

Institut für Biochemie und Biologie
Biologische Physik

Nichtlineare Kinetik und responsive Hydrogele
für
papierbasierte Schnelltestanwendungen

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines
doctor rerum naturalium
(Dr.rer.nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin

Biotechnologie

eingereicht an der

Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von

Robert Niedl

geboren am 23. Juni 1978 in Berlin

Potsdam, im Januar 2015

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-77735
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-77735>

Zusammenfassung

Viele klinische Schnelltestsysteme benötigen vorpräparierte oder aufgereinigte Analyte mit frisch hergestellten Lösungen. Fernab standardisierter Laborbedingungen wie z.B. in Entwicklungsländern oder Krisengebieten sind solche Voraussetzungen oft nur unter einem hohen Aufwand herstellbar. Zusätzlich stellt die erforderliche Sensitivität die Entwicklung einfach zu handhabender Testsysteme vor große Herausforderungen. Autokatalytische Reaktionen, die sich mit Hilfe sehr geringer Initiatorkonzentrationen auslösen lassen, können hier eine Perspektive für Signalverstärkungsprozesse bieten.

Aus diesem Grund wird im ersten Teil der vorliegenden Arbeit das Verhalten der autokatalytischen Arsenit-Jodat-Reaktion in einem mikrofluidischen Kanal untersucht. Dabei werden insbesondere die diffusiven und konvektiven Einflüsse auf die Reaktionskinetik im Vergleich zu makroskopischen Volumenmengen betrachtet.

Im zweiten Teil werden thermoresponsive Hydrogele mit einem kanalstrukturierten Papiernetzwerk zu einem neuartigen, kapillargetriebenen, extern steuerbaren Mikrofluidik-System kombiniert. Das hier vorgestellte Konzept durch Hydrogele ein papierbasiertes Lab-On-Chip (LOC)-System zu steuern, ermöglicht zukünftig die Herstellung von komplexeren, steuerbaren Point-Of-Care Testsystemen (POCT). Durch z.B. einen thermischen Stimulus, wird das Lösungsverhalten eines Hydrogels so verändert, dass die gespeicherte Flüssigkeit freigesetzt und durch die Kapillarkraft des Papierkanals ins System transportiert wird. Die Eigenschaften dieses Gelnetzwerks können dabei so eingestellt werden, dass eine Freisetzung von Flüssigkeiten sogar bei Körpertemperatur möglich wäre und damit eine Anwendung gänzlich ohne weitere Hilfsmittel denkbar ist. Für die Anwendung notwendige Chemikalien oder Enzyme lassen sich hierbei bequem in getrocknetem Zustand im Papiersubstrat vorlagern und bei Bedarf in Lösung bringen.

Im abschließenden dritten Teil der Arbeit wird ein durch Hydrogele betriebener, Antikörper-basierter Mikroorganismenschnelltest für *Escherichia coli* präsentiert. Darüber hinaus wird weiterführend eine einfache Methode zur Funktionalisierung eines Hydrogels mit Biomolekülen über EDC/NHS-Kopplung vorgestellt.

Abstract

Many test systems for clinical applications require well-prepared or purified analytes. Far away from a laboratory environment, for example in developing countries or crisis regions, such prerequisites are often difficult to establish. Furthermore, the required sensitivity poses a considerable challenge for the development of easy-to-use test systems. . Autocatalytic reactions, which are which are highly sensitive to small initiator concentrations, may offer promising solutions to this problem.

For this reason, in the first part of this thesis, the behavior of the autocatalytic arsenite-iodate-clock reaction is studied in a microfluidic environment. Especially the influence of diffusive and convective effects on the kinetics of the reaction were examined and compared to reaction conditions in macroscopic volumes.

In the second part thermoresponsive hydrogels and a microstructured papersubstrate are combined to a externally controllable, new microfluidic system driven by capillary force. This offers new opportunities to integrate more complex analytic procedures in small point-of-care devices. For example, initiated by a thermal stimulus, the solubility of the hydrogel network is changed, so that the stored liquid is released and transported into the paper device, driven by capillary forces. The properties of thermoresponsive hydrogels can be tuned in such a way that the liquid release is triggered already by body temperature, so that no pumps or tubings are required anymore for usage. Furthermore chemicals and enzymes can be stored in the paper channels under dried conditions for a long time. Upon operation of the device, they can be taken up by the liquid released from the hydrogel reservoirs when needed.

Finally, in the third part of this work, a rapid, easy-to-use hydrogel-driven test system for *Escherichia coli* is presented, based on an antibody assay. Futhermore a simple method for biofunctionalization of a hydrogel based on EDC/NHS coupling will be introduced.

Hinweis

Zitate nummeriert [i] und im Literaturverzeichnis alphabetisch mit Titel ausgeführt. In der Digitalversion sind die Zitate, Abkürzungen, Kapitelverweise und URL-Adressen als Link gesetzt. Zu dieser Arbeit gehört eine Daten-CD mit Filmmaterial zur besseren Anschauung.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Grundlagen	7
2.1. Verstärkung	7
2.2. Autokatalytische Reaktionen	8
2.2.1. Zeitliche Dynamik	8
2.2.2. Raumzeitliche Dynamik	9
2.2.3. Arsenit-Jodat Reaktion (Clock)	10
2.3. Mikrofluidische Systeme	12
2.3.1. Laminarer Fluss in einem Mikrokanal	13
2.3.2. Reaktions-Diffusions-Advektions-System	15
2.3.3. Paperfluidik	16
2.4. Hydrogele	17
2.5. <i>Escherichia coli</i> als Modelorganismus für Pathogene	18
3. Material und Methoden	20
3.1. Autokatalytische Arsenit-Jodat Reaktion	20
3.1.1. Herstellung der chemischen Reaktionslösungen	20
3.1.2. Durchführung der Arsenit-Jodat-Reaktion auf der Mikrotiterplatte	21
3.2. Mikrofluidische Hilfsmittel	23
3.2.1. Herstellung der Waferstruktur für die Softlithografie	23
3.2.2. Herstellung der PDMS basierten Mikrokanäle	24
3.3. Matlab-Simulation zur Arsenit-Jodat-Reaktion im Mikrokanal	25
3.4. Herstellung der Hydrogele	27
3.4.1. NIPAM-Hydrogel	28
3.4.2. NIPAM-Acrylamid Hydrogel	28
3.4.3. NIPAM-Acylsäure Hydrogel	29
3.4.4. Funktionalisieren eines Triethylenglycol-Hydrogels mit Antikörpern	30
3.5. Papierbasiertes Lab-On-Chip-System	32
3.5.1. Mikrokanalstrukturierung von Papiergeweben	32
3.5.2. Externe Freisetzung von Flüssigkeit in das papierbasierte LOC-System	33
3.6. Zellkultivierung von <i>Escherichia coli</i>	34
3.7. Mikroskopische Methoden	34
3.7.1. Olympus IX71	34
3.7.2. Messung im Mikrokanalsystem	35
3.7.3. Zeiss Axio Observer	38
3.7.4. Mikroskopische Aufnahmen der funktionalisierten Hydrogele	38
4. Ergebnisse	39
4.1. Verhalten eines autokatalytischen Systems im mikrofluidischen Kanal	39
4.1.1. Arsenit-Iodat Reaktion in der Mikrotiterplatte	40

4.1.2. Arsenit-Iodat Reaktion im Mikrokanal	43
4.1.3. Farbstoffdiffusion im Mikrokanal	47
4.1.4. Finite-Differenzen-Simulation im Linear kanal	50
4.1.5. Diskussion	62
4.2. Hydrogel gesteuerte Papierfluidik	67
4.2.1. Flüssigkeitstransport in mikrostrukturierten Papierkanälen	67
4.2.2. Temperaturverhalten von Hydrogelen im Probengefäß	69
4.2.3. Temperaturverhalten von Hydrogelen auf strukturiertem Papier	71
4.2.4. Hydrogele als Flüssigkeitsspeicher	72
4.2.5. Hydrogele als Wirkstoffspeicher	75
4.2.6. Diskussion	77
4.3. Verstärkung von Pathogennachweisreaktionen	79
4.3.1. Enzymatisch verstärkter E.coli-Schnelltest	79
4.3.2. Autokatalytische Clock-Reaktion zur Signalverstärkung von freigesetztem Kaliumjodid aus einem Hydrogelkollaps	82
4.3.3. E-Coli Bindung an ein funktionalisiertes Hydrogel	86
4.3.4. Diskussion	90
5. Zusammenfassung und Ausblick	93
6. Nachwort	95
Abkürzungsverzeichnis	98
Abbildungsverzeichnis	100
Anhang	108
A. Chemikalienliste	109
B. Protokoll zur Waferherstellung	110
C. MatLab-Quellcode	112
Literaturverzeichnis	118

Kapitel 1.

Einleitung

Die Faszination für komplexe Phänomene bei chemischen Reaktionen, beispielsweise Oszillationen oder Musterbildungen beschäftigt seit Generationen interessierte Forscherinnen und Forscher. Bereits Ende des 17. Jahrhunderts beschrieb Robert Boyle die periodische Lumineszenz von oxidierendem Phosphor^[103]. Etwa ein Jahrhundert später wurden weitere Beobachtungen für chemisch heterogen oszillierende Reaktionen des Eisen/Silber-Elektrodenpaares in einer salpetersauren Silbernitratlösung durch Gustav Theodor Fechner (1828)^[30] und des „schlagenden Quecksilberherzens“ durch Friedlieb Ferdinand Runge (1829)^[63] veröffentlicht. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts erfolgte schließlich mit dem Lotka-Volterra Modell die erste mathematische Beschreibung für chemische und biologische oszillierende Systeme durch Alfred Lotka^{[53],[54]} und Vito Volterra^[96]. Es stellte sich heraus, dass für ein oszillatives Verhalten ein sich selbst verstärkender Mechanismus (Autokatalyse), als auch eine Dissipation notwendig sind. Bei der Autokatalyse nimmt die Wachstumsrate einer Spezies in Form der chemischen Konzentration mit steigender Menge an eben dieser Spezies zu. Dieses führt mit anhaltender Produktion des Reaktionsproduktes während des Reaktionsablaufs zu einer stetigen Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit. Die Dissipation wirkt diesem Vorgang in Form einer Dämpfung entgegen, so dass sich stabile oszillierende Zustände in Form von Spiralen, Kreiswellen oder anderen Wellenfronten ausbilden können^[29]. Der wohl bekannteste Vertreter der oszillierenden chemischen Reaktionen ist die 1950 von Pavlovich Belousov entdeckte und von Anatol Zhabotinsky 1961 unabhängig untersuchte Belousov-Zhabotinsky Reaktion^[102], die im Gegensatz zu den oben dargestellten Reaktionen in einem homogenen Medium abläuft. Des Weiteren sind enzymatische oszillierende Reaktionen in der Biologie von besonderer Bedeutung. Sie sind in vielen essentiellen Lebensvorgängen wie der Zellatmung, dem Kohlenhydratstoffwechsel, der Mitose oder bei der Enzymsynthese in sehr begrenzten Reaktionsräumen zu finden^[83]. Aufgrund dieser Entdeckungen können oszillierende Reaktionen heute in drei Hauptgruppen unterschieden werden:

- 1.) biologische, meist enzymatisch funktionierende Systeme
- 2.) heterogene Systeme
- 3.) homogene Systeme.

Eine weitere Voraussetzung von Oszillationen ist nach Epstein, Kustin, DeKepler und Orban eine Bistabilität^[8], so dass innerhalb des Reaktionssystems (mindestens) zwei stabile Gleichgewichtszustände existieren müssen^[83]. Aufgrund unterschiedlicher Reaktionsgeschwindigkeiten der einzelnen Teilreaktionen oder unterschiedlichen Intermediärkonzentrationen schaltet der chemische Prozess zwischen diesen stationären Zuständen hin und her. Mitunter findet das Umschalten zwischen den Gleichgewichtszuständen nach einer lange anhaltenden Induktionsperiode statt. Die Dauer dieses Zeitintervalls wird von den Anfangsbedingungen der Reaktion beeinflusst, die man experimentell

sehr genau einstellen kann. Daher werden diese Reaktionssysteme auch als „Chemische Uhr“ oder „Clock-Reaktion“ bezeichnet. Die erste ausführliche wissenschaftliche Beschreibung einer chemischen Joduhr erfolgte 1886 durch den Schweizer Hans Heinrich Landolt und wird daher auch Landolt-Reaktion genannt^[49]. Zeitabhängige, autokatalytische Reaktionen können bereits durch sehr geringe Starterkonzentrationen ausgelöst werden. Diese Eigenschaft kann daher perspektivisch für eine Signalverstärkung von Prozessen genutzt werden, bei denen nur eine sehr geringe Anfangskonzentration oder ein sehr geringes Anfangsvolumen vorliegt. Im ersten Teil der vorliegenden Dissertation wird das Verhalten der stabilen Arsenit-Jodat-Clock-Reaktion in einem Mikrofluidikkanal und die Möglichkeiten für eine Anwendung als Verstärker untersucht.

Der zweite Teil dieser Arbeit besteht darin, mikrofluidische und verstärkende Methoden anzuwenden, um das Vorhandensein von wenigen Erregern in Lösungen oder Gasen kostengünstig und zuverlässig nachzuweisen. Die Auseinandersetzung mit Krankheiten, die Erforschung der Ursachen und die Suche nach Lösungen zur Bekämpfung von Krankheitserregern (Pathogenen) lässt sich bis in die Steinzeit zurück verfolgen^[34]. Als Pathogene werden für gewöhnlich Mikroorganismen bezeichnet, die in Wirtsorganismen Krankheiten hervorrufen^[77]. Bereits 1858 veröffentlichte der unter dem Spitznamen „Kleiner Doktor“ bekannte deutsche prominente Arzt Rudolph Virchow in seiner Arbeit *Cellularpathologie* die These, dass Krankheiten auf die direkte Störung von Zellen oder zumindest auf Funktionsstörungen innerhalb von diesen zurückgehen. Er hatte herausgefunden, dass jede neue Zelle durch Zellteilung aus einer vorherigen gebildet wird („omnis cellula e cellula“). Dadurch belegte er die durch Franz Meyen zu Beginn des 19. Jahrhunderts aufgestellte These, dass die Zelle als fundermentaler Grundbaustein des Lebens betrachtet werden kann^[88]. 1873 veröffentlichte Frederick Barnard seine theoretischen Überlegungen der „Keim-Theorie“^[4], in denen er darlegte, dass Keime in Form von Sporen durch die Luft verteilt werden und unter ausreichenden Bedingungen neues Wachstum generieren können. Drei Jahre später konnte Robert Koch das Bakterium *Bacillus anthracis* als Verursacher des Milzbrandes nachweisen^[48]. Acht Jahre später veröffentlichte Louis Pasteur seine Studien zu den pathogenen Mikroorganismen^[74] und beschrieb thermische Methoden, mit denen Pathogene abgetötet werden können. Heute ist diese Konservierungsmethode zu Ehren Pasteurs unter dem Namen *Pasteurisieren* etabliert.

1898 konnte Martinus Beijerinck bei der Untersuchung der experimentellen Daten von Adolf Mayer mit der Tabak-Mosaik-Krankheit von Pflanzen eine bakterielle Ursache ausschließen^[24]. Zur gleichen Zeit wurden ähnliche Ergebnisse von Löffler und Frosch bei der Untersuchung des Erregers der Maul- und Klauenseuche erzielt^[24]. Es wurde damit klar, dass die Definition von Pathogenen nicht nur auf Mikroorganismen beschränkt sein kann. 1917 schließlich entdeckte Félix d’Hérelle das Bakterienkulturen mit einem noch kleineren Erreger infiziert werden konnten. Er benannte den Erreger gemäß seinen gemachten Beobachtungen Bakteriophage (von phagein: essen) und postulierte, dass die gefundenen Phagenpartikel spezifische Bakterienviren sein müssten^[24]. Damit war klar, dass nicht nur Mikroorganismen in Form von lebenden Zellen krank machende Eigenschaften (Pathogenitäten) besitzen, sondern man kann für die Definition eines Pathogens alle bioaktiven Organismen, Partikel (Viren) oder gar Moleküle (Toxine) heranziehen, die die grundsätzliche Eigenschaft besitzen

den Wirtsorganismus krank zu machen. Mit Hilfe der Virulenz wird das Ausmaß ihrer Pathogenität unterschieden^{[13],[14]}.

Nach der Entdeckung der Pathogene war es möglich, gezielt Pharmazeutika zur Behandlung der Krankheiten zu entwickeln. Bahnbrechende Entwicklungen stellten die Serumtherapie von Emil von Behring 1890 dar, für die er 1901 den ersten Nobelpreis für Medizin erhielt^[12] und die des Penicillins, für das Alexander Flemming^[31] 1945 den Nobelpreis erhielt. Mit der Verfügbarkeit dieser wirksamen Arzneien in Form von Impfstoffen (Vakzinen) und Antibiotika wurden Seuchen wie Diphtherie, Thyphus, Tetanus und Gelbfieber in den Industrieländern nahezu ausgerottet.

Es stellte sich jedoch heraus, dass eine gar zu freizügige Behandlungsweise gerade mit Antibiotika in den letzten zwei Jahrzehnten eine Antwort in den Erregern in Form von Resistenzen hervorbrachte^[20]. Besonders in Krankenhäusern, in denen immungeschwächte Patienten dem Risiko von multiresistenten Erregern ausgesetzt sind, sind die Bemühungen für effektive Maßnahmen gegen diese Keime sehr groß^[62]. Aufgrund der hohen Wachstumsgeschwindigkeit von Bakterienkulturen bei optimalen Bedingungen können solche multiresistenten Stämme ein ernstes Problem darstellen.

Darüber hinaus existieren in unserer Umwelt einerseits Viren, die zwar eine hohe Virulenz aufweisen, jedoch in so geringer Häufigkeit auftreten, dass sich eine zeitlich aufwändige Impfstoffentwicklung nicht finanzieren lässt. Andererseits existieren virale Erreger, die eine sehr hohe Mutationsrate aufweisen und so den entwickelten Vakzinen immer einen Entwicklungsschritt voraus sind. Nicht vorhandene Vakzine oder zu spät eingesetzte Wirkstoffe können folglich zu einer rasanten Verbreitung dieser Erreger führen, wenn die Ansteckungswege zu spät erkannt oder nicht unterbunden werden. Als aktuelle Beispiele dieser Viren sind das Humane Immundefizienz-Virus (HIV), welches sich bezüglich seiner Symptomatik behandeln aber nicht mit Impfstoffen verhindern lässt, oder das erneute Auftreten des Ebola-Virus^{[28],[92],[5]} auf dem afrikanischen Kontinent zu nennen.

Um erfolgreich die Ausbreitung von resistenten Bakterien oder Viren mit einer hohen Virulenz einzudämmen oder gar zu verhindern, ist es zwingend erforderlich frühzeitig die übertragenen Wirte zu identifizieren, unter Quarantäne zu stellen und möglichst effektiv zu behandeln. Für die infizierten Personen mit dem bereits erwähnten Ebola-Virus beträgt die Zeit bis zum zweifelsfreien Nachweis beispielsweise zwischen 2 und 3 Tagen^[85]. Durch die beschränkten Ansteckungswege ergibt sich zudem für diesen Virustyp bislang noch eine verhältnismäßig langsame Verbreitungswelle und eine Ansteckungsgefahr liegt erst vor, wenn bereits Krankheitssymptome bei den Infizierten erkennbar sind. Die Brisanz für eine Verbreitung von Erregern mit starker Virulenz kann jedoch in dem Moment außer Kontrolle geraten, wenn die Ansteckung allein durch die Atemluft stattfinden kann und offensichtliche Krankheitssymptome nicht vorliegen. Aufgrund der hohen weltweiten Vernetzung durch Flugzeug- oder Bahnverkehr ergibt sich eine mögliche Verbreitungsgeschwindigkeit von wenigen Stunden oder Tagen. Bei diesem Szenario ist ein Eindämmen oder Unterbrechen der Ausbreitung nur über einen in großer Stückzahl vorliegenden Schnelltest möglich, wenn mit dessen Hilfe ein Identifizierungsnachweis innerhalb weniger Minuten oder Stunden geführt werden kann.

Eine ähnliche Situation liegt für die resistenten Bakterienstämme vor. Zwar findet hier in der Regel ein Verbreitungsweg über Schmier- und Kontaktinfektion statt, der nicht zwangsläufig mit einer Erkrankung des Infizierten enden muss. Jedoch sind Bakterien aufgrund ihrer hohen Wachstumsrate in der Lage Resistenzen gegen Antibiotika auszubilden und in Form von genetischem Material an andere Individuen innerhalb der Art weiterzugeben^[41]. Aufgrund der resultierenden Unempfindlichkeit gegenüber zelltoxischen Substanzen kann daher trotz Hygienevorkehrungen eine Vermehrung der resistenten Organismen erfolgen, die bei immungeschwächten oder operierten Patienten in die Blutbahn gelangen können und hier verschiedene Infektionen oder Blutvergiftungen auslösen^[82]. Aufgrund der entwickelten Resistenz ist eine Behandlung der Infizierten in der Folge schwierig bis unmöglich. Daher existiert hier an Krankenhäusern und medizinischen Einrichtungen der Bedarf nach Möglichkeiten, Patienten, Oberflächen und Geräte auf resistente Organismen zu überprüfen. Bei einem vorliegenden Positivbefund kann folglich entsprechend gehandelt bzw. gereinigt werden, um so eine Verbreitung dieser Mikroorganismen zu unterbinden.

Diese Notwendigkeiten waren der Anlass für eine Reihe von Forschungs- und Entwicklungsarbeiten^[44]. Durch die Entwicklung im Bereich der Genanalytik können über Abstrichverfahren und labor diagnostische Methoden pathogene Erreger zweifelsfrei nachgewiesen werden. Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, anhand von einigen wenigen Desoxyribonukleinsäure (DNA)- oder Ribonukleinsäure (RNA)molekülen einen sehr sensitiven Pathogennachweis zu führen^[40]. Da diese Nachweismethode jedoch ein labor diagnostisches Verfahren ist, wird eine umfangreiche Infrastruktur benötigt, um auf diese Methode zurückgreifen zu können. Die entnommenen Proben müssen zuerst eingesammelt, eingeschickt, labortechnisch bearbeitet und abschließend mit Computertechnik zu einem Befund ausgewertet werden. Diese Vorgehensweise nimmt mehrere Stunden in Anspruch und ist daher für schnelle Massenscreenings z.B. an Flughäfen und Bahnhöfen ungeeignet.

Im gleichen Maße wie sich die molekulare Bioanalytik entwickelt hat, wurden aufgrund der teils kostenintensiven Analysesubstanzen parallel eine Reihe von Fortschritten in den Mess- und Arbeitsmethoden erzielt. Die Entwicklung der Lab-On-Chip (LOC) Systeme ermöglicht seitdem die Messung in Mikro- und Nanolitervolumina^[16]. Darüber hinaus konnten die Kapillareigenschaften von Papieren und anderen Fasernetzwerken genutzt werden, um kostengünstige papierbasierte Einweg Schnelltestverfahren mit Hilfe von Druck- und Beschichtungsmethoden herzustellen^{[59],[1]}. Diese Einwegtestsysteme sind jedoch aufgrund der eingeschränkten Kontrollierbarkeit von Flüssigkeiten nur für die Untersuchung von einzelnen Substanzen einsetzbar. Zeitversetzte Vorgänge wie Zellaufschlüsse oder aufeinander folgende Flüssigkeitszufuhr sind mit dieser Technik noch nicht möglich.

Gesamtziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, ein System oder eine Methodik zu entwickeln, um spezifische Pathogennachweise mit Hilfe geeigneter chemischer Reaktionen durchzuführen und derart zu verstärken, dass das Vorhandensein von wenigen Erregern zweifelsfrei erkannt werden kann. Ein langfristiges Ziel der andauernden Forschungsarbeiten ist es, die Vorteile nichtlinearer chemischer Reaktionen als Verstärker im Rahmen von papierbasierten Schnelltestsystemen nutzbar zu machen. Dabei soll das System alle notwendigen Substanzen vor Ort bereitstellen, den Messvorgang nach dem Auslösen autonom durchführen und dem Anwender das Resultat über ein einfaches optisches

Signal anzeigen. Idealer Weise sind die Herstellungskosten minimal, um die Methode in Form eines Einwegtestsystems bereitzustellen.

Im folgenden Kapitel 2 wird zuerst eine Übersicht und Definition über die Verstärkung von chemischen und biochemischen Signalen gegeben(2.1). Danach wird ein kurzer Exkurs über das Verhalten von autokatalytischen Systemen durchgeführt und speziell das Reaktionsverhalten der in der Arbeit verwendeten autokatalytischen Arsenit-Jodat-Reaktion als Verstärkungsreaktion vorgestellt. Anschließend folgt in Unterkapitel 2.3 eine Einführung in die genutzten mikrofluidischen Systeme, wobei ein besonderes Augenmerk auf die Mikrofluidik in Papierkanälen gerichtet wird, da diese eine Reihe von nützlichen physikalischen Eigenschaften für ein Schnelltestsystem mitbringen. In Kapitel 2.4 der Grundlagen werden die Eigenschaften von thermoresponsiven Hydrogelen vorgestellt, deren Kollapsverhalten in den späteren Schnelltest-Systemen die autonom steuerbaren Flussprozesse erst möglich machen. Zum Abschluss des Kapitels Grundlagen wird in 2.5 der Modellorganismus *Escherichia coli* vorgestellt, der sich als sehr gutes Modell für die späteren pathogenen, bakteriellen Organismen herausgestellt hat.

In Kapitel 3 wird die Herstellung der verwendeten Materialien und Durchführung der angewendeten Methoden ausgeführt. Dabei gliedert sich der Aufbau dieses Kapitels im ersten Teil in die chemischen (3.1), mikrofluidischen (3.2) und numerischen (3.3) Methoden zur Untersuchung der autokatalytischen Arsenit-Jodat-Reaktion. Danach folgt der Methodenteil für die Erstellung eines papierbasierten, Hydrogel betriebenen Einwegschnelltestsystems. Im Teilkapitel 3.4 wird der Herstellungsprozess der Hydrogelkomponenten erläutert, gefolgt von der Erstellung des papierbasierten Lab-On-Chip-Systems in 3.5 und anschließend der Zellkultivierung des Modellorganismus *Escherichia coli* in 3.6. Abgeschlossen wird das Kapitel 3 durch die Erläuterung der mikroskopischen Methoden dieser Arbeit in 3.7.

Das Ergebniskapitel 4 gliedert sich in drei Abschnitte. Im ersten Abschnitt 4.1 werden die Ergebnisse der Messungen und der Simulationen von der autokatalytischen Arsenit-Jodat-Reaktion ausgeführt. Es werden die unterschiedlichen Verhaltensweisen der Reaktionskinetik in Reaktionsgefäßen und im Mikrokanal miteinander verglichen (4.1.1 und 4.1.2). Dann wird versucht die Unterschiede anhand der einzelnen Umgebungseinflüsse zu klären, indem Diffusionsversuche (Kapitel 4.1.3) und theoretische Simulationen (Kapitel 4.1.4) herangezogen werden. Das Kapitel 4.1 wird mit einer eigenen Diskussion beendet.

Im zweiten Abschnitt 4.2 werden die Flusseigenschaften durch den Kapillareffekt von strukturierten Mikrokanäle in Papier untersucht (4.2.1). Danach werden die unterschiedlichen Verhaltensweisen der temperatursensitiven Hydrogele in Bezug auf den Flüssigkeitsverlust im Eppendorfgefäß (4.2.2) und im Papierkanal (4.2.3) gezeigt. Zum Abschluss wird in Kapitel 4.2.4 und 4.2.5 untersucht, wie Hydrogele als Flüssigkeitsspeicher gezielt Flüssigkeiten und als Wirkstoffspeicher gezielt Lösungen an das darunter liegende Substrat abgeben können. Mit der Diskussion in Kapitel 4.2.6 wird der zweite Abschnitt abgeschlossen.

Im dritten Abschnitt des Ergebniskapitels 4 werden die Erkenntnisse aus den Kapiteln 4.1 und 2.3.3 kombiniert und in 4.3.1 zu einem Hydrogel gesteuerten *E. coli* Schnelltest zusammengestellt. Anschließend werden in Kapitel 4.3.2 weitere Möglichkeiten durch die Kombination eines Hydrogels mit einem autokatalytischen Farbstoffsystem und in Kapitel 4.3.3 ein Hydrogel mit selektiven Bindungseigenschaften für Mikroorganismen vorgestellt. Kapitel 4.3.4 schließt den dritten Abschnitt des Ergebniskapitels ab.

Am Ende der vorliegenden Arbeit wird in Kapitel 5 ein Gesamtresümé über die Hauptergebnisse gegeben, welcher einen Ausblick in zukünftige Anwendungen und Entwicklungen ermöglicht.

Kapitel 2.

Grundlagen

2.1. Verstärkung

Im Allgemeinen ist mit einer Verstärkung die Vergrößerung eines Signals assoziiert. Man stellt allerdings fest, dass eine genaue Definition von „Verstärkung“ in den unterschiedlichsten Arbeitsbereichen verschiedenartig aufgefasst werden kann. So wird dieser Begriff in der Psychologie, in der Biologie, im Verkehrswesen, der Telekommunikationstechnik und auch der Elektrotechnik verwendet. In der Verhaltenspsychologie wird der von einem Individuum als positiv wahrgenommener Reiz als Verstärker bezeichnet, der aufgrund eines kontingenten Verhaltens erfolgt und der Menschen oder Tiere veranlasst, die gleiche Verhaltensweise schneller oder vermehrt auszuführen^[91]. Im Verkehrswesen wird eine zusätzlich bereitgestellte Transportressource, die ein höheres Transportvolumen ermöglicht als Verstärker benannt^[35]. Die Definition in der Biologie betrifft eine charakteristische Basenabfolge in der DNA, aufgrund derer die Anlagerung eines Transkriptionsproteins für das Auslesen der genetischen Information begünstigt und das folgende Gen häufiger abgelesen wird^[19]. Alle drei Zuordnungen gehen auf den Sachverhalt „Mehr als der Normalzustand“ zurück.

Die Definition von einem Verstärker oder einer Verstärkung bezüglich einem Eingangssignal und einem resultierenden Ausgangssignal hingegen kommt aus der technischen Anwendung. Bei diesen Verstärkern wird ein Eingangssignal in der Regel linear so verarbeitet, dass ein deutlich höheres Ausgangssignal abgegeben wird^[61]. D.h. eine verdoppeltes Eingangssignal wird auch zu einer Verdopplung des verstärkten Ausgangssignal führen. Das Verhältnis aus Ausgangssignalstärke (S_{aus}) zum Eingangssignal (S_{ein}) ergibt die Verstärkung (V):

$$V = \frac{S_{aus}}{S_{ein}} \quad (2.1)$$

Die Verstärkung in Gleichung (2.1) ist dabei ein Wert ohne Einheiten, was bedingt, dass Eingangs- und Ausgangssignal gleiche Dimensionen haben müssen.

In der vorliegenden Arbeit geht es um die Verstärkung von Pathogenbindungsereignissen mit Hilfe nichtlinearer Reaktionen. Als Verstärkung werden hierbei mechanische, chemische und biologische Prozesse aufgefasst, die die Anfangskonzentration einer Substanz oder eines Mikroorganismus in Form einer sichtbaren Farbstoffkonzentration wiedergeben. Der gebildete Farbstoff weist dabei am Ende des Testverfahrens eine deutlich höhere Konzentration als die eingehende Substanzkonzentration auf. Das Eingangssignal wird hierbei jedoch nicht zwingend linear verarbeitet, sondern wird mit einem Ausgangssignal deutlich über dem Schwellwert der optischen Wahrnehmung für sehr geringe Pathogenkonzentrationen ohne weitere technische Hilfsmittel angezeigt. D.h. das Ergebnis ist ein

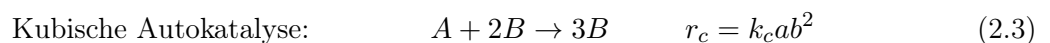
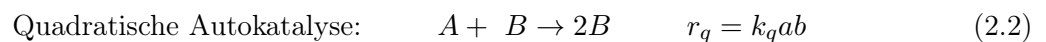
qualitativer Ja/Nein-Test, in dem das Ausgangssignal die Eingangskonzentration nicht quantitativ abbildet, sondern das Eingangssignal oberhalb eines Schwellwertes immer mit einer gleichbleibenden Farbstoffkonzentration angezeigt wird.

2.2. Autokatalytische Reaktionen

2.2.1. Zeitliche Dynamik

Autokatalytische Reaktionen zeichnen sich dadurch aus, dass mindestens eines der in der Gesamtreaktion entstehenden Produkte die Umsatzrate der Reaktion erhöht und somit direkt einen positiven Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt. Besitzt ein chemisches System mindestens zwei stabile oder stationäre Zustände und mindestens ein Reaktionsschritt beinhaltet eine positive Rückkopplung z.B. in Form der eben genannten Autokatalyse und befindet sich dieses System zudem außerhalb seines thermodynamischen Gleichgewichtszustandes, so können Phänomene wie z.B. Oszillationen oder deterministisches Chaos auftreten^[83]. Die Belousov-Zhabotinsky (BZ) Reaktion^[101] ist wohl der bekannteste Vertreter einer oszillierenden Reaktion.

Wenn der katalytisch wirkende Effekt eine stete Zunahme der Eduktkonzentrationen bewirkt, so führt dieses zu einer anhaltenden Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit. Je nach Geschwindigkeitszunahme zu Beginn der Reaktion lassen sich folgende Grundformen der Autokatalyse unterscheiden^[84]:



r_q und r_c repräsentieren die Umsatzraten, die sich aus dem Massenwirkungsgesetz mit den Konzentrationen a und b der Stoffe A und B in mol/l ergeben. k_q und k_c stellen die zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten dar. Der zeitliche Konzentrationsverlauf lässt sich aus den Gleichungen (2.2) und (2.3) als

$$\frac{\partial b}{\partial t} = +k_q ab \quad \text{bzw.} \quad \frac{\partial b}{\partial t} = +k_c ab^2 \quad (2.4)$$

darstellen, mit einem stöchiometrischen Koeffizienten von +1. Autokatalytische Systeme lassen sich entweder mit einer der genannten Gleichungen modellieren oder auch mit einer gewichteten Kombination aus beiden Gleichungen^[84]. Das im Folgenden vorgestellte autokatalytische System der

Arsenit-Jodat-Reaktion ist ein Vertreter, der sich mit solch einer gewichteten Kombination beschreiben lässt .

2.2.2. Raumzeitliche Dynamik

Reaktions-Diffusions-Systeme (RD-Systeme) beschreiben als mathematisches Modell lokale Wechselwirkungen, bei denen zusätzlich eine Diffusion auftritt. In einem unbewegten, nicht durchmischten homogenen System lässt sich der Konzentrationsverlauf einer Reaktion mit folgender Differentialgleichung darstellen:

$$\partial_t \mathbf{c} = \mathbf{D} \nabla^2 \mathbf{c} + R(\mathbf{c}) \quad (2.5)$$

Hierbei stellt $\mathbf{c} = \mathbf{c}(\mathbf{r}, t)$ die Konzentrationen der Substanzen, \mathbf{D} die Diagonalmatrix der stoffspezifischen Diffusionskonstanten und $R(\mathbf{c})$ die lokale Reaktionskinetik dar. Durch die Kopplung beispielsweise einer oszillierenden chemischen Reaktion mit einem Diffusionsvorgang können charakteristische Muster durch fortlaufende Fronten in Form von Wellen oder Spiralen entstehen. Abbildung 2.1a) zeigt ein solches Muster für die bereits erwähnte BZ-Reaktion in einer Petrischale. Im Gegensatz zu oszillierenden Reaktionen würde sich in einem nur einmalig anregbaren Medium folglich jeweils eine Reaktionsfront vom Initiationsursprung im Medium ausbreiten, wie in Abbildung 2.1b) dargestellt.

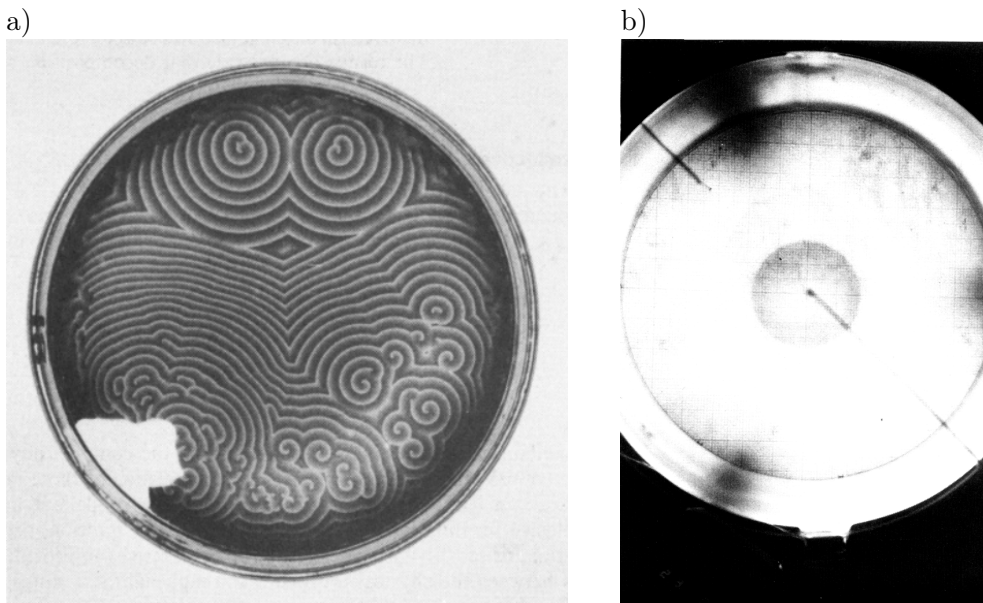
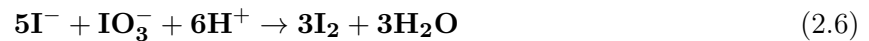


Abb. 2.1.: a) Darstellung der BZ-Reaktion in einer Petrischale (nach Yamaguchi *et al.* 1991)^[100]. b) Farbbandendarstellung der Jodat-Arsenit-Reaktion in der Petrischale. Im Gegensatz zur BZ-Reaktion findet der Farbumschlag hier nur einmal statt (nach Hanna *et al.* 1982)^[43].

2.2.3. Arsenit-Jodat Reaktion (Clock)

Ein Vertreter der autokatalytischen Reaktionen, der in dieser Arbeit behandelt wird, ist die Arsenit-Jodat Reaktion. Ihre Charakteristik besteht darin, dass während des Reaktionsverlaufes erst nach einem, von den Anfangsbedingungen abhängigen, Zeitintervall ein Farbumschlag von farblos auf schwarz bzw. von farblos auf rot stattfindet. Die resultierende Farbe hängt hierbei von der Wahl des Indikators ab. Wird Stärke als Indikator gewählt, so erhält man eine dunkelblaue bis schwarze Färbung, wird hingegen Polyvinylalkohol (PVA) gewählt, so zeigt sich eine rote Färbung. Aufgrund des Zeitintervalls wird diese Reaktion auch die „Joduhr“ oder „Clock-Reaktion“ genannt.

Die aus mindestens sieben Teilschritten bestehende Reaktion lässt sich nach Papsin et al. (1981) mit den folgenden zwei Gesamtreaktionsschritten beschreiben [72]:



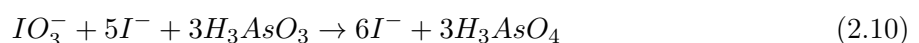
Der Reaktionsprozess (2.6) wird Dushman-Reaktion, der Prozess in (2.7) hingegen Roebuck-Reaktion genannt. Die Umsatzrate der Dushman-Reaktion wurde experimentell bestimmt und kann wie folgt dargestellt werden [26]:

$$\mathbf{r}_{Dush} = (k_1 + k_2[\text{I}^-]) \cdot [\text{I}^-] \cdot [\text{IO}_3^-] \cdot [\text{H}^+]^2 \quad (2.8)$$

mit den Reaktionskonstanten $k_1 = 4.5 \cdot 10^3 \text{M}^{-3} \text{s}^{-1}$ und $k_2 = 1.0 \cdot 10^8 \text{M}^{-4} \text{s}^{-1}$. Das Reaktionsprodukt Jod der Dushman-Reaktion wird in der deutlich schneller ablaufenden Roebuck-Reaktion konsumiert und schließlich zu Jodid umgesetzt. Die Umsatzrate dieser Reaktion lässt sich nach Stephen K. Scott [84] empirisch ausdrücken als:

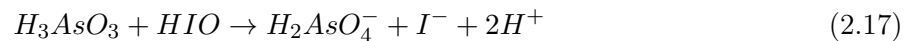
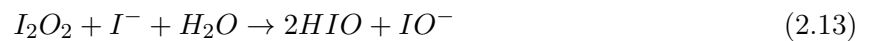
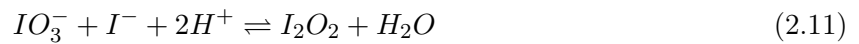
$$\mathbf{r}_{Roeb} = k_3 \cdot \frac{[\text{I}_2] \cdot [\text{H}_3\text{AsO}_3]}{[\text{I}^-] \cdot [\text{H}^+]} \quad (2.9)$$

mit der Geschwindigkeitskonstanten $k_3 = 3.2 \cdot 10^{-2} \text{M} \text{s}^{-1}$. Der autokatalytische Schritt wird offensichtlich, wenn man (2.6) und (2.7) zu folgender Gesamtreaktion zusammenfasst [84]:



Es ist erkennbar, dass 5 Mol Jodid-Ionen in die Reaktion eingehen, und 6 Mol Jodid-Ionen aus der Reaktion hervorgehen. D.h. je Reaktionsschritt entsteht ein Mol Jodid. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird aufgrund der langsamer ablaufenden Dushman-Reaktion von dieser bestimmt^[33].

In der Regel wird die Arsenit-Jodat-Reaktion über die Gleichungen (2.6) und (2.7) dargestellt. Wie bereits beschrieben liegen diesen beiden Reaktionen eine Mehrzahl an Reaktionsschritten zugrunde. Für eine Simulation ist es daher sinnvoll anstelle der zusammengefassten Reaktionsgleichungen die Einzelreaktionsschritte zu verwenden, um den Einfluss der einzelnen Umsatzraten genauer in der Berechnung zu berücksichtigen. Für eine genauere Betrachtung wurden daher die im Folgenden nach Papsin et al. 1981^[72] aufgeführten Reaktionsschritte für die Simulationen in dieser Arbeit verwendet:

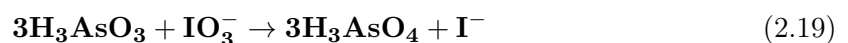


Für den Reaktionsablauf ist das Konzentrationsverhältnis R von Arseniger Säure zur Jodat-Lösung von entscheidender Bedeutung:

$$R = \frac{c[\text{H}_3\text{AsO}_3]}{c[\text{IO}_3^-]} \quad (2.18)$$

Es lassen sich nach Forštová et al. (2000)^[33] anhand dieses Konzentrationsverhältnisses drei Regime unterscheiden:

- i) $R > 3$ Die Konzentration der Arsenigen Säure liegt im Überschuss vor. Dann wird das Reaktionsprodukt folgendermaßen beschrieben:



Die Jodid-Ionen bleiben hier als finales Reaktionsprodukt erhalten, daher liegt die Lösung am Ende farblos vor.

- ii) $\frac{5}{2} < R < 3$ Die Anfangskonzentrationen von Jodat und Arseniger Säure wurden vollständig aufgebraucht und Jodid sowie Jod liegen als Endprodukt in der Lösung vor.

- iii) $R < \frac{5}{2}$ Die Jodatkonzentration liegt im stöchiometrischen Überschuss gegenüber der Arsenigen Säure vor. Somit lässt sich die Reaktion wie folgt darstellen:



Zum Ende der Reaktion liegt Jod und Jodat vor und die Lösung zeigt sich durch das eingelagerte Jod je nach gewähltem Indikator in der entsprechenden Farbe schwarz (Stärke) oder rot (PVA).

Die folgende Abbildung 2.2 zeigt die Raum-Zeit-Muster zu den drei Regimen in der Petrischale:

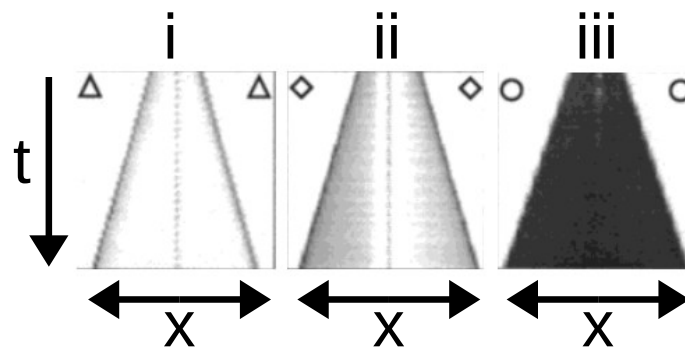


Abb. 2.2.: Darstellung des Raum-Zeit-Musters der Clock-Reaktion der Regime i) bis iii) in der Petrischale. Es ist jeweils die Position der Reaktionsbande oder -front von der Bildmitte nach außen verlaufend (x) zum jeweiligen Zeitpunkt (t) dargestellt. (nach Forštová *et al.* 2000 [33]).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Reaktion in der Ausgangssituation iii) mit $R < \frac{5}{2}$ verwendet. D.h. am Ende der Reaktion ist die Arsenitkonzentration vollständig aufgebraucht und es liegt ein deutlicher Farbumschlag vor. D.h. das Raum-Zeit-Muster in einem unbewegten, nicht durchmischten, homogenen Medium äußert sich in Form einer Farbumschlagsfront die sich in einem farblosen Medium ausbreitet, bis die gesamte Lösung schwarz, bzw. rot gefärbt vorliegt.

2.3. Mikrofluidische Systeme

In den letzten drei Jahrzehnten hat sich die Mikrofluidik als neuer Teilbereich der Mikrosystemtechnik etabliert^[9]. Der Anwendungsbereich dieser Disziplin reicht von der Herstellung chemischer^[22] und biochemischer Substanzen in großindustriellem Maßstab mit dem Ziel einer maximal hohen Ausbeute^{[55] [32]}, über labortechnische Analysemethoden^[68] bis hin zur Vor-Ort-Diagnostik im Life-science Bereich^{[93] [17]}. Im Bereich der Mikrofluidik wird definitionsgemäß mit Kanalstrukturen ge-

arbeitet, die einen Durchmesser von wenigen Mikrometern und Längen bis zu einigen Zentimetern haben^[64]. Die benötigten Volumenmengen in diesen Kanaldimensionen entsprechen wenigen Nanolitern und können bei der Verwendung von 2-Phasensystemen (Droplet-Chips) sogar bis auf Pikolitervolumina verringert werden^{[89] [42]}. Durch diese Miniaturisierung der Reaktionsumgebung sind andere charakteristische Eigenschaften in Bezug auf die Flussbedingungen zu berücksichtigen, als es bei einem Reaktionsgefäß mit Volumengrößen von Litern oder Millilitern der Fall wäre. In der Regel liegt in den Mikrokanälen ein laminares Flussverhalten vor. D.h. es findet ohne zusätzliche Hilfsmittel kein turbulentes oder chaotisches Mischen statt^[86]. Durch Hindernisstrukturen im Mikrokanal und einer variablen Volumendurchsatzrate von mehreren $\mu\text{l}/\text{min}$ konnte gezeigt werden, dass sich das laminaire Flussregime stören^[87] lässt.

Mit Hilfe der dimensionslosen Reynoldszahl (Re) lässt sich abschätzen, wann das laminaire Flussverhalten instabil wird und ein Turbulenzverhalten in der betrachteten Kanalstruktur auftreten kann. Sie ist als Verhältnis aus dem Produkt von Flussgeschwindigkeit (v), Dichte des Fluids (ρ) und einer charakteristischen Längenskala (l) zur dynamischen Viskosität (η) definiert^[78]:

$$Re = \frac{v \cdot \rho \cdot l}{\eta}. \quad (2.21)$$

2.3.1. Laminarer Fluss in einem Mikrokanal

In den Experimenten dieser Arbeit wird ausschließlich ein rechteckiges Kanaldesign verwendet. Für die Bestimmung der Reynoldszahl in diesem Kanaltyp wird anstelle der charakteristischen Längenskala l der hydraulische Durchmesser D_h verwendet^[71]. Der hydraulische Durchmesser errechnet sich dabei als die vierfache Querschnittsfläche des Kanals (A_{cross}) durch den Benetzungsperimeter (l_{bp}), der sich aus der Summe der benetzten Seitenlängen des Kanalquerschnitts ergibt^[71]:

$$D_h = \frac{4 \cdot A_{cross}}{l_{bp}}, \quad l_{bp} = \sum_{i=1}^4 l_i \quad (2.22)$$

Dadurch ergibt sich aus Gleichung 2.21 für die Reynoldszahl eines rechteckigen Mikrokanals folgender Ausdruck:

$$Re = \frac{v \cdot \rho \cdot D_h}{\eta}. \quad (2.23)$$

In vorangegangenen Arbeiten wurde für Mikrokanäle mit rechteckigem Querschnitt ein laminares Flussverhalten für wässrige Lösungen für Reynoldszahlen von weniger als 200-700 bestimmt^[75]. Bei spezieller Geometrieänderung des Mikrokanals im Zuführungsbereich der Lösung lassen sich diese Werte auch bis $Re = 50$ weiter verringern^[70]. Bei Reynoldszahlen weit darunter ist davon auszugehen, dass immer ein laminares Flussverhalten vorliegt. In der vorliegenden Arbeit liegt die

Reynoldszahl bei den verwendeten Flussgeschwindigkeiten zwischen 0,2 und 0,02. Daher wird hier immer ein laminares Flussverhalten vorausgesetzt.

Das Geschwindigkeitsprofil in einem rechteckigen Mikrokanal wird durch das Seitenverhältnis (ϵ) des Kanalquerschnitts bestimmt. Die Form des Geschwindigkeitsfeldes für unterschiedliche Kanalverhältnisse ist in Abbildung 2.3 nach Brody et al. (1996)^[9] dargestellt.

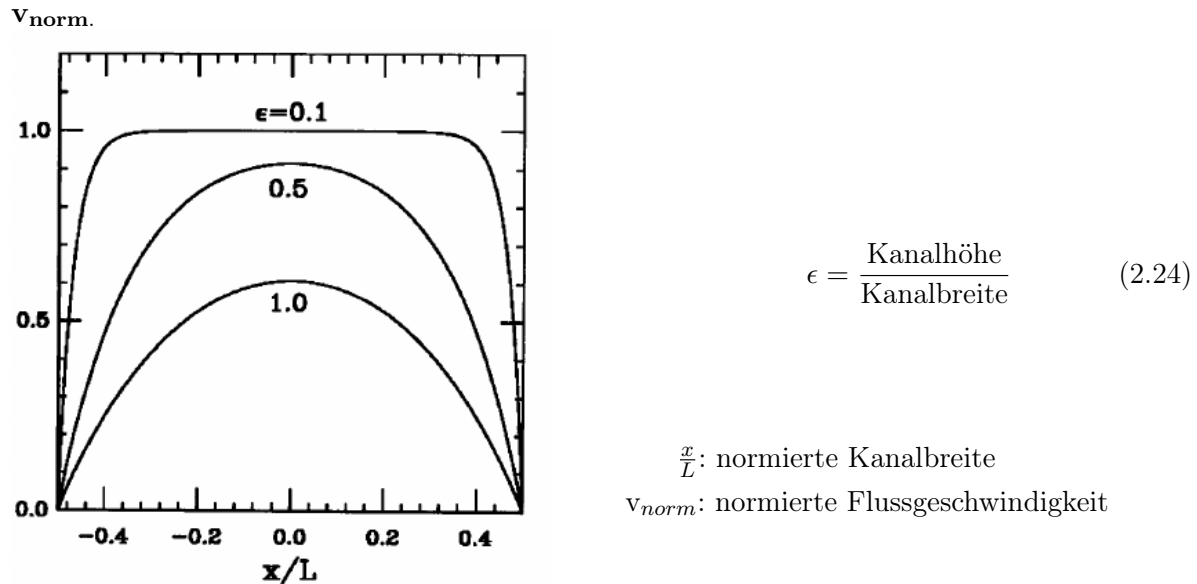


Abb. 2.3.: Darstellung des Geschwindigkeitsprofils in Flussrichtung entlang der Kanalbreite x . Die Geschwindigkeitswerte wurden normalisiert. ϵ gibt das Seitenverhältnis des Kanalquerschnitts an (entnommen aus Brody et al. 1996^[9]).

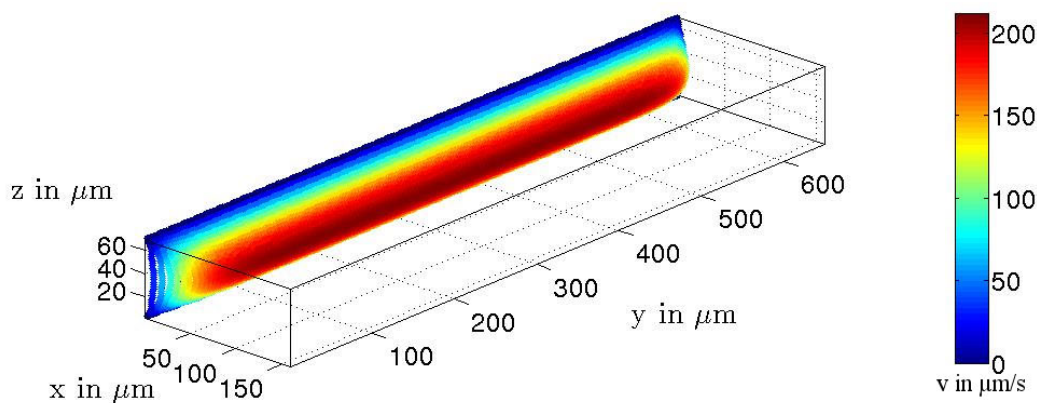


Abb. 2.4.: Simuliertes Geschwindigkeitsprofil in einem Mikrokanal mit einer Kanalbreite von 650µm und einer Kanalhöhe von 69µm. Dieses entspricht einem ϵ von 0,1.

Mit abnehmender Kanalhöhe flacht das Geschwindigkeitsprofil in der Kanalmitte ab, wie in Abbildung 2.4 dargestellt. Im gleichen Maße nimmt die Steigung des Geschwindigkeitsgefälles zur Kanalwand zu, da direkt an der Kanalwand bei einer sogenannten „No-Slip-Boundary“ die Flussgeschwindigkeit Null wird. Aufgrund dessen treten die Scherströmungen, hervorgerufen durch die

verschiedenen Strömungsgeschwindigkeiten in den einzelnen Fluidschichten, mit abnehmender Kanalhöhe bzw. zunehmender Kanalbreite dicht am Kanalrand auf. Die Folge ist ein abgeflachtes Strömungsprofil über die Kanalbreite und ein parabelförmiges Strömungsprofil über die Kanalhöhe wie in Abbildung 2.4 dargestellt. Ein parabelförmiges Strömungsprofil erhöht die effektive Diffusivität, wodurch der Ausgleich eines Konzentrationsgradienten erleichtert wird. Dieser Prozess wird als Taylor-Dispersion bezeichnet^[18]. In der vorliegenden Arbeit wird daher vorausgesetzt, dass der Konzentrationsausgleich über die Kanalhöhe unverzüglich erfolgt und daher der Konzentrationsverlauf über die Kanalbreite in einem 2D-Feld simuliert werden kann.

2.3.2. Reaktions-Diffusions-Advektions-System

In der vorliegenden Arbeit wird das Verhalten von autokatalytischen Reaktionen in mikrofluidischen Kanälen unter Strömungsbedingungen untersucht. Das Konzentrationsverhalten von Substanzen in einem solchen Reaktions-Diffusions-Advektions-Prozess (RDA-Prozess) kann ausgehend von Gleichung (2.5) in Kapitel 2.2.2 zur folgenden Reaktions-Diffusions-Advektions (RDA) Gleichung erweitert werden:

$$\partial_t \mathbf{c} = \vec{v} \cdot \nabla \mathbf{c} + \mathbf{D} \nabla^2 \mathbf{c} + R(\mathbf{c}) \quad (2.25)$$

Mikrofluidische Systeme zeichnen sich dadurch aus, dass aufgrund von sehr kleinen Reynoldszahlen eine Durchmischung von Substanzen nur über diffusiven Transport zwischen den Schichten der laminaren Strömung stattfindet (vgl. Kapitel 2.3). Im kontinuierlichen Fluss wird im Mikrokanal der Einfluss der Diffusion mit der Advektion bezüglich der Stoffverteilung konkurrieren. Um eine Abschätzung vorzunehmen welcher der beiden Vorgänge den größeren Einfluss in den durchgeführten Experimenten ausübt, kann die Péclet-Zahl herangezogen werden^[65]. Sie ist wie die Reynoldszahl dimensionslos und stellt das Verhältnis von advektiver zur diffusiven Transportrate dar. Sie wird gebildet aus der charakteristischen Länge l , der Flussgeschwindigkeit v und dem Diffusionskoeffizienten D :

$$Pe = \frac{l \cdot v}{D} \hat{=} \frac{\text{Advektion}}{\text{Diffusion}} \quad (2.26)$$

Aus Gleichung (2.26) ist zu erwarten, dass für $Pe \ll 1$ die Diffusion und für $Pe \gg 1$ die Advektion überwiegen wird.

2.3.3. Paperfluidik

Die Fortschritte durch mikrofluidische Anwendungen ermöglichen eine Analytik bei sehr begrenztem Flüssigkeitsvolumen. Dieses führte zu einer deutlichen Kostenreduzierung bei den einzusetzenden Chemikalien gerade bei aufwendig hergestellten oder isolierten Biomolekülen. Im Bereich der Vor-Ort-Diagnostik, in der Schnelltestsysteme als Einweganwendungen in hoher Stückzahl eingesetzt werden, wurde der erreichte Kostenvorteil leider durch den hohen Einsatz an Materialkosten für das Gehäuse und Peripheriegeräten (z.B. Pumpen, Mikroschläuche, Ventile, etc.) wieder aufgezehrt. Aus diesem Grund stellte sich die Frage nach Alternativen, die eine günstige Mengenproduktion ermöglichen könnten. Dieses führte zur Verwendung von saugfähigen Papiersubstraten, da diese sich als kostengünstiges und auf vielfältige Weise gut zu strukturierendes Material herausstellten^{[59] [58]}.

