

Schlussbericht zum Teilvorhaben

Grundlegende Untersuchungen von plasmatechnischen Prozessen für Diagnostikplattformen

Berichtszeitraum: 1.7.2003 bis 31.12.2006

Förderkennzeichen: 13N8458

Förderzeitraum: 1.7.2003 bis 31.12.2006

Projektleiter:

Dr. Andreas Ohl

Projektmitarbeiter:

Dr. Wilfried Besch,

Dr. Karsten Schröder, Dr. Antje Quade

Dagmar Jasinski, Steffen Borkowski, Uwe Lindemann

Institut für Niedertemperatur-Plasmaphysik e.V.

Felix-Hausdorff-Str. 2

17489 Greifswald

Juni 2007

Inhaltsverzeichnis

1	Aufgabenstellung und Projektziele	3
1.1	<i>Technische Voraussetzungen, Planung und Ablauf des Vorhabens</i>	5
1.1.1	Technische Voraussetzungen	5
1.1.2	Planung und Ablauf des Vorhabens	5
1.2	<i>Wissenschaftlicher und technischer Stand</i>	7
1.3	<i>Zusammenarbeit mit anderen Stellen.....</i>	9
2	Ergebnisse	10
2.1	<i>Mikrofluidikstruktur für die Zellkultur – Zellkulturchip</i>	10
2.1.1	Prinzipieller Aufbau	10
2.1.2	Detaillösungen	11
2.1.3	Montageverfahren	15
2.2	<i>Plasmaprozesse.....</i>	18
2.2.1	Prozessauswahl und Ausrüstungen	18
2.2.2	Plasmabonden	19
2.3	<i>Analytische Untersuchungen und Eigenschaften der Zellchips.....</i>	22
2.3.1	Kontaktwinkel	22
2.3.2	Rauhigkeit der Folien	23
2.3.3	Abzugskräfte	24
2.3.4	XPS-Messungen	27
2.3.5	Befüllverhalten.....	31
2.3.6	Statistische Funktionstests und Langzeitverhalten.....	33
2.3.7	Zellkulturtests.....	35
3	Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	38
4	Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	39
5	Vorträge und Veröffentlichungen	40
5.1	<i>Vorträge.....</i>	40
5.2	<i>Veröffentlichungen.....</i>	40
6	Zusammenfassung	41
7	Literatur.....	43

1 Aufgabenstellung und Projektziele

Inhalt des Vorhabens waren Untersuchungen zum Einsatz von Plasmaprozessen bei der Herstellung von komplexen Polymerstrukturen, die in der biomedizinischen Diagnostik, der Biomedizintechnik und der Zellkulturtechnik Verwendung finden. Eine nicht unerhebliche Zahl von Produkten aus diesem Bereich wird heute bereits unter Verwendung von Niederdruckplasma-Prozessschritten, insbesondere zur Aktivierung und Beschichtung, hergestellt. Neuere Entwicklungen, wie zum Beispiel der zunehmende Einsatz komplexer, dreidimensionaler, mikrostrukturierter Bauteile aus Kunststoff stellen interessante neue Anwendungen für Plasmaprozesse mit neuen technologischen Herausforderungen dar. Dabei muss der Einsatz von Plasmen nicht auf wenige, einzelne Aufgaben beschränkt sein. Vielmehr kann die Plasmatechnik als eine grundlegende Systemtechnologie betrachtet werden, die in größerem Umfang, d.h. an mehreren Stellen in die Fertigungstechnologie integriert ist und an entscheidenden Stellen grundsätzliche und auch neuartige Problemlösungen liefert.

Ein Ziel des Vorhabens war es, den Nutzen einer derartigen umfassenden Integration von Plasmaprozessen in die Fertigungsprozesse für das Beispiel der Erstellung polymerer, dreidimensionaler Mikrofluidik-Strukturen zu erproben:

- bei der Einstellung der Fluidik in Mikrostrukturen,
- beim klebstofffreien Fügen von Mikrostrukturbauteilen („Plasmabonden“) für eine weitestgehende Miniaturisierung ohne Beeinträchtigung der Biokompatibilität und
- bei der Erzeugung hochwertig biokompatibler Zell-Wachstums-Oberflächen in Mikrostrukturen.

Besonders interessante Beispiele für dreidimensionale Mikrofluidik-Strukturen sind zellbasierte Diagnostikplattformen für standardmäßige biologische Laborversuche. Die konsequente Minaturisierung der klassischen Zellkulturtechniken ermöglicht hier inhaltliche Fortschritte und Kostenersparnisse, z.B. in der Pharmaentwicklung und in

der klinischen Diagnostik. Solche Diagnostikplattformen sind Einmalgebrauchs-Artikel. Sie müssen kostengünstig im Spritzgussverfahren aus optisch transparenten Massenkunststoffen wie Polystyren (PS) oder Polycarbonat (PC) hergestellt werden. Diese Kunststoffe sind zunächst nicht biokompatibel, schlecht zu benetzen und schwer zu fügen. Sie müssen deshalb Oberflächenmodifikationen unterworfen werden. Auch werden mit zunehmender Miniaturisierung die für die Zellkultur notwendigen Vertiefungen für die Aufnahme der Zellen (Wells) und die Kanäle für die Verteilung der Kulturmedien immer enger, d.h. der Quotient Tiefe zu Breite, das so genannte Aspektverhältnis, steigt an. Aus diesen Gründen sollte die Anwendung plasmagestützter Oberflächenmodifikationen besonders vorteilhaft sein, denn bekanntlich sind Plasmen gut für alle möglichen, und biokompatiblen Funktionalisierungen von Kunststoffoberflächen geeignet und sie weisen auch eine vergleichsweise gute Spaltgängigkeit auf. So könnten sogar neuartige Mikrofluidik-Strukturen realisiert werden.

Ein weiteres Ziel des Vorhabens und gleichzeitig gemeinsames Ziel des Verbundvorhabens war es daher, diese Möglichkeit anhand der

- Schaffung einer neuartigen polymeren 3D-Mikrofluidikstruktur für die konsequente Miniaturisierung der Zellkulturtechnik (Zellkulturchip)

zu demonstrieren.

