel verfolgt, durch Miniaturisierung des Reaktionsraumes in Verbindung mit dem im konfokalen Aufbau erzeugten „miniaturisierten“ Messvolumen, die Detektion und Manipulation fluoreszierender Einzelteilchen zu erreichen.

Im Vordergrund steht die Entwicklung eines Mikrochips, in dem innerhalb eines Kanalsystems fluoreszierende Zellen und Teilchen nach der Detektion in Abhängigkeit ihrer spektroskopischen Eigenschaften sortiert werden können.

Die prinzipielle Idee ist in Abb. 1.2 skizziert: Die Probenlösung wird in einem Mikrokanal transportiert. Sobald ein Partikel bzw. eine Zelle in der fließenden Lösung detektiert wird, erfolgt direkt die Analyse des Signales und das Resultat („positiv“ oder „negativ“) bestimmt die Richtung der Sortierung.

Zur Realisierung dieses Vorhabens müssen sämtliche Einzelkomponenten (Detektionsystem, Mikrostrukturen, Manipulation des Flusses, Automatisierung) entwickelt und aufeinander abgestimmt werden. Dazu sollten ebenfalls die besonderen Eigenschaften des Flusses innerhalb der Mikrokanäle bekannt sein bzw. charakterisiert werden.

Die vorliegende Arbeit gibt einen Überblick über die fluoreszenzspektroskopische Detektion und Analyse, sowie die Manipulation von Zellen und Teilchen in miniaturisierten Kanälen und ist gemäß den fachlichen Disziplinen gegliedert:

- **Spektroskopie** (Kap. 2): Es werden die theoretischen und experimentellen Grundlagen der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie, einschließlich der Datenauswertung mittels Histogramm- oder Korrelationsanalyse, beschrieben.
- **Mikrosystemtechnik** (Kap. 3): Entwicklung, Design, Herstellung und Umgang mit den Mikrostrukturen.
- **Mikrofluidik** (Kap. 4): Charakterisierung der Flusseigenschaften in den Mikrokanälen, sowie der Realisierung eines kontinuierlichen Flussreaktors zur Bestimmung von Reaktionskinetiken.
- **Sortierung** (Kap. 5): Schließlich wird die Entwicklung des Mikrosortierers einschließlich der Automatisierung aufgezeigt. Weiterhin werden Applikationen zur Sortierung von Bakterienzellen gegeben.

Innerhalb der einzelnen Kapitel werden sämtliche theoretische Aspekte angeführt, die zum Verständnis der nachfolgenden Beobachtungen und Experimente wichtig sind; der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt jedoch in der experimentellen Umsetzung des Projektes.

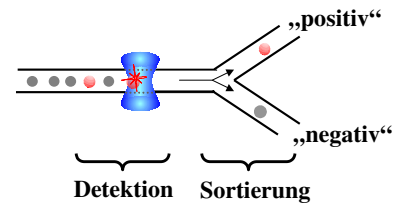


Abb. 1.2: ( $\mu$ FACS: Fluoreszenz-aktivierte (Zell-)Sortierung in einem Mikrofluidik-Kanal



# Kapitel 2

## Konfokale Fluoreszenzspektroskopie

In der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie wird die Messprobe durch stark fokussiertes Laserlicht angeregt und das Fluoreszenzlicht aus diesem fokalen Bereich detektiert. Die Bezeichnung *konfokal* resultiert daher, dass der Anregungsfokus identisch mit dem Fokus des Detektionsvolumens ist. Durch Verwendung von Objektiven mit hoher Numerischer Apertur (NA), verbunden mit dem Einsatz von Lochblenden (*Pinholes*) in der Bildebene, wird ein extrem kleines, definiertes Messvolumen von Bruchteilen von Femtolitern erzeugt. Typische Merkmale der konfokalen Spektroskopie sind das hohe Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis (*S/B-Rate*) [57] und ebenfalls eine hohe räumliche Auflösung, was für hochsensitive Messungen in den mikrostrukturierten Kanälen erforderlich ist. Abbildung 2.1 zeigt den Anregungs- und Emissionsbereich sowie schematisch das effektive Detektionsvolumen in einem konfokalen Aufbau.

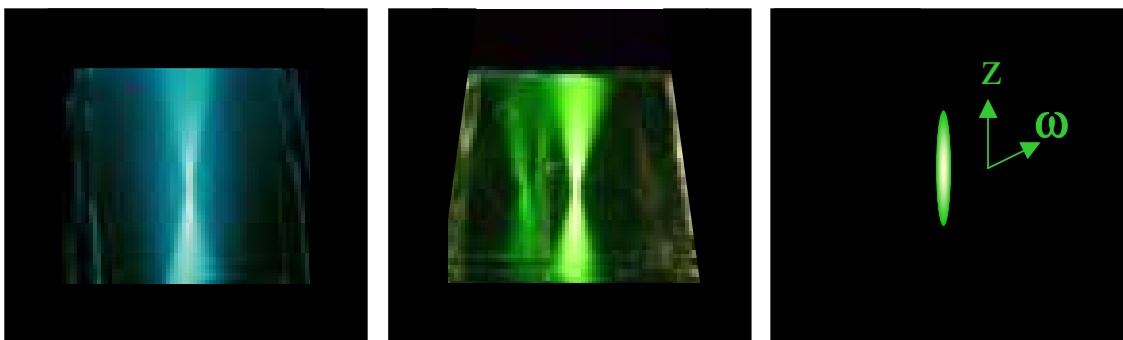


Abb. 2.1: Links: Der fokussierte Laserstrahl ( $\lambda_{anr} = 488 \text{ nm}$ , Zeiss-Trockenobjektiv 20x) ist anhand einer streuenden Partikelsuspension zu erkennen. Die Farbstofflösung (Fluorescein,  $\lambda_{em} > 500 \text{ nm}$ ) fluoresziert entlang dieses Anregungsstrahles (Mitte); durch Verwendung einer Lochblende wird schließlich der Bereich begrenzt, der vom Detektor „gesehen“ wird (effektives Detektionsvolumen, rechts).