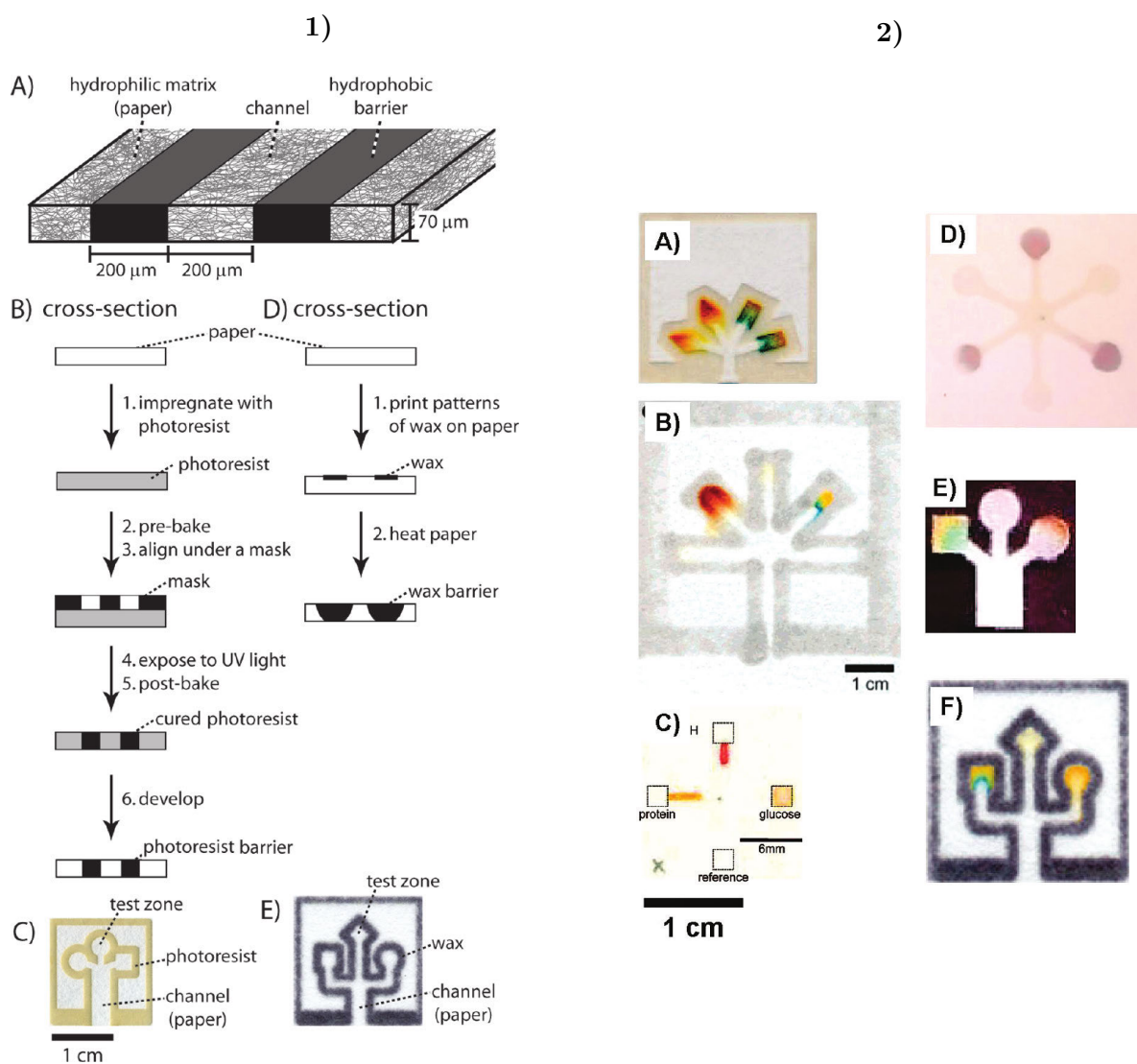


Abb. 2.5.: Strukturierungsmöglichkeiten von Papiersubstraten mit Hilfe von fotoaktivem Lack (photoresist) durch Belichten und Entwicklung (1B-C) oder thermisch mit Wachs (1D-E). Innerhalb der Kanalstrukturen lassen sich unterschiedliche Chemikalien vorlagern, die z.B. durch Farbreaktionen Substanzen nachweisen können (2A-F)(aus *Martinez et al.* 2010 ^[57]).

Des Weiteren stellt Papier durch seine substrateigenen Kapillarkräfte eine Flüssigkeit fördernde Funktion zur Verfügung, so dass in der Folge das notwendige technische Equipment für eine Testanwendung minimiert werden kann^[56]. Abbildung 2.5 zeigt schematisch die Strukturierungstechniken mit fotoaktivem Lack und mit Wachs, die von *Martinez et al.* 2010^[57] bereits durchgeführt wurden. Die strukturierten Bereiche lassen sich anschließend als getrennte Reaktionsräume nutzen, wie in Abbildung 2.5-2 dargestellt ist. Mehrere Papierlagen lassen sich zu einer 3D-Fluidik kombinieren. Hierbei bietet die Verwendung von Brücken mit verschiedenen Benetzungseigenschaften zwischen den einzelnen Lagen ein weiteres Hilfsmittel zur Kontrollierbarkeit von Flüssigkeiten auf den Papiersubstraten^[38]. Die Integration von komplexeren, aufeinander folgenden Aufreinigungs- oder Reaktionsschritten stellt die papierbasierten Testsysteme jedoch immer noch vor Herausforderungen. In der vorliegenden Arbeit wird ein Konzept für die Flüssigkeitskontrolle mit Hilfe von Hydrogelen vorgestellt, das diese Herausforderung löst.

2.4. Hydrogele

Hydrogele bestehen aus Polymerketten, die über Vernetzermoleküle zu einem Gesamtnetzwerk kovalent verbunden sind. Beinhalten die Monomermoleküle eine hydrophile Seitengruppe, bzw. sind in den Polymerketten hydrophile Bindungsbestandteile vorhanden, wie das beispielsweise beim Polyethylenglykol der Fall ist, so können Wassermoleküle über Wasserstoffbrücken mit dem Polymergerüst wechselwirken. Das hat zur Folge, dass sich Polymerpartikel im Submikrometermaßstab in Wasser auflösen lassen. Werden die Polymerketten mit den Vernetzermolekülen zu einem festen Makrogel verbunden, so erhält man eine zusammenhängende Platte, die in ihren mechanischen Eigenschaften sehr weichem Gummi entspricht, wie in Abbildung 2.6 dargestellt. Dieses Makrogel ist in der Lage ein vielfaches seines Eigengewichtes an Wasser einzulagern. Daher werden Vertreter dieser Gruppe in Hygieneartikeln wie z.B. Kinderwindeln als sogenannte Superabsorber verwendet^[10]. In der Biologie werden Hydrogele aus Acrylamid oder Agarose gern für die Auftrennung von Biomolekülen benutzt, da sie sich unkompliziert herstellen lassen und durch Variation der Mengen an Polymer und Vernetzer die Durchlässigkeit für Moleküle eingestellt werden kann^[67]. Aus diesem Grund gehört die Gelelektrophorese mittlerweile zu den Standardprotokollen in den biologischen Methoden^{[80] [81]}.

Durch die Verwendung von spezifischen Seitengruppen lassen sich die Quelleigenschaften in einem Hydrogel variieren. So können durch eine Mischung aus Monomeren mit hydrophoben (wasserabweisenden) und hydrophilen (wasserliebenden) Seitengruppen thermoresponsive Gele hergestellt werden. Hierbei wechselt das Polymergerüst in Abhängigkeit der Temperatur seine Eigenschaft bezüglich der Wasserlöslichkeit. Unterhalb einer Temperaturgrenze, die Lower-critical-solution-temperature (LCST) genannt wird, liegt eine vollständige Löslichkeit der Polymerkomponenten im Lösungsmittel vor. Als direkte Folge kann bei wasserlöslichen Polymeren mehr Wasser in das Gel eingelagert werden und das Gel nimmt durch einen Schwellvorgang an Größe zu. Bei Überschreiten der LCST wird das eingelagerte Wasser verdrängt. Das Gel kollabiert in diesem Temperaturbereich^[97].

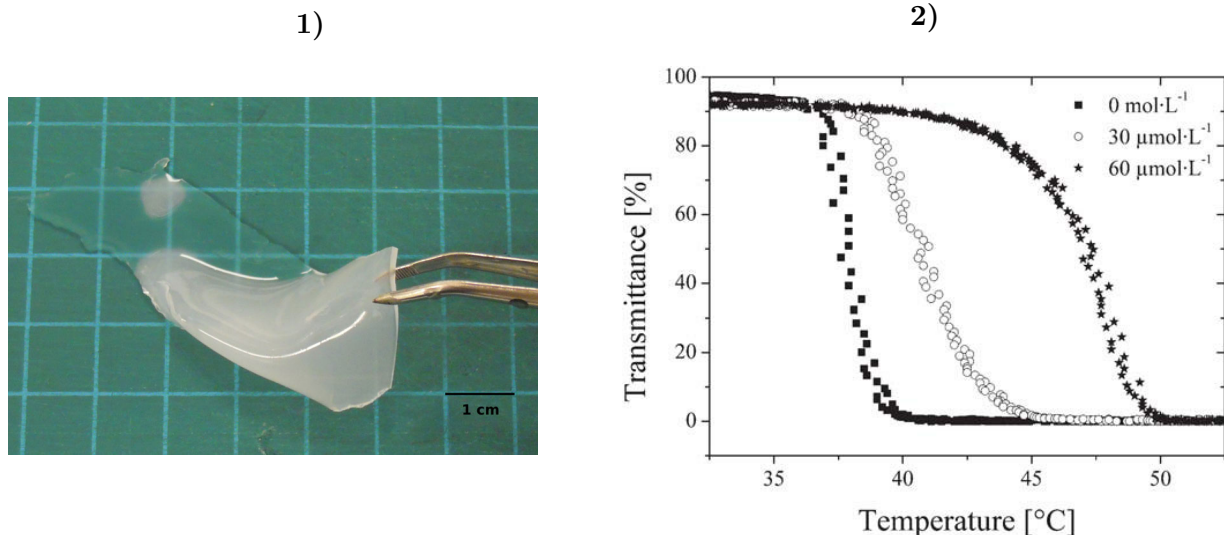


Abb. 2.6.: Acrylamid basiertes Hydrogel nach erfolgreicher Polymerisation, wie es in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. In Abbildung 2) ist ein Phasenübergang eines Hydrogels dargestellt, das mit Biotin funktionalisiert wurde. Durch Zugabe des Liganden Avidin wird der Phasenübergang in einen anderen Temperaturbereich verschoben (nach Buller *et al.* 2001^[11]).

Durch das Einfügen von Carboxyl-Gruppen in das Gelnetzwerk lassen sich ionisierbare Seitengruppen in das Hydrogel integrieren. Als Folge kann das Schwellverhalten mit Hilfe des pH-Wertes kontrolliert werden^[76]. Es konnte auch gezeigt werden, dass eine Integration von Seitengruppen, die ein Rezeptor-Liganden-Bindungsverhältnis eingehen können, als molekulare Schalter für das Schwellverhalten benutzt werden können^[11]. Hierbei wird die Phasenübergangstemperatur durch eine Ligandenbindung verschoben, wie in Abbildung 2.6-2 dargestellt. Dieses bedeutet, dass das Hydrogel in diesem Fall ohne den Liganden bereits bei etwa 38°C kollabieren würde, bei Anwesenheit des Liganden konzentrationsabhängig jedoch erst bei 42°C oder 48°C kollabiert. Aufgrund des Verdichtens (Kompaktieren) des Hydrogelgerüsts verändern sich die optischen Eigenschaften des Gels, so dass im dargestellten Fall die Lichtdurchlässigkeit abnimmt.

2.5. *Escherichia coli* als Modelorganismus für Pathogene

Escherichia coli (*E. coli*) ist ein gramnegatives, stäbchenförmiges und peritrich begeißeltes Enterobakterium, das im Darm von Warmblütern vorkommt^[27]. Bei normalem Zellwachstum der Bakterienkultur und intaktem Immunsystem des Wirtes liegt eine symbiotische Lebensweise vor, da *E. coli* unter anderem Vitamin K und Biotin produziert und dem Wirt zur Verfügung stellen kann^[79]. Bei immungeschwächten Individuen und massenhafter Vermehrung von pathogenen Stämmen des Bakteriums, wie dem enterohemorrhagischen *E. coli* (EHEC) kann es durch die Bildung von Toxinen und anderen Pathogenitätsfaktoren zu einer nachhaltigen Schädigung des Wirtsorganismus kommen^[21].

E. coli besitzt zwei Arten von fadenförmigen Strukturen an der Zelloberfläche, wie in der Rasterkraftmikroskopieaufnahme der Abbildung 2.7 zu sehen ist. Die langen über den Bildrand hinausgehenden Strukturen werden Flagellen genannt. Diese sind über einen drehbaren, aus Proteinen bestehenden Motorkomplex in der Zellwand verankert und dienen dem Zellkörper zur Fortbewegung. Die deutlich kürzeren, haarähnlichen Strukturen werden Pili oder Fimbrien genannt. Sie bestehen ebenfalls aus Proteinen und ermöglichen es den Bakterien sich an Oberflächen zu heften^[27].



Abb. 2.7.: Darstellung der Zelle des in der Arbeit verwendeten Modellorganismus *Escherichia coli*. Sichtbar ist der Zellkörper, die Strukturen der Fimbrien (faserige Struktur um den Zellkörper) und die Flagellen (lange Fasern über den Bildrand hinaus). Das Bild wurde mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie erstellt. (Aufnahme von Ang Li, University of Singapore^[51])

E. coli ist aufgrund seiner Robustheit und der gegenüber anderen Organismen anspruchslosen Kultivierbarkeit auch in Laboren geringer Sicherheitsstufe (S I) bei Biochemikern, Genetikern und Molekularbiologen als Forschungsobjekt sehr beliebt^[79]. Aufgrund dieser großen Anwendung sind für diesen Organismus eine Reihe von genetischen Variationen und ein breites Spektrum z.B. an Antikörpern verhältnismäßig kostengünstig erhältlich.

Kapitel 3.

Material und Methoden

3.1. Autokatalytische Arsenit-Jodat Reaktion

Die Grundidee der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine möglichst optimale Verstärkung eines Pathogenbindungsereignisses mit Hilfe einer autokatalytischen Reaktion zu erreichen. Als Voraussetzung mussten sich die Komponenten der Verstärkungsreaktion über einen längeren Zeitraum stabil handhaben lassen, ohne vorher fehlerhaft auszulösen. Der zuverlässigste Vertreter hierfür war die Arsenit-Jodat-Reaktion. Für die genauere Charakterisierung dieser Reaktion in Mikrolitergefäßen und im Mikrokanalsystem wurden die Reaktionslösungen, wie im folgenden Kapitel beschrieben, hergestellt.

3.1.1. Herstellung der chemischen Reaktionslösungen

Die verwendete Arsenit-Jodat-Clock-Reaktion wurde aus Kaliumjodat und arseniger Säure zusammengestellt und mit einer Kaliumjodid-Lösung als Reaktionsinitiator ausgelöst. Kaliumjodat und Kaliumjodid wurden hierfür jeweils frisch in bidestilliertem Wasser gelöst, wohingegen die arsenige Säure aus Arsen trioxid (As_2O_3) hergestellt wurde.

Für das Herstellen der arsenigen Säure wurden 0,98g As_2O_3 in 35ml bidestilliertem Wasser, das mit 2M Natronlauge auf pH 12,7 eingestellt war, gelöst. Nachdem das Arsen trioxid vollständig aufgelöst war, wurde die Lösung mit Schwefelsäure H_2SO_4 auf pH 2 eingestellt und mit bidestilliertem Wasser auf 50 Milliliter aufgefüllt. Aus dieser Grundlösung einer 0,2M arsenigen Säure wurden für alle Versuche über Verdünnung mit NaOH, Citrat-Phosphat-Puffer und bidestilliertem Wasser die entsprechenden gepufferten molaren Lösungen hergestellt. Sofern es nicht explizit anders beschrieben wird, wurde standardisiert eine arsenige Säure-Konzentration von 0,046 mol/l verwendet. Hierfür wurden 12,2ml der 0,2M Arsenit-Stammlösung mit 0,1M NaOH auf den beabsichtigten pH-Wert eingestellt, anschließend 12,5ml Citrat-Phosphat-Puffer mit gleichem pH-Wert hinzugegeben und abschließend die fehlende Volumenmenge mit bidestilliertem Wasser und Indikatorlösung auf 50ml aufgefüllt. Es wurde auf die Verwendung von Salzsäure (HCl) bei diesen Arbeiten bewusst verzichtet, um die Reaktion zu Arsenchlorid zu umgehen [37].

Für die gepufferten Lösungen wurde ein Citrat-Phosphat-Puffer nach *McIlwaine* [60] verwendet, mit dessen Hilfe eine Pufferung im pH-Wert Bereich zwischen 2,6 und 7,8 möglich ist. Hierzu wurden je zwei wässrige 1000ml Stammlösungen wie folgt angesetzt:

Lösung A	Dinatriumhydrogenphosphat	28,39g/1000ml
Lösung B	Citronensäure-Monohydrat	21,01g/1000ml

Zum jeweils gewünschten pH-Wert wurde zu der in folgender Tabelle angegebenen Menge der Stammlösung B die Stammlösung A auf 100ml aufgefüllt:

pH	,0	,1	,2	,3	,4	,5	,6	,7	,8	,9
2	-	-	-	-	-	-	10,8	13,2	15,6	18,1
3	20,6	22,6	24,7	26,6	28,5	30,3	32,2	33,9	35,5	37,1
4	38,6	40,0	41,4	42,7	44,0	45,4	46,7	48,0	49,3	50,4
5	51,5	52,6	53,6	54,7	55,8	56,9	58,0	59,2	60,5	61,8
6	63,2	64,6	66,1	67,7	69,3	71,0	72,8	74,8	77,2	79,8
7	82,4	85,6	86,9	88,8	90,7	92,1	93,6	94,6	95,7	

Tab. 3.1.: Mischtablette der Pufferstammlösungen A und B. In der Tabelle ist die Menge an Stammlösung B angegeben, zu der Stammlösung A bis auf 100ml aufgefüllt wird, um den gewünschten Puffer herzustellen.

Beispielsweise wurde für einen Citrat-Phosphat-Puffer mit pH 3,8 zu 35,5ml der Stammlösung B 64,5ml der Stammlösung A hinzu gegeben.

Für einen sichtbaren Farbumschlag der Clock-Reaktion war es notwendig einen Indikator hinzu zu geben. Aus diesem Grund wurden allen verwendeten Reaktionslösungen entweder gleiche Volumenanteile einer 1%tigen Stärkelösung oder einer 0,5%tigen Polyvinylalkohol (PVA)-Lösung zugesetzt, so dass in der Reaktionslösung 0,1 % Stärke bzw. 0,05 % PVA enthalten waren. Je nach verwendetem Indikator zeigte sich der Farbumschlag im Experiment von farblos zu blau-schwarz (Stärke) oder von farblos zu rot (PVA).

Die Kaliumjodat-Lösung wurde jeweils frisch mit der Zielmolarität in bidestilliertem Wasser und Indikatorlösung angesetzt. Als Standardmolarität wurde eine 0,15M KIO₃-Lösung verwendet. Für die Kaliumjodid-Lösung wurde eine 1M Stammlösung angesetzt, die mit bidestilliertem Wasser und Indikatorlösung jeweils auf die Zielmolaritäten verdünnt wurden. Für die in Kapitel 4.1 dargestellten Ergebnisse wurde als Standard ein Arsenige Säure/Jodat-Konzentrationsverhältnis von $R = 0,3$ gewählt (s. Kapitel 2.2.3), so dass am Ende der Reaktion ein sichtbarer Farbumschlag als Resultat vorlag.

3.1.2. Durchführung der Arsenit-Jodat-Reaktion auf der Mikrotiterplatte

Ein Bestandteil der vorliegenden Arbeit ist der Vergleich von Reaktionsverläufen der Arsenit-Jodat-Clock-Reaktion auf 96Well-Mikrotiterplatten und in einem Mikrofluidikkanal. Der Vorteil der Messungen auf der Mikrotiterplatte gegenüber den bisher etablierten Methoden im Continuous stirred-tank reactor (CSTR) oder im Becherglas ist die Möglichkeit des gleichzeitigen Auslösens der autokatalytischen Farbstoffreaktion in bis zu 8 Gefäßen mit Hilfe einer Mehrfachpipette wie in Abbildung 3.1a) dargestellt. Darüber hinaus kann dieser Versuchsaufbau sehr einfach mit einem

Laborschüttler kombiniert werden, wie in Abbildung 3.1b) gezeigt. Dadurch lassen sich auch auf der Mikrotiterplatte unterschiedliche Mischzustände herstellen.

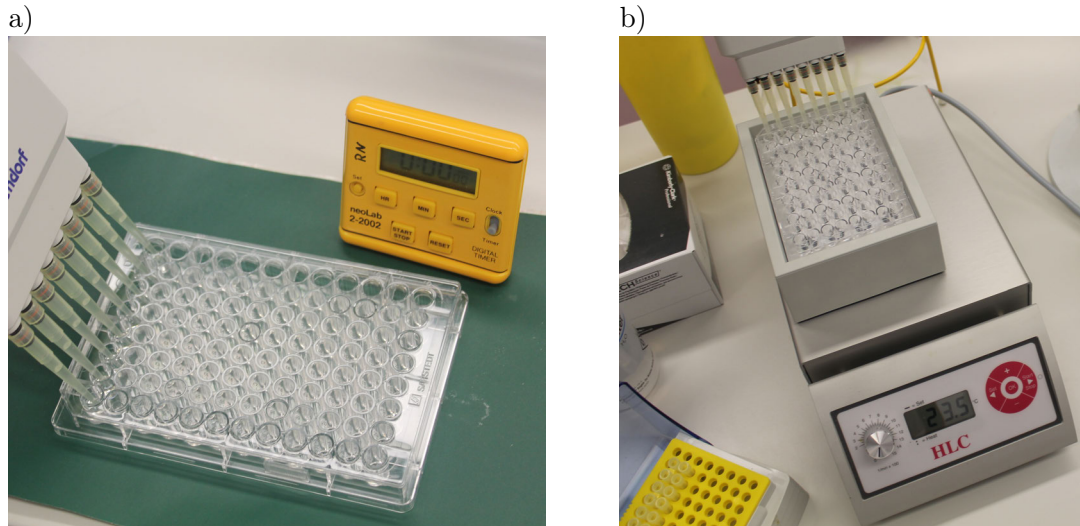


Abb. 3.1.: a) Versuchsaufbau für die Zeitmessung der Arsenit-Jodat-Reaktion auf der Mikrotiterplatte. Es wurden jeweils 8 Gefäße simultan mit einer Mehrfachpipette ausgelöst. b) Versuchsaufbau zur Zeitmessung auf dem Laborschüttler, um verschiedene Mischzustände zu erzeugen. Die Mikrotiterplatte wurde hierbei in den Schüttelhalter eingesetzt.

Die benötigten Reagenzien wurden wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben vor der Reaktionsdurchführung einzeln angesetzt. Anschließend wurden jeweils 80 μl der arsenigen Säure und der Kaliumjodatlösung pro Mikrotiterplattengefäß als Gesamtlösung vorgelegt. In dieser Art wurden bis zu acht Wells in einer Spalte vorbereitet. 100 μl der Kaliumjodid-Initiatorlösung wurden separat in ebenfalls maximal acht Wells in einer Gefäßreihe präpariert. Mit Hilfe einer Eppendorf 8fach-Pipette für den Volumenbereich 20-200 μl wurden danach 80 μl je Pipettenspitze aufgenommen und zu den vorbereiteten Clock-Reaktionsgefäßen hinzugegeben. Während der Starterzugabe wurde die sekundengenaue Stoppuhr gestartet. Somit konnten bis zu acht Gefäße simultan ausgelöst werden. Die bis zum Farbumschlag vergangene Zeit wurde anschließend von der Stoppuhr abgelesen und in eine Tabelle eingetragen. Hierbei hat sich die herstellerseitige Nummerierung der Mikrotiterplatte als sehr vorteilhaft erwiesen. Die 12 Spalten der jeweils 8 Gefäße sind von 1 bis 12 durchnummeriert und die 8 Zeilen der Platte sind mit den Buchstaben A bis H markiert. Bei Initiatorkonzentrationen mit Farbumschlagszeiten von weniger als 10 Sekunden wurde die Zeitnotation mit Hilfe eines Diktiergerätes aufgezeichnet, so dass eine sekundengenaue Zeitaufnahme je Mikrotiterplattengefäß (bspw. Zeile 1 A-H = 2 Sekunden) möglich war. Die Farbumschläge erfolgten bei diesen Konzentrationsverhältnissen faszinierender Weise hierbei in den Gefäßen simultan. Die Zeiten wurden anschließend abgehört und ebenfalls in eine Messtabelle übertragen.

3.2. Mikrofluidische Hilfsmittel

Die Versuchsreihen in Mikrokanälen wurden in Kanalstrukturen aus Polydimethylsiloxan (PDMS) durchgeführt. Die verwendeten Strukturen der Kanäle wurden alle selbstständig im PCB-Layout-Editor im Computer-Aided Design (CAD)-Programm Diptrace (*Novarm*) erstellt und durch die Firma *JD-Phototools* (Oldham-Lancs/England) hochauflösend bei einer Genauigkeit von $3\mu\text{m}$ auf eine Polyesterfolie (*AGFA*) bedruckt. Die Mikrokanäle wurden ebenfalls eigenständig mit Hilfe eines photolithografischen Prozesses nach *Whitesides et al.* ^{[25],[98]} hergestellt. Die genaue Vorgehensweise wird in den folgenden Kapiteln detailliert beschrieben. Es wurden einerseits Versuche in linearen Mikrokanälen und andererseits in linearen Kanälen mit Hindernisstrukturen durchgeführt.

3.2.1. Herstellung der Waferstruktur für die Softlithografie

Die Herstellung der Kanalstrukturen erfolgte mit softlithografischen Methoden nach *Whitesides et al.* ^{[25],[98]}. Hierfür wurde im ersten Schritt ein Masterwafer hergestellt, mit dessen Hilfe die Kanäle über ein Abgussverfahren in die verschiedenen Polymere eingebracht werden konnte. Bei der Herstellung dieses Wafers ist eine staubfreie Umgebung unerlässlich, da sonst Fehlstrukturen die Folge sind. Aus diesem Grund wurden alle Beschichtungs- und Bonding-Verfahren unter einer Airflow-Filterbench (Modell Bioair Aura HZ 72) durchgeführt. Über die beiden Parameter Rotationsgeschwindigkeit und Lackviskosität konnte mit Hilfe der Rotationsbeschichtung (Spin-Coating) die Strukturhöhe eingestellt werden. Der Wafer wurde, nach einer 30-minütigen Temperaturbehandlung bei 200°C auf einer Heizplatte, bei Raumtemperatur mit einem SU-8 2050 Negativ-Fotolack der Firma Microchem Corp. (SU-8 2050) in einem Spin-Coater (Model Laurell WS-400BX-6NPP/LITE) 40s bei 2000 Umdrehungen/Minute beschichtet, um eine Schichthöhe zwischen 65 und $70\mu\text{m}$ zu erhalten. Im Anschluss an die Beschichtung wurde der Lack in zwei Heizphasen erst 5 Minuten bei 65°C und anschließend 20 Minuten bei 95°C vorgetrocknet und 1-2 Sekunden belichtet. Die Belichtung wurde durch eine Fotomaske in Folienform, die auf den vorgetrockneten Wafer gelegt wurde, durchgeführt. Die Maske war an den späteren Strukturbereichen für die erforderliche Wellenlänge von 365 Nanometern durchlässig. Der belichtete Teil des Fotolacks wurde durch die Energieabsorption vernetzt und bildete am Ende die Struktur auf der Waferoberfläche ab. Nach dem Belichtungsvorgang wurde der Wafer auf einer Heizplatte mit Hilfe eines dreistufigen Temperaturprogrammes von 65°C über 75°C nach 85°C mit Temperaturschritten von $2,5^\circ\text{C}/\text{Minute}$ durchgehärtet und in gleichen Temperaturschritten auf 65°C abgekühlt. Zum Abschluss wurde der unbelichtete Teil des Fotolacks in einem Entwicklerbad bei Raumtemperatur abgelöst, so dass das gewünschte Kanaldesign als Struktur auf dem Wafer zurückblieb. Für eine bessere Haltbarkeit des Masterwafers wurden nach der Strukturerstellung sämtliche Lösemittelreste durch ein einstündiges Erhitzen bei 95°C entfernt. Ein detailliertes Protokoll zur technischen Vorgehensweise findet sich im Anhang B dieser Arbeit. Die detaillierten Dimensionen der Kanalgeometrie wurden nach dem Herstellungsprozess mit einem Dektak-Oberflächenprofilometer bestimmt und sind in der Abbildung 3.2 schematisch dargestellt. Der Masterwafer wurde anschließend für die Polymerabgüsse verwendet.

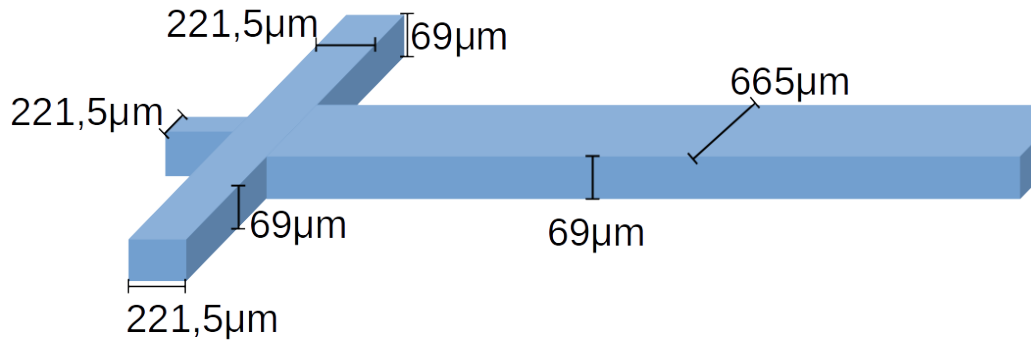


Abb. 3.2.: Schematische Darstellung des Mikrokanals mit den Kanalmaßen. Alle drei Inletkanäle hatten die gleichen Dimensionen. Die drei Inletkanalbreiten ergaben zusammen die Messkanalbreite, so dass die Flussgeschwindigkeit im Kanal konstant blieb.

3.2.2. Herstellung der PDMS basierten Mikrokanäle

Für die Erstellung der PDMS basierten Mikrokanäle wurde die in Kapitel 3.2.1 beschriebene Masterstruktur auf dem Siliziumwafer mit einem Elastomer-Härter-Gemisch abgegossen. Dafür wurden Härter und Elastomer aus einem Sylgard 184-Polymerkit im Verhältnis 1:10 gemischt, sehr gut verrührt, der Wafer in einer Kunststoffwägeschale übergossen und anschließend in einem Exsikkator die eingebrachte Luft entfernt. Zum Schluss wurde das Polymer in einem Thermo-Laborbackofen bei 75°C für 3 Stunden ausgehärtet.

Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur und einer Ruhephase über Nacht, wurde der die Zielstruktur enthaltende PDMS-Block mit Hilfe eines Skalpellts ausgeschnitten und abgelöst. Alle erforderlichen Schlauchzugänge und Öffnungen wurden vor dem Verschließen des Kanals mit Hilfe von Kanülenstanzen an den vorgesehenen Inlet-Strukturen, wie in Abbildung 3.3 dargestellt, in den PDMS-Block gestochen.

Um aus dem strukturierten Polymerblock nun einen funktionsfähigen Mikrofluidikchip herzustellen, wurde die Kanalunterseite mit einem Quarzglas klebstofffrei verschlossen. Dazu wurde der ausgeschnittene PDMS-Block zusammen mit dem Glas in einem Hattrick Plasmaofen für 3 Minuten in einem Luftplasma aktiviert (Cleaning) und anschließend zusammengehalten. Die durch das Cleaning entstandenen radikalen Molekülen auf der Glas- und Polymeroberfläche reagierten zu kovalenten Bindungen. Dadurch wurde das Kanalsystem ohne weitere chemikalische Hilfsmittel fest verschlossen. Dieses beschriebene Verfahren wird auch Bonden genannt und garantierte eine absolut saubere Kanaloberfläche. Zudem sorgte es dafür, dass die sonst hydrophobe Polymeroberfläche für mehrere Stunden, bzw. Tage hydrophile Eigenschaften aufwies.

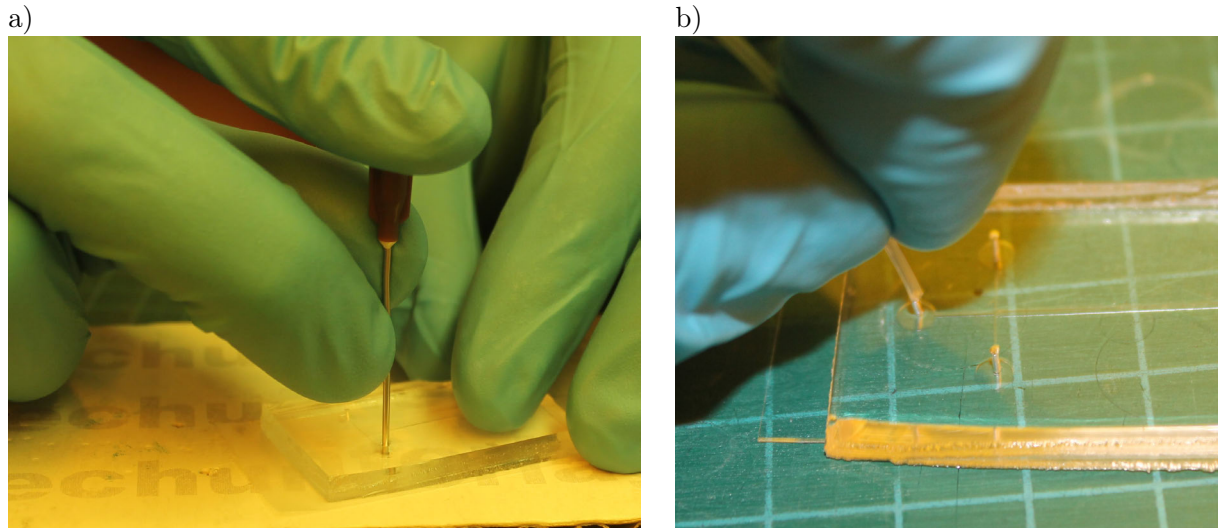


Abb. 3.3.: a) Darstellung des Stanzvorganges um eine Zuführung zu den Kanalinslets zu schaffen. b) Durch einstecken von PTFE-Schläuchen in die ausgestanzten Kanalzugänge wurde eine dichte Anschlussverbindung zu den Mikroliterspritzen hergestellt.

Direkt im Anschluss an das Bonding wurde der Kanal, wie in Abbildung 3.3 b) dargestellt, mit Schläuchen aus Polytetrafluorethylen (PTFE) verbunden, die direkt in die ausgestanzten Löcher gesteckt wurden und eine einfache dichte Verbindung herstellte.

3.3. Matlab-Simulation zur Arsenit-Jodat-Reaktion im Mikrokanal

Für die theoretische Untersuchung der autokatalytischen Reaktion im Mikrokanal wurde eine Finite-Differenzen-Simulation (FDS) im Programm MATLAB (*MathWorks*) erstellt. Es wurde dabei ein laminares Flusssystem vorausgesetzt. Dabei waren lokale Änderungen der Konzentration durch chemische Reaktionen und in Flussrichtung durch den Flüssigkeitsstrom zugelassen. Die zeitliche Änderung der lokalen Konzentration lässt sich in der bereits vorgestellten Differentialgleichung (2.25) ausdrücken:

$$\frac{\partial \mathbf{c}}{\partial t} = \vec{v} \cdot \nabla \mathbf{c} + \mathbf{D} \nabla^2 \mathbf{c} + R_{\text{Arsenit-Jodat-Reaktion}}(\mathbf{c}) \quad (3.1)$$

Um in einem virtuellen Kanal die Konzentration an jedem Ort \mathbf{i} des Kanals iterativ im Zeitverlauf zu berechnen und somit zu jedem Zeitpunkt t_n angeben zu können, wird in jedem Rechenschritt n zum derzeit existierenden Konzentrationswert c_n die Konzentrationsänderung hinzu addiert, so dass sich die aktuelle Konzentration c_{n+1} ergibt. D.h. die zugehörige Rechenvorschrift lautet:

$$c_{n+1} = c_n + [\Delta t \cdot (\vec{v} \cdot \nabla \mathbf{c} + \mathbf{D} \nabla^2 \mathbf{c} + R_{\text{Arsenit-Jodat-Reaktion}}(\mathbf{c}))] \quad (3.2)$$

Darüber hinaus wurde die Kanalhöhe als deutlich kleiner gegenüber der Kanalbreite angenommen, so dass die Konzentrationsverteilung über die Höhe z als für jeden Feldpunkt konstant angenommen wurde. Die im Folgenden genutzte FDS stellt daher eine 2D-Simulation dar. Zu Beginn der Simulation wurden die Startkonzentrationen, die Reaktionskonstanten und die Diffusionskonstanten definiert. Die Arsenit-Jodat-Clock-Reaktion verläuft nach *Papsin et al.*^[72] wie in Kapitel 2.2.3 beschriebenen über eine Reihe von Zwischen- und Endprodukten. Aus diesem Grund konnte die Reaktionskinetik nur über eine iterative Lösungsmethode angenähert werden. Zu diesem Zweck wurde jedem Zwischen- und Endprodukt ein eigenes (80x100) Gitterpunkte umfassendes Feld zugeordnet. Jeder Gitterpunkt stellt dabei ein $(1 \times 1) \mu\text{m}^2$ großes Kanalfeld dar, welchem je Iterationsschritt ein fester Konzentrationswert der jeweiligen Substanz zugeordnet wurde, wie in Abbildung 3.4 beispielhaft in 3D dargestellt. Nach Ende des Iterationsschrittes steht für den nachfolgenden Schritt somit an jedem Kanalfeld ein aktueller Konzentrationswert für jedes Zwischen- und Endprodukt für die Berechnung zur Verfügung und wird am Ende des Iterationsschrittes vom aktuellen Wert überschrieben.

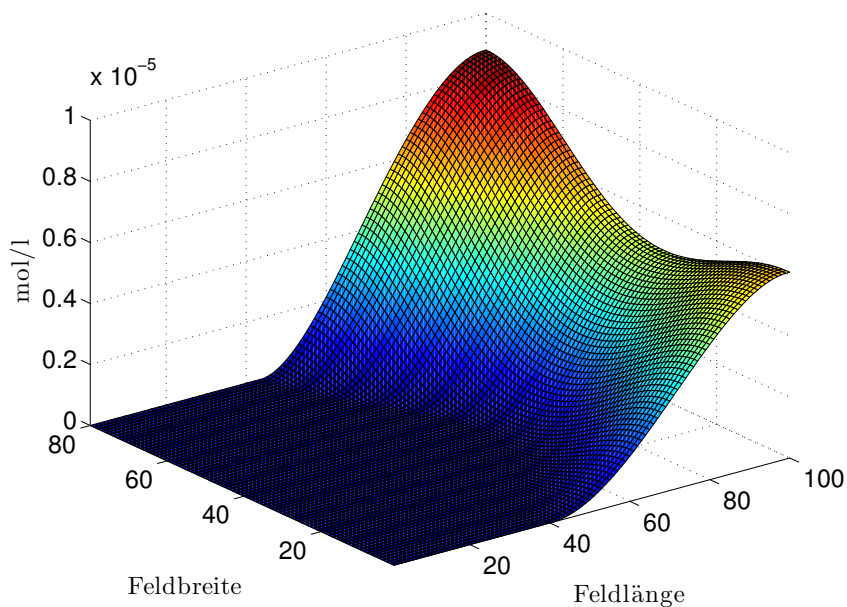


Abb. 3.4.: 3D-Darstellung eines Konzentrationsfeldes für Jod nach $9 \cdot 10^7$ Iterationen. Die Feldbreite beträgt 80 Gitterpunkte, die Feldlänge 100 Gitterpunkte. Für die Darstellung wurden die einzelnen Konzentrationswerte auf der z-Achse in mol/l aufgetragen.

Bevor die Iteration für die Konzentrationsberechnung beginnen konnte, war es notwendig die in Gleichung (3.2) eingehende Advektion in Form der Flussgeschwindigkeit festzulegen. Dafür wurde ein weiteres Gitterfeld von (80x100) als Geschwindigkeitsfeld definiert und über eine kurze Iterationsvorschrift mit den statischen Geschwindigkeitswerten besetzt. In Abbildung 3.5 a) ist das Geschwindigkeitsfeld und in 3.5 b) das zugehörige Strömungsprofil nach der Iteration dargestellt.

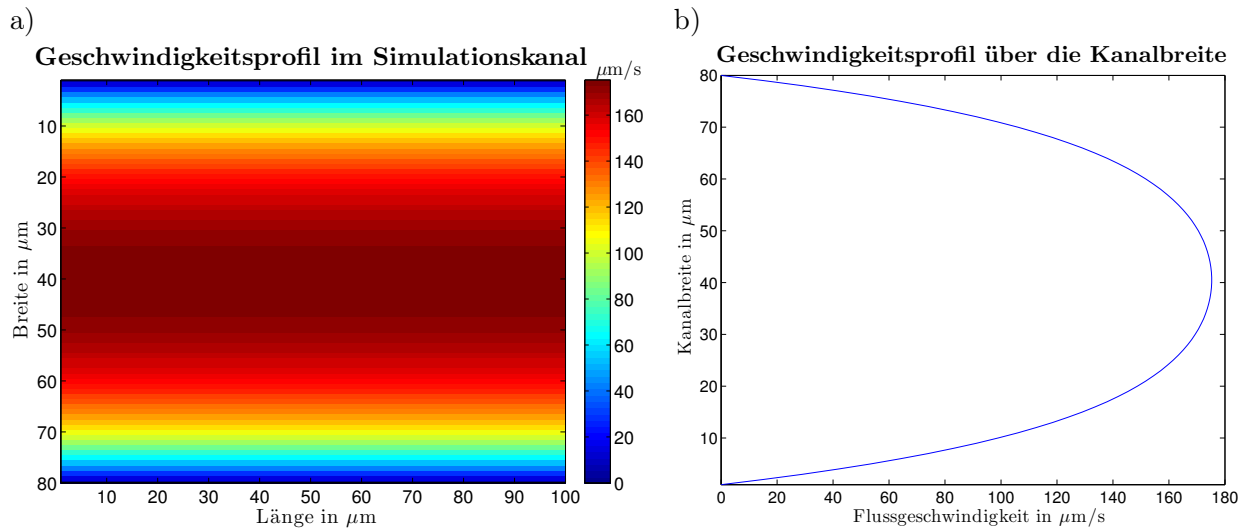


Abb. 3.5.: a) Darstellung des Geschwindigkeitsfeldes nach erfolgter Iteration bei der Finite-Differenzen-Simulation. Die Farbskala gibt die Flussgeschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ innerhalb des Kanalfeldes an. Die Flussrichtung verläuft von links nach rechts. b) Darstellung der Flussgeschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ über die Breite des simulierten Kanalfeldes.

Für eine genauere Einsichtnahme ist der Quellcode des Programmes in Anhang C detailliert dargestellt. Nach jeweils einer Iterationsdauer von 0.001s wurden die Felddaten gespeichert, so dass auf die Ergebnisse jedes gespeicherten Zeitschrittes nach der Simulation zugegriffen werden konnte.

3.4. Herstellung der Hydrogele

Die in dieser Arbeit verwendeten Hydrogele sind alle auf Acrylamidbasis hergestellte Gele, mit Metylenbisacrylamid (MBA) als Vernetzer. Um die fertigen Gele mit einer Thermoresponsivität auszustatten ist es notwendig Seitengruppen in das Gel zu implementieren, die einen Einfluss auf die Lösungstemperatur (lower-critical-solution-temperature LCST) haben. In Abbildung 3.6 sind die Strukturformeln der verwendeten Monomere dargestellt.

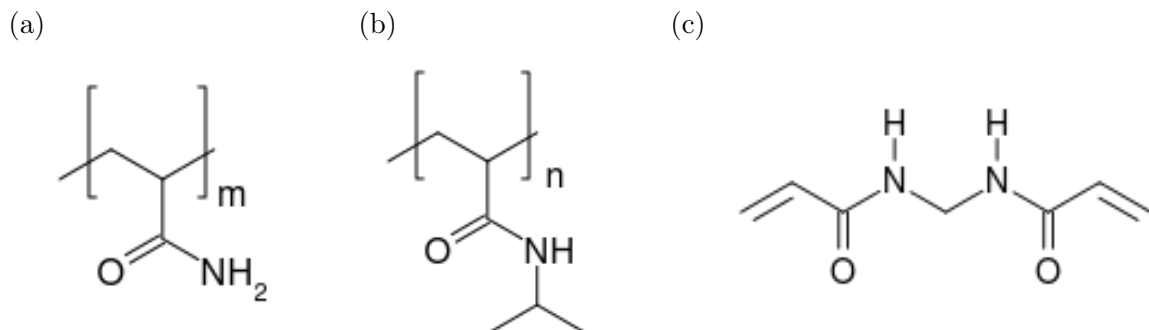


Abb. 3.6.: Strukturformeln der Monomereinheiten von Acrylamid (a), N-Isopropylacrylamid (b) und dem Vernetzermolekül Metylenbisacrylamid (c)

Bei der Betrachtung der Strukturformeln von Acrylamid (AcAm) und N-Isopropylacrylamid (NIPAM) in Abbildung 3.6a) und b) wird deutlich, dass man die Zusammenstellung der Monomere mit einer Art Baukastensystem vergleichen kann, in der das Acrylamid die gleichbleibende „Kopfgruppe“ darstellt. An der Amid-Gruppe werden jeweils die entsprechenden Seitengruppen ausgetauscht (s. Kapitel 3.4.2). Die Herstellung der folgenden Hydrogele erfolgte ausschließlich über radikalische Polymerisation, wobei sich das Herstellungsprotokoll an den Ergebnissen von *Walsh et al.* ^[97] orientierte.

3.4.1. NIPAM-Hydrogel

Für die Herstellung des NIPAM-Hydrogels wurde eine Grundlösung aus 28mmol NIPAM, 0,51mmol MBA und 5,7 μ mol Dextran 70 in 20 Millilitern entgastem und bidestilliertem Wasser hergestellt. Die Grundlösung wurde im Kühlschrank bei 6°C aufbewahrt. Das Verhältnis von NIPAM zu Dextran 70 wurde nach *Walsh et al.* ^[97] 8:1 gewählt, da für das Gel hier das größte Quellverhalten zu erwarten war.

Je 2 Milliliter dieser Grundlösung wurden mit 24 Mikrolitern Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Katalysator und 100 Mikrolitern einer wässrigen 60mM Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung als Starter versetzt, gut geschüttelt und anschließend sofort in einen Gelständer der Firma Biorad eingefüllt. Innerhalb von 2 Stunden polymerisierte die Lösung zu einem vollständigen, festen Gel. Die erfolgreiche Polymerisation wurde zusätzlich durch eine Trübung der zuvor klaren Lösung angezeigt.

Nach der Polymerisation wurde das formstabile Gel aus der Form gelöst und anschließend in bidestilliertes Wasser gelegt. Um das Dextran und eventuell unpolymersierte Monomere zu entfernen, wurde das Gel in Wasser auf 60°C erhitzt, sodass es vollständig kollabierte. Anschließend wurde das kollabierte Gel in gereinigtem Wasser bei Raumtemperatur gelagert, bis es seine ursprüngliche Größe wiedererlangt hatte. Dieser Vorgang wurde insgesamt viermal wiederholt. Nach diesem Reinigungsvorgang war das Gel einsatzbereit, wurde in bidestilliertem Wasser gelagert und konnte weiterverwendet werden.

3.4.2. NIPAM-Acrylamid Hydrogel

Um das Kollapsverhalten des Hydrogels zu modifizieren, wurde anstelle eines reinen NIPAM-Hydrogels ein Gemisch aus NIPAM und Acrylamid (AcAm) polymerisiert. Es wurde eine Grundlösung aus 26,5mmol NIPAM, 3mmol AcAm, 0,51mmol MBA und 5,7 μ mol Dextran 70 in 20 Millilitern entgastem und bidestilliertem Wasser hergestellt und bei 6°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Je 2 Milliliter dieser Grundlösung wurden mit 24 Mikrolitern Tetramethylethylendiamin (TEMED) und 100 Mikrolitern einer wässrigen 60mM Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung versetzt, gut geschüttelt und anschließend sofort in einen Gelständer der Firma Biorad eingefüllt. Innerhalb von

2 Stunden polymerisierte die Lösung zu einem vollständigen, festen Gel, wobei die Trübung weniger stark ausfiel als bei der Herstellung des NIPAM-Hydrogels.

Nach der Polymerisierung wurde das ebenso formstabile Hydrogel aus der Form gelöst und wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben von allen unpolymerisierten Chemikalien befreit. Das gereinigte Gel wurde bis zum Einsatz in bidestilliertem Wasser gelagert.

3.4.3. NIPAM-Acrylsäure Hydrogel

Für eine sich ausbreitende Farbfront von der auslösenden Stelle bot es sich an, dass Hydrogel mit in die Verstärkungsreaktion zu integrieren. Da jedoch durch die Arsenit-Jodat-Reaktion keine messbare Temperaturänderung ausgelöst wird, und somit die rein thermoresponsiven Hydrogele keinen ausreichenden Stimulus erhalten, entwickelte sich die Idee ein pH-responsives Hydrogel mit der Clock-Reaktion zu kombinieren. In mehreren Arbeiten wurde bereits erfolgreich gezeigt, dass Acrylsäure (AcAc) zu Hydrogelen polymerisieren und Stoffe durch pH-Wert-Änderung von diesen Gelen freigesetzt werden können [36],[50],[76],[99]. Mit Hilfe dieser Informationen und dem in Kapitel 3.4.2 etablierten Protokoll wurde für ein pH-responsives Hydrogel eine Copolymerisation von N-Isopropylacrylamid (NIPAM) und Acrylsäure (AcAc) durchgeführt, wie in Abbildung 3.7 dargestellt.

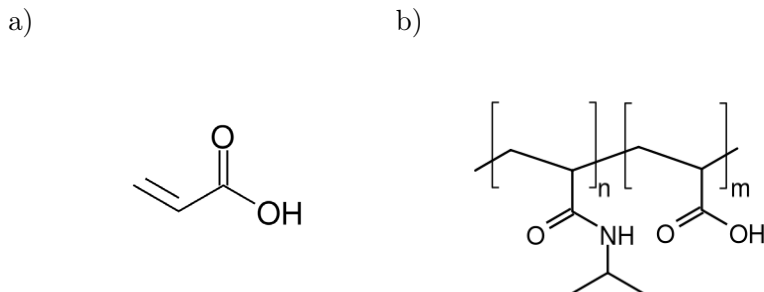


Abb. 3.7.: Strukturformeldarstellung der Acrylsäure a) und des NIPAM-Acrylsäure Copolymers b).

Es wurden 320mg NIPAM, 22,64mg AcAc, 8mg MBA und 40mg Dextran in 4ml entgastem, bidestilliertem Wasser gelöst. Diese Lösung wurde mit 24µl TEMED und 100µl einer wässrigen 60mM APS-Lösung versetzt, gut geschüttelt, in einen Gelständer (*Biorad*) gefüllt und bei Raumtemperatur für 2 Stunden auspolymerisiert. Danach wurde das Gel aus der gläsernen Gelform gelöst und in bidestilliertem Wasser auf 70°C erhitzt. Das warme Wasser wurde anschließend gegen raumtemperiertes, bidestilliertes Wasser ausgetauscht. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Das so gereinigte Gel wurde bis zum Einsatz in bidestilliertem Wasser gelagert.

3.4.4. Funktionalisieren eines Triethylenglycol-Hydrogels mit Antikörpern

Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Hydrogelen war es für eine erfolgreiche Funktionalisierung mit Biomolekülen erforderlich, einen Mindestabstand zwischen Hydrogelrückgrad und den verwendeten Antikörpern herzustellen. Die Interaktionsstärke zwischen Ligand und Rezeptor wird stark von räumlichen Einschränkungen auf Substratoberflächen beeinflusst^[47]. Im Verbundprojekt „Taschentuchlabor“ wurde durch den Projektpartner *Fraunhofer-IAP* ein Hydrogel entwickelt, welches durch eine Copolymerisation mit einem Triethylenglycol-Carboxyl-Monomer (s. Abbildung 3.8) eine funktionelle Carboxylgruppe an einer dreifachen Ethylenglycol-Molekülkette als Distanzstück bereitstellt. Aus diesem Grund konnte für die Bindungsversuche zwischen dem Bakterienstamm *Escherichia coli* und dem Antikörper funktionalisierten Hydrogel auf dieses Hydrogel zurückgegriffen werden. Die Idee und Anbindung für die Funktionalisierung des vorliegenden Hydrogels mit Antikörpern ist in einer engen Zusammenarbeit zwischen Jean-Philippe Couturier vom Institut für Chemie der Universität Potsdam und dem Autor dieser Arbeit entstanden. Im Folgenden wird die Herstellung und Funktionalisierung kurz dargestellt.

Das verwendete Hydrogel wurde mit Hilfe einer Copolymerisation aus folgenden Monomergruppen durchgeführt, deren Strukturformeln in Abbildung 3.8 dargestellt sind:

Oligo(ethyleneglycol)methylether-methacrylat (OEGMA)

2-(2-Methoxyethoxy)ethyl-methacrylat (MEO₂MA)

Oligo(ethylenglycol)dimethylether-methacrylat (OEGDMA)

Triethylenglycol-Carboxytertbutyl-methylether-methacrylat (TriEG-COOtBu-MA)

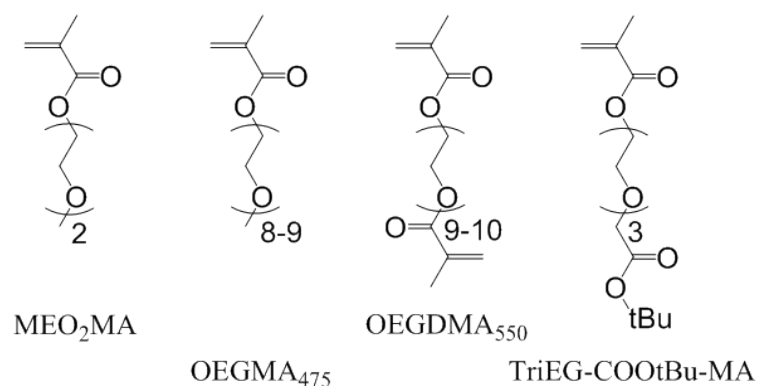


Abb. 3.8.: Strukturformeln der verwendeten Monomere von MEO₂MA, OEGMA, OEGDMA und TriEG-COOtBu-MA.

Die Polymerisation erfolgte radikalisch in Ethanol durch UV-Initiierung. Nach der vollständigen Polymerisation wurde die Tertbutyl-Schutzgruppe am TriEG-COOtBu-MA mit Hilfe von Trifluoressig-

säure (TFA) entfernt (s. Abbildung 3.9), so dass eine freie Carboxylgruppe am Hydrogel-Rückgrad für die Antikörperfunktionalisierung zur Verfügung stand.

Für eine detaillierte chemische Vorgehensweise und weitere ausführliche Beschreibungen der Eigenschaften dieses Hydrogels wird daher an dieser Stelle auf die Dissertation von Jean-Philippe Couturier verwiesen, in der eine chemische Charakterisierung des Hydrogels nach der Funktionalisierung vorgenommen wurde (Universität Potsdam, voraussichtlich 2015).

Das so präparierte Hydrogel wurde nun an der freien Carboxylgruppe in PBS bei pH 7,4 mit Hilfe der Kopplungssubstanzen EDC und NHS am NH-Terminus des verwendeten Antikörpers gegen *Escherichia coli* funktionalisiert, wie in Abbildung 3.9 dargestellt. Die erfolgreiche Funktionalisierung wird im Kapitel 4.3.3 untersucht. Der verwendete monoklonale Antikörper besitzt eine Erkennungsgruppe für den K99-Pili des Bakteriums *Escherichia coli* (s. Abbildung 2.7) und wurde unter der Kennziffer K99-11-201.3 von der Firma *Abnova* bezogen.

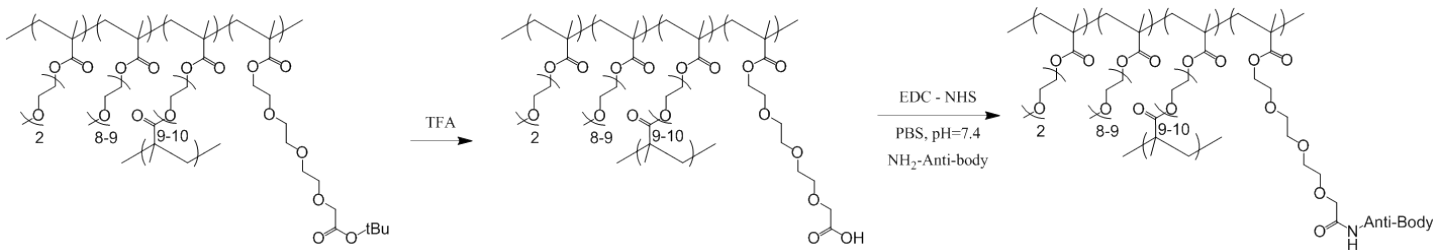


Abb. 3.9.: Reaktionsgleichung zur Herstellung des funktionalisierten Triglycol-Hydrogels. Nach Entschützen der Carboxylgruppe im ersten Reaktionsschritt kann an dieser der NH-Terminus des Antikörpers über EDC-NHS-Kopplung im zweiten Reaktionsschritt kovalent gebunden werden.

Nach der fertig gestellten Funktionalisierung wurde das Hydrogel bis zur Durchführung in PBS bei pH 7,4 gelagert.

3.5. Papierbasiertes Lab-On-Chip-System

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Verstärkung von spezifischen Bindungsereignissen zwischen pathogenen Strukturen und den Erkennungsdomänen. Um diesem System ein „Rückgrad“ zur Verfügung zu stellen, auf welchem sich die einzelnen Komponenten anordnen und bedarfsgerecht mikrofluidisch steuern lassen, bot sich Papier als gut zu handhabender Werkstoff an.

