

Abschlussbericht

Max-Buchner-Forschungsstiftung (MBFSt), Kennziffer 2676 mit dem Titel „Sensorarray auf der Basis von akustischen Oberflächenwellensensoren zum Nachweis von Affinitätsreaktionen“, Förderperiode Juli 2008 bis Juni 2010.

Bastian E. Rapp, Volker Saile, Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT), Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Kurzfassung

Im Rahmen des Projektes wurde ein Sensorsystem auf der Grundlage von akustischen Oberflächenwellensensoren entwickelt und aufgebaut. Das System ist in der Lage, affin bindende Analyte durch Ankopplung an eine Oberfläche zu detektieren. Neben Aspekten der Sensorentwicklung hatte diese Arbeit auch die Entwicklung einer integrierten Mikrofluidik zum Gegenstand, für welche im Rahmen des Projektes mit dem Konzept der indirekten Mikrofluidik eine neue Methode vorgeschlagen wurde, mikrofluidische Systeme aufzubauen.

1. Einleitung

Biosensoren sind zu einem wichtigen Werkzeug der analytischen Chemie, der Biochemie und der Medizintechnik geworden. Seit mehr als 40 Jahren werden diese Bauteile als Messfühler entwickelt, die in der Lage sind, eine biologische oder biochemische Messgröße in ein physikalisch messbares Signal zu überführen [1]. Ein Biosensor besteht dabei klassischerweise aus zwei Komponenten: dem eigentlichen biochemischen Rezeptor, der dem Sensor Selektivität verleiht und dem Transducer, der für die Signalwandlung in eine messbare Größe verantwortlich ist. Für diesen Transducer stehen dabei unter anderem optische (auf der Grundlage von Absorption, Reflektion, Fluoreszenz, Chemolumineszenz oder Oberflächenplasmonen), elektrochemische (amperometrisch, potentiometrisch, impedimetrisch) oder massesensitive (Quartz-Mikrowaagen, akustische Oberflächenwellen) Verfahren zur Verfügung. Die zuletzt genannte Gruppe ist dabei besonders im Hinblick auf ihre niedrigen Stückpreise und die Einfachheit der für die Auswertung des Transducers notwendigen Peripherie von Vorteil. Im Rahmen des geförderten Projektes wurden Biosensoren auf der Grundlage von akustischen Oberflächenwellensensoren (engl. surface acoustic wave, SAW) eingesetzt, welche im Vergleich zu den Quartz-Mikrowaagen vor allem durch ihre höhere Grundfrequenz und die daraus resultierenden höheren Empfindlichkeiten von Vorteil sind.

2. SAW basierte Biosensorik

Akustische Oberflächenwellen sind besondere Formen physikalischer Volumenschwingungen, die aufgrund der geringeren Rückstellkräfte an einer freien Oberfläche effektiv dort gebunden und geführt werden können. Eine solche Welle steht während ihrer Ausbreitung mit den Eigenschaften der Oberfläche in Interaktion und wird durch Veränderungen beeinflusst. Charakteristische Größen sind dabei neben der Dämpfung und der Phasenänderung der Welle vor allem die Änderung ihrer Grundfrequenz. Dabei ist besonders der Einfluss einer Massebelegung der Oberfläche von Bedeutung, dieser wird als charakteristische Sensorantwort infolge einer Anhaftung eines zu detektierenden Analyten an die Oberfläche ausgewertet. Das prinzipielle Vorgehen ist in Abbildung 1 gezeigt. Die akustische Welle wird dabei typischerweise mittels eines Interdigitaltransducers (IDT) auf einem piezoelektrischen Substrat erzeugt. Diese kammförmigen Elektroden erlauben die Erzeugung einer periodischen mechanischen Verspannung im Substrat durch die Ausnutzung des piezoelektrischen Effektes. Dabei wird ein periodisches Potential an einen solchen IDT angelegt, welcher das elektrische Wechselsignal in eine gleichphasige periodische Verspannung im Substrat übersetzt. Dies erzeugt die akustische Welle, die dann über die Oberfläche des Substrats läuft. Wird diese Oberfläche mit einer Masse beladen, so ändert sich die Frequenz der akustischen Welle, die in einem IDT wiederum in ein

