

# **Entwicklung eines mikrofluidischen Analysesystems zum immunologischen Proteinnachweis**

Von der Fakultät für Maschinenbau  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig  
zur Erlangung der Würde

einer Doktor-Ingenieurin (Dr.-Ing.)

genehmigte

**Dissertation**

von

Dipl.-Chem. Monika Michalzik

aus Salzgitter

eingereicht am: 07.10.2008

mündliche Prüfung am: 10.12.2008

Referenten: Prof. Dr. rer. nat. Stephanus Büttgenbach  
Juniorprof. Dr.-Ing. Ezequiel Franco-Lara

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Dietmar Hempel

2009



Berichte aus der Mikro- und Feinwerktechnik

herausgegeben von Prof. Dr. rer. nat. S. Büttgenbach

Band 24

**Monika Michalzik**

**Entwicklung eines mikrofluidischen Analysesystems  
zum immunologischen Proteinnachweis**

Shaker Verlag  
Aachen 2009

**Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Braunschweig, Techn. Univ., Diss., 2008

Copyright Shaker Verlag 2009

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8322-8009-3

ISSN 1433-1438

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • E-Mail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

## **Vorwort**

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Mikrotechnik (IMT) der Technischen Universität Braunschweig.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stephanus Büttgenbach für das entgegengebrachte Vertrauen und seine Unterstützung im Laufe dieser Arbeit. Die Beschäftigung am IMT ermöglichte mir den Einblick in interessante Forschungsgebiete sowie das Kennenlernen vieler neuer Techniken und Verfahren.

Mein herzlicher Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Ezequiel Franco-Lara für die Übernahme des Koreferats und Herrn Prof. Dr. Dietmar Hempel für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes sowie dem großen Interesse, das sie dieser Arbeit entgegengebracht haben.

Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel, Herrn Dr. Michael Hust und Frau Dipl.-Biol. Laila Al-Halabi vom Institut für Biochemie und Biotechnologie gilt mein Dank für die gemeinsame Arbeit im Bereich des Sonderforschungsprojektes 578. Ebenfalls danken möchte ich Herrn Dipl.-Chem. Steffen Harling vom Institut für Technische Chemie für die Unterstützung im Bereich der Hydrogelaktoren.

Ferner bedanken möchte ich mich auch bei allen meinen Kollegen am IMT für die gute Zusammenarbeit und Hilfe. Ganz besonders bedanken möchte ich mich jedoch bei Frau Dipl.-Ing. Anne Balck für die sehr angenehme gemeinsame Arbeit an diesem Forschungsprojekt sowie das gründliche Korrekturlesen dieser Dissertation. Frau Bettina Thürmann und Herrn Frederik Tuitje gilt mein Dank für die Geduld bei der Herstellung unzähliger Quarzsensoren. Ebenso möchte ich allen Studenten, die meine Arbeit in Form von Studien- und Diplomarbeiten unterstützt haben, für ihre kreativen Ideen danken.

Besonders erwähnen möchte ich aber auch die gute Gemeinschaft innerhalb der „Koch-AG“, die ebenfalls viele Anregungen während dieser Arbeit geliefert hat. Ebenfalls möchte ich Frau Dipl.-Ing. Nina Lucas für die schöne gemeinsame Zeit im Frauenbüro, sowie die vielen fruchtbaren Gespräche bei offener und geschlossener Tür danken.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern, Schwiegereltern, Freunden, Nachbarn und allen „Klesmern“ für den nötigen Abstand und Ablenkung bedanken, das beides entscheidend zum Gelingen beigetragen hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt dabei natürlich auch „meinen“ beiden Deutschlehren: meinem Schwiegervater Udo Michalzik und meiner Freundin Iris Raeth, die sich rechtschreibtechnisch durch diese Arbeit gemüht haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich jedoch ganz herzlich bei meinem Mann Marc für die vielen interessanten Diskussionen, seine Hilfe und Geduld bedanken.

## Abstract

This paper discusses the development of a calibratable and regeneratable microfluidic analysis system for point-of-care diagnostics of bacterial diseases with CRP (C-reactive protein). Serious inflammations cause the concentration of CRP in human's blood to increase by the factor of 100 or more. This can be qualified by the developed analysis system.

The detection of the protein can be achieved by using a mass sensitive quartz sensor. Immobilized CRP-specific antibody-fragments act as catching molecules on its surface.

For analysing a serum-sample the sensor was integrated into a microfluidic system made of PDMS (polydimethylsiloxane).

An additional component of the analysis system is the affinity chromatographic cell filled with beads which are used for cleaning the analyte from other serum proteins and thus concentrated for detection.

The implementation of these analysis systems was developed in modular manner by controlling the test-solution with electromagnetic valves. Both the sensor and the affinity chromatographic cell were characterized and tested for application in microfluidic analysis system. All components had to be examined due to their interactions with the used biomolecules.

Afterwards the obtained results were utilized for realising a lab-on-chip-system.

Active pH-sensitive hydrogel valves, also consisting of PDMS, were introduced for the regulation of the test-solution flow within the system. Therefore they fit into the rest of the whole analysing lab-on-chip concept.

Before integration the hydrogel actors were tested for its use in the analysis system.

The lab-on-chip-system described in this paper offers the opportunity to detect critical CRP-concentrations and can be used to diagnose inflammations.



## **Kurzfassung**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung eines kalibrier- und regenerierbaren, mikrofluidischen Analysesystems zur Point-of-Care-Diagnostik bakterieller Erkrankungen mithilfe des Serumproteins CRP (C-reaktives Protein).