3.5.1. Mikrokanalstrukturierung von Papiergeweben

Papier stellt sehr kostengünstig sowohl ein durchaus haltbares Netzwerk mit Kapillareigenschaften als Rückgrad zur Verfügung als auch die Möglichkeit dieses mit Hilfe softlithografischer Methoden zu strukturieren, wie schon in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden konnte [59], [58]. Basierend auf diesen Arbeiten wurde Filterpapier (*Munktell*) mit einer Schöpfungsdichte von 84 g/cm² strukturiert.

Dazu wurde vorbereitend ein Kanaldesign wie bereits in Kapitel 3.2 beschrieben erstellt, jedoch hier im Layout-Editor der OpenSource-CAD-Software KiCAD (*GNU-public-license/kicad-pcb.org*). Anschließend wurde das Design durch die Firma *JD-Phototools* (Oldham-Lancs/England) hochauflösend als Belichtungsmaske auf Folie gedruckt.

Das Filterpapier wurde in SU8-2010 Fotolack (*micro resist technology GmbH*/ Deutschland) getränkt und anschließend hängend bei 95°C für 30 Minuten getrocknet. Danach wurden die Papiere auf Raumtemperatur abgekühlt, auf einem schwarzen Untergrund reversibel fixiert, mit der Belichtungsmaske abgedeckt und mit einem Quarzglas beschwert. So vorbereitet wurden die Lackpapiere 24 Sekunden mit einer Energiedichte von 200 J/cm² und einer Lichtwellenlänge von 365nm belichtet. Anschließend wurden die Papiere weitere 10 Minuten im Wärmeschrank bei 95°C gelagert, so dass der belichtete und lackbeschichtete Teil des Papiers Zeit hatte zu vernetzen. Nachdem die Struktur nun deutlich auf dem Papier zu erkennen war, wurden die belichteten Papiere in einer DEV-600mr Entwicklerlösung in einem Ultraschallbad (*HBM Machines*) für 10 Minuten entwickelt, bis sich die nichtbelichtete Kanalstruktur weiß zeigte. Danach wurden die Papiere in einem Aceton/2-Propanol/H₂O dd-Gemisch der Volumenanteile 1:1:2 weitere 5 Minuten im Ultraschallbad gereinigt um den Entwickler restlos zu entfernen. Zum Abschluss wurden die Papiere in bidestilliertem Wasser (H₂O dd) für 5 Minuten im Ultraschallbad von den Lösemitteln befreit, mit Pressluft abgeblasen und im Trockenschrank bei 95°C getrocknet. Die so hergestellten Papierkanäle konnten nun weiterverarbeitet werden.

3.5.2. Externe Freisetzung von Flüssigkeit in das papierbasierte LOC-System

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass sich thermoresponsive Hydrogele sehr gut mit strukturierten Papiersubstraten zu Einweg-LOCs kombinieren lassen. Diese Methode ermöglicht es, Flüssigkeiten auch in abgeschlossenen Kanalsystemen freizusetzen. Dabei wird das thermoresponsive Hydrogel mit Hilfe eines von außen durchgeführten Temperaturstimulus durch das Gehäuse hindurch zum Kollabieren gebracht, so dass die Flüssigkeit aus dem Hydrogel entweicht.

Für die beschriebenen Temperaturstimuli wurden in der vorliegenden Arbeit Peltierelemente verwendet, da diese im Spannungsbereich von 0-12V betrieben werden können und außerdem den Vorteil aufweisen, dass sie durch Umpolung statt zum Heizen auch zum Kühlen verwendet werden können. Zudem sind sie sehr platzsparend und lassen sich daher auch in größere experimentelle Aufbauten ohne Schwierigkeiten integrieren. Die verwendeten Peltierelemente wurden durch den Elektronikversand *Conrad Electronics* bezogen und mit Hilfe einer Gleichspannungsquelle (*Wolff*) betrieben. Die Spannungen wurden dabei manuell in Abhängigkeit der mit einem Thermowiderstand (PT-1000 *Conrad Electronics*) direkt auf der Heizfläche gemessenen Temperaturen eingestellt. Hierdurch war es möglich die Hydrogele mit einer 1°C genauen Temperaturabstufung zu steuern. Die Heizzdauer war aufgrund der unterschiedlichen Papier-LOC-Aufbauten von den verwendeten Papier- und Foliendicken abhängig. Abbildung 3.10 zeigt den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Peltier-Heiz-Aufbau. Durch eine integrierte Lüftereinheit konnten mit dieser Apparatur Temperaturen bis 90°C erreicht werden. Die Genauigkeit der Apparatur liegt bei $\pm 0,5^\circ\text{C}$.

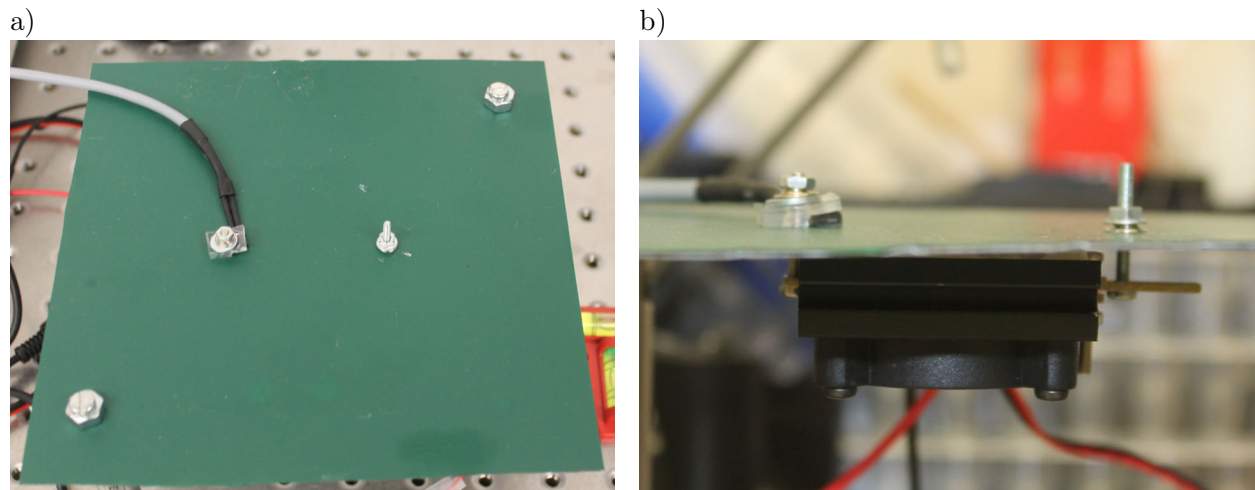


Abb. 3.10.: Peltier-Heizaufbau für den temperaturinduzierten Hydrogelkollaps. a) Aufsicht auf den Heiztisch mit der Heizzone zwischen den Befestigungsschrauben. Das Kabel an der linken Befestigungsschraube ist die Zuleitung zum Thermosensor. b) Seitenansicht des selben Tisches. Sichtbar sind die zwei mittleren Befestigungsschrauben und das unter dem Tisch installierte Peltierelement inklusive der Lüftereinheit um Temperaturbereiche bis 90°C zu erreichen.

3.6. Zellkultivierung von *Escherichia coli*

Für die Papierchip und Hydrogelversuche wurde der bakterielle Organismus *Escherichia coli* als Modellpathogen verwendet. Der Wildtyp-Organismus wurde aus einer Kryo-Kultur in einem LB-Kulturmedium (*Sigma Aldrich* Deutschland) nach *Bertani*^[6] als 25ml Schüttelkultur angesetzt und bis in die stationäre Wachstumsphase kultiviert. Anschließend wurde die Zellkultur über einen Impfösausstrich auf einer festen LB-Agarose-Nährbodenplatte bei 30°C für 24 Stunden bebrütet. Das Resultat waren Einzelkolonien, mit dessen Hilfe für die einzelnen Experimente 12 Stunden Schüttelkulturen durch beimpfen von 25ml LB-Medium mit Hilfe einer Impföse angesetzt wurden.

Aus den 12 Stunden Schüttelkulturen wurden jeweils 10µl Zellsuspension entnommen und mit MB-Puffer auf 1ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Von dieser Lösung wurden 50µl zur Zellzahlbestimmung mit Hilfe einer Neubauer-Thoma-Zählkammer entnommen und der übrige Teil der Lösung während der Zellzahlbestimmung bis zum Experiment im Kühlschrank bei 6°C aufbewahrt.

Der verwendete MB-Puffer ist ein Phosphatpuffer, der sich aus folgenden Chemikalien zusammensetzt:

112g	K ₂ HPO ₄
48g	KH ₂ PO ₄
0.29g	EDTA
39.3g	NaCl

Die oben angegebenen Chemikalienmengen wurden in einem Eichkolben in einem Liter bidestilliertem Wasser aufgenommen und der so hergestellte MB-Puffer wurde autoklaviert bis zur Verwendung bei 6°C im Kühlschrank gelagert.

3.7. Mikroskopische Methoden

Die mikroskopischen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden auf zwei inversen Mikroskoptypen durchgeführt. Hierbei handelt es sich einmal um ein IX71 der Firma *Olympus* und einem Axio-Observer der Firma *Zeiss*. Die Durchführungen an diesen Systemen wird im Folgenden für jeden Mikroskoptyp einzeln beschrieben.

3.7.1. Olympus IX71

Die Bildaufnahmen der autokatalytischen Arsenit-Jodat-Reaktion und der Fluoreszenzaufnahmen wurden mit Hilfe eines inversen Mikroskops IX71 (*Olympus*/ Göttingen) durchgeführt. Um ein möglichst großen Bildausschnitt zu erzielen, wurde ein Edmund DIN4 Objektiv (Vergrößerung 0,10) für die Mikroskopie verwendet. Über einen Prismenwürfel wurde das Mikrokanalbild der Arsenit-Jodat-

Reaktion auf den Sensor einer ORCA-ER Schwarz/Weiß-Kamera (C4742-80/*Hamamatsu*) gespiegelt, wo es mit Hilfe der Xcellence-Pro-Software (*Olympus*) in den Fileformaten *.avi und *.jpg aufgenommen wurde. Für die Fluoreszenzaufnahmen hingegen wurde eine F-View II (*Olympus*) Kamera verwendet. Die Kanalaufnahmen ohne Fluoreszenzfarbstoff wurden im Hellfeld mit einer Halogenlampe in der Durchlicht-Einstellung durchgeführt. Für die Fluoreszenzaufnahmen wurde der Kanal durch das Objektiv beleuchtet. Dazu war über einen weiteren Seitenkanal eine Quecksilberdampfampe angeschlossen, sodass das Licht über den schon beschriebenen Prismenwürfel in den Strahlengang eingebracht werden konnte. Im Strahlengang war zudem ein Fluoreszenzwürfel mit der Extinktionswellenlänge 488nm und einer Emmisionswellenlänge von 520nm angebracht. Dadurch wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein (FITC) mit blauem Licht angeregt und im grünen Lichtkanal betrachtet.

3.7.2. Messung im Mikrokanalsystem

Autokatalytische Reaktion im Mikrokanalsystem

Für die Untersuchung der autokatalytischen Reaktionen in einer Mikrostruktur wurde ein gerader Mikrofluidikkanal aus PDMS verwendet. Abbildung 3.11 zeigt das Kanaldesign als Aufsicht und den fertigen Mikrokanalchip.

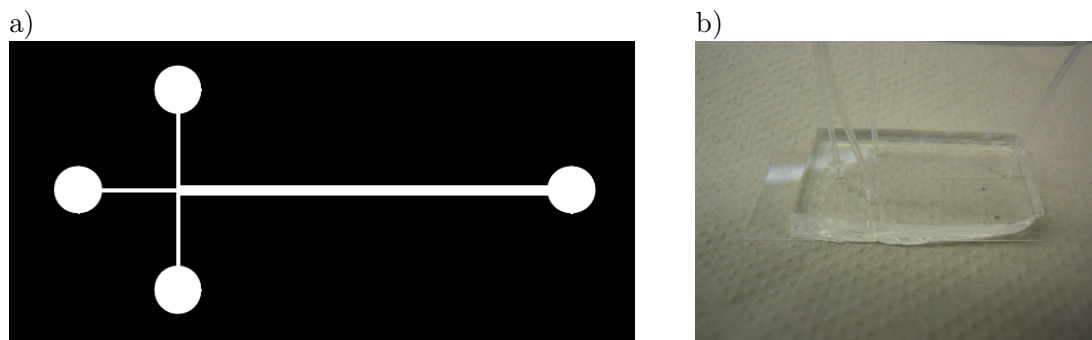


Abb. 3.11.: a) Maskenausschnitt vom Mikrokanaldesign des geraden Mikrofluidikkanals. Die kreisrunden Strukturen stellen die Inlet- und Outletbereiche des Mikrochips dar, in die die PTFE-Schlauchverbindung gestochen werden. b) Darstellung eines Mikrochips mit PTFE-Schläuchen.

Über die drei kreisrunden Inletstrukturen wurde der PDMS-Mikrokanal mit PTFE-Schläuchen an die 250µl-Mikroliterspritzen angeschlossen. Jede der drei Reaktionsflüssigkeiten - arsenige Säure, Kaliumjodat und Kaliumjodid - waren mit jeweils einer eigenen Spritze und über einen eigenen Inletkanal mit dem Mikrofluidikkanal verbunden. Alle drei Kanäle endeten direkt im Messkanal und wurden daher vorher nicht anderweitig miteinander gemischt. Die Flüssigkeitsabgabe aus den einzelnen Spritzen wurde durch eine Harvard-Spritzenpumpe (PHD Ultra / *Harvard Apparatus*) gesteuert. Durch den in Abbildung 3.12 dargestellten Mehrfachhalter wurden die Spritzen bei einer Veränderung der Einstellung simultan bedient.

In der Spritzenpumpe konnte der Spritzendurchmesser bzgl. des verwendeten Spritzenvolumens exakt eingestellt werden, so dass Flüssigkeitsvolumen von Nanolitern gesteuert werden konnten. Ebenso wurde darauf geachtet, dass die Spritzen und der PDMS-Mikrokanal in einer Höhe angeordnet waren, um einen gleichmäßigen Flüssigkeitsfluss zu garantieren. Außerdem fand die Messung in einem horizontal zur Tischoberfläche verlaufenden Mikrokanal statt, so dass die Gravitation keinen Einfluss auf die Flussrichtung hatte und daher in der Auswertung vernachlässigt werden konnte.

Während der Versuchsdurchführung wurden die Reaktionslösungen zu Beginn mit einer Volumendurchsatzrate von $3\mu\text{l}/\text{Minute}$ durch den Mikrokanal gepumpt. Die an der Mikropumpe eingestellte Durchsatzrate entsprach dabei jeweils $\frac{1}{3}$ der im Messkanal vorherrschenden Volumenmenge pro Zeitintervall, da die eingestellte Rate über den "Spritzenkamm", auf drei Spritzen simultan ausgeübt wurde. Die Bildaufnahmen des Mikrokanals wurden mit einer Hamamatsu-Kamera (C4742-80-12AG), angeschlossen an ein Olympus IX71 Mikroskop (s. Kapitel 3.7) und mit einem Edmund Objektiv (DIN4 0,10) durchgeführt. Die Kamera wurde dabei über die Xcellence-Pro-Software (*Olympus*) bedient und die Bildaufnahme im *.avi-Format gespeichert. Für die spätere Auswertung der Bilddaten wurde der Bildbereich auf den Mündungsbereich der drei Inletkanäle in den Messkanal eingestellt.

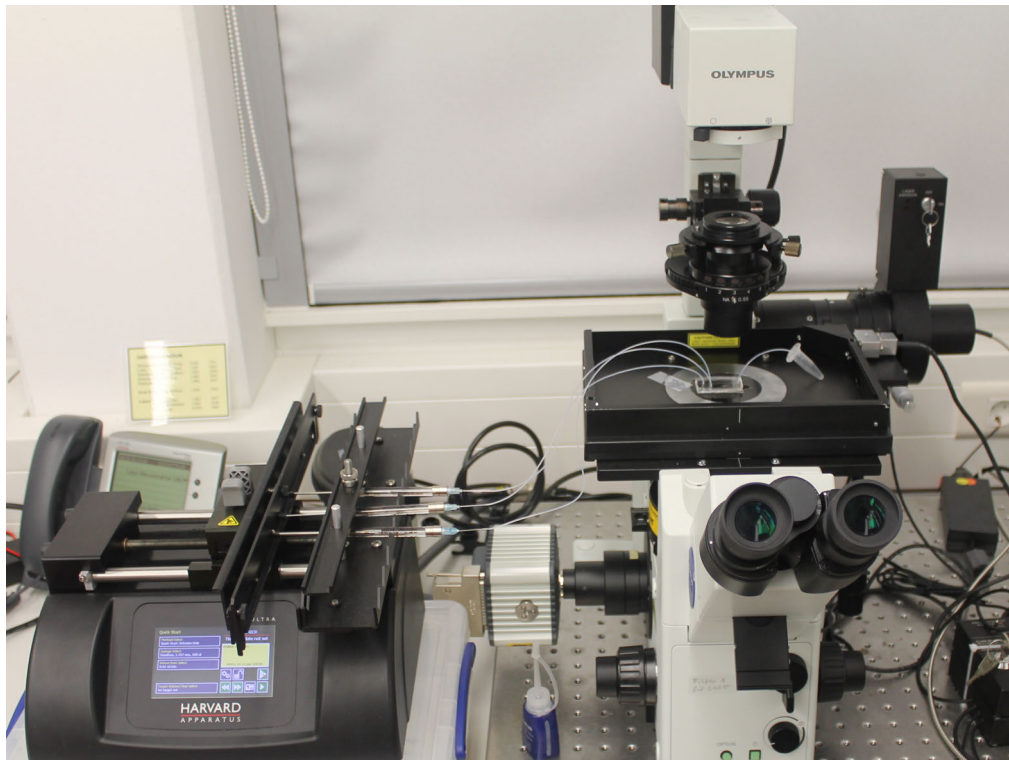


Abb. 3.12.: Darstellung des experimentellen Aufbaus aus der Harvard Spritzenpumpe mit Kammaufsatz (links vorn) und dem angeschlossenen Kanal auf dem Mikroskoptisch (rechts)

Nachdem die Farbbande am Messkanal-Outlet erkennbar war, wurde die Flussgeschwindigkeit solange reduziert, bis die Farbbande in den Bildbereich der Mikroskopkamera sichtbar wurde. Daraufhin wurde die Bildaufnahme gestartet, von der Xcellence-Software nach 500MB-Datenvolumen selbst-

ständig beendet und abschließend gespeichert. Die eingestellte Volumendurchsatzrate in $\mu\text{l}/\text{min}$ wurde notiert.

Im Anschluss an diese Versuchsdurchführung wurden die aufgenommenen Bilddateien im Programm ImageJ als Bildstapel importiert. Die Bilderfolge wurde bis zur stationären Phase der Farbbande abgefahren. Dieses Bild wurde als Messbild im Bildformat *.jpg gespeichert. Im Anschluss wurde die Kanalbreite im gleichen Programm ImageJ als Referenzwert bestimmt und aus der bekannten Kanalbreite der oben beschriebenen Dektak-Messung das Pixel/Abstandsverhältnis festgelegt. Der Beginn des Messkanals wurde als Referenzlinie für die Abstandsmessung bestimmt (s. Abbildung 4.5 in Kapitel 4.1.2) und der Farbbandenabstand entlang der Kanalmittellinie bis zur Referenzlinie gemessen und in Mikrometern gespeichert.

Anhand der bekannten Parameter Flussgeschwindigkeit im Kanal (notierte Flussgeschwindigkeit multipliziert mit der Spritzenanzahl), Kanaldimension und gemessenen Bandenabstand wurde im Anschluss in einer Datentabelle (*.xls) die zum Farbumschlag vergangene Zeit bestimmt und mit den gemessenen Farbumschlagszeiten auf der Mikrotiterplatte verglichen (s. Kapitel 4.1.2).

Fluoreszenzaufnahmen im Mikrokanalsystem

Es wurden weiterhin Fluoreszenzexperimente mit verschiedenen Hindernisstrukturen im Mikrokanal durchgeführt, um den Einfluss der Hindernisse auf das Mischungsverhalten im Kanal genauer zu untersuchen.

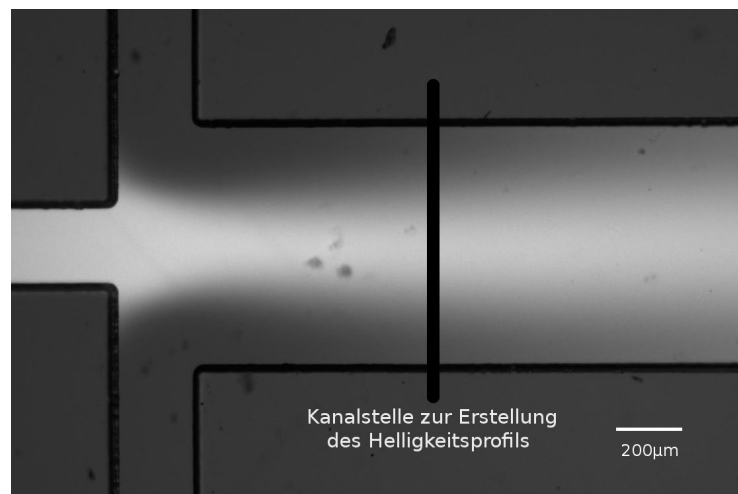


Abb. 3.13.: Mikrokanalaufnahme zum Mischungsverhalten von in Wasser gelöstem Fluoreszenzfarbstoff FITC (1mM). Die Farbstofflösung wurde durch den mittleren Kanal in den Messkanal gepumpt. Durch die Zuleitungskanäle oben und unten wurde jeweils bidestilliertes Wasser zugeführt. Die mit einem senkrechten Strich markierte Stelle zeigt den Ort für die Erstellung des Helligkeitsprofils im Kanalquerschnitt. Die Flussrichtung verläuft von links nach rechts.

Für diese Versuche wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein (FITC) in der Konzentration 1mM in bidestilliertem Wasser gearbeitet. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde mit Licht einer Wellenlänge von $\lambda = 488\text{nm}$ angeregt und die Bildaufnahmen durch einen Bandpassmissionsfilter von $\lambda = 520\text{nm}$ ($\pm 5\text{nm}$) mit Hilfe der Xcellence-Pro-Software (*Olympus*) aufgenommen und im *.jpg Format gespeichert. Die Bilder wurden nach der Aufnahme im Programm ImageJ aufgerufen und an der in Abbildung 3.13 markierten Messkanalstelle ($l=600\mu\text{m}$) ein Helligkeitsprofil erstellt.

3.7.3. Zeiss Axio Observer

Für die Mikroskopaufnahmen mit dem Modellorganismus *Escherichia coli* wurde ein Axio-Observer der Firma *Zeiss* (Jena) mit einem Kamerasystem des Laser-Scanning-Mikroskope (LSM) 780 Systems verwendet. Alle Aufnahmen wurden im Hellfeld mit einer HAL 100 Halogenlampe im Durchlichtkanal durchgeführt. Die Bildaufnahmen wurden mit der ZEN-Software (*Zeiss*) im *.czi Rohdatenformat abgespeichert. Es wurden Einzelbildaufnahmen und Bild-Zeit-Stapel aufgenommen. Für die Stapel-Aufnahme wurde eine Aufnahmezeit von 3,8 Bilder pro Sekunde (fps) gewählt, wobei die Bildgenerierung im „FastFrame“-Modus 0.2s in Anspruch nahm. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Video- und Bildaufnahmen wurden aus diesen Rohdaten mit Hilfe des ZEN-eigenen Konverters in die Formate *.avi und *.jpg konvertiert. Alle Aufnahmen wurden mit einem Plan-Apochromat-40x Objektiv (1,4 Oil DIC 27 / *Zeiss*) durchgeführt.

3.7.4. Mikroskopische Aufnahmen der funktionalisierten Hydrogele

Die Bindungsexperimente zwischen dem funktionalisierten Hydrogel und dem Modellorganismus *Escherichia coli* wurden mit dem oben beschriebenen Zeiss Axio Observer durchgeführt. Die verwendeten Hydrogele (s. 3.4.4) wurden auf einem Borosilikat Deckglas (D263 *Schott* / Dicke $175\pm 15\mu\text{m}$) in 2 μl PBS pH 7,4 positioniert und mit einem Deckglas abgedeckt. Bei den Aufnahmen während der Inkubation mit der *E.coli*-Lösung wurden 2 μl Zellsuspension zwischen die Glasplatten pipettiert, so dass die Bakterien in die PBS-Lösung schwimmen konnten und schließlich die Hydrogelkante erreichten. Ab diesem Zeitpunkt wurde die oben genannte Stapel-Aufnahme gestartet. Die Zelldichte der verwendeten Suspensionen lag zwischen $2,8 \cdot 10^8$ und $2,5 \cdot 10^{10}$ Zellen je ml Suspension.

Die Aufnahmen der in Zellsuspension dreitägig inkubierten Hydrogele wurden in PBS bei pH 7,4 auf einem Deckglas mikroskopiert, wobei auf das obere Deckglas verzichtet wurde. Die Aufnahmen wurden im Einzelbild-Modus ebenfalls mit dem Plan-Apochromat-40x Objektiv (1,4 Oil DIC 27 / *Zeiss*) aufgenommen und erst im *.czi Format gespeichert, bevor sie in das *.jpg Format exportiert wurden.

Kapitel 4.

Ergebnisse

Der folgende Ergebnisteil dieser Arbeit setzt sich aus drei Teilen zusammen. Im Kapitel 4.1 wird das kinetische Verhalten der Iodat-Arsenit-Clock-Reaktion in μl -Volumina auf einer Mikrotiterplatte mit dem Verhalten im Nanoliterbereich in einem Mikrokanal verglichen. Anhand von unterschiedlichen Geometrien und Lösungszusammensetzungen wurde hierbei besonders der Einfluss des Mischverhaltens auf die Kinetik untersucht.

Im zweiten Abschnitt 2.3.3 des Ergebnisteils wird ein papierbasiertes Mikrokanalsystem vorgestellt, das mit Hilfe thermoresponsiver Hydrogele zu einem neuen, extern steuerbaren Lab-On-Chip (LOC) in Form eines Demonstrators entwickelt wurde.

Im letzten Teil der Ergebnisse werden in Kapitel 4.3 die gewonnenen Erkenntnisse aus den oben genannten Kapiteln genutzt, um eine Pathogennachweisreaktion mit Hilfe des Modellorganismus *Escherichia coli* in ein papierbasiertes Schnelltestsysteams zu integrieren. Abschließend werden die Voraussetzungen geschaffen, um den Nachweis direkt mit der Verstärkungsreaktion zu koppeln, so dass für ein zukünftiges Schnelltestsysteams auf ein Kanalsysteams oder weitere notwendige Aufbereitungsschritte verzichtet werden kann.

4.1. Verhalten eines autokatalytischen Systems im mikrofluidischen Kanal

Zur erfolgreichen Verwendung von anorganischen, autokatalytischen Reaktionen für die Verstärkung eines primären Bindungsereignisses ist es erforderlich, dass das autokatalytische System sich als lagerstabil erweist und dennoch zuverlässig ausgelöst werden kann. Darüber hinaus sollte eine Verstärkung auch bei sehr geringen Mengen des Initiators gewährleistet sein.

Aus den vorhandenen bekannten autokatalytischen Reaktionen^{[29],[84]} wurde die Arsenit-Jodat-Clock-Reaktion ausgewählt und das Verhalten dieser Clock-Reaktion in μl -Volumina und Nanolitervolumen im mikrofluidischen Kanal untersucht und charakterisiert. Hierzu wurde der in Kapitel 2.2.3 beschriebene, zeitverzögerte Farbumschlag der Reaktion genutzt um den Verlauf der Reaktion zu bestimmen. Im folgenden Kapitel wird zuerst das Farbumschlagsverhalten in Abhängigkeit der beteiligten Substanzen in Volumenmengen bis 300 Mikrolitern auf einer 96Well-Mikrotiterplatte bestimmt. Anschließend wird die Reaktion in einer Mikrofluidikkammer ausgelöst und die Ergebnisse mit denen der Mikrotiterplatte verglichen. Zum Abschluss wird über eine numerische Simulation versucht, die Konzentrationsverhältnisse in dem Mikrokanal nachzubilden.

4.1.1. Arsenit-Iodat Reaktion in der Mikrotiterplatte

Zuerst wurde die Kinetik der Arsenit-Jodat Reaktion in den 300 μ l Wells einer 96 Well-Mikrotiterplatte untersucht. Der Vorteil dieser Methode war die Möglichkeit des simultanen Auslösens mehrerer Wells durch gleichzeitige Zugabe des Startreagenzes Kaliumjodid.

In Abbildung 4.1 ist der Verlauf der Arsenit-Iodat Reaktion in den 300 μ l Wells der 96-Well-Mikrotiterplatte zum Einen für verschiedene Kaliumjodid-Startkonzentrationen und zum Anderen für unterschiedliche pH-Werte in gepufferten Systemen dargestellt.

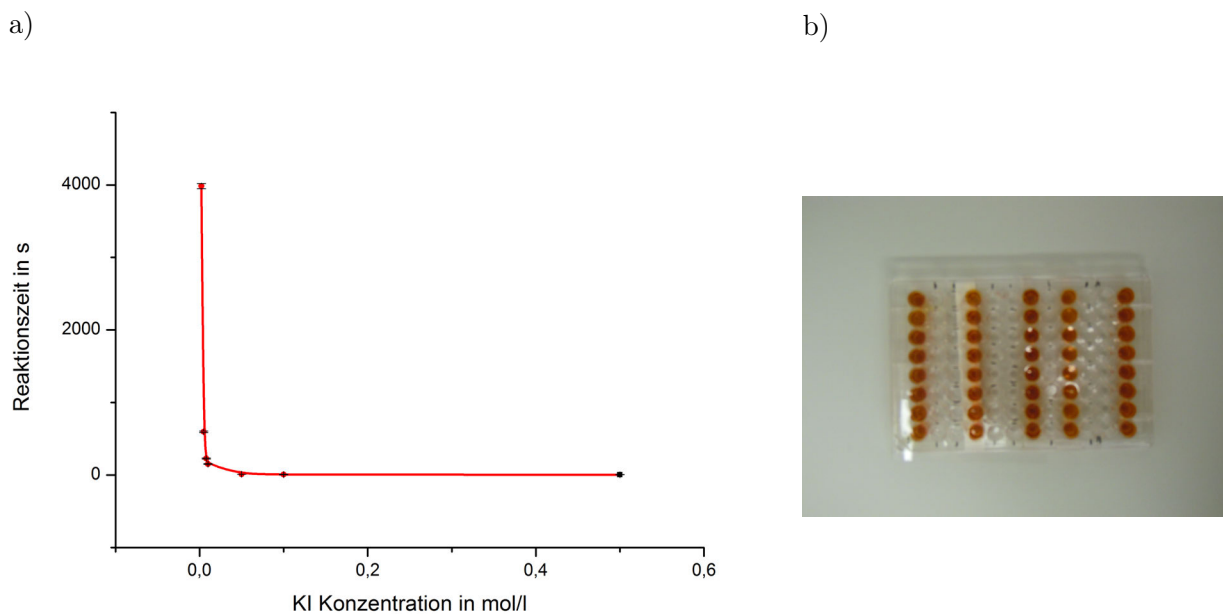


Abb. 4.1.: a) Reaktionszeit bis zum Farbumschlag der Arsenit-Iodat Reaktion im Mikrotiterplatten-Well bei unterschiedlichen Startkonzentrationen. b) Clock-Reaktion mit Farbumschlag in der Mikrotiterplatte.

Die Reaktionsdauer bis zum Farbumschlag bei unterschiedlichen Kaliumjodidkonzentrationen als Starter in Abbildung 4.1a) zeigt, dass die Clock-Reaktion ein nichtlineares Verhalten aufweist. Werden die Daten in einem doppelt logarithmischen Plot aufgetragen, so liegen die Werte annähernd auf einer Geraden, wie in Abbildung 4.2a) gezeigt. Hierbei fällt auf, dass die Steigungen für alle pH-Werte annähernd konstant ausfallen, jedoch die Graphen zueinander parallel verschoben sind. Je kleiner der pH-Wert der Reaktionslösung, desto schneller findet ein Farbumschlag statt. Somit zeigt Abbildung 4.2a) dass sich eine Zunahme der Protonenkonzentration in einer Beschleunigung der Reaktionskinetik des gesamten Systems äußert innerhalb des betrachteten Bereiches für die Initiatorkonzentrationen.

Neben den Versuchen mit unterschiedlichen pH-Werten wurde auch untersucht, inwiefern die Arsenit-Konzentration Einfluss auf die Farbumschlagszeit nimmt. Zu erwarten war eine längere Umschlagszeit bei steigender Arsenit-Konzentration, denn erst wenn die Roebuck-Reaktion (2.7) aufgrund der verbrauchten arsenigen Säure nicht mehr stattfindet, zeigt sich der Farbumschlag. Abbildung

4.2 zeigt die doppelt logarithmisch aufgetragenen Umschlagszeiten für unterschiedliche Arsenit-Konzentrationen.

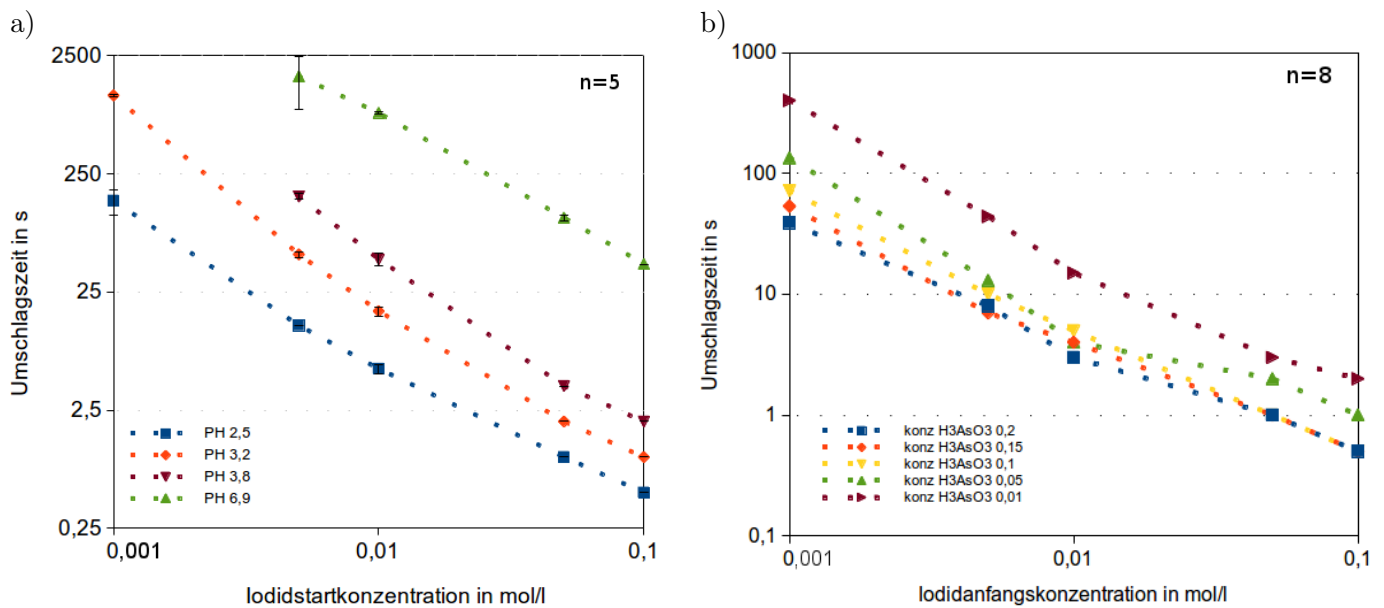


Abb. 4.2.: a) Reaktionszeit bis zum Farbumschlag der gepufferten Arsenit-Iodat Reaktion bei unterschiedlichen pH-Werten in doppelt logarithmischer Darstellung. b) Verhalten der Arsenit-Iodat Reaktion im Mikrotiterplatten-Well bei unterschiedlichen Arsenit-Konzentrationen in doppelt logarithmischer Darstellung.

Im Gegensatz zum erwarteten Resultat wird aus Abbildung 4.2a) deutlich, dass die Arsenit-Konzentration antiproportional zur Umschlagszeit verläuft. D.h. mit steigender Konzentration der arsenigen Säure nimmt die Umschlagszeit ab. Es zeigt sich darüber hinaus, dass dieser Faktor mit steigender Arsenit-Konzentration an Einfluss verliert.

Für einen sichtbaren Farbumschlag war es erforderlich der Reaktionslösung einen Indikator zu zusetzen. Wie bereits in Kapitel 3.1.1 ausgeführt, wurden als Indikatoren Polyvinylalkohol (PVA) und Stärkelösung verwendet. In einer Vorversuchsreihe zeigte sich, dass es bei der Verwendung von PVA zu unterschiedlichen Reaktionszeiten kommt, wenn nur die Kaliumjodid-Lösung als Initiator mit dem Indikator versetzt war. Aus diesem Grund wurden allen Reaktionslösungen für die folgenden Messversuche der Indikator gleichermaßen hinzugefügt, wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben.

Aus den Ergebnissen der unterschiedlichen Reaktionszeiten der Vorversuchsreihe wurde vermutet, dass der Indikator PVA einen Einfluss auf die Viskosität und damit auch den Mischungszustand der gesamten Reaktionslösung ausübt. Um dieses eingehender zu überprüfen, wurden daher ebenfalls Versuche bzgl. der Reaktionszeit mit unterschiedlichen Mischungszuständen und mit stark veränderter Viskosität vorgenommen. Als Verdicker wurde mit Agarose statt PVA gearbeitet, da hierdurch zusätzlich ein Reaktionseinfluss des Indikators mit den beteiligten Substanzen aus- oder eingeschlossen werden konnte. Die folgende Abbildung 4.3a) zeigt die Änderung der Farbumschlagszeit mit und ohne Verdicker.

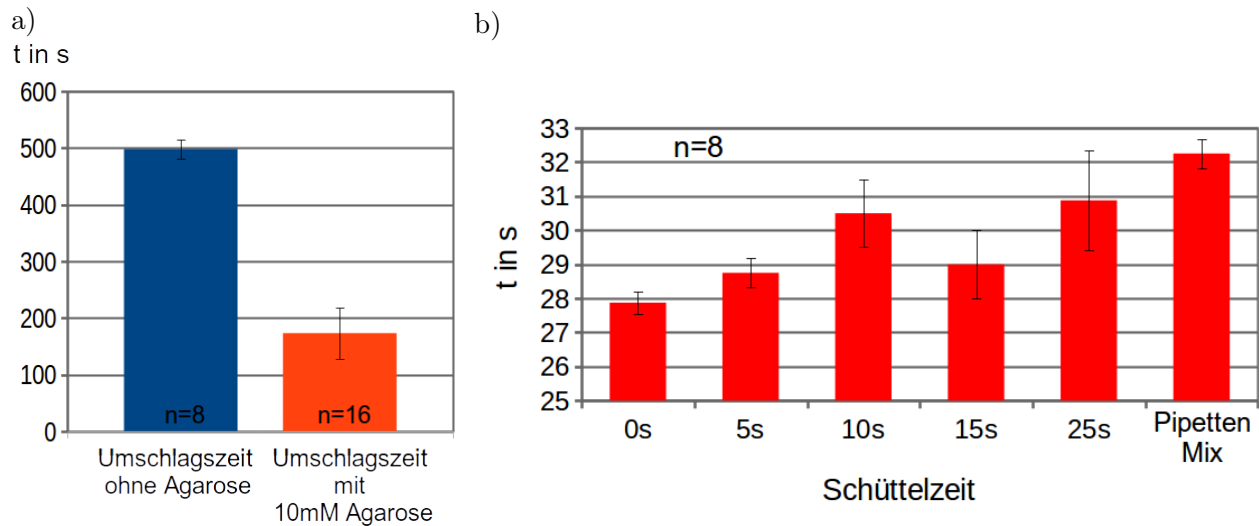


Abb. 4.3.: a) Darstellung der Reaktionszeit der Arsenit-Jodat Reaktion im Mikrotiterplatten-Well ohne und mit Agarose. b) Darstellung Reaktionszeit der Arsenit-Jodat Reaktion auf der Mikrotiterplatte bei unterschiedlichen Schüttelzeiten auf dem Laborschüttler. Die Pipettenmix Zeitdarstellung entspricht einem sehr gut gemischten Zustand durch mehrmaliges auf und nieder Pipettieren im Mikrotiterplatten-Gefäß.

Es ist offensichtlich, dass eine zeitlich verzögerte Durchmischung aufgrund der stark erhöhten Viskosität in diesem Fall in etwa zu einer Verdopplung der Reaktionsgeschwindigkeit führt. Ein ähnliches Verhalten zeigt sich, wenn man die Reaktionslösungen unterschiedlich stark vermischt. Hierfür wurde die Clock-Reaktion mit Hilfe eines Mikroplattenschüttlers nach Zugabe des Initiators unterschiedlich stark geschüttelt und so der Einfluss des Mischungsprozesses auf die Umschlagszeit untersucht. Abbildungen 4.3b) und 4.4 zeigen die gemessenen Umschlagszeiten im Verhältnis zu den eingestellten Schüttelzeiten und -geschwindigkeiten.

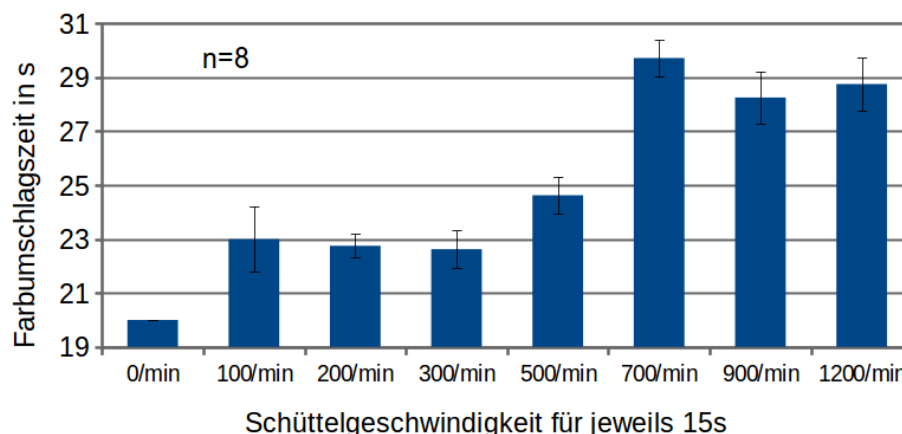


Abb. 4.4.: Verhalten der Arsenit-Iodat Reaktion im Mikrotiterplatten-Well bei unterschiedlichen Schüttelgeschwindigkeiten. Einfluss der Schüttelzeit auf den Farbumschlag.

Das Versuchsergebnis aus Abbildung 4.3b) zeigt, dass sich die Reaktionszeit bei einer konstanten Schüttelfrequenz von 300 Umdrehungen pro Minute (rpm) mit zunehmender Schüttelzeit um etwa

10% verlängert. Nimmt man die Vermischung mit der Pipette als idealem Mischungszustand, so ergibt sich ein Unterschied zu der am Rand zugegebenen Initiatorlösung ($0s$) von ca. 12% oder 4 Sekunden.

Deutlicher wird der Zeitunterschied im Reaktionsverlauf, wenn man statt der Schüttelzeit die Schüttelfrequenz und damit die Intensität der Durchmischung der gleichen Reaktionslösung erhöht, wie man Abbildung 4.4 entnehmen kann. Durch eine Schüttelintensitätszunahme von 0 bis zu 1200 rpm verlängert sich die Reaktionszeit um etwa $\frac{1}{3}$ im Vergleich zur nicht geschüttelten Probenreihe.

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse wurde nun im Folgenden untersucht, wie sich das Farbumschlagverhalten der Arsenit-Jodat-Reaktion im Mikrokanal verhält.

4.1.2. Arsenit-Iodat Reaktion im Mikrokanal

Im Anschluss an die Versuchsreihen auf der Mikrotiterplatte (s. Kapitel 4.1.1) wird die Arsenit-Jodat Reaktion nun in einem linearen Mikrokanal ausgelöst, um das Verhalten in einem μm -dimensionierten Versuchsaufbau zu studieren. Die Maschenweite auf einem Tuch oder innerhalb eines netzförmigen Zellulosesubstrates entsprechen dieser Größenordnung. Die Verwendung von PDMS-basierten Mikrofluidikkanälen bietet sich durch die leicht zu verändernden Strukturen und die guten Kontrollmöglichkeiten sowohl der Flussgeschwindigkeiten, als auch der Flüssigkeitsvolumina an. Die Einzellösungen wurden hierbei getrennt dem Messkanal zugeführt (s. Beschreibung Kapitel 3.7.2). Die Messung fand im Fluss statt, so dass sich an einem Ort des Kanals eine stationäre Farbumschlagsbande einstellte, wie sie in Abbildung 4.5 dargestellt ist.

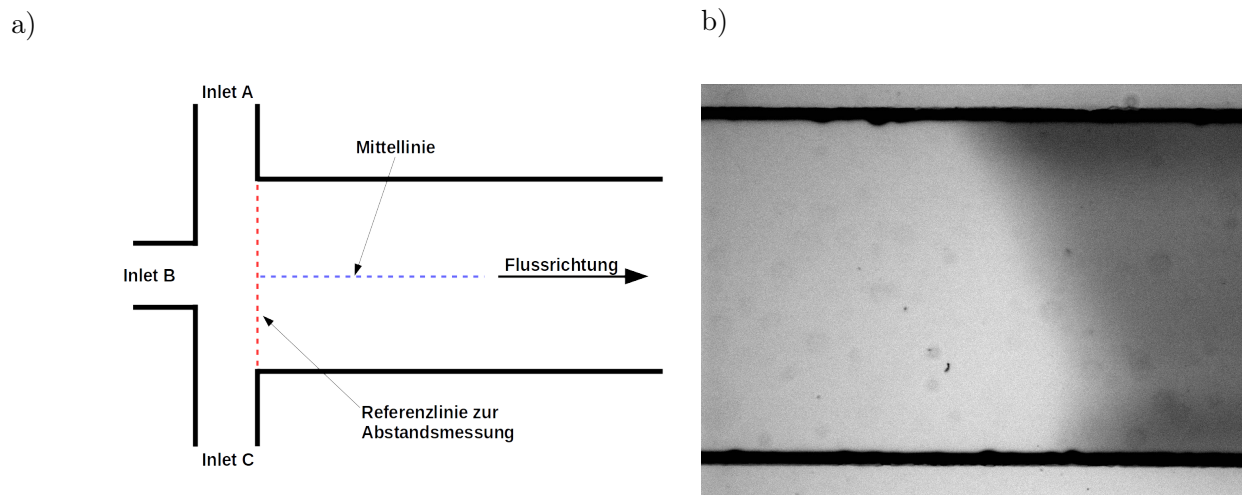


Abb. 4.5.: Abbildung a) zeigt eine schematische Darstellung des linearen Mikrokanals. Über die Inlets A-C wurden die Reaktionslösungen zugeführt. Der Abstand zur Farbumschlagsbande, wie sie in Abbildung b) dargestellt ist, wurde von der Referenzlinie entlang der Mittellinie gemessen. Anhand der eingestellten Flussgeschwindigkeit und des ermittelten Abstandes wurde die Reaktionszeit bestimmt.

Aus dem Abstand der Farbumschlagbande von der Referenzlinie, der Kanalgeometrie und der eingestellten Volumendurchsatzrate ließ sich anschließend die Reaktionszeit zum Farbumschlag berechnen. Abbildung 4.6 zeigt die ermittelte Farbumschlagszeit im Mikrokanal im Vergleich mit den gemessenen Zeiten auf der Mikrotiterplatte. Je Versuchsreihe wurden die identisch gepufferte Lösungen bei pH 3,8 verwendet.

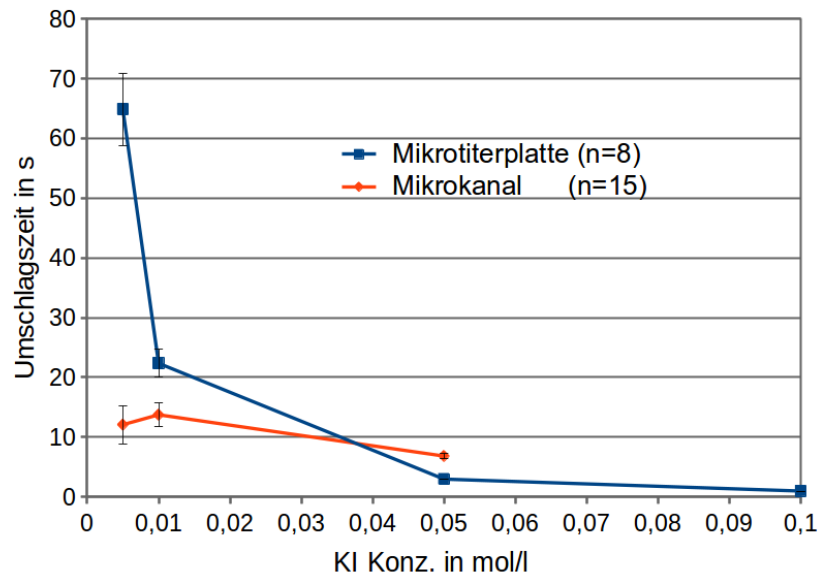


Abb. 4.6.: Vergleich der Farbumschlagszeit der Clockreaktion zwischen Mikrokanal und Mikrotiterplatte.

Der Vergleich der Farbumschlagszeiten zwischen den Reaktionen auf der Mikrotiterplatte und den Reaktionen im Mikrokanal zeigt, dass im Mikrokanal die Reaktion mit Initiatorkonzentrationen unterhalb von 0,04 mol/l „beschleunigt“ abläuft. Bei hohen Kaliumjodid-Konzentrationen, bei der im Mikrotiter-Well sich eine Umschlagszeit von einer Sekunde zeigt, findet der Farbumschlag im Mikrokanal hingegen mit neun Sekunden deutlich langsamer statt. Um sicherzustellen, daß die Referenzlinie und die Farbbande noch in einem Bild erfasst werden, musste in diesem Fall für die Datenerhebung jedoch die Flussgeschwindigkeit erhöht werden. Daher stellt sich an dieser Stelle die Frage, ob unterschiedliche Flussgeschwindigkeiten einen Einfluss auf die Farbumschlagszeit der autokatalytischen Reaktion haben. Abbildung 4.7 zeigt daher die Farbumschlagszeiten bei unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten für jeweils die gleiche Clock-Reaktionslösung. Es wurden an der Spritzenpumpe für die Versuchsreihen jeweils drei verschiedene Geschwindigkeiten für identische Reaktionslösungen von 0,06 $\mu\text{l}/\text{min}$, 0,07 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 0,08 $\mu\text{l}/\text{min}$ eingestellt. Da alle drei Lösungen simultan mit der eingestellten Volumengeschwindigkeit in den Messkanal gepumpt wurden, ergab sich im Kanal eine dreifach höhere Volumendurchsatzrate. Es ist gut zu erkennen, dass die Farbumschlagszeit der identischen Reaktionslösung im Mikrokanal dreimal schneller verläuft als im Mikrotiterplatten-Well. Weiterhin fällt auf, dass mit $\frac{1}{3}$ steigender Flussgeschwindigkeit zur Startgeschwindigkeit von 66 $\mu\text{m}/\text{s}$ eine Zunahme der Farbumschlagszeit im Mikrokanal von 17 Sekunden (von 22 zu 39 Sekunden) verbunden ist.

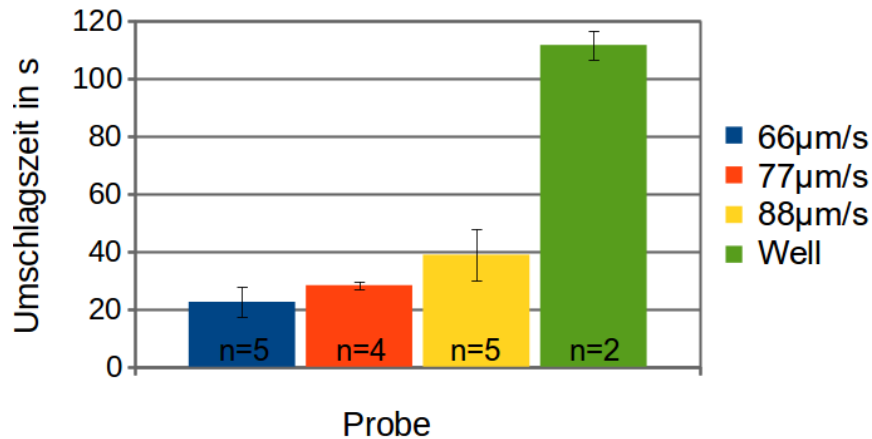
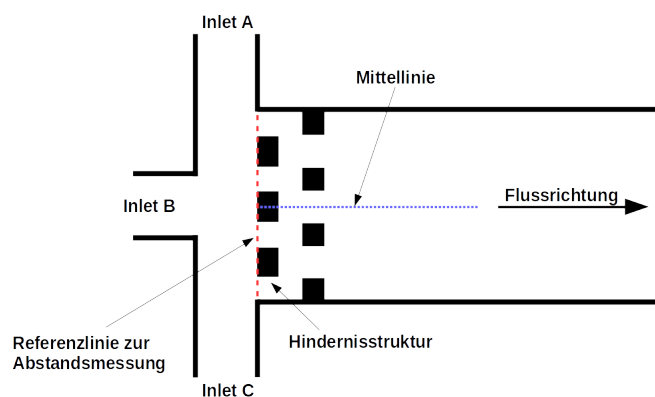


Abb. 4.7.: Vergleich der Farbumschlagszeit der Clockreaktion bei steigender Flussgeschwindigkeit im Vergleich mit der Farbumschlagszeit im Mikrotiter-Well.

Alle bis zu diesem Zeitpunkt aufgenommenen Beobachtungen erhärteten die These, dass die getrennt zugeführten Lösungen und die Einflüsse der Flussgeschwindigkeit Auswirkungen auf den Mischungs-zustand der Reaktionslösung nahmen. Daher entstand die Idee, mit Hilfe von Hindernisstrukturen eine bessere Durchmischung der Reaktionslösungen zu erreichen. Als Ergebnis müsste sich somit eine bessere Durchmischung in einer längeren Reaktionszeit bis zum Farbumschlag äußern. Daher wurde in den in Kapitel 3.7.2 beschriebenen Mikrokanal Hindernisstrukturen eingebracht und analog wie in den Versuchsreihen mit dem linearen Mikrokanal die entsprechende Reaktionsgeschwindigkeit gemessen.

a)



b)

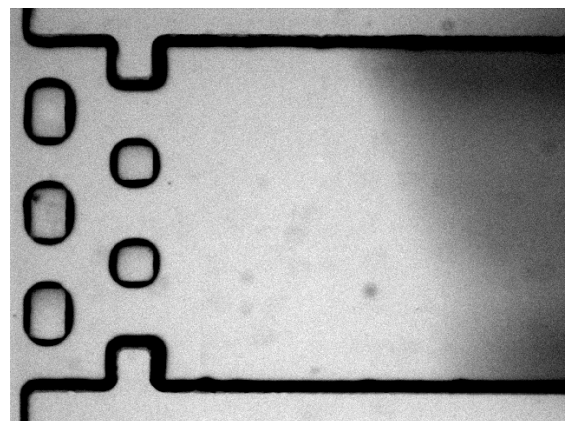


Abb. 4.8.: a) Schematische Darstellung des Mikrokanals mit Hindernissen. Über die Inlets A-C wurden die Reaktionslösungen zugeführt. Die Durchlässe in den Hindernisstrukturen entsprechen der halben Kanalbreite ($332 \pm 1 \mu\text{m}$). Der Abstand zur Farbumschlagsbande, wie sie in der Realansicht in Abbildung b) dargestellt ist, wurde von der Referenzlinie entlang der Mittellinie gemessen.

Die Dimensionen der Hindernisstrukturen wurden so gewählt, dass sich ein Kanaldurchlass von der halben Messkanalbreite ($332 \pm 1 \mu\text{m}$) ergab. Die quadratischen Hindernisse haben daher eine Kantenlänge von $83 \mu\text{m}$, die rechteckigen Strukturen eine Kantenlänge von $83 \mu\text{m}$ und $110 \mu\text{m}$. Bei der Zeitberechnung aus den gemessenen Abstandswerten wurde diese Verengung bzgl. der Flussgeschwindigkeit mit berücksichtigt.

Vergleicht man nun die Farbumschlagzeiten der bis hierher durchgeführten Experimente miteinander, so ergibt sich das in Abbildung 4.9 a) dargestellte Ergebnis.

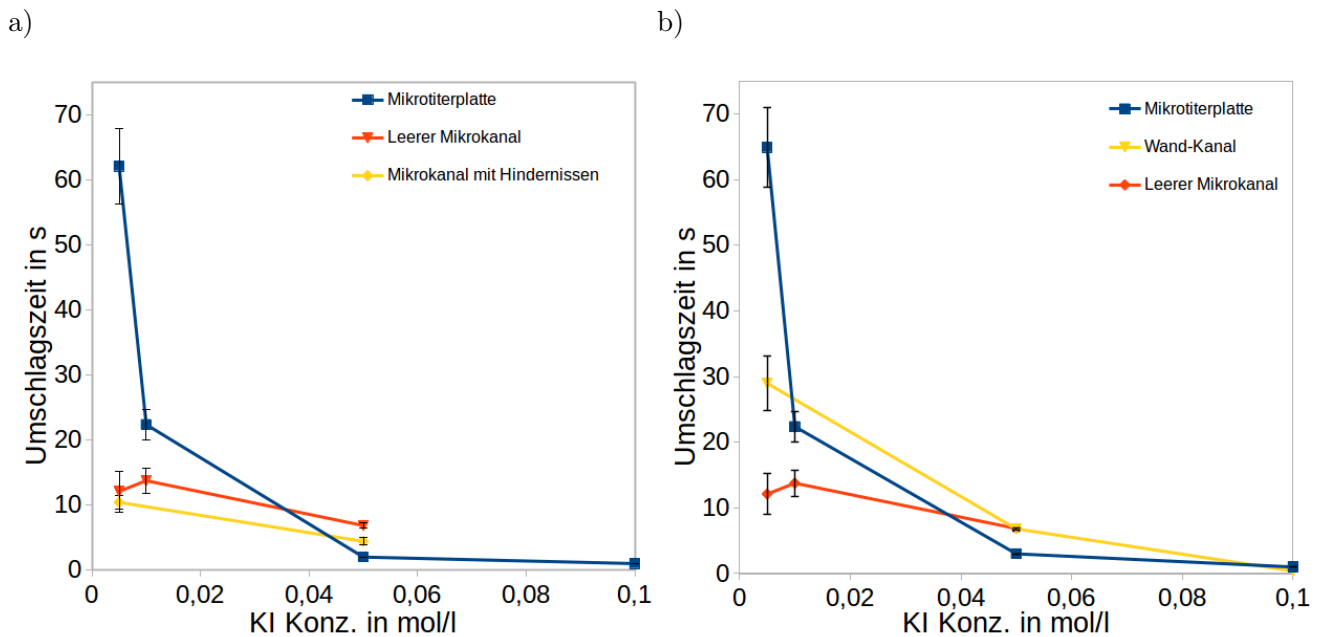


Abb. 4.9.: a) Farbumschlagzeiten der Clockreaktion auf der Mikrotiterplatte, im linearen Mikrokanal und im Mikrokanal mit quadratischen Hindernissen. b) Farbumschlagzeiten der Clockreaktion auf der Mikrotiterplatte, im linearen Mikrokanal und mit wandartigen Hindernissen.

