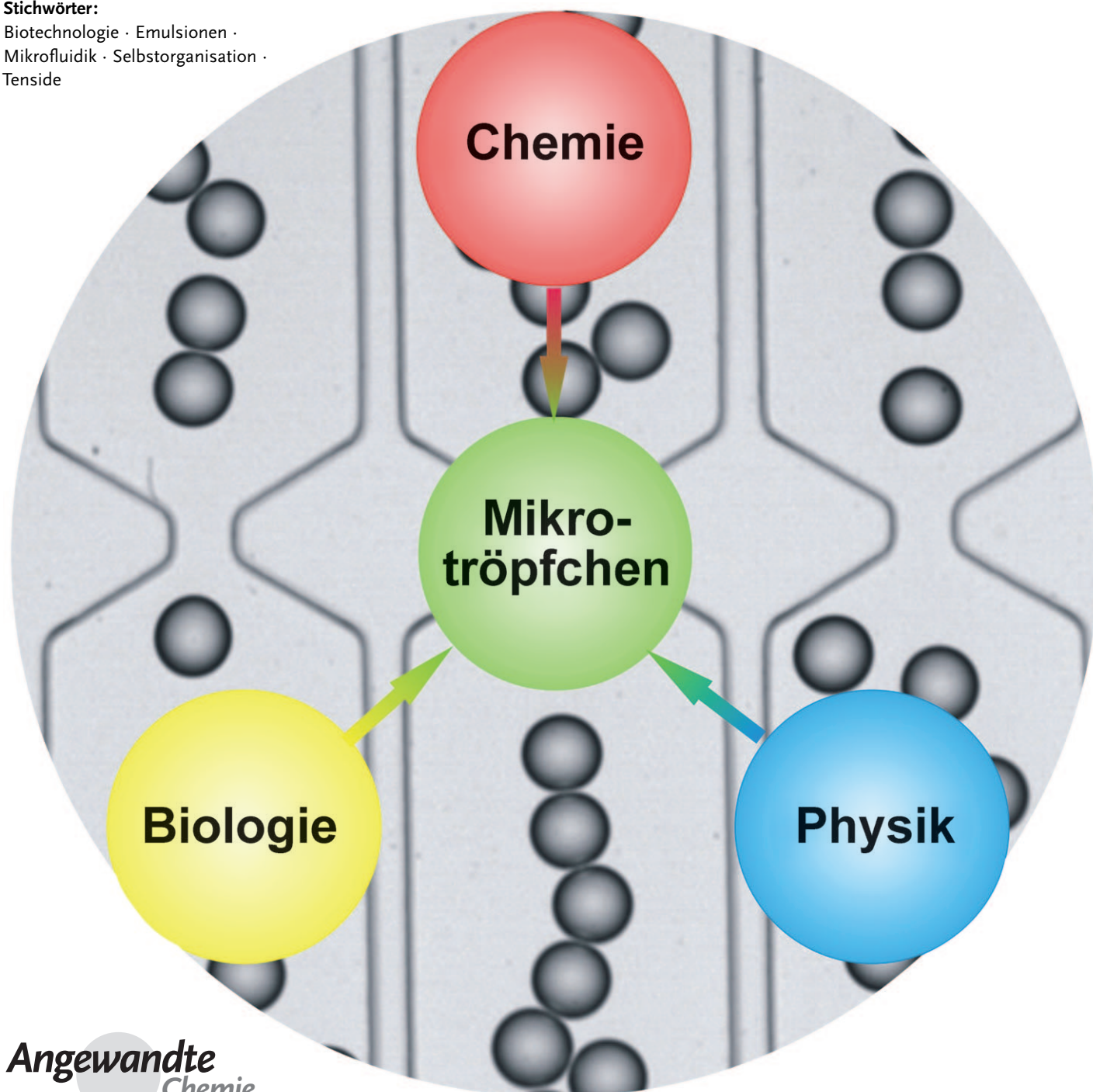


Mikrotröpfchen in Mikrofluidiksystemen: eine Technik für Entdeckungen in der Chemie und Biologie

Ashleigh B. Theberge, Fabienne Courtois, Yolanda Schaerli, Martin Fischlechner, Chris Abell, Florian Hollfelder und Wilhelm T. S. Huck*

Stichwörter:

Biotechnologie · Emulsionen ·
Mikrofluidik · Selbstorganisation ·
Tenside



Angewandte
Chemie

Mikrotröpfchen in Mikrofluidiksystemen bieten zahlreiche Möglichkeiten für die chemische und biologische Forschung. Sie ermöglichen die isolierte Betrachtung von Spezies oder Reaktionen, sie sind monodispers und daher für quantitative Studien geeignet, sie können für Studien in extrem kleinen Volumina sowie an einzelnen Zellen oder einzelnen Molekülen eingesetzt werden, und sie sind für Hochdurchsatzexperimente geeignet. Dieser Aufsatz analysiert die Bedeutung dieser Eigenschaften im Hinblick auf neue biologische und chemische Experimente, wobei jüngste Fortschritte bei der Entwicklung von Apparaturen vorgestellt, aber auch verbleibende technologische Herausforderungen angesprochen werden. Anhand von Beispielen wird gezeigt, welche Vorteile die Kompartimentierung, die Monodispersität der Tröpfchen, die Betrachtung einzelner Moleküle und der hohe Durchsatz in Experimenten gebracht haben, die ohne den Einsatz von Mikrofluidiksystemen kaum möglich gewesen wären.

1. Einführung

Im Jahr 1954 beschrieb Joshua Lederberg in einer Veröffentlichung ein „einfaches Verfahren zur Isolierung einzelner Mikroben“.^[1] In einer Weiterentwicklung von de Fonbrunes Ölkammer-Methode, bei der Wassertröpfchen in Mineralöl gesprüht werden,^[2] gelang es ihm, einzelne Zellen in Nanolitertröpfchen einzuschließen. Wenige Jahre darauf bestätigten Nossal und Lederberg in einem bahnbrechenden *Nature*-Beitrag die Vermutung, dass jeder Lymphozyt einen bestimmten Antikörper produziert („one cell–one antibody“).^[3] In ihren Experimenten isolierten sie einzelne Lymphknoten, die sie sorgfältig wuschen und in Mikrotröpfchen unter Mineralöl mehrere Stunden lang aufbewahrten, bis messbare Antikörperkonzentrationen erreicht waren. Dann wurden Bakterien zugesetzt, und der Effekt der Zellen auf die Lebensfähigkeit der Bakterien wurde unter dem Mikroskop verfolgt.^[4] Einige Jahre später ließ Rotman eine kinetische Studie an einzelnen Enzymen in Tröpfchen folgen. Dazu wurde einfach eine hochverdünnte wässrige β -D-Galactosidase-Lösung in Öl dispergiert, und der enzymatische Umsatz wurde fluoreszenzmikroskopisch ermittelt (Abbildung 1).^[5]

Lederberg sah Anwendungsmöglichkeiten für Mikrotröpfchen in vielfältigen Studien mit kleinen Kulturvolumina und erhoffte für seine Methode einen routinemäßigen Einsatz in Laboratorien aller Art. Bis dahin sollten aber nach dem Nachweis der Kompartimentierung von Zellen – ihrer Abtrennung durch Einschluss – und der Untersuchung enzymatischer Reaktionen in Mikrotröpfchen noch fast 50 Jahre vergehen. Dies lag einerseits daran, dass solche Experimente extrem arbeitsintensiv waren und nur geringe Durchsätze ergaben; daher kamen in einem Zeitraum von zehn Jahren nur einige hunderte Experimente zusammen. Andererseits standen keine Digitalkameras zur Verfügung, und die Nachweisverfahren für Fluoreszenz waren deutlich weniger empfindlich als heute. Und schließlich brachte erst der Eintritt ins „omik“-Zeitalter einen gesteigerten Bedarf für Experimente im kleinstmöglichen Maßstab (wenn möglich an einzelnen

Zellen oder Molekülen) mit hohem Durchsatz und in Parallelformaten. Auf lithographisch erzeugten, und somit hoch reproduzierbaren und definierten Mikrofluidikchips gelingt die hierfür erforderliche Manipulation kleiner Volumina. Immer mehr Forscher untersuchen daher ihre Reaktionen in Mikrotröpfchen in Mikrofluidiksystemen.^[6]

Dieses Teilgebiet der Mikrofluidik, das auch als segmentierte, Tropfen- oder Zweiphasen-Mikrofluidik bezeichnet wird, unterscheidet sich von der „digitalen Mikrofluidik“, in der einzelne Tröpfchen, typischerweise in Luft, durch Elektrobenetzung adressiert werden. Bei der digitalen Mikrofluidik lassen sich die Tröpfchen zwar mit unerreichter Präzision manipulieren, allerdings auf Kosten der Tröpfchenzahl und in deutlich komplizierteren Apparaturen.^[7,8]

Aus dem Inhalt

1. Einführung	5983
2. Was kennzeichnet Mikrotröpfchen in Mikrofluidiksystemen?	5984
3. Technische Herausforderungen und Fortschritte	5986
4. Online-Charakterisierung von Reaktionen in Tröpfchen	5992
5. Zellen in Tröpfchen	5995
6. In-vitro-Transkription und -Translation	5997
7. Polymerasekettenreaktion in Tröpfchen	5997
8. Chemische Synthesen in Tröpfchen	5998
9. Polymer- und Gelpartikel	6000
10. Zusammenfassung und Ausblick	6001

[*] A. B. Theberge, Dr. F. Courtois, Y. Schaerli, Dr. M. Fischlechner, Prof. Dr. C. Abell, Prof. Dr. W. T. S. Huck
Department of Chemistry, University of Cambridge
Lensfield Road, Cambridge, CB2 1EW (Großbritannien)
E-Mail: wtsh2@cam.ac.uk

Dr. F. Courtois, Y. Schaerli, Dr. F. Hollfelder
Department of Biochemistry, University of Cambridge
80 Tennis Court Road, Cambridge, CB2 1GA (Großbritannien)
Prof. Dr. W. T. S. Huck
Radboud University Nijmegen, Institute for Molecules and Materials
Heyendaalseweg 135, 6525 AJ Nijmegen (Niederlande)
E-Mail: w.huck@science.ru.nl

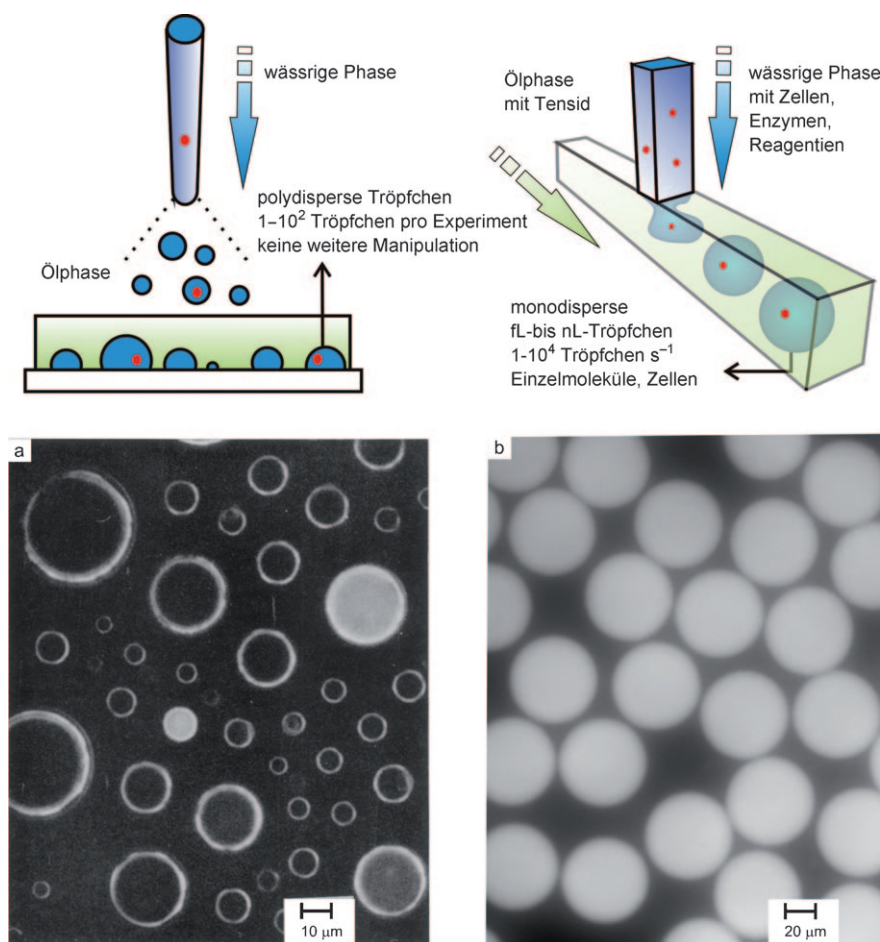


Abbildung 1. Oben: Tropfenbildung mit herkömmlicher Technik (links) und in einem Mikrofluidiksystem (rechts). Die Mikroskopiebilder (a) und (b) zeigen das Ergebnis der beiden Verfahren. a) Rotmans klassisches Experiment: kinetische Messungen an einzelnen Enzymen in Mikrotröpfchen, die in Öl dispergiert sind. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [5]. b) Monodisperse fL- bis nL-Tröpfchen aus einem Mikrofluidiksystem für biologische und chemische Experimente.

In diesem Aufsatz werden wir nur Mikrotröpfchen in Mikrofluidiksystemen betrachten, wobei grundsätzlich jedes Tröpfchen einem klassischen chemischen Reaktionskolben entspricht. Gegenüber solchen Kolben haben die Tropfen aber die physikalischen Vorteile eines geringeren Reagenzienverbrauchs, schnellerer Durchmischung, Automatisierbarkeit und einer kontinuierlichen (anstelle einer diskonti-

nuierlichen) Verfahrensweise.^[9–11] Nachdem schon ausführliche Über-sichten zu Tröpfchen in Mikrofluidiksystemen vorliegen,^[6,12–14] werden wir uns auf aktuelle Fortschritte konzentrieren. Im Mittelpunkt stehen dabei die deutlich ausgefeilteren Apparaturen, in denen Mikrotröpfchen nun gehandhabt werden können, und die bemerkenswerte Auswahl an Untersuchungsverfahren für den Inhalt der Tröpfchen.

Lederberg und Rotman haben die Eignung von Mikrotröpfchen zur Untersuchung von Reaktionen in Femtolitervolumina sowie auf der Ebene einzelner Zellen oder gar einzelner Moleküle überzeugend nachgewiesen. Mikrotröpfchen in Mikrofluidiksystemen zeichnen sich vor allem dadurch aus, dass sie 1) einen Raum bieten, in dem Spezies oder Reaktionen isoliert betrachtet werden können, 2) monodispers und daher potenziell für quantitative Studien geeignet sind, 3) Untersuchungen in extrem kleinen Volumina sowie an einzelnen Zellen oder einzelnen Molekülen ermöglichen und 4) große Versuchsreihen unterstützen. Hier wollen wir die Bedeutung dieser Merkmale im Hinblick auf neue biologische und chemische Experimente herausarbeiten. Wir werden auf jüngste Fortschritte bei der Entwicklung von Apparaturen hinweisen, die solche



Wilhelm Huck ist Professor für makromolekulare Chemie an der University of Cambridge und seit Januar 2010 auch Professor für physikalische organische Chemie an der Radboud-Universität Nijmegen (Niederlande). Seine Forschungsinteressen umfassen weiche Nanomaterialien, die Oberflächenmodifizierung mit Polymerbürsten und Polymere für die Photovoltaik. Mit seiner neuen Gruppe in Nijmegen wird er den Einfluss von Grenzflächen und Verkapselungsphänomenen auf chemische Reaktionen mithilfe von Mikrotröpfchen untersuchen und neue Verfahren für quantitative biologische Studien in Mikrotröpfchen entwickeln.

2. Was kennzeichnet Mikrotröpfchen in Mikrofluidiksystemen?

2.1. Kompartimentierung

Das Konzept der Kompartimentierung chemischer Reaktionen – die Betrachtung von Reaktionen in einem abgeschlossenen Raum, hier in einem Mikrotröpfchen – lässt sich auf eine große Bandbreite von Experimenten anwenden. Jedes Mikrotröpfchen ist mit allen erforderlichen Reaktanten beschickt und zeigt das Ergebnis des Experiments. Dabei ist man nicht auf Moleküle beschränkt – auch Experimente mit

ganzen Zellen oder gar lebenden Organismen in Tröpfchen wurden entwickelt, bei denen Konzentrationsänderungen gelöster Stoffe in der Umgebung der Zelle gemessen und mit bestimmten Ereignissen im Zellinneren korreliert werden können. Beim Einsatz von Mikrotröpfchen werden Experimente im Grunde genommen in mikroskopische Bereiche aufgespalten, die durch eine nicht mischbare Trägerphase voneinander getrennt sind. Die größte kommerzielle Bedeutung haben Mikrotröpfchen (in herkömmlichen Emulsionen) in der Emulsions-PCR erlangt, auf der „Hochdurchsatz-Sequenzierungssysteme der nächsten Generation“, z.B. der Genome Sequencer FLX (Roche) und SOLiD (ABI), beruhen.^[15,16] Einige Mikrofluidiksysteme für PCR-Experimente in Tröpfchen wurden vor kurzem beschrieben (siehe Abschnitt 7). Einen Eindruck vom Potenzial der Mikrotröpfchen (wenn auch nicht in Mikrofluidiksystemen, sondern in herkömmlichen Emulsionen) gibt die Kompartimentierung von Phänotyp und Genotyp *in vitro*.^[17] Dabei sind Genotyp und Phänotyp miteinander verknüpft, und zwar nicht durch Einschluss von Genen in Zellen, sondern durch Einschluss in den Mikrotröpfchen einer Wasser-in-Öl-Emulsion. Mithilfe von dispergierten Tröpfchen ist es gelungen, bindende und katalytische Proteine aus großen Genbibliotheken auszuwählen (mit etwa 10^9 Komponenten)^[18,19] und DNA-Polymerasen mit neuen Eigenschaften zu erzeugen.^[20,21] Dieses Konzept wurde in die Mikrofluidik übertragen durch den gemeinsamen Einschluss von Plasmid-DNA und einem käuflichen *In-vitro*-Transkriptions- und Translationssystem in Wassertröpfchen. Entsprechende Systeme konnten die Mikrotröpfchen bilden und stundenlang speichern, sodass die Proteinexpression ausgehend von einem einzigen DNA-Templat gelang. Dadurch entstanden „monoklonale Tröpfchen“, in denen Genotyp und Phänotyp verknüpft waren.^[22]

2.2. Quantitative Messungen mit monodispersen Tröpfchen

Frühe Experimente in Tröpfchen hatten mit einem grundsätzlichen Nachteil von Emulsionen zu kämpfen: Die Tröpfchen waren polydispers, sodass die einzelnen Experimente in unterschiedlichen Volumina stattfanden. Folglich wichen die Reaktionsbedingungen deutlich voneinander ab, weil die Konzentrationen der Reagentien und Produkte nicht über ein einheitliches Volumen festgelegt waren. Daher war ein quantitativer Vergleich von Experimenten in emulgierten Tröpfchen nicht leicht, und obwohl Screenings in solchen Tröpfchen möglich waren, ließ deren Genauigkeit doch zu wünschen übrig.

In Mikrofluidiksystemen werden dagegen hoch monodisperse Mikrotröpfchen erhalten (mit einer Polydispersität des Durchmessers von etwa 1 %).^[23,24] Weil überdies die Analyse von Reaktionen in den Tröpfchen einer Emulsion eine geraume Zeit beansprucht, werden die einzelnen Tröpfchen nach unterschiedlichen Reaktionszeiten analysiert. In Mikrofluidikformaten ist dieses Screening nicht wesentlich schneller, doch kann man die Tröpfchen der Reihe nach betrachten, sodass der Zeitabstand zwischen Tröpfchenbildung und Analyse jeweils gleich ist. Zusätzlich können die Tröpfchen mithilfe von integrierten Nachweisverfahren (z.B. durch

Fluoreszenzmessung) zu bestimmten Zeitpunkten direkt auf dem Chip analysiert werden. Der Vorteil eines Mikrofluidiksystems liegt auf der Hand: Weil monodisperse Tröpfchen auf einem Chip gebildet werden und die Reaktionen zum Zeitpunkt dieser Tröpfchenbildung (oder einer Tröpfchenverschmelzung) einsetzen, sind alle Tröpfchen bezüglich der Konzentrationen und ihrer „Vorgeschichte“ identisch. Die Möglichkeit eines direkten Vergleichs zwischen Tröpfchen ist ein wichtiger Vorteil bei Studien an einzelnen Zellen oder Molekülen, in denen statistische Schwankungen die detaillierte Analyse und Verschmelzung der Daten aus einer großen Zahl an Experimenten erforderlich machen.^[25]

2.3. Kleine Volumina, empfindliche Nachweise

Das Volumen der Tröpfchen liegt normalerweise im Femto- bis Nanoliterbereich (10^{-15} – 10^{-9} L). Daher ist der Reagentienverbrauch sehr gering, was auch Screenings und Analysen von wertvollen Verbindungen ermöglicht. Weil sich das Volumen und die Salz- und Makromolekülkonzentration in Tröpfchen einstellen lassen, sind diese auch ideal geeignet, um die besten Bedingungen für eine Proteinkristallisation herauszuarbeiten.^[26,27] Das große Oberfläche/Volumen-Verhältnis der Tröpfchen und innere Flüsse, die durch Scherkräfte und Unterschiede in den Flussgeschwindigkeiten von Trägerphase und Tröpfchen zustandekommen, führen außerdem zu einem effizienten Masse- und Wärmetransfer zwischen der Trägerphase und der inneren Phase.^[28] Die chemische Analyse kleiner Tröpfchen, die sich in schneller Folge durch Kanäle bewegen, ist eine Herausforderung, die neue analytische Verfahren erforderlich gemacht hat (siehe Abschnitt 4). Man sollte sich auch bewusst sein, dass Experimente mit geringen Mengen nicht notwendigerweise mit verdünnten Proben gleichzusetzen sind. Durch den Einschluss einzelner Zellen in Tröpfchen wird die Zelldichte erhöht. Freigesetzte Moleküle können sich in dieser Umgebung in Zellnähe akkumulieren, wodurch ihre Konzentration rasch ansteigt und sie schneller nachgewiesen werden können.

