

Forschungsergebnisse

Optische Technologien

der Baden-Württemberg Stiftung gGmbH

Mikrofluidisch integriertes System zur markerfreien Zellanalyse und -sortierung

Im Rahmen des Forschungsprogramms „Optische Technologien“ der Baden-Württemberg Stiftung gGmbH entwickelten zwei Arbeitsgruppen gemeinsam ein mikrofluidisch integriertes System zur markerfreien Zellanalyse und -sortierung. Ziel der Kooperation zwischen dem Institut für Optoelektronik der Universität Ulm und dem Institut für Mikrostrukturtechnik des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) war die Demonstration der miniaturisierten Detektion und Sortierung von Partikeln mit rein optischen Prinzipien.

In der Zellanalyse etablierte Geräte basieren häufig auf Fluoreszenzmarkierungen und sind in der Regel teuer und großvolumig. Auch andere Methoden wie Ramanpektroskopie, Interferometrie oder Durchflusszytometrie sind weitgehend ungeeignet für den Einsatz in portablen Systemen. Durch Zellanalyse innerhalb mikrofluidischer Kanäle kann das benötigte Probenvolumen und perspektivisch auch die Größe der Geräte drastisch reduziert werden. Die Herstellung der mikrofluidischen Chips mit Hilfe üblicher lithographischer Strukturierungsverfahren aus Polymeren oder Glas verstärkt die

Kostenreduktion zusätzlich. Es können verschiedene Analyseschritte wie Mischen, Anregung, Reaktion sowie optische oder elektrische Untersuchungen auf einem mikrofluidischen Chip vereint werden, was zu der häufig verwendeten Bezeichnung Lab-on-a-Chip führt. Die niedrige Durchflussrate ist dabei zweitrangig, da die Untersuchung nur weniger tausend Zellen angestrebt wird und Ergebnisse innerhalb kurzer Zeit erwartet werden können.

Die im Projekt vorgesehenen Demonstratoren hatten zum Ziel, eine Basis für zukünftige Zellanalysegeräte zu bilden. Dabei sollten sie auf rein optischen Verfahren basieren und die Vorteile der Mikrosystemtechnik nutzen. Die zu sortierenden Partikel sollten auf einer mikrofluidischen Plattform basierend auf Kunststoff und Glas durch den verlängerten Resonator einer integrierten, vertikal emittierenden Halbleiterlaserdioden geleitet werden. Damit wird ein optofluidisches System gebildet. Durch das Durchströmen des Kanals mit Partikeln unterliegt der integrierte Laserresonator ständigen Änderungen. Die ausgelesenen Laserparameter ermöglichen detaillierte Rückschlüsse bezüglich relevanter Kenngrößen wie

Brechungsindex, Absorption oder Morphologie der den Resonator passierenden Zellen. Eine auf optischen Fallen basierende Sortiereinheit, bestehend aus individuell gefertigten Matrizen integrierter Vertikallaserdioden, sollte die unmittelbar nachfolgende Sortierung der Partikel gewährleisten.

Mikrofluidisches Modul

Das mikrofluidische Modul ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt. Als Substrat dient eine 2 mm dicke Kunststoffplatte, die eine mikrofluidische Y-Verzweigung sowie Flüssigkeitsreservoirs enthält. Die fluidische Struktur wird durch einen dünnen Glasdeckel abgedichtet.

Innerhalb der Analysezone, die sich im Zuleitungskanal befindet, wird der Kanal senkrecht mit kontinuierlichem Laserlicht durchstrahlt. Bei dem in Abbildung 1 links dargestellten Laser handelt es sich um einen VECSEL (vertical extended cavity surface-emitting laser), der auf dem Halbleiter-Materialsystem Galliumarsenid (GaAs) / Aluminiumgalliumarsenid (AlGaAs) basiert und durch elektrischen Strom gepumpt wird. Sein externer stabiler Resonator wird von einem in die