Entgegen der erwarteten langsameren Reaktionsgeschwindigkeit, aufgrund der „besseren Durchmischung“ mit Hilfe der Hindernisstruktur, zeigen die Reaktionszeiten im Hinderniskanal eine nochmalige Beschleunigung der Kinetik für die Initiatorkonzentration von 5mM Kaliumjodid. Die Reaktionsgeschwindigkeit für die Starterkonzentration von $0,05 \text{M}$ hingegen liegt zwischen der Reaktionszeit auf der Mikrotiterplatte und der Reaktionszeit im leeren Mikrokanal.

Nachdem das Mischungsverhalten durch die im folgenden Kapitel 4.1.3 dargestellten Fluoreszenzversuche überprüft worden waren, wurden die Farbumschlagversuche in einem Mikrokanal mit wandartigen Hindernisstrukturen, wie in Abbildung 4.10 dargestellt, wiederholt. Gegenüber den Versuchen im leeren Mikrokanal und im Mikrokanal mit den quadratischen Hindernisstrukturen findet der Farbumschlag hier bei einer Konzentration von 10mM Kaliumjodid mit etwa 30s deutlich verzögerter statt, wie in Abbildung 4.9b) gezeigt. Gegenüber den Versuchen auf der Mikrotiterplatte hingegen verläuft die Reaktion im Wandhinderniskanal immer noch etwa doppelt so schnell.

4.1.3. Farbstoffdiffusion im Mikrokanal

Die in Abbildung 4.9 gemachten Beobachtungen entsprachen nicht der Erwartung, dass eine bessere Durchmischung zu einer Verzögerung in der Reaktionszeit führt. Aus diesem Grund war es wünschenswert, den Einfluss der Hindernisstruktur auf das Mischverhalten sichtbar zu machen. Das Mischungsverhalten der einzelnen Lösungen ist in den Versuchen mit der Clock-Reaktion leider nicht direkt nachzuvollziehen, da alle Lösungen zu Beginn transparent und farblos vorliegen (s. Abbildung 4.12a). Um den Mischungsprozess bezüglich der Diffusion dennoch sichtbar zu machen, wurden daher Fluoreszenzversuche mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein (FITC) 1mM in bidestilliertem Wasser in drei verschiedenen Kanaldesigns durchgeführt.

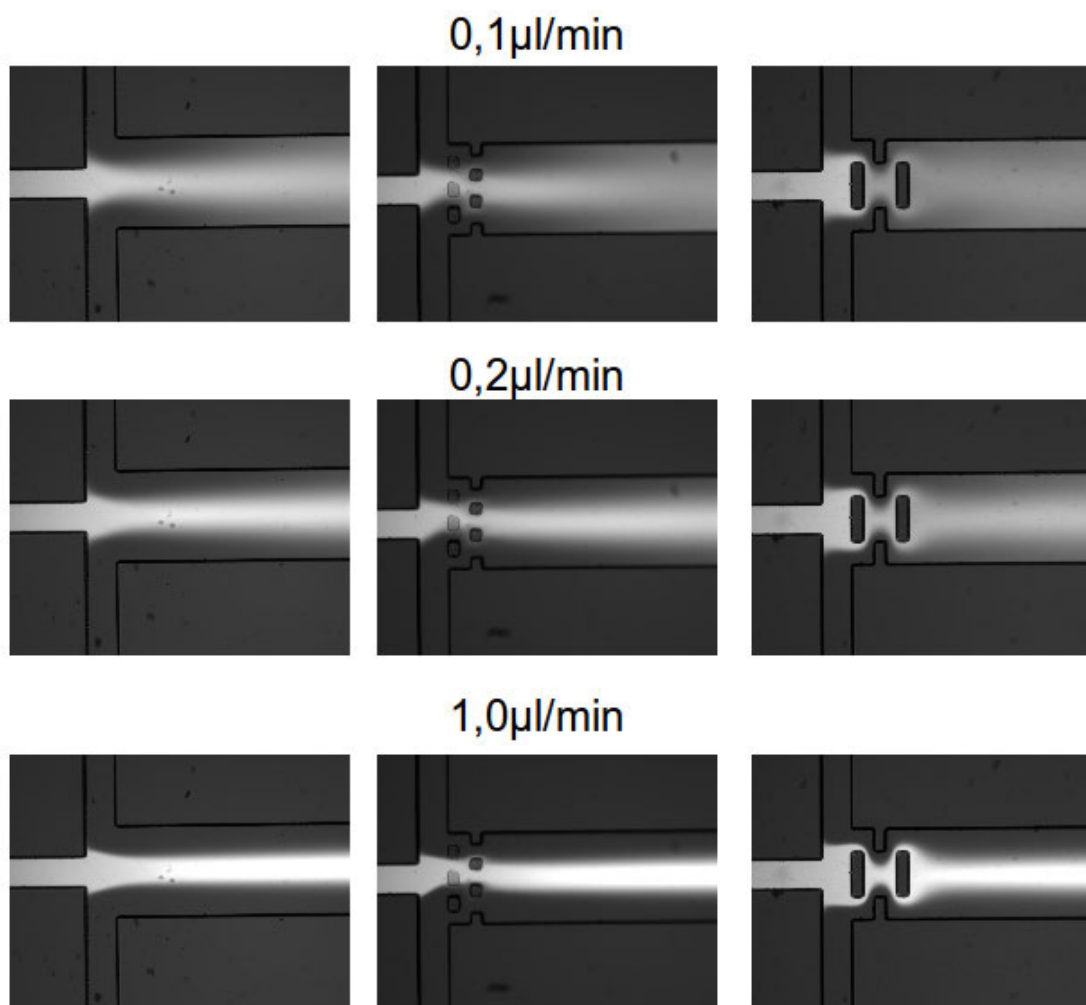


Abb. 4.10.: Fluoreszenzdiffusion im linearen Mikrokanal bei konstanten Flussbedingungen mit und ohne integrierte Strukturhindernisse. Die angegebenen Volumendurchsatzrate beziehen sich jeweils auf die Inlet-Kanäle. Im Messkanal liegt daher jeweils der dreifache Volumendurchsatz vor, bei dreifachem Kanalquerschnitt. Der Messkanal besitzt eine Kanalbreite von $650\mu\text{m}$ bei einer Kanalhöhe von $69\mu\text{m}$, die Inletkanäle hingegen weisen eine Kanalbreite von $221,5\mu\text{m}$ auf.

Die Fluoreszenzlösung wurde über den mittleren Inletkanal zugeführt. Über die beiden anderen Seitenkanäle wurde jeweils bidestilliertes Wasser zugeführt. Die bereits verwendeten Kanalgeometrien in Form des LinearKanals und des Mikrokanals mit säulenartigen Hindernissen wurden hier verglichen. Als dritte Kanalgeometrie wurde angelehnt an die Arbeit von Bhagat und Papautsky [7] eine rechteckige Hindernisstruktur gewählt, die jedoch vergleichbar mit der Säulengeometrie symmetrisch und senkrecht zur Flussrichtung angeordnet wurde.

Abbildung 4.10 zeigt das Diffusionsverhalten der Fluoreszenzlösung in die wässrigen Phasen nach oben und nach unten im Mikrokanal bei zunehmender Flussgeschwindigkeit von $110\mu\text{m/s}$, $220\mu\text{m/s}$ und $1100\mu\text{m/s}$. Die Maximalgeschwindigkeit entspricht dem Durchfluss des Bildausschnitts in einer Sekunde, die Minimalgeschwindigkeit entsprechend von etwa 10 Sekunden. Es ist erkennbar, dass die Fluoreszenz durch eine zunehmende Volumendurchsatzrate und damit eine erhöhte Flussgeschwindigkeit weniger über den Kanalquerschnitt verteilt ist. Die Verteilung der Fluoreszenz zwischen den verschiedenen Kanal designs bei gleicher Volumendurchsatzrate nimmt mit größerer Hindernisstruktur zu. Der geringe asymmetrische Flüssigkeitszufluss der Fluoreszenzlösung zu Beginn des Mikrokanals mit der säulenartigen Hindernisstruktur ergibt sich mit großer Wahrscheinlichkeit durch ein unvollständiges Bonding (s. Kapitel 3.2.2) der mittleren Säule in der ersten Reihe.

An den folgenden in Abbildung 4.11 gezeigten zugehörigen Helligkeitsprofilen lässt sich abschätzen, wie stark der Fluoreszenzfarbstoff FITC entlang der Kanalbreite diffundiert ist. Ein hoher Helligkeitswert entspricht einer hohen FITC-Konzentration.

Die Helligkeitsprofile bestätigen die bereits in Abbildung 4.10 gemachten Beobachtungen. Mit zunehmender Flussgeschwindigkeit ergibt sich ein engeres und höheres Helligkeitsprofil (s. Abbildung 4.11a) bis c)). Interessant ist der Vergleich der relativen Helligkeitswerte der unterschiedlichen Kanalgeometrien bei gleicher Flussgeschwindigkeit in Abbildung 4.11 d). Die relativen Helligkeitswerte liegen hier für den leeren Mikrokanal bei 155, für den Mikrokanal mit säulenartiger Struktur bei 137 und für den Wandkanal bei 96 Einheiten. Das Histogramm der säulenartigen Struktur liegt darüber hinaus innerhalb des leeren Mikrokanals. D.h. in dem Hinderniskanal mit der Säulenstruktur nimmt die Fluoreszenz gegenüber der des leeren Mikrokanals an den Kanalrändern nicht zu.

Im Gegensatz dazu ist die Fluoreszenzverteilung innerhalb des Wandkanals deutlich anders. Der Maximalwert in der Mitte des Kanals liegt um 39% unterhalb des leeren Mikrokanals. Gleichzeitig liegt der Fluoreszenzwert an den Kanalrändern um etwa 33% höher im Vergleich zu den Kanalrändern des leeren Mikrokanals. D.h. beim Wandkanal liegt eine deutlich bessere Durchmischung bei gleicher Flussgeschwindigkeit vor.

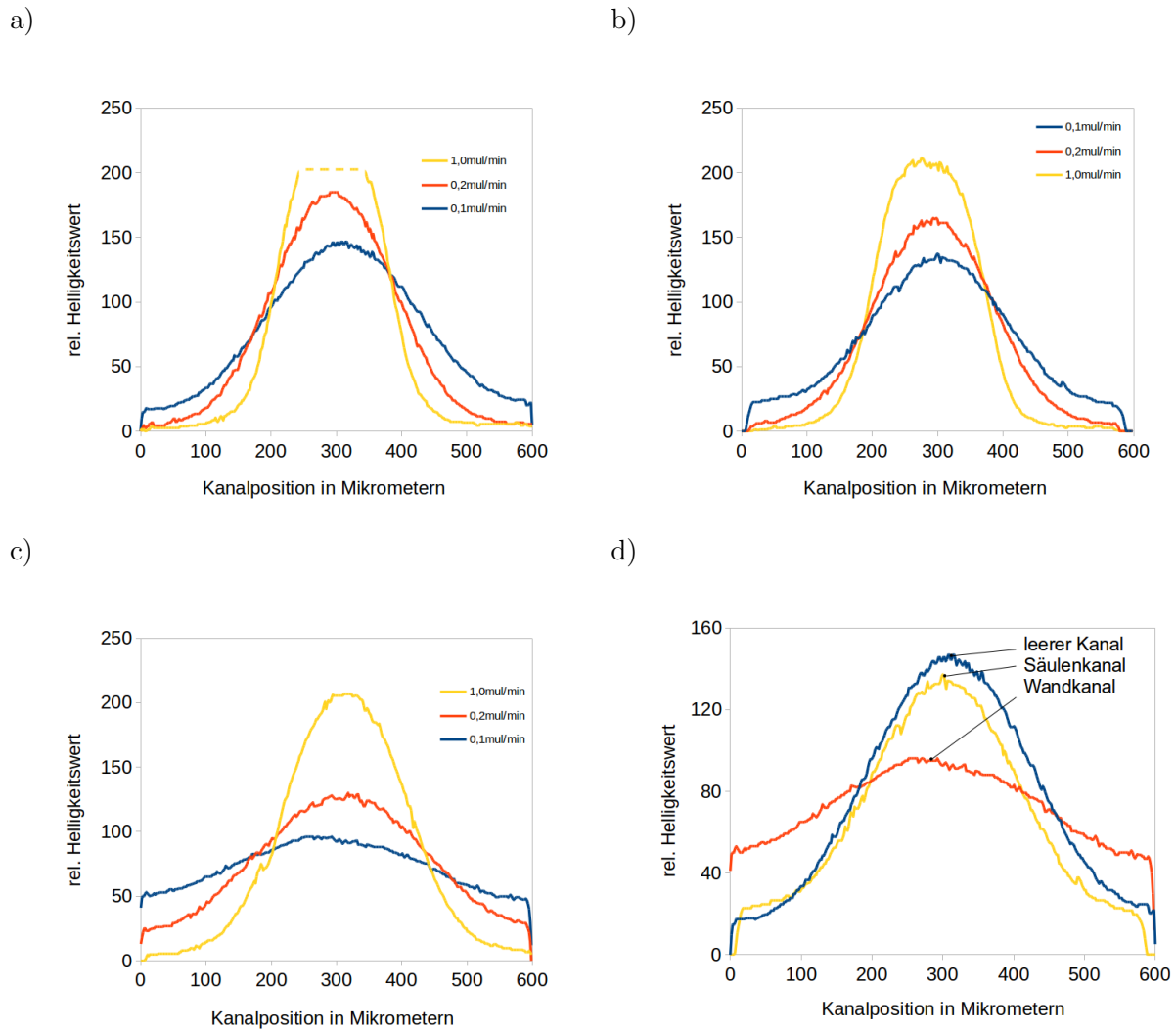


Abb. 4.11.: Helligkeitsprofile im Mikrokanalquerschnitt der in Abbildung 4.10 gezeigten Fluoreszenzaufnahmen im linearen Mikrokanal. Es wurde jeweils an den in Abbildung 4.10 durch Pfeile angezeigten Stellen entlang der Kanalbreite im Programm ImageJ das Helligkeitsprofil erstellt.

Abbildung a) zeigt das Helligkeitsprofil im Linearkanal ohne Hindernisse entlang der Kanalbreite bei den in Abbildung 4.10 dargestellten Flussgeschwindigkeiten. Der Helligkeitsverlauf bei einer Flussgeschwindigkeit von 1,0 µl/min überschreitet an der Kanalposition zwischen 250 und 350 µm den messbaren Bereich. Aus diesem Grund ist der Graph hier an der Messgrenze gestrichelt dargestellt. Abbildung b) zeigt den Helligkeitsverlauf des Mikrokanals mit säulenartigen Hindernisstrukturen, Abbildung c) das Profil des Kanals mit wandartigen Strukturen. Abbildung d) zeigt im Vergleich das Helligkeitsprofil aller drei dargestellten Kanalarten bei einer identischen Flussgeschwindigkeit von 0,1 µl/min.

4.1.4. Finite-Differenzen-Simulation im Linearkanal

Wie in Abbildung 4.12a) dargestellt, zeigt sich die Reaktion der Jodat-Arsenit-Reaktion im Mikrokanal bis zum Farbumschlag farblos, daher ist der Konzentrationsverlauf und die Kinetik der Reaktion bis zum Farbumschlag im Experiment nicht nachzuvollziehen. Erst die Farbbande zeigt die Dominanz der Dushman-Reaktion (s. Gleichung 2.6 in Kapitel 2.2.3) an. Aus diesem Grund wurde eine Finite-Differenzen-Simulation im Programm MatLab der Firma MathWorks¹ durchgeführt, um eine Vorstellung davon zu bekommen, welche kinetischen und flussbedingten Einflüsse beim Reaktionsverlauf berücksichtigt werden müssen. Hierbei wurden die einzelnen Substanzen in einem jeweils eigenen 2D-Feld simuliert.

Die Felder wurden in $1 \mu\text{m}^2$ Parzellen eingeteilt, denen je Iterationsschritt ein berechneter Konzentrationswert zugeordnet wurde. Eine genaue Beschreibung des Programmes ist im Kapitel 3.3 ausgeführt. Der zugehörige, ausführliche Quellcode ist im Anhang C dargestellt. Es wurden Vergleichssimulationen für die Jodidkonzentrationen 0.1M und 0.05M als Starterlösung durchgeführt. Aufgrund der sehr Zeitintensiven Simulation von mehreren Tagen bis zu Wochen bei mehr als 80-Millionen Iterationen wurden die Felder auf $80\mu\text{m}$ Breite und $100\mu\text{m}$ Länge begrenzt.

Die Abbildungen 4.12b) bis d) zeigen die Startbedingungen für die Simulation und entsprechen dem im Experiment verwendeten Messkanal. Die ersten drei Parzellenreihen werden konstant für jeden Iterationsschritt mit den Reaktionslösungskonzentrationen besetzt. D.h. von den $80\mu\text{m}$ Kanalbreite sind die Parzellen 1 bis 26 in drei aufeinander folgenden Reihen mit der Konzentration 0.1M für die Jodat-Lösung besetzt, die Parzellen 27 bis 53 mit der 0.0486M Konzentration der arsenigen Säure und die Parzellen 54 bis 80 mit der 0.1M, bzw. 0.05M Konzentration der Jodid-Initiatorlösung.

Der Iterationszeitschritt wurde auf $1 \cdot 10^{-8}\text{s}$ festgelegt, da ein längerer Zeitschritt innerhalb der Simulation eine zu geringe Auflösung für die Berechnung zur Verfügung stellte und zu Artefakten führte. Darüber hinaus wurde berechnet, ab welcher Konzentration das Reaktionsprodukt Iod dargestellt werden kann. Hierzu wurde angenommen, dass der simulierte Kanal mit den Maßen $80\mu\text{m} \times 100\mu\text{m} \times 40\mu\text{m}$ ein Volumen von 320Pikoliter (pl) besitzt. Durch dieses geringe Volumen werden rechnerisch daher erst bei einer Konzentrationsgrößenordnung von $1 \cdot 10^{-11} \text{ mol/l}$ einzelne Moleküle im Mikrokanal vorhanden sein. Daher wurden in den folgenden Abbildungen die Jodkonzentrationen erst ab $1 \cdot 10^{-11} \text{ mol/l}$ dargestellt.

¹<http://www.mathworks.de/products/matlab/>

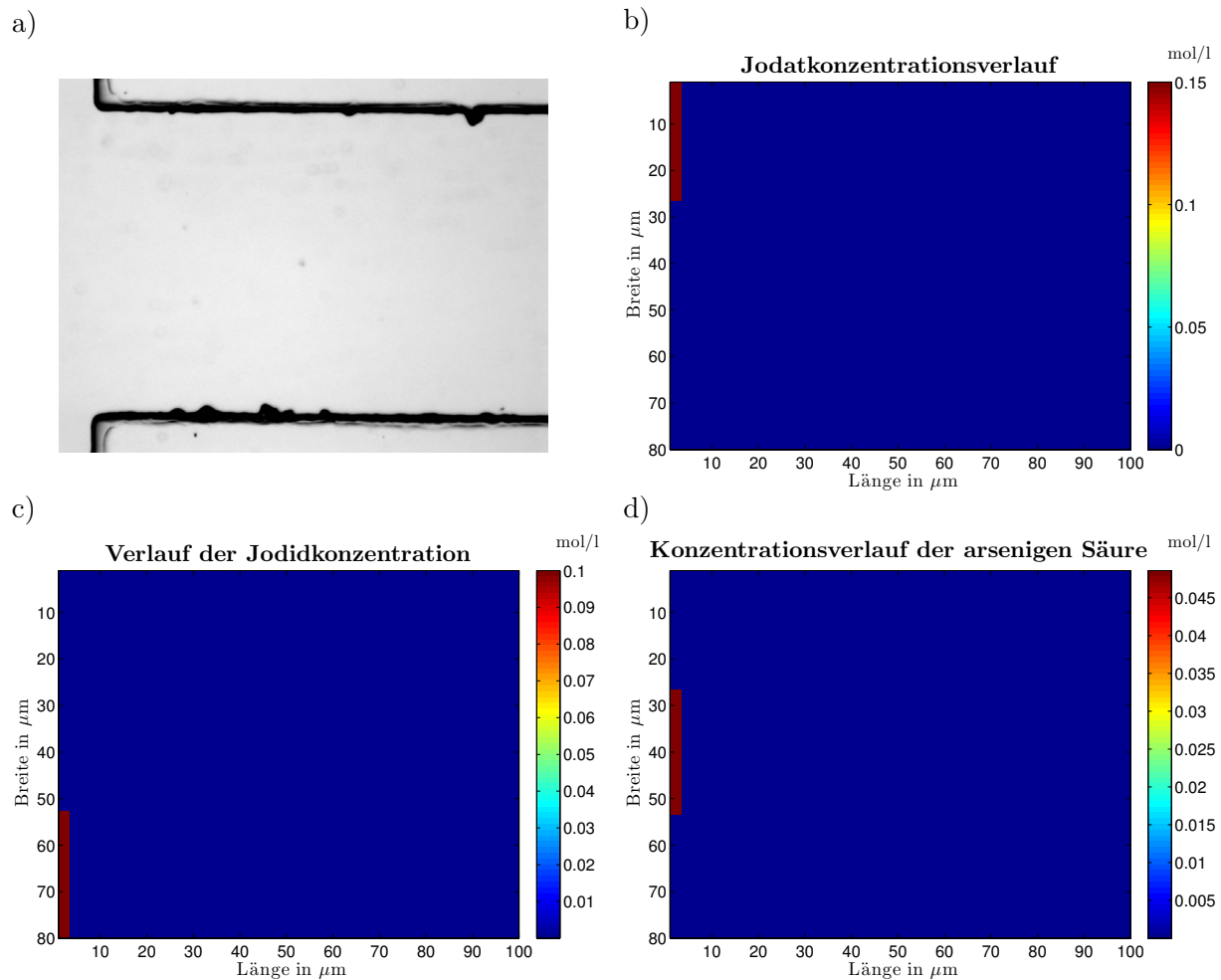


Abb. 4.12.: Abbildung a) zeigt einen Mikrofluidikkanal wie er sich im Realexperiment darstellt. Die einzelnen Lösungen sind aufgrund ihrer Transparenz nicht voneinander zu unterscheiden. Aus diesem Grund wurde eine Simulation durchgeführt, in der eine $80\mu\text{m}$ breite und $100\mu\text{m}$ lange Kanalgeometrie als Datenfeldgrundlage gewählt wurde. Abbildungen b) bis d) zeigen die Datenfelder, die den einzelnen Konzentrationen zugeordnet wurden. Die Flussrichtung verläuft von links nach rechts. Dargestellt sind die Startbedingungen der einzelnen Lösungszuflüsse Kaliumjodat 1M (b), Kaliumjodid 0.1M (c) und arsenige Säure 0.0486M (d). Die Zuflüsse blieben über den gesamten Simulationszeitraum konstant.

In den Abbildungen 4.13 und 4.14 ist zuerst der zeitliche Konzentrationsverlauf der Reaktionseprodukte Kaliumjodat, arsenige Säure und anschließend von Kaliumjodid gezeigt. Bei der Kaliumjodatkonzentration und der Konzentration der arsenigen Säure sollten sich erwartungsgemäß die Konzentrationen ausschließlich verringern, da diese während der Reaktionsverlaufs konsumiert werden.

Die Kaliumjodidkonzentration hingegen sollte sich während des Reaktionsablaufes erst verringern, jedoch infolge der in der Roebuck-Reaktion produzierten Jodid-Ionen (vgl. Gleichung 2.7 Kapitel 2.2.3) an exponierten Stellen lokal vergrößern. Die Jodkonzentration hingegen sollte sich in dem Moment „sprunghaft“ bemerkbar machen, wenn die arsenige Säure verbraucht ist und daher die Dushman-Reaktion bestimmend wird^[43].

Die in Abbildung 4.13 dargestellten zeitlichen Konzentrationsverläufe der Arsensäure und der Kaliumjodatlösung zeigen, wie erwartet, eine kontinuierliche Verringerung vom Startkonzentrationswert in Flussrichtung entsprechend der geometrischen Zuführung.

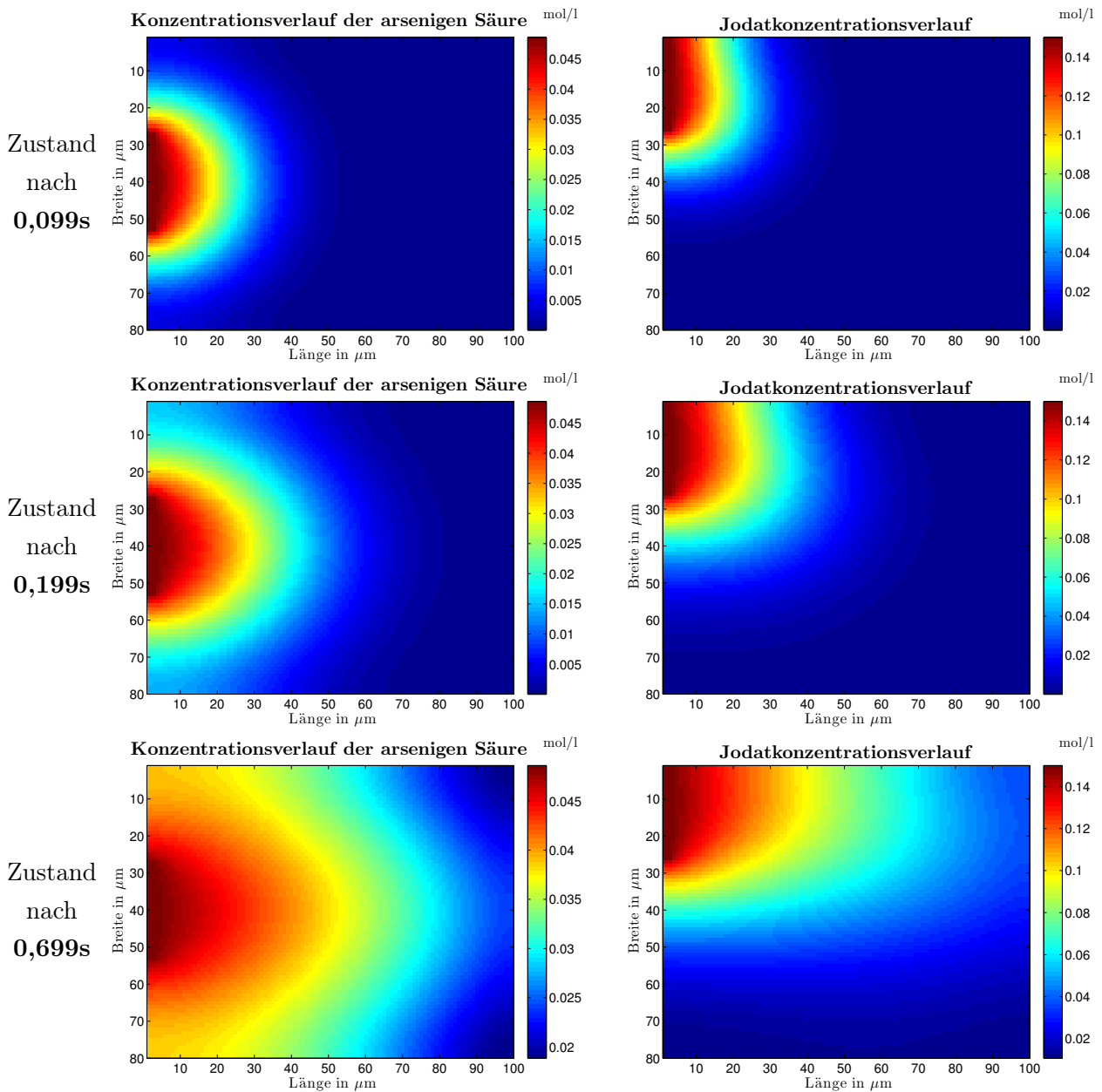


Abb. 4.13.: MatLab-Simulation des Konzentrationsverhaltens der zugeführten Reaktionslösungen von arseniger Säure und Kaliumjodat für die Jodat-Arsenit-Reaktion im linearen Mikrokanal bis zum Zeitpunkt $t=0,699\text{s}$. Die Simulation berücksichtigt hierbei bereits die getrennte Zuführung der Lösungen im jeweils einem eigenen Inletkanal. Die Kanallänge wurde für die Simulation auf $100\ \mu\text{m}$ (unterer Bildrand) und die Kanalbreite auf $80\ \mu\text{m}$ (Skala jeweils linker Bildrand) festgelegt. Die Flussrichtung verläuft von links nach rechts. Die Konzentration ist über die rechtsseitige Farbskala in mol/l angegeben. Die Flussgeschwindigkeit beträgt in der Simulation $130\frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$.

D.h. die arsenige Säure bereitet sich im Kanal aufgrund der mittig plazierten Zuführung symmetrisch in Flussrichtung abnehmend aus, die Kaliumjodatlösung hingegen breitet sich asymmetrisch von oben zur Mitte hin in den Mikrokanal in Flussrichtung aus. Es lässt sich im Zeitverlauf von 0,099s zu 0,699s ebenfalls erkennen, dass sich der Kernbereich der hohen Konzentration ($>80\%$ der Anfangskonzentration) in roter Farbdarstellung, bedingt durch die konstante Zuführung, mit Hilfe der Advektion in Flussrichtung verschiebt. Diese Verschiebung findet in der Kanalmitte bei etwa $40\mu\text{m}$ im Flussfeld mit der größten Geschwindigkeit deutlicher statt als am Kanalrand. Es zeigt darüber hinaus nach 0,699s, dass der Kernkonzentrationsbereich der arsenigen Säure etwa $10\mu\text{m}$ in der Kanallänge dem Kernbereich der Kaliumjodatlösung voraus liegt, obwohl die Jodatlösung dreifach höher konzentriert ist. D.h. trotz der geringeren Konzentration der arsenigen Säure breitet diese sich in Kanalrichtung schneller aus als die Kaliumjodatlösung.

Für die Beobachtung des in Abbildung 4.14 a) bis c) dargestellten, simulierten Konzentrationsverlaufes der Kaliumjodidkonzentration, der als Initiator und als „Verstärker“ in der Reaktion agiert, ergeben sich zwei interessante Tatsachen:

Zum Einen weist der zeitliche Verlauf ein ähnliches Verhalten wie die oben bereits beschriebene Kaliumjodatkonzentration auf. Die Lösung breitet sich von unten links in die Mitte und über den weiteren Kanalverlauf aus, was sich aus der Zuführungsgeometrie erwartungsgemäß ergibt. Trotz der etwa zweifach höheren Konzentration der Iodidlösung ist vergleichbar mit der oben genannten Kaliumjodatlösung ein geringeres Voranschreiten des Kernkonzentrationsbereiches erkennbar als bei der schwächer konzentrierten arsenigen Säure.

Zum Anderen zeigt sich in den semilogarithmisch aufgetragenen Konzentrationsverläufen in 4.14a) und b) jeweils eine kontinuierliche Abnahme der Kaliumjodidkonzentration an den drei ausgewählten Kanalstellen, entlang des gesamten Kanalverlaufs. In der Darstellung 4.14c) erscheint an der Stelle Kanalbreite= $20\mu\text{m}$ jedoch zwischen der Kanallänge $0\mu\text{m}$ und $60\mu\text{m}$ ein Plateau. Vergrößert man den entsprechenden Graphen an der Kanalbreite $20\mu\text{m}$, so erhält man den in 4.15a) dargestellten Konzentrationsverlauf.

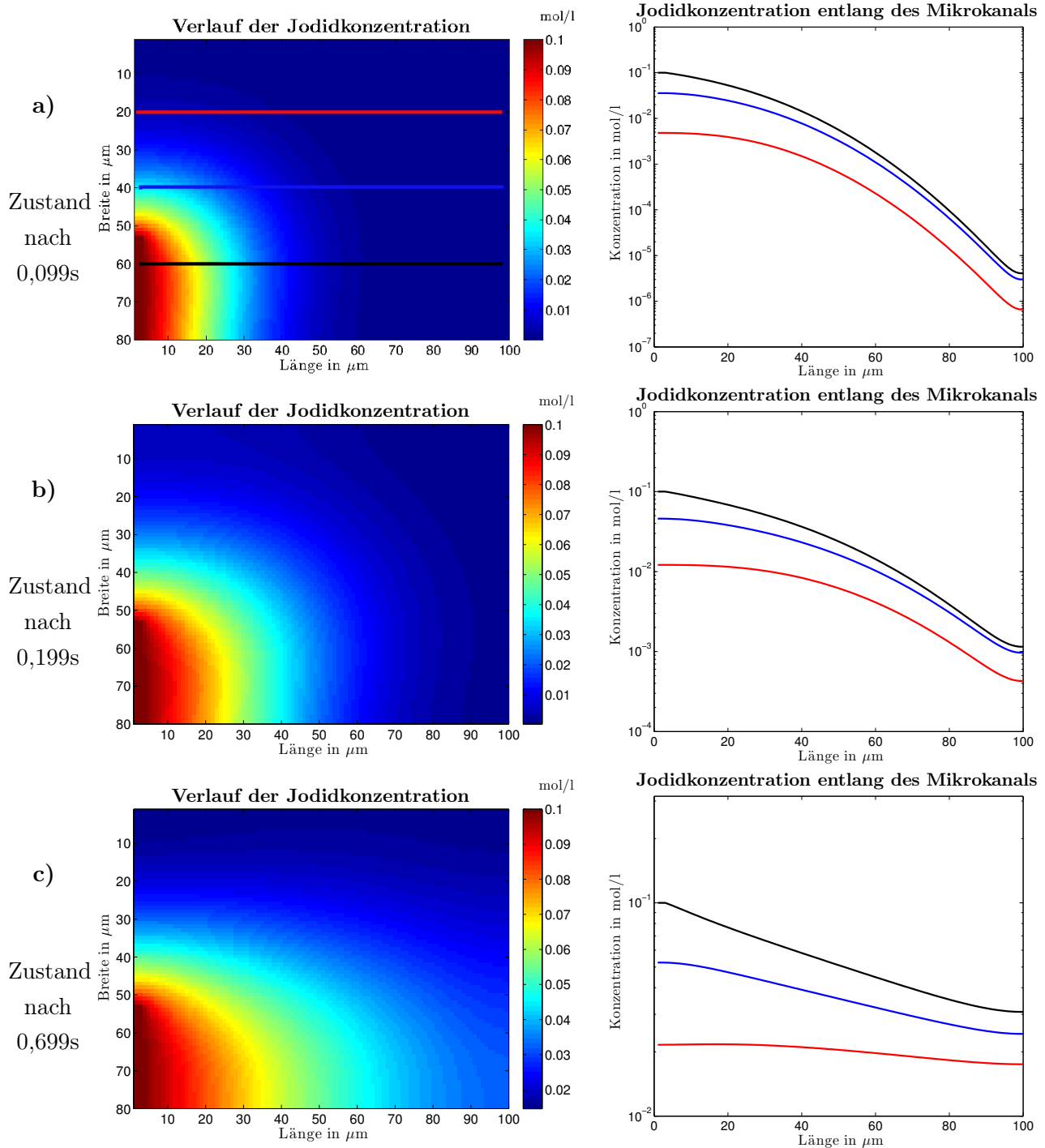


Abb. 4.14.: MatLab-Simulation des Konzentrationsverhaltens des Kaliumjodids im linearen Mikrokanal. Die Abbildungen a) bis c) auf der linken Seite zeigen den Konzentrationsverlauf in Farbdarstellung im Mikrokanal. Die Kanallänge wurde für die Simulation auf 100 μm (unterer Bildrand) und die Kanalbreite auf 80 μm (Skala jeweils linker Bildrand) festgelegt. Die Flussrichtung verläuft von links nach rechts. Die Konzentration ist über die rechtsseitige Farbskala in mol/l angegeben. Die Flussgeschwindigkeit beträgt in der Simulation $130 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$. Auf der rechten Seite ist der Konzentrationsverlauf entlang der Kanallänge an den in der Farbdarstellung a) gekennzeichneten Kanalbreiten 20 μm (rot), 40 μm (blau) und 60 μm (schwarz) dargestellt. Die Abzissenachse gibt die Kanallänge in μm , die Ordinatenachse in logarithmischer Darstellung die Konzentration in mol/l an.

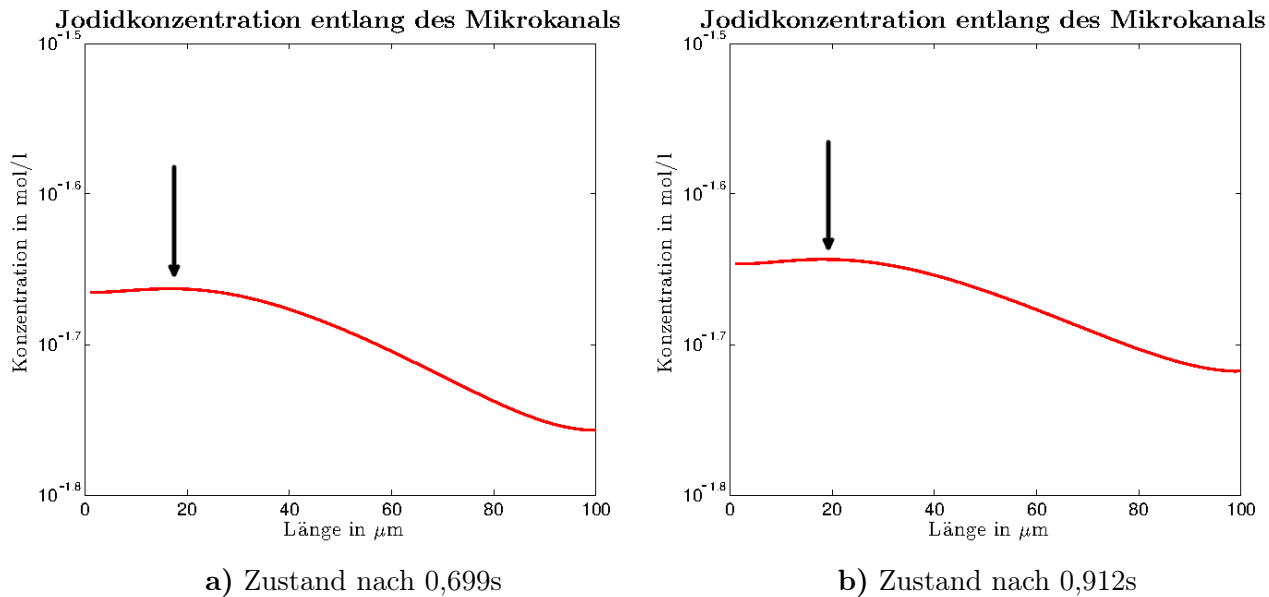


Abb. 4.15.: MatLab-Simulation des Konzentrationsverhaltens von Kaliumjodid im Zustand nach $t=0,699\text{s}$ und $t=0,912\text{s}$ entlang der Kanallänge an der Stelle Kanalbreite= $20\mu\text{m}$. Aufgetragen ist die Kanallänge gegen die Kaliumjodidkonzentration in semilogarithmischer Darstellung. An den gekennzeichneten Stellen steigt die Jodidkonzentration lokal an.

Es ist erkennbar, dass die Jodid-Ionen-Konzentration hin zur Längenposition $20\mu\text{m}$ ansteigt, bevor sie im weiteren Verlauf kontinuierlich sinkt. Der beschriebene Verlauf bleibt auch erhalten, wenn die Simulation zum Zeitpunkt $t=0,912\text{s}$ voranschreitet. Aus Abbildung 4.15 b) lässt sich entnehmen, dass im weiteren Zeitverlauf die Konzentration insgesamt im Kanalabschnitt zugenommen und gleichzeitig das Konzentrationsgefälle entlang des Kanals abgenommen hat. D.h. zusätzlich zur Advektion muss mindestens ein weiterer Faktor Einfluss auf die Konzentration genommen haben.

Im folgenden Abbildungen wird nun der Konzentrationsverlauf des Reaktionsproduktes Jod betrachtet. Dieses wurde in den vorangegangenen Mikrokanalexperimenten mit Hilfe der verwendeten Indikatoren Stärke bzw. PVA farblich sichtbar gemacht. Mit Hilfe der Simulation soll untersucht werden, ab welchem Zeitpunkt das Reaktionsprodukt Jod auftritt und welchen Einfluss die Flussgeschwindigkeit auf die Farbbande nimmt. Es sei schon an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass aufgrund der zeitintensiven Berechnung die folgenden Ergebnisse keine stationären Zustände darstellen, sondern einen Überblick verschaffen, wie sich das System auf den Gleichgewichtszustand zu bewegt.

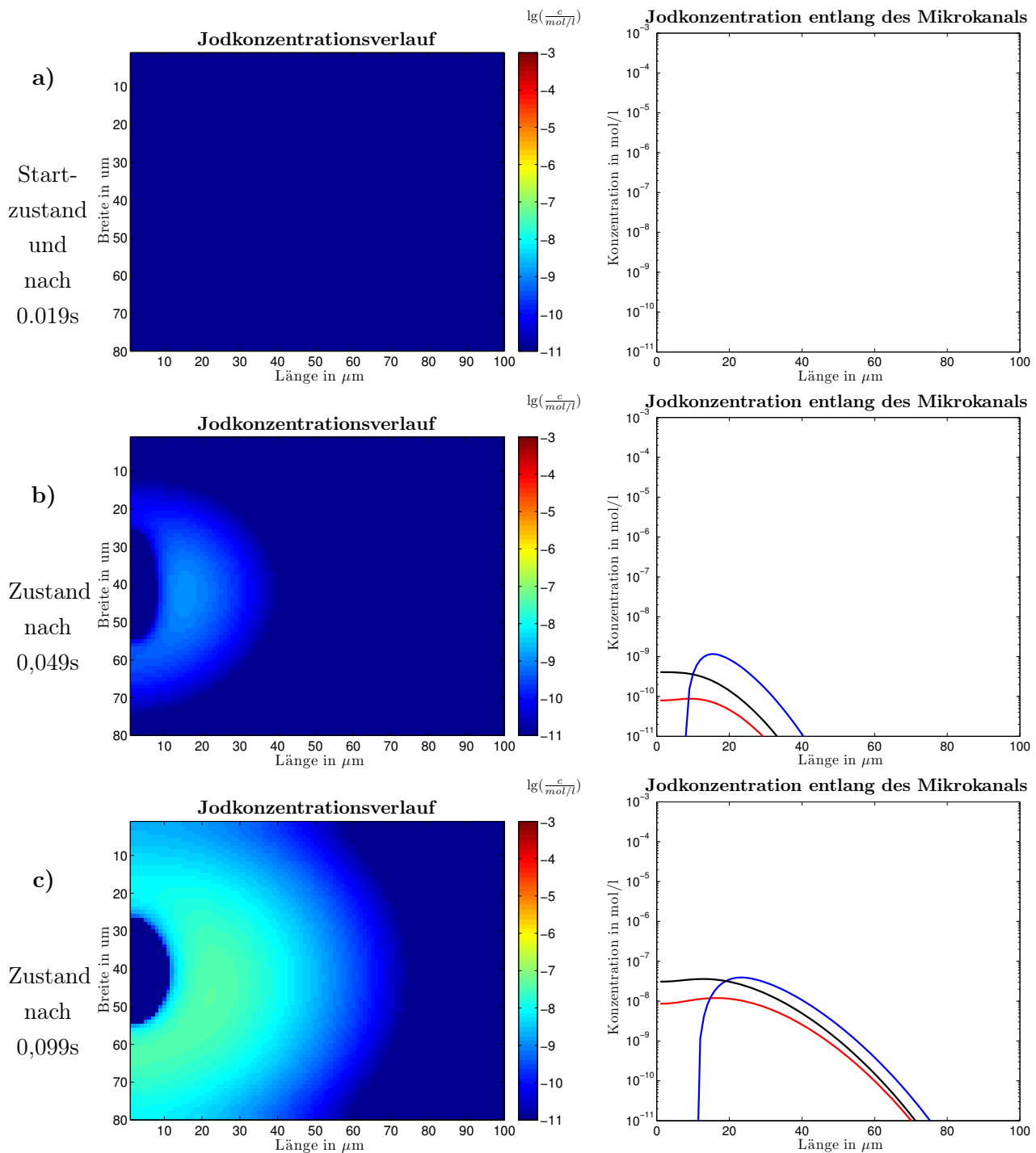


Abb. 4.16.: MatLab-Simulation des Konzentrationsverhaltens des Reaktionsproduktes Jod vom Startzeitpunkt bis zum Zustand $t=0.099\text{s}$. Die Abbildungen a) bis c) auf der linken Seite zeigen den Konzentrationsverlauf in Farbdarstellung im Mikrokanal. Die Kanallänge wurde für die Simulation auf $100\ \mu\text{m}$ (unterer Bildrand) und die Kanalbreite auf $80\ \mu\text{m}$ (Skala jeweils linker Bildrand) festgelegt. Die Flussrichtung verläuft von links nach rechts. Die Konzentration ist über die Farbskala im dekadischen Logarithmus von $\frac{c}{\text{mol/l}}$ angegeben. Die Flussgeschwindigkeit beträgt in der Simulation $130\ \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$. Auf der rechten Seite ist der Konzentrationsverlauf entlang der Kanallänge an den in der Farbdarstellung a) gekennzeichneten Kanalbreiten $20\ \mu\text{m}$ (rot), $40\ \mu\text{m}$ (blau) und $60\ \mu\text{m}$ (schwarz) dargestellt. Die Abzissenachse gibt die Kanallänge in μm , die Ordinatenachse in logarithmischer Darstellung die Konzentration in mol/l an.

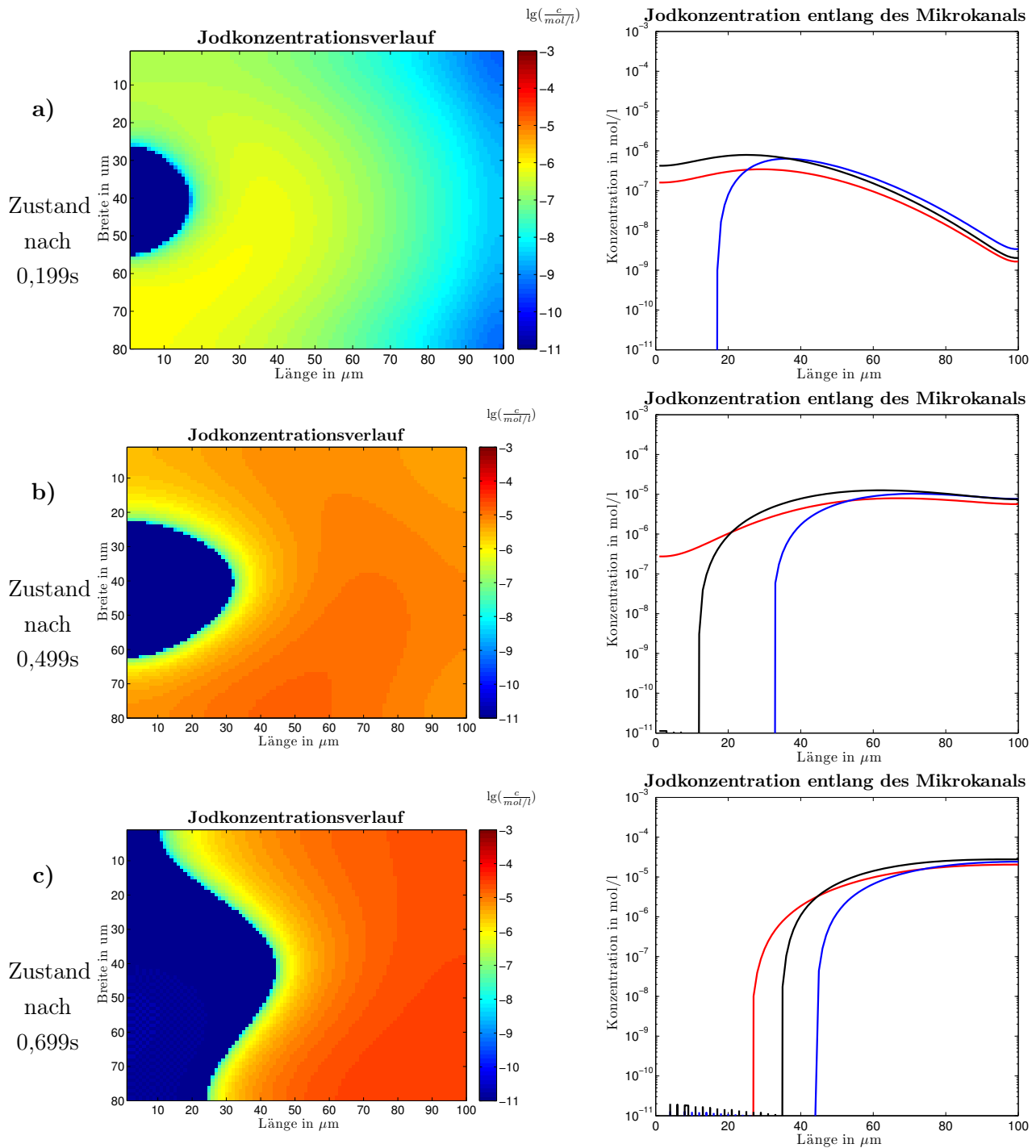


Abb. 4.17.: MatLab-Simulation des Konzentrationsverhaltens des Reaktionsproduktes Jod vom Zustand $t=0.199\text{s}$ bis zum Zustand $t=0.699\text{s}$. Die Abbildungen a) bis c) auf der linken Seite zeigen den Konzentrationsverlauf in Farbdarstellung im Mikrokanal. Die Kanallänge wurde für die Simulation auf $100\ \mu\text{m}$ (unterer Bildrand) und die Kanalbreite auf $80\ \mu\text{m}$ (Skala jeweils linker Bildrand) festgelegt. Die Flussrichtung verläuft von links nach rechts. Die Konzentration ist über die Farbskala im dekadischen Logarithmus von $\frac{c}{\text{mol/l}}$ angegeben. Die Flussgeschwindigkeit beträgt in der Simulation $130\ \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$. Auf der rechten Seite ist der Konzentrationsverlauf entlang der Kanallänge an den in der Farbdarstellung a) gekennzeichneten Kanalbreiten $20\ \mu\text{m}$ (rot), $40\ \mu\text{m}$ (blau) und $60\ \mu\text{m}$ (schwarz) dargestellt. Die Abzissenachse gibt die Kanallänge in μm , die Ordinatenachse in logarithmischer Darstellung die Konzentration in mol/l an.

In Abbildung 4.16 b) lässt sich erkennen, dass nach 0,049s eine Jodkonzentrationsbande im nanomolaren Bereich vorliegt, die bereits bis zur Längenposition von 20 μm reicht. Auffällig ist der Bereich bis zur Längenposition von 10 μm und der Breitenposition zwischen 26 μm und 54 μm . Dieses entspricht dem Zuführungsbereich der arsenigen Säure, die das Jod in der Roebuck-Reaktion konsumiert. Darüber hinaus liegt die Jodkonzentration im Zuführungsbereich des Kaliumjodats (Breitenposition 1 μm bis 26 μm) geringer vor als im Zuführungsbereich des Kaliumjodids (Breitenposition 56 μm bis 80 μm), wie sich anhand des Konzentrationsverlaufs entlang der Kanallänge in der rechten Abbildung von 4.16 b) erkennen lässt. Der Bereich der Kanalmitte weist die höchste Jodkonzentration auf. Mit fortschreitender Simulationszeit 4.16 c) steigt die Jodkonzentration an und die Bande wird in Flussrichtung breiter. Nach 0,199s Simulationszeit 4.17 a) hat die Jodkonzentration im Kaliumjodidzuführungsbereich (57 μm bis 80 μm) die Konzentration der Kanalmitte im Bereich 10^{-6} bis 10^{-7}M erreicht. Im weiteren Verlauf 4.17 b) und c) wandert die Jodbande in Flussrichtung weiter, wobei die Front an der Breitenposition 1 μm bis 26 μm , der Front an der Breitenposition 54 μm bis 80 μm nachläuft. Diese Bandenform deckt sich annähernd mit der Bandenform in den Mikrofluidikexperimenten (s. Abbildungen 4.5 b) und 4.8 b)). Desweiteren sind in den Abbildungen 4.17b) und c) auf der rechten Seite Konzentrationswerte vor der Jodbande sichtbar. Diese stellen mit großer Wahrscheinlichkeit ein Rauschen aufgrund der Auflösungsgrenze im Konzentrationsbereich um 10^{-11}M dar.

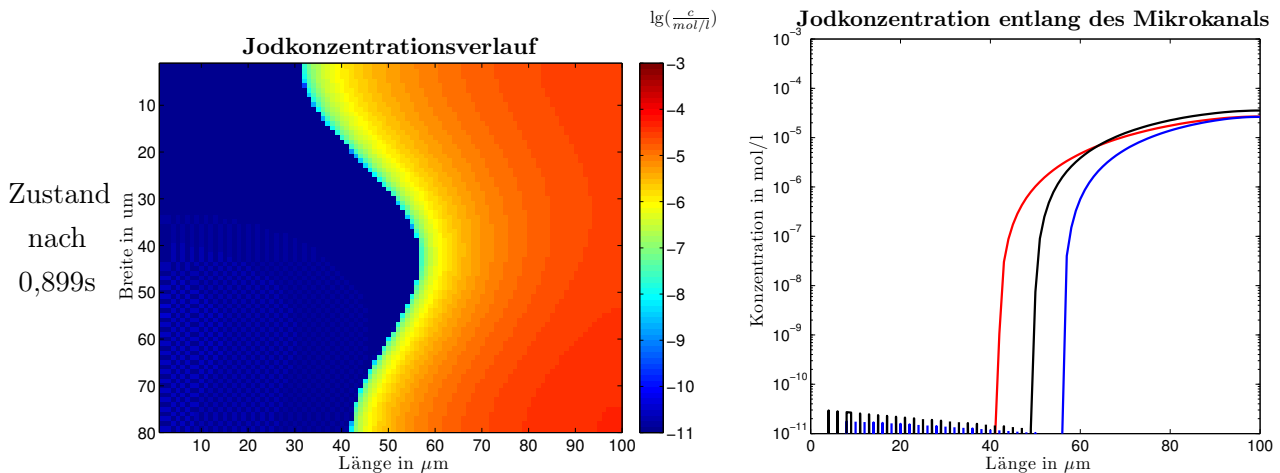


Abb. 4.18.: MatLab-Simulation des Konzentrationsverhaltens des Reaktionsproduktes Jod kurz vor Ende der Simulation ($t=0.899\text{s}$). Die Abbildung auf der linken Seite zeigt den Konzentrationsverlauf in Farbdarstellung im Mikrokanal. Die Kanallänge wurde für die Simulation auf 100 μm (unterer Bildrand) und die Kanalbreite auf 80 μm (Skala jeweils linker Bildrand) festgelegt. Die Flussrichtung verläuft von links nach rechts. Die Konzentration ist über die Farbskala im dekadischen Logarithmus von $\frac{c}{\text{mol/l}}$ angegeben. Die Flussgeschwindigkeit beträgt in der Simulation $130\frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$. Auf der rechten Seite ist der Konzentrationsverlauf entlang der Kanallänge an den in der Farbdarstellung a) gekennzeichneten Kanalbreiten 20 μm (rot), 40 μm (blau) und 60 μm (schwarz) dargestellt. Die Abzissenachse gibt die Kanallänge in μm , die Ordinatenachse in logarithmischer Darstellung die Konzentration in mol/l an.

Abbildung 4.18 zeigt den Zustand der Jodkonzentrationsbande kurz vor Ende der Simulation. Die Konzentrationen an allen 3 Breitenpositionen haben sich nahezu vollständig angenähert. Im Ver-

gleich zwischen 4.17 c) und 4.18 ist erkennbar, dass die Bandenform erhalten bleibt, jedoch ihre Position sich in Flussrichtung weiterbewegt.

Zum Vergleich wird im Folgenden die Jodkonzentration in der gleichen Simulation mit einer Kaliumjodidkonzentration von 0,05M dargestellt.