2.4. Schnelle Reaktionen, große Tröpfchenzahlen

Bei den meisten Experimenten in Mikrofluidiksystemen werden die Mikrotröpfchen mit Frequenzen von 0.1–2 kHz gebildet. Diese Geschwindigkeiten sollten für die Untersuchung von enzymatischen Reaktionen oder für zellbasierte Screenings eine vollkommen ausreichende Auflösung ergeben. Der Wunschwert für die Tröpfchenbildungsfrequenz in Mikrofluidiksystemen orientiert sich aber an der Geschwindigkeit moderner Flusszytometer, die 70000 Zellen pro Sekunde analysieren und sortieren können. Das elektrochemische Verschmelzen von Tröpfchen wurde genutzt, um Reagentien in kontrollierter Weise zusammenzuführen.^[29] Der Verschmelzungsprozess dauert nicht länger als 100 μ s,^[30] doch für das anschließende Mischen der Reagentien sind einige Millisekunden hinzuzurechnen, selbst wenn die Tröpfchen durch einen gewundenen Kanal geführt werden, um durch chaotische Advektion eine homogene Lösung zu erhalten.^[9,31]

3. Technische Herausforderungen und Fortschritte

Die intensive Erforschung von Mikrotröpfchen in Mikrofluidiksystemen während der vergangenen fünf Jahre hat eine Reihe von Methoden zur Bildung, Verschmelzung und zum Sortieren kleiner Tröpfchen hervorgebracht (Abbildung 2). Einige Übersichten geben bereits einen umfassenden Überblick zu den technischen Aspekten dieses Forschungsfelds.^[6,14,32–35] Um komplizierte (bio)chemische oder biologische Experimente im Mikrotröpfchenformat auszuführen, benötigt man hochgradig integrierte Systeme. Hier stellen wir Fortschritte bei der Tröpfchenmanipulation vor, und wir verweisen auf verbleibende Probleme, die vor der erfolgreichen Umsetzung komplizierter Experimente noch gelöst werden müssen. Die Kombination verschiedener Module in integrierten Systemen setzt eine sehr kontrollierte Tröpfchenbildung und -manipulation voraus. Auch sind bei den meisten Experimenten zusätzliche Trenn- und Reinigungsschritte unumgänglich, und schließlich benötigt man eine Palette an analytischen Verfahren, um den Inhalt der Tröpfchen bei sehr hohem Durchsatz quantitativ zu erfassen. Im folgenden Abschnitt werden die wichtigsten technischen Herausforderungen bei Experimenten mit Tröpfchen in Mikrofluidiksystemen diskutiert.

3.1. Tröpfchenerzeuger

Für die Bildung monodisperser Tröpfchen (<1–3% Dispersität) mit Frequenzen um 10 kHz stehen mit T-Kreuzungen^[23,36,37] und Flussfokussierern^[38] zwei etablierte Konfigurationen zur Verfügung. Garstecki und Mitarbeiter zeigten,^[39] dass die Zerteilungsdynamik im beschränkten Raum eines mikrofluidischen Flussfokussierers gänzlich durch die Geschwindigkeit des kontinuierlichen Flusses bestimmt wird. Solche Geräte liefern einheitliche Tröpfchen, weil es immer gleich lange dauert, bis der durch die Düse erzeugte Flüssigkeitsfaden kollabiert, und weil es sich bei diesem Kollaps um einen langsamen Prozess handelt, während sich schnell ein Gleichgewicht zwischen Oberflächenspannung und hydrostatischem Druck einstellt.

Einige Forschungsgruppen haben eine Strahlzerteilung als Möglichkeit zur Tröpfchenbildung in Erwägung gezogen. Utada et al.^[40] untersuchten zwei Arten von Tropfen-Strahl-Übergängen in koaxialen Flüssen – einerseits bedingt durch einen schnelleren Fluss der kontinuierlichen Phase, andererseits durch einen schnelleren Fluss der inneren Phase. Qualitativ unterscheiden sich beide Fälle deutlich: Der erste ergibt einen Strahl, der sich entlang des Kanals verjüngt, bis er in kleine Tröpfchen zerfällt; der zweite resultiert in deutlich größeren Tröpfchen, die sich vom Ende eines breiter werdenden Strahls abteilen. Die Erzeugung monodisperser Tröpfchen durch Strahlbildung ist eine anspruchsvolle Aufgabe, aber man kann die Flussparameter und Kanalabmes-

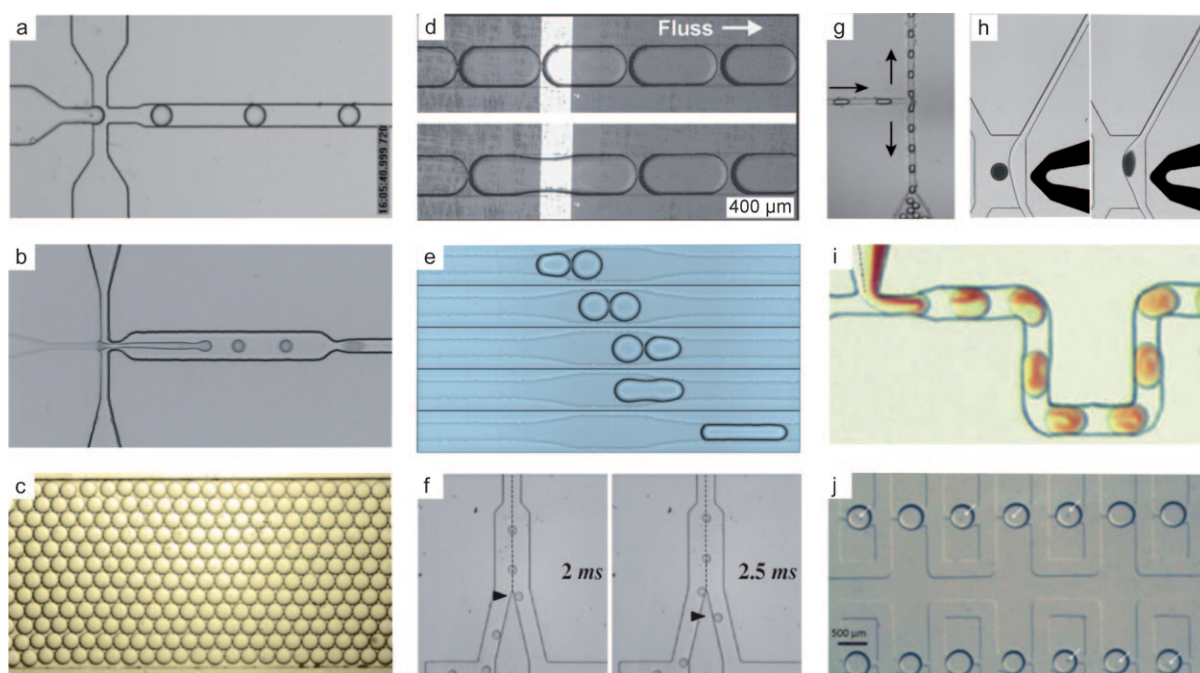


Abbildung 2. Häufige Tröpfchenmanipulationen: a) Tröpfchenbildung in einem Flussfokussierer. b) Tröpfchenbildung durch Strahlbildung in einem Flussfokussierer. c) Verengungskanal/Reservoir (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [74]). d) Tröpfchenverschmelzung im elektrischen Feld (Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [30]). e) Passive Tröpfchenverschmelzung, induziert durch die Kanalform (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [81]). f) Sortieren von Tröpfchen im elektrischen Feld (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [113]). g) Tröpfchenaufspaltung an einer Kanalverzweigung (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [37]). h) Trennung einer Emulsion im elektrischen Feld (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [119]). i) Durchmischen des Tröpfcheninhalts in einem gewundenen Kanal (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [31]). j) Lagerung von Tröpfchen (Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [61]).

sungen so wählen, dass in jedem Fall eine absolute Instabilität auftritt, die ein kontrolliertes Auseinanderbrechen nach sich zieht.^[41] Um Tröpfchen aus einem Strom zu erzeugen, können außerdem zusätzliche Hindernisse in den Kanal eingeführt werden. Stößt ein stabiler Strahl auf ein solches Hindernis, so zerbricht die innere Phase in Tröpfchen.^[42]

Mithilfe von Strahlverfahren konnten Tröpfchen mit Frequenzen über 10 kHz erzeugt werden, sodass Hochdurchsatz-Experimente denkbar sind. Für das Screening großer Bibliotheken oder das Sortieren von Zellpopulationen in Tröpfchen wären aber mindestens um eine Größenordnung höhere Geschwindigkeiten wünschenswert. Überdies ist das Gesamtvolumen der so produzierten Emulsionen gering. Die Tröpfchenbildungsgeschwindigkeit stellt somit eine Beschränkung für Anwendungen wie die Partikelbildung auf Chips dar.^[43] Die Tröpfchenbildung lässt sich um ein Vielfaches beschleunigen, wenn mithilfe von Membranen oder Sieben zahlreiche Tröpfchen gleichzeitig erzeugt werden. Bei der Membranemulsifizierung entstehen die Tröpfchen durch Dispergieren einer Lösung in eine kontinuierliche Phase durch eine Membran oder ein Sieb, die dabei prinzipiell wie eine Anordnung von T-Kreuzungen wirken.^[44] Durch Verwendung nichtzylindrischer Poren wird die zu dispergierende Phase gezwungen, im Mikrokanal die Form einer verzerrten Scheibe einzunehmen. Dadurch wird die Oberfläche vergrößert, und mindestens ein Krümmungsradius ist kleiner als bei der Kugelform, die in einer Vertiefung vorliegt. Auf diesem Weg lässt sich die Tröpfchengröße strikt durch die Porengröße vorgeben (1–50 µm).^[45,46]

Ein potenziell stark störendes (und oft nicht berücksichtigtes) Phänomen beim Einsatz von Mikrotröpfchen in Mikrofluidiksystemen ist die instabile Tröpfchenbildung unter den wechselnden Druckverhältnissen beim Befüllen des Systems.^[47] Jede Änderung der Flussgeschwindigkeit wirkt sich auf Frequenz, Zusammensetzung, Größe und Geschwindigkeit der Tröpfchen aus. Folglich entstehen zunächst polydisperse Tröpfchen, und erst wenn sich der Fluss stabilisiert hat, werden monodisperse Tröpfchen erhalten. Für Systeme mit Tröpfchenfallen in den Kanälen (siehe Abschnitt 3.5) oder Studien an kleinen Volumina von wertvollen Reagentien bedarf es einer zuverlässigeren Tröpfchenbildungsmethode.

Wenn es nicht auf einen hohen Durchsatz ankommt, bietet die Tröpfchenbildung „nach Bedarf“ eine Möglichkeit, ein System mit perfekt monodispersen Tröpfchen zu versorgen. Diese Art der Tröpfchenbildung beruht auf plötzlichen Druckänderungen in Kombination mit einer verengten Flussfokussierzone und einem schnellen Abreißen des Wasserflusses vom entstehenden Tröpfchen.^[48,49] Chiu und Mitarbeiter erzeugten in Mikrofluidikkanälen auch einzelne Wassertröpfchen mit Femto- bis Pikolitervolumina in Öl, indem sie die Wasser-Öl-Grenzfläche kurzen Millisekunden-Hochspannungspulsen im kV-Bereich aussetzten.^[50] Diese Behandlung führte zur Bildung eines Wasserstrahls, der infolge Rayleigh-Instabilität abbricht. Stärke und Dauer des Pulses bestimmen gemeinsam mit den Abmessungen des Mikrokanals die Größe des resultierenden Tröpfchens.^[51] Alternativ lässt sich die Tröpfchenbildung durch einen piezoelektrischen Aktuator auf dem Chip genau steuern.^[52]

Unabhängig von Aufbau des System und der Flussgeschwindigkeit kann die Tröpfchengröße auch durch die Einführung von Heizelementen an bestimmten Stellen verändert werden. Eine Temperaturänderung wirkt sich auf die Grenzflächenspannung und die Viskosität aus, die wiederum den Tröpfchendurchmesser in einem Flussfokussierer beeinflussen.^[53,54]

3.2. Kompartimentierte Reagentien

Schon Rotman und Lederberg konnten nachweisen, dass ein einfaches Verdünnen eine effektive Methode sein kann, um einzelne Enzyme oder Zellen in Tröpfchen einzuschließen. Nach einem ähnlichen Prinzip ist dies in Mikrofluidiksystemen für Zellen,^[55,56] DNA-Moleküle^[57,58] und ganze Organismen gelungen.^[59–61] Der Verdünnungsansatz ist wirkungslos für niedermolekulare Substanzen, weil keine Verfüllungsoperation vor der Analyse zur Verfügung steht. Im Fall von DNA gelingt dies beispielsweise durch die Exprimierung zahlreicher Proteine – einschließlich Enzymen, die viele Substrat- in Produktmoleküle umwandeln können. Es ist eine sehr schwierige Aufgabe, eine Bibliothek aus Tröpfchen aufzubauen, die jeweils eine andere Verbindung enthalten. Chiu und Mitarbeiter haben einen eleganten Lösungsansatz vorgeschlagen.^[62,63] Indem man den Auslass einer Kapillarelektrophorese-Säule mit dem Einlass für die wässrige Phase an ein Mikrofluidiksystem koppelt, können Mischungen potenziell getrennt und die Fraktionen mit den reinen Verbindungen anschließend in Tröpfchen eingeschlossen werden. Alternativ können Tröpfchen, die ein gewünschtes Solut enthalten, gebildet und für spätere Anwendungen gespeichert werden. Durch Kombination bestimmter Mengen an gespeicherten Tröpfchen unterschiedlichen Inhalts lassen sich dann Experimente ausführen. Dieses Konzept nutzte Raindance Technologies beim Screening einer Wirkstoffbibliothek auf Toxizität gegen U937-Zellen mithilfe optisch kodierter Tröpfchen.^[64]

Der passive Einschluss einzelner Zellen oder Partikel durch Verdünnen führt gemäß einer Poisson-Verteilung zur Bildung von leeren Tröpfchen und solchen mit einer, zwei und mehr Zellen. Ein großer Anteil leerer Tröpfchen und ein entsprechend verringerter produktiver Durchsatz lassen sich also nicht vermeiden. Chabert und Viovy nutzten aber eine zellvermittelte Plateau-Rayleigh-Instabilität in einem Flussfokussierer, um beim Aufbrechen eines Strahls einzelne Zellen in Tröpfchen einzuschließen. So wurden 70–80 % der Zellen in Tröpfchen mit genau einer Zelle eingeschlossen, und weniger als 1 % der Tröpfchen war leer; allerdings konnten nur 10² Tröpfchen pro Sekunde gebildet werden.^[65] Toner und Mitarbeiter^[66] setzten beim Einschluss einzelner Zellen auf eine Selbstorganisation der Zellen vor der Tröpfchenbildung. Zu einer Selbstorganisation kommt es dann, wenn eine konzentrierte Suspension von Zellen oder Partikeln schnell durch einen Mikrokanal geschleust wird, dessen Weite den Partikeldurchmesser nicht deutlich übersteigt (Abbildung 3). Weil sich die Zellen oder Partikel mit gleichmäßigen Abständen entlang des Kanals bewegen, fällt die Tröpfchenbildung mit dem Eintreten einer Zelle in den Flussfokussierer zusammen. Praktisch jedes Tröpfchen ent-

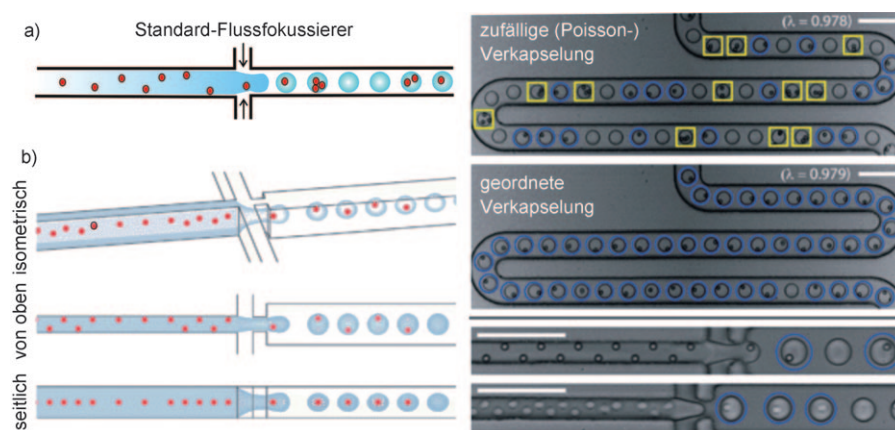


Abbildung 3. Poisson-Statistik und wie man sie umgeht, um Tröpfchen zu erzeugen, die jeweils einzelne Partikel enthalten. a) Zufällige Verkapselung führt zu leeren Tröpfchen sowie zu Tröpfchen mit einem (blaue Kreise) oder mehreren Partikeln (gelbe Quadrate). b) Hydrodynamische Wechselwirkungen können dazu führen, dass sich fließende Partikel selbstorganisiert entlang einer Seite des Mikrokanals oder alternierend anordnen. Ihr gleichmäßiger Abstand in Flussrichtung (erkennbar in der Seitenansicht) führt zur Bildung von Tröpfchen mit einzelnen Partikeln, wenn zwei seitlich einströmende Ölflüsse den Wasserfluss in Tröpfchen zerteilen (isometrische Ansicht), wobei die Tröpfchenbildungsfrequenz mindestens genauso hoch sein muss wie die Frequenz, mit der die Partikel an der Verzweigung eintreffen. Die geordnete Verkapselung von Kügelchen erzeugt mehr Tröpfchen mit einzelnen Partikeln und weniger leere Tröpfchen als eine zufällige Verkapselung. Maßstab 200 μm . Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [66].

hält deshalb genau eine Zelle, und die Probleme durch Poisson-Statistik werden vermieden. Die Idee einer kontrollierten Verkapselung vorgeordneter Partikel oder Zellen kann auch auf Gelkügelchen angewendet werden.^[67] Weiche Gelpartikel verstopfen entweder die Düse und führen dadurch die Tröpfchenbildung unter Kompartimentierung herbei, oder die Partikel wurden zuerst dicht gepackt und anschließend in Wasser-in-Öl-Tröpfchen geladen; dazu wurden Systeme verwendet, die auch effizient hierarchische Emulsionen und Mehrfachemulsionen bilden.^[68]

Beim Einschluss einzelner Zellen in kleinen Tröpfchen lässt sich die Zelldichte effektiv erhöhen. Durch Tröpfchenbildung wird eine verdünnte Lösung in viele kleine Teile (die Tröpfchen) aufgespalten, die zumeist leer sind, aber in einigen Fällen einzelne Zellen enthalten. Für eine Zelle in einem Pikolitertröpfchen ergibt sich also eine deutlich höhere Konzentration als in der ursprünglichen Zellsuspension. Moleküle, die von einer solchermaßen eingeschlossenen Zelle freigesetzt werden, verbleiben in deren Umgebung im Tröpfchen, sodass sie schneller nachweisbar sind. Ein System mit diesem Konzept wurde genutzt, um die Empfindlichkeit von Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA) gegen mehrere Antibiotika in einem einzigen Experiment zu prüfen, und um die minimale inhibitorische Konzentration (MIC) von Cefoxitin gegen diese Zelllinie zu ermitteln.^[69]

3.3. Tenside

Ungeachtet des hier verwendeten Begriffs „Mikrotröpfchen“, der sich auf die mikrometergroßen Tröpfchen bezieht, handelt es sich bei den kolloidalen Dispersionen um Makroemulsionen, und diese sind definitionsgemäß metastabil. Um

Tröpfchen zu bilden, bedarf es keiner Tenside, doch ohne stabilisierende Reagentien verschmelzen die Tröpfchen in den Systemen rasch. Auch in Gegenwart von Tensiden sind die Tröpfchen nicht als hermetisch versiegelte Behälter zu verstehen, weil kleine Moleküle – in Abhängigkeit von der Art des Tensids und der Hydrophilie/Lipophilie der eingeschlossenen Moleküle – durch die Tensidschicht in das Öl hinaus diffundieren können.^[70] Bei der Wahl des Tensids sind sowohl die Art der kontinuierlichen Phase (bei Wasser-in-Öl-Emulsionen ist dies typischerweise ein Paraffin- oder Fluorkohlenstofföl) als auch die geplanten Experimente im Tröpfcheninneren zu berücksichtigen. Für Mineralöle wurden am häufigsten käufliche Tenside wie Span 80 und Abil EM verwendet, wohingegen für fluoridierte Öle Krytox (von Dupont) gewählt wurde, das eine Perfluorpolyether-(PFPE)-Schwanzgruppe und eine

hydrophile Carbonsäure-Kopfgruppe enthält. Fluoridierte Öle haben als kontinuierliche Phase viele Vorteile gegenüber herkömmlichen Paraffinölen – z.B. eine höhere Durchlässigkeit für Sauerstoff und eine geringe Mischbarkeit mit organischen Verbindungen –, doch bis vor kurzem standen nur wenige geeignete Tenside zur Verfügung. In den vergangenen Jahren wurden aber neuartige fluoridierte Tenside entwickelt, dank deren verbesserter Tröpfchenstabilisierung und Bioverträglichkeit nun vermehrt biologische und chemische Experimente in Mikrotröpfchen möglich sind.