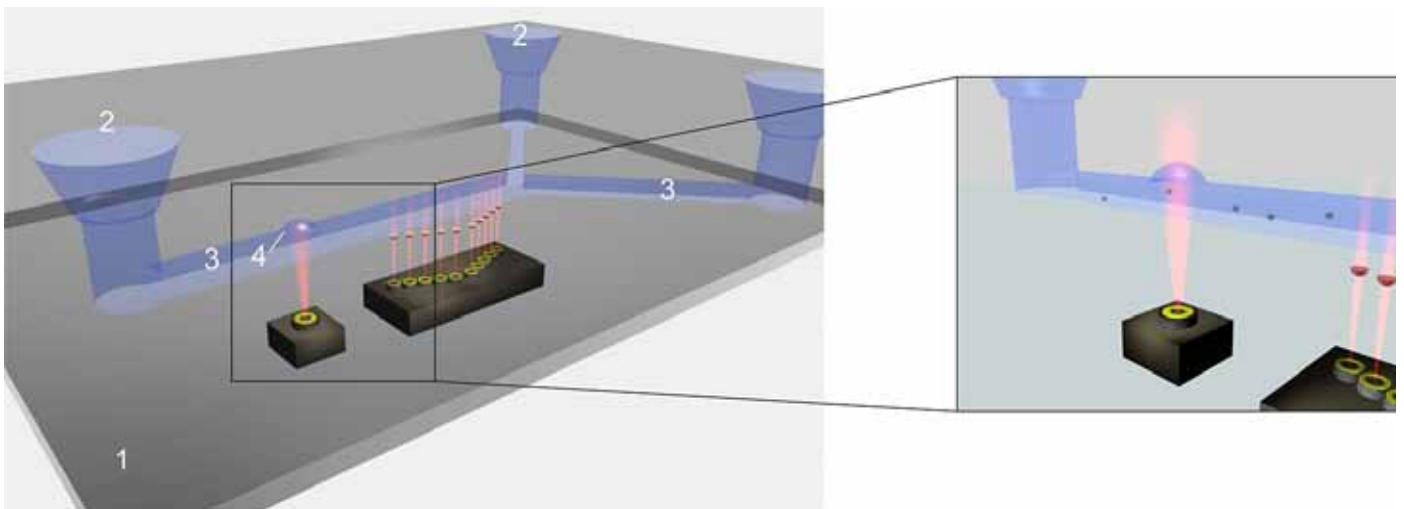


Abbildung 1: Schema des optofluidischen Systems (1) bestehend aus Flüssigkeitsreservoirs (2), Mikrokanälen (3) und externem Resonatorspiegel (4). Im vollständig integrierten System sind die Laser (5) unterhalb des mikrofluidischen Chips platziert

Kunststoffplatte integrierten, hochreflektierend beschichteten Hohlspiegel definierter Krümmung abgeschlossen.

Ein durch den Resonator fließendes Teilchen ruft Änderungen des Brechungsindex und der modalen Resonatorverluste durch Fokussierung, Absorption und Streuung hervor, was die Laserleistung, die spektrale Lage der Laserlinien und das optische Spektralmuster beeinflusst. Daneben wirkt sich eine Störung auf die elektrische Charakteristik aus: Es kann eine Änderung des Schwellstroms oder bei konstantem Strom eine Änderung der Diodenspannung beobachtet werden. Das optische Signal wird oberhalb des mikrofluidischen Kanals in einem verdünnten Bereich des Kunststoff-Substrats abgegriffen, indem es direkt in eine Glasfaser eingekoppelt und spektral sowie bezüglich der Ausgangsleistung untersucht wird.

In der Sortierzone vor der Kanalverzweigung in Abbildung 1 wird eine gezielte Ablenkung der Partikel in einen der beiden Ausgangsarne realisiert. Partikelablenkung kann ohne bewegte Mechanik durch ein optisches Fallen-Gitter beziehungsweise ein Array kontinuierlich arbeitender optischer Fallen erzielt werden, wenn die Strömungskräfte der transportierenden Flüssigkeit im Kanal und die Haltekraft der Fallen von vergleichbarer Größe sind.

Ein Teilchen wird in diesem Fall nicht vollständig fixiert, sondern lediglich von seiner eigentlichen Flussrichtung abgelenkt. Es folgt der Neigung des Arrays und wird so von einer Seite eines Kanals zu der anderen bewegt.