In Forschung und Entwicklung erfahren sogenannte „Lab-on-a-chip“ Systeme gegenwärtig hohe Aufmerksamkeit, da ihnen vor allem für die Bioanalytik eine große Bedeutung prognostiziert wird. Die in diesen Systemen erfolgende Integration von komplexen Analysefunktionen auf minimalem Raum eröffnet vollkommen neue Wege und Möglichkeiten der Diagnostik mit sehr kleinen Probenmengen (Nano- und Mikroliterbereich), sehr schnell vorliegenden Ergebnissen und hoher statistischer Sicherheit.

Die Integration von Zellkulturfunktionen in solche miniaturisierten Diagnostiksysteme erfordert bei der Herstellung nicht nur präzise Spritzgusstechniken und hochwertige, biokompatible Oberflächenmodifikationen, sondern auch spezielle Aufbau- und Verbindungstechniken. Dabei müssen unter anderem Bauteile aus unterschiedlichen,

wenig kompatiblen Materialien kombiniert werden. Ein Beispiel dafür sind filigrane Aufbau- und Verschlussfolien auf den mikrostrukturierten Grundkörpern, wie sie in diesem Projekt verwendet wurden. Wegen der Thermolabilität und mechanischen Empfindlichkeit dieser Materialien und dem im Interesse der Zellkulturfunktion zu fordernden minimalen Einsatz von Fremdstoffen, z.B. reaktiven Klebstoffen, sind gerade für diese Zwecke plasmagestützte Verfahren vorteilhaft.

1.1 Technische Voraussetzungen, Planung und Ablauf des Vorhabens

1.1.1 Technische Voraussetzungen

Die Ausrüstung und Laborausstattung für das Projekt wurde in vollem Umfang vom INP zur Verfügung gestellt. Das betraf im wesentlichen eine Feinvakuum-Plasmaanlage V55 GS der Firma PlasmaFinish, Schwedt, in der die Plasmaprozesse ausgeführt wurden, einen Rollen-Laminator zum Folienbonden, eine Zug- und Druck-Prüfmaschine der Firma Zwick/Roell, Ulm sowie eine Vorrichtung zum Stanzen (Fa. Gechter GmbH & Co. Erlangen) der verwendeten Folien und eine im INP gefertigte Montagepresse für die Chipmontage.

1.1.2 Planung und Ablauf des Vorhabens

Das vorliegende Projekt wurde in der Zeit vom 01.07.2003 bis 31.12.2006 durchgeführt.

Das erste Vorhabensjahr war der Suche nach geeigneten Prozessplasmen und Prozessen, der Erprobung verschiedener Varianten zur Oberflächenmodifikation der Mikrostruktur aus Polycarbonat und der Folien vorbehalten. Bei Aufstellung des Arbeitsplanes wurde davon ausgegangen, dass bereits nach etwa einem halben Jahr nach Beginn des Vorhabens ein Grundkörper für einen anwendungsnahen Zellkulturchip zur Verfügung stehen kann. So wurde sofort nach Projektstart ein erster Prototyp des Grundkörpers für den Zellkulturchip im Verbund diskutiert und entworfen. Die Herstellung des entsprechenden Werkzeugs für die Abformung und der Spritzguss erster fertiger Teile beim Projektpartner BImP nahm dann tatsächlich etwa ein halbes Jahr in Anspruch. In dieser Zeit wurden selbst gefertigte Testplatten für die praktische Erprobung der Plasmatechniken eingesetzt. So konnten erste geeignete Oberflächenfunktionalisierungen für das Bonden der Folien untereinander und auf dem Grundkörper bereits im ersten

Vorhabenshalbjahr erzielt werden. Darauf aufbauend erfolgte im zweiten Vorhabenshalbjahr eine Festlegung auf die im weiteren Vorhabensverlauf anzuwendende und zu qualifizierende Plasmatechniken.

Im zweiten Jahr lag der Schwerpunkt auf den Oberflächenmodifikationen der eingesetzten Folie und deren Adaptation an den Grundkörper des Zellchips.

Untersuchungen zur Verbesserung und Sicherung der Qualität der Plasmamodifikationen und der Bondung der einzelnen Chip-Komponenten erstreckten sich über den gesamten Vorhabenszeitraum. Sinnvoll war es daher, plangemäß sofort mit Vorhabensbeginn mit den analytischen Untersuchungen und Screenings zu beginnen. Das betraf vor allem Kontaktwinkelmessungen auf den modifizierten Oberflächen von Grundkörpern und Folien sowie Abzugskraftmessungen der verbundenen Teile der Zellchips. Nach der Hälfte der Projektlaufzeit wurden die bis dahin im Projekt erhaltenen Ergebnisse zusammengestellt. Es konnte festgestellt werden, dass es dem Verbund tatsächlich gelungen war, wie geplant, plasmachemische Oberflächenmodifikationen so in den Fertigungsablauf zu integrieren, dass sowohl die Einstellung der Biokompatibilität, als auch der Mikrofluidik in den Strukturen als auch das Plasmabonden möglich sind.

Zum Meilenstein wurden die mit verschiedenen Plasmatechniken erhaltenen Zellchips verglichen und eine erfolgversprechende Lösung für die weitere Bearbeitung ausgewählt. Das geplante Redesign konnte wegen der guten Funktion der Chips auf kleinere Modifikationen am Grundkörper und in den Abmessungen und der Materialauswahl der Folien beschränkt werden. Anstelle dessen nahmen im dritten Jahr Arbeiten zur Stabilisierung der Technologien, zur Fertigungssicherheit bei größeren Stückzahlen, insbesondere der Montageabläufe und des Fügen, mehr Aufwand in Anspruch. Außerdem wurden statistische Untersuchungen mit größeren Stückzahlen der Zellchips zur Befüllung mit biologischen Medien und Zellen, zu Haltbarkeit und Lagerung durchgeführt.