Vor jedem biologischen Experiment muss die Verträglichkeit der Reagentien aufs Neue getestet werden. Beispielsweise verhindern Tenside mit Oligoethylenglycol-Endgruppen die nichtspezifische Adsorption von Proteinen an Wasser-Öl-Grenzflächen.^[71] Dies ist ein wichtiger Punkt, weil das große Oberfläche/Volumen-Verhältnis in Tröpfchen den Ausgang von enzymatischen Reaktionen beeinflussen kann. Die Bildung von Tröpfchen durch Abspaltung aus größeren Tropfen führt zu einer Umverteilung der Tensidmoleküle an der Grenzfläche, was auch die Passivierung der Grenzfläche gegen die nichtspezifische Proteinbindung betrifft. Die Aktivität von β -Galactosidase fiel mit abnehmender Tröpfchengröße ab, weil Adsorption und Inaktivierung des Enzyms an der Grenzfläche an Bedeutung gewannen.^[72] Eine gezielte Proteinadsorption an der Tröpfchengrenzfläche kann genutzt werden, um den Mechanismus der Proteinaggregation, die etwa bei Amyloiderkrankungen eine Rolle spielt, aufzuklären. In einem Mikrofluidiksystem wurde die Aggregation von A β_{40} in Tröpfchen untersucht, deren Fluorid-wässrig-Grenzfläche durch ein proteinabweisendes fluoridiertes Tensid mit OEG-Teil geschützt war.^[73] Der Aggregationsprozess wurde deutlich verlangsamt, sodass hierin eine effektive Methode zur Minimierung von Grenzflächeneffekten bei der Unter-

suchung anderer Faktoren der Proteinaggregation bestehen könnte.

Die Bioverträglichkeit von PFPE-Tensiden mit verschiedenen hydrophilen Kopfgruppen (Abbildung 4) wurde von Clausell-Tormos et al. untersucht.^[60] Tenside mit Ammoniumcarboxylat-PFPE und Poly-L-lysine als Kopfgruppen bewirkten die Lyse von HEK293T-Zellen, in Gegenwart von Tensiden mit Polyethylenglycol(PEG)- und Dimorpholinophosphat(DMP)-Gruppen wuchsen und vermehrten sich entsprechende Kulturen dagegen ähnlich wie Kontrollpopulationen ohne Tensid. Mit DMP-PFPE-Tensid in einem fluorierten Öl wurden Zellen in Tröpfchen auf einem Mikrofluidikchip eingeschlossen. Solche Emulsionen konnten vom Chip entfernt, 14 Tage gelagert und wieder in das Mikrofluidiksystem injiziert werden. Der Umstand, dass nach 14 Tagen weniger als 10 % der Tröpfchen verschmolzen waren, belegt, dass das Tensid bioverträglich ist und außerdem stark stabilisierend wirkt.

Holtze et al.^[74] synthetisierten eine Reihe von PEG-PFPE-Tensiden, wobei sie einen Kompromiss zwischen verschiedenen Erfordernissen für die Bildung und Stabilisierung von Tröpfchen in Mikrofluidiksystemen suchten. Die PEG- und PFPE-Komponente der Tenside müssen groß genug sein, um dichte Bürsten an der Tröpfchengrenzfläche zu bilden, die die Tröpfchen stabilisieren und ihr Verschmelzen verhindern. Dieselben Tensidmoleküle müssen aber auch klein genug sein, um bei Tröpfchenbildungsfrequenzen von 1–10 kHz schnell durch das Öl zu den Grenzflächen diffundieren zu

können. Tenside mit einer kritischen Micellbildungskonzentration (CMC) von 10^{-4} mol L⁻¹ oder darüber ordnen sich am effizientesten an der Tröpfchengrenzfläche an. In Tests zur Emulsionsbeständigkeit bei unterschiedlich langen PEG- und PFPE-Ketten schnitt ein Tensid mit 600 g mol⁻¹ PEG und 6000 g mol⁻¹ PFPE (Abbildung 4) am besten ab. Mit Frequenzen von 30 kHz wurden stabile Tröpfchen gebildet, die abseits des Chips gespeichert und erneut injiziert werden konnten. Das Tensid war außerdem bioverträglich, sodass sowohl die In-vitro-Transkription und -Translation von Plasmid-DNA als auch das Kultivieren von Hefe- und Säugerzellen in den Tröpfchen gelangen.

Tenside mit einem Nitrilotriacetat(NTA)-Nickel-Komplex als Kopfgruppe und einer perfluorierten C₈-Schwanzgruppe, die über eine OEG-Brücke verknüpft sind (Abbildung 4c), bildeten Tröpfchengrenzflächen, an denen sich Histidin-markierte Proteine sammeln.^[75] Im Fall von His-markiertem grün fluoreszierendem Protein (hGFP) zeigte ein erneutes Auftreten der Fluoreszenz nach Photozerstörung (FRAP), dass die Grenzfläche immer noch beweglich und dadurch gegenüber herkömmlichen selbstorganisierten Monoschichten (SAMs) im Vorteil war. Die erhöhte Proteinkonzentration an der Tröpfchengrenzfläche führt zu einer lokalen Übersättigung, was für die Kristallisation von His₆-markierten Membranproteinen genutzt wurde.

Mikrofluidiksysteme, in denen die Tröpfchenmanipulation zeitlich genau abgestimmt werden kann, wurden zur Messung der Zeitdauer angewendet, bis eine Passivierung von Grenzflächen durch Tenside eintritt.^[76] In Kanälen mit unterschiedlichen Weglängen zwischen dem Ort der Tröpfchenbildung und einer Verbreiterung, die ein Verschmelzen ermöglichen soll, lässt sich ermitteln, wie viel Zeit benötigt wird, bis sich das Tensid an der Tröpfchengrenzfläche anlagert. Die Bewegung von Tensiden in Mikrotröpfchensystemen wurde auch anhand eines Tensids analysiert, das zu fluoreszieren beginnt, sobald die Kopfgruppe die Grenzfläche zur wässrigen Lösung erreicht. Die Tensidadsorption tritt mit einer Verzögerung im Millisekunden- bis Sekundenbereich auf, die man leicht durch Einbau kurzer Verzögerungskanäle überbrücken kann, bevor die Tröpfchen in weitere Module überführt werden. Wang et al. untersuchten in einer ähnlichen Arbeit den Einfluss der dynamischen Oberflächenspannung auf die Tröpfchengröße. Im System Hexan/Wasser/Tween 20 nahm die Tröpfchengröße mit steigender Tween-20-Konzentration so lange ab, bis die Adsorption gesättigt war. Dieses Ergebnis bestätigt den Einfluss der Tensidadsorption auf die Tröpfchenbildung.^[77] Auf der Grundlage dieser Studien entwarfen Mazutis et al.^[78] ein Verfahren zur Tröpfchenverschmelzung, bei dem sie die Konzentration und Akkumulationszeit eines Tensids an der Tröpfchengrenzfläche variierten. Ihr Ziel war es, ein System für das passive Verschmelzen von Tröpfchenpaaren zu stabilen Tröpfchen zu entwickeln. Mit 4 Gew.-% des fluorierten Tensids EA (von RainDance Technologies, Lexington, MA) in dem fluorierten Öl FC-40 erzeugten sie zunächst stabile Tröpfchen, die außerhalb des Chips inkubiert und an-

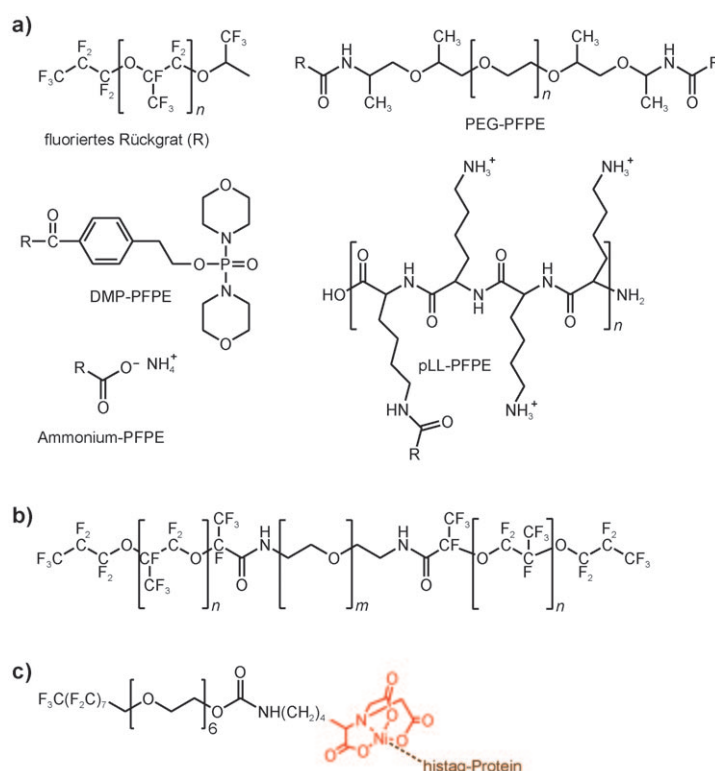


Abbildung 4. Fluorierte Tenside verbessern Bioverträglichkeit und Stabilität von Tröpfchen und erhöhen die Proteinkonzentration an der Tröpfchengrenzfläche. Wiedergabe nach Lit. [60], [74] und [75].

schließlich wieder injiziert werden konnten. Nachdem auf dem Chip mit EA in FC40 in niedrigerer Konzentration (0.55 Gew.-%; ausreichend für die reproduzierbare Tröpfchenbildung, aber nicht hoch genug, um das Verschmelzen auf Kontakt hin ganz zu vermeiden) instabile Tröpfchen gebildet worden waren, wurden die tensidstabilisierten Tröpfchen wieder injiziert. Auf dem Chip bildeten sich Paare aus diesen stabilen Tröpfchen und den instabilen Tröpfchen, die dann in einem Zickzack-Kanal verschmolzen wurden. Durch das zeitlich abgestimmte Injizieren von stabilisierendem Öl (2.8 Gew.-% EA in FC40) gelang es, genug Tensid an die Grenzfläche zu bringen, um ein unerwünschtes weiteres Verschmelzen der aus einem stabilen und einem instabilen Tröpfchen gebildeten Tröpfchen zu unterbinden, ohne den gewünschten ersten Verschmelzungsprozess zu stören. In dieser Arbeit wurde die Dynamik der Tensidadsorption in einem Mikrofluidiksystem beispielhaft genutzt, um ein bestimmtes Ergebnis zu erzielen.

3.4. Eine Reaktion beginnt: Verschmelzen von Tröpfchen

Das Verschmelzen, ein Grundschrift bei der Manipulation von Mikrotröpfchen, ist für ihre Anwendung als Mikroreaktoren wichtig, weil es ein räumlich und zeitlich genau definiertes Mischen von Reagentien ermöglicht. In Mikrofluidiksystemen erfolgt dieser Mischvorgang sehr schnell und reproduzierbar, was etwa bei der Nanopartikelsynthese von Vorteil sein kann.^[79]

Beim passiven Verschmelzen wird der Vorgang durch Eigenschaften des Kanals ausgelöst. Werden zwei oder mehr Tröpfchen in einem Kanal durch Entfernen der kontinuierlichen Phase in Kontakt gebracht,^[80] so können Schwankungen der Oberflächenspannung zum Verschmelzen führen. Bibette und Mitarbeiter analysierten diesen Prozess im Detail.^[81] In ihrem System wird ein Tröpfchen vor dem Eintritt in einen engeren Kanalabschnitt abgebremst und verschmilzt mit dem darauf folgenden Tröpfchen. Das Verschmelzen tritt dabei erst auf, wenn sich die aufeinander folgenden Tröpfchen schon wieder zu trennen beginnen, und nicht, wie man erwarten würde, beim ersten Zusammenstoß. Die Trennung führt zur Bildung von zwei Ausbuchtungen im Kontaktbereich. Dadurch werden die Grenzflächen verbunden, und es kommt zum Verschmelzen. Sogar durch Tenside stabilisierte Tröpfchenpaare können durch eine erzwungene Trennung destabilisiert werden.

Während sich die meisten Verfahren auf das Verschmelzen von zwei Tröpfchen beschränken, ist es derzeit noch nicht möglich, mehrere Tröpfchen kontrolliert zu verschmelzen. Fidalgo et al.^[82] beschrieben eine Methode zum Verschmelzen von Mikrotröpfchen mithilfe von Oberflächenenergiemustern im Inneren von Mikrofluidikkanälen, die den Fluss der Tröpfchen stören und diese an das Muster binden, von dem sie erst nach dem Verschmelzen wieder freigesetzt werden. Durch Variieren der Kanal- und Musterabmessungen und des Flusses lässt sich das Verschmelzen der Tröpfchen in einem Maß steuern, dass ein einziges großes Tröpfchen durch Verschmelzen mehrerer kleiner Tröpfchen gezielt mit verschiedenen Komponenten befüllt werden kann. Der Nachteil

dieses Verfahrens liegt in einer möglichen Kreuzkontamination über das Muster. Niu et al.^[83] führten Säulenreihen in die Kanäle ein, um ein definiertes passives Verschmelzen auszulösen. Die Säulen hielten die Tröpfchen zurück, während die kontinuierliche Phase abfließen und ein zweites Tröpfchen heranströmen konnte. Der Vorgang des Verschmelzens hängt weniger vom Abstand zwischen den Tröpfchen ab als von ihrer Größe, und die Zahl an Tröpfchen, die jeweils verschmolzen werden können, wird außerdem vom Massestrom und vom Volumenverhältnis von Tröpfchen und Verschmelzungskammer vorgegeben.

Aktive Verschmelzungsmethoden haben den Vorteil, dass der Prozess ein- und ausgeschaltet werden kann, aber sie erfordern auch eine genaue Synchronisation der Tröpfchen, die sehr nahe zusammengebracht werden müssen.^[84] Weil das Verschmelzen durch ein externes Signal ausgelöst wird, gestaltet sich die Herstellung solcher Systeme komplizierter. Verschmelzungsmodule nutzen meist starke elektrische Felder^[30, 85–88] oder ein örtliches Erhitzen durch Laserimpulse.^[89] Für ein effizientes elektrisches Verschmelzen müssen die betreffenden Tröpfchen nahe beieinander sein,^[29, 90, 91] obgleich kürzlich mit starken elektrischen Feldern auch eine Kaskade von Tröpfchenverschmelzungen entgegen der Flussrichtung beobachtet wurde.^[92] Aufgrund der Poiseuille-Strömung bewegen sich kleinere Tröpfchen schneller; diese Tatsache kann genutzt werden, um Paare aus Tröpfchen unterschiedlicher Größe in der Verschmelzungszone zu bilden und dort durch ein elektrisches Feld zu verschmelzen. Sollen die beiden Tröpfchenarten die Reagentien für eine Reaktion enthalten, so werden für praktische Anwendungen perfekt alternierende Tröpfchensequenzen benötigt, wie sie etwa die hydrodynamische Kopplung zweier Tröpfchenbildungskanäle liefert.^[93] Der hydrodynamische Widerstand kann genutzt werden, um den Teilchenfluss in zwei Kanälen mithilfe von passiven Strukturen wie Schleifen und Leitern zu synchronisieren,^[94, 95] oder um zwei Kanäle abwechselnd mit Tröpfchen zu versorgen, indem ein Tröpfchenfluss an einer T-Kreuzung symmetrisch aufgespalten wird.^[96, 97] Ein bemerkenswerter Effekt beim Durchlaufen einer T-Kreuzung besteht in der Reduktion des Hintergrundrauschens, was zu gleichmäßigeren Tröpfchenabständen führt.^[98]

Das Verschmelzen von Tröpfchen mit einer Oberfläche, wie in der „Chemistode“, ist eine neue Methode, um Reagentien in die benetzende Schicht auf einer Oberfläche einzubringen und von derselben Oberfläche freigesetzte Moleküle einzuschließen.^[99] Oberflächen können mit chemischen Impulsen bis hinab zu 50 ms untersucht werden. In Kombination mit Fluoreszenzbildgebung bewährte sich die „Chemistode“ bei der optischen Verfolgung des Calciumausstoßes von Maus-Inselzellen auf einer Oberfläche nach Stimulierung durch Tröpfchen mit hoher Glucosekonzentration.^[100]

3.5. Während des Experiments: wie man die Aufenthaltsdauer verlängert

Typische Aufenthaltsdauern für Tröpfchen in Mikrofluidiksystemen bewegen sich im Sekunden- bis Minutenbereich. Daher eignen sich solche Systeme nicht für das Studium vieler

chemischer Reaktionen und biologischer Experimente mit Zellinkubation oder In-vitro-Expression von Proteinen, die sich über Minuten oder Stunden hinziehen. Der direkte Weg, die Aufenthaltsdauer im System zu verlängern, besteht in einer Verlängerung der Kanäle. Weil aber der Einbau von Verzögerungskämen eine proportionale Erhöhung des Rückstaus bewirkt, stören sie die Tröpfchenbildung, und sie führen zum Aufblättern von PDMS-Schichten. Frenz et al. lösten dieses Problem, indem sie Systeme herstellten, in denen der Verzögerungskanal breiter und tiefer ist als die Tröpfchenbildungszone. Überdies führten sie periodische Kanalverengungen ein, um die Tröpfchen zu durchmischen und sicherzustellen, dass alle Tröpfchen zu einem gegebenen Zeitpunkt ähnlich lange im System sind. (Das ist wichtig, denn Tröpfchen fließen in der Kanalmitte schneller als am Rand.^[101]) Shim et al.^[102] bauten Mehrschichtsysteme mit Kanalausbuchtungen, in denen die Tröpfchen eingefangen werden; auf diesem Weg wurde die Oberflächenspannung minimiert, und die Tröpfchen waren nahezu kugelförmig. Ein genau abgestimmtes Füllen und Entleeren der Vertiefungen gelang mithilfe von Ventilen, machte aber die Herstellung komplizierter Mehrschichtsysteme erforderlich.^[103] Ein großer Vorteil solcher Mehrschichtsysteme liegt darin, dass das Tröpfchenvolumen zu jeder Zeit eingestellt werden kann. In Systemen aus PDMS kommt es zu einem langsamen Wasserverlust aus den Tröpfchen; zum einen, weil PDMS wasserdurchlässig ist,^[104,105] zum anderen als Folge der Wasseraufnahme durch die Trägerphase. Um das Volumen der eingefangenen Tröpfchen konstant zu halten, fügten Shim und Mitarbeiter^[102] einen Reservoirkanal unter der Tröpfchenspeicherzone an, der eine wässrige Lösung derselben Molarität enthielt. Das Tröpfchenvolumen wurde dadurch vorgegeben, dass Wasser durch eine PDMS-Membran aus dem Reservoir hinaus und in dieses hinein wandern konnte.

Solche Mehrschichtsysteme ermöglichen die genaue Einstellung des Tröpfchenvolumens, doch ihre Herstellung gestaltet sich schwierig. Unter den leichter herstellbaren Alternativen ist ein System von Courtois et al., mit dem Wassertropfen in Öl kontrolliert gebildet, über mehrere Stunden gespeichert und einzeln mithilfe eines Lasers analysiert werden konnten.^[22] Als Speicher diente nichts weiter als ein stark aufgeweiteter Kanalabschnitt, der bis zu 10^6 Tröpfchen aufnehmen konnte. An seinem V-förmigen Eingang wurden die Tröpfchen langsam abgebremst, sodass das Verschmelzen infolge von Stößen vermieden wurde. Um ein Durchhängen des PDMS zu verhindern, wurden im Zentrum des Speichers vier Stützsäulen eingebaut. Solche großen Speicher haben den Nachteil, dass die Tröpfchenreihenfolge verloren geht, weil den eintretenden Tröpfchen keine bestimmte Position zugewiesen werden kann; dieses Problem ließ sich aber durch den Einbau von Säulen im Speicher lösen.^[105] Weitz und Mitarbeiter^[106] verfolgten die Vorgänge in Tausenden einzelner Pikolitertröpfchen, die eine Anordnung von runden Kammern mit engen Verbindungskämen durchflossen. Liegt ein Fluss an, so werden die Tröpfchen durch die Käme gepresst, ohne Fluss überwiegt aber die Oberflächenspannung, und die Tröpfchen nehmen die Form niedrigster Energie an. Dann befindet sich in jeder Kammer nur ein einziges Tröpfchen. Um die Tröpfchen aus dem System zu spülen, erhöht

man einfach die Flussgeschwindigkeit der Trägerphase. Diese „Dropspot“-Systeme wurden verwendet, um die β -Galactosidase-Aktivität in über 200 Tröpfchen mit einzelnen Zellen durch Fluoreszenzbildgebung zu ermitteln (Abbildung 5). Wegen ihres geringen Volumens eignen sich Tröpfchen auch als kontrollierbare Umgebung für die Keimbildung, was für detaillierte thermodynamische Untersuchungen zur gezielten Kristallisation^[107,108] oder für das schnelle Erstellen von Löslichkeitsdiagrammen^[109] von Belang ist.