In der Literatur sind verschiedene Verfahren zur Erzeugung eines optischen Fallen-Gitters zu finden, wie zum Beispiel Mehrstrahlinterferenz, holographische Techniken oder die Erzeugung optischer Potentialverteilungen mittels Bessel-Strahlen, stehender Wellen, Strahlstreckung durch eine Zylinderlinse, zweidimensionalem Talbot-Effekt, Mikrolinsen-Array sowie parabolischem Mikrospiegel. Die genannten Ansätze benötigen jedoch externe Laserquellen und beinhalten vielfach aufwändige optische Aufbauten. Es ist daher erstrebenswert, die optische Falle in die Mikrofluidik zu integrieren. Das Laserlicht kann zum Beispiel über Lichtwellenleiter in den Kanal geführt werden. Auch wurde bereits in einem verkleinerten Aufbau das Einbringen kantenemittierender AlGaAs-Laserdioden in die Seitenwände eines Kanals gezeigt.

Neu ist der im Projekt verfolgte Ansatz, die Vertikallaserdioden (VCSEL, vertical-cavity surface-emitting laser) direkt auf dem mikrofluidischen Chip zu integrieren. Ihre Emission senkrecht zur Oberfläche ermöglicht die Herstel-

lung zweidimensionaler Laserarrays, sodass optische Fallen-Gitter ohne zusätzliche optische Elemente erzeugbar sind. Konventionelle VCSEL-Arrays wurden bereits erfolgreich als Laserquellen in herkömmlichen optischen Fallenaufbauten eingesetzt. Im biomedizinischen Bereich konnte der parallele Transport von eingefangenen Zellen mit VCSEL-Arrays demonstriert werden. Mit der Fabrikation optimierter, miniaturisierter Arrays und deren Integration in mikrofluidische Module wurde im Projekt Neuland betreten.

Fertigung der Komponenten

Das optische System besteht aus insgesamt drei Komponenten, die alle eigens für die vorliegende Anwendung angepasst und hergestellt wurden: den mit Fluiden durchströmten Resonator eines VCSELS, einen optischen Signalabgriff im mikrofluidischen Chip und eine integrierte Ablenkeinheit, gebildet durch ein zweidimensionales VCSEL-Array.

Damit die optische Fallenwirkung des Arrays ausreichend hoch für gezielte Ablenkung ist, musste der Abstand zwischen Sortier-Chip und mikrofluidischem Kanal auf ein Minimum reduziert werden, was neue Lösungen für die Integration der beiden Komponenten erforderte. Für das Projekt wurde ein neuer Ansatz zur Herstellung dicht gepackter integrierbarer VCSEL-Arrays mit Mittenabständen der Laser von nur 20 μm entwickelt. Im Institut für Optoelektronik der Universität Ulm wurden sowohl die notwendigen Halbleiterschichtstrukturen epitaktisch gewachsen als auch die gesamte Prozessierung durchgeführt. Die Laserchips wurden anschließend mit Wärmesenken versehen und mit dem mikrofluidischen Chip integriert.

Zur Herstellung der Laser mit externem Resonator wurde ein ähnlicher Ansatz basierend auf Flip-Chip-Lötung entwickelt. Auch hier gelang die Integration mit Fluidik-Chips, und zwar mittels aktiver Justage bei konstantem Be-



Abbildung 2: Foto eines VCSEL-Chips auf Siliziumträger, bereit für die Integration mit einem Fluidik-Chip