elektrisches Signal rückübersetzt wird. Die Änderung der Eigenschaften des Ausgangssignals im Vergleich zum Eingangssignal stellt das eigentliche Messsignal dar. Um einen solchen Transducer nun zu einem Biosensor zu machen, wird auf der Oberfläche des Sensors eine spezifische bindende Schicht von Rezeptoren aufgebracht, üblicherweise sind dies Antikörper. Liegt im Flüssigkeitsstrom, der über den Sensor beprobt wird, eine signifikante Konzentration der zu den immobilisierten Antikörpern spezifisch bindenden Antigene vor, so kommt es zu einer affinen Bindung und dadurch zu einer Erhöhung der auf die Oberfläche aufliegenden Masse. In diesem Falle antwortet der Sensor mit einer Signaländerung in Form einer Frequenzverschiebung, deren Größe mit der Konzentration der im Fluss vorliegenden Antigene korreliert werden kann.

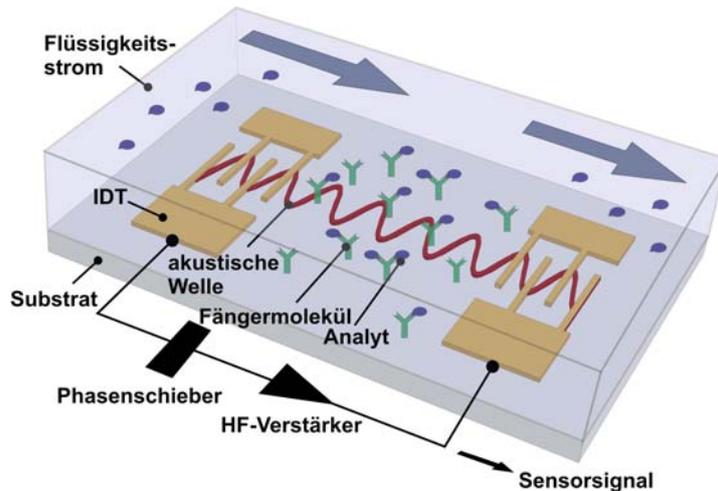


Abbildung 1 – Prinzipieller Aufbau eines SAW Bauteils in einem Fluidstrom. Die akustische Oberflächenwelle wird dabei an der Oberfläche eines Substrates mittels eines Interdigitaltransducers (IDT) erzeugt und breitet sich von dort aus über die Oberfläche des Bauteils aus. Auf dieser Oberfläche sind spezifisch bindende Fängermoleküle (beispielsweise in Form von Antikörpern, welche die zu detektierenden Analyte spezifisch binden) angebracht. Wird der Analyt durch den Flüssigkeitsstrom transportiert, so binden die Antikörper kleine Mengen des Analyten an die Oberfläche, wodurch sich die Frequenz der akustischen Welle ändert. Die Änderung dieser Frequenz wird über einen frei schwingenden Oszillatorschaltkreis (bestehend aus einem Phasenschieber, einem Hochfrequenzverstärker und dem SAW Bauteil als frequenzbestimmendes Element) ausgewertet und über eine Messsoftware protokolliert.

Dass SAW basierte Biosensoren einfache und robuste Sensorelemente für die Biosensorik sind, ist aus der Literatur bekannt [2]. Im Rahmen des geförderten Projektes nun wurde ein kommerziell verfügbares SAW Bauteil für einen Einsatz in der Biosensorik vorbereitet. Hierfür musste zunächst das eigentliche Bauteil mit einem geeigneten Gehäuse ausgerüstet werden. Der Grund hierfür liegt darin, dass SAW Bauteile überaus brüchig und empfindlich sind und in dieser Form nicht für einen direkten Gebrauch in analytischen Systemen geeignet sind, vor allem nicht, wenn diese durch einen Endanwender bedient werden sollen.