Takeuchi und Mitarbeiter setzten Schleifen mit Rechteckwellenform auf einen geraden Kanal, in dem Verengungen als Fallen wirkten. Die Systeme wurden so ausgelegt, dass der gerade Kanal einen geringeren Flusswiderstand als die Schleifen bietet, solange die Falle leer ist. Folglich wird der größte Teil des Flusses den geraden Kanal durchströmen. Ein Partikel oder Tröpfchen im Fluss wird aber in die Falle gespült, wo es dann als Pfropfen wirkt, der den Flusswiderstand entlang des geraden Kanals deutlich vergrößert und dadurch den Hauptfluss durch die Schleife umleitet. Nachfolgende Partikel oder Tröpfchen werden dann durch die Schleife fließen und die gefüllte Falle umgehen.^[110] Shi et al. verwendeten denselben Aufbau, um Tröpfchen mit *C. elegans* einzufangen,^[61] und Fraden und Mitarbeiter nutzten ein abgewandeltes Verfahren, um Tröpfchen zwischenzulagern.^[111]

Schließlich wurde noch eine neuartige und effektive Methode für das sehr schnelle Einfangen von Tröpfchen mithilfe eines automatisierten Zweibegeventils beschrieben.^[112] Bei diesem Ansatz werden die Tröpfchen an einer Stelle festgehalten, sodass der optische Nachweis einzelner Moleküle und reaktionskinetische Messungen mit Millisekundenauflösung erleichtert sind.

3.6. Sortieren von Tröpfchen

Tröpfchensortierer, die „aktive“ Tröpfchen vom Rest des Tröpfchenstroms abtrennen, sind wichtige Module für integrierte Systeme. Elektrische Felder wurden oft angewendet, um bestimmte Tröpfchen dielektrophoretisch in einen getrennten Kanal abzuzweigen, während die übrigen Tröpfchen dem Weg des geringsten hydrodynamischen Widerstands folgen.^[113] Auch akustische Oberflächenwellen können Tröpfchen oder Partikel in Mikrofluidiksystemen ablenken, indem sie Fluide örtlich komprimieren.^[114] Außerdem wurden Magnetfelder angewendet, um Tröpfchen, die magnetische Partikel enthalten, zu manipulieren,^[115] und auch das örtliche Erhitzen mit einem Laser eignet sich zum Sortieren von Tröpfchen.^[89,116] Durch Einbau einer Mikroheizereinheit an einer Y-Kreuzung lässt sich die Tröpfchenbewegung genau steuern, weil der Flusswiderstand und die Thermokapillarität in einem Zweig verändert werden können (Aufspalten eines Tröpfchenstroms oder Sortieren von Tröpfchen).^[117]

Das elektrische Signal, das die Detektion einer Fluoreszenz durch einen Photonenervielfacher hervorruft, kann weitere Manipulationen an Tröpfchen auslösen. Eine solche Rückkopplung wurde verwendet, um Tröpfchen anhand ihrer Fluoreszenz in der Art eines Flusszytometers zu sortieren. Baret et al. verkapselten einzelne *E.-coli*-Zellen in Pikolitertröpfchen und schlossen in einem enzymatischen Assay auf

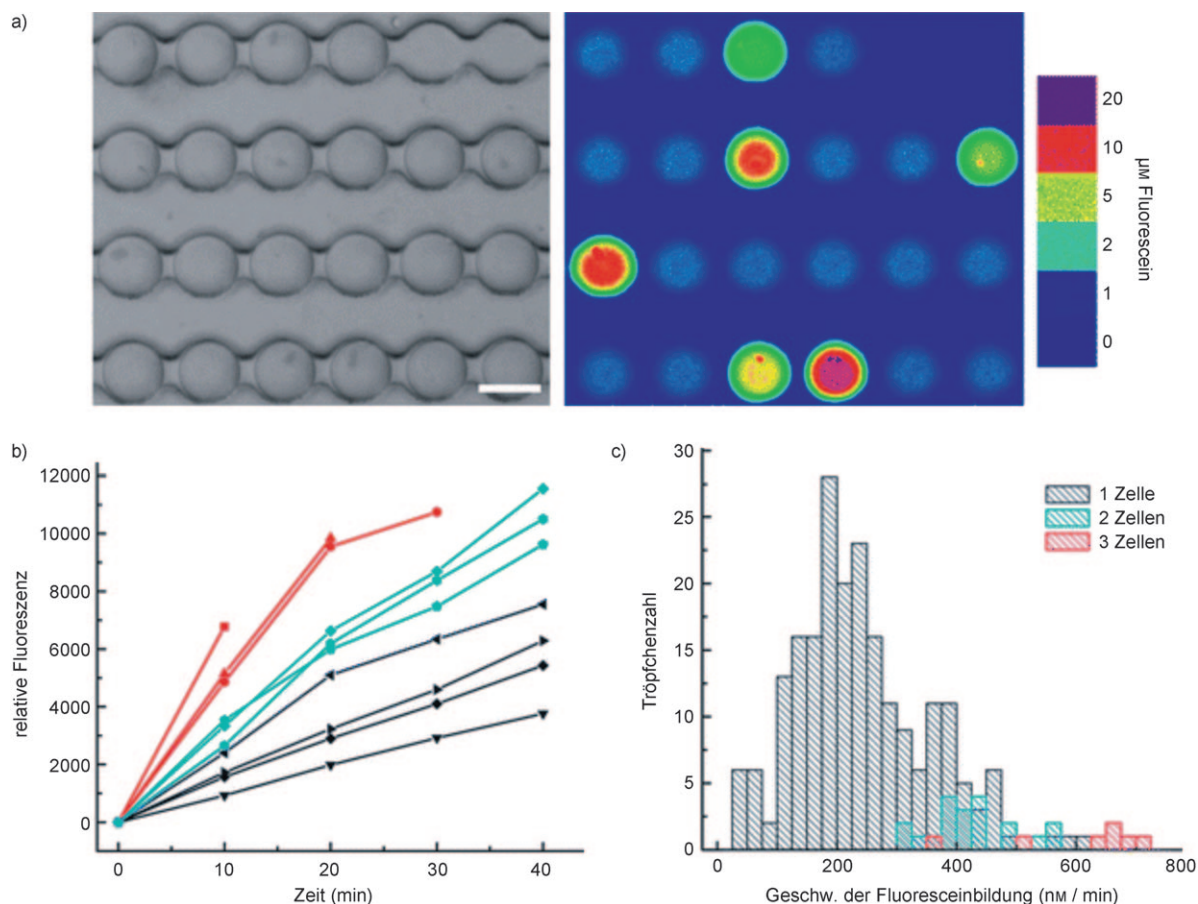


Abbildung 5. In „Dropspot“-Anordnungen lässt sich die Fluoreszenzintensität von Tröpfchen mit einem fluorogenen Substrat und β -Galactosidase produzierenden Zellen verfolgen. a) Hellfeldaufnahme der Fluoreszenz nach $t = 45$ min. b) Zeitliche Änderung der Tröpfchenfluoreszenz für 9 repräsentative Tröpfchen mit einer (grau), zwei (türkis) oder drei Zellen (rot). c) Histogramm der Reaktionsgeschwindigkeiten für 265 Tröpfchen, aufgeschlüsselt nach der Zahl an eingeschlossenen Zellen. Maßstab $40 \mu\text{m}$. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [106].

deren β -Galactosidase-Aktivität. Durch ein Fluoreszenzsignal ausgelöste elektrische Felder wurden dann verwendet, um β -Galactosidase-positive Mutanten mit einer Frequenz von 300 Hz auszuwählen; die Emulsion mit den intakten Zellen konnte zurückgewonnen und durch Kolonie-Screening analysiert werden (Abbildung 6). Die beste Sortiereffizienz für fluoresceinhaltige Tröpfchen ist vergleichbar mit dem Ergebnis der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (FACS); bei Sortierfrequenzen von 2 oder 1 kHz wurden 1 aus 100 bzw. 1 aus 1000 Tröpfchen falsch positiv gewertet.^[118] Dieses FADS-Verfahren (fluorescence-activated droplet sorting) beruht auf Arbeiten von Fidalgo et al., die eine Fluoreszenzdetektion mit einer selektiven „Emulsionstrennung“ verbunden und ausgewählte Tröpfchen in einen kontinuierlichen Wasserfluss extrahierten (Abbildung 6a). Ihr System selektierte Tröpfchen mit 30 nm Fluorescein mit weniger als 1% falsch-positiver Zuordnung aus einem strömenden Gemisch von Tröpfchen mit 10 oder 30 nm Fluorescein.^[119]

4. Online-Charakterisierung von Reaktionen in Tröpfchen

Dank der immer zuverlässigeren Tröpfchenmanipulation, auch in komplizierten Systemen, kommen Mikrotröpfchen als ein mögliches Hilfsmittel für die biologische und chemische Forschung in Betracht.^[14] Eine Voraussetzung ist die Fähigkeit, Tausende extrem kleine, von Öl umschlossene Proben handhaben und chemisch analysieren zu können. Die folgenden Abschnitte geben einen Überblick über die Fortschritte bei der Analyse auf dem Chip.

4.1. Fluoreszenz

Fluoreszenzmessungen sind nach wie vor die erfolgreichste Analyseverfahren für den Inhalt von Tröpfchen, wobei unterschiedliche Experimente verschiedenartige Informationen liefern. Am weitesten verbreitet ist die Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie, bei der man ein Fluoreszenzmikroskop mit einer empfindlichen Kamera koppelt, um gewünschte Bereiche zu photographieren. Mit dieser Technik wurden enzymkinetische Messungen in sich bewegenden

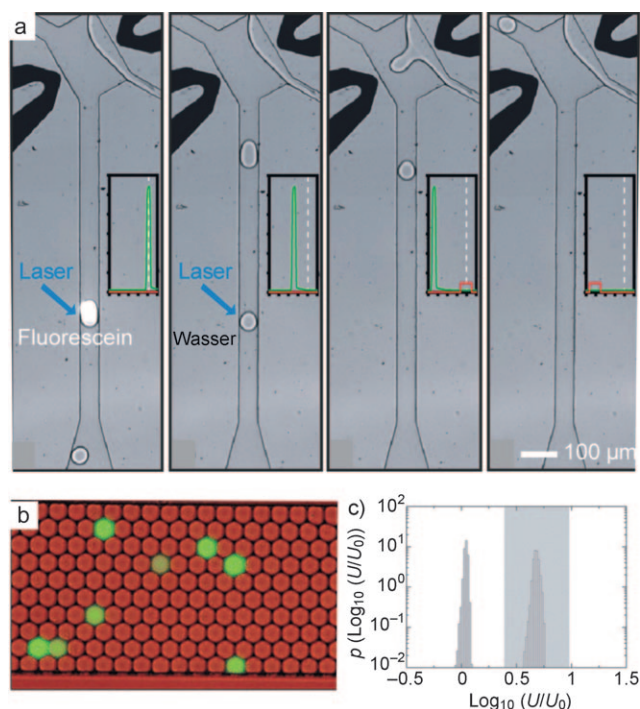


Abbildung 6. a) Mikroskopiebilder zur Auswahl und Extraktion eines fluoreszierenden Tröpfchens: Ein mit 12 mM Fluorescein beladenes Tröpfchen fließt durch den Brennpunkt eines Lasers. Die resultierende Fluoreszenz wird durch einen Photovervielfacher detektiert, und das elektronische Signal löst einen Spannungspuls aus, der das ausgewählte Tröpfchen mit einem kontinuierlichen Wasserfluss verschmilzt. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [119]. b) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Tröpfchen mit Bakterien, die β -Galactosidase überexprimieren, in einem Mikrofluidiksystem. c) Histogramm der Fluoreszenzsignale in einer Emulsion von Tröpfchen mit 25 und 100 μm Natriumfluorescein. Die beiden Tröpfchenarten ergeben deutlich unterscheidbare Signale, sodass eine Sortierfunktion die Tröpfchen mit starker Fluoreszenz selektieren kann (grauer Bereich). Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [118].

Tröpfchen ausgeführt.^[9,120] Ein parallelisiertes Mikrotröpfchenverfahren^[121] ergibt beispielsweise eine schnelle Enzymcharakterisierung (k_{cat} und K_M). Das Substrat wird auf dem Chip nach einem Konzentrationsgradienten verdünnt, und die Flüsse mit unterschiedlichen Konzentrationen werden mit dem Enzymfluss vereint, sodass Tröpfchen mit allen Konzentrationen gleichzeitig gebildet werden. Während die Tröpfchen ihre jeweiligen Kanäle durchwandern, werden sie in parallelen Fluoreszenzmessungen untersucht. Leider liegt die Tröpfchenfrequenz oft noch weit über der Aufnahme Frequenz der CCD-Kamera, sodass einzelne Tröpfchen nicht untersucht werden können. Alle kinetischen Daten beruhen daher auf den gemittelten Fluoreszenzintensitäten von Hunderten von Tröpfchen, die den Detektionsbereich bei geöffneter Blende durchfließen.

Für die Analyse des Inhalts einzelner Tröpfchen durch Fluoreszenzbildgebung muss der Tröpfchenfluss angehalten werden. Dies wurde beispielsweise zur Aufklärung der Blutgerinnung getan: Ein kombinierter Ansatz mit quantitativer zeitlicher Analyse der Thrombinerzeugung und qualitativer

Analyse der Bildung von Fibrinklumpchen in Plasmatrophen nutzte Fluoreszenz- und Hellfeldmikroskopie.^[122] Verschiedene Mikrofluidiksysteme wurden mit Fluoreszenzbildgebungsmethoden gekoppelt, um den zeitlichen Verlauf langsamer Reaktionen (über mehrere Stunden) in Tausenden von einzelnen Mikrotröpfchen zu verfolgen. Dieser Ansatz liefert gute Daten für statistische Analysen von Populationen.^[70,105,123]

Über die Fähigkeit zur Verfolgung von Tausenden individueller Tröpfchen hinaus hat die Fluoreszenzbildgebung den großen Vorteil, dass sie eine genaue Lokalisierung ermöglicht. Daher wurde dieses Verfahren vielfach genutzt, um die Wechselwirkung biologischer Proben mit der Oberfläche von Tröpfchen zu analysieren und so Proteine,^[71,73,75] Tröpfchenschumpfung^[105] und den Austritt des Tröpfcheninhalts sowie eine Kommunikation zwischen Tröpfchen nachzuweisen.^[70] Beispielsweise studierten Courtois et al. die Freisetzung von Fluoresceinderivaten aus Tröpfchen, die 6–18 h in einem Reservoir gelagert wurden. Mithilfe von Fluoreszenzbildgebung gelangen die Visualisierung, Lokalisierung und Quantifizierung über den Untersuchungszeitraum in heterogenen Emulsionen, die sowohl Puffertröpfchen als auch mit dem Fluoresceinderivat beladene Tröpfchen enthielten, was einen Rückschluss über den Austritt von Fluoresceinderivaten in Abhängigkeit von der Zahl an Puffertröpfchen in der Umgebung der fluoreszierenden Tröpfchen zuließ.^[70]

Zwar eignet sich die Fluoreszenzdetektion zur Lokalisierung von Tröpfchen, die wenigsten entsprechenden Systeme erreichen aber den für Screening-Anwendungen erforderlichen hohen Durchsatz; ebenso wenig kann man sie mit weiteren Schritten verknüpfen, in denen einzelne Tröpfchen gezielt manipuliert werden (etwa durch eine Sortierung). Daher wurde die laserinduzierte Fluoreszenz verwendet, die in zellbasierten Assays, PCR-Detektion und Bindungsassays einen sehr empfindlichen und schnellen Nachweis ermöglicht. Huebner et al. verkapselten Zellen in Tröpfchen und wiesen die Expressierung fluoreszierender Proteine in den Zellen nach. Ihr mit einem konfokalen Laser ausgestattetes System konnte Fluoreszenzereignisse bei einer Frequenz von 100 kHz auflösen; das Hintergrundsignal definierte die Umrisse der Tröpfchen, während aus Intensitätsspitzen die Zahl an Zellen pro Tröpfchen ermittelt werden konnte.^[55]

Srisa-Art et al. verfolgten mithilfe von Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (FLIM) das Mischen zweier Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Lebensdauern in Tröpfchen mit einer zeitlichen Auflösung von 5 ms. Messungen an mehreren Punkten eines Kanals lieferten ein zweidimensionales Bild vom Mischprozess.^[124] Dieselbe Gruppe nutzte einen Fluoreszenzenergietransfer (FRET) für die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in Tröpfchen.^[125] Ein FRET-Donor (gebunden an Streptavidin) und ein FRET-Akzeptor (gebunden an einen DNA-Strang, der komplementär zu einem biotinmodifizierten DNA-Strang ist) ergaben nach der DNA-Hybridisierung einen nachweisbaren FRET. Messungen der FRET-Effizienz an mehreren Punkten eines Verzögerungskanal lieferten Geschwindigkeitskonstanten und Daten zur Bindungskinetik. FRET-Messungen wurden auch in Studien zur Antigen-Antikörper-Bindung angewendet.^[126]

4.2. Raman-Spektroskopie

Die Raman-Spektroskopie eignet sich als zerstörungs- und markierungsfreie Methode zum Nachweis des Inhalts von Mikrotröpfchen in Echtzeit und kann Informationen zur chemischen Struktur einer Substanz und zu ihrer Konzentration liefern. Grundsätzliche Tröpfcheneigenschaften, z. B. die Länge, lassen sich bestimmen, indem man die Beiträge der dispergierten und der kontinuierlichen Phase zum Raman-Spektrum betrachtet.^[127] Die räumlich auflösende Raman-Spektroskopie ermöglicht es auch, das Mischen von zwei Lösungen im Inneren von Tröpfchen zu verfolgen.^[127,128] Sarrazin et al.^[128] untersuchten einen solchen Mischvorgang unter chaotischer Advektion in einem System mit gewundenen Kanälen anhand des Isotopenaustauschs zwischen D₂O und H₂O. Durch Mittelwertbildung für ca. 900 Tröpfchen erhielten sie Konzentrationsprofile der Ausgangsverbindungen und des Produkts HOD für diese diffusionskontrollierte Reaktion, aus denen sie ableiteten, dass das System nach 20 ms gut durchmischt war. Mithilfe von Raman-Spektroskopie lassen sich auch Reaktionen verbessern, die zu einem gewünschten Produkt führen. Die durch UV-Bestrahlung ausgelöste Polymerisation von Methacrylat ist von großer Bedeutung für die Zahntechnik; dieser Prozess wurde in Tröpfchen durch Variieren der Zusammensetzung (Methacrylat-Monomer/Dimethacrylat-Vernetzer) und Betrachten der anschließenden Umsetzung mithilfe von Raman-Spektroskopie optimiert.^[129]

Bei der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie (surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS) erhöhen Kolloide mit Oberflächenplasmonen das Raman-Signal. Die Zugabe solcher Kolloide kann die Messgenauigkeit deutlich steigern, in herkömmlichen Küvetten und auch in Flusszellen kann es aber zur Abscheidung der Kolloide und der Analyte an den Innenwänden, und folglich zu Artefakten, kommen. Ein solcher Gedächtniseffekt („memory effect“) – die Detektion einer längst nicht mehr in eine Flusszelle eingespeisten Substanz – lässt sich durch den Einsatz von Tröpfchen in Mikrofluidiksystemen vermeiden, und Verzögerungskanäle können verwendet werden, um Wechselwirkungen zwischen dem Analyt und den Kolloiden in den Tröpfchen herbeizuführen.^[130] Die hoch empfindliche SERS wurde auch zum Nachweis von Quecksilber in Tröpfchen genutzt. Dabei wurde die Verringerung des SERS-Signals von Rhodamin B, das auf Goldnanopartikeln adsorbiert war, nach der Verdrängung durch Quecksilber(II)-Ionen gemessen.^[131]

4.3. Massenspektrometrie und Elektrophorese

Die Massenspektrometrie (MS) wurde als markierungsfreie und potenziell allgemein anwendbare Untersuchungsmethode für chemische und biologische Reaktionen auch erfolgreich in Mikrofluidikformate integriert.^[132–135] Bei der Anwendung von Elektrophorese, Massenspektrometrie oder Chromatographie auf Tröpfchen in Mikrofluidiksystemen ist die kontinuierliche (Öl)Phase allerdings stark hinderlich. Dieses Problem ließe sich durch die Verknüpfung von kontinuierlicher und tröpfchenbasierter Mikrofluidik in inte-

grierten Systemen aber vermeiden, wobei die Reaktionen zunächst in Mikrotröpfchen ausgeführt und die Produkte nach der Umwandlung in ein kontinuierliches System anschließend elektrophoretisch oder chromatographisch getrennt und mithilfe von Massenspektrometrie oder HPLC analysiert werden.^[136] Fidalgo et al.^[119] sowie Roman et al.^[137] errichteten in ersten Beispielen eine virtuelle Grenze zwischen einem tröpfchenführenden Kanal mit hydrophober Trägerphase und einem kontinuierlichen Wasserfluss (siehe Abbildung 6a für die Extraktion des Tröpfcheninhalts in einen kontinuierlichen Fluss). In der Studie von Roman et al. kamen die Wassertropfen in der Ölphase in Berührung mit der virtuellen Grenze, sodass sie durch Verschmelzen in die kontinuierliche wässrige Phase übergingen. Solche extrahierten Flüsse können in der Folge elektrophoretisch getrennt werden.

Fidalgo et al. nutzten Spannungsimpulse, um Wassertropfen in einem kontinuierlichen Ölfluss in Richtung der virtuellen Grenze zu drängen, hinter der ein kontinuierlicher Wasserstrom floss. Die elektrischen Felder steuerten nicht nur die Tröpfchen dielektrophoretisch, sondern sie führten auch zur Verschmelzung und somit letztlich zur Phasentrennung in der Emulsion. Diese Technik verbindet somit Mikrotröpfchen und kontinuierliche Mikrofluidik.