In den letzten Monaten bestand die Notwendigkeit, die Zellkulturchips hinsichtlich ihrer biologischen Eigenschaften wie Zellanheftung und Zellproliferation zu verbessern und sie in ausreichender, größerer als geplanter Anzahl für die zellbiologische Testung beim Projektpartner IVSS zur Verfügung zu stellen. Durch eine Verlängerung des Projektes bis zum 31. Dezember 2006 konnte dies erreicht werden.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand

Die Entwicklung mikrofluidischer Lab-on-a-Chip-Systeme ist für die Bioanalytik von großer Bedeutung, denn sie können Analysenfunktionen wie Probenaufgabe, Trennung, chemische Reaktion und Detektion auf einem Chip integrieren. Bereits zu Beginn des Vorhabens waren auch Ansätze zur Herstellung entsprechender Systeme mit Zell- oder Gewebekulturen bekannt. Lab-on-a-Chips werden sowohl aus Polymeren, insbesondere aus Polystyrol, aber auch aus Glas hergestellt [1-3]. Das Material Glas stellt jedoch höhere Anforderungen an die Herstellung der Chips, ist für einen hohen Proben-durchsatz wenig geeignet und kostenintensiv. Deshalb werden besonders für Zellkulturen Kunststoffe bevorzugt.

Die Miniaturisierung molekularbiologischer und biochemischer Methoden und der entsprechenden Gerätetechnik bietet zahlreiche Vorteile. Neben einer Reduktion der Herstellungskosten ermöglicht sie einen höheren Grad der Automatisierung und eine größere Flexibilität der Einsatzmöglichkeiten [4-6]. Man kann sogar davon ausgehen, dass es sich hier um eine strategische Vorgehensweise in der biomedizinischen Diagnostik handelt, mit der eine schnellere, einfachere und gleichzeitig sogar umfassendere Analytik ermöglicht werden soll, die zudem kostendämpfend für die klinische Diagnostik und die Arzneistoffforschung und -testung wirkt.

Der tatsächliche Einsatz miniaturisierter Systeme im medizinischen und biochemischen Labor ist allerdings noch nicht weit fortgeschritten. Die in Publikationen vorgeschlagenen Systemlösungen sind oft noch unfertig. Gut hantierbare Zellchips waren z.B. zu Vorhabensbeginn aus der Literatur noch nicht bekannt. Dieser Sachstand ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass für eine Reihe von Anforderungen an Funktion und Fertigungstechniken noch keine zufrieden stellenden Lösungen existieren. Wenn z.B. beim Flüssigkeitstransport in den Kapillaren Blasen auftreten, kann dies die Mikrofluidik erheblich stören. Auch zuverlässige, biokompatible Füge- und Verdeckelungstechnologien sind nicht ganz einfach zu erzielen, weil die Materialauswahl durch Biokompatibilitäts- und Funktionsanforderungen auf einige wenige, zumeist inerte Polymere beschränkt ist. Desgleichen ist zwar bekannt, dass bei polymeren Bauteilen und Membranen bestimmte, geforderte chemische und/oder physikalische Eigenschaften, wie z.B. gute Benetzbarkeit, geringe Rauigkeit oder reaktive funktionelle Gruppen durch Oberflächenmodifizierungen herbeiführbar sind.

Häufig treten aber Probleme mit der Alterungsbeständigkeit oberflächenmodifizierter Kunststoffe auf. Diese Probleme haben in miniaturisierten Zellkultursystemen sehr viel mehr Gewicht als bei üblichen makroskopischen Zellkulturplattformen, weil sie die Fließeigenschaften der Medien erheblich ändern können. Mit der Verkleinerung der Chips nimmt auch die Wechselwirkung der biologischen, immunologischen oder biochemischen Medien mit den Substratoberflächen an Bedeutung zu, weil sich das Verhältnis der Kontaktfläche zum Probenvolumen vergrößert [7]. Das muss ebenfalls bei der Auswahl der Technologien zur Chipfertigung berücksichtigt werden. Die Verkleinerung der Abmessungen führt auch dazu, dass Kavitäten und Kanäle nur noch mit wässrigen Medien befüllbar sind, wenn sie hydrophile Oberflächen aufweisen. Das hat Konsequenzen für mögliche Oberflächenmodifikationen. Nur Gasphasenverfahren können innere Oberflächen noch gut erreichen, denn in der Regel sind Kunststoffe von Natur aus hydrophob.

Der gesamte Komplex von Anforderungen lässt Plasmaprozesse für die notwendigen Oberflächenmodifikationen besonders geeignet erscheinen. Bekanntlich sind Nieder-temperaturplasmen für die Modifikation von Kunststoffoberflächen prädestiniert, weil sie nur auf die obersten Moleküllagen wirken, Volumeneigenschaften des Grundpolymers wie z.B. mechanische Festigkeit oder Transparenz nicht beeinflussen und nur sehr geringe thermische Substratbelastungen hervorrufen [8, 9]. Das ist gerade für Mikrobauteile äußerst wichtig. Plasmen weisen damit erhebliche technologische Vorteile gegenüber nasschemischen Verfahren auf, bei denen Lösungsmittel und höhere Temperaturen (organische Reaktionen laufen häufig erst bei 100°C ab) sehr leicht das Grundmaterial verändern können. Deshalb werden sie in bedeutendem Umfang zur Oberflächenmodifikation von polymeren Biomaterialien erforscht und eingesetzt [10-12]. Dabei handelt es sich beispielsweise ganz allgemein um die Hydrophilierung von Materialien, um die Erzeugung von einfachen und höherwertigen Zellkulturunterlagen [13, 14], die lokale Steuerung der Zellanlagerung in Mikrodimensionen in-vitro [15] oder die Biokompatibilität von Implantaten [16].