Im Rahmen des geförderten Projektes wurde hierfür das in Abbildung 2 gezeigte Polymergehäuse entwickelt. Das Gehäuse erlaubt die Einbettung eines SAW Sensors in eine schützende Umgebung, ohne die sensitive Oberfläche des Sensors komplett zu verschließen. Dies ist deswegen notwendig, weil nach der Einbettung des Sensors die Oberfläche noch für die skizzierte Modifikation mit Rezeptoren zur Verfügung stehen muss. Hierfür wurde ein Gehäuse mit einem geeigneten Fenster entwickelt. Im Rahmen des geförderten Projektes wurden diese Gehäuse im Mikrospritzgussverfahren hergestellt und für die Einbettung der Sensor zu sogenannten SAW Biosensorchips eine vollautomatisierte Fertigungsplattform entwickelt. Protokolle zur geeigneten Oberflächenmodifikation dieser Bauteile wurden bereits in vorhergehenden Projekten entwickelt und in parallelen Arbeiten auf die geänderten Anforderungen der Polymergehäuse angepasst (siehe hierzu [3-5]). Die eingebetteten SAW Biosensoren wurden mittels eines entwickelten und im Rahmen des

Projektes hergestellten mikrofluidischen Chips fluidisch in Reihe geschaltet. Auf diese Weise können Sensorarrays hergestellt werden.