Kürzlich koppelte dieselbe Gruppe ihr Verfahren mit der Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS), indem sie den Auslass eines PDMS-Chips über einen PEEK-Schlauch mit einer MS-Düse aus Quarzglas verbanden.^[138] Nach dem selektiven Verschmelzen von Tröpfchen mit dem Wasserfluss durch Spannungspulse wurde der Inhalt einzelner Tröpfchen massenspektrometrisch untersucht. Als Test wurden zweierlei Arten von Tröpfchen, jeweils beladen mit einem Peptid (Angiotensin oder Bradykinin), eingesetzt und durch MS analysiert. Bei dieser Technik lässt sich überdies ein Fluoreszenz-Screening vorschalten, was für Tröpfchen illustriert wurde, die Angiotensin mit oder ohne Fluoreszenzmarkierung enthielten. Die Möglichkeit, solche Tröpfchen anhand ihrer Fluoreszenzintensität für die MS-Analyse auszuwählen, könnte für Hochdurchsatz-Screenings interessant werden. Beschränkend wirkte sich bei diesen Systemen die hohe Nachweisgrenze aus (ca. 500 µm), die sich aus der Taylor-Strömung des Tröpfcheninhalts nach dem Verschmelzen mit dem kontinuierlichen Fluss ergab. Kelly und Mitarbeiter reduzierten das Verschmieren im Wasserfluss deutlich, indem sie die Elektrospray-Düse in das Mikrofluidiksystem integrierten (Abbildung 7). Sie detektierten Peptide in Konzentrationen um 1 µM nach der Extraktion aus Tröpfchen mit ungefähr 700 pL Volumen bei einer Frequenz von 0.1 Hz.^[139]

Die Verbindung von Tröpfchenextraktion auf dem Chip und ESI-MS stellt eine elegante Analyse-methode für Systeme dar, in denen die kontinuierliche Phase beim MS-Nachweis stört, allerdings wird dieser Vorteil mit einer signifikanten Verdünnung des Tröpfcheninhalts erkauft. Eine grundsätzlich andere, und möglicherweise leistungsfähigere Methode, um einzelne Tröpfchen massenspektrometrisch zu untersuchen, wurde von Pei et al.^[140] eingeführt; sie zeigten, dass 10–50 nL große Tropfen in einem Teflonschlauch, getrennt durch Luft und eine dünne Schicht fluoridierten Öls, direkt in ein Massenspektrometer injiziert werden können (Abbildung 7). Der

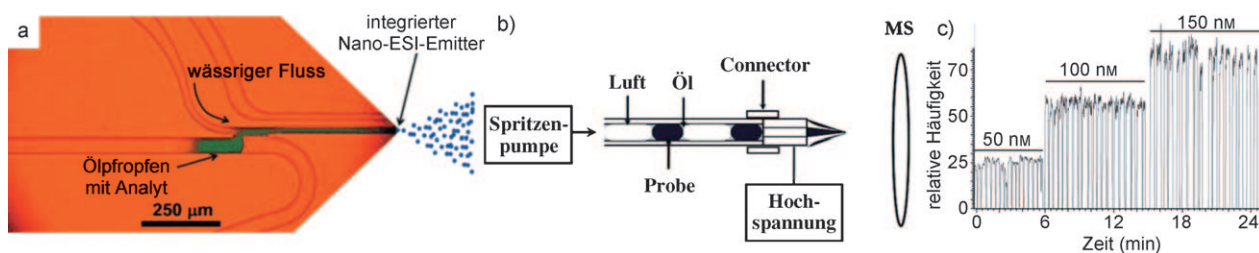


Abbildung 7. Kopplung von Tröpfchenfluss und Massenspektrometrie. a) An einer Grenzfläche extrahiert ein wässriger Fluss die Tröpfchen aus dem Fluss im Kanal und führt sie der Elektro spray-Düse zu. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [139]. b) Prinzip der Analyse einer Tröpfchenfolge nach Sammlung in einem Teflonröhrchen. c) Ionenstrom für eine Reihe von 50-nL-Tröpfchen mit steigender Konzentration an Leucin-Enkephalin, gelöst in Wasser mit 50 % Methanol und 1 % Essigsäure. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [140].

Schlauch wurde an die Quarzglas-Nanospraydüse des Massenspektrometers angeschlossen. Dieser direkte Ansatz ergibt eine minimale Überlappung zwischen den Tropfen ($< 0.1\%$) und eine Nachweisgrenze um 1 nM für Leucin-Enkephalin-Proben.

4.4. Elektrochemischer Nachweis

Zwar ist der elektrochemische Nachweis nicht so allgemein anwendbar wie der massenspektrometrische, auch er kann aber Informationen über physikalische und chemische Eigenschaften von Tröpfcheninhalten liefern. Alternativ zu den üblichen Kombinationen aus Mikroskop und Kamera lassen sich die Bildung von Tröpfchen sowie deren Länge, Frequenz und Geschwindigkeit auf elektrochemischem Weg ermitteln.^[141] Diese Technik eignet sich auch zum Einsatz in nichttransparenten Chips, sodass auch solche Materialien für die Mikrofluidiksysteme infrage kommen.

Außerdem lässt sich der Inhalt von Mikrotröpfchen elektrochemisch analysieren. Dies belegt die Messung der NaCl-Konzentration mit einer Nachweisgrenze von 20 μM .^[142] Amperometrie wurde auch angewendet, um schnelle Enzymreaktionen kinetisch zu studieren.^[143] Während Fluoreszenzassays für die Enzymanalyse fluorogene Substrate benötigen, kann diese markierungsfreie Methode auf jede beliebige Reaktion angewendet werden, an der ein elektrochemisch aktives Reagens oder Produkt beteiligt ist. In einem einfachen System, das lediglich aus einem Elektrodenpaar am Auslass bestand, wurden K_m und V_{\max} für die Umsetzung von H_2O_2 durch Katalase bestimmt. Ventile wurden eingesetzt, um Proben aus dem Fluss zu entnehmen und die Verweilzeit der Tröpfchen einzustellen.

5. Zellen in Tröpfchen

Tröpfchen stellen eine definierte (und möglicherweise sterile) Umgebung für einzelne Zellen bereit. Der Inhalt der Tröpfchen kann bei deren Erzeugung systematisch variiert und anschließend durch Verschmelzen mit anderen Tröpfchen modifiziert werden. Durch den Einsatz von Mikrotröpfchen können zellbasierte Assays möglicherweise von μL - auf pL-Volumina verkleinert werden, sodass geringere Mengen an Reagentien und Zellen ausreichen. Außerdem

sollten prinzipiell deutlich schnellere Assays möglich sein als auf herkömmlichen Mikrotiterplatten. Während in den meisten Experimenten Bakterien^[55,69,144,145] oder Hefezellen^[106] zum Einsatz kamen, liegen auch einige Studien mit humanen^[60] und anderen Säugerzellen^[56] und sogar mit ganzen Organismen wie *C. elegans* vor.^[60] Ein Chip mit einer Säugerzellkultur und integrierter Befüllung von Mikrotröpfchen wurde beschrieben.^[146] Sowohl suspendierte als auch adhärenzte Zellen konnten in Mikrotröpfchen überführt, neun Tage gelagert und anschließend freigesetzt und erneut kultiviert werden. Durch Verwendung gasdurchlässiger Perfluorkohlenstofföle als Träger bleiben die Zellen über Tage hin vital, und Zellkulturen in Tröpfchen sind ähnlich lebensfähig wie übliche Kulturen.^[60,145]

He et al. stellten ein allgemeines Verfahren für Assays mit einzelnen Zellen vor; sie lysierten in Mikrotröpfchen eingeschlossene Zellen durch Laserlicht, um überexprimierte Enzyme nachzuweisen. Ausgewählte Zellen, die β -Galactosidase exprimieren, wurden in Tröpfchen mit einem fluorogenen Substrat gemischt, und die enzymatische Reaktion setzte erst ein, nachdem der Zellinhalt ins Tröpfcheninnere freigesetzt wurde.^[49] Assays mit einzelnen Zellen, die β -Galactosidase überexprimieren, gelangen auch dadurch, dass die Zellmembran für das Eindringen des Substrats permeabilisiert wurde.^[123]

Wird ein Enzym im Periplasma exprimiert, so sind Zelllyse oder Permeabilisierung überflüssig. Entsprechende Assays gelangen in Pikolitertröpfchen mit *E.-coli*-Zellen, die alkalische Phosphatase (AP) überexprimierten. Nach dem Übertritt in das Periplasma hydrolysierte dieses Enzym das (nicht zellgängige) Substrat Fluoresceinphosphat, wodurch Fluorescein im Tröpfcheninneren freigesetzt wurde.^[144] Der Substratumsatz in einzelnen Tröpfchen wurde durch Fluoreszenzmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten im System verfolgt. Dieses Verfahren lieferte ähnliche Resultate wie kinetische Studien in Lösung. Ein Mehrschicht-Mikrofluidiksystem wurde kürzlich für quantitative kinetische Messungen der Proteinexprimierung und Enzymaktivität für einzelne Zellen in Tröpfchen verwendet (Abbildung 8). Weil das Tröpfchenvolumen in solchen Systemen über die gesamte Versuchsdauer (> 5 h) hin konstant gehalten werden kann, lassen sich die Fluoreszenzintensitäten für einzelne Tröpfchen quantitativ vergleichen. Zellen mit einem Plasmid für die Coexprimierung von AP und dem rot fluoreszierenden Protein mRFP1 wurden gemeinsam mit einem fluorogenen

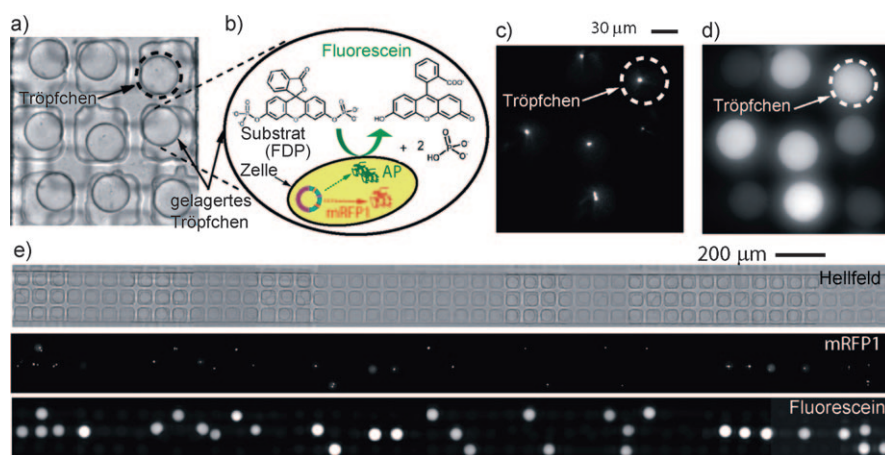


Abbildung 8. a) Hellfeld-Aufnahme von Tröpfchen, die in quadratischen Vertiefungen gelagert werden. b) Eingeschlossene Zellen exprimieren die beiden Zielproteine AP und mRFP1, ausgelöst durch zwei identische Promotoren. AP hydrolysiert das Substrat FDP zu Fluorescein. c) Fluoreszenzbild der mRFP1-Expression. Helle Punkte sind in Mikrotröpfchen eingeschlossene Zellen, die mRFP1 exprimieren. d) Fluoreszenzbild der Anreicherung von Fluorescein: Das fluoreszierende Produkt ist gleichmäßig in den Tröpfchen verteilt. e) Zusammengefügte Mikroskopiebilder von gelagerten Tröpfchen 20 h nach der Tröpfchenbildung. Von oben nach unten: Hellfeld, rote und grüne Fluoreszenz. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [147].

Substrat und einem die Proteinexpression auslösenden Agens in Mikrotröpfchen verkapselt. Die Fluoreszenz infolge der mRFP1-Expression blieb in den Zellen lokalisiert, wohingegen sich das fluoreszierende Produkt aus der Umsetzung durch die alkalische Phosphatase über das gesamte Tröpfchen verteilt. Die mRFP1-Intensität dient in diesem Fall als ein interner Standard, mit dessen Hilfe die Aktivität und die Menge an exprimiertem Enzym für einzelne Zellen verglichen werden können. Dadurch, dass diese Eigenschaften parallel verfolgt werden können, ist es möglich, die Mitglieder einer Bibliothek in einem Experiment zur gerichteten Evolution zu bewerten oder herauszufinden, inwieweit sich Zellen unterscheiden, die aus einer identisch präparierten Probe entstanden sind.^[147]

In Tröpfchen wurden auch in geringen Mengen auftretende Zelloberflächen-Biomarker enzymatisch verstärkt, was einem Miniatur-ELISA gleichkommt.^[148] Zellen mit spezifischen Biomarkern wurden mit einem Antikörper markiert, an den β -Galactosidase gebunden war, und gemeinsam mit einem fluorogenen Substrat in Tröpfchen verkapselt. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität wurde nach der Inkubation außerhalb des Systems und erneuter Injektion der Tröpfchen mithilfe eines Lasers gemessen. Mit diesem Verfahren ließen sich Zellpopulationen untersuchen, wobei die Tröpfchen vor der enzymatischen Verstärkung mit einem Farbcode versehen wurden. Während bei FACS-Standardmethoden der Antikörper mit einem Farbstoff markiert wird, und nicht mit einem Enzym, das viele Farbstoffmoleküle aktivieren kann, konnten bei der enzymatischen Verstärkung in Tröpfchen vier- bis siebenmal mehr Zellen mit Biomarkern in einer Zellpopulation erkannt werden.^[148]

Mithilfe von „Dropspot“-Systemen (Abbildung 5) wurde die Vermehrung von Hefezellen untersucht. Dabei fiel auf, dass die Generationszeit für Tröpfchen, die anfangs mehr Zellen enthielten, länger war. Dieser Unterschied kann

asynchronen Zellzyklen zugeschrieben werden, aber auch der hohen Zelldichte der eingeschlossenen Zellen: In einem Tröpfchen von 40 μm Durchmesser steht einer einzelnen Zelle ein vergleichbares Volumen zur Verfügung wie bei einer Konzentration von 10^8 Zellen pro Milliliter, was annähernd der Dichte einer gesättigten Kultur von Hefezellen entspricht.^[106] Studien an ortsfesten Tröpfchen, die einzelne Zellen enthalten, belegen das Potenzial von Mikrotröpfchen für die Untersuchung zufälliger Phänotyp-Variationen in Populationen genetisch identischer Zellen. Ein neues Verfahren, mit dem sich die Größe kleiner Partikel in Tröpfchen bestimmen lässt, bietet zudem die Möglichkeit, auch Zellkomponenten wie synaptische Vesikel in Tröpfchen zu studieren.^[149]

Die Erzeugung hoher Zelldichten in kleinen Volumina (nicht begrenzt

auf Tröpfchen in einem Öl) half bei Untersuchungen zum „Quorum sensing“ und zur Kommunikation zwischen Bakterien.^[69,150] Quorum sensing spielt bei vielen Prozessen eine Rolle, etwa bei der Sporulation, der Bildung von biologischen Filmen, der Antibiotikaproduktion und der Biolumineszenz. Übersteigt die Bakterien-Zelldichte einen bestimmten Wert, so werden diese Prozesse durch chemische Signale ausgelöst. Das Phänomen wurde in Lösung bereits studiert, doch der Einschluss in Mikrotröpfchen bietet einen ganz anderen Blickwinkel. Für eine einzelne Zelle in einem Tröpfchen mit 10 μm Durchmesser (und 500 fL Volumen) errechnet sich eine Zelldichte von 2×10^9 Zellen pro mL, die über 20-mal so hoch ist wie die für ein Quorum sensing benötigte Zelldichte. Folglich lässt sich durch Einschluss in kleinen Tröpfchen das Verhalten einzelner oder weniger Zellen bei hohen Zelldichten betrachten. Kürzlich wurden 100-fL-Tröpfchen mit *P. aeruginosa*-Zellen in Vertiefungen immobilisiert. Die Zellen enthielten einen Fluoreszenzreporter unter der Kontrolle des Gens *lasB*, das wiederum vom Quorum sensing abhängt. Schon Tröpfchen mit nur einer oder zwei Zellen zeigten ein Quorum sensing, das aber insgesamt stochastisch ausfiel.^[151]

In Tröpfchen auf einem Chip lässt sich durch Lyse der Inhalt von Zellen ausschütten, umgekehrt eröffnet sich aber auch eine Möglichkeit, Material in Zellen einzuführen. Zhan et al.^[152] stellten kürzlich ein einfaches Mikrofluidiksystem vor, das Zellen in Wassertröpfchen verkapseln und elektroporieren kann. Zu diesem Zweck werden die zellhaltigen Tröpfchen im Ölfluss zwischen einem Mikroelektrodenpaar auf konstanter Spannung hindurchgeführt. Die Möglichkeiten dieser Technik zeigten sich bei der Übertragung eines Plasmids für das verstärkt grün fluoreszierende Protein (enhanced green fluorescent protein, EGFP) in Eierstockzellen des chinesischen Hamsters (CHO). In Tröpfchen eingeschlossene Hefezellen wurden auch unter hoher Spannung

elektroporiert, um das Eindringen niedermolekularer Verbindungen zu erleichtern.^[142] Ein weiterer vielversprechender Ansatz für die Zelltransfektion ist der gemeinsame Einschluss von Zellen und Komplexen aus kationischen Lipiden und DNA. Bei der Bildung nichtviraler Vektoren in Mikrotröpfchen lassen sich das Verhältnis und die Polydispersität der Vektoren besser steuern und eine besser reproduzierbare Transfektion erzielen.^[153]

Da sich nun einzelne Zellen in Tröpfchen elektroporieren, untersuchen und manipulieren lassen, wäre auch eine Möglichkeit wünschenswert, die zellhaltigen Tröpfchen über längere Zeiträume zu lagern. Das Einfrieren von Tröpfchen mit einzelnen Zellen könnte eine solche Möglichkeit bieten. Fließende Wassertröpfchen lassen sich in Mikrofluidiksystemen abkühlen und einfrieren, die an bestimmten Stellen mit thermoelektrischen Kühlelementen ausgestattet sind. Eine kontinuierliche Phase mit tiefem Schmelzpunkt hilft bei diesem Verfahren, weil sie die gefrorenen Tröpfchen weitertransportiert, sodass diese samt ihrem gefrorenen Inhalt gesammelt werden können. Bei Zusatz eines Frostschutzmittels waren Maus-B-Lymphocyten in gefrorenen Tröpfchen auch nach einwöchiger Lagerung noch lebensfähig.^[154]

6. In-vitro-Transkription und -Translation

Die Aufspaltung einer Population in ihre Mitglieder mit anschließendem Einschluss in Mikrotröpfchen kann für den Aufbau von Bibliotheken genutzt werden. Tröpfchen gelten in dieser Hinsicht als besonders aussichtsreich, weil sie beim Einschluss ähnlich wie eine Zellbegrenzung wirken. Im Tröpfchen lassen sich Genotyp (DNA oder RNA) und Phänotyp (messbare Eigenschaften wie Bindungsverhalten oder katalytische Aktivität) miteinander verknüpfen, sodass Proteine mit einer bestimmten Funktion, die in einem zellähnlich begrenzten Raum aufrechterhalten werden kann, künstlich „evolutioniert“ werden können. In derartigen Experimenten zur molekularen Evolution müssen die Tröpfchen jeweils ein Mitglied einer Nucleinsäure-Bibliothek enthalten, das mithilfe käuflicher In-vitro-Transkriptions/Translations (IVTT)-Extrakte (z. B. aus *E. coli*, Weizenkeimen oder Kaninchen-Reticulozyten) translatiert wird. Dieses strikte In-vitro-Format hat Vorteile gegenüber Evolutionsexperimenten, die auf Organismen zurückgreifen: Es ist auch möglich, Proteine zu exprimieren, die Wirtzellen schädigen würden; nichtnatürliche Cofaktoren und Aminosäuren können bei den Selektionsexperimenten mit eingeschlossen werden; der Selektionsprozess kann in Gegenwart von Cosolventien oder bei extremen pH-Werten und Temperaturen stattfinden. Und schließlich lässt sich dem Selektionsdruck nicht leicht ausweichen, weil in der kontrollierten Umgebung eines Tröpfchens nur eine Minimalzahl anderer Prozesse abläuft. Beim direktesten Ansatz wird jeweils eine Genkopie in einem Tröpfchen eingeschlossen, sodass „monoklonale“ Evolutionseinheiten resultieren.

Die Bildung monodisperser Subpikolitertröpfchen als Mikroreaktoren für die In-vitro-Exprimierung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in einem Hochdurchsatz-Verfahren wurde zuerst von Dittrich et al. beschrieben.^[155]

Courtois et al. erweiterten dieses System, indem sie ein Reservoir entwickelten, das bis zu 10^6 solcher Tröpfchen stundenlang speichern kann, um die In-vitro-Exprimierung von GFP in diesen zu verfolgen. Dank der hohen Ausbeuten an GFP war es möglich, das Protein ausgehend von einzelnen DNA-Kopien zu exprimieren. So entstanden „monoklonale Tröpfchen“, in denen Genotyp und Phänotyp verknüpft waren^[22] – ein großer Vorteil für zukünftige In-vitro-Experimente zur gerichteten Evolution.