Auch in der Mikrostrukturtechnik finden Plasmen vielfältige Anwendungen. Von besonderer Bedeutung für Mikrofluidiksysteme ist die Innenmodifizierung von Mikro-Hohlräumen und Kanälen mit hohem Aspektverhältnis (Spalttiefe/Spaltbreite). Das stellt aber auch für die Plasmatechnik immer noch eine Herausforderung dar [17]. Eine ähnliche Herausforderung besteht hinsichtlich der Stabilität plasmabehandelter

Polymeroberflächen. Es gibt sowohl Beispiele für lagerstabile plasmamodifizierte Polymeroberflächen [18, 19] als auch für drastische Oberflächenveränderungen bei Lagerung [20]. Für diesen Effekt wird vor allem die Oxidation von an und in der Nähe der Oberfläche vorhandenen überschüssigen, metastabilen Kohlenwasserstoff-Radikalen verantwortlich gemacht [21].

1.3 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Durchführung des Verbundprojektes erfolgte arbeitsteilig mit den Industriepartnern:

- Boehringer Ingelheim microParts GmbH Dortmund (vormals STEAG microparts GmbH)
- In-Vitro Systems & Services GmbH Göttingen.

Das Institut für Niedertemperatur-Plasmaphysik (INP) hatte im Verbundvorhaben die Aufgabe, mit Hilfe von Plasmaprozessen die vom Projektpartner Boehringer Ingelheim microParts GmbH in Dortmund erstellten Grundkörper der mikrostrukturierten Diagnostikplattformen mit Oberflächenmodifikationen zu versehen und unter Hinzunahme weiterer Komponenten zu komplettieren bzw. zu montieren. Dazu gehörte auch die Analyse der Ergebnisse, unter anderem mit oberflächenanalytischen Methoden und ersten Zellkulturtests. Ausführliche zellkulturtechnische Erprobungen wurden dann beim Projektpartner In Vitro Systems und Services GmbH in Göttingen vorgenommen. Dieser durch wechselseitige Zuarbeiten gekennzeichnete Projektablauf erforderte eine intensive Kooperation der Partner. Darüber hinaus war eine Zusammenarbeit mit anderen Stellen für den Projektfortschritt bzw. das Erreichen der Projektziele nicht erforderlich.

2 Ergebnisse

2.1 Mikrofluidikstruktur für die Zellkultur – Zellkulturchip

2.1.1 Prinzipieller Aufbau

Als Anwendung für die hier als Demonstrations- und Testobjekt realisierte Mikrofluidikstruktur war bei der Planung des Vorhabens die Miniaturisierung der klassischen Zellrasen-Kultur ausgewählt worden. Es sollte ein den Mikrotiterplatten ähnelnder Chip hergestellt werden, der eine größere Anzahl von Zellkulturgefäßen (Durchmesser ca. 2,5 mm) besitzt und den durch die Miniaturisierung entstehenden neuen technischen Anforderungen hinsichtlich Zellaussaat, Medienwechsel und Beobachtung unter dem Mikroskop Rechnung trägt. Die gewählte, unter Anwendung von Plasmaverfahren möglich werdende Lösung wird in Abb. 1 anhand des prinzipiellen Aufbaus eines einzelnen Zellkulturgefäßes demonstriert.

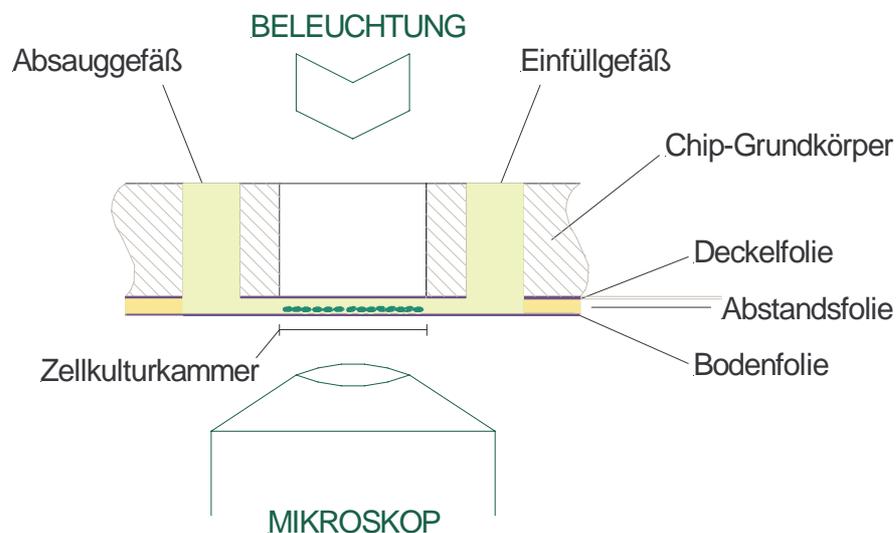


Abb. 1: Prinzipieller Testaufbau des Zellkulturchips

Dieser Aufbau gewährleistet, dass

- eine Reduzierung der Kulturmedien- bzw. Analytmengen um bis zu zwei Größenordnungen im Vergleich zu herkömmlichen Kulturen möglich ist (Kostensparnis),

- die Zellmenge pro Gefäß eine nicht nur prinzipiell, sondern auch praktisch abzählbare Zahl erreicht,
- die Dimension der Überschichtung mit Medium in den Bereich um 100 μm und darunter gelangen kann und damit annähernde Vergleichbarkeit mit der Situation in- vivo herstellbar ist,
- eine schnelle Verdunstung der sehr geringen Medientvolumina verhindert wird,
- die sichere, definierte Befüllbarkeit der einzelnen Gefäße gewährleistet ist,
- Medien mehrfach ausgetauscht werden können,
- gute Adhärenz und überhaupt Funktionalität der Zellen auf den Gefäßböden gewährleistet ist,
- ausreichend Sauerstoff zu den Kulturen hinzutreten kann und
- Fluoreszenzanalysen und Mikroskopie uneingeschränkt möglich sind.