Die Konzentration von CRP im Blut eines Patienten steigt bei einer kritischen Entzündungsreaktion auf mindestens den 100-fachen Wert an und kann somit durch das hier entwickelte Analysesystem qualitativ bestimmt werden.

Für die Detektion des Proteins wird ein massensensitiver Quarzsensoren verwendet, an dessen Oberfläche CRP-spezifische Antikörperfragmente als Fängermoleküle immobilisiert werden. Für die Untersuchung einer Serumprobe wurde der Sensor in ein mikrofluidisches System aus dem Polymer PDMS (Polydimethylsiloxan) integriert.

Ein weiterer Bestandteil des Analysesystems ist eine mit Beads gefüllte Affinitätschromatographiezelle, in der der nachzuweisende Analyt von anderen Serumproteinen gereinigt und für den Nachweis angereichert werden kann.

Die Umsetzung des Analysesystems erfolgte zunächst in modularer Weise, indem für die Steuerung der Probelösung aktive elektromagnetische Ventile Verwendung fanden.

Sowohl Sensor- als auch Affinitätschromatographiezelle wurden dabei charakterisiert und für ihren Einsatz in einem mikrofluidischen Analysesystem getestet. Die Komponenten mussten hierzu insbesondere auf ihre Wechselwirkungen mit den verwendeten Biomolekülen untersucht werden.

Anschließend konnte aus den daraus gewonnenen Ergebnissen ein Lab-on-Chip-System realisiert werden.

Für die Steuerung der Probelösung innerhalb dieses Systems kamen aktive pH-sensitive Hydrogel-Ventile zum Einsatz, die ebenso aus PDMS hergestellt und somit in das mikrofluidische Gesamtsystem integriert werden konnten.

Die Hydrogel-Aktoren wurden dabei zuvor für ihren Einsatz in dem Analysesystem getestet.

Mithilfe des in dieser Arbeit entwickelten Lab-on-Chip-Systems ist die Möglichkeit gegeben, kritische CRP-Konzentrationen zu detektieren und somit entzündliche Erkrankungen zu diagnostizieren.



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen der mikrofluidischen Proteinanalytik .....</b>	<b>5</b>
2.1	Mikrofluidik.....	5
2.2	<b>Materialien und Herstellungsverfahren der mikrofluidischen Komponenten.....</b>	<b>7</b>
2.2.1	Softlithographie .....	8
2.2.2	Polydimethylsiloxan .....	10
2.3	<b>Immunosensorik .....</b>	<b>14</b>
2.3.1	Immunosensoren .....	14
2.3.2	Antikörper .....	18
2.3.3	Serumproteine .....	21
2.4	<b>Quarzmikrowaage .....</b>	<b>22</b>
2.4.1	Der piezoelektrische Effekt .....	23
2.4.2	Quarzschnitte.....	26
2.4.3	Elektrische Eigenschaften .....	30
2.4.4	Einfluss von Flüssigkeiten auf die Quarzmikrowaage.....	34
2.4.5	Einfluss von Biomolekülen auf die Quarzmikrowaage .....	37
2.4.6	Herstellung der Quarzsensoren .....	41
2.4.7	Immobilisierung .....	42
2.4.8	Messdatenerfassung .....	47
2.4.9	Immunosensorische Anwendungen von Quarzmikrowaagen in Flüssigkeit .....	50

<b>2.5</b>	<b>Affinitätschromatographie.....</b>	<b>52</b>
2.5.1	Trennprinzip.....	52
2.5.2	Affinitätschromatographische Trennung in der Mikrofluidik.....	53
<b>2.6</b>	<b>Mikroventile.....</b>	<b>54</b>
2.6.1	Varianten aktiver Mikroventile.....	54
2.6.2	Hydrogele.....	56
<b>3</b>	<b>Entwurf und Realisierung eines mikrofluidischen Analyzesystems.....</b>	<b>65</b>
<b>3.1</b>	<b>Fertigungstechnologie.....</b>	<b>65</b>
3.1.1	Masterherstellung.....	65
3.1.2	Replikatformen.....	67
3.1.3	PDMS-Bondprozess.....	69
<b>3.2</b>	<b>Mikrofluidische Sensorzelle auf Basis eines Quarzresonators.....</b>	<b>71</b>
3.2.1	Konzept.....	71
3.2.2	Herstellung.....	73
3.2.3	Interface-Elektronik.....	76
3.2.4	Charakterisierung.....	81
3.2.5	Oberflächenmodifikation.....	85
3.2.6	Messungen.....	92
3.2.7	Zusammenfassung und Diskussion.....	94
<b>3.3</b>	<b>Miniaturisierte Affinitätschromatographiezelle.....</b>	<b>96</b>
3.3.1	Konzept.....	96
3.3.2	Herstellung.....	98

---

3.3.3	Charakterisierung .....	100
3.3.4	Zusammenfassung und Diskussion .....	101
<b>3.4</b>	<b>Modularer Messaufbau .....</b>	<b>102</b>
3.4.1	Konzept .....	102
3.4.2	Aufbau .....	103
3.4.3	Messungen.....	104
3.4.4	Zusammenfassung und Diskussion .....	106
<b>3.5</b>	<b>Aktives Ventil auf Basis eines Hydrogel-Aktors.....</b>	<b>107</b>
3.5.1	Konzept .....	107
3.5.2	Herstellung .....	108
3.5.3	Charakterisierung .....	110
3.5.4	Zusammenfassung und Diskussion .....	114
<b>3.6</b>	<b>Mikrofluidisches Lab-on-Chip-System .....</b>	<b>115</b>
3.6.1	Konzept .....	115
3.6.2	Herstellung .....	121
3.6.3	Zusammenfassung und Diskussion .....	123
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>125</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>129</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>143</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>i</b>