Bei der In-vitro-Exprimierung eines Enzyms mit direkt anschließendem Nachweis wurden mehrere hundert Kopien eines DNA-Plasmids, das für β -Galactosidase kodiert, zusammen mit IVTT-Extrakt und einem fluorogenen Substrat eingeschlossen, und die Enzymaktivität wurde durch Fluoreszenzbildgebung bestimmt.^[74] Vor der Transkription kann die DNA auch noch vervielfältigt werden. Durch Kopplung mehrerer Mikrofluidikchips mit der Möglichkeit zum Sammeln und erneuten Injizieren von Tröpfchen können die biochemischen Schritte der DNA-Vervielfältigung und der IVTT getrennt ausgeführt werden.^[156] Um β -Galactosidase zu erhalten, wurden Tröpfchen, die die Reagentien für die isotherme PCR über HRCA („hyperbranched rolling circle amplification“) enthalten, außerhalb des Chips inkubiert und anschließend mit Tröpfchen verschmolzen, die eine IVTT-Mischung enthalten. Die Tröpfchen wurden dann in einen Analysechip eingeführt, um die Enzymaktivität mithilfe eines Fluoreszenzassays zu messen.^[156] Oft ist es aber so, dass die optimalen Bedingungen für IVTT und das anschließende Enzymassay voneinander abweichen; so kann eine Komponente des Enzymassays die IVTT behindern und umgekehrt, oder die Prozesse laufen bei unterschiedlichen pH-Werten ab. Eine Lösung für dieses Problem besteht darin, die Prozesse zu trennen: Erst wird die IVTT in Tröpfchen ausgeführt, und nach der Translation werden diese Tröpfchen mit größeren Tröpfchen verschmolzen, die die Komponenten für das Enzymassay enthalten.^[88]

7. Polymerasekettenreaktion in Tröpfchen

Aus der modernen Molekularbiologie ist die Polymerasekettenreaktion (PCR) nicht mehr wegzudenken. Bei der Umsetzung dieser Schlüsseltechnik in Tröpfchen profitiert man von einigen Merkmalen des Formats: Die Miniaturisierung liefert hohe Durchsätze bei kleinen Volumina, und die schnelle Wärmeübertragung auf der Mikrometerebene verkürzt die Reaktionsdauer. Anders als in üblichen Mikrofluidiksystemen sind die Polymerasen und die DNA-Template in den Tröpfchen außerdem vor Stößen mit den Kanalwänden geschützt, sodass eine Desaktivierung der Polymerase und die Kreuzkontamination mit anderen Proben vermieden werden.^[157]

Tröpfchen, die nur ein einziges DNA-Molekül (oder mehrere identische Kopien) enthalten, werden in Analogie zu Zellklonen als „monoklonal“ bezeichnet. Die Isolierung jedes Templates in einem eigenen Tröpfchen schließt Konkurrenz und Rekombination aus, die bei mehreren Amplikons auftreten können, und stellt die effiziente Vervielfältigung unter Bildung des gewünschten Amplikons sicher. Daher spiegeln

die Produkte einer PCR in Tröpfchen die Zusammensetzung komplizierter Ausgangsmischungen wie Genbibliotheken mit variierender Templatlänge oder variierendem G/C-Gehalt getreuer wider als die Produkte einer herkömmlichen PCR.^[158] Eine Möglichkeit, die Monoklonalität auch nach dem Aufbrechen der Tröpfchen zu sichern, besteht darin, vervielfältigte DNA auf einem Mikrokügelchen zu verankern. Nach diesem Prinzip erhält man Anordnungen aus Tausenden von identischen Kopien der Original-DNA auf einem Kügelchen.^[159,160] Solche Kügelchen eignen sich für „Hochdurchsatz-Sequenzierungen der zweiten Generation“^[16,161] für die Quantifizierung seltener Ereignisse in großen Populationen (etwa der Nachweis mutierter Krebszellen)^[159,162,163] und für das Hochdurchsatz-Screening von Zielstrukturen für Transkriptionsfaktoren.^[164]

Monoklonale Tröpfchen bieten auch ein Format für den Nachweis und die Quantifizierung sehr kleiner Nucleinsäuremengen, wie sie in der medizinischen Diagnostik von Viren oder Pathogenen gesucht werden. Die „digitale PCR“ ermittelt unter allen erzeugten Tröpfchen den Anteil der Tröpfchen, in denen es zu einer Vervielfältigung kommt (was dem Vorliegen der DNA-Matrize in diesen Tröpfchen entspricht), und daraus mithilfe der Poisson-Statistik die DNA-Menge in einer Probe. An Ausgabesignalen unterscheidet die digitale PCR dabei lediglich, ob eine Vervielfältigung im Tröpfchen erfolgt ist oder nicht.^[165] Solche linearen, digitalen Signale sind zuverlässiger als die Daten aus herkömmlichen DNA-Quantifizierungsmethoden, bei denen eine exponentielle Vervielfältigung von DNA verfolgt und angenähert werden muss. Tröpfchen in Mikrofluidiksystemen sind wegen des hohen Durchsatzes ideal für niedrige Nachweisgrenzen, wobei die nachweisbare Mindestkonzentration mit zunehmender Tröpfchenzahl sinkt.

Ursprünglich wurde die Emulsions-PCR (ePCR) für makroskopische Emulsionen eingeführt.^[158] Die ersten Mikrofluidik-ePCRs nutzten große Tröpfchen mit nL- bis μ L-Volumina.^[166–169] Viovy und Mitarbeiter untersuchten eine ePCR in μ L-Tröpfchen, die in gewundenen Röhren um einen Kupferzylinder flossen und dabei heiße und kalte Abschnitte passierten.^[170,171] Heutige Mikrofluidiksysteme beruhen auf Pikolitertröpfchen und erreichen somit einen viel höheren Durchsatz. Frühe Mikrofluidikchips für die PCR durchliefen als Ganzes die erforderlichen Temperaturzyklen.^[172,173] Die gewünschte Temperatur lässt sich aber schneller in den Tröpfchen einstellen, wenn diese einzelne Zonen des Chips durchlaufen, die auf konstanter Temperatur gehalten werden. Die Kanäle verlaufen dabei entweder in Schlangenlinien^[174] oder radial (Abbildung 9).^[58] Wie bei jeder PCR ist es auch bei der Verwendung von Tröpfchen in Mikrofluidiksystemen unerlässlich, die Temperatur genau einzustellen, um eine effiziente Vervielfältigung zu erreichen. Die temperaturabhängige Fluoreszenzlebensdauer von Farbstoffen in Tröpfchen diente hierbei als Anhaltspunkt.^[58] Will man es vermeiden, die Temperatur im Mikrofluidiksystem selbst einzustellen, so ist es möglich, zunächst monodisperse Tröpfchen zu erzeugen, diese dann in einem Gefäß aufzufangen und die PCR anschließend in einem käuflichen Thermozykler außerhalb des Systems auszuführen.^[163,175] Die Tröpfchen können danach für weitere Manipulationen (z.B. Ver-

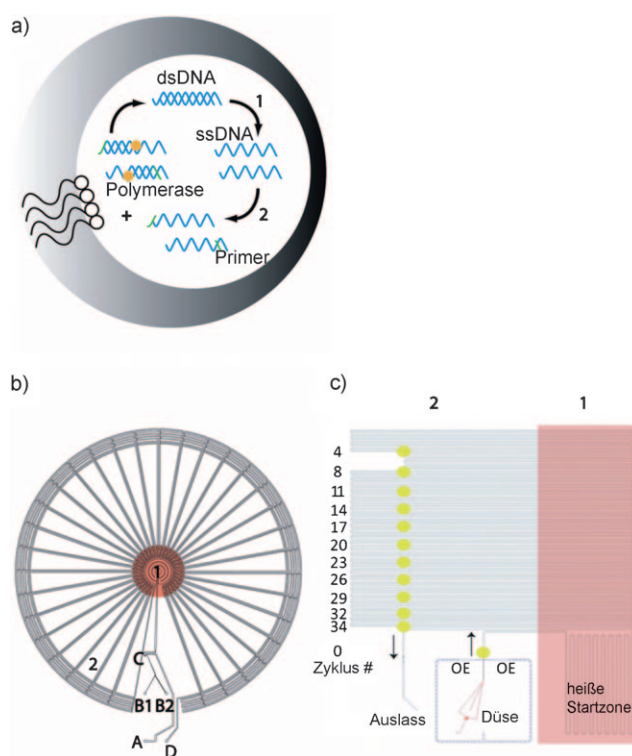


Abbildung 9. Kontinuierliche PCR in Tröpfchen in einem Mikrofluidiksystem für Hochdurchsatz-Verfahren. a) Allgemeines Schema des PCR-Protokolls mit zwei Temperaturen für die Vervielfältigung von Doppelstrang-DNA. b, c) Skizzen zweier Systeme für die kontinuierliche PCR, in denen Tröpfchen die erforderlichen Temperaturzyklen durchlaufen, indem sie zwischen zwei Temperaturzonen hin und her wechseln: b) Beim radialen Aufbau durchfließen die Tröpfchen zur Denaturierung zunächst die Kreise in der heißen inneren Zone, bevor sie für die Primerhybridisierung und die Templatverlängerung zur Peripherie transportiert werden. Anschließend kehren die Tröpfchen zur Mitte zurück, und ein neuer Zyklus beginnt; nach 34 Zyklen werden sie aus dem System entlassen. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [58]. c) In gewundenen Röhren passieren die Tröpfchen 34-mal statische Temperaturzonen für Denaturierung sowie Primerhybridisierung und Templatverlängerung auf entgegengesetzten Seiten eines Chips. In den gelb markierten Zonen wird das Fortschreiten der PCR durch Fluoreszenzmessungen verfolgt. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [174].

schmelzen) wieder in ein Mikrofluidiksystem eingebracht werden. Ein solches Verfahren kam beim gezielten Sequenzieren bestimmter Genregionen zum Einsatz.^[175] Weil bei der PCR in Tröpfchen einheitliche DNA-Vervielfältigungsprodukte erhalten werden, müssen die folgenden (Re-)Sequenzierungsschritte weniger häufig wiederholt werden. Temperaturzyklen lassen sich gänzlich vermeiden, wenn man alternativ zur PCR ein isothermes Vervielfältigungsverfahren einsetzt.^[156]

8. Chemische Synthesen in Tröpfchen

Die Kombination von Synthese und Screening auf einem Chip ist erstrebenswert, weil sie Verbindungsbibliotheken, wie sie von der Pharmaindustrie genutzt werden, mit zellbasierten Screenings verknüpfen könnte. Mugheri et al. be-

schrieben kürzlich eine Synthese von Enzyminhibitoren mit Screening in Tröpfchen, allerdings nicht in Mikrofluidikkanälen, sondern in einer Mikrotröpfchenanordnung.^[176] Die Reaktanten wurden in DMSO/Glycerin gelöst (um ein Verdampfen zu vermeiden) und auf Objektträger getupft, die mit 800 hydrophilen Punkten modifiziert waren. Anschließend wurden Lösungen von Enzym und Substrat auf die Tröpfchen aufgetragen, was die Lösung verdünnte und unspezifische inhibitorische Effekte durch Reste der Ausgangsverbindungen zurückdrängte. Wenn ein Inhibitor in einem Tröpfchen vorlag, kam es zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität. Dieses Beispiel belegt das Potenzial von Tröpfchen für die Synthese niedermolekularer Verbindungen und zeigt bereits viele charakteristische Operationen (Tröpfchenbildung, Verschmelzen, Verdünnung, Fluoreszenzmessung). Ähnliche Synthesen in Tröpfchen in Mikrofluidikkanälen sind zwar anspruchsvoll, aber sie bieten interessante Möglichkeiten.

Tröpfchen eignen sich ideal für den Aufbau von Hochdurchsatz-Screenings. Sie wurden beispielsweise verwendet, um die Reaktionsbedingungen der selektiven Hydrolyse von Ouabain-Hexaacetat zu optimieren, dessen Derivate bei Studien an Neuronen zur Anwendung kommen. Bei einem Verbrauch von nur 20 µg Substrat wurden über 40 verschiedene Reaktionsbedingungen getestet, und die Resultate wurden mithilfe von MALDI-MS ausgewertet.^[177] Ein wichtiger Vorteil von Mikrotröpfchen liegt darin, dass auch Reaktionen, bei denen ein Niederschlag gebildet wird, untersucht werden können, ohne dass Mikrofluidikkanäle verstopft werden. Dies wurde zuerst anhand der Synthese von Indigo sowie der Bildung von Iminen und Amidinen als Modellreaktionen demonstriert. Weil der Niederschlag die dispergierte Phase nicht verließ und die kontinuierliche Phase die Kanalwände vorzugsweise benetzte, verstopfte das unlösliche Produkt die Kanäle nicht.^[178]

Das hohe Oberfläche/Volumen-Verhältnis der Tröpfchen und die zirkulierenden Flüsse im Inneren von Tröpfchen in Mikrofluidikkanälen führen zu einem starken Massentransfer zwischen dispergierter und kontinuierlicher Phase,^[28,179,180] was für Phasentransferreaktionen genutzt werden kann. Onal et al. berichteten über die regioselektive Hydrierung von α,β -ungesättigten Aldehyden in einem Dreiphasensystem. Tröpfchen mit dem organischen Reagens und Bläschen aus Wasserstoffgas waren in einem Wasserfluss dispergiert, der den Katalysator enthielt. In Tröpfchen in Mikrofluidiksystemen entstehen zirkulierende Flüsse (Taylor-Flüsse) als Folge einer Scherung an den Kanalwänden. Diese Flussmuster können den Massentransfer an der Flüssig-flüssig-Grenzfläche erleichtern. Ein drastischer Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit folgte aus der Verringerung des Kanaldurchmessers, weil Taylor-Flüsse unter diesen Bedingungen an Bedeutung gewinnen. Überdies steigerte die Beschleunigung des Wasserflusses den Umsatz, was einem Anstieg der Reynolds-Zahl zugeschrieben wurde, die in den Massentransportkoeffizient des Systems eingeht.^[181]

Das schnelle Durchmischen von Reagentien durch die zirkulierenden Flüsse wirkte auch beschleunigend bei der Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat und bei einer Tandemsequenz aus Diazotierung und Heck-Reaktion im segmen-

tierten Fluss (gegenüber einem laminaren Fluss).^[182,183] Eine ähnliche Tendenz wurde auch bei der Nitrierung von Arenen in einem Zweiphasensystem festgestellt.^[184] Neben der Bereitstellung definierter Flüssig-flüssig-Grenzflächen für die Phasentransferreaktion führte der Einsatz von Tröpfchen als Mikroreaktoren bei dieser exothermen Reaktion auch zu einer schnellen Wärmeableitung.

Tröpfchen in Mikrofluidiksystemen erleichtern nicht nur den Phasentransfer stöchiometrisch eingesetzter Reagentien, sondern sie ermöglichen auch katalytische Reaktionen in Zweiphasensystemen. Theberge et al. beschrieben kürzlich ein System, in dem eine kontinuierliche fluorige Phase, die den Katalysator enthielt, mit einer dispergierten wässrigen Phase kombiniert wurde, in der sich die Reagentien für eine Suzuki-Kreuzkupplung befanden (Abbildung 10).^[185] Um den Palladiumkatalysator in der fluorigen Phase zu lösen und zugleich an die Grenzfläche zu den Tröpfchen zu bringen, wurde ein amphiphiler Ligand mit einer fluorierten Schwanzgruppe und einer hydrophilen Guanidin-Kopfgruppe zugesetzt. Bei einigen Suzuki-Kreuzkupplungen wurden die Produkte in guten Ausbeuten erhalten, und die katalysatorhaltige fluorige Phase konnte in einem geschlossenen System wiederverwendet werden, indem die Tröpfchen am Ausgang des Reaktionskanals gesammelt wurden.

Die Maßstabsvergrößerung bildet bei herkömmlichen Reaktoren ein großes Problem, dessen Lösung in manchen Fällen die Entwicklung neuer Bedingungen erfordert (Mischvorgang, Lösungsmittelvolumen und weitere größenabhängige Faktoren). Wheeler et al. zeigten, dass in Tröpfchenflüssen eine alternative Methode zur Verfügung steht: Der Maßstab einer Reaktion lässt sich vergrößern, indem die Tröpfchen im Bereich des Möglichen vergrößert oder einfach die Tröpfchenzahl erhöht wird. Dieses Konzept wurde anhand der Synthese von α -Diazo- β -ketoestern und einer

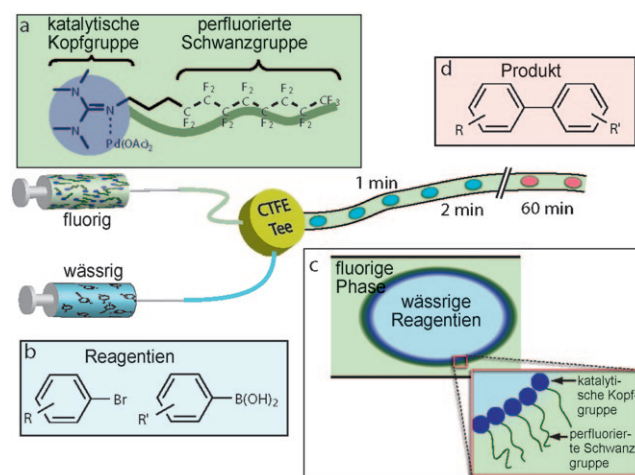


Abbildung 10. Mikrotröpfchen mit katalytisch aktiven Oberflächen. Ein Palladiumkatalysator mit perfluorierter Schwanzgruppe in einer fluorigen Phase (a) und eine wässrige Reagentienlösung (b) wurden in eine T-Kreuzung gepumpt, wo monodisperse Wassertröpfchen in der kontinuierlichen fluorigen Phase entstehen. Beim anschließenden Durchfließen eines Kanals wird in den Tröpfchen das Produkt gebildet (c,d). Die Reaktionszeit ist direkt proportional zum zurückgelegten Weg und lässt sich über die Flussgeschwindigkeit bestimmen. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [185].

nucleophilen aromatischen Substitution bestätigt, wenn auch mit deutlich größeren Tropfenvolumina ($> 100 \mu\text{L}$) als bei nichtindustriellen Synthesen in Tröpfchen üblich.^[186] Mit dem Mikrowellen absorbierenden Perfluormethyldecalin (PFMD) als Trägerphase gelangen auch Suzuki-Miyaura-Kreuzkuppelungen und nucleophile Substitutionen in Tröpfchen unter Mikrowellenbestrahlung.^[187]

9. Polymer- und Gelpartikel

Monodisperse Tröpfchen, wie sie in Mikrofluidikkanälen erzeugt werden können, stellen eine einzigartige Umgebung für die Bildung von Partikeln, Gelkugeln und -kapseln dar. Zahlreiche Originalbeiträge und Übersichten belegen die Fortschritte bei der Herstellung von Polymerpartikeln^[33,188–190] sowie Hydro- und Mikrogelpartikeln und -kapseln.^[191–193] Mikrotröpfchen sind auch nützlich für den Aufbau hierarchischer Materialien, wie mit der Bildung von inversen Polymeropalen durch Kolloidkristallisation in Tröpfchen nachgewiesen wurde (Abbildung 11).^[194,195] In einem Mikrofluidiksystem wurde zunächst eine wässrige Suspension, die monodisperse Polystyrolkugeln und kleinste Kieselgelpartikel enthielt, in einem Ölträgerfluss in Form von Tröpfchen dispergiert, die dann gesammelt wurden. Beim Verdampfen des Wassers aus den Tröpfchen bildeten die Polystyrolkugeln geordnete Gitter, in denen die kleinen Kieselgelpartikel die Zwischenräume besetzten. Die resultierenden Kugeln wurden zum markierungsfreien Nachweis von Biomarkern verwendet.^[196] Tröpfchenflüsse sind sehr gut geeignet, um (geringe Mengen) an Gelpartikeln mit Größen von gut 10 bis fast 1000 μm mit variablen Porengrößen, Ansprechverhalten und Zusammensetzungen zu erhalten. Der

folgende Abschnitt gibt nur einen flüchtigen Einblick in die Anwendungsmöglichkeiten auf Gebieten wie Wirkstofftransport, Kosmetik, Sensoren und Biomedizin.