2.1.2 Detaillösungen

2.1.2.1 Grundkörper

In dem mikrostrukturierten Grundkörper (Abb. 2) sind 24 Durchbrüche (Durchmesser 2,5 mm) für die Beobachtung der Zellkultur sowie Einfüll- und Absauggefäße als rechteckiges 4 x 6 Array auf einer Fläche von 20 x 37,5 mm² angeordnet. Mit einer Stärke von 2 mm ist der Grundkörper mechanisch stabil als Voraussetzung für das Roboterhandling, darüber hinaus aber auch manuell einsetzbar. Er stabilisiert auch den auf ihn gebondeten, für sich selbst nicht stabilen Folienstapel (s. unten).

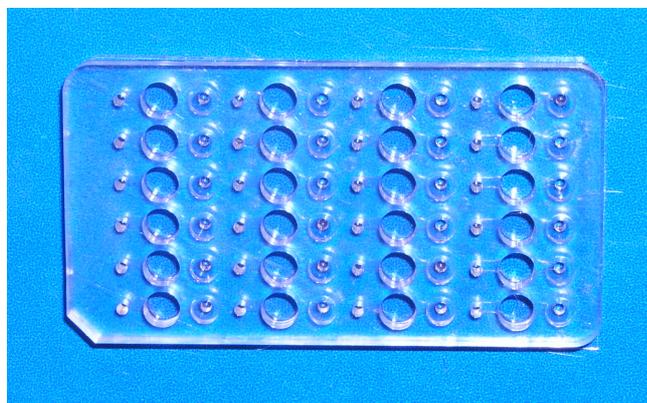


Abb. 2: Zellchip-Grundkörper aus Polycarbonat

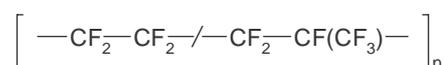
Anfangs war vorgesehen, den Chip-Grundkörper aus Polystyrol (PS) herzustellen. Im Verbund wurde dann aber entschieden, diesen aus Polycarbonat (PC) zu fertigen, weil das gegenüber PS fertigungstechnische Vorteile aufweist.

Entwurf und Fertigung des Grundkörpers und alle damit zusammenhängenden Problemstellungen waren Inhalt des BImP-Teilvorhabens.

2.1.2.2 Folienstapel

Die eigentlichen Zellkulturgefäße des Chips werden durch drei miteinander verbundene, unterschiedliche, gestapelte Folien, welche zweckentsprechend durchbrochen sind, aufgebaut. Genau diese Lösung ermöglicht extreme Miniaturisierung unter Beibehaltung guter Hantierungs- und Analysemöglichkeiten, sofern die Folien an den Grundkörper gebondet sind. Wichtig sind hier vor allem zwei Aspekte: Erstens verhindert der Einschluss zwischen den zwei planparallelen Folien die zu schnelle Verdunstung der extrem kleinen Kulturmedium-Volumina (in der Größenordnung weniger Mikroliter in jeder Kultureinheit, bis unterhalb eines Mikroliters innerhalb des Zellkulturbereiches). Zweitens wird so die Mikroskopierfähigkeit gesichert. Diese wäre bei offenen Mikrogefäßen wegen der hier vorliegenden kleinen Abmessungen und geringen Flüssigkeitsmengen durch Meniskenbildung und andere Kapillareffekte extrem gestört. Ein kritischer Punkt dieser Lösung ist die Materialauswahl. Die Deckel- und Bodenfolien müssen gasdurchlässig (Sauerstoff) sein. Außerdem sollen sie sehr gute optische Eigenschaften haben und möglichst wenig Eigenfluoreszenz aufweisen. Letzteres ist auch für Abstandsfolie und Grundkörper zu fordern. Weiterhin müssen die Folien über ein Mindestmaß an mechanischer Stabilität verfügen sowie maßhaltig sein. Für die Deckel- und Bodenfolie wurde deshalb FEP und für die Abstandsfolie Polycarbonat gewählt. Beide Materialien sind chemisch inert und bedürfen sowohl für die Chipmontage als auch für die Zellkultur (Biokompatibilität) einer material-spezifischen Funktionalisierung.

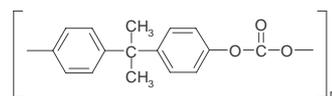
Von der FEP-Folie wurden verschiedene Qualitäten eingesetzt bzw. erprobt. Vorzugsweise handelte es sich um Folien mit einer Dicke von 25 µm. FEP ist ein fluoriertes Ethylen-Propylen-Kunststoff.



Poly(tetrafluorethylen-co-hexafluorpropylen)

FEP ist chemisch widerstandsfähig und temperaturstabil bis etwa 200 °C. Die verwendete Folie war einseitig vorbehandelt, hat also unterschiedlich hydrophobe Seiten. Die Kontaktwinkel lagen auf der Seite A bei 85° und auf der Seite B bei 106°.

Für die Abstandsfolie wurde eine auf Makrolon von Bayer MaterialScience basierende Polycarbonat-Extrusionsfolie, eingesetzt. Sie zeichnet sich durch hohe Transparenz und optische Qualität aus. Die Folie war beidseitig hochglänzend, also relativ glatt. Sie wird standardmäßig beidseitig schutzkaschiert als Rollen- und Plattenware angeboten. Die Folie ist in verschiedenen Standarddicken zwischen 175 - 1000 µm verfügbar. Die Ober- und Unterseite unterschieden sich hinsichtlich der Rauigkeit voneinander. Dieser Umstand musste bei der Plasmabehandlung und der Montage der Folien Berücksichtigung finden.



Polycarbonat

Für die ersten Untersuchungen wurde Makrolon-Folie mit einer Dicke von 125 µm eingesetzt, später dann mit einer Dicke von 250 µm. Es wurden aber auch noch dünnere Folien verwendet.