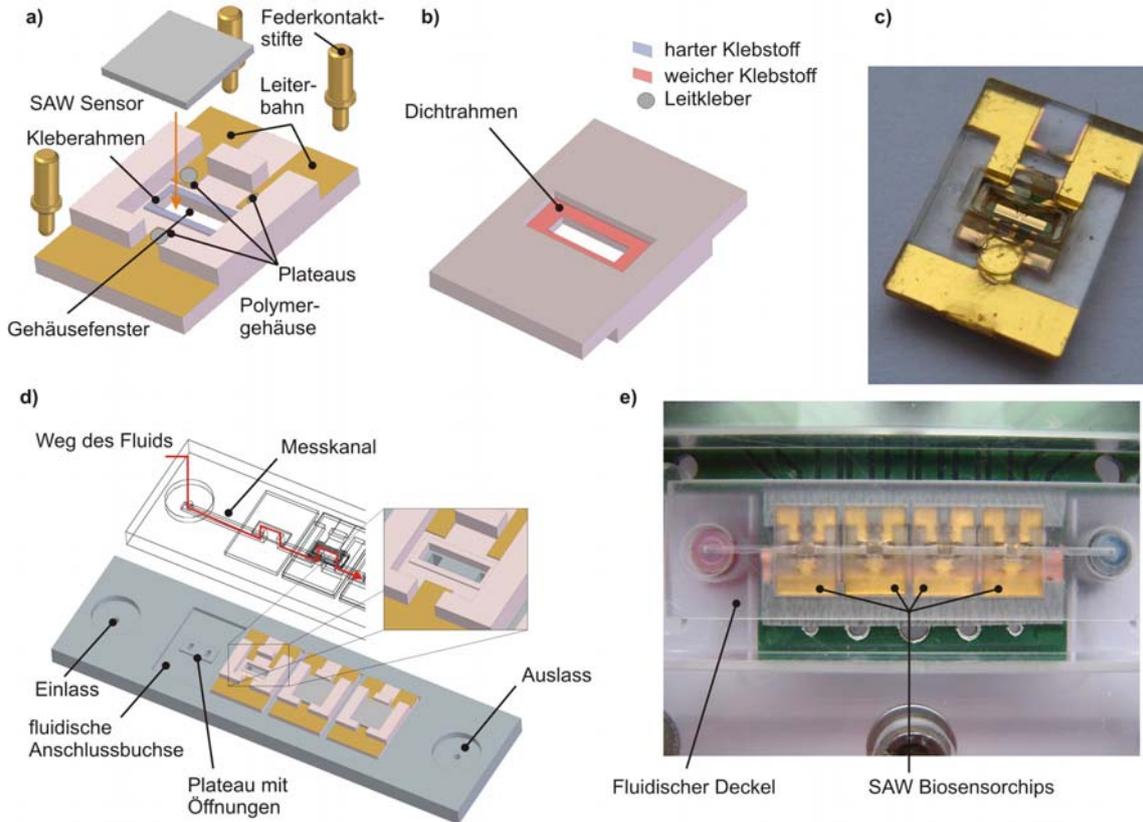


Abbildung 2 – Prinzipdarstellung der im Rahmen des geförderten Projekts entwickelten Sensorgehäuse für den kommerziell verfügbaren SAW Sensor E062. a) Ansicht des Polymergehäuses von der Unterseite. Dem Bauteil wird über eine Schattenmaske eine Leiterbahnstruktur aufgesputtert, der Sensor mittels UV-härtendem Klebstoff und einem leitfähigen Epoxidkleber im Gehäuse fixiert und kontaktiert. b) Ansicht des Gehäuses von der Oberseite. Durch eine Öffnung im Gehäuse, dem so genannten Gehäusefenster, bleiben die sensitiven Bereiche des Sensors für eine spätere Oberflächenmodifikation zugänglich. In eine Vertiefung wird eine weiche Klebstoffspur als Dichtelement eingesetzt. c) Ansicht eines fertigen SAW Biosensorchips. d) CAD Ansicht des entwickelten mikrofluidischen Chips, der in diesem Fall vier einzelnen SAW Biosensorchips fluidisch in Reihe schalten kann. e) Ansicht eines fluidischen Chips mit vier eingelegten SAW Biosensorchips.

3. Indirekte Mikrofluidik

Neben der Herstellung der SAW Biosensorarrays wurde im Rahmen des geförderten Projektes ein neues Konzept für ein mikrofluidisches System entwickelt. Das System verwendet neben den eigentlich durch das System zu fördernden Flüssigkeiten eine zweite, mit diesen Flüssigkeiten nicht mischbare Substanz, vorzugsweise einen aliphatischen Kohlenwasserstoff wie beispielsweise Tetradekan (siehe hierzu Abbildung 3). Das System bedient sich einer indirekten Manipulation von Flüssigkeit, wodurch der Name sich der Name „indirekte Mikrofluidik“ herleitet. Grundsätzlich wird ein System dabei so aufgebaut, dass jeder Ein- und Ausgang zu einem einwegtauglichen mikrofluidischen Chip mit einem Ventil verbunden wird, der Fluss durch das System durch die Öffnung von jeweils nur einem ein- und einem ausgangsseitigen Ventil somit genau bestimmt ist. Gefördert wird dabei durch die Pumpe und die Ventile des Systems lediglich Tetradekan, welches zwischen einem Ein- oder Ausgang des Systems und dem dazugehörigen Ventil in einem sogenannten Fluidtauscher gegen das eigentlich ins System zu führende Medium (beispielsweise eine Proteinlösung) ausgetauscht wird. Ein Fluidtauscher ist dabei ein geschlossenes Gefäß, in welchem sich ein

stabiles Zweiphasensystem ausbildet, dessen einzelne Phasen jeweils mit einem Zufluss kontaktiert werden. Wird ein Volumenfluss in eine der beiden Phasen eingefördert, sie fließt das gleiche Volumen aus der anderen Phase heraus.