9.1. Partikelpolymerisation

Die Polymerisation in Tröpfchen findet gewöhnlich unter Einwirkung eines Vernetzers statt, der entweder direkt ins Tröpfcheninnere^[43] oder in die kontinuierliche Phase zugeführt wird.^[197] Die Verwendung von Photoinitiatoren und UV-Bestrahlung^[198] ermöglicht eine gezielte lokale Polymerisation auf einem Mikrofluidikchip, sodass sich die erforderliche Verweilzeit der Partikel auf dem Chip verkürzen lässt. Die Kanäle können geometrisch so ausgelegt werden, dass verzerrte Kugeln oder Stäbchen entstehen,^[43,199,200] und in Mehrfachemulsionen lassen sich Janus-Partikel erhalten.^[201] Zahlreiche Morphologien, auch Janus-Partikel, entstehen als Folge einer Phasentrennung der Polymerlösung im Inneren der Mikrotröpfchen.^[202] Durch Einbringen kleiner Gasblasen in das Tröpfcheninnere werden poröse Mikropartikel erhalten.^[203]

Eine offensichtliche Anwendungsmöglichkeit für Polymerpartikel mit bestimmter Größe und Form liegt im Wirkstofftransport. Die Wirkstoffe können schon im Zuge der Polymerisation in die Partikel eingelagert werden. Weil die Trägerpartikel monodispers sind, ergibt sich ein ähnliches Freisetzungsprofil für alle Partikel.^[204]

Hohle Polymerpartikel (oder Kapseln) wurden auf verschiedene Weise erhalten. Bei der Grenzflächenpolymerisation, einer direkten und auf viele Polymere anwendbaren Methode, diffundieren die aktivierten Initiatoren zur Grenzfläche zwischen kontinuierlicher Phase und Wassertropfchen und lösen dort die Polymerisation aus.^[205] Alternativ wurden Blockcopolymere an der Öl-Wasser-Grenzfläche aufgebaut, um Oberflächenmuster mit Nanoporen zu erhalten.^[206] Doppelmulsionen (Abbildung 11) mit Wasser-Öl-Wasser-Schichtung ergeben Polymerschalen, wenn die Öl-Zwischenphase polymerisiert wird, was beispielsweise auf Zugabe eines Initiators oder Vernetzers zur inneren Phase hin^[207] oder durch UV-Bestrahlung der mittleren Phase geschehen kann.^[208] Zusätzlich kann die Dicke der Schale über die Flussgeschwindigkeiten von Innen- oder Zwischenphase eingestellt werden, und die Kerne lassen sich bezüglich der Schale unsymmetrisch platzieren, indem man die Viskosität der Schalenphase variiert.^[209] Zur Herstellung von Nanopartikel-Kolloidosomen wurde die Ölphase verdampft.^[210] Über monodisperse Partikel mit einstellbarer Form hinaus lassen sich in laminaren Flüssen auch Partikel erzeugen, die aus Bereichen mit unterschiedlichen Polymeren bestehen. Dazu werden zwei oder drei nichtmischbare Monomerflüsse vereint, und die anschließende Polymerisation der Tröpfchen durch UV-Bestrahlung ergibt Partikel mit zwei oder mehr Phasen.^[211] Ist nur eine von zwei Phasen polymerisierbar, so entstehen Partikel mit konvex-konkaver Struktur.^[212,213] Die induzierte Phasentrennung von Polymeren in Tröpfchen führt zu zweiphasigen Partikeln mit vielfältigen inneren Strukturen.^[192,214]

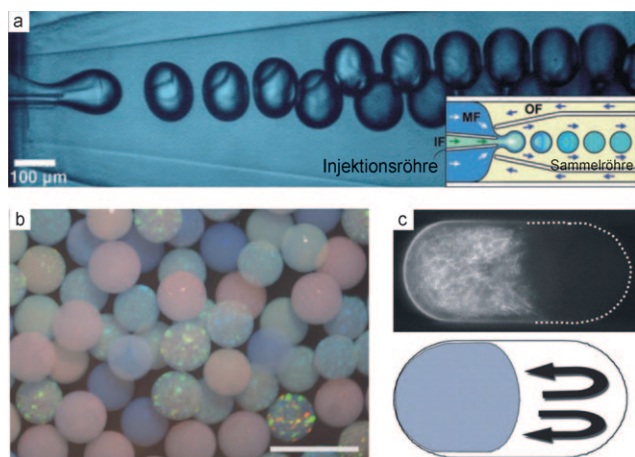


Abbildung 11. a) Bildung von Tröpfchen mit Gelvorstufen in einer Mikrofluidikkapillare (siehe Einschub). Die äußere Phase (OF) besteht aus Siliconöl, die mittlere Phase (MF) ist eine wässrige Lösung von Monomer und Vernetzer, und die innere Phase (IF) enthält den Initiator. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [207]. b) Bild der sieben unterschiedlichen Arten von inversen Polymeropalen in Wasser (Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [194]). c) Komprimierung von Fibrin-Netzwerken durch Flüsse im Inneren von Tröpfchen (Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [228]).

9.2. Gelbildung in Tröpfchen

In einer bahnbrechenden Studie zur Erzeugung von Gelen in Tröpfchen polymerisierten Weitz und Mitarbeiter Acrylamid mit einer Reihe von Comonomeren und Vernetzern in einer Doppel-emulsion mithilfe von Redoxinitiatoren in der inneren Phase.^[207] In Tröpfchen herstellbare, monodisperse Gelpartikel sind interessant für Zellkultur-Anwendungen und für Suspensionen konservierter DNA aus Kulturen, die in Kügelchen gezüchtet wurden („suspension arrays“).^[215] Diese Experimente wurden zwar nicht direkt in Tröpfchen ausgeführt, sie illustrieren aber das Potenzial dieser Technik. Ähnlich wie andere Polymerpartikel sind auch monodisperse Mikrogelpartikel aus biologischen oder bioverträglichen Polymeren^[216–218] durch chemische Gelbildung zugänglich.^[219,220]

Mit temperaturabhängigen Komponenten wie Agarose können Hydrogelpartikel durch einfache Temperaturänderung erhalten werden.^[43] Einige Berichte beschrieben die Bildung von Alginat-Partikeln^[221] in Gegenwart vernetzender Dikationen. Die unkontrollierte Gelbildung lässt sich vermeiden, indem man parallele, laminar fließende Natriumalginat- und CaCl_2 -Lösungen vor der Tröpfchenbildung durch einen Wasserfluss voneinander getrennt hält; nach dem Mischen im Inneren der Tröpfchen tritt die Gelbildung sehr schnell ein.^[199] Alternativ lassen sich Gelpartikel auch durch Mischen der beiden Flüsse kurz vor der Tröpfchenbildung erhalten.^[205] Die Gelbildung durch Verschmelzen von Tröpfchen hat den Vorteil, dass keine Gelbildung außerhalb der Tröpfchen auftreten kann, was ein Verstopfen der Kanäle vermeidet.^[222]

Ein drittes Verfahren zur kontrollierten Alginat-Gelbildung besteht im Eintragen von Calciumionen über die Ölphase,^[207] oder darin, unlösliches CaCO_3 oder BaCO_3 zusammen mit Alginat in Tröpfchen einzuschließen. Durch Eindiffundieren von Essigsäure aus der Ölphase in die emulgierten Tröpfchen werden die Kationen dann aus den Carbonaten freigesetzt.^[223,224] Alginat-Geltröpfchen eignen sich beispielsweise zum Einkapseln von Zellen.^[225,226] Shen und Mitarbeiter erzeugten vor kurzem andere Hydrogelpartikel, wobei sie die Selbstorganisation von Hydrogelbildnern in Wassertröpfchen beim langsamen Abkühlen im Fluss von 70 °C am Ort der Tröpfchenbildung auf unter 64 °C nutzten.^[227]

Mikrofluidikverfahren wurden auch angewendet, um die mechanischen Eigenschaften von Gelen zu erforschen.^[228] Sowohl gereifte als auch im Bildungsprozess begriffene Fibrin-Netzwerke, die in Tröpfchen nach der thrombinkatalysierten Spaltung von Fibrinogen entstanden, wurden beim Durchtritt durch enge Kanäle als Folge von Flüssen im Tröpfcheninneren verformt (Abbildung 11). Die Deformationsgeschwindigkeit lässt sich leicht steuern, und der Young-Modul der Netzwerke konnte auf 50–900 Pa geschätzt werden. Mikrotröpfchen sind somit nicht nur ideal, um Reagentien in kleinen Volumina zu manipulieren, sondern sie bieten auch Möglichkeiten für die Synthese und Charakterisierung neuer weicher Materialien.

10. Zusammenfassung und Ausblick

Rund 50 Jahre nach Lederbergs Experimenten in polydispersen Tröpfchen auf Glas-Objektträgern steht mit Mikrotröpfchen in Mikrofluidiksystemen heute ein leistungsfähiges Hilfsmittel für komplizierte chemische und biologische Experimente zur Verfügung. Dieser Fortschritt beruht auf der Entwicklung einfacher Module zur Manipulation von Tröpfchen während der vergangenen zehn Jahre. Monodisperse Tröpfchen lassen sich nun mit Frequenzen von 10 kHz und mehr erzeugen und auf einem Chip durch Operationen wie Heizen, Kühlen, Verschmelzen, Mischen, Lagern und Sortieren so manipulieren, dass Experimente in Volumenphasen weitgehend nachgestellt werden können. Das nahtlose Zusammenfügen unterschiedlicher Module zu Systemen und die Entwicklung von Tensiden, die auch unter schwierigen Bedingungen intakte Tröpfchen liefern, können schon bald weitere Verbesserungen bringen, ebenso wie die Kopplung von Mikrotröpfchensystemen mit einer größeren Auswahl an analytischen Verfahren. Hier ist besonders die NMR-Spektroskopie hervorzuheben, die bislang noch nicht zur Charakterisierung des Tröpfcheninhalts herangezogen wurde.

Die technischen Fortschritte der vergangenen zehn Jahre haben es ermöglicht, Experimente zu entwerfen, in denen die Stärken von Mikrotröpfchen zum Tragen kommen. Die Kompartimentierung ist ein leistungsfähiges Konzept zur Isolierung und Untersuchung einzelner Zellen und ihrer Umgebung. Monodisperse Tröpfchen, die kleine Mengen nicht verunreinigten zellulären Materials einschließen, können in ausreichender Zahl gebildet und effizient analysiert und manipuliert werden. Mit hochempfindlichen – und idealerweise markierungsfreien – Nachweismethoden gekoppelte Systeme bieten sich für Genomik-, Proteomik- und Metabolomik-Studien an einzelnen Zellen an.

In Tröpfchen lassen sich aber auch chemische Reaktionen untersuchen, die in einer abgeschlossenen Umgebung, an Grenzflächen oder über diese hinweg oder in hochkonzentrierten Lösungen ablaufen. Die Tröpfchen bilden dabei ein Modellsystem mit einigen der wichtigsten Merkmalen der chemischen Umgebung in lebenden Zellen. Neue Erkenntnisse über den Einfluss von Einschluss, Beengung und Grenzflächen auf enzymatische Reaktionen werden nicht nur unser Verständnis von biologischen Systemen vertiefen, sondern auch die Entwicklung neuer chemischer Reaktionen vorantreiben.

Wir bedanken uns bei unseren Mitarbeitern für ihren Beitrag zu unserer Forschung auf diesem Gebiet und Luis M. Fidalgo für das Bild im Inhaltsverzeichnis. Unsere Arbeiten wurden durch die Europäische Union (EC Framework 6 Research Project MiFem) und das RCUK Basic Technology Programme unterstützt.

Eingegangen am 25. November 2009

Online veröffentlicht am 22. Juni 2010

Übersetzt von Dr. Volker Jacob, Weinheim

[1] J. Lederberg, *J. Bacteriol.* **1954**, 68, 258.

[2] P. de Fonbrune, *Technique de micromanipulation*, Masson, Paris, **1949**.

- [3] G. J. V. Nossal, J. Lederberg, *Nature* **1958**, *181*, 1419.
- [4] C. Viret, W. Gurr, *J. Immunol.* **2009**, *182*, 1229.
- [5] B. Rotman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1961**, *47*, 1981.
- [6] S. Y. Teh, R. Lin, L. H. Hung, A. P. Lee, *Lab Chip* **2008**, *8*, 198.
- [7] M. Abdelgawad, A. R. Wheeler, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 920.
- [8] M. G. Pollack, R. B. Fair, A. D. Shenderov, *Appl. Phys. Lett.* **2000**, *77*, 1725.
- [9] H. Song, R. F. Ismagilov, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14613.
- [10] H. Song, J. D. Tice, R. F. Ismagilov, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 792; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 768.
- [11] J. D. Tice, H. Song, A. D. Lyon, R. F. Ismagilov, *Langmuir* **2003**, *19*, 9127.
- [12] H. Song, D. L. Chen, R. F. Ismagilov, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7494; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7336.
- [13] A. Huebner, S. Sharma, M. Srisa-Art, F. Hollfelder, J. B. Edel, A. J. Demello, *Lab Chip* **2008**, *8*, 1244.
- [14] D. T. Chiu, R. M. Lorenz, G. D. M. Jeffries, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5111.
- [15] M. Margulies, M. Egholm, W. E. Altman, S. Attiya, J. S. Bader, L. A. Bembien, J. Berka, M. S. Braverman, Y. J. Chen, Z. T. Chen, S. B. Dewell, L. Du, J. M. Fierro, X. V. Gomes, B. C. Godwin, W. He, S. Helgesen, C. H. Ho, G. P. Irzyk, S. C. Jando, M. L. I. Alenquer, T. P. Jarvie, K. B. Jirage, J. B. Kim, J. R. Knight, J. R. Lanza, J. H. Leamon, S. M. Lefkowitz, M. Lei, J. Li, K. L. Lohman, H. Lu, V. B. Makhijani, K. E. McDade, M. P. McKenna, E. W. Myers, E. Nickerson, J. R. Nobile, R. Plant, B. P. Puc, M. T. Ronan, G. T. Roth, G. J. Sarkis, J. F. Simons, J. W. Simpson, M. Srinivasan, K. R. Tartaro, A. Tomasz, K. A. Vogt, G. A. Volkmer, S. H. Wang, Y. Wang, M. P. Weiner, P. G. Yu, R. F. Begley, J. M. Rothberg, *Nature* **2005**, *437*, 376.
- [16] E. R. Mardis, *Trends Genet.* **2008**, *24*, 133.
- [17] D. S. Tawfik, A. D. Griffiths, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 652.
- [18] E. Mastrobattista, V. Taly, E. Chanudet, P. Treacy, B. T. Kelly, A. D. Griffiths, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1291.
- [19] J. J. Agresti, B. T. Kelly, A. Jäschke, A. D. Griffiths, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 16170.
- [20] M. d'Abbadie, M. Hofreiter, A. Vaisman, D. Loakes, D. Gasparutto, J. Cadet, R. Woodgate, S. Paabo, P. Holliger, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 939.
- [21] F. J. Ghadessy, N. Ramsay, F. Boudsocq, D. Loakes, A. Brown, S. Iwai, A. Vaisman, R. Woodgate, P. Holliger, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 755.
- [22] F. Courtois, L. F. Olguin, G. Whyte, D. Bratton, W. T. S. Huck, C. Abell, F. Hollfelder, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 439.
- [23] T. Thorsen, R. W. Roberts, F. H. Arnold, S. R. Quake, *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 4163.
- [24] P. B. Umbanhowar, V. Prasad, D. A. Weitz, *Langmuir* **2000**, *16*, 347.
- [25] L. Cai, N. Friedman, X. S. Xie, *Nature* **2006**, *440*, 358.
- [26] B. Zheng, L. S. Roach, R. F. Ismagilov, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11170.
- [27] J. Leng, J. B. Salmon, *Lab Chip* **2009**, *9*, 24.
- [28] J. R. Burns, C. Ramshaw, *Lab Chip* **2001**, *1*, 10.
- [29] K. Ahn, J. Agresti, H. Chong, M. Marquez, D. A. Weitz, *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *88*, 3.
- [30] C. Priest, S. Herminghaus, R. Seemann, *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *89*, 134101.
- [31] H. Song, M. R. Bringer, J. D. Tice, C. J. Gerdt, R. F. Ismagilov, *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *83*, 4664.
- [32] P. Kim, K. W. Kwon, M. C. Park, S. H. Lee, S. M. Kim, K. Y. Suh, *Biochip J.* **2008**, *2*, 1.
- [33] A. Gunther, K. F. Jensen, *Lab Chip* **2006**, *6*, 1487.
- [34] J. West, M. Becker, S. Tombrink, A. Manz, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 4403.
- [35] G. F. Christopher, S. L. Anna, *J. Phys. D* **2007**, *40*, R319.
- [36] T. Nisisako, T. Torii, T. Higuchi, *Lab Chip* **2002**, *2*, 24.
- [37] D. R. Link, S. L. Anna, D. A. Weitz, H. A. Stone, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92*, 054503.
- [38] S. L. Anna, N. Bontoux, H. A. Stone, *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *82*, 364.
- [39] P. Garstecki, H. A. Stone, G. M. Whitesides, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94*, 164501.
- [40] A. S. Utada, A. Fernandez-Nieves, H. A. Stone, D. A. Weitz, *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *99*, 094502.
- [41] A. S. Utada, A. Fernandez-Nieves, J. M. Gordillo, D. A. Weitz, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 014502.
- [42] K. J. Humphry, A. Ajdari, A. Fernandez-Nieves, H. A. Stone, D. A. Weitz, *Phys. Rev. E* **2009**, *79*, 056310.
- [43] S. Q. Xu, Z. H. Nie, M. Seo, P. Lewis, E. Kumacheva, H. A. Stone, P. Garstecki, D. B. Weibel, I. Gitlin, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 734; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 724.
- [44] S. Sugiura, M. Nakajima, S. Iwamoto, M. Seki, *Langmuir* **2001**, *17*, 5562.
- [45] K. C. van Dijke, K. Schroën, R. M. Boom, *Langmuir* **2008**, *24*, 10107.
- [46] S. van der Graaf, C. Schroën, R. M. Boom, *J. Membr. Sci.* **2005**, *251*, 7.
- [47] N. R. Beer, K. A. Rose, I. M. Kennedy, *Lab Chip* **2009**, *9*, 838.
- [48] R. M. Lorenz, J. S. Edgar, G. D. M. Jeffries, D. T. Chiu, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 6433.
- [49] M. Y. He, J. S. Edgar, G. D. M. Jeffries, R. M. Lorenz, J. P. Shelby, D. T. Chiu, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1539.
- [50] M. Y. He, J. S. Kuo, D. T. Chiu, *Appl. Phys. Lett.* **2005**, *87*, 031916.
- [51] M. He, J. S. Kuo, D. T. Chiu, *Langmuir* **2006**, *22*, 6408.
- [52] A. Bransky, N. Korin, M. Khoury, S. Levenberg, *Lab Chip* **2009**, *9*, 516.
- [53] N. T. Nguyen, T. H. Ting, Y. F. Yap, T. N. Wong, J. C. K. Chai, W. L. Ong, J. Zhou, S. H. Tan, L. Yobas, *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *91*, 084102.
- [54] S. H. Tan, S. M. S. Murshed, N. T. Nguyen, T. N. Wong, L. Yobas, *J. Phys. D* **2008**, *41*, 165501.
- [55] A. Huebner, M. Srisa-Art, D. Holt, C. Abell, F. Hollfelder, A. J. Demello, J. B. Edel, *Chem. Commun.* **2007**, 1218.
- [56] S. Köster, F. E. Angile, H. Duan, J. J. Agresti, A. Wintner, C. Schmitz, A. C. Rowat, C. A. Merten, D. Pignano, A. D. Griffiths, D. A. Weitz, *Lab Chip* **2008**, *8*, 1110.
- [57] M. Srisa-Art, A. J. deMello, J. B. Edel, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 6682.
- [58] Y. Schaerli, R. C. Wootton, T. Robinson, V. Stein, C. Dunsby, M. A. A. Neil, P. M. W. French, A. J. deMello, C. Abell, F. Hollfelder, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 302.
- [59] A. Funfak, A. Brosing, M. Brand, J. M. Kohler, *Lab Chip* **2007**, *7*, 1132.
- [60] J. Clausell-Tormos, D. Lieber, J. C. Baret, A. El-Harrak, O. J. Miller, L. Frenz, J. Blouwolff, K. J. Humphry, S. Koster, H. Duan, C. Holtze, D. A. Weitz, A. D. Griffiths, C. A. Merten, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 427.
- [61] W. W. Shi, J. H. Qin, N. N. Ye, B. C. Lin, *Lab Chip* **2008**, *8*, 1432.
- [62] J. S. Edgar, G. Milne, Y. Q. Zhao, C. P. Pabbati, D. S. W. Lim, D. T. Chiu, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2757; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2719.
- [63] J. S. Edgar, C. P. Pabbati, R. M. Lorenz, M. Y. He, G. S. Fiorini, D. T. Chiu, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 6948.
- [64] E. Brouzes, M. Medkova, N. Savenelli, D. Marran, M. Twardowski, J. B. Hutchison, J. M. Rothberg, D. R. Link, N. Perri-mon, M. L. Samuels, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 14195.
- [65] M. Chabert, J. L. Viovy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 3191.
- [66] J. F. Edd, D. Di Carlo, K. J. Humphry, S. Koster, D. Irimia, D. A. Weitz, M. Toner, *Lab Chip* **2008**, *8*, 1262.