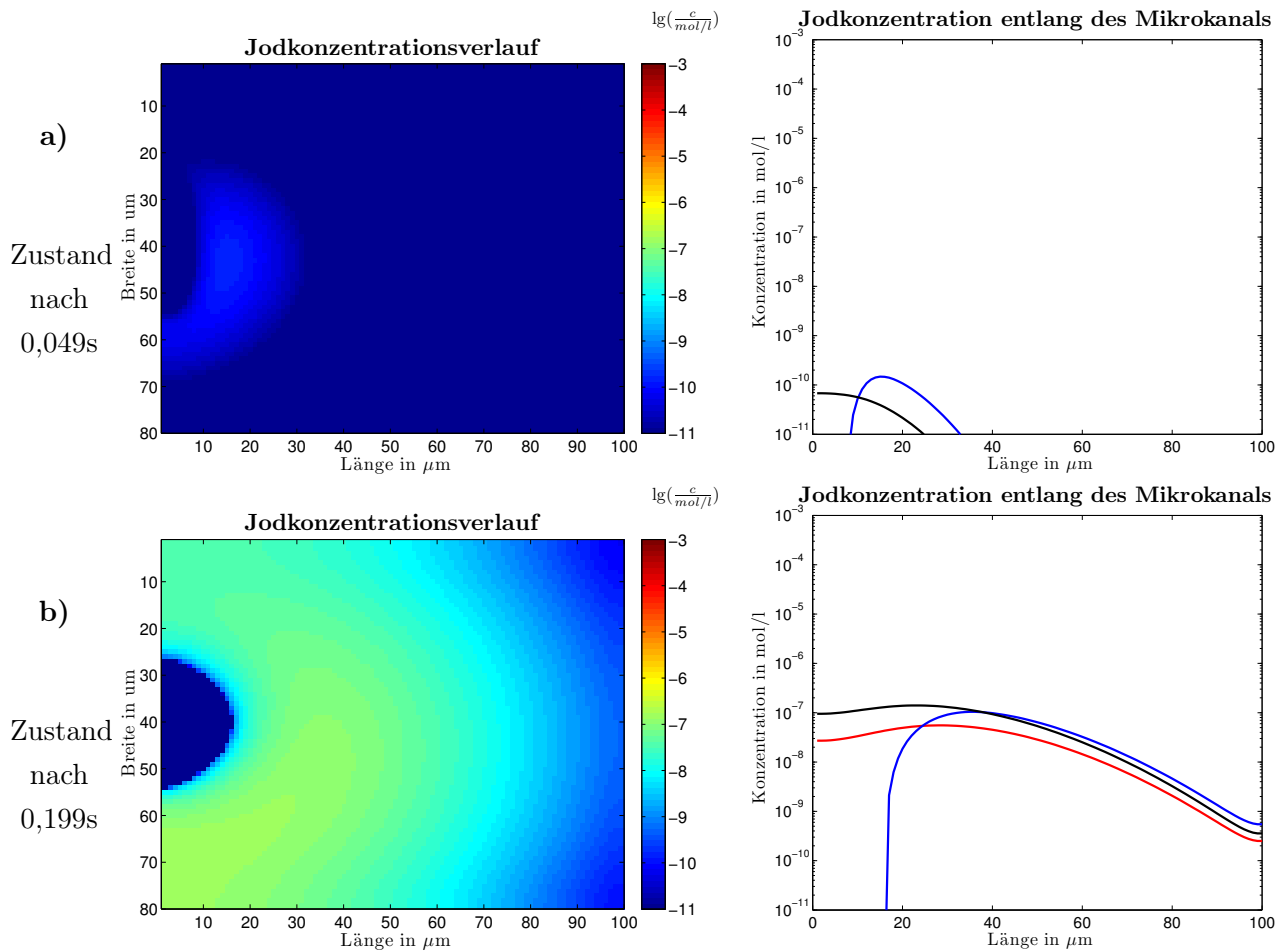


Abb. 4.19.: MatLab-Simulation des Konzentrationsverhaltens des Reaktionsproduktes Jod vom Zustand $t=0.049s$ bis zum Zustand $t=0.199s$ bei einer Initiatorkonzentration von 0,05M Kaliumjodid. Die Abbildungen auf der linken Seite zeigen den Konzentrationsverlauf in Farbdarstellung im Mikrokanal. Die Kanallänge wurde für die Simulation auf 100 μm (unterer Bildrand) und die Kanalbreite auf 80 μm (Skala jeweils linker Bildrand) festgelegt. Die Flussrichtung verläuft von links nach rechts. Die Konzentration ist über die Farbskala im dekadischen Logarithmus von $\frac{c}{mol/l}$ angegeben. Die Flussgeschwindigkeit beträgt in der Simulation $130 \frac{\mu m}{s}$. Auf der rechten Seite ist der Konzentrationsverlauf entlang der Kanallänge an den Kanalbreiten 20 μm (rot), 40 μm (blau) und 60 μm (schwarz) dargestellt. Die Abzissenachse gibt die Kanallänge in μm , die Ordinatenachse in logarithmischer Darstellung die Konzentration in mol/l an.

In Abbildung 4.19 a) und b) ergibt sich ein ein ähnliches Bild wie in den Abbildungen 4.16 b) und 4.17 a). Wie zu erwarten war, fällt die Jodidkonzentration in Abbildung 4.19 a) nach 0,049s und 4.19 b) nach 0.199s geringer aus, als die gleiche Simulation mit 0,1M Initiatorkonzentration in Abbildung 4.16 b) und 4.17 a). Interessant ist jedoch der Ort der mittleren Jodbande (Breitenposition 40 μm) in der Darstellung der Jodkonzentration entlang des Mikrokanals. Hier stimmen die jeweils rechten Abbildungen von 4.17 a) und 4.19 b) mit der Längenposition bei ca. 18 μm überein.

Betrachtet man weiter die Zustände nach $t=0.699\text{s}$ und $t=0.899\text{s}$ für die Simulation mit $0,05\text{M}$ Initiatorkonzentration in Abbildung 4.20 a) und b), so ist erkennbar, dass die Jodkonzentration bei geringerer Initiatorkonzentration erwartungsgemäß um etwa eine Dekade niedriger ausfällt, die Bandenposition in der Mitte des Kanals jedoch nach gleicher Zeitdauer für die $0,05\text{M}$ Kaliumjodat-Simulation nur um etwa $5\mu\text{m}$ länger in Flussrichtung ausfällt als bei der doppelten Initiatorkonzentration (Abbildungen 4.17c) und 4.18). Auch in der Simulation mit geringerem Initiator zeigt sich wie bereits in den Abbildungen 4.17c) und 4.18, dass die Bandenform in Abbildung 4.20a) und b) erhalten bleibt und nur in Flussrichtung verschoben wird. Auch der Versatz der Bandenflanken jeweils am Rand des Kanals ist vorhanden, fällt bei dieser Simulation jedoch geringer aus als bei der Simulation mit $0,1\text{M}$ Kaliumjodidkonzentration.

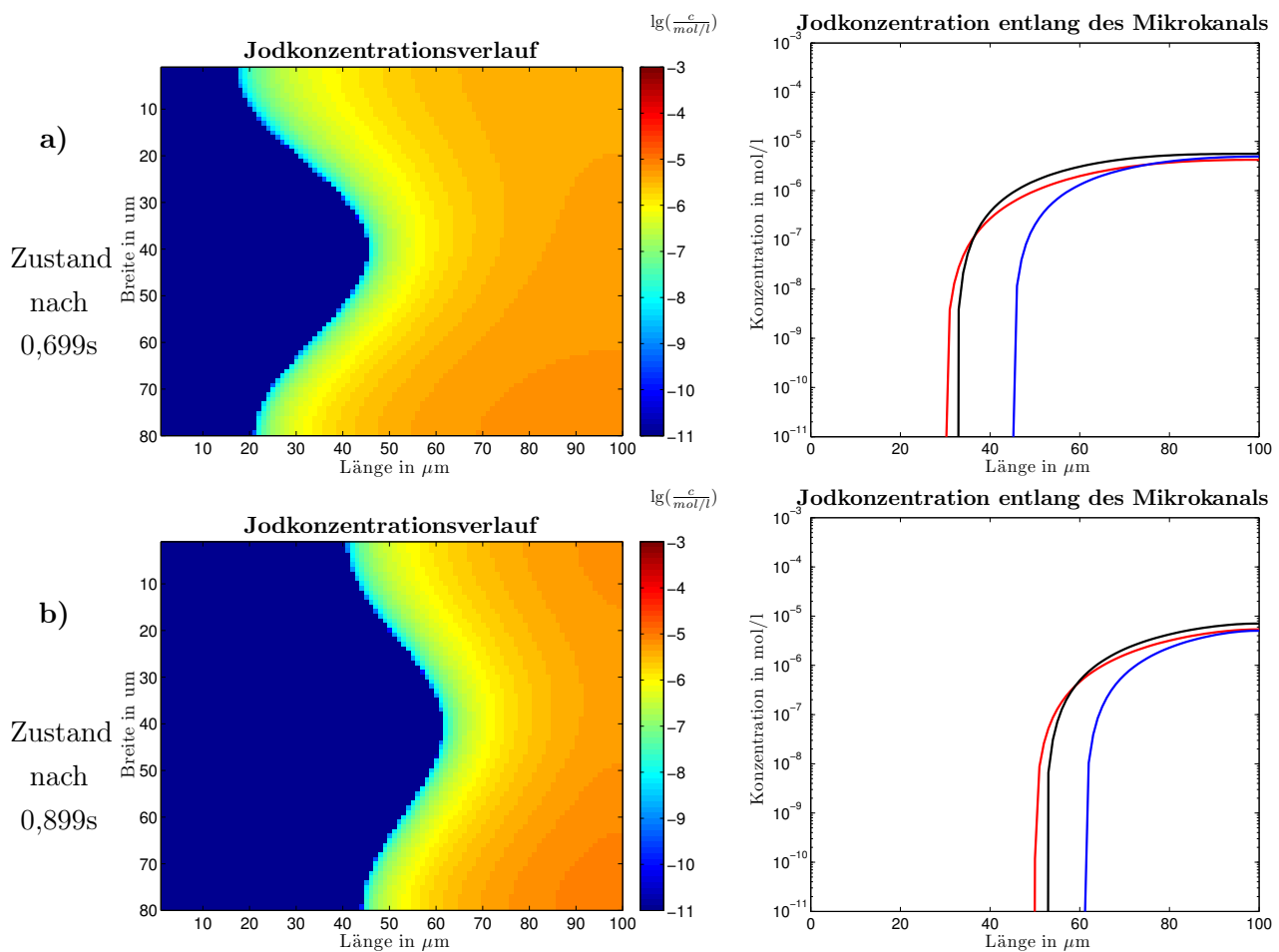


Abb. 4.20.: MatLab-Simulation des Konzentrationsverhaltens des Reaktionsproduktes Jod vom Zustand $t=0.699\text{s}$ bis zum Zustand $t=0.899\text{s}$ bei einer Initiatorkonzentration von $0,05\text{M}$ Kaliumjodid. Die Abbildungen auf der linken Seite zeigen den Konzentrationsverlauf in Farbdarstellung im Mikrokanal. Die Kanallänge wurde für die Simulation auf $100\ \mu\text{m}$ (unterer Bildrand) und die Kanalbreite auf $80\ \mu\text{m}$ (Skala jeweils linker Bildrand) festgelegt. Die Flussrichtung verläuft von links nach rechts. Die Konzentration ist über die Farbskala im dekadischen Logarithmus von $\frac{c}{\text{mol/l}}$ angegeben. Die Flussgeschwindigkeit beträgt in der Simulation $130\frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$. Auf der rechten Seite ist der Konzentrationsverlauf entlang der Kanallänge an den Kanalbreiten $20\mu\text{m}$ (rot), $40\mu\text{m}$ (blau) und $60\mu\text{m}$ (schwarz) dargestellt. Die Abzissenachse gibt die Kanallänge in μm , die Ordinatenachse in logarithmischer Darstellung die Konzentration in mol/l an.

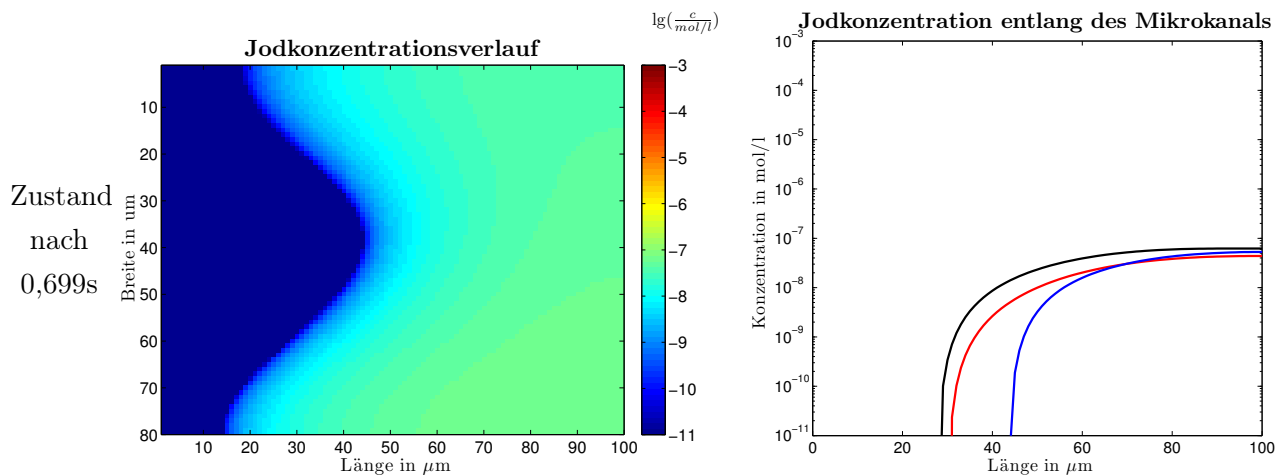


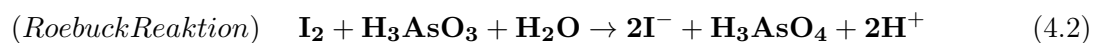
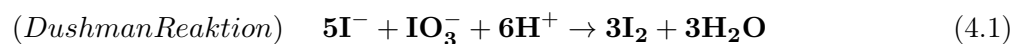
Abb. 4.21.: MatLab-Simulation des Konzentrationsverhaltens des Reaktionsproduktes Jod beim Zustand $t=0,699\text{s}$ bei einer Initiatorkonzentration von $0,005\text{M}$ Kaliumjodid. Die Abbildungen auf der linken Seite zeigen den Konzentrationsverlauf in Farbdarstellung im Mikrokanal. Die Kanallänge wurde für die Simulation auf $100\ \mu\text{m}$ (unterer Bildrand) und die Kanalbreite auf $80\ \mu\text{m}$ (Skala jeweils linker Bildrand) festgelegt. Die Flussrichtung verläuft von links nach rechts. Die Konzentration ist über die Farbskala im dekadischen Logarithmus von $\frac{c}{\text{mol/l}}$ angegeben. Die Flussgeschwindigkeit beträgt in der Simulation $130\ \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$. Auf der rechten Seite ist der Konzentrationsverlauf entlang der Kanallänge an den Kanalbreiten $20\ \mu\text{m}$ (rot), $40\ \mu\text{m}$ (blau) und $60\ \mu\text{m}$ (schwarz) dargestellt. Die Abzissenachse gibt die Kanallänge in μm , die Ordinatenachse in logarithmischer Darstellung die Konzentration in mol/l an.

Verringert man die Initiatorkonzentration nun nochmals um das 10fache auf $0,005\text{M}$ Kaliumjodid für die Simulation, so ist im Vergleich der Abbildung 4.21 mit den Abbildungen 4.17 c) und 4.20 a) nach jeweils $0,699\text{s}$ Reaktionszeit erkennbar, dass erwartungsgemäß die Jodkonzentration im Bereich 10^{-8}M bis 10^{-7}M deutlich geringer ausfällt, jedoch die mittlere Bandenposition aller drei Initiatorkonzentrationen im gleichen Kanallängenabschnitt zwischen $40\ \mu\text{m}$ und $50\ \mu\text{m}$ vorliegt. D.h. unabhängig von der Starterkonzentration des Kaliumjodids liegen die Bandenpositionen bis zum Zeitpunkt $t=0,699\text{s}$ im gleichen Kanalbereich vor und werden anschließend durch die Flussgeschwindigkeit weiter transportiert.

4.1.5. Diskussion

In diesem Kapitel der vorliegenden Arbeit wurde das Verhalten der autokatalytischen Arsenit-Jodat Reaktion in Mikrokanalstrukturen mit dem Reaktionsverhalten in kleinen Probengefäßen verglichen. Die Probenvolumina der verwendeten Reaktionsumgebung in den Mikrotiterplattengefäßen von 240µl unterschieden sich zu den Flüssigkeitsvolumina in den Mikrokanälen von etwa 30nl um das 8000fache. Die Reaktionszeit der autokatalytischen Reaktion wurde mit Hilfe eines Farbumschlages durch das Reaktionsprodukt Jod bestimmt, der in Abhängigkeit der Konzentration der arsenigen Säure zeitverzögert sichtbar wurde.

Die Reaktionsgeschwindigkeit innerhalb der Probengefäße auf der Mikrotiterplatte konnte für verschiedene pH-Werte, Konzentrationen der arsenigen Säure, Mischungszustände und Lösungsviskositäten bestimmt werden (Kapitel 4.1.1). Es zeigte sich, dass eine Zunahme der Protonenkonzentration, zu einer Beschleunigung der Reaktionskinetik des gesamten Systems führt (vgl. Abbildung 4.1 b). Dieses konnte man anhand der folgenden Dushman-Reaktionsgleichung 4.1 erwarten, da die Konzentration der Protonen neben der Jodat- und Jodidionenkonzentration in die Umsatzrate eingeht.



Ein ähnliches Verhalten ergibt sich, wenn ausschließlich die Konzentration der arsenigen Säure erhöht wird. Auch hier nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit zu, scheint sich jedoch bei einer Konzentration von 0,2M arseniger Säure einem Maximum zu nähern (4.2 a). Hier hätte man hingegen mit einem anderen Resultat gerechnet, da es bei einer höheren Arsenit-Konzentration vermeintlich länger dauern sollte, bis die gesamte arsenige Säure umgesetzt wurde. Erst nach dem vollständigen Umsatz der Säure wird das Jod in der Roebuck-Reaktion nicht mehr konsumiert und der Farbumschlag der Reaktionslösung findet statt. Die Lösung zu dieser augenscheinliche Diskrepanz lässt sich mit zwei Eigenschaften des vorliegenden Feedback-Reaktionstyps erklären. Zum Einen läuft die Roebuck-Reaktion deutlich schneller ab, als die Dushman-Reaktion^[84]. Aus diesem Grund ist die Dushman-Reaktion letztlich bestimmend für die Reaktionsgeschwindigkeit. Das Reaktionsprodukt Jodid der Roebuck-Reaktion nimmt nun Einfluss als Reaktionsedukt auf die Dushman-Reaktion Umsatzrate, so dass bei einer höheren Umsatzrate der Roebuck-Reaktion zwangsläufig auch die Umsatzrate der Dushman-Reaktion erhöht wird. Dieses funktioniert jedoch nur solange, bis die Dushman-Reaktion als langsamere Reaktion, aufgrund der hier ebenfalls Einfluss nehmenden Jodat- und Protonenkonzentration, ihre maximal mögliche Reaktionsgeschwindigkeit erreicht hat. D.h. trotz der zunehmenden Konzentration an arseniger Säure liegt nur eine limitierte Jodkonzentration aus der Dushman-Reaktion vor. Das Resultat ist zwangsläufig eine Maximalgeschwindigkeit der gesamten Feedback-Reaktion, was die gemessenen Daten in Abbildung 4.2 a) auch anzeigen. Um

eine Beschleunigung dieser Reaktion für eine Verstärkung im Zusammenhang eines Testsystems mit den Konzentrationen zu beeinflussen, reicht es daher nicht aus die Arsenit-Konzentration zu erhöhen, sondern zeitgleich müssen auch die Jodat- und Protonenkonzentrationen erhöht werden.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich die Reaktionsgeschwindigkeit der Jodat-Arsenit-Reaktion auch über die Viskositäten und den Mischungsstatus beschleunigen lässt (s. Abbildung 4.3). Aus den bereits diskutierten Ergebnissen leitet sich ab, dass eine Beschleunigung der Reaktion durch die Eduktkonzentrationen der Dushman- und Roebuck-Reaktion erreicht werden kann. Aus diesem Grund würde man erwarten, dass sich eine geringere Durchmischung in örtlich höheren Konzentrationswerten äußert, was folglich zur Beschleunigung der Reaktion beitragen sollte. Die in den Abbildungen 4.3 und 4.4 dargestellten Ergebnisse bestätigen diese Erwartung. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine schlechte Durchmischung die Reaktionszeit um bis zu 30% beschleunigt werden kann. Behindert man die zeitliche Durchmischung durch die Erhöhung der Viskosität mit Agarose, so lässt sich die Reaktionszeit bis zum Farbumschlag sogar um 64% verkürzen.

Nachdem das Reaktionsverhalten der Jodat-Arsenit Reaktion in den Mikroliterprobengefäßen untersucht worden war, wurden die Versuche nun in einer Mikrokanalgeometrie durchgeführt, wobei sich das Volumen der Reaktionsumgebung, wie bereits angedeutet, um das 8000fache verringerte. Die Versuche wurden im kontinuierlichen Volumenfluss durchgeführt, was ermöglichte, dass sich durch die Zuführung von frischen Reaktionslösungen eine stabile Farbbande des Jods im Kanalsystem ausbildete. Während des Experimentes konnte in diesem Fall keine Reaktionszeit aufgenommen werden, da diese durch die Volumendurchsatzrate ($\mu\text{m}/\text{min}$) im Mikrokanal von der zeitlichen Dimension in die räumliche Dimension eines Bandenabstandes (μm) von der Einmündungsstelle im Messkanal transformiert wurde (Abbildung 4.5). Mit Hilfe der eingestellten Volumendurchsatzrate und den Kanaldimensionen wurde die Reaktionszeit ermittelt und mit den Ergebnissen in den Probengefäßen auf der Mikrotiterplatte verglichen. Es zeigte sich, dass die autokatalytische Jodat-Arsenit Reaktion im geraden Mikrokanal für die Starterkonzentrationen unterhalb von 10mM Kaliumjodid um das zwei bis 7fache schneller verläuft, als auf der Mikrotiterplatte (vgl. Abbildung 4.6). Ab einer Starterkonzentration von 0.05M hingegen verläuft die Reaktion langsamer als in den Probengefäßen. Für die Interpretation dieser Beobachtung muss berücksichtigt werden, dass innerhalb der Mikrokanäle nur ein laminares Flüssigkeitsverhalten aufgrund der sehr geringen Reynoldszahlen (0,016 für die Dimensionen 69 μm Kanalhöhe und 650 μm Kanalbreite im Experiment) vorliegt. Eine Durchmischung der Reaktionsflüssigkeiten im Mikrokanal kann bei diesen Flussbedingungen nur durch Taylordispersion oder normale Diffusion stattfinden^[3]. Außerdem fanden die Experimente im kontinuierlichen Fluss statt, so dass Diffusion und Advektion miteinander konkurrieren (vgl. Kapitel 2.3). Die Péclet-Zahl (Pe) gibt hier einen Hinweis, welcher Vorgang überwiegt. Die Bestimmung dieser dimensionslosen Größe Pe für die durchgeführten Versuche im Mikrokanal ergibt Werte zwischen 5 und 50. Für Werte $Pe \gg 1$ überwiegt die Advektion (vgl. Gleichung 2.26 in Kapitel 2.3). Die hier bestimmten Werte liegen nahe 1 oder $Pe > 1$, daher ist zu erwarten, dass Diffusion und Advektion etwa gleichberechtigten Einfluss nehmen, bzw. die Advektion im Zweifelsfall überwiegen wird.

Anhand der Resultate in den Gefäßen der Mikrotiterplatte lässt sich folgern, dass für eine Beschleunigung der Jodat-Arsenit Reaktion eine höhere Eduktkonzentrationen der Dushman und der

Roebuck-Reaktionen notwendig sind. Analog kann eine Verzögerung der Reaktionsgeschwindigkeit hingegen eintreten, wenn die Lösungskonzentrationen verringert werden. Die Verzögerung der Reaktionsgeschwindigkeit im Mikrokanal gegenüber der Probengefäße für die Initiatorkonzentration oberhalb von 0,05M kann daher so erklärt werden, dass für einen Start der Autokatalyse in Form der Dushman Reaktion erst jeder der Reaktionspartner Kaliumjodat und Kaliumjodid sowie eine ausreichende Menge an Protonen vorhanden sein muss. Die Kaliumjodat- und die Kaliumjodidlösungen waren im realen Kanalexperiment durch die Lösung der arsenigen Säure getrennt, wie es auch in der Simulation des durchgeführten Experimentes in Abbildung 4.12 als Startbedingung deutlich gemacht wurde. Daher verzögert sich die Reaktionszeit folglich um diese Diffusionszeit bei hohen Starterkonzentrationen im Vergleich mit den Probengefäßexperimenten. Übt die Advektion in Form des Mediumflusses nun auch noch zusätzlichen Einfluss aus, so wird die Verzögerung hier noch verstärkt. Dieses Phänomen verliert jedoch für die geringeren Kaliumjodidkonzentrationen an Einfluss, wie im Folgenden noch begründet wird.

Ein weiterer Beleg für diese These findet sich in den durchgeführten Simulationsexperimenten in Abbildung 4.16 a) und b). Hier wurde, vergleichbar wie im Realexperiment, mit einer deutlich hohen Kaliumjodidkonzentration von 0,1 mol/l simuliert. Es zeigt sich eine Zeitlücke von 0,049 s bis eine Jodkonzentration im Bereich von $1 \cdot 10^{-9}$ sichtbar wird. Diese setzt sich zusammen aus der aufeinander zu gerichteten Diffusion der Kaliumjodat- und Kaliumjodidkonzentrationen (Abbildungen 4.13 und 4.14) und der Reaktionskinetik. Berücksichtigt man nun, dass im Realexperiment die Kanalbreite 600µm und der Abstand zwischen den Reaktionslösungen Kaliumjodid und Kaliumjodat mindestens 200µm betrug, so ist davon auszugehen, dass die Diffusion bis zum Reaktionsstart eine längere Zeitspanne in Anspruch genommen hat. Hinzu kommt, dass die Arsenitkonzentration in der Kanalmitte maximal ist, so dass hier davon auszugehen ist, dass die Roebuck Reaktion das entstehende Jodprodukt der Dushman Reaktion sofort vollständig konsumiert und eine Farbbande erst sichtbar wird, wenn durch die Diffusion und den weiteren Reaktionsverlauf die arsenige Säure vollständig aufgebraucht ist. Bei den Versuchen auf der Mikrotiterplatte hingegen lagen die Kaliumjodat- und die Arsenitkonzentrationen bei Initiatorzugabe vollständig durchgemischt vor. D.h. bei den hohen Kaliumjodidkonzentrationen musste ausschließlich die Initiatorkonzentration in die reaktionsfähige Lösung aus Kaliumjodat und arseniger Säure hinein diffundieren, was durch die autokatalytische Reaktion noch verstärkt wurde. Daher war hier die arsenige Säure frühzeitiger aufgebraucht und als Resultat ein schnellerer Farbumschlag zu beobachten.

Folgt man nun dieser These, so stellt sich die Frage, wie die deutlich abweichenden Reaktionszeiten in Abbildung 4.6 für Kaliumjodidkonzentrationen unterhalb von 0,05mol/l zustande kommen. Hier verläuft die Jodat-Arsenit Reaktion im Mikrokanal bis zu 7fach beschleunigt. An dieser Stelle sei nochmals auf das Reaktionsverhalten der verwendeten autokatalytischen Reaktion bei steigender Arsenitkonzentration in Abbildung 4.2 verwiesen. Dort konnte gezeigt werden, dass eine steigende Konzentration an arseniger Säure die Reaktionkinetik bis zu einer Maximalgeschwindigkeit gerade für geringe Initiatorkonzentrationen um das 500fache beschleunigen kann. Genau dieses liegt auch in der verwendeten Mikrokanaldurchführung vor. Dadurch dass die arsenige Säure in der Mitte des Mikrokanals am Treffpunkt der Jodat- und der Jodidlösung in der maximalen Konzentration

vorlag, wurde das entstehende Reaktionsprodukt Jod der Dushman Reaktion augenblicklich zu Jodid umgesetzt. Einen Beleg für diese These lässt sich dem Simulationsergebnis der Abbildung 4.15 entnehmen. Hier ist erkennbar, dass die Kaliumjodidkonzentration ein Maximum aufweist und damit mehr zunimmt, als es durch die ausschließliche Diffusion erwartet werden kann. D.h. an dieser Stelle werden die in der Roebuck Reaktion produzierten Jodidionen sichtbar. Es kann also davon ausgegangen werden, dass bei den Versuchen im geraden und Hindernis freien Mikrokanal der Jodumsatz mit der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit abläuft, wohingegen in den Probengefäßen der Mikrotiterplatte eine durch die vorgelegten Konzentrationen festgelegte Reaktionsgeschwindigkeit eingehalten wird. Hinzu kommen die möglichen Teilchenflussrichtungen der einzelnen Stoffe, vorgegeben durch die Volumeneigenschaften in den durchgeführten Experimenten. In den Probengefäßen wurde in Volumina von $1 \cdot 10^2$ μl gemessen. Im Gegensatz dazu wurden die Experimente im Mikrokanal in durch die Kanalgeometrie begrenzten $1 \cdot 10^2$ nl Volumina durchgeführt. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die Diffusion im Mikrokanal eingeschränkt gerichtet (senkrecht zur Flussrichtung) stattgefunden hat, im Gegensatz zu den Experimenten im Probengefäß. Hier war eine Diffusion innerhalb des Gefäßes in alle Raumrichtungen möglich, was eine schnellere Abnahme von örtlich hohen Konzentrationen ermöglichte. Daher ist es naheliegend anzunehmen, dass im Mikrokanal lokal erhöhte Konzentrationen, bedingt durch die Reaktionskinetik und die Lösungszuführung, über einen längeren Zeitraum konserviert vorlagen als im Probengefäß auf der Mikrotiterplatte und somit ein zusätzlichen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit stattgefunden hat. Diese Annahme wird durch die Simulation gestützt, denn hier trat die Farbbande an der mittleren Kanalposition für alle verwendeten Kaliumjodidkonzentrationen im gleichen Kanallängenabschnitt auf und wurde anschließend durch die Advektion verschoben (s. Vergleich der Abbildung 4.21 mit den Abbildungen 4.17 c) und 4.20 a) nach jeweils 0,699s Reaktionszeit).

Im Abschluss der Laborversuchsreihen wurde versucht über Hindernisstrukturen die Kanalgeometrie derart zu verändern, dass eine bessere Durchmischung der Reaktionslösungen im Mikrokanal vorliegt und damit die Reaktionsgeschwindigkeit verzögert wurde. Entgegen den Erwartungen wurde die Reaktionszeit durch säulenartige Strukturen nochmals beschleunigt (Abbildung 4.9). Es konnte jedoch mit Hilfe der durchgeführten Fluoreszenzmessungen gezeigt werden, dass die gewählte Hindernisstruktur gegenüber dem leeren Mikrokanal keine bessere Durchmischung bzgl. der Diffusion erreichte (Abbildung 4.11 d). Es wird aus Abbildung 3.13 ersichtlich, dass durch die Säulen im Kanal der Flüssigkeitsstrom umgelenkt wird. D.h. an dieser Stelle liegt ein anderes Strömungsverhalten vor als im leeren Mikrokanal. Es findet für die 0,05M als auch für die 0,05M Initiatorkonzentration eine Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber dem Kanal ohne Hindernisse statt. Es wird an dieser Stelle vermutet, dass die zugeführte Initiatorkonzentration durch das Umlenken und das veränderte Strömungsverhalten schneller mit der Kaliumjodatlösung zusammentrifft. Eine schneller zunehmende Jodkonzentration wäre die Folge. Aufgrund der mangelnden Durchmischung bleibt die Konzentration der arsenigen Säure jedoch nach wie vor lokal soweit erhöht, dass die Reaktion gegenüber den Probengefäßen und auch vergleichbar mit dem leeren Mikrokanal beschleunigt abläuft. Dieses würde somit sowohl zu einer beschleunigten Reaktion bei hoher Kaliumjodidkonzentration als auch bei der geringen Initiatorkonzentration führen.

Ein Vergleich mit dem gut durchmischenden Mikrokanal mit Wandhindernis (Abbildung 4.11d)

und 3.13) zeigte schließlich, dass sich gegenüber den beiden übrigen verwendeten Kanalstrukturen der Farbumschlag bei geringen Starterkonzentrationen auf die doppelte Zeitdauer verzögern ließ (Abbildung 4.9). Gegenüber den Versuchen auf der Mikrotiterplatte lief die Farbumschlagszeit mit einer Differenz von etwa 35s immer noch schneller ab. Daher lässt sich hierdurch ableiten, dass die Arsenit-Jodat-Clock-Reaktion durch die lokal erhöhte Konzentration aufgrund der laminaren Flussbedingungen im Mikrokanal schneller abläuft. Durch die Randbedingungen der Kanalwände nach oben und unten kann ein Konzentrationsaustausch zudem nur entlang der Kanalbreite stattfinden, was ebenfalls die Farbreaktionsgeschwindigkeit beschleunigt. Daher wird die verwendete autokatalytische Reaktion im begrenzten Mikrokanal immer schneller ablaufen als in einer Reaktionsumgebung, die eine Diffusion nach allen Raumrichtungen zulässt.

Als Gesamtfazit lässt sich schließen, dass lokal hohe Konzentrationen von reaktionsbeteiligten Substanzen in autokatalytischen Reaktionen in sehr begrenzten Reaktionsräumen eine verstärkende Wirkung entfalten können, auch oder gerade dadurch dass die Lösungen nicht vollständig durchmischt sind. Bedingt durch die Reaktionskinetik kommt es lokal zu einem nichtlinearen Anstieg der Konzentration des Reaktionsinitiators, so dass durch Diffusion in der weiteren Umgebung bereits frühzeitiger höhere Konzentrationen erreicht werden, als das der Fall für einen gut durchmischten Zustand gewesen wäre.

4.2. Hydrogel gesteuerte Papierfluidik

Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist es, mit Hilfe von Verstärkungsreaktionen ein möglichst einfaches System zu entwickeln, um Pathogene ohne weitere Laborhilfsmittel mit Hilfe eines „Wischtestes“ sensitiv nachzuweisen. Anstelle der herkömmlichen Flüssigkeitszuführung mittels Schlauchverbindungen bei den bisher bekannten Lab-On-Chip Systemen wird in diesem Fall versucht die materialspezifischen Eigenschaften von saugfähigen Substraten zu nutzen, um die Notwendigkeit weiterer technischer Hilfsmittel weitestgehend zu vermeiden. Grundlage hierfür war die durch *Martinez et al.*^[59] vorgestellte, papierbasierte Mikrofluidiktechnik, die unter Einbeziehung steuerbarer on-Chip Flüssigkeitsreservoirs zu einer autonomen Papierfluidik für den point-of-care Bereich weiterentwickelt wird. Hierbei soll außer der Probenzugabe keine direkte Einflussnahme mehr durch den Anwender notwendig sein. Die Flüssigkeitskontrolle in den strukturierten Papierkanälen wird dabei über thermoresponsive Hydrogele sichergestellt. Wie bereits in Kapitel 3.4 ausgeführt, lassen diese sich bezüglich ihres Schwellverhaltens durch die Vernetzung unterschiedlicher Monomere einstellen. In der vorliegenden Arbeit wurde einerseits ein Hydrogel mit stufenartigem Schaltverhalten und andererseits ein Hydrogel mit einem quasi linearem Schwellverhalten als Funktion der Temperatur verwendet.

Im folgenden Kapitel dieser Arbeit werden zuerst die Kapillareigenschaften eines mikrostrukturierten Papiersystems untersucht. Danach werden zwei thermoresponsive Hydrogele mit unterschiedlichen Schwellverhalten charakterisiert. Zum Abschluss werden beide Materialien zu einem durch externen Stimulus steuerbaren Lab-On-Chip (LOC) zusammengesetzt und die Potentiale dieses Systems in Bezug auf mögliche Anwendungsfelder untersucht und beschrieben.

4.2.1. Flüssigkeitstransport in mikrostrukturierten Papierkanälen

Für die Entwicklung eines steuerbaren und kostengünstigen Einweg-Lab-On-Chip System wurde auf die bereits in der Literatur mehrfach beschriebene Papierfluidik zurück gegriffen^{[59],[56],[58],[57]}. Der Vorteil dieser Methode liegt in der vergleichsweise einfachen Strukturierbarkeit der Papiere zu mikrofluidischen Kanalsystemen und den durch das Papiernetzwerk vorhandenen Kapillarkräften zum Flüssigkeitstransport. Die aufgetragenen Flüssigkeiten bewegen sich kapillargetrieben in das Papiersubstrat hinein, ohne zusätzliche Mikropumpen oder Anschlusszubehör.

Die verwendeten Papierkanäle wurden mit Photolack in Filterpapier strukturiert, wie sie in Abbildung 4.22 a) dargestellt sind. Die in Abbildung 4.22b) gezeigten geraden Papierkanäle wurden für die Experimente zur Kapillarkraft verwendet und hatten eine definierte Breite von zwei Millimetern. Die Flüssigkeiten wurden dabei jeweils über die am Kanalansatz erkennbaren, runden Reservoirstrukturen auf das Papier aufgetragen. Der Flüssigkeitstransport in diesen Kanalsystemen wurde ausschließlich über die Kapillarkraft hergestellt. Über die Benetzungsfähigkeit des Kanalsubstrates konnte ein weiterer Einfluss auf den Flüssigkeitstransport ausgeübt werden. Wie in der Abbildung

4.23 deutlich wird, ist die Lauflänge der aufgetragenen Flüssigkeit für die verwendete Kanalbreite bei etwa 50mm begrenzt.

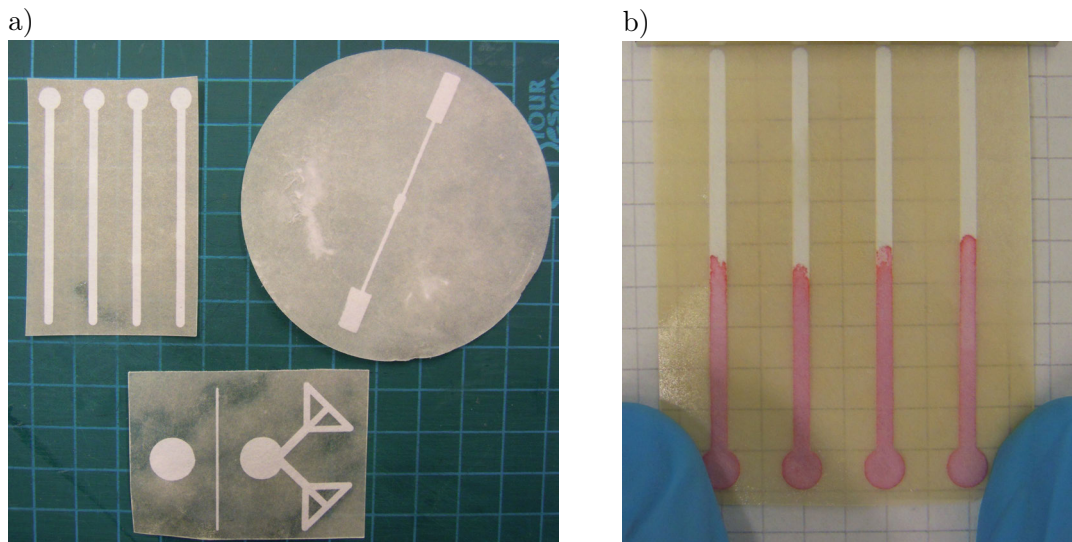


Abb. 4.22.: a) Unterschiedliche Kanalstrukturen, die mit Fotolack und softlithografischen Methoden in das Filterpapier eingebracht wurden. b) vier der hier verwendeten linearen Papierkanäle. In diesem Fall wurde eine rote Farblösung als Kontrastdarstellung auf das runde Reservoirfeld am unteren Bildrand auf die Papierkanäle aufgetragen, die durch die Kapillarkraft in die Kanäle gezogen wurde.

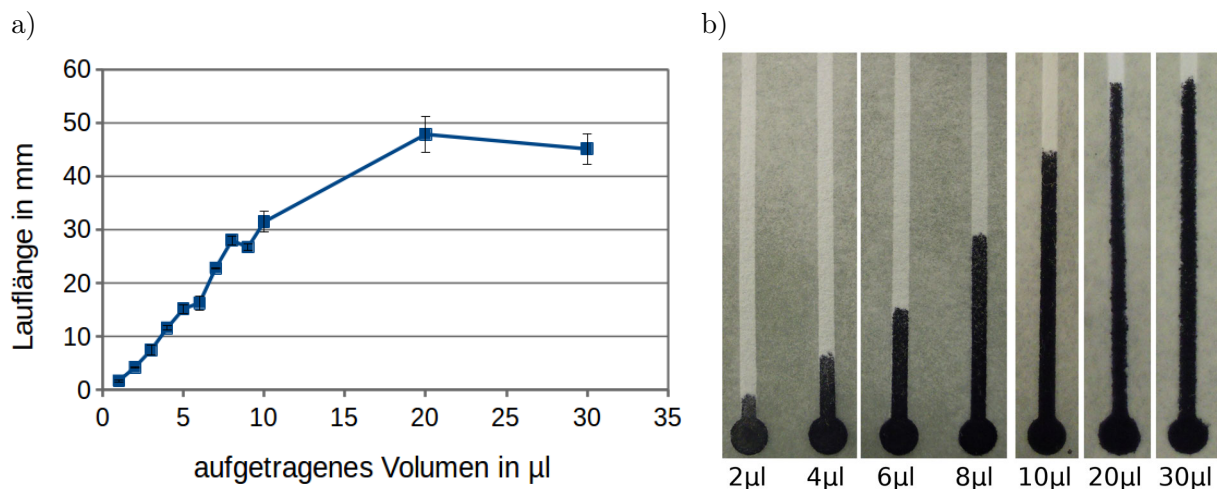


Abb. 4.23.: Flüssigkeitslauflänge im Papierkanal in Abhängigkeit vom aufgetragenen Volumen.

Bis zu einem zugeführten Volumen von 10 Mikrolitern Flüssigkeit nimmt die Lauflänge im 2 Millimeter breiten Papierkanal linear zu. Bei höheren Volumina wird für dieses System eine Laufweite von 5cm nicht überschritten.

Darüber hinaus zeigt Abbildung 4.24, dass die Zeit für die Flüssigkeitsaufnahme mit jedem Mikroliter Volumen zunimmt. Es wurde jeweils der Zeitpunkt als Messzeit in Sekunden festgehalten, sobald die Flüssigkeit vollständig am Reservoir aufgenommen worden war und sich nicht weiter im Kanal bewegte.

Aufgrund der deutlich verlangsamten Flüssigkeitsweiterleitung, die ab 10 Mikrolitern Volumen mehrere Minuten in Anspruch nimmt, muss für offene Systeme berücksichtigt werden, dass aufgrund der Mikrolitervolumina die Verdunstung einen zunehmenden Einfluss auf das Papierkanalsystem hat.

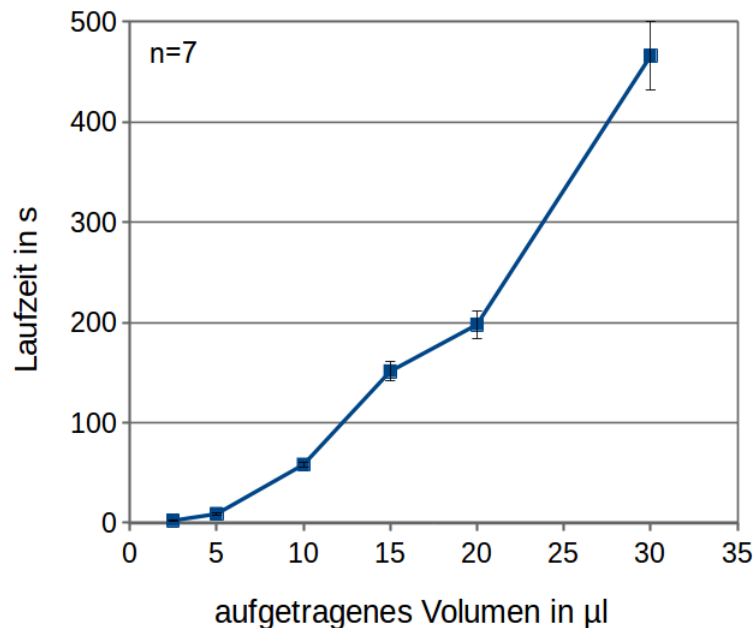


Abb. 4.24.: Darstellung der Flüssigkeitsaufnahmedauer im Verhältnis zum aufgetragenen Lösungsvolumen im Papierkanal. Für die Volumina 20 und 30 Mikroliter wurde das Volumen in jeweils 2 Aliquots von 10, bzw. 15 Mikrolitern auf das Reservoirfeld aufgetragen, da die Größe des Feldes begrenzt war.

Der „Knick“ in der graphischen Darstellung der Messwerte zwischen 15 und 20 Mikrolitern ist darauf zurückzuführen, dass die aufgetragene Flüssigkeitsmenge für 20 und 30 Mikroliter jeweils in zwei Aliquots hintereinander durchgeführt werden musste, da die Reservoirs aufgrund ihrer Größe nur ein begrenztes Volumen aufnehmen konnten.

4.2.2. Temperaturverhalten von Hydrogelen im Probengefäß

Durch die Verwendung von thermoresponsiven Hydrogelen mit Projektpartnern des Institutes für Chemie der Universität Potsdam und des Fraunhofer-IAP Potsdam im gemeinsamen Forschungsprojekt „Taschentuchlabor“ entstand die Idee, mit Hilfe dieser Polymereigenschaft eine Kontrollmöglichkeit von Flüssigkeiten für eine autonome Papierfluidik herzustellen. Über die Wärme induzierte Flüssigkeitsabgabe aus den bei Walsh et al.^[97] beschriebenen NIPAM Hydrogelen ist somit der Zeitpunkt und die Volumenmenge ohne direkten Kontakt auch durch Gehäuseteile hindurch, fest definierbar.

Es wurde zum einen ein Hydrogel aus N-Isopropylacrylamid (NIPAM) vernetzt mit Methylenbisacrylamid (MBA) und zum anderen ein Hydrogel aus NIPAM und Acrylamid (AcAm) vernetzt mit MBA hergestellt. Abbildung 4.26 zeigt das unterschiedliche Kollapsverhalten bei ansteigender Tem-

peratur dieser beiden Hydrogele im Vergleich. Jeweils gleich große ausgestanzte Pads (s. Abbildung 4.25) wurden in einem 1,5ml großen Probengefäß erhitzt und das abgegebene Volumen über das Gewicht bestimmt.

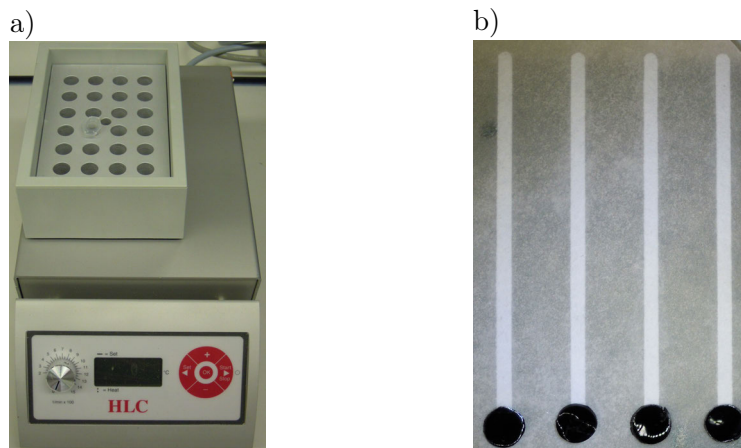


Abb. 4.25.: a) Heizgerät mit dem die Hydrogelpads in den Probengefäßen erhitzt wurden. b) Versuchsaufbau der linearen Papierkanäle mit den auf den Reservoirfeldern positionierten Hydrogelpads.

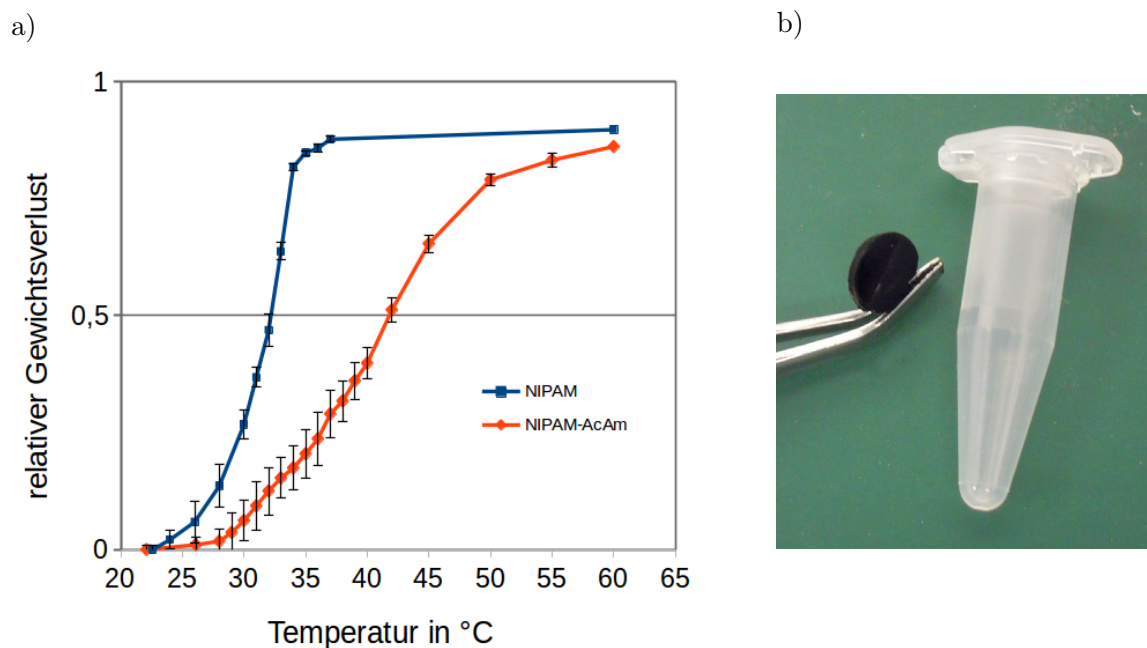


Abb. 4.26.: a) Temperaturabhängige Flüssigkeitsabgabe der unterschiedlich zusammengesetzten Hydrogele. Der Flüssigkeitsverlust wurde über das Gewicht bestimmt. b) Beispiel eines Hydrogelpads neben einem 1,5ml Eppendorf-Tube.

Es ist erkennbar, dass bei Zugabe des Monomers Acrylamid eine wesentlich höhere Temperatur erforderlich ist, um die gesamte Flüssigkeit aus dem Hydrogel zu entfernen. Diese unterschiedlichen Schaltverhalten können auf einem Testsystem so kombiniert werden, dass für die Anwendung in optimaler Weise Flüssigkeitsmengen auf das strukturierte Papiersubstrat abgegeben werden können. Im Fall des NIPAM-AcAm Hydrogels lässt sich somit auch über eine schrittweise Temperaturerhö-

lung sukzessiv Flüssigkeit an das System abgeben, wohingegen beim reinen NIPAM Hydrogel die gesamte Flüssigkeitsmenge über einen schmalen Temperaturbereich vollständig freigesetzt wird.

4.2.3. Temperaturverhalten von Hydrogelen auf strukturiertem Papier

Das Prinzip der Hydrogel gesteuerten Papierfluidik basiert auf der temperaturinduzierten Freisetzung von Flüssigkeit aus dem thermoresponsiven Polymer. Die freigesetzte Flüssigkeitsmenge wird anschließend durch das Papiersubstrat aufgenommen und durch die Kapillarkräfte des Fasernetzwerkes weitergeleitet. Abbildung 4.27a) zeigt ein mit Tintenwasser beladenes Hydrogel auf einer unstrukturierten Papierfläche. Das Wasser wird stabil durch das Gelnetzwerk festgehalten und erst durch eine externe Temperaturerhöhung freigesetzt, wie in Abbildung 4.27b) dargestellt. Durch eine Kanalstrukturierung des Papiernetzwerkes kann die abgegebene Flüssigkeit gezielt weitergeleitet werden, wie anhand des Universitätslogos in Abbildung 4.27d) deutlich wird. Abbildung 4.27 c) zeigt die schematische Darstellung des papierbasierten LOC-Systems. Die Klebefolien auf der Ober- und Unterseite versiegeln das Kanalsystem, da die Hydrogele durch die geringen Flüssigkeitsmengen über einen längeren Lagerzeitraum austrocknen würden.

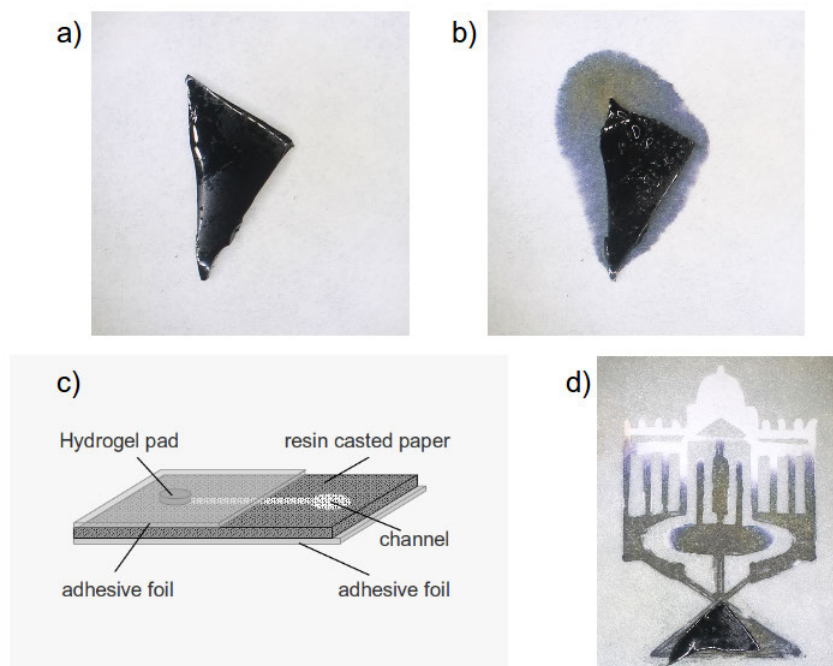


Abb. 4.27.: a) NIPAM-Hydrogelstück auf einem Filterpapier, das auf die Kollapstemperatur erhitzt wird b) und die gespeicherte Tintenlösung an das Filterpapier abgibt. c) Schematischer Aufbau eines Hydrogel-gesteuerten LOC-Systems. d) Kontrollierte Flüssigkeitsaufnahme des Papierkanals in Form des Uni-Potsdam-Logos, nachdem das Hydrogel kollabiert ist.

Nachdem das Schaltverhalten der zur Verfügung stehenden Hydrogele untersucht war, wurden sie anschließend in das strukturierte Papier integriert. Hierbei wurden die Hydrogele jeweils in Reser-

voirgröße ausgestanzt und über dem Reservoirfeld positioniert. Mit Hilfe einer großflächigen Klebefolie aus Polymethylmethacrylat (PMMA) wurden die Ober- und Unterseite des strukturierten Papiers verschlossen, damit die Hydrogele aufgrund ihrer geringen Größe bei Raumtemperatur nicht austrockneten, was bei einem gespeicherten Volumen bis etwa 15 Mikrolitern innerhalb einer Stunde vollständig passieren würde.

Über die Kanalbreite, die Saugfähigkeit des Fasernetzwerkes und das freigesetzten Flüssigkeitsvolumens wird bestimmt, wie weit die Flüssigkeit in den Papierkanal fließt. Abbildung 4.28 zeigt, dass durch das unterschiedliche Temperaturverhalten der verschiedenen Hydrogele die Lauflänge der Flüssigkeit im Papierkanal mit Hilfe definierter Temperaturwerte gesteuert werden kann.

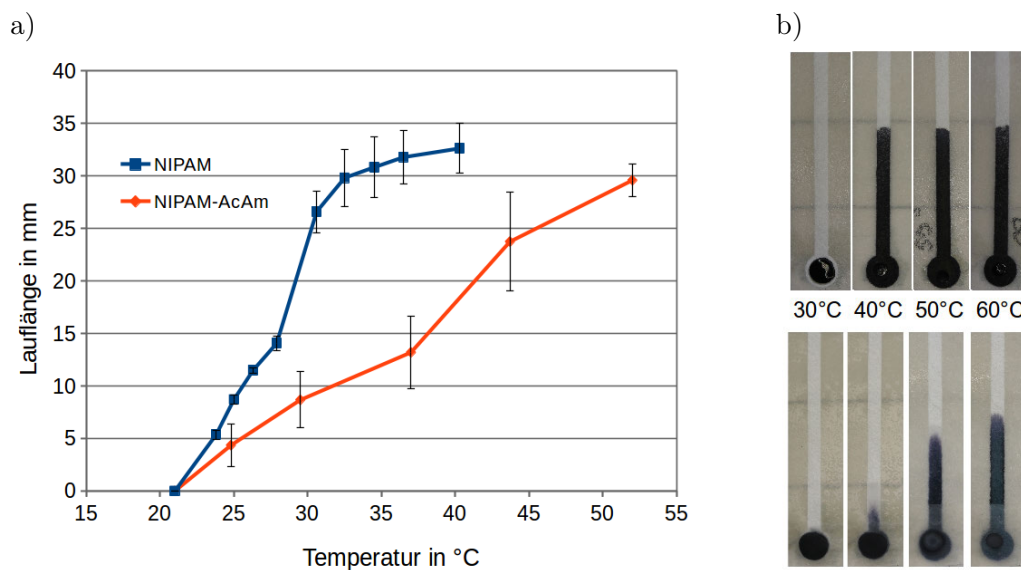


Abb. 4.28.: Temperaturabhängig gesteuerte Laufweite der Flüssigkeit im Papierkanal durch einen Hydrogellkollaps. a) Unterschiedliches Verhalten des NIPAM- und des NIPAM-AcAm-Hydrogels als Flüssigkeitsreservoir auf dem Papierkanal. b) Farbbanden im Papierkanal nach der Flüssigkeitsabgabe bei den angegebenen Temperaturen für NIPAM (oben) und NIPAM-AcAm (unten).

Darüber hinaus wird deutlich, dass die Kombination aus NIPAM- und AcAm-Monomeren den Temperaturbereich für das Kollapsverhalten deutlich vergrößert. Während NIPAM zwischen 30°C und 40°C seinen Flüssigkeitsgehalt nahezu vollständig abgegeben hat, kann das NIPAM-AcAm-Hydrogel hingegen in diesem Temperaturbereich nur die Hälfte seines Flüssigkeitsinhaltes freisetzen.

4.2.4. Hydrogele als Flüssigkeitsspeicher

Die in Kapitel 4.2.2 und 4.2.3 beschriebenen Eigenschaften der Hydrogele werden nun verwendet, um mit Hilfe des freigesetzten Flüssigkeitsvolumens gezielt Substanzen auf dem Papierchip zu transportieren und miteinander in Kontakt zu bringen. Werden im Papierkanal Substanzen im trockenen Zustand vorgelagert, können diese durch die Flüssigkeit anschließend wieder gelöst werden. Anhand der vorgelagerten Substanzmenge und der freigesetzten Volumenmenge lassen sich auch Konzentra-

tionsverhältnisse im Kanal einstellen. In der folgenden Abbildung 4.29 wurden in den Bereichen I und II des Papierkanals Natriumhydroxid und Zitronensäure im getrockneten Zustand vorgelagert. Durch einen unteren, temperaturinduzierten NIPAM-AcAm-Hydrogelkollaps bei 34°C wird im unteren Abschnitt des Kanals das Natriumhydroxid im freigesetzten Wasser gelöst (Abschnitt II). Im Anschluss wird die im NIPAM-Hydrogel gespeicherte Thymolblau-Indikator-Lösung bei 44°C vollständig freigesetzt (2). Der durch die Natronlauge vorherrschende alkalische pH-Wert wird durch die blaue Färbung angezeigt. Zum Schluss wird das partiell kompaktierte Hydrogel weiter bis auf 63°C erhitzt, so dass das im Gel verbliebene Restvolumen komplett freigesetzt wird. Die bereits im Kanal befindliche Lösung wird durch die Kapillarkraft weiterbewegt (3) und erreicht den Kanalbereich mit der vorgelagerten Zitronensäure. Hier löst sich das Natriumcitrat und verschiebt den pH-Wert in den neutralen Bereich, so dass der Indikator im Kanalabschnitt (I) in Bild C einen Farbwechsel von blau nach gelbgrün anzeigt.