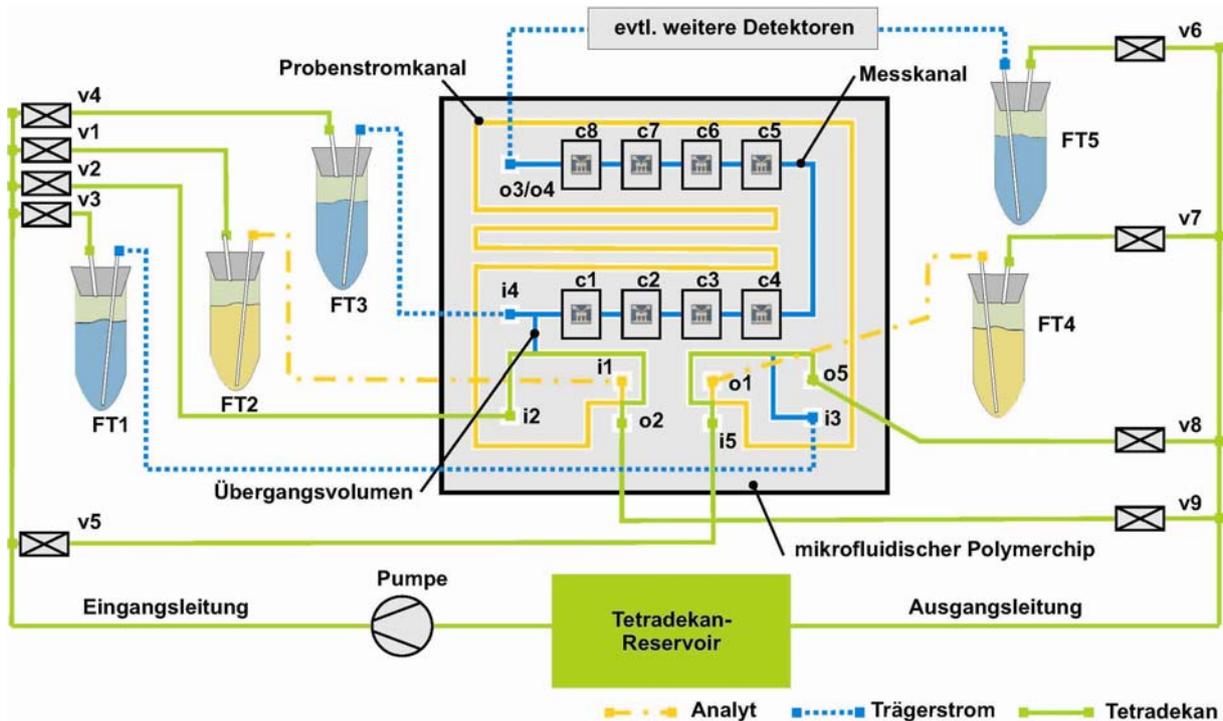


Abbildung 3 – Prinzipielle Darstellung des indirekten Mikrofluidiksystems. Aus einem Reservoir wird eine mit den durch das System zu fördernden Flüssigkeiten nicht mischbare Substanz (in diesem Fall Tetradekan) durch eine Pumpe gefördert. Je nach Stellung der Eingangs- und der Ausgangsventile (die über einen sogenannten Fluidtauscher mit einem Eingang in bzw. einem Ausgang aus dem fluidischen System verbunden sind) fließt Tetradekan in den angeschlossenen Fluidtauscher, aus welchem das im System zu führende Fluid in gleicher Menge und Volumenfluss wieder austritt. Die beiden Flüssigkeiten werden effektiv ausgetauscht. Die Substanz (beispielsweise eine Proteinlösung) fließt durch das System und verlässt es durch den Ausgang wieder, dessen angeschlossenes Ventil geöffnet ist. Auf diese Weise kann indirekt der Fluss durch das System kontrolliert werden, ohne dass Ventile und Pumpen in den mikrofluidischen Polymerchip integriert werden. Der Chip kann daher passiv und als Einwegkomponente ausgeführt werden.

Auf diese Weise ist es möglich, mikrofluidische Systeme so auszuführen, dass aktive und passive (und damit einweg- und mehrwegtaugliche Systemteile) streng getrennt werden können.

4. Messergebnisse

Im Rahmen des geförderten Projektes wurden eine Reihe von prinzipiellen, charakterisierenden Messungen nicht nur für die SAW Biosensorchips sondern auch für das skizzierte mikrofluidische durchgeführt. Exemplarisch sollen im Folgenden zwei Versuche gezeigt werden. In Abbildung 4 ist eine charakterisierende Messung gezeigt, bei der das entwickelte mikrofluidische System gegen einen bestehenden mikrofluidischen Aufbau und ein klassisches makroskopisches Fließinjektionsanalysesystem verglichen wurde. Neben dem Vorteil der Einwegtauglichkeit liefert das System durch die hohe Integration die schnellsten Sensorantworten und weist die geringsten Diffusionseffekten auf. Durch den Einsatz eines zweiten, nichtmischbaren Mediums ist es möglich, die Diffusion in solchen System vollständig zu unterdrücken. Ein solcher Versuch ist in Abbildung 5 gezeigt. Hier wurde jeweils vor und hinter einem Analytsegment im mikrofluidischen Kanal ein nicht mischbares Fluidsegment aus Tetradekan eingebracht. Der Sensor antwortet durch die Verwendung dieser Diffusionsbarriere mit nahezu rechteckigen Signalverläufen, welche die vollständige Unterdrückung von Diffusion belegen. Ein solcher Sensor kann in realen

Messsystemen schneller und unter Verwendung geringerer Mengen an Analyten und Proben verwendet werden.