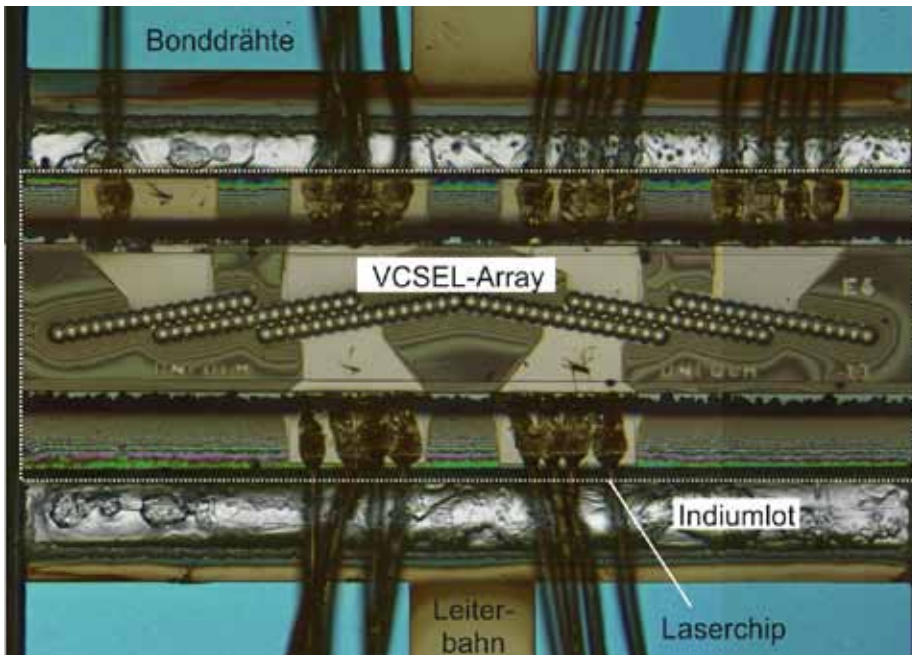


Abbildung 3: Mikroskopaufnahme eines VCSEL-Array-Chips mit minimierten Bauteilabständen

triebsstrom, um die Ausrichtung des externen Spiegels zum Laser zu optimieren. Abbildung 2 zeigt das Foto eines hergestellten VCSEL-Chips auf einem ebenso gefertigten Chipträger aus Silizium. Eine Mikroskopaufnahme eines VCSEL-Array-Chips ist in Abbildung 3 dargestellt. Die geringen Bauteilabstände ermöglichen eine kontinuierliche Partikelablenkung ohne Einsatz weiterer strahlformender Optiken.

Die optofluidischen Plattformen wurden in dem Kunststoff Cyclo-Olefin-

Copolymer (Topas COC) gefertigt. Auf jeder Plattform befindet sich ein Fluidik-Kanal mit Y-Verzweigung, an dessen Oberseite eine konkav geformte Fläche eingebracht wurde. Breite und Höhe der Kanäle liegen im Bereich einiger 10 μm . Die gekrümmte Fläche mit einer darauf abgeschiedenen hochreflektierenden (dielektrischen) Beschichtung bildet den externen Spiegel des Resonators der Analysezone. Um Streuverluste durch Oberflächendefekte zu minimieren und einen effizienten Signalabgriff des VCSELs

zu ermöglichen, musste die Fläche über diesem externen Spiegel in der Dicke reduziert und die dem Resonator zugewandte Fläche dieser verdünnten Region mit Rauigkeiten in der Größenordnung optischer Oberflächen hergestellt werden.

Am Institut für Mikrostrukturtechnik des Karlsruher Instituts für Technologie wurde das Design der Fluidikstrukturen mit den integrierten optischen Oberflächen entwickelt und die Bauteile mittels beidseitigem Heißprägen hergestellt. Dazu wurde das Polymer zwischen zwei Masterstrukturen, welche die Negative der in Polymer zu erstellenden mehrstufigen Strukturen besitzen, bei einer Temperatur oberhalb der Glasübergangstemperatur des Polymers und bei hohem Druck gepresst, sodass das erweichte Polymer die Negativstrukturen ausfüllte. Abbildung 4 zeigt sowohl ein Foto eines geprägten Kunststoff-Wafers als Nutzen mit zwölf zusammenhängenden mikrofluidischen Chips als auch einen vereinzelt Chip.

Um die Fluidik-Kanäle zu verschließen, wurde das Polymersubstrat nach Aufbringen der Spiegelschicht für den externen Resonator irreversibel mit einem 30 μm dünnen Glasplättchen verbunden. Das Gesamtsystem war erst durch Wahl dieses besonders dünnen Glases realisierbar. Der Ab-