- [67] A. R. Abate, C. H. Chen, J. J. Agresti, D. A. Weitz, *Lab Chip* **2009**, *9*, 2628.
- [68] C. H. Chen, A. R. Abate, D. Y. Lee, E. M. Terentjev, D. A. Weitz, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 3201.
- [69] J. Q. Boedicker, L. Li, T. R. Kline, R. F. Ismagilov, *Lab Chip* **2008**, *8*, 1265.
- [70] F. Courtois, L. F. Olguin, G. Whyte, A. B. Theberge, W. T. S. Huck, F. Hollfelder, C. Abell, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3008.
- [71] L. S. Roach, H. Song, R. F. Ismagilov, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 785.
- [72] Y. Liu, S.-Y. Jung, C. P. Collier, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 4922.
- [73] M. Meier, J. Kennedy-Darling, S. H. Choi, E. M. Norstrom, S. S. Sisodia, R. F. Ismagilov, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1515; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1487.
- [74] C. Holtze, A. C. Rowat, J. J. Agresti, J. B. Hutchison, F. E. Angile, C. H. J. Schmitz, S. Koster, H. Duan, K. J. Humphry, R. A. Scanga, J. S. Johnson, D. Pisignano, D. A. Weitz, *Lab Chip* **2008**, *8*, 1632.
- [75] J. E. Kreutz, L. Li, L. S. Roach, T. Hatakeyama, R. F. Ismagilov, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6042.
- [76] J.-C. Baret, F. Kleinschmidt, A. El Harrak, A. D. Griffiths, *Langmuir* **2009**, *25*, 6088.
- [77] K. Wang, Y. C. Lu, J. H. Xu, G. S. Luo, *Langmuir* **2009**, *25*, 2153.
- [78] L. Mazutis, J.-C. Baret, A. D. Griffiths, *Lab Chip* **2009**, *9*, 2665.
- [79] L. Frenz, A. El Harrak, M. Pauly, S. Bégin-Colin, A. D. Griffiths, J. C. Baret, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6923; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6817.
- [80] Y. C. Tan, J. S. Fisher, A. I. Lee, V. Cristini, A. P. Lee, *Lab Chip* **2004**, *4*, 292.
- [81] N. Bremond, A. R. Thiam, J. Bibette, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 024501.
- [82] L. M. Fidalgo, C. Abell, W. T. S. Huck, *Lab Chip* **2007**, *7*, 984.
- [83] X. Niu, S. Gulati, J. B. Edel, A. J. deMello, *Lab Chip* **2008**, *8*, 1837.
- [84] A. R. Thiam, N. Bremond, J. Bibette, *Phys. Rev. Lett.* **2009**, *102*, 188304.
- [85] D. R. Link, E. Grasland-Mongrain, A. Duri, F. Sarrazin, Z. D. Cheng, G. Cristobal, M. Marquez, D. A. Weitz, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2618; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2556.
- [86] M. Chabert, K. D. Dorfman, J. L. Viovy, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 3706.
- [87] M. Zagnoni, J. M. Cooper, *Lab Chip* **2009**, *9*, 2652.
- [88] L. Mazutis, J. C. Baret, P. Treacy, Y. Skhiri, A. F. Araghi, M. Ryckelynck, V. Taly, A. D. Griffiths, *Lab Chip* **2009**, *9*, 2902.
- [89] C. N. Baroud, M. R. de Saint Vincent, J. P. Delville, *Lab Chip* **2007**, *7*, 1029.
- [90] F. Mostowfi, K. Khristov, J. Czarnecki, J. Masliyah, S. Bhattacharjee, *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *90*, 184102.
- [91] X. Z. Niu, F. Gielen, A. J. deMello, J. B. Edel, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7321.
- [92] M. Zagnoni, C. N. Baroud, J. M. Cooper, *Phys. Rev. E* **2009**, *80*, 046303.
- [93] L. Frenz, J. Blouwolff, A. D. Griffiths, J. C. Baret, *Langmuir* **2008**, *24*, 12073.
- [94] M. Prakash, N. Gershenfeld, *Science* **2007**, *315*, 832.
- [95] M. J. Fuerstman, P. Garstecki, G. M. Whitesides, *Science* **2007**, *315*, 828.
- [96] G. Cristobal, J. P. Benoit, M. Joanicot, A. Ajdari, *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *89*, 034104.
- [97] W. Engl, M. Roche, A. Colin, P. Panizza, A. Ajdari, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *95*, 208304.
- [98] M. Schindler, A. Ajdari, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 044501.
- [99] Y. Liu, R. F. Ismagilov, *Langmuir* **2009**, *25*, 2854.
- [100] D. Chen, W. B. Du, Y. Liu, W. S. Liu, A. Kuznetsov, F. E. Mendez, L. H. Philipson, R. F. Ismagilov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 16843.
- [101] L. Frenz, K. Blank, E. Brouzes, A. D. Griffiths, *Lab Chip* **2009**, *9*, 1344.
- [102] J. U. Shim, G. Cristobal, D. R. Link, T. Thorsen, Y. W. Jia, K. Piatelli, S. Fraden, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8825.
- [103] T. Thorsen, S. J. Maerkl, S. R. Quake, *Science* **2002**, *298*, 580.
- [104] J. N. Lee, C. Park, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6544.
- [105] A. Huebner, D. Bratton, G. Whyte, M. Yang, A. J. deMello, C. Abell, F. Hollfelder, *Lab Chip* **2009**, *9*, 692.
- [106] C. H. J. Schmitz, A. C. Rowat, S. Koster, D. A. Weitz, *Lab Chip* **2009**, *9*, 44.
- [107] P. Laval, A. Crombez, J. B. Salmon, *Langmuir* **2009**, *25*, 1836.
- [108] J. F. Edd, K. J. Humphry, D. Irimia, D. A. Weitz, M. Toner, *Lab Chip* **2009**, *9*, 1859.
- [109] P. Laval, N. Lisai, J. B. Salmon, M. Joanicot, *Lab Chip* **2007**, *7*, 829.
- [110] W. H. Tan, S. Takeuchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 1146.
- [111] H. Boukellal, S. Selimovic, Y. W. Jia, G. Cristobal, S. Fraden, *Lab Chip* **2009**, *9*, 331.
- [112] N. R. Beer, K. A. Rose, I. M. Kennedy, *Lab Chip* **2009**, *9*, 841.
- [113] K. Ahn, C. Kerbage, T. P. Hunt, R. M. Westervelt, D. R. Link, D. A. Weitz, *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *88*, 024104.
- [114] T. Franke, A. R. Abate, D. A. Weitz, A. Wixforth, *Lab Chip* **2009**, *9*, 2625.
- [115] K. Zhang, Q. L. Liang, S. Ma, X. A. Mu, P. Hu, Y. M. Wang, G. A. Luo, *Lab Chip* **2009**, *9*, 2992.
- [116] C. N. Baroud, J. P. Delville, F. Gallaire, R. Wunenburger, *Phys. Rev. E* **2007**, *75*, 046302.
- [117] Y. F. Yap, S. H. Tan, N. T. Nguyen, S. M. S. Murshed, T. N. Wong, L. Yobas, *J. Phys. D* **2009**, *42*, 065503.
- [118] J. C. Baret, O. J. Miller, V. Taly, M. Ryckelynck, A. El-Harrak, L. Frenz, C. Rick, M. L. Samuels, J. B. Hutchison, J. J. Agresti, D. R. Link, D. A. Weitz, A. D. Griffiths, *Lab Chip* **2009**, *9*, 1850.
- [119] L. M. Fidalgo, G. Whyte, D. Bratton, C. F. Kaminski, C. Abell, W. T. S. Huck, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2072; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2042.
- [120] A. Liao, R. Karnik, A. Majumdar, J. H. D. Cate, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 7618.
- [121] N. Damean, L. F. Olguin, F. Hollfelder, C. Abell, W. T. S. Huck, *Lab Chip* **2009**, *9*, 1707.
- [122] H. Song, H. W. Li, M. S. Munson, T. G. Van Ha, R. F. Ismagilov, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4839.
- [123] Y. P. Bai, X. M. He, D. S. Liu, S. N. Patil, D. Bratton, A. Huebner, F. Hollfelder, C. Abell, W. T. S. Huck, *Lab Chip* **2009**, *9*, 44.
- [124] M. Srisa-Art, A. J. deMello, J. B. Edel, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *101*, 014502.
- [125] M. Srisa-Art, E. C. Dyson, A. J. deMello, J. B. Edel, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7063.
- [126] M. Srisa-Art, D. K. Kang, J. Hong, H. Park, R. J. Leatherbarrow, J. B. Edel, S. I. Chang, A. J. deMello, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1605.
- [127] G. Cristobal, L. Arbouet, F. Sarrazin, D. Talaga, J.-L. Bruneel, M. Joanicot, L. Servant, *Lab Chip* **2006**, *6*, 1140.
- [128] F. Sarrazin, J.-B. Salmon, D. Talaga, L. Servant, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1689.
- [129] S. E. Barnes, Z. T. Cygan, J. K. Yates, K. L. Beers, E. J. Amis, *Analyst* **2006**, *131*, 1027.
- [130] K. R. Strehle, D. Cialla, P. Rösch, T. Henkel, M. Köhler, J. Popp, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1542.
- [131] G. Wang, C. Lim, L. Chen, H. Chon, J. Choo, J. Hong, A. J. deMello, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 1827.
- [132] F. Foret, P. Kusy, *Electrophoresis* **2006**, *27*, 4877.
- [133] I. M. Lazar, J. Grym, F. Foret, *Mass Spectrom. Rev.* **2006**, *25*, 573.
- [134] S. Koster, E. Verpoorte, *Lab Chip* **2007**, *7*, 1394.

- [135] P. Hoffmann, M. Eschner, S. Fritzsche, D. Belder, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7256.
- [136] D. Belder, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3790; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3736.
- [137] G. T. Roman, M. Wang, K. N. Shultz, C. Jennings, R. T. Kennedy, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8231.
- [138] L. M. Fidalgo, G. Whyte, B. T. Ruotolo, J. L. P. Benesch, F. Stengel, C. Abell, C. V. Robinson, W. T. S. Huck, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3719; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3665.
- [139] R. T. Kelly, J. S. Page, I. Marginean, K. Q. Tang, R. D. Smith, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6964; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6832.
- [140] J. Pei, Q. Li, M. S. Lee, G. A. Valaskovic, R. T. Kennedy, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6558.
- [141] S. J. Liu, Y. F. Gu, R. B. Le Roux, S. M. Matthews, D. Bratton, K. Yunus, A. C. Fisher, W. T. S. Huck, *Lab Chip* **2008**, *8*, 1937.
- [142] C. X. Luo, X. J. Yang, O. Fu, M. H. Sun, Q. Ouyang, Y. Chen, H. Ji, *Electrophoresis* **2006**, *27*, 1977.
- [143] Z. Han, W. Li, Y. Huang, B. Zheng, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5840.
- [144] A. Huebner, L. F. Olguin, D. Bratton, G. Whyte, W. T. S. Huck, A. J. de Mello, J. B. Edel, C. Abell, F. Hollfelder, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 3890.
- [145] K. Martin, T. Henkel, V. Baier, A. Grodrian, T. Schön, M. Roth, J. M. Köhler, J. Metze, *Lab Chip* **2003**, *3*, 202.
- [146] H. Hufnagel, A. Huebner, C. Gulch, K. Guse, C. Abell, F. Hollfelder, *Lab Chip* **2009**, *9*, 1576.
- [147] J. U. Shim, L. F. Olguin, G. Whyte, D. Scott, A. C. Babbie, C. Abell, F. Hollfelder, W. T. S. Huck, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15251.
- [148] H. N. Joensson, M. L. Samuels, E. R. Brouzes, M. Medkova, M. Uhlen, D. R. Link, H. Andersson-Svahn, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2556; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2518.
- [149] J. C. Gadd, C. L. Kuyper, B. S. Fujimoto, R. W. Allen, D. T. Chiu, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 3450.
- [150] H. J. Kim, J. Q. Boedicker, J. W. Choi, R. F. Ismagilov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 18188.
- [151] J. Q. Boedicker, M. E. Vincent, R. F. Ismagilov, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6022; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5908.
- [152] Y. H. Zhan, J. Wang, N. Bao, C. Lu, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2027.
- [153] A. T. H. Hsieh, N. Hori, R. Massoudi, P. J. H. Pan, H. Sasaki, Y. A. Lin, A. P. Lee, *Lab Chip* **2009**, *9*, 2638.
- [154] A. E. Sgro, P. B. Allen, D. T. Chiu, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4845.
- [155] P. S. Dittrich, M. Jahnz, P. Schwill, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 811.
- [156] L. Mazutis, A. F. Araghi, O. J. Miller, J. C. Baret, L. Frenz, A. Janoshazi, V. Taly, B. J. Miller, J. B. Hutchison, D. Link, A. D. Griffiths, M. Ryckelynck, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 4813.
- [157] A. J. de Mello, *Lab Chip* **2001**, *1*, 24N.
- [158] R. Williams, S. G. Peisajovich, O. J. Miller, S. Magdassi, D. S. Tawfik, A. D. Griffiths, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 545.
- [159] F. Diehl, M. Li, Y. P. He, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, D. Dressman, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 551.
- [160] F. Diehl, M. Li, D. Dressman, Y. P. He, D. Shen, S. Szabo, L. A. Diaz, S. N. Goodman, K. A. David, H. Juhl, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 16368.
- [161] J. Shendure, H. L. Ji, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1135.
- [162] M. Li, F. Diehl, D. Dressman, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 95.
- [163] P. Kumaresan, C. J. Yang, S. A. Cronier, R. G. Blazei, R. A. Mathies, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 3522.
- [164] T. Kojima, Y. Takei, M. Ohtsuka, Y. Kawarasaki, T. Yamane, H. Nakano, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e150.
- [165] B. Vogelstein, K. W. Kinzler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9236.
- [166] S. Mohr, Y. H. Zhang, A. Macaskill, P. J. R. Day, R. W. Barber, N. J. Goddard, D. R. Emerson, P. R. Fielden, *Microfluid. Nanofluid.* **2007**, *3*, 611.
- [167] A. Gonzalez, D. Ciobanu, M. Sayers, N. Sirr, T. Dalton, M. Davies, *Biomed. Microdevices* **2007**, *9*, 729.
- [168] M. Curcio, J. Roeraade, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1.
- [169] F. Wang, M. A. Burns, *Biomed. Microdevices* **2009**, *11*, 1071.
- [170] K. D. Dorfman, M. Chabert, J. H. Codarbox, G. Rousseau, P. de Cremoux, J. L. Viovy, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3700.
- [171] M. Chabert, K. D. Dorfman, P. de Cremoux, J. Roeraade, J. L. Viovy, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7722.
- [172] N. R. Beer, E. K. Wheeler, L. Lee-Houghton, N. Watkins, S. Nasarabadi, N. Hebert, P. Leung, D. W. Arnold, C. G. Bailey, B. W. Colston, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1854.
- [173] N. R. Beer, B. J. Hindson, E. K. Wheeler, S. B. Hall, K. A. Rose, I. M. Kennedy, B. W. Colston, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 8471.
- [174] M. M. Kiss, L. Ortoleva-Donnelly, N. R. Beer, J. Warner, C. G. Bailey, B. W. Colston, J. M. Rothberg, D. R. Link, J. H. Leamon, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8975.
- [175] R. Tewhey, J. B. Warner, M. Nakano, B. Libby, M. Medkova, P. H. David, S. K. Kotsopoulos, M. L. Samuels, J. B. Hutchison, J. W. Larson, E. J. Topol, M. P. Weiner, O. Harismendy, J. Olson, D. R. Link, K. A. Frazer, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 1025.
- [176] L. Muehler, O. N. Burchak, L. A. Balakireva, A. Thomas, F. Chatelain, M. Y. Balakirev, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7775; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7639.
- [177] T. Hatakeyama, D. L. Chen, R. F. Ismagilov, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2518.
- [178] S. L. Poe, M. A. Cummings, M. P. Haaf, D. T. McQuade, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1574; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1544.
- [179] P. Mary, V. Studer, P. Tabeing, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2680.
- [180] M. Rhee, M. A. Burns, *Langmuir* **2007**, *24*, 590.
- [181] Y. Önal, M. Lucas, P. Claus, *Chem. Eng. Technol.* **2005**, *28*, 972.
- [182] B. Ahmed, D. Barrow, T. Wirth, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1043.
- [183] B. Ahmed-Omer, D. A. Barrow, T. Wirth, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 3352.
- [184] G. Dummann, U. Quittmann, L. Gröschel, D. W. Agar, O. Wörz, K. Morgenschweis, *Catal. Today* **2003**, *79–80*, 433.
- [185] A. B. Theberge, G. Whyte, M. Frenzel, L. M. Fidalgo, R. C. R. Wootton, W. T. S. Huck, *Chem. Commun.* **2009**, 6225.
- [186] R. C. Wheeler, O. Benali, M. Deal, E. Farrant, S. J. F. MacDonald, B. H. Warrington, *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11*, 704.
- [187] O. Benali, M. Deal, E. Farrant, D. Tapolczay, R. Wheeler, *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 1007.
- [188] C. A. Serra, Z. Chang, *Chem. Eng. Technol.* **2008**, *31*, 1099.
- [189] W. Engl, R. Backov, P. Panizza, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2008**, *13*, 206.
- [190] S. W. Choi, I. W. Cheong, J. H. Kim, Y. Xia, *Small* **2009**, *5*, 454.
- [191] M. Das, H. Zhang, E. Kumacheva, *Annu. Rev. Mater. Res.* **2006**, *36*, 117.
- [192] R. K. Shah, J. W. Kim, J. J. Agresti, D. A. Weitz, L. Y. Chu, *Soft Matter* **2008**, *4*, 2303.
- [193] R. K. Shah, H. C. Shum, A. C. Rowat, D. Lee, J. J. Agresti, A. S. Utada, L. Y. Chu, J. W. Kim, A. Fernandez-Nieves, C. J. Martinez, D. A. Weitz, *Mater. Today* **2008**, *11*, 18.
- [194] Y. J. Zhao, X. W. Zhao, J. Hu, M. Xu, W. J. Zhao, L. G. Sun, C. Zhu, H. Xu, Z. Z. Gu, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 569.
- [195] S. H. Kim, S. Y. Lee, G. R. Yi, D. J. Pine, S. M. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10897.
- [196] Y. J. Zhao, X. W. Zhao, J. Hu, J. Li, W. Y. Xu, Z. Z. Gu, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7486; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7350.
- [197] H. Zhang, E. Tumarkin, R. Peerani, Z. Nie, R. M. A. Sullan, G. C. Walker, E. Kumacheva, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12205.
- [198] W. J. Jeong, J. Y. Kim, J. Choo, E. K. Lee, C. S. Han, D. J. Beebe, G. H. Seong, S. H. Lee, *Langmuir* **2005**, *21*, 3738.
- [199] Q. Xu, M. Hashimoto, T. T. Dang, T. Hoare, D. S. Kohane, G. M. Whitesides, R. Langer, D. G. Anderson, H. David, *Small* **2009**, *5*, 1575.

- [200] M. Seo, Z. Nie, S. Xu, M. Mok, P. C. Lewis, R. Graham, E. Kumacheva, *Langmuir* **2005**, *21*, 11614.
- [201] C. H. Chen, R. K. Shah, A. R. Abate, D. A. Weitz, *Langmuir* **2009**, *25*, 4320.
- [202] Y. Wang, B. H. Guo, X. Wan, J. Xu, X. Wang, Y. P. Zhang, *Polymer* **2009**, *50*, 3361.
- [203] J. Wan, A. Bick, M. Sullivan, H. A. Stone, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 3314.
- [204] Q. B. Xu, M. Hashimoto, T. T. Dang, T. Hoare, D. S. Kohane, G. M. Whitesides, R. Langer, D. G. Anderson, *Small* **2009**, *5*, 1575.
- [205] C. H. Choi, J. H. Jung, D. W. Kim, Y. M. Chung, C. S. Lee, *Lab Chip* **2008**, *8*, 1544.
- [206] S. Abraham, Y. H. Park, J. K. Lee, C. S. Ha, I. Kim, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 2177.
- [207] J. W. Kim, A. S. Utada, A. Fernandez-Nieves, Z. B. Hu, D. A. Weitz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1851; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1819.
- [208] Z. Nie, S. Xu, M. Seo, P. C. Lewis, E. Kumacheva, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8058.
- [209] Y. Hennequin, N. Pannacci, C. P. De Torres, G. Tetradis-Meris, S. Chapuliot, E. Bouchaud, P. Tabeling, *Langmuir* **2009**, *25*, 7857.
- [210] D. Lee, D. A. Weitz, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 3498.
- [211] Z. Nie, W. Li, M. Seo, S. Xu, E. Kumacheva, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9408.
- [212] T. Nisisako, T. Tonii, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1489.
- [213] N. Prasad, J. Perumal, C. H. Choi, C. S. Lee, D. P. Kim, *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 1656.
- [214] B. Wang, C. S. Ho, D. A. Weitz, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 641.
- [215] M. Walser, R. Pellaux, A. Meyer, M. Bechtold, H. Vanderschuren, R. Reinhardt, J. Magyar, S. Panke, M. Held, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, e57.
- [216] D. Mark, S. Haeberle, R. Zengerle, J. Ducree, G. T. Vladislavljjevic, *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *336*, 634.
- [217] H. Zhang, E. Tumarkin, R. M. A. Sullan, G. C. Walker, E. Kumacheva, *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28*, 527.
- [218] J. K. Oh, R. Drumright, D. J. Siegwart, K. Matyjaszewski, *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 448.
- [219] B. G. De Geest, J. P. Urbanski, T. Thorsen, J. Demeester, S. C. De Smedt, *Langmuir* **2005**, *21*, 10275.
- [220] H. Zhang, X. J. Ju, R. Xie, C. J. Cheng, P. W. Ren, L. Y. Chu, *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *336*, 235.
- [221] S. Sugiura, T. Oda, Y. Izumida, Y. Aoyagi, M. Satake, A. Ochiai, N. Ohkohchi, M. Nakajima, *Biomaterials* **2005**, *26*, 3327.
- [222] E. Um, D. S. Lee, H. B. Pyo, J. K. Park, *Microfluid. Nanofluid.* **2008**, *5*, 541.
- [223] L. Capretto, S. Mazzitelli, C. Balestra, A. Tosi, C. Nastruzzi, *Lab Chip* **2008**, *8*, 617.
- [224] E. Amici, G. Tetradis-Meris, C. P. de Torres, F. Jousse, *Food Hydrocolloids* **2008**, *22*, 97.
- [225] V. L. Workman, S. B. Dunnett, P. Kille, D. D. Palmer, *Bio-microfluidics* **2007**, *1*, 014105.
- [226] V. L. Workman, S. B. Dunnett, P. Kille, D. D. Palmer, *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, *29*, 165.
- [227] W. Y. Chen, Y. J. Yang, C. Rinadi, D. Zhou, A. Q. Shen, *Lab Chip* **2009**, *9*, 2947.
- [228] H. M. Evans, E. Surenjav, C. Priest, S. Herminghaus, R. Seemann, T. Pfohl, *Lab Chip* **2009**, *9*, 1933.