Ein spezieller Aspekt dieser Chips ist, dass er aus relativ einfachen Strukturen – Grundkörper plus Folien – besteht. Das ist für eine kostengünstige Fertigung größerer Stückzahlen vorteilhaft. Allerdings ist es für eine zuverlässige Funktion der Befüllung erforderlich, dass die Löcher und Durchbrüche in den Folien hinreichend präzise erzeugt werden. Das ist nicht ganz einfach. Letztendlich wurden die Löcher in die Deckelfolie gefräst und die Durchbrüche für die Zellgefäße in die Abstandsfolie gestanzt. Vortests hatten gezeigt, dass Stanzwerkzeuge zwar aufwändig zu fertigen sind, aber insgesamt das Stanzen gegenüber dem Lasern vorteilhaft ist. Die beim Stanzen erhaltenen Durchbrüche wiesen vergleichsweise glatte Kanten auf und mussten nicht nachbehandelt werden, wogegen beim Lasern durch Abbrand an den Rändern eine Nachbehandlung unumgänglich war. Die etwas geringere Präzision der gestanzten Löcher war tolerierbar. Abb. 5 gibt ein Beispiel für die erreichte Qualität der Stanzungen.

Um hohe Stückzahlen herstellen zu können, musste sowohl der Fräs- als auch der Stanzprozess teilautomatisiert werden. Mit einer CNC-Bohrmaschine wurden mehrere Lagen von Deckelfolien gefräst (Abb. 3) und mit einer pneumatischen Stanze (Abb. 4) konnten nach einer PC-gestützten Positionierung Abstandsfolien gleichzeitig für drei Chips gestanzt werden. Die Automatisierung führte erwartungsgemäß auch zu Verbesserungen der Qualität der Durchbrüche.

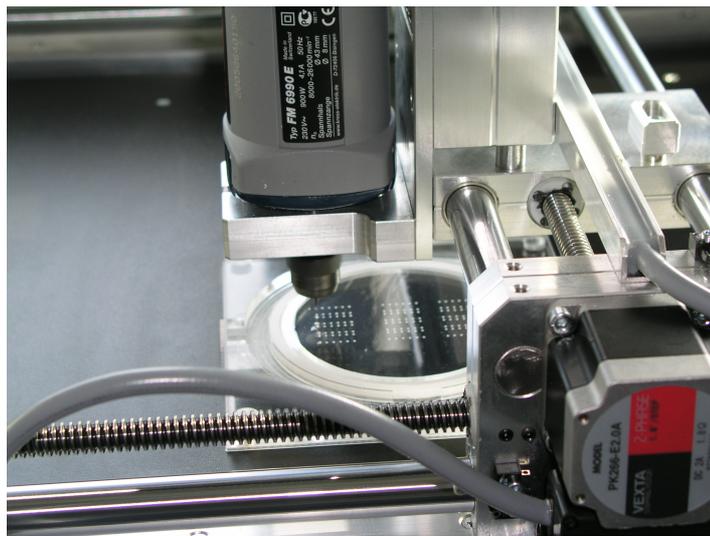


Abb. 3: Fräsvorrichtung für das Durchbrechen der Deckelfolie

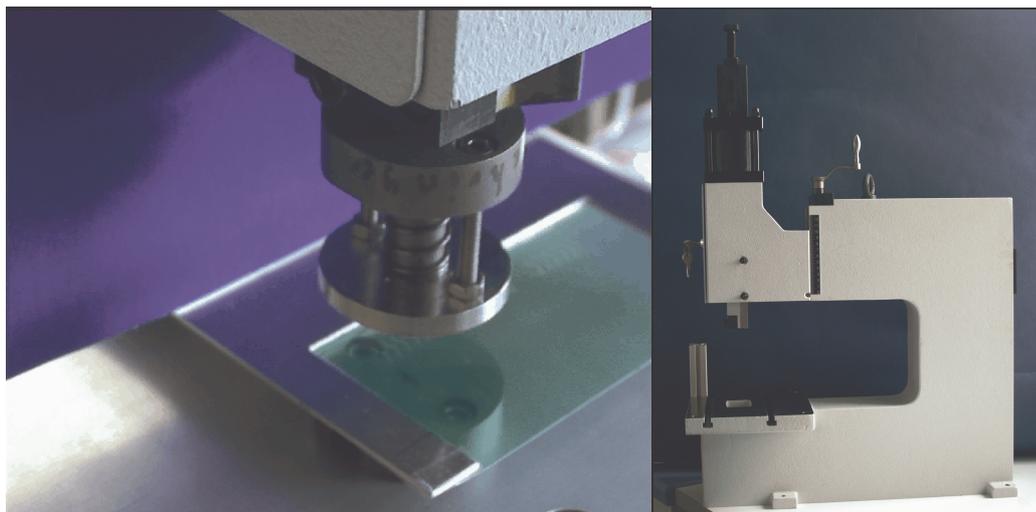


Abb. 4: Pneumatische Stanze und Stanzwerkzeug mit Spannvorrichtung und Niederhalter für die Strukturierung der Zwischenfolie

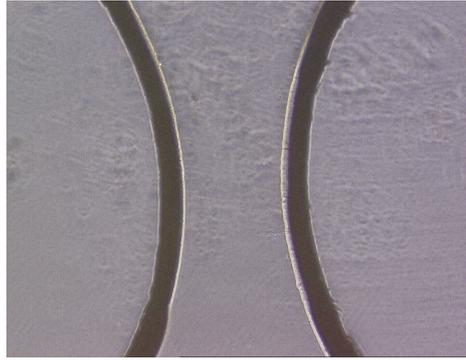


Abb. 5: Mittels Stanzen erzielte Randpräzision der Durchbrüche in der Zwischenfolie.
Der Abstand der beiden Kanten beträgt im zentralen Bereich 500 μm .