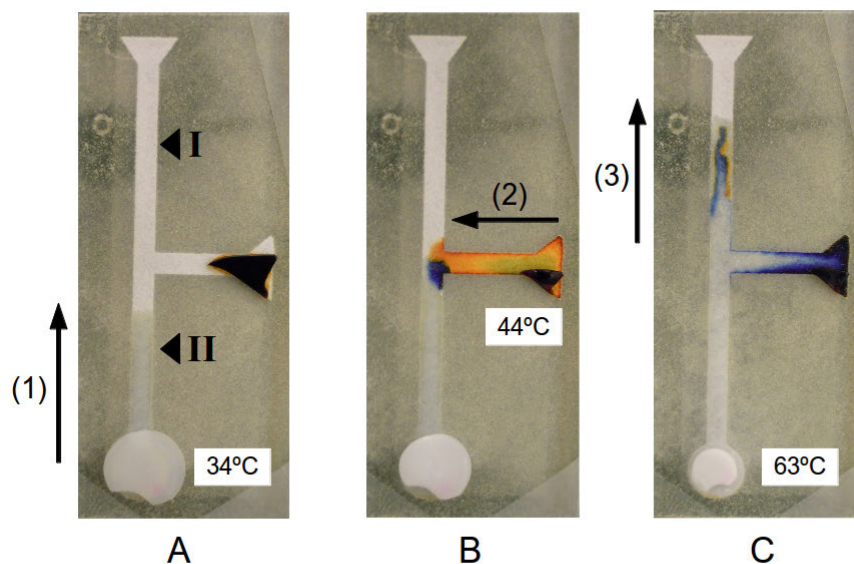


Abb. 4.29.: T-förmiges Papierkanalsystem mit trocken vorgelagerten Substanzen in den Bereichen I und II. Durch das aus dem Hydrogel freigesetzte Flüssigkeitsvolumen in Abbildung A(1) wird das bei II befindliche Natriumhydroxid im Kanal gelöst. Der sich einstellende alkalische pH-Wert wird durch die im zweiten Schritt (2) bei 44°C aus dem NIPAM-Hydrogel vollständig freigesetzten Thymolblau-Indikator-Lösung anhand eines blauen Farbumschlages angezeigt (B). Zum Abschluss wird das Restvolumen im NIPAM-AcAm Hydrogel bei 63°C komplett freigesetzt und die Flüssigkeitssäule im Kanal weiter nach oben transportiert. Der pH-Wert der Lösung wird durch die sich bei I lösende Zitronensäure in den neutralen pH-Bereich verschoben, so dass hier der Indikator einen Farbwechsel von blau auf grüngelb anzeigt (3).

Bei einem geschlossenen Kanalsystem kann mit Hilfe eines Hydrogels bei dem die freigesetzte Flüssigkeitsmenge linear von der Temperatur abhängt (s. NIPAM-AcAm-Hydrogel in Kapitel 4.2.3) die

Flüssigkeit an jedem beliebig nachfolgenden Kanalort angehalten oder weiterbefördert werden. Mit Hilfe des definierten Temperaturverhaltens kann es für eine Anwendung darüber hinaus vorteilhaft sein, dass die Flüssigkeit in dem Papierkanal erst weiter transportiert wird, wenn eine gewünschte Solltemperatur erreicht wurde. In dem hier vorgestellten Fall in Abbildung 4.29 wurde in einem Temperaturspektrum von 34°C bis 63°C im Kanalsystem gearbeitet.

Für zukünftige Anwendungen des durch Hydrogele steuerbaren Testsystems ist gerade die Lagerfähigkeit von organischen Substanzen im System interessant. Diese konnte modellhaft anhand eines enzymbasierten Glukosetest als Demonstrator gezeigt werden. Das System erfüllt folgende Anforderungen:

- Trockenlagerung der benötigten Enzyme und Chemikalien mit unterschiedlichen Lösungseigenschaften auf dem Papiersubstrat.
- Bedarfsgerechte Bereitstellung der frisch präparierten Enzymlösungen für den Test.
- Bedarfsgerechte Zuführung der Lösungen zum Reaktionsfeld.
- Bedarfsgerechte Zuführung der Reaktionslösung zum Sensorfeld.

Abbildung 4.30 zeigt den mit Hydrogelen ausgestatteten Demonstrator. Die Hydrogele dienen in diesem Fall als Flüssigkeitsspeicher für Wasser und können bei Bedarf ab einer Temperatur von 32 °C das gespeicherte Volumen vollständig freisetzen. Die für den Test notwendigen und in Wasser löslichen Enzyme Merrettichperoxidase (HRP) und Glukoseoxidase (GOX) wurden jeweils getrennt in den Kanalbereichen I und II eingetrocknet vorgelagert. Der in Ethanol lösliche Redoxfarbstoff Tetramethylbenzidin (TMB) wurde auf dem separierten Sensorfeld links getrocknet vorgelagert.

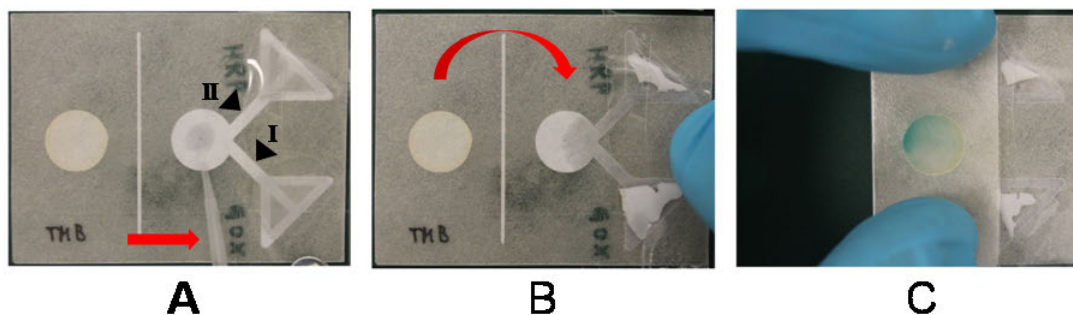


Abb. 4.30.: Darstellung des papierbasierten Glukosetest-Demonstrator. In den Bereichen I und II in Abbildung A wurden die Enzyme Glukoseoxidase und Merrettichperoxidase trocken vorgelagert. Über eine Pipette wird die Probenlösung manuell aufgebracht (roter Pfeil). Durch einen thermisch induzierten NIPAM-Hydrogelkollaps wird Wasser freigesetzt, so dass die Enzyme gelöst werden (B). Abschließend wird für den Nachweis durch Knicken der auf dem Sensorfeld vorgelagerte Redoxfarbstoff Tetramethylbenzidin mit dem Reaktionsfeld zusammengebracht und zeigt dort einen blauen Farbumschlag (C).

Zwei Mikoliter der zu messenden Flüssigkeit reichen aus, um den Test durchzuführen. Die Probe wurde hier durch eine Pipette manuell auf das Reaktionsfeld aufgetragen (roter Pfeil in Abbildung 4.30A). Danach wurden die in den Kanälen vorgelagerten Substanzen durch einen thermisch ausgelösten Hydrogelkollaps und der damit verbundenen Flüssigkeitsfreisetzung in Lösung überführt. Die Kapillarkraft des Papiersubstrates zog die Flüssigkeiten anschließend durch die Kanäle zum Reaktionsfeld, wo die Enzyme mit der Glukose reagierten (B). In Folge der Flüssigkeitsbenetzung zeigt sich der Kanal in der Abbildung an diesen Stellen dunkler. Durch Knicken wurde zuletzt das Sensorfeld mit dem vorgelagerten Redoxfarbstoff mit dem Reaktionsfeld in Kontakt gebracht, so dass das TMB umgesetzt werden konnte. Der in Abbildung 4.30 C sichtbare Farbumschlag von gelbgrün nach blau zeigt die in der Messsubstanz vorhanden gewesene Glukose an.

4.2.5. Hydrogele als Wirkstoffspeicher

In den vorangegangenen Versuchen wurden die Hydrogel-Pads als Wasserspeicher verwendet. Als Erweiterung wurde untersucht, ob auch in Wasser lösliche Substanzen mit dem Lösungsmittel in den Hydrogelen gespeichert werden können. In der bereits besprochenen Abbildung 4.29 des T-Kanals wurde Thymolblau-Natriumsalz in Wasser gelöst und mit dem Lösungsmittel im Hydrogel gespeichert. Durch einen Hydrogelkollaps wurde das gespeicherte Lösungsmittel anschließend mit dem darin gelösten Indikator freigesetzt, was sich hier in der blauen Färbung des Papierkanals zeigt. Es wird anhand des kollabierten, gefärbten Hydrogels jedoch deutlich, dass Teile des Indikators im Hydrogel verblieben sind. Um dieses genauer zu untersuchen, wurde im folgenden Versuch Thymolblau mit einer definierten Konzentration in Wasser gelöst und anschließend im Hydrogel gespeichert.

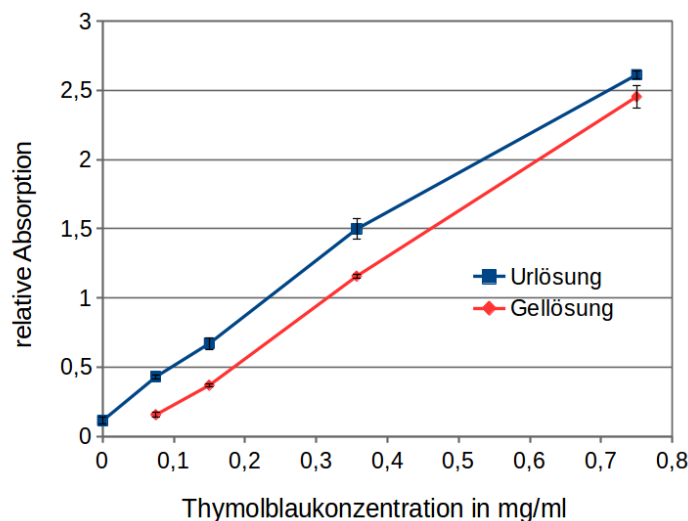


Abb. 4.31.: Relative Absorption der Inkubationslösung (Urlösung) die in das Hydrogel eingelagert wurde, gegen die durch einen Thermokollaps freigesetzte Lösung (Gellösung). Die angegebene Thymolblaukonzentration entspricht hierbei der Urlösungskonzentration. Die gemessene Absorption der Gellösung kann daher einer Konzentration zugeordnet werden.

Nach dem erneuten Freisetzen der Substanzen durch einen Hydrogelkollaps wurde die Absorption der Lösung gegen eine geeichte Konzentrationsreihe in einem Mikrotiterplattenphotometer (i-Mark, *BioRad*) bestimmt. In Abbildung 4.31 sind die gemessenen Absorptionswerte dargestellt. Es zeigt sich, dass die Absorptionsmesskurven annähernd parallel verlaufen, jedoch zueinander verschoben sind. Die Funktion der Eichkurve (Urlösung) wurde mit Hilfe einer linearen Regression bestimmt. Der Mittelwert der Absorptionsdifferenz zwischen Eichlösung und Gellösung beträgt $0,27 (\pm 0,07)$. Mit Hilfe der Eichkurvenfunktion ergibt sich eine durch das Hydrogel zurückgehaltene Thymolblaukonzentration von $0,027\text{mg/ml}$.

4.2.6. Diskussion

In vorangegangenen Arbeiten [59] [56] [58] [57] konnte erfolgreich gezeigt werden, dass Papier mit Hilfe fotolithografischer und drucktechnischer Methoden auf verschiedene Art und Weise strukturiert werden kann. Diese Kanalstrukturen können durch die papiereigenen Kapillarkräfte als mikrofluidische Systeme genutzt werden^[90]. Begrenzt waren diese papierbasierten Lab-On-Chip (LOC) Systeme allerdings in ihrer Steuerungsfähigkeit, sodass mehrschrittige und komplexere Reaktionen mit Flussunterbrechungen bisher nicht auf Papiersubstraten implementiert werden konnten.

Darüber hinaus existieren eine Reihe von Arbeiten zur Herstellung von responsiven Hydrogelen^{[97] [73]}, die beispielsweise als Oberflächen mit positiven Eigenschaften für die Zellkultur verwendet werden können^[69]. Es wurden ebenfalls Untersuchungen durchgeführt, diese Hydrogele als Reservoir für chemische und biologische Substanzen zu verwenden [2],[45]. Es konnte gezeigt werden, dass responsive Hydrogele ein hohes Potential für unterschiedlichste Anwendungsbereiche besitzen.

In der vorliegenden Arbeit konnten nun zum ersten Mal erfolgreich thermoresponsive Hydrogele mit strukturierten Papiersubstraten zu einem steuerbaren, anschluss- und pumpenfreien Lab-On-Chip System kombiniert werden.

Durch die Verwendung von Papier als Trägermaterial ist es möglich aus den vorgestellten Demonstratoren Einwegsysteme zu konzipieren, die sehr kostengünstig und vergleichsweise einfach herzustellen sind. Darüber hinaus zeigt sich das System als sehr vorteilhaft in Bezug auf die zur Analyse und Steuerung notwendigen Flüssigkeitsmengen. Mit weniger als 20 Mikrolitern Volumen lassen sich bereits komplexe Analyseprotokolle durchführen und zeitlich kontrollieren. In der vorliegenden Arbeit wurden in Kapitel 4.2.4 Demonstratoren in Form eines einfachen Glukosetests und eines pH-Wert-Test präsentiert. Mit diesen konnte gezeigt werden, dass sich chemische und biologische Substanzen im getrockneten Zustand auf dem Testsystem lagern lassen und bei Bedarf schnell bereitgestellt werden können. Ebenso wurde gezeigt, dass die verwendeten Hydrogele nicht nur als reine Flüssigkeitsreservoirs auf diesen Testsystemen Verwendung finden können, sondern auch die Möglichkeit besteht, gelöste Substanzen zu speichern und bei Bedarf abzugeben.

Weiterhin hat sich die Verwendung von Acrylamid als Grundmaterial für die Hydrogelherstellung als sehr günstig erwiesen. Durch die Fähigkeit verschiedene chemische Seitengruppen an die Amid-Gruppe zu knüpfen, ergibt sich ein vielfältiges Baukastensystem, mit dem die Eigenschaften des polymerisierten Hydrogels beeinflusst werden können. Hier konnte gezeigt werden, dass durch die Kombination von N-Isopropylacrylamid (NIPAM) und Acrylamid (AcAm) die Thermoresponsivität des ursprünglichen NIPAM-Hydrogels von einem schmalen Kompaktierungsverhalten, bei dem der Kollaps in einem engen Temperaturbereich abläuft, zu einem linearen Verhalten, bei dem der Kollaps über einen breiten Bereich proportional zur Temperatur erfolgt, aufgeweitet werden kann (s. Kapitel 4.2.2). Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, durch die Kombination aus verschiedenen thermoresponsiven Hydrogelen Flüssigkeiten bei Bedarf sehr schnell oder auch schrittweise in die Papierkanäle zu leiten. Damit ist die Voraussetzung geschaffen worden, Substanzen trocken oder in

Lösung zu lagern, die Flüssigkeiten zielgerecht zuzuführen, vor Ort zu halten oder auch bei Bedarf abzuführen.

Zusätzlich stellt dieses Fluidiksystem die Möglichkeit zur Verfügung, stark toxische Substanzen vollständig isoliert von der Umwelt und dem Anwender ohne direkten Kontakt über Schlauchsysteme für analytische Zwecke kontrollieren zu können. Umgekehrt kann mit diesem LOC-System ebenso ein Analyseplatz mit definierter Reinheit zur Verfügung gestellt werden, wenn die äußeren Bedingungen eine anderweitige Messung aufgrund der Verkeimung oder Verschmutzung unmöglich machen.

Neben diesen Vorteilen konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass dem hydrogelgesteuerten LOC-System aufgrund der verwendeten Materialien Grenzen gesetzt sind:

In Kapitel 4.2.5 wurde gezeigt, dass bei der Verwendung von Hydrogelen als Wirkstoffreservoir die gespeicherten Substanzen nach der Freisetzung durch einen Hydrogelkollaps nicht vollständig abgegeben werden. Anhand des Thymolblau-Absorptionsversuches wurde deutlich, dass 0,027 mg/ml Thymolblau im NIPAM-Gel zurückgehalten werden. Aus diesem Grund wird es bei der Verwendung von Hydrogelen als Wirkstoffreservoir notwendig sein, den Wirkstoffverlust aufgrund der Geleigenschaften für jede verwendete Substanz separat festzustellen.

Im Hinblick auf die Verwendung der Papierkanalstrukturen wurde in Kapitel 4.2.1 deutlich, dass die Kanallänge bei einer festgelegten Kanalbreite von zwei Millimetern auf 5 Zentimeter begrenzt ist. Ab dieser Länge ist die Kapillarkraft nicht mehr ausreichend, um die Flüssigkeit adäquat durch das Kanalsystem zu transportieren. Als Lösung für dieses Problem sind zwei Auswege zu nennen:

Zum einen besteht die Möglichkeit zum Ende der Grenzlänge ein weiteres Hydrogel inklusive dem notwendigen Reservoir zu positionieren, um die Flüssigkeit voranzutreiben. Es muss jedoch darauf geachtet werden, dass Wirkstoffe und Substanzen, die durch den Kanal befördert werden sollen, auch durch die zusätzlich freigesetzte Flüssigkeit erfasst werden. Zum anderen bietet das Papierkanalsystem die Möglichkeit der Lagen- oder Sandwichanordnung, wie es bereits von *Martinez et al.* [57] und *Then und Garnier* [90] beschrieben wurde. Hierdurch lassen sich die Kanallängen deutlich verkürzen, bei gleichzeitig ausreichendem Platzangebot für unterschiedliche Reaktionsbereiche.

Werden diese Einschränkungen ausreichend berücksichtigt, so repräsentiert das hier neu vorgestellte System ein einfaches, kostengünstiges, innovatives und vielfältig einsetzbares LOC-System, mit dessen Hilfe Lösungen zur Analyse automatisiert direkt vor Ort sauber hergestellt sowie kontrolliert zu- und abgeführt werden können.

4.3. Verstärkung von Pathogennachweisreaktionen

Nachdem in Kapitel 2.3.3 erfolgreich ein Demonstrator in Form eines Hydrogel-gesteuerten Glukosetestsystems entwickelt werden konnte, fehlt bis zu diesem Zeitpunkt noch der Beweis, dass ein derartiges Schnelltestsystem pathogene Strukturen, wie Mikroorganismen oder Viren, nachweisen kann. Dieser Beweis soll nun im folgenden Kapitel erbracht werden. Dabei wird zuerst das bereits vorgestellte, automatisiert steuerbare Papierfluidiksystem zu einem selektiven Schnelltest auf den Mikroorganismus *Escherichia coli* weiterentwickelt. In den letzten beiden Abschnitten des vorliegenden Ergebnisteils wird anschließend versucht, in einem weiteren „Vereinfachungsschritt“ die Pathogenerkennung und die Verstärkungsreaktion in eine einzige Reaktionsumgebung direkt in das Hydrogel einzubetten, so dass die Miniaturisierung des Schnelltestsystems hier mit Hilfe der maximal zur Verfügung stehenden Möglichkeiten ausgereizt wird.

4.3.1. Enzymatisch verstärkter E.coli-Schnelltest

Auf Basis der Ergebnisse aus Kapitel 2.3.3 wurde im Folgenden ein Mikroorganismenschnelltest konzipiert, der in gas- oder flüssigkeitsführenden Leitungssystemen eine Kontamination durch ausgewählte Zielorganismen nachweisen kann. Als Modellorganismus wurde in diesem Fall das Bakterium *Escherichia coli* gewählt, da es sich schnell in Laboren der Sicherheitsstufe S1 kultivieren und handhaben lässt. Für die Identifizierung des Mikroorganismus wird eine Antikörper basierte Farbreaktion verwendet. Dazu werden die Pili von *E. coli* mit einem polyklonalen Antikörper (K99-Pili-AK/ Rabbit/ *antibody-online*) markiert. Dieser spezifische Antikörper wurde vom Hersteller am NH-Terminus mit dem Enzym Merrettichperoxidase (Horseradish peroxidase) (HRP) gelabelt. Durch die Zugabe einer Bariumperoxid-Lösung in verdünnter Schwefelsäure (pH 4,0) und Tetramethylbenzidin wird dieser Stoff bei Anwesenheit der HRP zu einem blauen Farbstoff umgesetzt, wie in Abbildung 4.32 dargestellt.

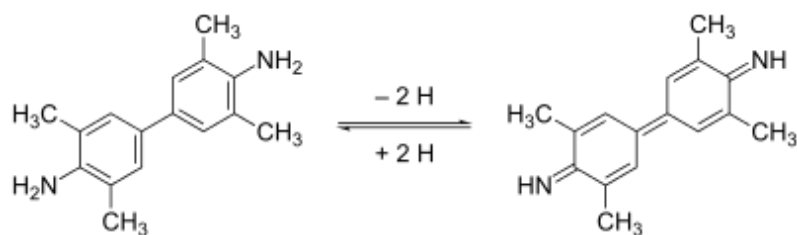


Abb. 4.32.: Farbstoffreaktion von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB). In Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und dem Enzym Merrettichperoxidase wirkt das TMB als Wasserstoffdonator und wird zum TMB-diimin umgesetzt^[52].

Die entscheidenden Eigenschaften eines point-of-care Testsystems sind zum einen die Einfachheit in der späteren Anwendung und zum anderen die Empfindlichkeit bezüglich des Zielnachweises. Aus diesem Grund wurde der nachfolgend vorgestellte *E. coli*-Schnelltest so zusammengestellt, dass alle notwendigen Chemikalien und Enzyme bereits auf dem Testsystem implementiert sind. In einem zu-

vor kanalstrukturierten Papiersubstrat wurden $0,6\mu\text{g}$ eines Merrettichperoxidase (HRP) gelabelten monoklonalen Antikörpers an Position 1 in Abbildung 4.33 im linearen Kanal trocken vorgelagert. Dazu wurde die Antikörpermenge vorher in $6\mu\text{l}$ H_2O dd aufgenommen, in jeweils $1\mu\text{l}$ -Aliquots in die Struktur pipettiert und bei Raumtemperatur eingetrocknet. Im gegabelten Kanal wurde an Position 2 insgesamt $30\mu\text{g}$ des Redoxfarbstoffs TMB aufgenommen in $6\mu\text{l}$ einer H_2O dd/Aceton-Lösung (1:2) aufgetragen und eingetrocknet. Im Gleichen Kanal wurden $0.8\mu\text{g}$ Bariumperoxid an Position 3 als Protonendonator (suspendiert in $6\mu\text{l}$ Ethanol) in die Struktur pipettiert und eingetrocknet. Anschließend wird auf das Absorptionsfeld 4 ein wasserspeicherndes Hydrogel aufgebracht. Auf das Absorptionsfeld 5 wurde ein Hydrogel mit gespeicherter, verdünnter Schwefelsäure ($100\mu\text{M}$) aufgebracht. Mit dem oberen Gehäusedeckel (Acrylklebefolie), wie in Abbildung 4.34 dargestellt, wurde das System von oben dicht verschlossen. Auf dem unteren Gehäusedeckel (Glasträger) wurde mit Hilfe einer doppelseitig klebenden Folie ein Endreservoir aus saugfähigem Substrat fixiert. In der Mitte der Klebefolie wurde ein ringförmiger Durchlass eingebracht, welcher mit einer Verbindungsbrücke aus saugfähigem Material ausgefüllt war. Das so vorbereitete Testsystem war anschließend einsatzbereit.

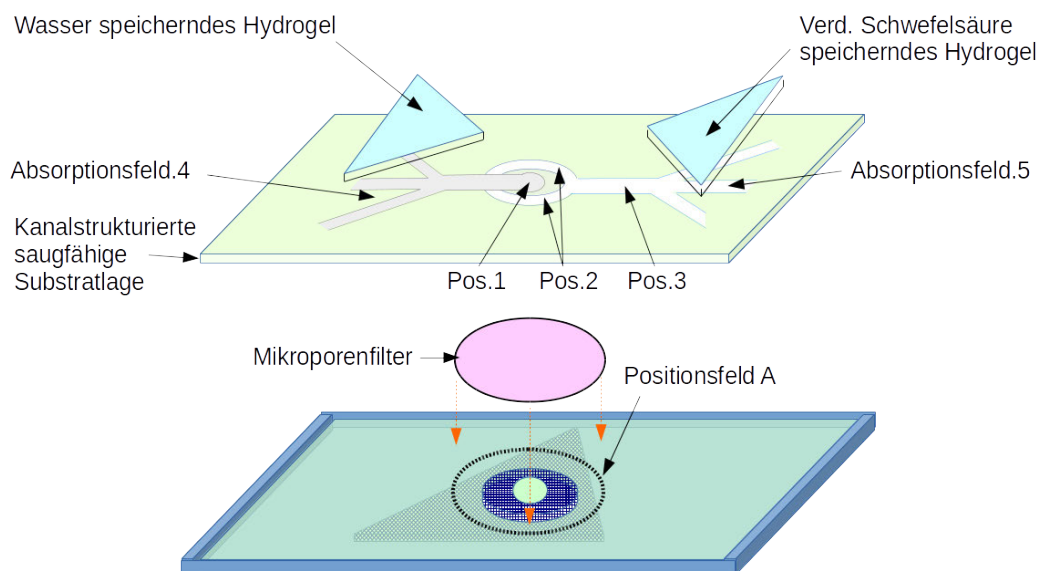


Abb. 4.33.: Positionierung des Mikroporenfilters auf dem Positionsfeld A. In der oberen Struktur sind die Positionen 1-3 der Reaktionssubstanzen dargestellt. Auf die Darstellung des Gehäusedeckels wurde aus Übersichtsgründen in dieser Abbildung verzichtet.

Es wurden jeweils *E. coli*-Zellsuspensionen mit einer Zelldichte von $2,8 \times 10^5$ und $5,025 \times 10^6$ auf einen Mikroporenfilter mit einem Porendurchmesser von $0,2\mu\text{m}$ aufgetragen und eingetrocknet. Durch das Zurückhalten der Mikroorganismen auf der Filtermembran findet ein örtliches Aufkonzentrieren statt, so dass die Bindungswahrscheinlichkeit zwischen Zielpräparat und Antikörper im Testsystem erhöht wird. Anschließend wird der Mikroporenfilter mit einer sterilen Pinzette mit der Unterseite mittig auf die Verbindungsbrücke geklebt, wie in Abbildung 4.33a) dargestellt.

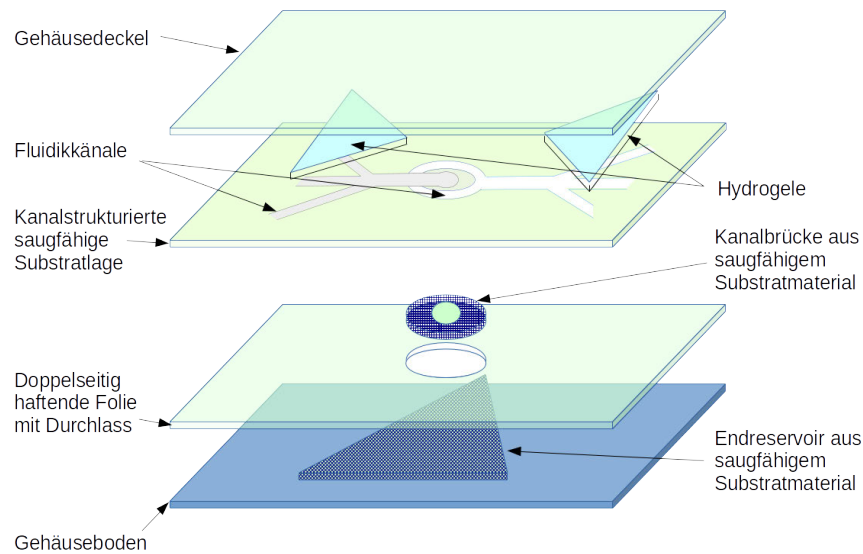


Abb. 4.34.: Detaillierte Darstellung des E-coli-Schnelltests in den einzelnen Lagen mit Gehäuse.

Danach wird die Testunterseite mit der Testoberseite zentriert, handfest verpresst und somit das Testsystem dicht verschlossen. Über einen thermischen Stimulus von 38°C wird das Hydrogel auf dem Absorptionsfeld 4 zum Kollabieren gebracht, wodurch das gespeicherte Wasser freigesetzt wird. Die Kapillarkräfte des saugfähigen Substrates ziehen das Wasser in den strukturierten Kanal zuerst zur Position 1, wo es den dort vorgelagerten Antikörper auflöst und im Weiteren durch den Mikroporenfilter hindurch gezogen wird. Hier bleibt ein Teil der Antikörper an den vorhandenen Mikroorganismen selektiv gebunden. Die restliche Lösung wird vom Endreservoir aufgenommen, wodurch die ungebundenen Antikörper gleichzeitig vom Mikroporenfilter entfernt werden.

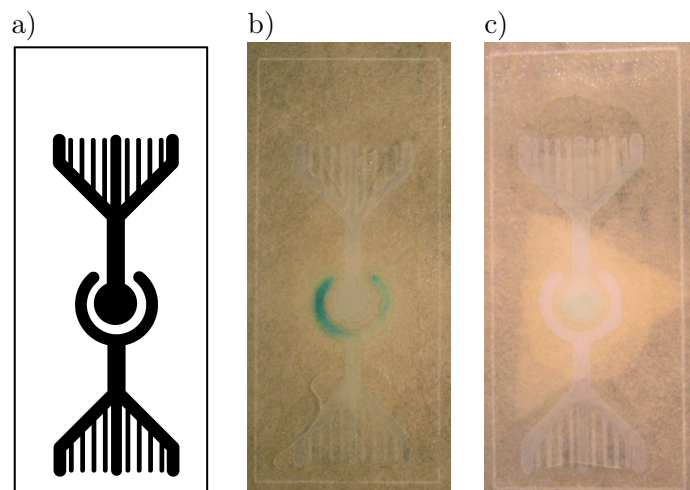


Abb. 4.35.: Aufsicht auf den Mikroorganismenschnelltest. a) Kanaldesign, b) ein durchgeführter Schnelltest mit positivem *E. coli* Befund und c) mit negativem Befund auf *E. coli*. Die Durchführungszeit für den Schnelltest nach Einlegen des Mikroporenfilters beträgt weniger als 5 Minuten.

Im zweiten Schritt wird das Hydrogel auf dem Absorptionsfeld 5 bei 38°C thermisch zum Kollaps gebracht, wobei die verdünnte Schwefelsäure freigesetzt wird. Diese wird ebenfalls durch die Kapillarkräfte des saugfähigen Substrates in den Kanal gezogen, wo es an Position 3 das Peroxid auflöst und mit diesem zu Wasserstoffperoxid und Bariumsulfat reagiert. Diese Lösung wird weiter zu Position 2 gezogen und durchfeuchtet dort das Tetramethylbenzidin (TMB) besetzte Substrat. Befinden sich nun Mikroorganismen auf dem Mikroporenfilter, an die der Peroxidase-gelabelte Antikörper aus der ersten Freisetzung binden konnte, so wird in Anwesenheit des Wasserstoffperoxid das TMB durch die HRP von gelbgrün nach blau umgesetzt und zeigt somit als positiver Nachweis den Zielorganismus an, wie in Abbildung 4.35b) dargestellt. Sind keine Zielpräparate auf dem Filter, so fehlt die Peroxidase für die Umsetzung des TMBs. Der Farbkanal zeigt als Resultat keinen Farbumschlag, wie in Abbildung 4.35c) dargestellt.

4.3.2. Autokatalytische Clock-Reaktion zur Signalverstärkung von freigesetztem Kaliumjodid aus einem Hydrogellkollaps

Nachdem mit Hilfe von thermoresponsiven Hydrogel-Pads erfolgreich gezeigt werden konnte, dass Substanzen und Flüssigkeiten gespeichert und bei Bedarf freigesetzt werden können, soll nun ein Verstärkungssystem aus Hydrogelen und autokatalytischer Reaktion zusammengestellt werden. Im folgenden Demonstrator wurde das Arsenit-Jodat-Reaktionsgemisch in ein Agarosegel bei einem pH-Wert von 5 eingebettet und in einer Petrischale geliert vorgelegt.

Anschließend wurden die bisherigen Arbeiten mit dem NIPAM- und NIPAM-AcAm-Hydrogel genutzt, um ein pH-sensitives Hydrogel zusammenzustellen. Hierfür wurde das NIPAM-Hydrogel mit Carboxylgruppen versehen. Dieses lässt sich bequem über eine Zusammenstellung aus den N-Isopropylacrylamid (NIPAM)- und Acrylsäure (AcAc)-Monomeren (vgl. Kapitel 3.4.3) herstellen. Es zeigte sich, dass ein Copolymer aus NIPAM und AcAc im Verhältnis von 9:1 mit dem vorher etablierten Herstellungsprotokoll für das NIPAM- und das NIPAM-AcAm Hydrogel mit einem guten Polymerisationsergebnis herstellbar war. Ein Copolymerisationsverhältnis zugunsten der Acrylsäure hingegen führte zu teilweise unvollständiger Polymerisation.

Das fertig polymerisierte NIPAM-AcAc-Hydrogel wurde gewaschen und anschließend über Nacht in einer Kaliumjodid-Lösung gelagert, so dass das Kaliumjodid durch Diffusion als Reaktionstarter im Hydrogel gespeichert wurde. Das pH-responsive Hydrogel wurde abschließend auf die Agaroseschicht mit dem eingebetteten Arsenit-Iodat-Reaktionssystem gelegt, so dass im Ergebnis ein durch Jodid auslösbares Farbstoffsystem in Sandwichform zusammengestellt wurde. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 4.36 dargestellt.

Mit Hilfe eines 0,5µl Tropfens aus 1M Salzsäure wurde das Hydrogel örtlich begrenzt zum Kollabieren gebracht und das Jodid als Reaktionstarter freigesetzt. Das Hydrogel verändert dabei an einer kreisrund begrenzten Fläche sein Erscheinungsbild von transparent zu lichtundurchlässig, wie in Abbildung 4.37a) gezeigt. Abbildung 4.37b) zeigt in einer schematischen Schichtdarstellung den Verlauf der freigesetzten Jodid-Ionen und den resultierenden Bandenverlauf. In Abbildung 4.37c)

ist der Versuchsaufbau nach der abgelaufenen Reaktion gezeigt. An den Flüssigkeitstropfen an der Hydrogeloberfläche ist erkennbar, dass das gesamte Gel kollabiert ist. Der Farbumschlag der auto-katalytischen Reaktion wird an der Freisetzungsstelle zuerst sichtbar, wie man in Abbildung 4.39e) und f) erkennen kann, und setzt sich entlang der Grenzschicht zwischen Hydrogel und Agarosegel fort.

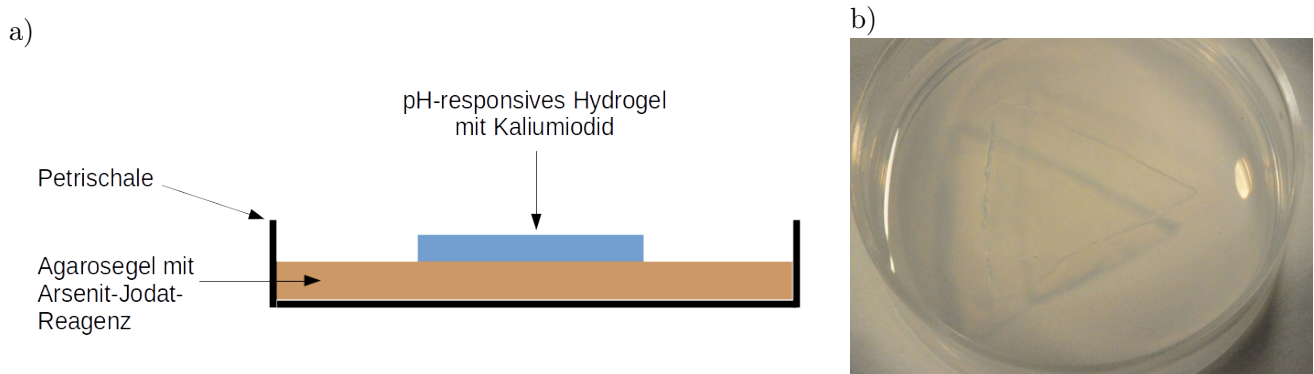


Abb. 4.36.: Farbstoffsystem aus Hydrogel und Arsenit-Jodat-Clock-Reaktion. a) Aufbau in einer schematischen Schnittskizze gezeichnet. In eine Petrischale wurde ein Agarosegel mit der Arsenit-Jodat-Lösung gegossen und geliert. Auf das feste Agarosegel wird das pH-responsive Hydrogel mit dem gespeicherten Kaliumjodid plaziert. In Abbildung b) ist der reale Versuchsaufbau des auslösbaren Farbstoffsystems gezeigt. Auf der Agarosegelschicht befindet sich mittig ein dreieckig ausgeschnittenes Hydrogelpad.

Während des Reaktionsablaufs werden in der Agaroseschicht ständig Protonen freigesetzt, so dass sich vor der Farbbande der pH-Wert entlang des Hydrogels weiter verringert, worauf die darüber angrenzenden Hydrogelbereiche ebenfalls kollabieren.

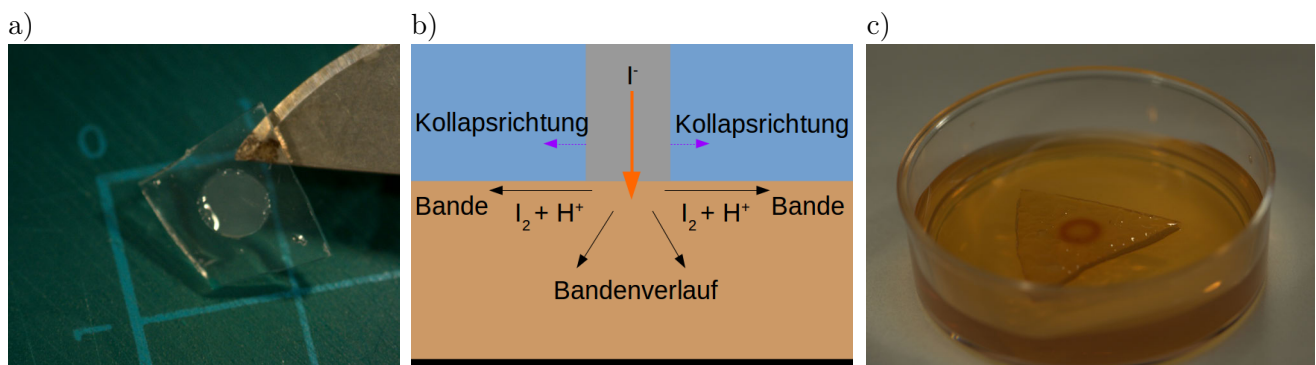


Abb. 4.37.: a) Hydrogelpad an einer Skalpellklinge mit abgegrenzter, kreisrunder Kollapsstelle, wie diese sich nach Zugabe eines Salzsäure-Droplet zeigt. b) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus aus Hydrogel und der Agaroseschicht. Nach dem örtlichen Kollaps des Hydrogels werden Jodid-Ionen an das darunter liegende Agarosegel abgegeben. Hier reagiert das Jodid mit Jodat zu Jod, welches durch die arsenige Säure zu Jodid umgesetzt wird (s. Kapitel 2.2.3). Nach dem vollständigen Verbrauch der arsenigen Säure in der Reaktion bleibt Jod zurück, welches als Farbbande sichtbar wird. Zusätzlich produziert die Reaktion Protonen, so dass der pH-Wert in der Agaroseschicht sinkt. Dieses führt zu einem Kollaps des darüber liegenden Hydrogels. Aus diesem Grund breiten sich radial vom Reaktionsstartpunkt eine Farbbande und eine Kollapsbande aus. c) Vollständig kollabiertes Hydrogel auf der farbigen Agaroseschicht.

Diese Bereiche setzen an der Hydrogel-Oberfläche, wie in Abbildung 4.37 c) dargestellt, Flüssigkeitstropfen frei, da hier ein angrenzendes, aufnahmefähiges Medium fehlt.

Nachdem die Reaktion den Hydrogelrand erreicht hat, zeigt sich das Hydrogel in Abbildung 4.39j) vollständig kollabiert. Die Farbreaktion läuft anschließend im Agarosegel ohne Hydrogel bis zum Schalenrand weiter. Es lässt sich auf den Abbildungen 4.39h)-j) weiterhin erkennen, dass sich der Bereich um die Stelle an der die Reaktion ausgelöst wurde dunkler hervorhebt, von einer Kreisform in eine Ringform übergeht und schließlich in der Mitte des Hydrogels verblasst, jedoch abgesetzt erhalten bleibt.

Ein Referenzversuch mit einem 0,5µl Droplet reinem Wasser führt hingegen nicht zum Auslösen der Farbstoffbande innerhalb der gesamten Experimentdauer von 30 Minuten. Auch die bereits mit Hydrogelen versehenen und zum Auslösen vorbereiteten Hydrogel-Agarose-Systeme bleiben mehrere Tage bei Raumtemperatur stabil. Es zeigte sich jedoch, dass bereits geringe Verunreinigungen bei der Lagerung der fertig präparierten, anregbaren Systeme ausreichen, um die Farbreaktion auszulösen. 8 von ursprünglich 12 Systemen waren nach 3 Tagen noch einsatzfähig. Nach zwei Wochen waren noch 6 von 12 Systemen auslösbar.

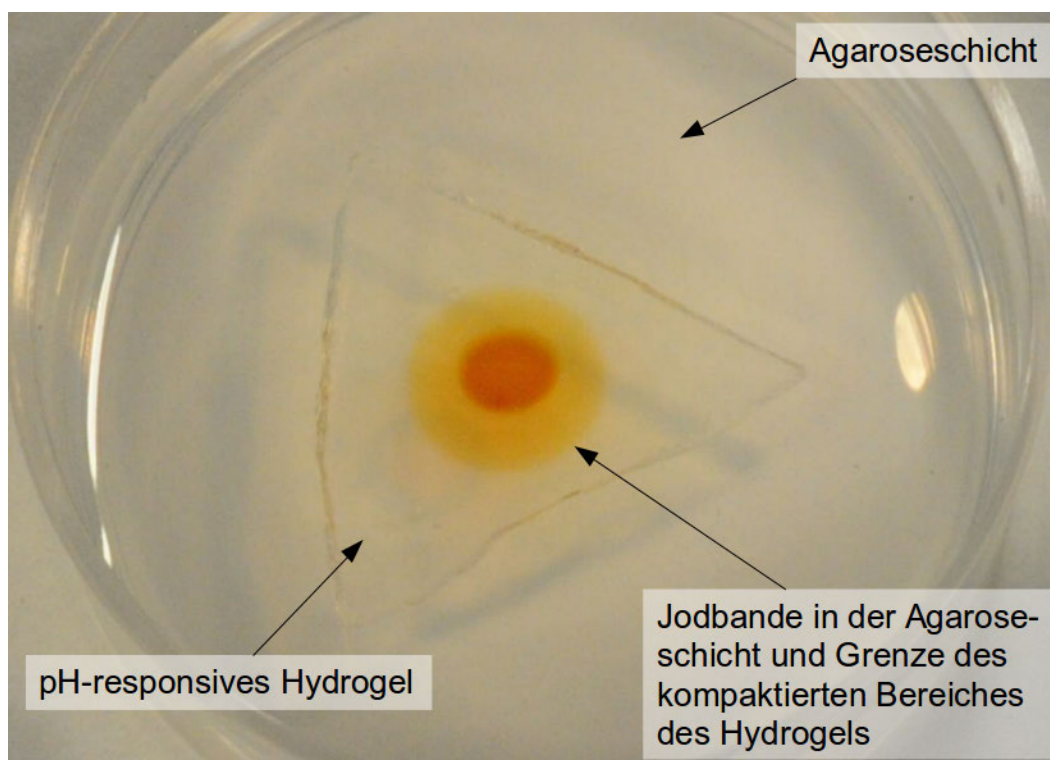


Abb. 4.38.: Momentaufnahme eines frisch ausgelösten autokatalytischen Farbstoffsystems. Die gelbe Bandenfront zeigt den Farbumschlag in der Agaroseschicht an der Grenze zum Hydrogel. Diese stellt auch gleichzeitig die Kollapsgränze des pH-responsiven Hydrogels dar. Sehr verlangsamt zeigt sich dahinter eine zweite orange-rote Farbbande im Hydrogel, die im weiteren Verlauf einen Ring bildet.

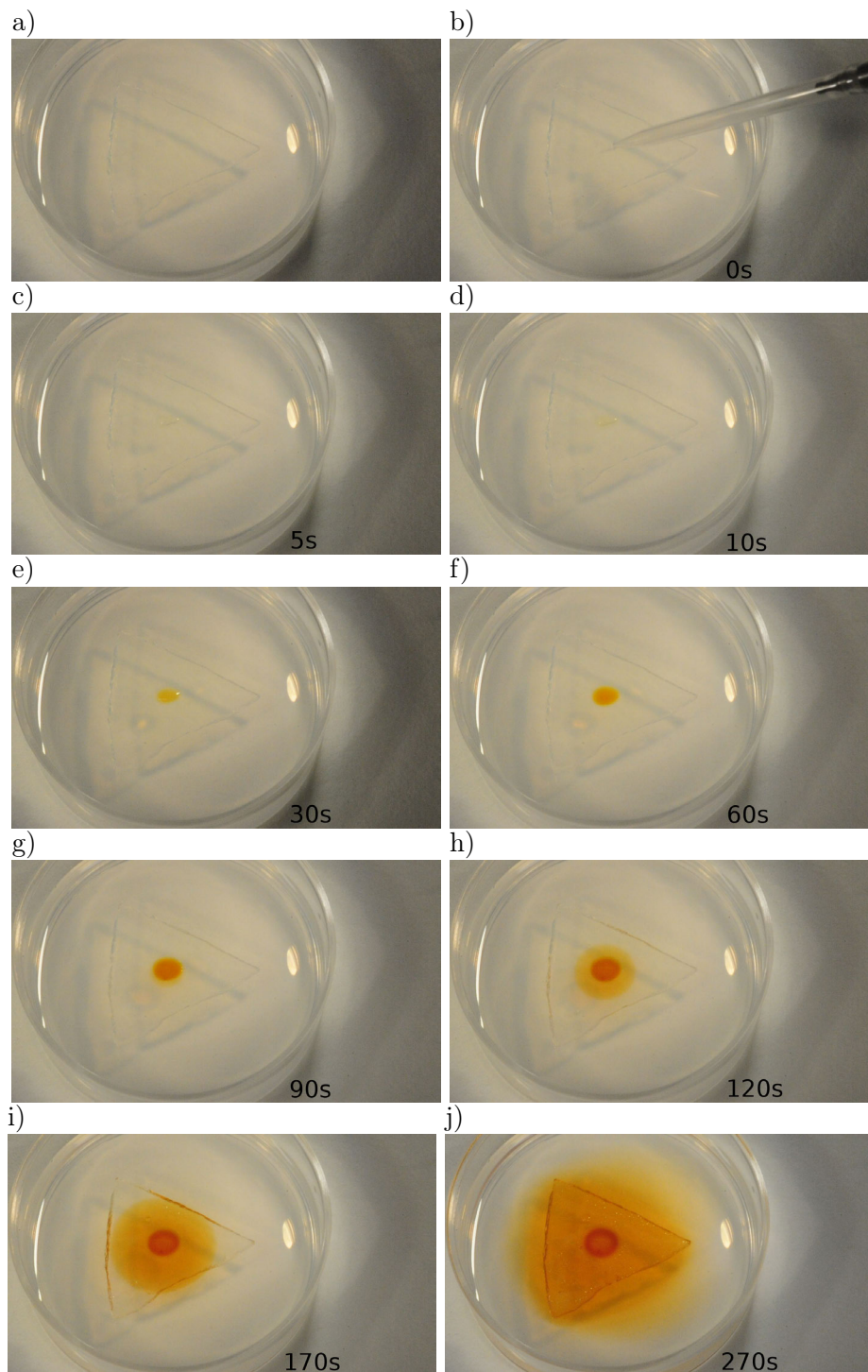


Abb. 4.39.: Versuchsergebnis des auslösbaren Farbstoffsystems aus dem Hydrogel und der Arsenit-Jodat-Clock-Reaktion. Abbildung a) zeigt die Ausgangssituation. Nachdem der Säure-Droplet mit einer Mikropipette in der Mitte des Hydrogels platziert wurde (b) vergehen ca. 30s, bis sich ein Farbumschlag zeigt (e). Innerhalb von 240s breitet sich die Reaktionsfront im anregbaren Agarosemedium bis über das Hydrogel hinaus aus. Eine zweite sehr dunklere Farbbande zeigt sich im Hydrogel folgend (g-j). In den Abbildungen i) und j) sind Flüssigkeitsabsonderungen innerhalb der ersten Farbbande auf dem Hydrogel erkennbar.

4.3.3. E-Coli Bindung an ein funktionalisiertes Hydrogel

Um das in Kapitel 4.3.2 gezeigte anregbare Verstärkungssystem zu einem Pathogennachweissystem weiter zu entwickeln, ist es notwendig eine Erregerbindung als Primärreaktion in das Hydrogel zu implementieren. Die Spezifität dieser Bindung bestimmt dabei, inwiefern ein solches System für die spätere Anwendung brauchbar ist. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der bereits in Kapitel 4.3.1 verwendete Nachweisweg über spezifische Antikörperbindung gewählt, wie sie auch in den etablierten ELISA-Tests Anwendung finden [94] [95] [23]. Außerdem soll idealer Weise eine schnelle und einfache Anpassung durch Austausch unterschiedlicher Erkennungsgruppen an das Polymergerüst möglich sein. Bei diesem Lösungskonzept muss darauf geachtet werden, dass eine kovalente Kopplung des Antikörpers an das Hydrogel nicht zum Verlust der Erkennungsfunktion führt. Aufgrund der bereits in Kapitel 4.3.1 angesprochenen Vorteile des Darmbakteriums *Escherichia coli* wurde dieser Mikroorganismus als Modell ausgewählt und versucht ein Hydrogel mit Antikörpern auf diesen Zielorganismus zu funktionalisieren. Die Wahl des Hydrogels und die Kopplung des Antikörpers wurden dabei in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer IAP in Potsdam entwickelt und durchgeführt. Eine kurze Beschreibung der EDC/NHS-Kopplung ist in Kapitel 3.4.4 und der zugehörigen Abbildung 3.9 dargestellt. Antikörperwahl, Zellkultur und Bindungsversuche sind dabei Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

Für die Verifizierung einer erfolgreichen Antikörperkopplung zwischen einem Triglycol-Hydrogel und einem monoklonalen Antikörper gegen *Escherichia coli* Pili K99 wurde das funktionalisierte Hydrogelpad (s. Kapitel 3.4.4) zum einen zwischen zwei Glasplatten und zum anderen in einem Eppendorf-Tube mit *E. coli* Zellsuspensionen inkubiert. In Abbildungen 4.40 und 4.41 ist im Vergleich die zeitliche Abfolge der Inkubation mit der Bakteriensuspension zwischen zwei Glasplatten gezeigt. Aufgrund der räumlichen Begrenzung durch die Deckgläser konnte die Bakteriensuspension das Hydrogel nur von der schmalen Gelseite erreichen. In Folge der Gelpräparation auf den Glaträgern kommt es an den Gelkanten durch ungleichmäßige Anhaftungen an der Glasoberfläche zu tunnelartigen Strukturen, wie sie in Abbildung 4.40a) durch die Anordnung der schwimmenden Bakterien gut zu erkennen sind. Hier lässt sich das Verhalten der Bakterien sehr gut beobachten, da die Bewegungsrichtung der Bakterien in einer Ebene mit begrenzter Höhe eingeschränkt ist. In der Darstellung 4.40 ist dabei das Verhalten der Bakterien an einem Hydrogel, das mit den Kopplungssubstanzen EDC und NHS, jedoch ohne den E.coli-Antikörper behandelt wurde, dargestellt. Zum Vergleich ist in Abbildung 4.41 ein Hydrogel der gleichen Zusammensetzung, das mit EDC, NHS und E.-coli-Antikörper behandelt wurde, gezeigt. Beide Abbildungsreihen wurden aus einer zusammenhängenden Bildsequenz erstellt. Der unterschiedliche Bindungseffekt wird in der gezeigten Abfolge anhand eines markierten Bakteriums dargestellt. Es sei daher an dieser Stelle auf die zugehörige, deutlich bessere Darstellung der Originalsequenzen 'E-coli-HyGel-ohne-AK-mit-EDC-01', 'E-coli-HyGel-ohne-AK-mit-EDC-02' und 'E-coli-HyGel-funkt-01' sowie 'E-coli-HyGel-funkt-02' auf der im Anhang beigefügten CD verwiesen, da in der folgenden Darstellung nur Makro-Momentaufnahmen verwendet werden konnten.

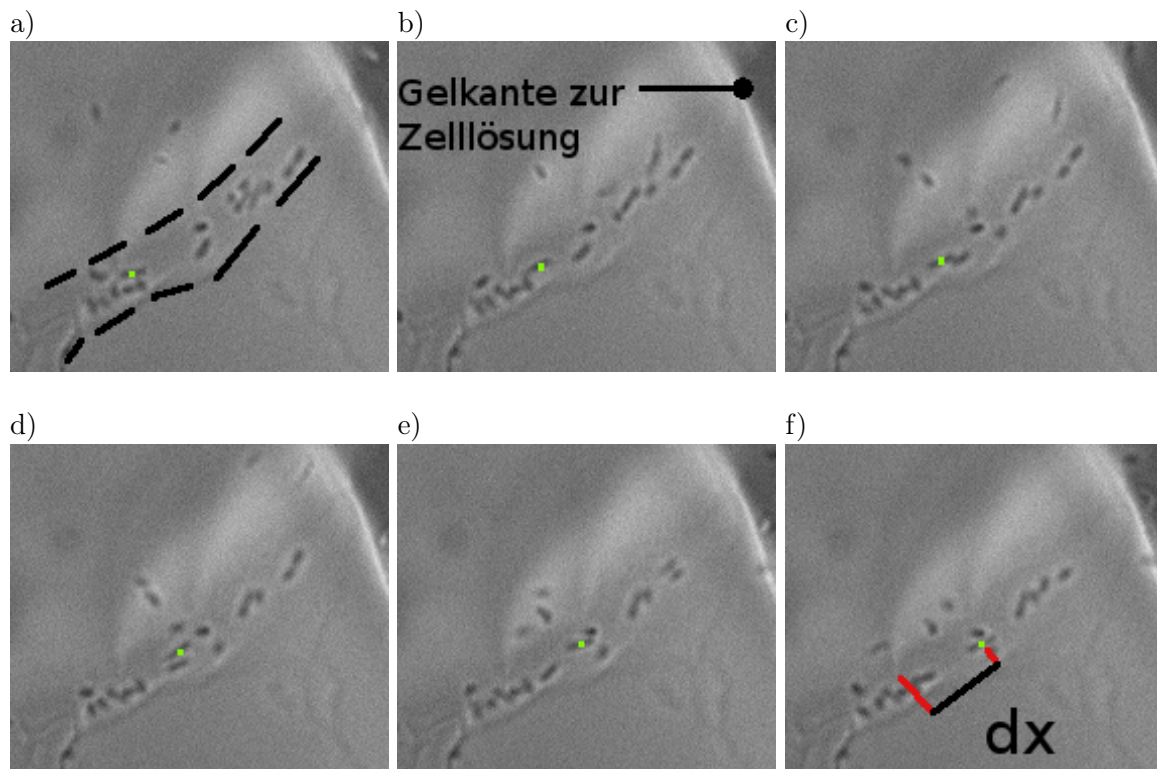


Abb. 4.40.: a) Tunnelartige Struktur am Rand des nicht mit Antikörpern funktionalisierten Triglykol-Hydrogels. Durch diese Struktur können die *E.-coli*-Bakterien im Suspensionsmedium hindurch schwimmen. b) Markierung am Übergang zwischen Gel und Zellsuspension. Anhand eines markierten Bakteriums ist erkennbar, dass es sich in Abbildung a) an einer Engstelle vorbei durch den Tunnel bewegt. Dabei begegnet es auch einzelnen Individuen wie in Abbildung c) dargestellt und berührt dabei mit dem gesamten Zellkörper die Hydrogeloberfläche. Es kann sich jedoch danach weiter ungehindert weiterbewegen d)-f). In Abbildung f) ist der zurückgelegte Weg markiert.

In Abbildung 4.40 ist zu erkennen, dass das in 4.40a) farbig markierte Bakterium an einer Hydrogelengestelle vorbei in die tunnelartige Struktur hinein schwimmt. In dieser Struktur begegnet es anderen Individuen, so dass es mehrfach die Hydrogeloberfläche mit dem Zellkörper berührt, wie man in Abbildung 4.40c) und d) erkennen kann. Bis auf die räumliche Begrenzung durch das Hydrogel erfahren die einzelnen Bakterien jedoch keine weitere Einschränkung.

Wiederholt man den Versuch nun mit einem Triglykol-Hydrogel, dessen Oberfläche mit den Koppelungssubstanzen EDC, NHS und dem *E.-coli*-Antikörper behandelt wurde, so erhält man ein anderes Ergebnis, wie in den Abbildungen 4.41 a) bis f) dargestellt ist. Sobald ein Bakterium die Hydrogeloberfläche berührt, wird dessen Zellkörper fest am Hydrogel immobilisiert, wie der Vergleich der Abbildungen 4.41e) und f) zeigt.