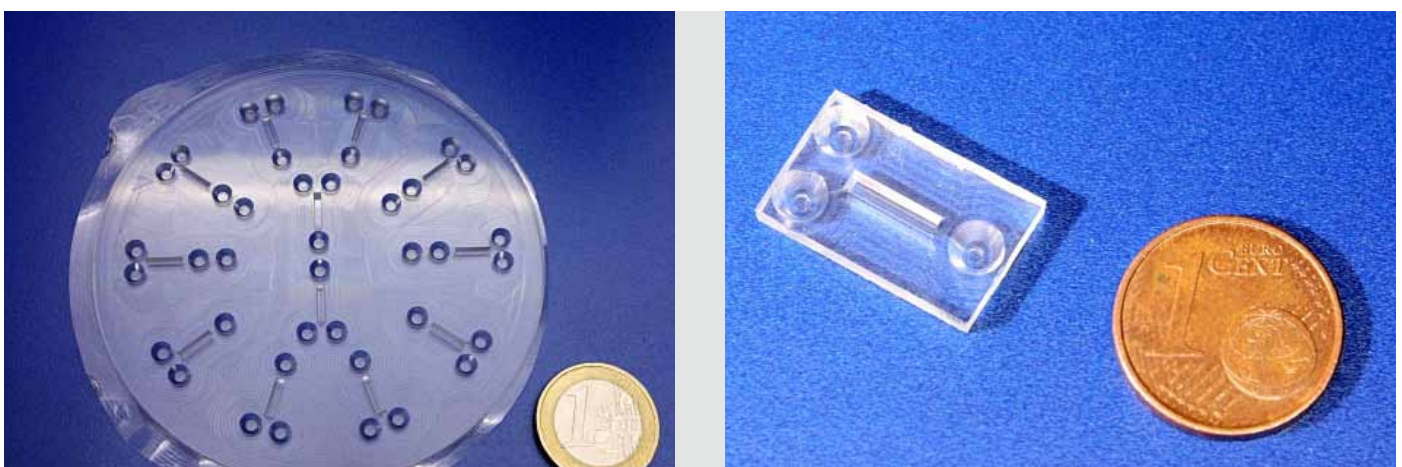


Abbildung 4: Foto eines geprägten Kunststoff-Wafers als Nutzen mit zwölf mikrofluidischen Strukturen (links) sowie ein aus dem Wafer vereinzelter mikrofluidischer Chip mit Durchgangslöchern zur Befüllung (rechts)



Abbildung 5: Ablenkexperiment mit einem Polystyrolpartikel mit 15 µm Durchmesser. Im linken Bild wurde der Infrarotfilter entfernt und die Laser werden nahe der Schwelle betrieben, um ihre Lage im Kanal sichtbar zu machen. Die Flüssigkeit durchströmt den Kanal von rechts nach links

stand der integrierten Laser zum im Kanal geführten Fluid ist damit so weit verringert, dass die Strahldivergenz eine untergeordnete Rolle spielt.

Experimente und Ausblick

In dem Projekt gelang die unabhängige Demonstration der beiden Funktionen Partikeldetektion sowie Partikelablenkung mit vollständigen, elektrisch ansteuerbaren optofluidischen Modulen. Durch gleichzeitige Aufnahme von Wellenlänge und Ausgangsleistung des VECSELs sowie Videos des Fluidik-Kanals konnten den Kanal passierende Partikel eindeutig mit Änderungen der Laser-Ausgangscharakteristik korreliert werden.

Die kontinuierliche Partikelablenkung konnte erfolgreich an Partikeln unterschiedlichen Durchmessers demonstriert werden und stellt damit die Grundlage für eine erfolgreiche Partikelsortierung dar. Exemplarisch zeigt Abbildung 5 die Serienaufnahme eines Experiments, bei dem ein im Kanal fließendes 15 µm großes Partikel kontrolliert von seiner Fließrichtung abgelenkt wird.

Die erforderlichen experimentellen Schritte zur Realisierung eines autarken optofluidischen Systems nach

Abbildung 1 sind (1) die Zusammenführung der Laserkomponenten auf einer gemeinsamen Plattform und deren Integration mit Fluidik-Chips, (2) die Generation einer Datenbasis der charakteristischen Analysesignale verschiedenster Partikel und (3) die Erstellung einer effizienten Software

zur In-situ-Korrelation zwischen Messsignalen und Datenbank sowie hieraus in Echtzeit abgeleiteter Ansteuerung der Sortiereinheit. Finalen Aufschluss über die Umsetzbarkeit der vorgestellten hochintegrierten Konzepte würden schließlich Tests mit biologischem Zellmaterial geben.

Kontakt

Prof. Dr.-Ing. Rainer Michalzik
Universität Ulm
Institut für Optoelektronik
Albert-Einstein-Allee 45
89081 Ulm

Tel.: 0731 50-26048

rainer.michalzik@uni-ulm.de

www.uni-ulm.de/opto

PD Dr.-Ing. Timo Mappes
Karlsruher Institut für Technologie
Institut für Mikrostrukturtechnik

76128 Karlsruhe

Tel.: 01520 1600832

timo.mappes@kit.edu

www.biophotonic-systems.com

Seit 1.10.2012:

Carl Zeiss AG
Corporate Research
and Technology
Carl-Zeiss-Promenade 10
07745 Jena