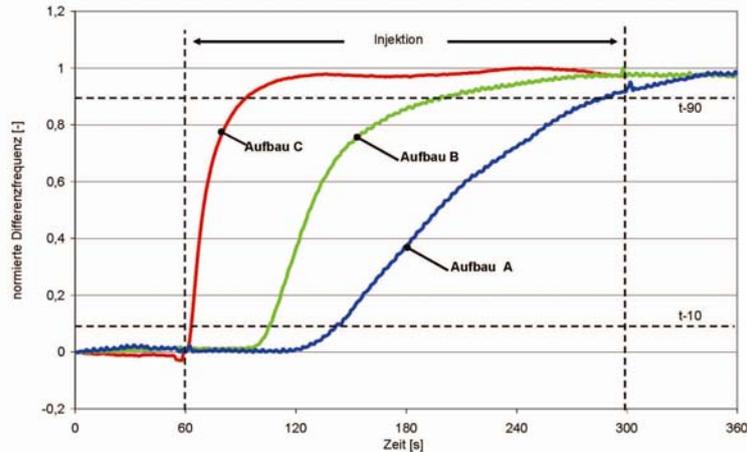


Abbildung 4 – Proteinadsorptionsmessungen mit Rinderserumalbumin (BSA) auf SAW Biosensorchips zur Charakterisierung verschiedener mikrofluidischer Aufbauten (A – Klassisches Fließinjektionsanalysesystem, B – Messungen mit einer zu Beginn des Projektes vorliegende Mikrofluidik, C – indirekte Mikrofluidik). Es ist deutlich zu erkennen, dass das indirekte mikrofluidische System die schnellsten Sensorantworten (im Bereich weniger Sekunden nach Beginn der Messung) liefert.

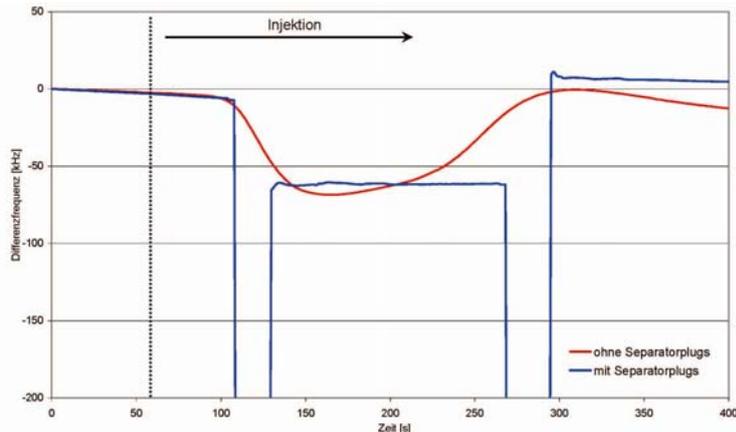


Abbildung 5 – Detektion der Änderung von Flüssigkeitsleitfähigkeit mit einem SAW Biosensor. Im indirekten mikrofluidischen System wurde durch das Einbringen kleiner Tetradekan-Separatorplugs vor und hinter der eigentlichen Messprobe im Flusskanal eine effektive Unterdrückung von Diffusionseffekten erreicht.

5. Ausblick

Der Stipendiat leitet mittlerweile eine eigene Nachwuchsgruppe, die sich mit der Weiterentwicklung der im Rahmen des geförderten Projektes entwickelten Ideen und Konzepte beschäftigt. Dieser Nachwuchsgruppe gehören zum heutigen Tage zwei Doktoranden und ein Ingenieur an. Schwerpunkte der Arbeit sind die Entwicklung mikrofluidischer Komponenten wie Mikroventile und -pumpen in monolithischer integrierter Bauweise, die Synthese und die Verwendung hochfluorierter Polymere für die Mikrofluidik, sowie die Herstellung und die Verwendung von Biosensoren für Interaktionsanalyse und Hochdurchsatzscreening.