2.1.3 Montageverfahren

Der Erfolg der Gesamtmontage des Chips wird stark von der Reihenfolge der Prozessschritte beeinflusst. Diese Feststellung war Anlass ausgedehnter Untersuchungen, denn es handelt sich hier um Abläufe aus mehreren Plasma-Oberflächenmodifikationsschritten, Fügeschritten und auch zusätzlichen Nachbehandlungsschritten, welche auch in unterschiedlicher Weise durchgeführt werden können. Von der Reihenfolge werden vor allem die Haftfestigkeiten der drei Interfaces beeinflusst. Über die Ursachen dieser Unterschiede besteht allerdings noch keine vollständige Klarheit. Dazu muss aber angemerkt werden, dass es sich ja stets noch um eine Labormusterfertigung gehandelt hat, bei der nicht alle Unwägbarkeiten ausgeschlossen werden können. So wurde zum Beispiel festgestellt, dass sich während des Hantierens auf den Folien niederschlagende Staubpartikel aus der Luft nur sehr schwer wieder entfernen lassen. Für die Entfernung der Partikel wurden deshalb ein Ionensprühstab und eine Ionensprühpistole zusammen mit einer Abblasvorrichtung verwendet. Trotzdem konnte das Problem nicht vollständig behoben werden.

Sicher ist, dass die Qualität der Plasma-Funktionalisierung für den Erfolg des Plasmasbondens entscheidend ist. Außerdem hat die Art und Weise der Nachbehandlung gebondeter Teile Einfluss. So erscheint eine zusätzliche thermische Behandlung für das Erzielen höherer Festigkeiten sinnvoll.

Im Laufe des Vorhabens stellte sich außerdem heraus, dass der zunächst für die Montage eingesetzte Rollen-Laminator für diesen Zweck, zumindest unter Laborbedingungen und in Entwicklungsphasen, nicht gut brauchbar ist. Er verursachte eine so

große Streuung der Ergebnisse, vor allem Ungleichmäßigkeiten verteilt über die Chipflächen, dass systematische Einflüsse von Prozessparameter-Änderungen kaum erkennbar bzw. bewertbar waren. Erst durch den Einsatz einer selbst gefertigten, speziellen Montagepresse (Abb. 6) konnten diese Probleme behoben werden. Die Montagepresse verfügt über eine Chipaufnahme auf dem unteren, beweglichen Stempel der Presse, in der die Chips elastisch gelagert werden. Beim Bonden werden die Stapel aus Chip und Folie/n gegen den oberen, geheizten Stempel gedrückt, der poliert ist.

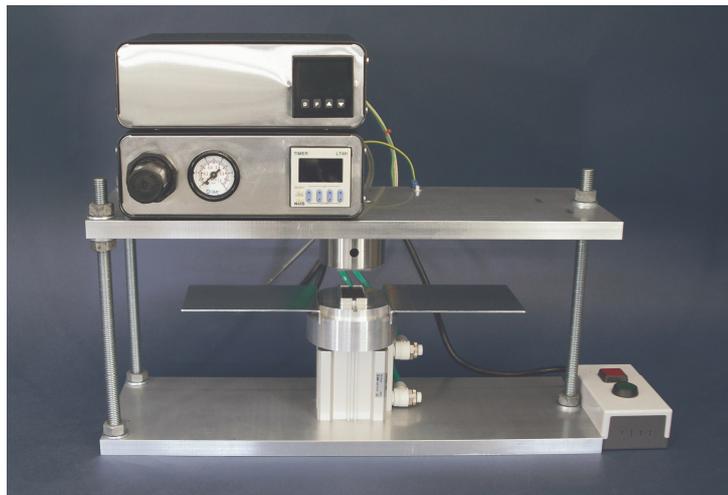


Abb. 6: Montagepresse für die Chipmontage, mit Zeitsteuerung und Heizvorrichtung

Ein wesentliches Problem der Montage war das Erzielen einer gleichmäßigen Zellkammerhöhe. Die typische nominelle Dicke (und damit die Höhe der Zellkulturkammer) der Abstandsfolie war 125 μm . Damit ist die 2,5 mm im Durchmesser messende Kammer sehr flach. Durch das Anpressen kommt es zu Änderungen der Kammerhöhe. Gleichfalls können durch ungleichmäßigen Andruck und ungewollten Druckaufbau in den Kulturkammern Folienverwerfungen auftreten. Auch aus diesen Gründen ist der Einsatz eines Rollenlaminators nicht zu empfehlen. Mit der Montagepresse erwiesen sich diese Probleme als beherrschbar.

Angemerkt sei noch, dass die gesamte Chipmontage von Hand in einer mit staubfreier Luft beströmten Umgebung erfolgte. Um die Montage der sehr dünnen FEP-Folien überhaupt zu ermöglichen, wurden diese in Spannrahmen eingespannt (Abb. 7). Die gestaffelten Durchmesser der Rahmen (max. 20 cm) waren so gewählt, dass typischerweise 3 Chips (max. 6) pro Rahmen gefertigt werden konnten. Während der gesamten

Montage verblieben die Folien in den Spannrahmen. Erst am Ende der Fertigung wurden die Chips aus den Spannrahmen geschnitten, danach die Kanten besäubert.

Für die Justage der Löcher und Durchbrüche in Folien und Grundkörper zueinander musste ein Stereomikroskop zu Hilfe genommen werden. Die erzielte Präzision reichte aus, um eine gute Fluidik, ohne Störungen durch Folienkanten und ähnliches zu erzielen.

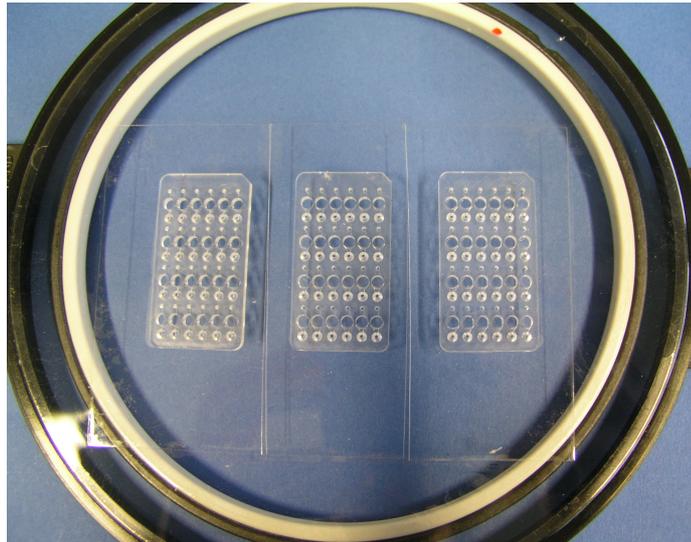


Abb. 7: Während der Plasmabehandlungen und der Chipmontage verwendete Folienspannrahmen