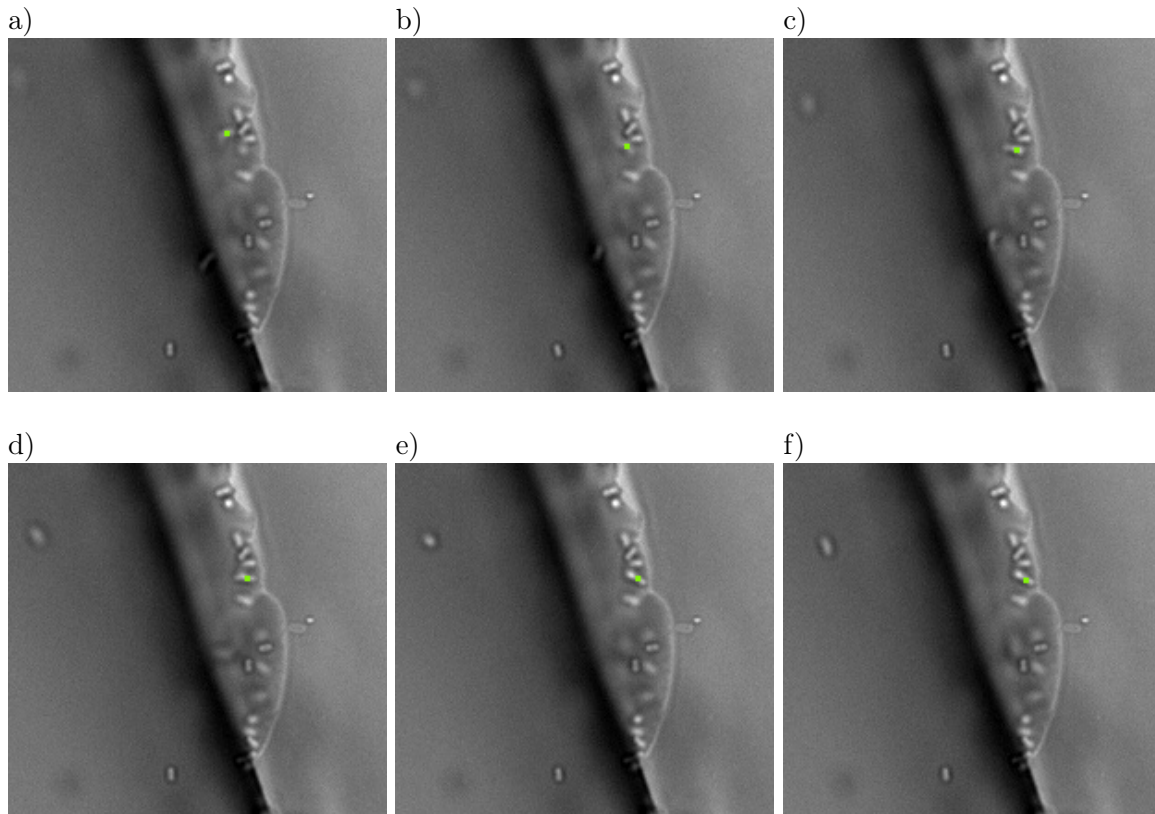


Abb. 4.41.: Verhalten der *E.-coli*-Bakterien an einer mit Antikörpern versehenen Triglykol-Hydrogeloberfläche. Durch die ungleichmäßige Schnittkante des Hydrogels, verursacht durch die Präparation, ergibt sich hier, vergleichbar wie in Abbildung 4.40 bereits beschrieben, eine tunnelartige Struktur entlang der Kante des auf der rechten Bildseite erkennbaren Hydrogels. In den Abbildungen a) bis c) ist ein Bakterium gezeigt, das mit einem farbigem Pixel markiert wurde. Dieses nähert sich aus der Zellsuspension kommend der Hydrogelkante, trifft in Abbildung d) auf diese auf und wird in Abbildung e) schließlich immobilisiert. Die Position des Bakteriums verändert sich in den Bildern e) und f) nicht mehr. Ebenso zeigt der Vergleich der Bilder a)-f) dass alle Individuen entlang der Hydrogelkante ihre Position aufgrund der Immobilisierung nicht mehr ändern konnten.

Es ist insbesondere zu sehen, dass alle Individuen die bereits an der Hydrogelkante immobilisiert wurden, ihre Positionen in den Abbildungen a) bis f) nicht mehr sichtbar verändern. Bei der Durchführung der Messung war zudem erkennbar, dass bereits eine ausreichende Annäherung der Individuen an das Hydrogel dazu führte, dass diese beschleunigt an die Hydrogeloberfläche „herangezogen“ wurden. Auch wurden Individuen gefunden, die konstant über einer lokalen Stelle des Hydrogels ein präzidierendes Bewegungsmuster zeigten. Insgesamt zeigte sich der Modelorganismus *Escherichia coli* als sehr robust in den Versuchsdurchführungen. Auch bei Aufnahmen von immobilisierten *E.-coli* an funktionalisierten Gelen, die mehrere Tage im Kühlschrank in MB-Puffer mit 0,5% w/v Glukose gelagert wurden, fanden sich immer noch Individuen mit präzidierenden oder rotierenden Bewegungen oberhalb einer festen Stelle im Hydrogel. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Bakterien an den Pili fest an der Oberfläche gebunden sind.

Darüber hinaus wurde der Versuch aus Abbildung 4.40 an einem Triglycol-Hydrogel ohne weitere Behandlung mit EDC, NHS und Antikörpern wiederholt. Die Ergebnisse gleichen den Ergebnissen

aus 4.40 und wurden daher hier nicht nochmal als Bildmaterial dargestellt. Die zugehörigen Originalaufnahmen als Filmmaterial sind jedoch unter der Bezeichnung 'Triglycol-ohne-alles' auf der CD im Anhang zu finden.

Zum Abschluss dieser Versuchsreihe wurde die Haltbarkeit der Immobilisierung zwischen funktionalisiertem Hydrogel und den gebundenen Bakterien in Bezug auf Scherkräfte untersucht. Hierfür wurden die funktionalisierten Hydrogele jeweils 5 Tage in der Zellsuspension bei 6°C inkubiert und anschließend drei Tage in MB-Puffer mit 0,5% Glukose in kleinen Petrischalen auf einem Laborschüttler bei 500rpm gewaschen, wobei das Puffermedium jeden Tag erneuert wurde. In Abbildung 4.42 ist der Hydrogelzustand des funktionalisierten Hydrogels dem nicht funktionalisierten Hydrogel gegenübergestellt.

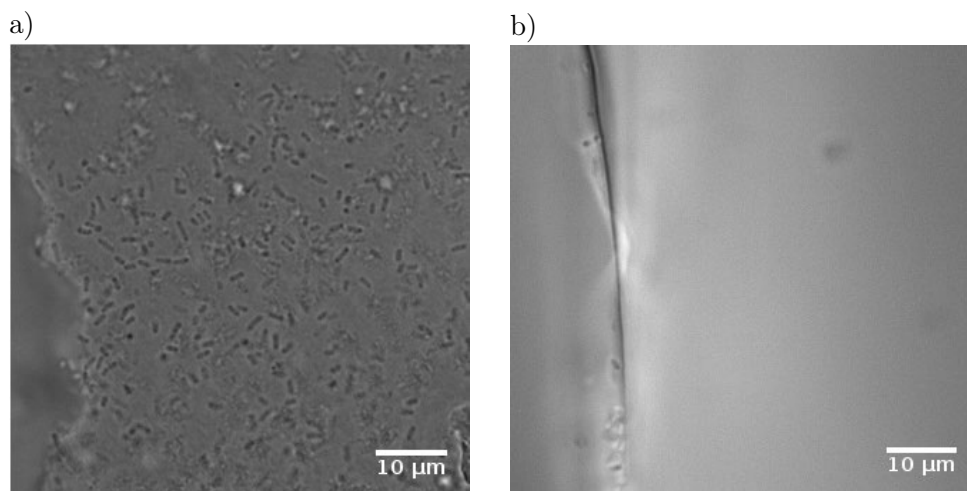


Abb. 4.42.: Gegenüberstellung der Oberflächen eines funktionalisierten a) und eines nicht funktionalisierten Hydrogels b) nach dreitägiger Scherstressbehandlung auf einem Laborschüttler. In der MB-Pufferflüssigkeit sind in beiden Abbildungen links neben der jeweiligen Hydrogelkante *Escherichia coli*-Bakterien erkennbar. Auf der Hydrogeloberfläche jeweils rechts in den Abbildungen sind hingegen deutliche Unterschiede in der Zellkörperbesetzung zu sehen. Das funktionalisierte Hydrogel in Abbildung a) ist dicht besetzt mit Zellkörpern und anderen Partikeln, wohingegen das nicht funktionalisierte Hydrogel aus dem gleichen Material keine Besetzung und nur wenig Verunreinigungen zeigt. Die Helligkeitsunterschiede kommen durch die automatisierte Kontrastwahl im Programm ZEN der Firma Zeiss zustande.

Vergleicht man nun beide Hydrogele, so ist der Unterschied offensichtlich. Das funktionalisierte Hydrogel in Abbildung 4.42 a) zeigt eine dichte Besetzung mit Zellkörpern und weiteren anhaftenden Partikeln, das nicht funktionalisierte Hydrogel hingegen in Abbildung b) weist nahezu keine Besetzung mit Zellkörpern auf.

4.3.4. Diskussion

Die in Kapitel 4.1 und 2.3.3 dargestellten Resultate sollten in diesem Kapitel 4.3 verwendet werden, um einen selektiven Pathogenschnelltest zu entwickeln. Es gibt dabei unterschiedliche Strategien, die Erreger nachzuweisen. Als die sicherste und genaueste Variante ist der genetische Nachweis anzuführen. Um diesen Nachweis jedoch durchführen zu können, ist ein Zerstören der Erregerhülle unumgänglich. Für die spätere Anwendung hätte dieses bedeutet, dass die Probenlösung im Labor vorbehandelt werden muss. Dieses widerspricht jedoch der Vorstellung eines einfachen, von jedem vor Ort schnell durchzuführenden Testsystems. Aufgrund der Sicherheitsanforderungen für die Pathogenkultivierung wurde in der Durchführung vorerst auf den Modellorganismus *Escherichia coli* zurückgegriffen, da sich dieser sehr gut in Laboren der Sicherheitsstufe S1 kultivieren lässt und ebenso monoklonale Antikörper gegen diese Bakterienkultur einfach zu beziehen sind. Der in Kapitel 2.3.3 vorgestellte Glukosetest Demonstrator (Abbildung 4.30) konnte erfolgreich zu einem Hydrogel gesteuertem Papiernachweistest auf den Zielorganismus *E. coli* weiterentwickelt werden (Abbildung 4.3.1), der darüber hinaus als ein neu verfügbares Testverfahren an der Universität Potsdam zum Patent eingereicht wurde. Um die Nachweisgrenze für eine spätere Anwendung auf möglichst wenige Mikroorganismen herabzusetzen, wurden drei Verstärkungsmechanismen in das Testsystem integriert:

Zum Ersten wird das zu untersuchende Medium durch einen Mikroporenfilter geleitet, der durch seine Porengröße Organismen ab einem definierbaren Zelldurchmesser zurückhalten kann. Die Durchflussmenge des Untersuchungsmediums kann hierbei frei variiert werden und ist daher auf die spezifischen Anforderungen des späteren Anwenders anpassbar. Durch diese Art des Filtrierens wird die nachweisbare Organismenanzahl an der Membranoberfläche aufkonzentriert.

Zum Zweiten wird in dem hier vorgestellten System die bereits in der Biotechnologie etablierte ELISA-Technik ^[94] verwendet, um mit Hilfe spezifischer Antikörper die einzelnen Organismen auf der Mikroporenfilteroberfläche selektiv durch eine maximal an die Zelloberfläche bindende Antikörperanzahl zu markieren.

Zum Dritten ist jeder gebundene Antikörper am NH-Terminus dieses Proteins mit einer Peroxidase ausgestattet, welches den anschließend zugeführten Redoxfarbstoff Tetramethylbenzidin (TMB) enzymkatalytisch umsetzt. Als Resultat zeigt sich dem Anwender ein blaues Farbsignal bei positivem Testbefund (Abbildung 4.35). Durch die Hydrogel gesteuerte Flüssigkeitszuführung ist es möglich das Testsystem für den Anwender so zu vereinfachen, dass nur die Probenentnahme am Testmedium durch die zu untersuchende Person ausgeführt werden muss. Nach dem Einlegen des Mikroporenfilters in den papierbasierten Schnelltest kann die folgende Analyse vollständig automatisiert und damit Anwenderfehler minimiert werden. Die Nachweisgrenze für dieses System konnte für eine Pathogendichte von 10^5 Zellen mit einem gut ablesbaren Resultat bestätigt werden. Mit Hilfe von höher sensitiven Nachweisreaktionen (beispielsweise Silberstaining) wird die Nachweisgrenze noch weiter verringert werden können.

Im weiteren Verlauf dieses Kapitels 4.3 wurde die in Kapitel 4.1 verwendete, autokatalytische Jodat-Arsenit Reaktion als sensitives Verstärkersystem mit einem pH-responsiven Hydrogel kombiniert, um notwendige Reaktionsschritte des in Kapitel 4.3.1 vorgestellten Hydrogel gesteuerten Mikroorganismenschnelltest in die Hydrogelmatrix zu integrieren. Die Idee war, dass der nachzuweisende Organismus im Anwendungsfall spezifisch an das Hydrogel bindet und der verstärkte Farbnachweis in unmittelbarer Nähe des Kontaktes stattfindet. Hierzu wurden die aus Abbildung 4.1 b) in Kapitel 4.1.1 gewonnenen Erkenntnisse bzgl. der Protonenkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Arsenit-Jodat-Reaktion genutzt, um den Farbnachweis über das gesamte Hydrogel auszubreiten. Hierzu wurde ein Stoffgemisch aus arseniger Säure und Kaliumjodat in eine Agaroseschicht eingebettet. Die in Kapitel 2.3.3 Abschnitt 4.2.5 erarbeiteten Ergebnisse wurden genutzt, um das Kaliumjodid als Reaktionsstarter im pH-responsiven Hydrogel zu speichern. Im Anschluss wurde das Hydrogel mit der erregbaren Agaroseschicht verbunden (Abbildung 4.38). Aufgrund der noch nicht verfügbaren spezifischen Pathogenbindungsmöglichkeit wurde in diesem Fall der Hydrogelkollaps mit Hilfe von einem 0.5µl Salzsäuredroplet der Konzentration 1mol/l ausgelöst (Abbildung 4.37).

Es konnte in Abbildung 4.39 gezeigt werden, dass das freigesetzte Jodid erfolgreich die Farbreaktion im Agarosegel auslöst. In der Weise, wie sich die Farbreaktion im Agarosegel ausbreitete, folgte der kollabierte Hydrogelbereich nach (Abbildung 4.39 i und j). Somit zeigt dieser Demonstrator, dass die gewählte Kombination von pH-responsiven Hydrogel und Protonen produzierender, autokatalytischer Farbstoffreaktion zu einem verstärkenden Farbnachweissystem kombiniert werden kann. Durch den nachfolgenden Hydrogelkollaps ist garantiert, dass immer eine ausreichende Initiatorkonzentration an das anregbare Medium abgegeben wird und somit eine Ausbreitung des Farbnachweises mit Sicherheit gewährleistet ist.

Weiterhin war ein weitaus dunklerer Bereich um die Stelle auffällig, an der die Farbreaktion ausgelöst wurde (vgl. Abbildung 4.39 h-j). Dieser entwickelte sich im weiteren Verlauf zu einem Ring, der sich jedoch nicht über das gesamte responsive Hydrogel ausbreitete, sondern dicht an der Auslösungsstelle verblieb. Eine erste Vermutung, dass hier Jod-Moleküle aus der Agarose in das kompaktierte Gel diffundierten, kann nicht als Ursache angeführt werden, da sich dieses Phänomen dann in der weiteren Folge im gesamten responsiven Hydrogel hätte zeigen müssen. Somit stellt sich hier die Frage, was in diesem Bereich ein solches Verhalten hervorrufen kann. Der einzige Unterschied gegenüber dem restlichen Hydrogel liegt in der Auslösung der Farbstoffreaktion mit Hilfe von Salzsäure. Somit lässt sich folgern, dass in diesem begrenzten Bereich eine deutlich höhere Konzentration an Protonen vorliegt als die sich später ausbreitende Reaktion hervorruft. Aus den Erkenntnissen aus Kapitel 4.1.1 lässt sich schlussfolgern, dass der Dushman-Prozess der autokatalytischen Clock hier deutlich schneller abläuft als das im weiteren Verlauf der Reaktionsfront erfolgt. Daher wird an dieser Stelle vorerst eine deutlich höhere Jodkonzentration erreicht, als im weiteren Verlauf der Reaktionsfront. Durch den weiter voranschreitenden Roebuck-Prozess wird der örtlich vorhandene Jodüberschuss jedoch im weiteren Verlauf wieder konsumiert, so dass es zu der beobachteten Ringbildung und Verblässung kommt. Aufgrund der starken Kompaktierung bleibt der Bereich jedoch dauerhaft dunkler als im übrigen Bereich des responsiven Hydrogels.

Im letzten Abschnitt dieses Kapitels konnte erfolgreich gezeigt werden, dass ein responsives Hydrogel mit Antikörpern gegen *Escherichia coli* funktionalisiert werden kann. Die Funktionalisierung wurde über eine EDC-NHS Kopplung am NH-Terminus des TriEG-COOtBu-MA Monomers durchgeführt (s. Kapitel 3.4.4). Aufgrund der gemachten Beobachtungen in Abbildung 4.41 wurde gleichzeitig bestätigt, dass die Herstellungsprozedur des funktionalisierten Hydrogels die Bindungsfähigkeit der Antikörper gegen den K99-Pili von *E. coli* nicht beeinträchtigt. Darüber hinaus konnte in Abbildung 4.42 gezeigt werden, dass sich die Bindung zwischen funktionalisiertem Hydrogel und dem Mikroorganismus über Tage hinweg auch gegen Scherkräfte als sehr stabil erweist.

Mit den Resultaten aus den Kapiteln 4.3.3 und 4.3.2 wurden die Voraussetzungen geschaffen, ein Hydrogel basiertes Schnelltestsystem für den Nachweis von Mikroorganismen herzustellen. In nachfolgenden Arbeiten müsste nun das Triethylenglycol-Hydrogel durch Monomere mit ionisierbaren Seitengruppen erweitert werden, so dass eine Startersubstanz nach der erfolgreichen Pathogenbindung an das Farbstoffsystem abgegeben werden kann und damit ein verstärkter Farbnachweis in unmittelbarer Bindungsnähe möglich wird.

Kapitel 5.

Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde im ersten Teil (Kapitel 4.1) das Verhalten der autokatalytischen Jodat-Arsenit-Reaktion im Mikrokanal untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass aufgrund mangelnder Durchmischung durch laminare Flussbedingungen und der eng begrenzten Kanalgeometrie eine zeitlich und örtlich höhere Konzentration der einzelnen Reaktionslösungen gegenüber größeren Reaktionsgefäßen vorliegt. Dieses führt im Ergebnis zu einer deutlichen Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit der autokatalytischen Reaktion gegenüber makroskopischen Volumenmengen mit homogen durchmischten Bedingungen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass für die Anwendung der Arsenit-Jodat-Uhr als Verstärker neben einer ausreichenden Jodid-Starterkonzentration auch die Protonen- und Jodatkonzentration berücksichtigt werden muss, um einen Farbumschlag in angemessenen Zeiträumen zu erhalten. Da mit steigender Protonen- und Jodat-Konzentration jedoch auch die Lagerstabilität der Arsenit-Jodat-Reaktion abnimmt, ist eine Anwendung dieser Reaktion unterhalb einer Schwellwertkonzentration von 1 mmol/l für die Jodid-Lösung eher ungeeignet. Mit der Kombination aus Mikrokanälen und kontrollierter Zuleitung einzelner Reaktionslösungen besteht jedoch durchaus die Möglichkeit, eine Verstärkung in Form einer Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber makroskopischen Reaktionsumgebungen zu erreichen. Durch die lokal hohen Konzentrationen der Reaktionspartner an den Grenzflächen zwischen den einzelnen Reaktionslösungen lassen sich vergleichbar optimale Bedingungen für einen schnellen Reaktionsablauf herstellen, wie sie bereits von katalytisch wirkenden Oberflächen oder Enzymen bekannt sind^[79]. Die für die Mikrofluidik notwendigen sehr geringen Volumenmengen ermöglichen darüber hinaus eine Analysemöglichkeit für sehr kleine Probenvolumina.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte erfolgreich das durch *Martinez et al.* (2007)^[59] eingeführte papierbasierte Kanalsystem durch die Kombination von strukturiertem Papiersubstrat und thermoresponsiven Hydrogelen zu einem neuartigen, steuerbaren Lab-On-Chip (LOC)-System zusammengestellt werden. Hierfür wurden zuerst die kapillargetriebenen Flusseigenschaften in papierbasierten Kanalstrukturen definierter Größe analysiert. Es wurde gezeigt, dass wässrige Flüssigkeiten in Hydrogelen erfolgreich gespeichert und aus diesen mit Hilfe eines Temperaturstimulus bei Bedarf freigesetzt werden können. Mit dieser Methode ist es möglich, Lösungen örtlich gezielt und frisch auf dem Testsystem herzustellen und zu unterschiedlichen Reaktionsfeldern zu transportieren. Dadurch kann in diesem System auf Mikropumpen oder externe Schlauchverbindungen vollständig verzichtet werden. Es wurde außerdem gezeigt, dass durch die Variation der chemischen Zusammensetzung die Freisetzungseigenschaften der Hydrogele bedarfsgerecht angepasst werden können. Aufgrund der wirtschaftlich interessanten Potentiale für die LOC-Anwendung wurde dieses System in Kooperation mit dem Fraunhofer-IAP in Potsdam erfolgreich zum Patent angemeldet^[66].

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde mit Hilfe der erhaltenen Ergebnisse bezüglich Verstärkung durch lokal erhöhte Konzentrationen und der Hydrogel gesteuerten Papierfluidik ein kontrollierba-

res, papierbasiertes *E. coli*-Schnelltestsystem entwickelt und erfolgreich präsentiert. Für die *E. coli*-Identifikation wurde eine analytische Nachweisreaktion mit biomolekularen Markierungsmethoden in das papierbasierte Kanalsystem integriert. Dabei wurde gezeigt, dass die notwendigen Filter- und Reinigungsvorgänge für die unterschiedlichen Reaktionsschritte automatisiert im System durchführbar sind, die vorher auf papierbasierten Systemen gar nicht oder nur durch zusätzliche manuelle Methoden bzw. mit Hilfe von weiterem technischen Equipment, wie beispielsweise Mikroliterpumpen und Schlauchverbindungen, in anderen Gehäusematerialien möglich waren. Die erforderliche Sensitivität des Testsystems wurde einerseits mechanisch durch das Zurückhalten der Zielorganismen auf einem Mikroporenfilter und andererseits chemisch durch eine enzymkatalytische Farbstoffumsetzung von Tetramethylbenzidin (TMB) hergestellt. Für das vorgestellte System lassen sich noch höhere Sensitivitäten erreichen, sofern empfindlichere Redoxsysteme angewendet werden. Darüber hinaus existiert ein weiteres Potential für die Konzentrationsbestimmung durch die Absorptionsbestimmung mit Hilfe von LED- und Photodiodentechnik, bzw. mit den Kamerasystemen der verbreiteten Smartphonetechnik.

Durch die Verwendung von kostengünstigem Material wie Papier bietet die vorgestellte Methode eine gute zukünftige Perspektive für die Anwendung in Form von Einwegtestsystemen. So wird der hier präsentierte *E. coli*-Schnelltest Grundlage für ein geplantes, zukünftiges Trinkwasserschnelltestverfahren darstellen. Darüber hinaus sind weitere Anwendungsfelder für die steuerbare Papierfluidik denkbar. Beispielsweise wird die Entwicklungen der DNA-Vervielfältigung durch die isothermale Polymerase-Kettenreaktion (PCR)^{[39] [46]} einen Weg in die Anwendung von zukünftigen Schnelltestverfahren finden^[15]. Die Möglichkeit die hier vorgestellte neuartige, durch Hydrogele gesteuerte Papierfluidik mit den isothermalen PCR-Methoden zu kombinieren, könnten neue Perspektiven mit hohem Potential eröffnen. Aufgrund der hohen Zuverlässigkeit und Genauigkeit der DNA-Vervielfältigungstechnik ließen sich dadurch auch neue Maßstäbe in der Sensitivität erreichen.

Zum Abschluss der vorliegenden Dissertation wurde eine Methodik vorgestellt, responsive Hydrogele mit spezifischen Biomarkern zu funktionalisieren. Hier ist eine große Bandbreite der Anwendung im Bereich der Bioanalytik vorstellbar. So ist es denkbar Oberflächen mit diesen Polymeren zu versehen, um spezifisch Mikroorganismen in Lösungen oder Gasen nachzuweisen. Ebenso könnten diese Polymere als autonome Fängerpartikel unerwünschte Organismen in Flüssigkeiten binden und anschließend durch Filtrierung besser eliminiert werden. Als Vision könnten diese Polymere als Mikropartikel in Form von Reservoiren auch als Wirkstofflieferanten in Organismen dienen, die spezifisch an Biostrukturen binden und so ihren Inhalt zielgerichtet zustellen würden. Für solche Anwendungsszenarien sind allerdings noch eine Reihe von Untersuchungen bezüglich Biokompatibilität und Funktionssicherheit in Bezug auf das Kompaktierungsverhalten notwendig. Ein hohes Nutzungspotential ist hier aber garantiert.

Kapitel 6.

Nachwort

Warum ich Biologie gewählt habe?

Es ist einerseits die Faszination an den schier unendlichen Strategien und Lösungen, mit denen die Natur die Erschließung von Lebensräumen ermöglicht und andererseits der Drang immer weitere Kapitel in diesem „3D-Lehrbuch“ zu erkunden.

Was ich an der Chemie so mag?

Es gibt für mich kein besseres und vielfältigeres Werkzeug mit dem es sich so herrlich seriös spielen lässt.

Was ich an der Physik so schätze?

Sie ist für mich als Wissenschaftler wie ein grundehrlicher Freund. Sie lässt dich feiern, wenn deine Annahme nach investierten Stunden und Tagen im Experiment Bestätigung findet.

Genauso schonungslos lässt sie dich aber auch wissen, wenn dein Holzweg jeden guten Kontrabass als Resonanzkörper in den Schatten stellt!

Danksagung

Allem voran möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Carsten Beta aus vollem Herzen danken, dass er mich als Promotionsstudent unter seine Fittiche genommen hat. Ich habe es sehr genossen mich in seiner fantastischen Gruppe, auch abseits der projektbezogenen Pfade, in den unterschiedlichsten Bereichen der Mikrofluidik, der „Weichen Materie“ oder der Zellbiologie austoben zu können. In einem äußerst angenehmen, persönlichen, freundschaftlichen und ruhigen Umgang fand ich bei ihm zu jeder Zeit bei Fragen oder Problemen ein offenes Ohr. Gleichzeitig habe ich im Schriftlichen, als auch in Vorträgen ein sehr gutes Rüstzeug in Form seiner stets professionellen und in allen Dingen konstruktiven Kritik bekommen. Ich schätze seinen offenen und teils fragenden Diskussionsstil, der mir immer auch die Schwächen meiner Argumentation aufzeigte und hoffe auch in Zukunft bei ihm als Ratsuchender immer eine offene Tür zu finden.

Meinen beiden Gutachtern Prof. Laschewsky und Prof. Steinbock möchte ich danken, dass sie ihre Zeit in die Bewertung der vorliegenden Arbeit investiert haben. Darüber hinaus schätze ich beide für ihre inspirierenden Vorträge auf Kongressen oder Vortragsreihen. Nach jedem Treffen konnte ich immer mit neuen Ideen ins Labor zurückkehren.

Meinem Mitstreiter Jean-Philippe Couturier möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich für unsere gemeinsame Arbeit an den funktionalisierten Hydrogelen danken. Bei unserer Tätigkeit hatte ich immer das Gefühl, dass ein Zahnrad ins andere greift. Egal wie unwahrscheinlich die Chancen auf Erfolg standen, J.-P. hat es trotzdem probiert, so dass das „Zappeln“ der Bakterien auf der Oberfläche schließlich gelang. Ich wünsche uns sehr, dass wir die Chance bekommen, hier weiter zu machen, um die Potentiale der funktionalisierten Hydrogele weiter offenzulegen.

Obwohl ich an unserem „Lieblingsorganismus“ *Dictyostelium discoideum* gar nicht geforscht habe, so hat das soziale Verhalten dieser Amöbenart doch eindeutig auf unser Arbeitsgruppenverhalten abgefärbt. Wenn *Dictyostelium* einen neuen Nahrungsraum erschließen will, so vereinen sich die einzelnen Amöben auf ein Startsignal hin zu einem einzigen Sporenkörper, um voran zu kommen. Gleiches habe ich immer wieder in unserer Arbeitsgruppe beobachtet. Wann auch immer Komplikationen auftraten, sich Herausforderungen stellten oder ich das Gefühl hatte es geht nicht weiter, so bekam ich aus unserem „Arbeitsgruppenorganismus“ in kürzester Zeit einen Ausweg aufgezeigt. Daher kann ich an dieser Stelle vor euch, liebe Kollegen, nur den Hut ziehen. Das Arbeiten mit euch war und ist motivierend, inspirierend und durchweg von Spaß begleitet. Es gab in meiner ganzen Promotionszeit keinen einzigen Tag, an dem ich nicht gern in die Uni gekommen wäre. Es ist ein gutes Gefühl, Teil in eurem Team zu sein. Meinen ganz herzlichen Dank dafür.

Ich danke im Besonderen meiner „Büro-Cloud“ Kirsten Krüger und Alexander Anielski für die grandiose Zusammenarbeit, das freitägliche Diskutieren und das übrige wissenschaftliche Streiten, so dass Zeit für mich teilweise nicht mehr zu existieren schien. Gerade eure Erfahrung im Labor und im Umgang mit MatLab hat mir manche verlorene Stunde erspart.

Ich danke Marius Hintsche und Dr. Matthias Theves für die tolle, kollegiale Zusammenarbeit in der Mikrostruktur, der Gruppen-Wiki und bei den Bakterienkulturen. Dr. Stephan Katholy danke ich für die Unterstützung bei der Lehre in den Tutorien, Dr. Matthias Gerhardt für den Support am Lasermikroskop und meinem Freund Dr. Markus Rieck für seine Zeit zum Korrekturlesen.

Ich bin dankbar, dass ich unsere Masterstudenten Oliver Nagel, Maria Schwarzl und Carina Schierig ein Stück auf ihrem Weg begleiten durfte. Eure frischen, teils kritischen und unvoreingenommenen Fragen haben mich immer wieder konstruktiv zum Nachdenken angeregt. Darüber hinaus möchte ich allen Danken, die ich unbeabsichtigter Weise vergessen habe und die mich bei meinen Bemühungen unterstützt haben.

Am allermeisten aber gilt mein Dank meiner Familie. Um meinen Wissensdurst trotz zwei Töchtern auch bis spät in die Abende hinein noch zu stillen, war es mehr als hilfreich darauf vertrauen zu können, dass mir hier der Rücken freigehalten wird. Daher bin ich meiner Frau Ariane, meinen Eltern Rolf und Renate Kälberloh und meinen Schwiegereltern Gerhard und Christina Niedl zutiefst dankbar, dass ich jederzeit und in wirklich jeder Situation alle denkbare Unterstützung erhalten habe, wenn sie notwendig war. Ohne eure Hilfe wäre ich mit Sicherheit nicht so weit gekommen.

Vielen lieben Dank!

Abkürzungsverzeichnis

AcAc	Acrylsäure.....	29
AcAm	Acrylamid.....	28
APS	Ammoniumperoxodisulfat.....	28
CAD	Computer-Aided Design.....	23
CSTR	Continuous stirred-tank reactor.....	21
DNA	Desoxiribonukleinsäure.....	4
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	
FDS	Finite-Differenzen-Simulation.....	25
FITC	Fluorescein.....	35
fps	Bilder pro Sekunde.....	38
GOX	Glukoseoxidase.....	74
H₂O dd	Bidestilliertes Wasser	
HRP	Merrettichperoxidase (Horseradish peroxidase).....	79
LCST	Low-Critical-Solution-Temperature	
LOC	Lab-On-Chip.....	i
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop.....	38
MBA	Methylenbisacrylamid.....	27
MEO₂MA	2-(2-Methoxyethoxy)ethyl-methacrylat.....	30
NHS	N-Hydroxysuccinimid	
NIPAM	N-Isopropylacrylamid.....	28
OEGDMA	Oligo(ethylenglycol)dimethylether-methacrylat.....	30
OEGMA	Oligo(ethyleneglycol)methylether-methacrylat.....	30
PBS	Phosphate-Saline-Buffer	
PDMS	Polydimethylsiloxan.....	23
pl	Pikoliter.....	50
PVA	Polyvinylalkohol.....	21
PTFE	Polytetrafluorethylen.....	25
RNA	Ribonukleinsäure.....	4
rpm	Umdrehungen pro Minute.....	42
SU-8 2050	SU-8 2050 Negativ-Fotolack der Firma Microchem Corp.....	23

TEMED	Tetramethylethylendiamin	28
TMB	Tetramethylbenzidin.....	74
TriEG-COOtBu-MA	Triethylenglycol-Carboxytertbutyl-methylether-methacrylat	30
TFA	Trifluoressigsäure	30

Abbildungsverzeichnis

2.1. a) Darstellung der BZ-Reaktion in einer Petrischale (nach <i>Yamaguchi et al.</i> 1991) ^[100] . b) Farbbandendarstellung der Jodat-Arsenit-Reaktion in der Petrischale. Im Gegensatz zur BZ-Reaktion findet der Farbumschlag hier nur einmal statt (nach <i>Hanna et al.</i> 1982 ^[43]).	9
2.2. Darstellung des Raum-Zeit-Musters der Clock-Reaktion der Regime i) bis iii) in der Petrischale. Es ist jeweils die Position der Reaktionsbande oder -front von der Bildmitte nach außen verlaufend (x) zum jeweiligen Zeitpunkt (t) dargestellt. (nach <i>Forštová et al.</i> 2000 ^[33]).	12
2.3. Darstellung des Geschwindigkeitsprofils in Flussrichtung entlang der Kanalbreite x . Die Geschwindigkeitswerte wurden normalisiert. ϵ gibt das Seitenverhältnis des Kanalquerschnitts an (entnommen aus <i>Brody et al.</i> 1996 ^[9]).	14
2.4. Simuliertes Geschwindigkeitsprofil in einem Mikrokanal mit einer Kanalbreite von 650 μm und einer Kanalhöhe von 69 μm . Dieses entspricht einem ϵ von 0,1.	14
2.5. Strukturierungsmöglichkeiten von Papiersubstraten mit Hilfe von fotoaktivem Lack (photoresist) durch Belichten und Entwicklung (1B-C) oder thermisch mit Wachs (1D-E). Innerhalb der Kanalstrukturen lassen sich unterschiedliche Chemikalien vorlagern, die z.B. durch Farbreaktionen Substanzen nachweisen können (2A-F)(aus <i>Martinez et al.</i> 2010 ^[57]).	16
2.6. Acrylamid basiertes Hydrogel nach erfolgreicher Polymerisation, wie es in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. In Abbildung 2) ist ein Phasenübergang eines Hydrogels dargestellt, dass mit Biotin funktionalisiert wurde. Durch Zugabe des Liganden Avidin wird der Phasenübergang in einen anderen Temperaturbereich verschoben (nach <i>Buller et al.</i> 2001 ^[11]).	18
2.7. Darstellung der Zelle des in der Arbeit verwendeten Modellorganismus <i>Escherichia coli</i> . Sichtbar ist der Zellkörper, die Strukturen der Fimbrien (faserige Struktur um den Zellkörper) und die Flagellen (lange Fasern über den Bildrand hinaus). Das Bild wurde mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie erstellt. (Aufnahme von Ang Li, University of Singapore ^[51])	19
3.1. a) Versuchsaufbau für die Zeitmessung der Arsenit-Jodat-Reaktion auf der Mikrotiterplatte. Es wurden jeweils 8 Gefäße simultan mit einer Mehrfachpipette ausgelöst. b) Versuchsaufbau zur Zeitmessung auf dem Laborschüttler, um verschiedene Mischungszustände zu erzeugen. Die Mikrotiterplatte wurde hierbei in den Schüttelhalter eingesetzt.	22
3.2. Schematische Darstellung des Mikrokanals mit den Kanalmaßen. Alle drei Inletkanäle hatten die gleichen Dimensionen. Die drei Inletkanalbreiten ergaben zusammen die Messkanalbreite, so dass die Flussgeschwindigkeit im Kanal konstant blieb.	24
3.3. a) Darstellung des Stanzvorganges um eine Zuführung zu den Kanalinslets zu schaffen. b) Durch einstecken von PTFE-Schläuchen in die ausgestanzten Kanalzugänge wurde eine dichte Anschlussverbindung zu den Mikroliterspritzen hergestellt.	25

3.4.	3D-Darstellung eines Konzentrationsfeldes für Jod nach $9 \cdot 10^7$ Iterationen. Die Feldbreite beträgt 80 Gitterpunkte, die Feldlänge 100 Gitterpunkte. Für die Darstellung wurden die einzelnen Konzentrationswerte auf der z-Achse in mol/l aufgetragen. . . .	26
3.5.	a) Darstellung des Geschwindigkeitsfeldes nach erfolgter Iteration bei der Finite-Differenzen-Simulation. Die Farbskala gibt die Flussgeschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ innerhalb des Kanalfeldes an. Die Flussrichtung verläuft von links nach rechts. b) Darstellung der Flussgeschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ über die Breite des simulierten Kanalfeldes. . .	27
3.6.	Strukturformeln der Monomereinheiten von Acrylamid (a), N-Isopropylacrylamid (b) und dem Vernetzermolekül Methylenbisacrylamid (c)	27
3.7.	Strukturformeldarstellung der Acrylsäure a) und des NIPAM-Acrylsäure Copolymers b).	29
3.8.	Strukturformeln der verwendeten Monomere von MEO ₂ MA, OEGMA, OEGDMA und TriEG-COOtBu-MA.	30
3.9.	Reaktionsgleichung zur Herstellung des funktionalisierten Triglycol-Hydrogels. Nach Entschützen der Carboxylgruppe im ersten Reaktionsschritt kann an dieser der NH-Terminus des Antikörpers über EDC-NHS-Kopplung im zweiten Reaktionsschritt kovalent gebunden werden.	31
3.10.	Peltier-Heizaufbau für den temperaturinduzierten Hydrogelkollaps. a) Aufsicht auf den Heiztisch mit der Heizzone zwischen den Befestigungsschrauben. Das Kabel an der linken Befestigungsschraube ist die Zuleitung zum Thermosensor. b) Seitenansicht des selben Tisches. Sichtbar sind die zwei mittleren Befestigungsschrauben und das unter dem Tisch installierte Peltierelement inklusive der Lüftereinheit um Temperaturbereiche bis 90°C zu erreichen.	33
3.11.	a) Maskenausschnitt vom Mikrokanaldesign des geraden Mikrofluidikkanals. Die kreisrunden Strukturen stellen die Inlet- und Outletbereiche des Mikrochips dar, in die die PTFE-Schlauchverbindung gestochen werden. b) Darstellung eines Mikrochips mit PTFE-Schläuchen.	35
3.12.	Darstellung des experimentellen Aufbaus aus der Harvard Spritzenpumpe mit Kamm-aufsatz (links vorn) und dem angeschlossenen Kanal auf dem Mikroskoptisch (rechts)	36
3.13.	Mikrokanalaufnahme zum Mischungsverhalten von in Wasser gelöstem Fluoreszenzfarbstoff FITC (1mM). Die Farbstofflösung wurde durch den mittleren Kanal in den Messkanal gepumpt. Durch die Zuleitungskanäle oben und unten wurde jeweils bidestilliertes Wasser zugeführt. Die mit einem senkrechten Strich markierte Stelle zeigt den Ort für die Erstellung des Helligkeitsprofils im Kanalquerschnitt. Die Flussrichtung verläuft von links nach rechts.	37
4.1.	a) Reaktionszeit bis zum Farbumschlag der Arsenit-Iodat Reaktion im Mikrotiterplatten-Well bei unterschiedlichen Startkonzentrationen. b) Clock-Reaktion mit Farbumschlag in der Mikrotiterplatte.	40

4.2.	a) Reaktionszeit bis zum Farbumschlag der gepufferten Arsenit-Iodat Reaktion bei unterschiedlichen pH-Werten in doppelt logarithmischer Darstellung. b) Verhalten der Arsenit-Iodat Reaktion im Mikrotiterplatten-Well bei unterschiedlichen Arsenit-Konzentrationen in doppelt logarithmischer Darstellung.	41
4.3.	a) Darstellung der Reaktionszeit der Arsenit-Jodat Reaktion im Mikrotiterplatten-Well ohne und mit Agarose. b) Darstellung Reaktionszeit der Arsenit-Jodat Reaktion auf der Mikrotiterplatte bei unterschiedlichen Schüttelzeiten auf dem Laborschüttler. Die Pipettenmix Zeitdarstellung entspricht einem sehr gut gemischten Zustand durch mehrmaliges auf und nieder Pipettieren im Mikrotiterplatten-Gefäß.	42
4.4.	Verhalten der Arsenit-Iodat Reaktion im Mikrotiterplatten-Well bei unterschiedlichen Schüttelgeschwindigkeiten. Einfluss der Schüttelzeit auf den Farbumschlag. . . .	42
4.5.	Abbildung a) zeigt eine schematische Darstellung des linearen Mikrokanals. Über die Inlets A-C wurden die Reaktionslösungen zugeführt. Der Abstand zur Farbumschlagsbande, wie sie in Abbildung b) dargestellt ist, wurde von der Referenzlinie entlang der Mittellinie gemessen. Anhand der eingestellten Flussgeschwindigkeit und des ermittelten Abstandes wurde die Reaktionszeit bestimmt.	43
4.6.	Vergleich der Farbumschlagszeit der Clockreaktion zwischen Mikrokanal und Mikrotiterplatte.	44
4.7.	Vergleich der Farbumschlagszeit der Clockreaktion bei steigender Flussgeschwindigkeit im Vergleich mit der Farbumschlagszeit im Mikrotiter-Well.	45
4.8.	a) Schematische Darstellung des Mikrokanals mit Hindernissen. Über die Inlets A-C wurden die Reaktionslösungen zugeführt. Die Durchlässe in den Hindernisstrukturen entsprechen der halben Kanalbreite ($332\pm 1\ \mu\text{m}$). Der Abstand zur Farbumschlagsbande, wie sie in der Realansicht in Abbildung b) dargestellt ist, wurde von der Referenzlinie entlang der Mittellinie gemessen.	45
4.9.	a) Farbumschlagszeiten der Clockreaktion auf der Mikrotiterplatte, im linearen Mikrokanal und im Mikrokanal mit quadratischen Hindernissen. b) Farbumschlagzeiten der Clockreaktion auf der Mikrotiterplatte, im linearen Mikrokanal und mit wandartigen Hindernissen.	46
4.10.	Fluoreszenzdiffusion im linearen Mikrokanal bei konstanten Flussbedingungen mit und ohne integrierte Strukturhindernisse. Die angegebenen Volumendurchsatzrate beziehen sich jeweils auf die Inlet-Kanäle. Im Messkanal liegt daher jeweils der dreifache Volumendurchsatz vor, bei dreifachem Kanalquerschnitt. Der Messkanal besitzt eine Kanalbreite von $650\mu\text{m}$ bei einer Kanalhöhe von $69\mu\text{m}$, die Inletkanäle hingegen weisen eine Kanalbreite von $221,5\mu\text{m}$ auf.	47

- 4.11. Helligkeitsprofile im Mikrokanalquerschnitt der in Abbildung 4.10 gezeigten Fluoreszenzaufnahmen im linearen Mikrokanal. Es wurde jeweils an den in Abbildung 4.10 durch Pfeile angezeigten Stellen entlang der Kanalbreite im Programm ImageJ das Helligkeitsprofil erstellt.
Abbildung a) zeigt das Helligkeitsprofil im Linearkanal ohne Hindernisse entlang der Kanalbreite bei den in Abbildung 4.10 dargestellten Flussgeschwindigkeiten. Der Helligkeitsverlauf bei einer Flussgeschwindigkeit von $1,0 \mu\text{l}/\text{min}$ überschreitet an der Kanalposition zwischen 250 und $350 \mu\text{m}$ den messbaren Bereich. Aus diesem Grund ist der Graph hier an der Messgrenze gestrichelt dargestellt. Abbildung b) zeigt den Helligkeitsverlauf des Mikrokanals mit säulenartigen Hindernisstrukturen, Abbildung c) das Profil des Kanals mit wandartigen Strukturen. Abbildung d) zeigt im Vergleich das Helligkeitsprofil aller drei dargestellten Kanalarten bei einer identischen Flussgeschwindigkeit von $0,1 \mu\text{l}/\text{min}$ 49
- 4.12. Abbildung a) zeigt einen Mikrofluidikkanal wie er sich im Realexperiment darstellt. Die einzelnen Lösungen sind aufgrund ihrer Transparenz nicht voneinander zu unterscheiden. Aus diesem Grund wurde eine Simulation durchgeführt, in der eine $80\mu\text{m}$ breite und $100\mu\text{m}$ lange Kanalgeometrie als Datenfeldgrundlage gewählt wurde. Abbildungen b) bis d) zeigen die Datenfelder, die den einzelnen Konzentrationen zugeordnet wurden. Die Flussrichtung verläuft von links nach rechts. Dargestellt sind die Startbedingungen der einzelnen Lösungszuflüsse Kaliumjodat 1M (b), Kaliumjodid 0.1M (c) und arsenige Säure 0.0486M (d). Die Zuflüsse blieben über den gesamten Simulationszeitraum konstant. 51
- 4.13. MatLab-Simulation des Konzentrationsverhaltens der zugeführten Reaktionslösungen von arseniger Säure und Kaliumjodat für die Jodat-Arsenit-Reaktion im linearen Mikrokanal bis zum Zeitpunkt $t=0,699\text{s}$. Die Simulation berücksichtigt hierbei bereits die getrennte Zuführung der Lösungen im jeweils einem eigenen Inletkanal. Die Kanallänge wurde für die Simulation auf $100 \mu\text{m}$ (unterer Bildrand) und die Kanalbreite auf $80 \mu\text{m}$ (Skala jeweils linker Bildrand) festgelegt. Die Flussrichtung verläuft von links nach rechts. Die Konzentration ist über die rechtsseitige Farbskala in mol/l angegeben. Die Flussgeschwindigkeit beträgt in der Simulation $130 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$ 52
- 4.14. MatLab-Simulation des Konzentrationsverhaltens des Kaliumjodids im linearen Mikrokanal. Die Abbildungen a) bis c) auf der linken Seite zeigen den Konzentrationsverlauf in Farbdarstellung im Mikrokanal. Die Kanallänge wurde für die Simulation auf $100 \mu\text{m}$ (unterer Bildrand) und die Kanalbreite auf $80 \mu\text{m}$ (Skala jeweils linker Bildrand) festgelegt. Die Flussrichtung verläuft von links nach rechts. Die Konzentration ist über die rechtsseitige Farbskala in mol/l angegeben. Die Flussgeschwindigkeit beträgt in der Simulation $130 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$. Auf der rechten Seite ist der Konzentrationsverlauf entlang der Kanallänge an den in der Farbdarstellung a) gekennzeichneten Kanalbreiten $20\mu\text{m}$ (rot), $40\mu\text{m}$ (blau) und $60\mu\text{m}$ (schwarz) dargestellt. Die Abzissenachse gibt die Kanallänge in μm , die Ordinatenachse in logarithmischer Darstellung die Konzentration in mol/l an. 54

- 4.15. MatLab-Simulation des Konzentrationsverhaltens von Kaliumjodid im Zustand nach $t=0,699s$ und $t=0,912s$ entlang der Kanallänge an der Stelle Kanalbreite= $20\mu m$. Aufgetragen ist die Kanallänge gegen die Kaliumjodidkonzentration in semilogarithmischer Darstellung. An den gekennzeichneten Stellen steigt die Jodidkonzentration lokal an. 55
- 4.16. MatLab-Simulation des Konzentrationsverhaltens des Reaktionsproduktes Jod vom Startzeitpunkt bis zum Zustand $t=0.099s$. Die Abbildungen a) bis c) auf der linken Seite zeigen den Konzentrationsverlauf in Farbdarstellung im Mikrokanal. Die Kanallänge wurde für die Simulation auf $100\mu m$ (unterer Bildrand) und die Kanalbreite auf $80\mu m$ (Skala jeweils linker Bildrand) festgelegt. Die Flussrichtung verläuft von links nach rechts. Die Konzentration ist über die Farbskala im dekadischen Logarithmus von $\frac{c}{mol/l}$ angegeben. Die Flussgeschwindigkeit beträgt in der Simulation $130\frac{\mu m}{s}$. Auf der rechten Seite ist der Konzentrationsverlauf entlang der Kanallänge an den in der Farbdarstellung a) gekennzeichneten Kanalbreiten $20\mu m$ (rot), $40\mu m$ (blau) und $60\mu m$ (schwarz) dargestellt. Die Abzissenachse gibt die Kanallänge in μm , die Ordinatenachse in logarithmischer Darstellung die Konzentration in mol/l an. 56
- 4.17. MatLab-Simulation des Konzentrationsverhaltens des Reaktionsproduktes Jod vom Zustand $t=0.199s$ bis zum Zustand $t=0.699s$. Die Abbildungen a) bis c) auf der linken Seite zeigen den Konzentrationsverlauf in Farbdarstellung im Mikrokanal. Die Kanallänge wurde für die Simulation auf $100\mu m$ (unterer Bildrand) und die Kanalbreite auf $80\mu m$ (Skala jeweils linker Bildrand) festgelegt. Die Flussrichtung verläuft von links nach rechts. Die Konzentration ist über die Farbskala im dekadischen Logarithmus von $\frac{c}{mol/l}$ angegeben. Die Flussgeschwindigkeit beträgt in der Simulation $130\frac{\mu m}{s}$. Auf der rechten Seite ist der Konzentrationsverlauf entlang der Kanallänge an den in der Farbdarstellung a) gekennzeichneten Kanalbreiten $20\mu m$ (rot), $40\mu m$ (blau) und $60\mu m$ (schwarz) dargestellt. Die Abzissenachse gibt die Kanallänge in μm , die Ordinatenachse in logarithmischer Darstellung die Konzentration in mol/l an. 57
- 4.18. MatLab-Simulation des Konzentrationsverhaltens des Reaktionsproduktes Jod kurz vor Ende der Simulation ($t=0.899s$). Die Abbildung auf der linken Seite zeigt den Konzentrationsverlauf in Farbdarstellung im Mikrokanal. Die Kanallänge wurde für die Simulation auf $100\mu m$ (unterer Bildrand) und die Kanalbreite auf $80\mu m$ (Skala jeweils linker Bildrand) festgelegt. Die Flussrichtung verläuft von links nach rechts. Die Konzentration ist über die Farbskala im dekadischen Logarithmus von $\frac{c}{mol/l}$ angegeben. Die Flussgeschwindigkeit beträgt in der Simulation $130\frac{\mu m}{s}$. Auf der rechten Seite ist der Konzentrationsverlauf entlang der Kanallänge an den in der Farbdarstellung a) gekennzeichneten Kanalbreiten $20\mu m$ (rot), $40\mu m$ (blau) und $60\mu m$ (schwarz) dargestellt. Die Abzissenachse gibt die Kanallänge in μm , die Ordinatenachse in logarithmischer Darstellung die Konzentration in mol/l an. 58

- 4.19. MatLab-Simulation des Konzentrationsverhaltens des Reaktionsproduktes Jod vom Zustand $t=0.049s$ bis zum Zustand $t=0.199s$ bei einer Initiatorkonzentration von $0,05M$ Kaliumjodid. Die Abbildungen auf der linken Seite zeigen den Konzentrationsverlauf in Farbdarstellung im Mikrokanal. Die Kanallänge wurde für die Simulation auf $100\ \mu m$ (unterer Bildrand) und die Kanalbreite auf $80\ \mu m$ (Skala jeweils linker Bildrand) festgelegt. Die Flussrichtung verläuft von links nach rechts. Die Konzentration ist über die Farbskala im dekadischen Logarithmus von $\frac{c}{mol/l}$ angegeben. Die Flussgeschwindigkeit beträgt in der Simulation $130\frac{\mu m}{s}$. Auf der rechten Seite ist der Konzentrationsverlauf entlang der Kanallänge an den Kanalbreiten $20\mu m$ (rot), $40\mu m$ (blau) und $60\mu m$ (schwarz) dargestellt. Die Abzissenachse gibt die Kanallänge in μm , die Ordinatenachse in logarithmischer Darstellung die Konzentration in mol/l an. 59
- 4.20. MatLab-Simulation des Konzentrationsverhaltens des Reaktionsproduktes Jod vom Zustand $t=0.699s$ bis zum Zustand $t=0.899s$ bei einer Initiatorkonzentration von $0,05M$ Kaliumjodid. Die Abbildungen auf der linken Seite zeigen den Konzentrationsverlauf in Farbdarstellung im Mikrokanal. Die Kanallänge wurde für die Simulation auf $100\ \mu m$ (unterer Bildrand) und die Kanalbreite auf $80\ \mu m$ (Skala jeweils linker Bildrand) festgelegt. Die Flussrichtung verläuft von links nach rechts. Die Konzentration ist über die Farbskala im dekadischen Logarithmus von $\frac{c}{mol/l}$ angegeben. Die Flussgeschwindigkeit beträgt in der Simulation $130\frac{\mu m}{s}$. Auf der rechten Seite ist der Konzentrationsverlauf entlang der Kanallänge an den Kanalbreiten $20\mu m$ (rot), $40\mu m$ (blau) und $60\mu m$ (schwarz) dargestellt. Die Abzissenachse gibt die Kanallänge in μm , die Ordinatenachse in logarithmischer Darstellung die Konzentration in mol/l an. 60
- 4.21. MatLab-Simulation des Konzentrationsverhaltens des Reaktionsproduktes Jod beim Zustand $t=0.699s$ bei einer Initiatorkonzentration von $0,005M$ Kaliumjodid. Die Abbildungen auf der linken Seite zeigen den Konzentrationsverlauf in Farbdarstellung im Mikrokanal. Die Kanallänge wurde für die Simulation auf $100\ \mu m$ (unterer Bildrand) und die Kanalbreite auf $80\ \mu m$ (Skala jeweils linker Bildrand) festgelegt. Die Flussrichtung verläuft von links nach rechts. Die Konzentration ist über die Farbskala im dekadischen Logarithmus von $\frac{c}{mol/l}$ angegeben. Die Flussgeschwindigkeit beträgt in der Simulation $130\frac{\mu m}{s}$. Auf der rechten Seite ist der Konzentrationsverlauf entlang der Kanallänge an den Kanalbreiten $20\mu m$ (rot), $40\mu m$ (blau) und $60\mu m$ (schwarz) dargestellt. Die Abzissenachse gibt die Kanallänge in μm , die Ordinatenachse in logarithmischer Darstellung die Konzentration in mol/l an. 61
- 4.22. a) Unterschiedliche Kanalstrukturen, die mit Fotolack und softlithografischen Methoden in das Filterpapier eingebracht wurden. b) vier der hier verwendeten linearen Papierkanäle. In diesem Fall wurde eine rote Farblösung als Kontrastdarstellung auf das runde Reservoirfeld am unteren Bildrand auf die Papierkanäle aufgetragen, die durch die Kapillarkraft in die Kanäle gezogen wurde. 68
- 4.23. Flüssigkeitslaufänge im Papierkanal in Abhängigkeit vom aufgetragenen Volumen. 68

4.24. Darstellung der Flüssigkeitsaufnahmedauer im Verhältnis zum aufgetragenen Lösungsvolumen im Papierkanal. Für die Volumen 20 und 30 Mikroliter wurde das Volumen in jeweils 2 Aliquots von 10, bzw. 15 Mikrolitern auf das Reservoirfeld aufgetragen, da die Größe des Feldes begrenzt war.	69
4.25. a) Heizgerät mit dem die Hydrogelpads in den Probengefäßen erhitzt wurden. b) Versuchsaufbau der linearen Papierkanäle mit den auf den Reservoirfeldern positionierten Hydrogelpads.	70
4.26. a) Temperaturabhängige Flüssigkeitsabgabe der unterschiedlich zusammengesetzten Hydrogele. Der Flüssigkeitsverlust wurde über das Gewicht bestimmt. b) Beispiel eines Hydrogelpads neben einem 1,5ml Eppendorf-Tube.	70
4.27. a) NIPAM-Hydrogelstück auf einem Filterpapier, das auf die Kollapstemperatur erhitzt wird b) und die gespeicherte Tintenlösung an das Filterpapier abgibt. c) Schematischer Aufbau eines Hydrogel-gesteuerten LOC-Systems. d) Kontrollierte Flüssigkeitsaufnahme des Papierkanals in Form des Uni-Potsdam-Logos, nachdem das Hydrogel kollabiert ist.	71
4.28. Temperaturabhängig gesteuerte Laufweite der Flüssigkeit im Papierkanal durch einen Hydrogelkollaps. a) Unterschiedliches Verhalten des NIPAM- und des NIPAM-AcAm-Hydrogels als Flüssigkeitsreservoir auf dem Papierkanal. b) Farbbanden im Papierkanal nach der Flüssigkeitsabgabe bei den angegebenen Temperaturen für NIPAM (oben) und NIPAM-AcAm (unten).	72
4.29. T-förmiges Papierkanalsystem mit trocken vorgelagerten Substanzen in den Bereichen I und II. Durch das aus dem Hydrogel freigesetzte Flüssigkeitsvolumen in Abbildung A(1) wird das bei II befindliche Natriumhydroxid im Kanal gelöst. Der sich einstellende alkalische pH-Wert wird durch die im zweiten Schritt (2) bei 44°C aus dem NIPAM-Hydrogel vollständig freigesetzten Thymolblau-Indikator-Lösung anhand eines blauen Farbumschlages angezeigt (B). Zum Abschluss wird das Restvolumen im NIPAM-AcAm Hydrogel bei 63°C komplett freigesetzt und die Flüssigkeitssäule im Kanal weiter nach oben transportiert. Der pH-Wert der Lösung wird durch die sich bei I lösende Zitronensäure in den neutralen pH-Bereich verschoben, so dass hier der Indikator einen Farbwechsel von blau auf grüngelb anzeigt (3).	73
4.30. Darstellung des papierbasierten Glukosetest-Demonstrator. In den Bereichen I und II in Abbildung A wurden die Enzyme Glukoseoxidase und Merrettichperoxidase trocken vorgelagert. Über eine Pipette wird die Probenlösung manuell aufgebracht (roter Pfeil). Durch einen thermisch induzierten NIPAM-Hydrogelkollaps wird Wasser freigesetzt, so dass die Enzyme gelöst werden (B). Abschließend wird für den Nachweis durch Knicken der auf dem Sensorfeld vorgelagerte Redoxfarbstoff Tetramethylbenzidin mit dem Reaktionsfeld zusammengebracht und zeigt dort einen blauen Farbumschlag (C).	74

- 4.31. Relative Absorption der Inkubationslösung (Urlösung) die in das Hydrogel eingelagert wurde, gegen die durch einen Thermokollaps freigesetzte Lösung (Gellösung). Die angegebene Thymolblaukonzentration entspricht hierbei der Urlösungskonzentration. Die gemessene Absorption der Gellösung kann daher einer Konzentration zugeordnet werden. 75
- 4.32. Farbstoffreaktion von 3,3',5,5'Tetramethylbenzidin (TMB). In Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und dem Enzym Merrettichperoxidase wirkt das TMB als Wasserstoffdonator und wird zum TMB-diimin umgesetzt^[52]. 79
- 4.33. Positionierung des Mikroporenfilters auf dem Positionsfeld A. In der oberen Struktur-lage sind die Positionen 1-3 der Reaktionssubstanzen dargestellt. Auf die Darstellung des Gehäusedeckels wurde aus Übersichtsgründen in dieser Abbildung verzichtet. . . 80
- 4.34. Detaillierte Darstellung des E-coli-Schnelltests in den einzelnen Lagen mit Gehäuse. . 81
- 4.35. Aufsicht auf den Mikroorganismenschnelltest. a) Kanaldesign, b) ein durchgeführter Schnelltest mit positivem *E. coli* Befund und c) mit negativem Befund auf *E. coli*. Die Durchführungszeit für den Schnelltest nach Einlegen des Mikroporenfilters beträgt weniger als 5 Minuten. 81
- 4.36. Farbstoffsystem aus Hydrogel und Arsenit-Jodat-Clock-Reaktion. a) Aufbau in einer schematischen Schnittskizze gezeichnet. In eine Petrischale wurde ein Agarosegel mit der Arsenit-Jodat-Lösung gegossen und geliert. Auf das feste Agarosegel wird das pH-responsive Hydrogel mit dem gespeicherten Kaliumjodid plaziert. In Abbildung b) ist der reale Versuchsaufbau des auslösbaren Farbstoffsystems gezeigt. Auf der Agarosegelschicht befindet sich mittig ein dreieckig ausgeschnittenes Hydrogelpad. . . 83
- 4.37. a) Hydrogelpad an einer Skalpellklinge mit abgegrenzter, kreisrunder Kollapsstelle, wie diese sich nach Zugabe eines Salzsäure-Droplet zeigt. b) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus aus Hydrogel und der Agaroseschicht. Nach dem örtlichen Kollaps des Hydrogels werden Jodid-Ionen an das darunter liegende Agarosegel abgegeben. Hier reagiert das Jodid mit Jodat zu Jod, welches durch die arsenige Säure zu Jodid umgesetzt wird (s. Kapitel 2.2.3). Nach dem vollständigen Verbrauch der arsenigen Säure in der Reaktion bleibt Jod zurück, welches als Farbbande sichtbar wird. Zusätzlich produziert die Reaktion Protonen, so dass der pH-Wert in der Agaroseschicht sinkt. Dieses führt zu einem Kollaps des darüber liegenden Hydrogels. Aus diesem Grund breiten sich radial vom Reaktionsstartpunkt eine Farbbande und eine Kollapsbande aus. c) Vollständig kollabiertes Hydrogel auf der farbigen Agaroseschicht. 83
- 4.38. Momentaufnahme eines frisch ausgelösten autokatalytischen Farbstoffsystems. Die gelbe Bandenfront zeigt den Farbumschlag in der Agaroseschicht an der Grenze zum Hydrogel. Diese stellt auch gleichzeitig die Kollapsgrenze des pH-responsiven Hydrogels dar. Sehr verlangsamt zeigt sich dahinter eine zweite orange-rote Farbbande im Hydrogel, die im weiteren Verlauf einen Ring bildet. 84

- 4.39. Versuchsergebnis des auslösbaren Farbstoffsystems aus dem Hydrogel und der Arsenit-Jodat-Clock-Reaktion. Abbildung a) zeigt die Ausgangssituation. Nachdem der Säure-Droplet mit einer Mikropipette in der Mitte des Hydrogels platziert wurde (b) vergehen ca. 30s, bis sich ein Farbumschlag zeigt (e). Innerhalb von 240s breitet sich die Reaktionsfront im anregbaren Agarosemedium bis über das Hydrogel hinaus aus. Eine zweite sehr dunklere Farbbande zeigt sich im Hydrogel folgend (g-j). In den Abbildungen i) und j) sind Flüssigkeitsabsonderungen innerhalb der ersten Farbbande auf dem Hydrogel erkennbar. 85
- 4.40. a) Tunnelartige Struktur am Rand des nicht mit Antikörpern funktionalisierten Triglykol-Hydrogels. Durch diese Struktur können die E.-coli-Bakterien im Suspensionsmedium hindurch schwimmen. b) Markierung am Übergang zwischen Gel und Zellsuspension. Anhand eines markierten Bakteriums ist erkennbar, dass es sich in Abbildung a) an einer Engstelle vorbei durch den Tunnel bewegt. Dabei begegnet es auch einzelnen Individuen wie in Abbildung c) dargestellt und berührt dabei mit dem gesamten Zellkörper die Hydrogeloberfläche. Es kann sich jedoch danach weiter ungehindert weiterbewegen d)-f). In Abbildung f) ist der zurückgelegte Weg markiert. 87
- 4.41. Verhalten der E.-coli-Bakterien an einer mit Antikörpern versehenen Triglykol-Hydrogeloberfläche. Durch die ungleichmäßige Schnittkante des Hydrogels, verursacht durch die Präparation, ergibt sich hier, vergleichbar wie in Abbildung 4.40 bereits beschrieben, eine tunnelartige Struktur entlang der Kante des auf der rechten Bildseite erkennbaren Hydrogels. In den Abbildungen a) bis c) ist ein Bakterium gezeigt, dass mit einem farbigem Pixel markiert wurde. Dieses nähert sich aus der Zellsuspension kommend der Hydrogelkante, trifft in Abbildung d) auf diese auf und wird in Abbildung e) schließlich immobilisiert. Die Position des Bakteriums verändert sich in den Bildern e) und f) nicht mehr. Ebenso zeigt der Vergleich der Bilder a)-f) dass alle Individuen entlang der Hydrogelkante ihre Position aufgrund der Immobilisierung nicht mehr ändern konnten. 88
- 4.42. Gegenüberstellung der Oberflächen eines funktionalisierten a) und eines nicht funktionalisierten Hydrogels b) nach dreitägiger Scherstressbehandlung auf einem Laborschüttler. In der MB-Pufferflüssigkeit sind in beiden Abbildungen links neben der jeweiligen Hydrogelkante *Escherichia coli*-Bakterien erkennbar. Auf der Hydrogeloberfläche jeweils rechts in den Abbildungen sind hingegen deutliche Unterschiede in der Zellkörperbesetzung zu sehen. Das funktionalisierte Hydrogel in Abbildung a) ist dicht besetzt mit Zellkörpern und anderen Partikeln, wohingegen das nicht funktionalisierte Hydrogel aus dem gleichen Material keine Besetzung und nur wenig Verunreinigungen zeigt. Die Helligkeitsunterschiede kommen durch die automatisierte Kontrastwahl im Programm ZEN der Firma Zeiss zustande. 89
- B.1. a) Datenblatt Rotationsgeschwindigkeit vs. Schichthöhe. b) Datenblatt Schichthöhe vs. Belichtungsenergie (entnommen aus dem SU-8 50 Datenblatt der Firma *microresist*). 110

Anhang A.