Weiterführende, durch den Stipendiaten betreute Arbeiten, haben das Konzept der indirekten Mikrofluidik vertieft und die entwickelte Fertigungsplattform erweitert und ergänzt [6, 7]. Neben SAW basierten Biosensoren werden in der Arbeitsgruppe des Stipendiaten mittlerweile auch elektrochemische Sensoren entwickelt in Kombination mit mikrofluidischen Systemen eingesetzt [8, 9].

6. Publikationen und Patente

Die Promotion des Stipendiaten wurde mit der Note „summa cum laude“ abgeschlossen. Die Arbeit wurde mit dem Südwestmetall-Förderpreisträger ausgezeichnet. Aus der Arbeit wurden zahlreiche Konferenz- und Journalbeiträge publiziert [10-15]. Darüber hinaus wurde für das Konzept der indirekten Mikrofluidik ein Patent erteilt [16].

7. Literatur

- [1] G. G. Guilbault, M. Pravda, M. Kreuzer and C. K. O'Sullivan, "Biosensors - 42 years and counting", *Anal. Lett.*, **37** (2004).
- [2] K. Länge, B. E. Rapp and M. Rapp, "Surface acoustic wave biosensors: a review", *Anal. Bioanal. Chem.*, **391** (2008).
- [3] K. Länge, G. Blaess, A. Voigt, M. Rapp, E. Hansjosten and U. Schygulla, *Proceedings of the IEEE International Frequency Control Symposium and Exposition* (2005).
- [4] K. Länge and M. Rapp, "Influence of intermediate aminodextran layers on the signal response of surface acoustic wave biosensors", *Anal. Biochem.*, **377** (2008).
- [5] K. Länge and M. Rapp, "Influence of intermediate hydrogel layer and density of surface binding sites on the signal response of surface acoustic wave biosensors", *Sens. Actuators, B*, **142** (2009).
- [6] A. Günther, "Konstruktion einer automatisierten Fertigungsplattform für Biosensoren für die medizinische Diagnostik", Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (KIT) (2009).
- [7] C. A. H. Espitia, "Completion and startup of a fully automated assembly platform for biosensors", Master thesis, Karlsruhe Institut für Technology (KIT) / Fachhochschule Karlsruhe (2010).
- [8] K. Sachsenheimer, "Untersuchung von Methoden zur Messung von Leitfähigkeit und Dielektrizitätskonstante einer Trägerlösung innerhalb eines Mikrokanals", Master thesis, Forschungszentrum Karlsruhe (FZK) / Fachhochschule Karlsruhe (2009).
- [9] T. Nargang, "Oberflächenmodifikation von impedimetrischen Biosensoren", Bachelor thesis, Karlsruhe Institut für Technology (KIT) / Fachhochschule Karlsruhe (2010).
- [10] B. E. Rapp and M. Worgull, *Symposium on Design, Test, Integration and Packaging of MEMS/MOEM (DTIP)*, Sevilla, Spain (2010).
- [11] B. E. Rapp, K. Länge and M. Rapp, *International Meeting on Chemical Sensors IMCS*, Columbus, USA (2008).
- [12] B. E. Rapp, K. Länge, L. Carneiro and M. Rapp, *Biosensors 2008*, Shanghai, China (2008).
- [13] B. E. Rapp, F. J. Gruhl, K. Länge and M. Rapp, *IEEE Transducers*, Denver, USA (2009).
- [14] B. E. Rapp, L. Carneiro, K. Länge and M. Rapp, "An indirect microfluidic flow injection analysis (FIA) system allowing diffusion free pumping of liquids by using tetradecane as intermediary liquid", *Lab Chip*, **9** (2009).
- [15] B. Rapp, F. Gruhl and K. Länge, "Biosensors with label-free detection designed for diagnostic applications", *Anal. Bioanal. Chem.*, **398** (2010).
- [16] B. E. Rapp, L. Carneiro and A. Voigt, "Vorrichtung zur Erzeugung einer mikrofluidischen Kanalstruktur in einer Kammer, Verfahren zu ihrer Betrieb und ihre Verwendung", Germany, 102009035291 (2010).