Chemikalienliste

Chemikalie	Summenformel	CAS-Nr.	Reinheitsgrad	Hersteller
Acrylamid	C_3H_5NO	79-06-1	reinst	Carl-Roth
Acrylsäure	$C_3H_4O_2$	79-10-7	reinst	Carl-Roth
Agarose	$C_{12}H_{18}O_9$	9012-36-6	a.c.s	Applichem
Ammoniumperoxodisulfat	$H_8N_2O_8S_2$	7727-54-0	a.c.s	Prolabo
Arsenige Säure	H_3AsO_3	36465-76-6	–	–
Bariumperoxid	BaO_2	1304-29-6	a.c.s	Sigma-Aldrich
Bidestilliertes Wasser	H_2O	7732-18-5	reinst	–
Dextran 70	$(C_6H_{10}O_5)_n$	9004-54-0	reinst	Carl-Roth
EDTA-Dinatriumsalz	$C_{10}H_{14}Na_2N_2O_8$	60-00-4	a.c.s	Applichem
Entwickler DEV-mr-600	–	–	–	microresist
E-Coli Antikörper	–	–	in Puffer	Abnova
EDC	$C_8H_{17}N_3$	1892-57-5	a.c.s	Merck
Fluoresceinisothiocyanat	$C_{21}H_{11}NO_5S$	27072-45-3	reinst	Merck
Glukose	$C_6H_{12}O_6$	50-99-7	a.c.s	AnalaR Normapur
Glukoseoxidase	–	–	gefriergetrocknet	U.S. Biological
Merretichperoxidase (HRP)	–	–	gefriergetrocknet	Amresco
Dikaliumhydrogenphosphat	K_2HPO_4	7758-11-4	a.c.s	Applichem
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	7778-77-0	a.c.s	Merck
Kaliumjodid	KI	7681-11-0	a.c.s	Carl-Roth
Kaliumjodat	KIO_3	7758-05-6	a.c.s	Carl-Roth
Kochsalz	NaCl	7647-14-5	a.c.s	Sigma Aldrich
LB-Medium	–	–	nach Lennox	Applichem
MEO ₂ MA	–	–	–	IAP-Potsdam
Methylenbisacrylamid	$C_7H_{10}N_2O_2$	110-26-9	für Mikrobiologie	neolab
N-Hydroxysuccinimid	$C_4H_5NO_3$	6066-82-6	a.c.s	Sigma Aldrich
N-Isopropylacrylamid	$(C_6H_{11}NO)_n$	25189-55-3	97 %	Sigma-Aldrich
OEGDMA	–	–	–	IAP-Potsdam
OEGMA	–	–	–	IAP-Potsdam
PDMS	–	–	–	Sylgard
Polyvinylalkohol	$(C_2H_4O)_n$	9002-89-5	98 %	Applichem
Schwefelsäure	H_2SO_4	7664-93-9	a.c.s	Sigma Aldrich
Stärke	$(C_6H_{10}O_5)_n$	9005-25-8	reinst	neolab
SU-8 Photoresist	–	–	–	microresist
Tetramethylbenzidine	$C_{16}H_{20}N_2$	54827-17-7	a.c.s	Applichem
Thymolblauatriumsalz	$C_{27}H_{29}NaO_5S$	62625-21-2	a.c.s	AlfaAesar

Anhang B.

Protokoll zur Waferherstellung

Eine runde polierte Siliziumscheibe wurde auf einer Heizplatte bei 200°C für eine Stunde erhitzt, um sämtliche Lösungsmittelbestandteile zu entfernen. Anschließend wurde die Scheibe langsam auf 65°C abgekühlt um Spannungen im Material zu vermeiden. Danach wurde der Wafer auf den Vakuumfuß im Spin-Coater der Firma *Laurell* (Model WS-400BX-6NPP/LITE gesetzt) und über Vakuumtechnik festgehalten. Eine ausreichende Menge an SU-8 Fotolack wird über eine Einmalpipette auf den Wafer gegeben. Für die hier verwendeten Masterwafer wird mit den Fotolacken SU-8 2100, SU-8 2050 und SU-8 2010 gearbeitet. Die verwendeten Mengen richten sich nach der gewünschten Höhe der späteren Struktur. Menge und notwendige Umdrehungsgeschwindigkeit wurden aus dem zugehörigen Materialdatenblatt der Firma *microresist* entnommen, wie in Abbildung B.1 dargestellt.

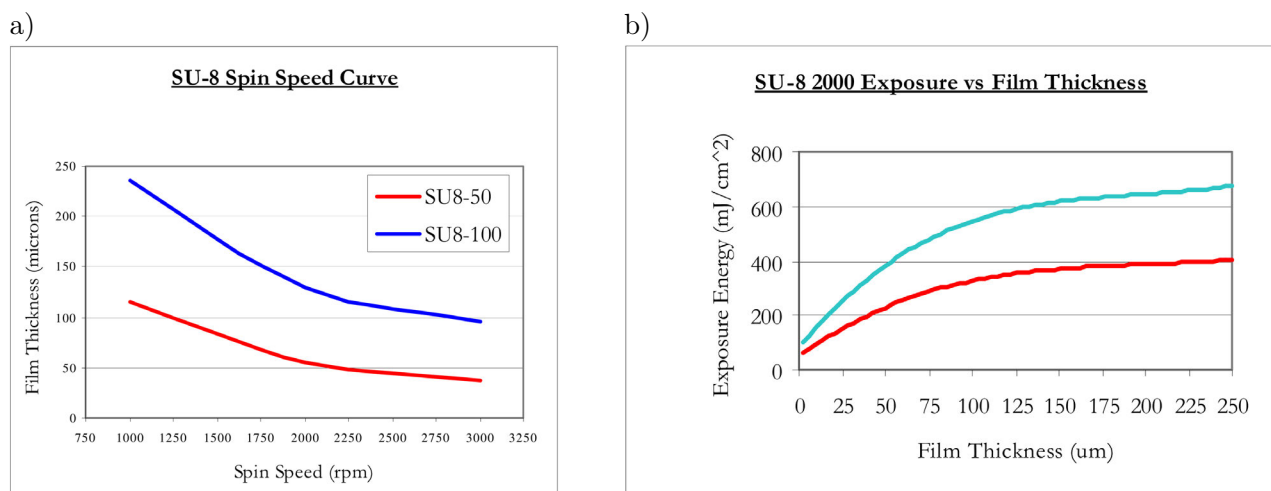


Abb. B.1.: a) Datenblatt Rotationsgeschwindigkeit vs. Schichthöhe. b) Datenblatt Schichthöhe vs. Belichtungsenergie (entnommen aus dem SU-8 50 Datenblatt der Firma *microresist*).

Der Spin-Coater ist so programmiert, dass vor der eigentlichen Endgeschwindigkeit immer eine Umdrehungsgeschwindigkeit von 500 U/min für 15 Sekunden vorgeschaltet ist, so dass der Fotolack bereits auf dem Wafer verteilt wird. Im Anschluss wird die abgelesene Rotationsgeschwindigkeit für 40s gehalten und der Photolack so auf seine Sollhöhe verteilt. Direkt im Anschluss an den Beschichtungsvorgang wird das Vakuum gelöst und der Fotolack entspannt weitere 5 Minuten im Spin-Coater. Danach wird der frisch beschichtete Wafer vorsichtig auf der Heizplatte erst 5 Minuten bei 65°C und anschließend 15 Minuten bei 95°C vorgebacken (Prebake-Phase). Nach diesem Prozess wird der Wafer auf den Belichtungshalter positioniert, die Fotomaske mit der Struktur auf der Beschichtung aufgebracht und der Lack an den späteren Strukturstellen bei einer Wellenlänge von 365nm belichtet. Die Lichtenergie wird entsprechend dem Datenblatt der in Abbildung B.1b) dargestellten Kurve abgelesen und eingestellt, nachdem vorher die Lampenintensität mit einem In-

tensitätsmessgerät (PM 100 D *Thorlabs*) bestimmt wurde. Im Anschluss an den Belichtungsprozess wird der Wafer von der Fotomaske befreit und auf der Heizplatte mit einem Temperaturrampenprogramm 30 Minuten hart gebacken (Postbake-Phase). Hierfür durchläuft die Heizplatte einen Temperaturbereich von 65°C bis 85°C aufwärts und abwärts jeweils mit einem Intervallschritt von $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Nach Abschluss der Postbake-Phase ist die vernetzte Struktur bereits erkennbar. Der Wafer wird anschließend in DEV-600mr Entwicklerlösung entwickelt, bis nur noch die belichtete Struktur auf der Waferoberfläche zurückbleibt. Abschließend wird der Wafer mit 2-Propanol gewaschen und sämtliche Lösemittelrückstände bei 95°C auf der Heizplatte für eine Stunde durch Aufheizen entfernt.

Anhang C.

MatLab-Quellcode

```
function Diffusion_mit_Reaktion

%Diffusionsmatrix
clear;
clc;
%*****
%Wertvorgaben:
LV1=1;
ZV1=1;
dt=1; %Zeitschritt
dx=1; %Gitterzelle
vm=130;% $\mu\text{m/s}$  mittlere Flussgeschwindigkeit

%*****
%Diffusionskoeffizienten in  $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ 

DAs=1.11e3; %Diff-koeff-H3AsO3
DIO3=1.0e3;%Diff-koeff-IO3
DI=2.05e3;%Diff-koeff-Iodid
DIod=1.36e3;%Diff-koeff-Iod
DHOI=1.08e3;%Diff-koeff-Zwischenprodukt
DI3=1.1e3;
DI2O2=1.08e3; %Wie HOI angenommen
DHIO2=1.08e3; %Wie HOI angenommen

%*****
%Werte für die Reaktionskinetik

% Konzentrationen in mol/l
cAs=0.0486;
cIO3=0.1;
cI=0.05;
cH=1e-4;

% Geschwindigkeitskonstanten fuer die Reaktion
k1=4.0e9;
k2=4.5e-2;
```

```

k3=1.0e3;
k4=1.433e-3;
k5=1.0e10;
k6=3.1e12;
k7=8.0e9;

%*****
%Kanal erstellen für die Konzentrationsberechnung:
m=80; %Gitterpunkte
n=100; %Gitterpunkte

%*****
%Geschwindigkeitsprofil:
vx=ones(m,n);

vx=vfeld(m,40,n)*vm;

%Bildansicht Flussfeld
figure(1)
imagesc(vx); axis image xy

%*****
%Reaktionskinetik

%Simulationsfelder
IO=zeros(m,n); %Raumgitter
I=zeros(m,n); %I(1:54,1:n)=cI; % Inducerfläche
As=zeros(m,n); %Arsenige Säure
Iod=zeros(m,n); %Iod
HOI=zeros(m,n); %HIO Zwischenprodukt
I3=zeros(m,n); %I3 Absorptionsprodukt
I2O2=zeros(m,n); %I2O2 Zwischenprodukt
HIO2=zeros(m,n); %HIO2 Zwischenprodukt

t_react=0;
%load(['Simulation0600.mat']); ZV1=ZV1; %Ladefunktion für
%aufeinanderfolgende Simulationszyklen

Dt=1e-8; %Zeitschrittvorgabe
dt=Dt;
for ZV1=ZV1:65000000 %ZV1 gleich Zahlvariable

```

```

t_react=t_react+dt;

%Randbedingungen/Lösungszuführung:
IO(1,:)=IO(2,:); IO(m,:)=IO(m-1,:); IO(:,1)=IO(:,2); IO(:,n)=IO(:,n-1);
IO(1:80,1:3)=cIO3;

I(1,:)=I(2,:); I(m,:)=I(m-1,:); I(:,1)=I(:,2); I(:,n)=I(:,n-1);
I(1:80,1:3)=cI;

As(1,:)=As(2,:); As(m,:)=As(m-1,:); As(:,1)=As(:,2); As(:,n)=As(:,n-1);
As(1:80,1:3)=cAs;

Iod(1,:)=Iod(2,:); Iod(m,:)=Iod(m-1,:); Iod(:,1)=Iod(:,2);
Iod(:,n)=Iod(:,n-1);

HOI(1,:)=HOI(2,:); HOI(m,:)=HOI(m-1,:); HOI(:,1)=HOI(:,2);
HOI(:,n)=HOI(:,n-1);

I3(1,:)=I3(2,:); I3(m,:)=I3(m-1,:); I3(:,1)=I3(:,2); I3(:,n)=I3(:,n-1);

I2O2(1,:)=I2O2(2,:); I2O2(m,:)=I2O2(m-1,:); I2O2(:,1)=I2O2(:,2);
I2O2(:,n)=I2O2(:,n-1);

HIO2(1,:)=HIO2(2,:); HIO2(m,:)=HIO2(m-1,:); HIO2(:,1)=HIO2(:,2);
HIO2(:,n)=HIO2(:,n-1);
%*****

%Advektionsschritt

dxIO=conv2(IO,[1 0 -1]/2,'same');
dxI=conv2(I,[1 0 -1]/2,'same');
dxAs=conv2(As,[1 0 -1]/2,'same');
dxIod=conv2(Iod,[1 0 -1]/2,'same');
dxHOI=conv2(HOI,[1 0 -1]/2,'same');
dxI3=conv2(I3,[1 0 -1]/2,'same');
dxI2O2=conv2(I2O2,[1 0 -1]/2,'same');
dxHIO2=conv2(HIO2,[1 0 -1]/2,'same');

%*****
%Reaktionsgleichungen

I=I + dt*((DI*lap(I,dx)-vx.*dxI/dx)-(k1*IO.*I.*cH^2)-(k3*I2O2.*I.*cH)

```

```

-(k5*I.*HIO2.*cH)-(k6*I.*HOI.*cH)-(k4*I.*Iod)+(k7*As.*HOI));

As=As + dt*((DAs*lap(As,dx)-vx.*dAs/dx)-(k7*As.*HOI));

HOI=HOI +dt*((DHOI*lap(HOI,dx)-vx.*dHOI/dx)-(k6*I.*HOI.*cH)
-(k7*As.*HOI)+(k2*I2O2)+3*(k3*I2O2.*I.*cH)+2*(k5*I.*HIO2.*cH));
%Zwischenprodukt

Iod=Iod + dt*((DIod*lap(Iod,dx)-vx.*dIod/dx)-(k4*I.*Iod)
+(k6*I.*HOI.*cH));

IO=IO + dt*((DIO3*lap(IO,dx)-vx.*dIO/dx)-(k1*IO.*I.*cH^2));

I3=I3 + dt*((DI3*lap(I3,dx)-vx.*dI3/dx)+(k4*I.*Iod));

I2O2=I2O2 + dt*((DI2O2*lap(I2O2,dx)-vx.*dI2O2/dx)-(k2*I2O2)
-(k3*I2O2.*I.*cH)+(k1*IO.*I.*cH^2));

HIO2=HIO2 + dt*((DHIO2*lap(HIO2,dx)-vx.*dHIO2/dx)-(k5*I.*HIO2.*cH)
+(k2*I2O2));

% keine negativen Werte zulassen

IO(find(IO<0))=0;
I(find(I<0))=0;
As(find(As<0))=0;
Iod(find(Iod<0))=0;
I3(find(I3<0))=0;
I3(find(isnan(I3)))=0;
I3=I3.*isfinite(I.*Iod);
I2O2(find(I2O2<0))=0;
HIO2(find(HIO2<0))=0;
HOI(find(HOI<0))=0;

%Bilddausgaben mit Speichermöglichkeit

if mod(zv1,100000)==1

    fprintf('t = % 12.5f s\n',t_react);
    save(['Simulation' num2str(int16(LV1),'%04d') '.mat'])

    h2=figure(2);

```

```
imagesc(IO); colormap(jet); colorbar; axis image
title('Iodat');
drawnow;
%saveas(h2,['FIG_C' num2str(int16(LV1),'%04d') '.png']);
% will create FIG1, FIG2,...

h3=figure(3);
imagesc(I); colormap(jet); colorbar; axis image
caxis([0 0.15])
%saveas(h3,['FIG_I' num2str(int16(LV1),'%04d') '.png']);
title('Iodid');
drawnow;

h4=figure(4);
imagesc(As); colormap(jet); colorbar; axis image
caxis([0 0.05])
%saveas(h4,['FIG_As' num2str(int16(LV1),'%04d') '.png']);
title('Arsenit');
drawnow;

h5=figure(5);
imagesc(Iod); colormap(jet); colorbar; axis image
%caxis([0 0.001])
%saveas(h5,['FIG_Iod' num2str(int16(LV1),'%04d') '.png']);
title('Iod');
drawnow;

h6=figure(6);
imagesc(I3); colormap(jet); colorbar; axis image
%caxis([0 0.001])
%saveas(h5,['FIG_Iod' num2str(int16(LV1),'%04d') '.png']);
title('Triodid');
drawnow;

h7=figure(7);
imagesc(log(I3)/log(10)); colormap(jet); colorbar; axis image
%caxis([0 0.001])
%saveas(h5,['FIG_Iod' num2str(int16(LV1),'%04d') '.png']);
title('log(Triiodid)');
```

```

    drawnow;

    LV1=LV1+1;

end

    if mod(zv1,10000)==1
    zv1
    end

end

%Funktion zur Geschwindigkeitsberechnung
function vx=vfeld(n1,n2,n)
    %n1=80; n2=40;
    F=zeros(n1,n2);

    schritt=0.2; alpha=1;

    for j=1:10000
        F=F+schritt*conv2(F,[0 1 0;1 -4 1; 0 1 0], 'same')+schritt*alpha;
        F([1 end],:)=0; % Zeile 1 und Zeile Ende =0
        F(:, [1 end])=0; %Spalte 1 und Spalte ende =0
    end
    F=F/mean(F(:)); % normierung auf Mittelwert=1

    vx=(mean(F,2));% hier wird die Dimension entlang n2 weggemittelt
    vx=vx/mean(vx);
    vx=vx*ones(1,n);

function Y=lap(X,dx)
    Y=4*del2(X)/dx^2;

```

Literaturverzeichnis

- [1] ABE, K. ; SUZUKI, K. ; CITTERIO, D.: Inkjet-Printed Microfluidic Multianalyte Chemical Sensing Paper. 80 (2008), Nr. 18, S. 6928–6934
- [2] AFRASSIABI, Ali ; HOFFMAN, Allan S. ; CADWELL, Linda A.: Effect of temperature on the release rate of biomolecules from thermally reversible hydrogels. In: *Journal of Membrane Science* 33 (1987), September, Nr. 2, 191–200. [http://dx.doi.org/10.1016/S0376-7388\(00\)80377-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0376-7388(00)80377-4). – DOI 10.1016/S0376-7388(00)80377-4. – ISSN 03767388
- [3] BAE, A. ; BETA, C. ; BODENSCHATZ, E.: Rapid switching of chemical signals in microfluidic devices. In: *Lab on a Chip* (2009), accepted for publication. <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2009/LC/b905521e>
- [4] BARNARD, Frederick .: The germ theory of disease and its relations to hygiene. In: *Public health papers and reports* 1 (1873), 70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2272653/>
- [5] BARRETTE, R. W. ; METWALLY, S. A. ; ROWLAND, J. M. ; XU, L. ; ZAKI, S. R. ; NICHOL, S. T. ; ROLLIN, P. E. ; TOWNER, J. S. ; SHIEH, W.-J. ; BATTEN, B. ; SEALY, T. K. ; CARRILLO, C. ; MORAN, K. E. ; BRACHT, A. J. ; MAYR, G. A. ; SIRIOS-CRUZ, M. ; CATBAGAN, D. P. ; LAUTNER, E. A. ; KSIAZEK, T. G. ; WHITE, W. R. ; MCINTOSH, M. T.: Discovery of Swine as a Host for the Reston ebolavirus. In: *Science* 325 (2009), Nr. 5937, 204–206. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1172705>. – DOI 10.1126/science.1172705. – ISSN 0036–8075, 1095–9203
- [6] BERTANI, G.: STUDIES ON LYSOGENESIS I.: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic Escherichia coli1. In: *Journal of bacteriology* 62 (1951), Nr. 3, 293. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC386127/>
- [7] BHAGAT, Ali Asgar S. ; PAPAUTSKY, Ian: Enhancing particle dispersion in a passive planar micromixer using rectangular obstacles. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 18 (2008), Nr. 8, 085005. <http://dx.doi.org/10.1088/0960-1317/18/8/085005>. – DOI 10.1088/0960-1317/18/8/085005. – ISSN 0960–1317, 1361–6439
- [8] BOISSONADE, J. ; DE KEPPEL, P.: Transitions from bistability to limit cycle oscillations. Theoretical analysis and experimental evidence in an open chemical system. In: *The Journal of Physical Chemistry* 84 (1980), Nr. 5, 501–506. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100442a009>
- [9] BRODY, J.P. ; YAGER, P. ; GOLDSTEIN, R.E. ; AUSTIN, R.H.: Biotechnology at low Reynolds numbers. In: *Biophysical Journal* 71 (1996), Nr. 6, 3430–3441. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79538-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79538-3). – DOI 10.1016/S0006-3495(96)79538-3. – ISSN 00063495

- [10] BUCHHOLZ, Fredric L. ; PESCE, Sandra R. ; POWELL, Cynthia L.: Deswelling stresses and reduced swelling of superabsorbent polymer in composites of fiber and superabsorbent polymers. In: *Journal of Applied Polymer Science* 98 (2005), Nr. 6, 2493–2507. <http://dx.doi.org/10.1002/app.21963>. – DOI 10.1002/app.21963. – ISSN 0021–8995, 1097–4628
- [11] BULLER, Jens ; LASCHEWSKY, André ; LUTZ, Jean-François ; WISCHERHOFF, Erik: Tuning the lower critical solution temperature of thermoresponsive polymers by biospecific recognition. In: *Polymer Chemistry* 2 (2011), Nr. 7, 1486. <http://dx.doi.org/10.1039/c1py00001b>. – DOI 10.1039/c1py00001b. – ISSN 1759–9954, 1759–9962
- [12] BYNUM, W. F.: DEREK S. LINTON. Emil von Behring: Infectious Disease, Immunology, Serum Therapy. (Memoirs of the American Philosophical Society, number 255.) Philadelphia: American Philosophical Society. 2005. Pp. xi, 580. \$65.00. In: *The American Historical Review* 112 (2007), Nr. 2, 605–606. <http://dx.doi.org/10.1086/ahr.112.2.605>. – DOI 10.1086/ahr.112.2.605. – ISSN 0002–8762, 1937–5239
- [13] CASADEVALL, Arturo ; PIROFSKI, Liise-anne: Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. In: *Infection and Immunity* 67 (1999), Nr. 8, 3703–3713. <http://iaia.asm.org/content/67/8/3703.short>
- [14] CASADEVALL, Arturo ; PIROFSKI, Liise-anne: Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. In: *Journal of Infectious Diseases* 184 (2001), Nr. 3, 337–344. <http://jid.oxfordjournals.org/content/184/3/337.short>
- [15] CHANG, Wen-Hsin ; YANG, Sung-Yi ; LIN, Chih-Lin ; WANG, Chih-Hung ; LI, Ping-Chen ; CHEN, Tzong-Yueh ; JAN, Fuh-Jyh ; LEE, Gwo-Bin: Detection of viruses directly from the fresh leaves of a Phalaenopsis orchid using a microfluidic system. In: *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 9 (2013), Nr. 8, 1274–1282. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2013.05.016>. – DOI 10.1016/j.nano.2013.05.016. – ISSN 15499634
- [16] CHIN, C. D. ; LINDER, V. ; SIA, S. K.: Lab-on-a-chip devices for global health: Past studies and future opportunities. In: *Lab Chip* 7 (2007), Nr. 1, 41–57. internal-pdf://chin-et-al-2007-2589549056/chin-et-al-2007.pdf. – ISSN 1473–0197
- [17] CHIN, Curtis D. ; LINDER, Vincent ; SIA, Samuel K.: Lab-on-a-chip devices for global health: Past studies and future opportunities. In: *Lab on a Chip* 7 (2006), Nr. 1, 41–57. <http://dx.doi.org/10.1039/B611455E>. – DOI 10.1039/B611455E. – ISSN 1473–0189
- [18] CUSSLER, E. L.: *Diffusion: mass transfer in fluid systems*. 2nd ed. New York : Cambridge University Press, 1997. – ISBN 0521450780
- [19] DARNELL, James E. ; LODISH, Harvey F. ; BALTIMORE, David: *Molekulare Zellbiologie*. W. de Gruyter, 1994. – ISBN 311011934X 9783110119343

- [20] D’COSTA, V. M.: Sampling the Antibiotic Resistome. In: *Science* 311 (2006), Nr. 5759, 374–377. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1120800>. – DOI 10.1126/science.1120800. – ISSN 0036–8075, 1095–9203
- [21] DEAN-NYSTROM, Evelyn A. ; BOSWORTH, Brad T. ; CRAY, W. C. ; MOON, Harley W.: Pathogenicity of Escherichia coli O157: H7 in the intestines of neonatal calves. In: *Infection and immunity* 65 (1997), Nr. 5, 1842–1848. <http://iai.asm.org/content/65/5/1842.short>
- [22] DEMELLO, Andrew J.: Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems. In: *Nature* 442 (2006), Nr. 7101, 394–402. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05062>. – DOI 10.1038/nature05062. – ISSN 0028–0836, 1476–4687
- [23] DONG, Hua ; LI, Chang-Ming ; ZHANG, Yi-Fan ; CAO, Xiao-Dong ; GAN, Ye: Screen-printed microfluidic device for electrochemical immunoassay. In: *Lab on a Chip* 7 (2007), Nr. 12, 1752. <http://dx.doi.org/10.1039/b712394a>. – DOI 10.1039/b712394a. – ISSN 1473–0197, 1473–0189
- [24] DREWS, Gerhart: *Mikrobiologie*. Springer Berlin Heidelberg, 2010 <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-10757-3>. – ISBN 978–3–642–10756–6, 978–3–642–10757–3
- [25] DUFFY, David C. ; McDONALD, J. C. ; SCHUELLER, Olivier J. A. ; WHITESIDES, George M.: Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). In: *Analytical Chemistry* 70 (1998), Dezember, Nr. 23, 4974–4984. <http://dx.doi.org/10.1021/ac980656z>. – DOI 10.1021/ac980656z. – ISSN 0003–2700
- [26] DUSHMAN, Saul: The rate of the reaction between iodic and hydriodic acids. In: *The Journal of Physical Chemistry* 8 (1904), Nr. 7, 453–482. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j150061a001>
- [27] EITINGER, Thomas ; FUCHS, Georg ; SCHLEGEL, Hans G.: *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme, 2014. – ISBN 9783131521491 313152149X 9783131678591 3131678593 9783134446098 313444609X
- [28] EMOND, R. T. ; EVANS, Brandon ; BOWEN, E. T. ; LLOYD, G.: A case of Ebola virus infection. In: *British medical journal* 2 (1977), Nr. 6086, 541. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1631428/>
- [29] EPSTEIN, I. R. ; POJMAN, J. A.: *An Introduction to Nonlinear Chemical Dynamics*. Oxford University Press, 1998
- [30] FECHNER, M.G.Th.: Über Umkehrungen der Polarität in der einfachen Kette. In: *Journal für Chemie und Physik* 53 (1828), 129–151. <http://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=mdp.39015067141104;view=2up;seq=1>

- [31] FLEMING, Alexander: On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. In: *British journal of experimental pathology* 10 (1929), Nr. 3, 226. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2048009/>
- [32] FLETCHER, Paul D. ; HASWELL, Stephen J. ; POMBO-VILLAR, Esteban ; WARRINGTON, Brian H. ; WATTS, Paul ; WONG, Stephanie Y. ; ZHANG, Xunli: Micro reactors: principles and applications in organic synthesis. In: *Tetrahedron* 58 (2002), Nr. 24, 4735–4757. [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020\(02\)00432-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020(02)00432-5). – DOI 10.1016/S0040-4020(02)00432-5. – ISSN 00404020
- [33] FORŠTOVÁ, Lenka ; ŠEVČIKOVÁ, Hana ; MAREK, Miloš ; MERKIN, John H.: Influence of External Electric Fields on Reaction Fronts in the Iodate-Arsenous Acid System. In: *The Journal of Physical Chemistry A* 104 (2000), Oktober, Nr. 40, 9136–9143. <http://dx.doi.org/10.1021/jp001157g>. – DOI 10.1021/jp001157g. – ISSN 1089-5639, 1520-5215
- [34] FOWLER, Brenda: *Iceman: uncovering the life and times of a prehistoric man found in an alpine glacier*. University of Chicago Press ed. University of Chicago Press, 2001. – ISBN 0226258238
- [35] FRIEDRICH, M. ; NÖKEL, K.: Erweiterung strategischer Verkehrsmodelle für die operationale Planung im ÖV. In: *Tagungsband der 19. Verkehrswissenschaftlichen Tage* http://www.trafficforum.ethz.ch/vwt_2003/beitraege/VWT19proceedings_contribution_100.1-100.18.pdf
- [36] GAMAGE, Pubudu ; BASEL, Matthew T. ; LOVELL, Kimberly ; POKHREL, Megh R. ; BATTLE, Deletria ; ITO, Takashi ; PAVLENOK, Mikhail ; NIEDERWEIS, Michael ; BOSSMANN, Stefan H.: Poly- *N* -Isopropyl-acrylamide/Acrylic Acid Copolymers for the Generation of Nanostructures on Mica Surfaces and as Hydrophobic Host Systems for the Porin MspA from *Mycobacterium smegmatis*. In: *The Journal of Physical Chemistry C* 113 (2009), Nr. 37, 16485–16494. <http://dx.doi.org/10.1021/jp9057687>. – DOI 10.1021/jp9057687. – ISSN 1932-7447, 1932-7455
- [37] GARRETT, A. B. ; HOLMES, Oscar ; LAUBE, Arthur: The solubility of arsenious oxide in dilute solutions of hydrochloric acid and sodium hydroxide. The character of the ions of trivalent arsenic. Evidence for polymerization of arsenious acid. In: *Journal of the American Chemical Society* 62 (1940), Nr. 8, 2024–2028. <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja01865a031>
- [38] GERBERS, Roman ; FOELLSCHER, Wilke ; CHEN, Hong ; ANAGNOSTOPOULOS, Constantine ; FAGHRI, Mohammad: A new paper-based platform technology for point-of-care diagnostics. In: *Lab Chip* 14 (2014), Nr. 20, 4042–4049. <http://dx.doi.org/10.1039/C4LC00786G>. – DOI 10.1039/C4LC00786G. – ISSN 1473-0197, 1473-0189

- [39] GILL, Pooria ; GHAEMI, Amir: Nucleic Acid Isothermal Amplification Technologies—A Review. In: *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 27 (2008), Nr. 3, 224–243. <http://dx.doi.org/10.1080/15257770701845204>. – DOI 10.1080/15257770701845204. – ISSN 1525–7770, 1532–2335
- [40] GNARPE, JUDY ; LINDQUIST, LINDA: A new DIG-PCR-EIA method for the detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA in clinical samples. In: *Apmis* 108 (2000), Nr. 9, 626–632. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1600-0463.2000.d01-106.x/full>
- [41] GUINEY, D. G.: Promiscuous Transfer of Drug Resistance in Gram-Negative Bacteria. In: *Journal of Infectious Diseases* 149 (1984), Nr. 3, 320–329. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/149.3.320>. – DOI 10.1093/infdis/149.3.320. – ISSN 0022–1899, 1537–6613
- [42] GUO, Feng ; LIU, Kan ; JI, Xing-Hu ; DING, Hui-Jiang ; ZHANG, Meng ; ZENG, Qian ; LIU, Wei ; GUO, Shi-Shang ; ZHAO, Xing-Zhong: Valve-based microfluidic device for droplet on-demand operation and static assay. In: *Applied Physics Letters* 97 (2010), Nr. 23, 233701. <http://dx.doi.org/10.1063/1.3521283>. – DOI 10.1063/1.3521283. – ISSN 00036951
- [43] HANNA, Adel ; SAUL, Alan ; SHOWALTER, Kenneth: Detailed studies of propagating fronts in the iodate oxidation of arsenous acid. In: *Journal of the American Chemical Society* 104 (1982), Nr. 14, 3838–3844. <http://dx.doi.org/10.1021/ja00378a011>. – DOI 10.1021/ja00378a011. – ISSN 0002–7863
- [44] IMPULSZENTRUM FÜR INTEGRIERTE BIOANALYSE, *Taschentuchlabor: Das Taschentuchlabor*. <http://www.taschentuchlabor.de/index47c2.html?id=83>
- [45] KAWAGUCHI, Haruma ; FUJIMOTO, Keiji ; MIZUHARA, Yoshiro: Hydrogel microspheres III. Temperature-dependent adsorption of proteins on poly-N-isopropylacrylamide hydrogel microspheres. In: *Colloid and Polymer Science* 270 (1992), Nr. 1, 53–57. <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00656929>
- [46] KERSTING, Sebastian ; RAUSCH, Valentina ; BIER, Frank F. ; NICKISCH-ROSENEGK, Markus von: Multiplex isothermal solid-phase recombinase polymerase amplification for the specific and fast DNA-based detection of three bacterial pathogens. In: *Microchimica Acta* 181 (2014), Nr. 13, 1715–1723. <http://dx.doi.org/10.1007/s00604-014-1198-5>. – DOI 10.1007/s00604-014-1198-5. – ISSN 0026–3672, 1436–5073
- [47] KIM, Dennis H. ; KLIBANOV, Alexander L. ; NEEDHAM, David: The Influence of Tiered Layers of Surface-Grafted Poly(ethylene glycol) on Receptor-Ligand-Mediated Adhesion between Phospholipid Monolayer-Stabilized Microbubbles and Coated Glass Beads. In: *Langmuir* 16 (2000), März, Nr. 6, 2808–2817. <http://dx.doi.org/10.1021/la990749r>. – DOI 10.1021/la990749r. – ISSN 0743–7463, 1520–5827

- [48] KOCH, Robert: Die Ätiologie der Mizbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des Bacillus Anthracis. In: *Cohns Beiträge zur Biologie der Pflanzen* II (1876), Nr. 2, 277–300. <http://edoc.rki.de/documents/rk/508-5-26/PDF/5-26.pdf>
- [49] LANDOLT, H.: Ueber die Zeitdauer der Reaction zwischen Jodsäure und schwefliger Säure. In: *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 19 (1886), Nr. 1, 1317–1365. <http://dx.doi.org/10.1002/cber.188601901293>. – DOI 10.1002/cber.188601901293. – ISSN 03659496
- [50] LEE, Wen-Fu ; CHIU, Ru-Jen: Investigation of charge effects on drug release behavior for ionic thermosensitive hydrogels. In: *Materials Science and Engineering: C* 20 (2002), Nr. 1, 161–166. [http://dx.doi.org/10.1016/S0928-4931\(02\)00027-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-4931(02)00027-9). – DOI 10.1016/S0928-4931(02)00027-9. – ISSN 09284931
- [51] LI, A ; LEE, P ; HO, B ; DING, J ; LIM, C: Atomic force microscopy study of the antimicrobial action of Sushi peptides on Gram negative bacteria. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1768 (2007), Nr. 3, 411–418. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.12.010>. – DOI 10.1016/j.bbamem.2006.12.010. – ISSN 00052736
- [52] LI, Bingling ; DU, Yan ; LI, Tao ; DONG, Shaojun: Investigation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as colorimetric substrate for a peroxidatic DNAzyme. In: *Analytica Chimica Acta* 651 (2009), Nr. 2, 234–240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.09.009>. – DOI 10.1016/j.aca.2009.09.009. – ISSN 00032670
- [53] LOTKA, Alfred J.: Analytical note on certain rhythmic relations in organic systems. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 6 (1920), Nr. 7, 410. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1084562/>
- [54] LOTKA, Alfred J.: UNDAMPED OSCILLATIONS DERIVED FROM THE LAW OF MASS ACTION. In: *Journal of the American Chemical Society* 42 (1920), August, Nr. 8, 1595–1599. <http://dx.doi.org/10.1021/ja01453a010>. – DOI 10.1021/ja01453a010. – ISSN 0002-7863, 1520-5126
- [55] MAERKL, Sebastian J.: Next generation microfluidic platforms for high-throughput protein biochemistry. In: *Current Opinion in Biotechnology* 22 (2011), Nr. 1, 59–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2010.08.010>. – DOI 10.1016/j.copbio.2010.08.010. – ISSN 09581669
- [56] MARTINEZ, Andres W. ; PHILLIPS, Scott T. ; CARRILHO, Emanuel ; THOMAS, Samuel W. ; SINDI, Hayat ; WHITESIDES, George M.: Simple Telemedicine for Developing Regions: Camera Phones and Paper-Based Microfluidic Devices for Real-Time, Off-Site Diagnosis. In: *Analytical Chemistry* 80 (2008), Mai, Nr. 10, 3699–3707. <http://dx.doi.org/10.1021/ac800112r>. – DOI 10.1021/ac800112r. – ISSN 0003-2700
- [57] MARTINEZ, Andres W. ; PHILLIPS, Scott T. ; WHITESIDES, George M. ; CARRILHO, Emanuel: Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. In: *Ana-*

- lytical Chemistry* 82 (2010), Januar, Nr. 1, 3–10. <http://dx.doi.org/10.1021/ac9013989>. – DOI 10.1021/ac9013989. – ISSN 0003–2700
- [58] MARTINEZ, Andres W. ; PHILLIPS, Scott T. ; WILEY, Benjamin J. ; GUPTA, Malancha ; WHITESIDES, George M.: FLASH: A rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices. In: *Lab on a Chip* 8 (2008), Nr. 12, 2146. <http://dx.doi.org/10.1039/b811135a>. – DOI 10.1039/b811135a. – ISSN 1473–0197
- [59] MARTINEZ, Andres W. ; PHILLIPS, Scott T. ; BUTTE, Manish J. ; WHITESIDES, George M.: Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays. In: *Angewandte Chemie* 119 (2007), Februar, Nr. 8, 1340–1342. <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200603817>. – DOI 10.1002/ange.200603817. – ISSN 00448249
- [60] MCILVAINE, T.C.: A buffer solution for colorimetric comparison. In: *The Journal of Biological Chemistry* 49 (1921), November, Nr. 1, S. 183–186. – ISSN 0021–9258
- [61] MERTINS, Alfred: Signaltheorie: Grundlagen der Signalbeschreibung, Filterbänke, Wavelets, Zeit-Frequenz-Analyse, Parameter- und Signalschätzung; mit 5 Tabellen; [mit Online-Service] Springer Vieweg, 2013. – ISBN 9783834813947 383481394X 9783834881090 3834881090
- [62] MUTO, Carlene A. ; JERNIGAN, John A. ; OSTROWSKY, Belinda E. ; RICHEL, Hervé M. ; JARVIS, William R. ; BOYCE, John M. ; FARR, Barry M.: SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and enterococcus. In: *Infection control and hospital epidemiology* 24 (2003), Nr. 5, 362–386. <http://www.jstor.org/stable/10.1086/502213>
- [63] MÖLLENCAMP, Hartwig ; FLINTJER, Bolko ; JANSEN, Walter: 200 Jahre „Pulsierendes Quecksilberherz“ Zur Geschichte und Theorie eines faszinierenden elektrochemischen Versuchs. In: *CHEMKON* 1 (1994), Nr. 3, 117–125. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ckon.19940010303/full>
- [64] NGUYEN, Nam-Trung: *Mikrofluidik: Entwurf, Herstellung und Charakterisierung*. 2004
- [65] NGUYEN, Nam-Trung ; WU, Zhigang: Micromixers—a review. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 15 (2005), Nr. 2, R1–R16. <http://dx.doi.org/10.1088/0960-1317/15/2/R01>. – DOI 10.1088/0960–1317/15/2/R01. – ISSN 0960–1317, 1361–6439
- [66] NIEDL, Robert ; BETA, Carsten ; WISCHERHOFF, Erik ; LASCHEWSKY, André: Fluidiksystem mit saugfähigen Material und schaltbarem Polymergel. , Nr. EP : 121988356
- [67] OGDEN, Richard C. ; ADAMS, Deborah A.: Electrophoresis in agarose and acrylamide gels. In: *Methods in enzymology* 152 (1987), 61–87. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687987520110/pdf?md5=4e84248dfd2f438f87b3e80d3f6cc767&pid=1-s2.0-0076687987520110-main.pdf&_valck=1

- [68] OHNO, Ken-ichi ; TACHIKAWA, Kaoru ; MANZ, Andreas: Microfluidics: applications for analytical purposes in chemistry and biochemistry. In: *Electrophoresis* 29 (2008), Nr. 22, 4443–4453. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.200800121/full>
- [69] OKANO, Masamichi Nakayama T. ; WINNIK, Fran\cisco M.: Poly (N-isopropylacrylamide)-based Smart Surfaces for Cell Sheet Tissue Engineering. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/material-matters/volume5-3a56/poly-n-isopropylacrylamide.pdf>
- [70] OUWA, Yasuhiro ; WATANABE, Masaaki ; MATSUOKA, Yoshihiro: Behavior of a Confined Plane Jet in a Rectangular Channel at Low Reynolds Number I. General Flow Characteristics. In: *Japanese Journal of Applied Physics* 25 (1986), 754–761. <http://dx.doi.org/10.1143/JJAP.25.754>. – DOI 10.1143/JJAP.25.754. – ISSN 0021–4922, 1347–4065
- [71] PAPAUTSKY, Ian ; GALE, Bruce K. ; MOHANTY, Swomitra K. ; AMEEL, Timothy A. ; FRAZIER, A. B.: Effects of rectangular microchannel aspect ratio on laminar friction constant, 1999, 147–158
- [72] PAPSIN, G. A. ; HANNA, A. ; SHOWALTER, K.: Bistability in the iodate oxidation of arsenous acid. In: *The Journal of Physical Chemistry* 85 (1981), Nr. 17, S. 2575–2582. – ISSN 0022–3654
- [73] PARK, Tae G. ; HOFFMAN, Allan S.: Synthesis and characterization of pH-and/or temperature-sensitive hydrogels. In: *Journal of applied polymer science* 46 (1992), Nr. 4, 659–671. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/app.1992.070460413/abstract>
- [74] PASTEUR: ON THE GERM THEORY. In: *Science os-2* (1881), Nr. 63, 420–422. <http://dx.doi.org/10.1126/science.os-2.63.420>. – DOI 10.1126/science.os-2.63.420. – ISSN 0036–8075, 1095–9203
- [75] PENG, X. F. ; PETERSON, G. P. ; WANG, B. X.: FRICTIONAL FLOW CHARACTERISTICS OF WATER FLOWING THROUGH RECTANGULAR MICROCHANNELS. In: *Experimental Heat Transfer* 7 (1994), Nr. 4, 249–264. <http://dx.doi.org/10.1080/08916159408946484>. – DOI 10.1080/08916159408946484. – ISSN 0891–6152, 1521–0480
- [76] PHILIPPOVA, Olga E. ; HOURDET, Dominique ; AUDEBERT, Roland ; KHOKHLOV, Alexei R.: pH-responsive gels of hydrophobically modified poly (acrylic acid). In: *Macromolecules* 30 (1997), Nr. 26, 8278–8285. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma970957v>
- [77] PIROFSKI, Liise-anne ; CASADEVALL, Arturo: Q&A: What is a pathogen? A question that begs the point. In: *BMC biology* 10 (2012), Nr. 1, 6. <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/10/6>
- [78] PURCELL, E. M.: Life at low Reynolds number. In: *American Journal of Physics* 45 (1977), Nr. 1, 3. <http://dx.doi.org/10.1119/1.10903>. – DOI 10.1119/1.10903. – ISSN 00029505

- [79] PURVES, William K. ; MARKL, Jürgen.: *Biologie*. München : Elsevier, Spektrum Akad. Verl., 2006. – 135–148 S. – ISBN 9783827416308 3827416302 9783827420077 3827420075
- [80] RAYMOND, Samuel ; WANG, Yi-Ju: Preparation and properties of acrylamide gel for use in electrophoresis. In: *Analytical biochemistry* 1 (1960), Nr. 4, 391–396. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269760900361>
- [81] RIGHETTI, Pier G. ; GELFI, Cecilia: Electrophoresis gel media: the state of the art. In: *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 699 (1997), Nr. 1, 63–75. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434796002071>
- [82] ROBERT-KOCH-INSTITUT: Empfehlungen zur Prävention und Kontrolle von Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus-Stämmen (MRSA) in medizinischen und pflegerischen Einrichtungen: Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut. In: *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 57 (2014), Nr. 6, 695–732. <http://dx.doi.org/10.1007/s00103-014-1980-x>. – DOI 10.1007/s00103-014-1980-x. – ISSN 1436-9990, 1437-1588
- [83] SCHNEIDER, F. W.: *Nichtlineare Dynamik in der Chemie*. Spektrum, Akademischer Verlag, 1996. – ISBN 3860253603
- [84] SCOTT, Stephen K.: *Oscillations, waves, and chaos in chemical kinetics*. Oxford University Press, 1994 (Oxford chemistry primers 18). – ISBN 0198558325
- [85] SEASON, Influenza: Airport Exit and Entry Screening for Ebola — August–November 10, 2014. (2014). <http://origin.glb.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm6349.pdf>
- [86] SQUIRES, Todd M. ; QUAKE, Stephen R.: Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. In: *Reviews of modern physics* 77 (2005), Nr. 3, 977. <http://journals.aps.org/rmp/abstract/10.1103/RevModPhys.77.977>
- [87] STROOCK, A. D.: Chaotic Mixer for Microchannels. In: *Science* 295 (2002), Nr. 5555, 647–651. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1066238>. – DOI 10.1126/science.1066238. – ISSN 00368075, 10959203
- [88] TAN, MD JD R. SY ; BROWN, J: Medicine in Stamps Rudolph Virchow. In: *Singapore Med J* 47 (2006), Nr. 7, S. 567
- [89] TEH, Shia-Yen ; LIN, Robert ; HUNG, Lung-Hsin ; LEE, Abraham P.: Droplet microfluidics. In: *Lab on a Chip* 8 (2008), Nr. 2, 198. <http://dx.doi.org/10.1039/b715524g>. – DOI 10.1039/b715524g. – ISSN 1473-0197, 1473-0189
- [90] THEN, Whui L. ; GARNIER, Gil: Paper diagnostics in biomedicine. In: *Reviews in Analytical Chemistry* 32 (2013), Januar, Nr. 4. <http://dx.doi.org/10.1515/revac-2013-0007>. – DOI

10.1515/revac-2013-0007. – ISSN 2191-0189, 0793-0135

- [91] THORNDIKE, Edward L.: The Law of Effect. In: *The American Journal of Psychology* 39 (1927), Nr. 1, 212. <http://dx.doi.org/10.2307/1415413>. – DOI 10.2307/1415413. – ISSN 00029556
- [92] TOWNER, Jonathan S. ; SEALY, Tara K. ; KHRISTOVA, Marina L. ; ALBARIÑO, César G. ; CONLAN, Sean ; REEDER, Serena A. ; QUAN, Phenix-Lan ; LIPKIN, W. I. ; DOWNING, Robert ; TAPPERO, Jordan W. ; OKWARE, Samuel ; LUTWAMA, Julius ; BAKAMUTUMAHU, Barnabas ; KAYIWA, John ; COMER, James A. ; ROLLIN, Pierre E. ; KSIAZEK, Thomas G. ; NICHOL, Stuart T.: Newly Discovered Ebola Virus Associated with Hemorrhagic Fever Outbreak in Uganda. In: *PLoS Pathogens* 4, Nr. 11, e1000212. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000212>. – DOI 10.1371/journal.ppat.1000212. – ISSN 1553-7374
- [93] TÜDOS, Anna J. ; BESSELINK, Geert A. J. ; SCHASFOORT, Richard B. M.: Trends in miniaturized total analysis systems for point-of-care testing in clinical chemistry. In: *Lab on a Chip* 1 (2001), Nr. 2, 83. <http://dx.doi.org/10.1039/b106958f>. – DOI 10.1039/b106958f. – ISSN 1473-0197, 1473-0189
- [94] VOLLER, A. ; BARTLETT, A. ; BIDWELL, D. E.: Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. In: *Journal of Clinical Pathology* 31 (1978), Nr. 6, 507-520. <http://jcp.bmj.com/content/31/6/507.short>
- [95] VOLPE, G. ; FARES, G. ; QUADRI, F. d. ; DRAISCI, R. ; FERRETTI, G. ; MARCHIAFAVA, C. ; MOSCONE, D. ; PALLESCHI, G.: A disposable immunosensor for detection of 17 β -estradiol in non-extracted bovine serum. In: *Analytica Chimica Acta* 572 (2006), Nr. 1, 11-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2006.05.008>. – DOI 10.1016/j.aca.2006.05.008. – ISSN 00032670
- [96] VOLTERRA, Vito: Fluctuations in the Abundance of a Species considered Mathematically. In: *Nature* 118 (1926), Oktober, Nr. 2972, 558-560. <http://dx.doi.org/10.1038/118558a0>. – DOI 10.1038/118558a0. – ISSN 0028-0836
- [97] WALSH, Dominic ; HALL, Simon R. ; MOIR, Adam ; WIMBUSH, Stuart C. ; PALAZZO, Barbara: Carbonated water mediated preparation of poly(N-isopropylacrylamide) thermoresponsive gels and liquids. In: *Biomacromolecules* 8 (2007), Dezember, Nr. 12, S. 3800-3805. <http://dx.doi.org/10.1021/bm7007179>. – DOI 10.1021/bm7007179. – ISSN 1525-7797. – WOS:000251547600017
- [98] XIA, Younan ; WHITESIDES, George M.: Soft lithography. In: *Annual review of materials science* 28, Nr. 1, 153-184. <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.matsci.28.1.153>
- [99] XIANG, Maoliang ; JIANG, Ming ; KONG, Xiangming ; YANG, Yiquing ; LU, Wenkui: A novel synthesis of acrylic acid containing polymers. In: *Macromolecular rapid communica-*

- tions 18 (1997), Nr. 5, 385–391. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/marc.1997.030180505/abstract>
- [100] YAMAGUCHI, T. ; KUHNERT, L. ; NAGY-UNGVARAI, Zs ; MÜLLER, S. C. ; HESS, B.: Gel systems for the Belousov-Zhabotinskii reaction. In: *The Journal of Physical Chemistry* 95 (1991), Nr. 15, 5831–5837. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100168a024>
- [101] ZAIKIN, A. N. ; ZHABOTINSKY, A. M.: Concentration Wave Propagation in Two-dimensional Liquid-phase Self-oscillating System. In: *Nature* 225 (1970), Nr. 5232, 535–537. <http://dx.doi.org/10.1038/225535b0>. – DOI 10.1038/225535b0. – ISSN 0028–0836
- [102] ZHABOTINSKY, A. M. ; ROVINSKY, A. B.: Mechanism and nonlinear dynamics of an oscillating chemical reaction. In: *Journal of statistical physics* 48 (1987), Nr. 5-6, 959–975. <http://link.springer.com/article/10.1007/BF01009526>
- [103] ZHABOTINSKY, Anatol M.: A history of chemical oscillations and waves. In: *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science* 1 (1991), Nr. 4, 379. <http://dx.doi.org/10.1063/1.165848>. – DOI 10.1063/1.165848. – ISSN 10541500