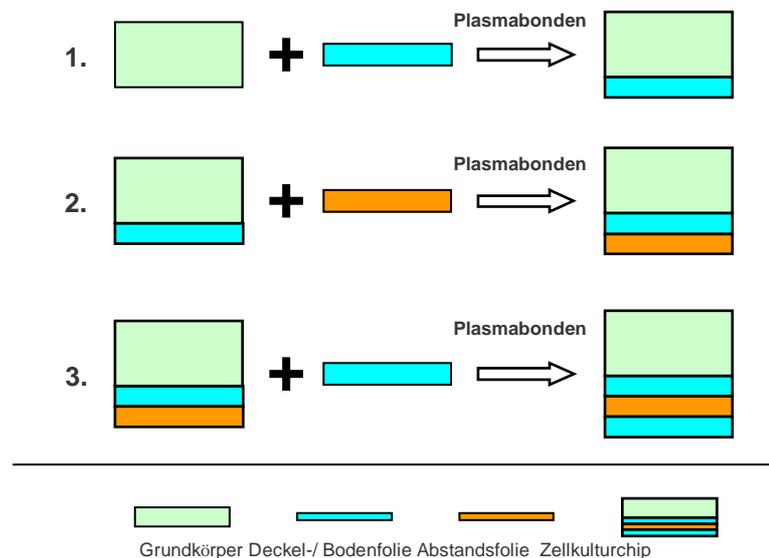


Abb. 8: Montageverfahren zur Herstellung des Zellkulturchips

Das in Abb. 8 schematisch dargestellte Montageverfahren wurde für die Herstellung größerer Stückzahlen eingesetzt. Grundkörper, Deckel-, Abstands- und Bodenfolie

wurden einzeln nacheinander gebondet. Die im Schäl-Abzugs-Test gemessenen Abzugskräfte zwischen den Folien lagen dabei zwischen 250 und 400 N/m.

Der Vorteil dieses Montageverfahrens liegt vor allem darin, dass alle Verbindungen plasmagebondet sind. Das bedeutet eine technologische Vereinfachung. Die gezeigte Reihenfolge der Montage sichert für alle Interfaces relativ hohe Abzugskräfte im Schältest sowie Hydrolysestabilität gegenüber Wasser und 96 %igem Ethanol für mindestens 72 h.

2.2 Plasmaprozesse

2.2.1 Prozessauswahl und Ausrüstungen

Plasmaprozesse waren erforderlich, um die Einstellung der Fluidik in den Hohlräumen der Mikrostruktur vorzunehmen, das Fügen der Einzelteile ohne Zuhilfenahme von Klebstoffen zu ermöglichen und um eine hochwertige Biologisierung der Zell-Wachstumsoberflächen den Mikrokavitäten zu sichern. Hierzu wurde eine umfangreiche Methodenoptimierung betrieben.

Ein wesentliches Ergebnis des Vorhabens ist die Feststellung, dass für die Lösung dieser Aufgabenstellungen nicht unbedingt separate Prozessschritte erforderlich sind. Der vorliegende Aufbau der Mikrostruktur und die Art und Weise der Montage – eben durch Plasmabonden – bringen es mit sich, dass alle Lösungen miteinander kombiniert werden können. Deshalb wird nachfolgend auch nur das Plasmabonden als Teilprozess beschrieben.

Sämtliche Plasmaprozesse konnten auch in Plasmareaktoren desselben Typs, nämlich in mit Mikrowellen-Plasmaanregung arbeitenden, industriellen Plasmaprozessoren des Typs V 55 GS der Firma PlasmaFinish (Abb. 9) durchgeführt werden. Diese Plasma-reaktoren zeichnen sich durch für die Vorhabenszwecke ausreichend große maximale Substratausdehnungen (fast 40 cm x 40 cm Fläche) und die für thermoempfindliche Substrate erforderlichen guten Möglichkeiten zum gepulsten und downstream Plasmabetrieb aus. So konnten für die Montierbarkeit schädliche thermische Verformungen der filigranen Chips während der Plasmaprozesse vermieden werden. Auch die sehr dünnen, in Kunststoffrahmen eingespannten Folien wiesen während der

Plasmabehandlungen höchsten leicht wellige Verwerfungen auf, die nach der Behandlung sofort wieder zurückgingen.



Abb. 9: Feinvakuum-Plasmaprozessor V55 GS (PlasmaFinish Schwedt/O.)

Als Plasmaprozesse wurden letztendlich ausschließlich plasmachemische Funktionalisierungen verwendet werden. Dabei handelte es sich, mit leichten Variationen, immer um dieselben Prozesse: eine Sauerstofffunktionalisierung und eine stickstoffhaltige Funktionalisierung. Eine zeitweilig mit Hilfe von Maskenprozessen in den Bereichen der Zellkulturkammern auf die Bodenfolie aufbrachte zusätzliche, mikrostrukturierte besonders biokompatible Allylamin-Plasmapolymer-Beschichtung erwies sich als nicht unbedingt erforderlich.

2.2.2 Plasmabonden

Unter Plasmabonden wird hier das Fügen von gleichen oder unterschiedlichen, plasma- vorbehandelten Bauteilen unter Druck und erhöhter Temperatur ohne Zusatz von Kleb-

stoffen verstanden. Klebstofffreies Fügen wird für Verbindungen benötigt, bei denen es auf Präzision ankommt und bei denen die chemische Beschaffenheit der Klebstoffe sich auf die Funktion der Bauteile, z.B. deren Biokompatibilität, auswirken kann. Beides ist hier der Fall.

Im Verlaufe des Vorhabens wurde im Zusammenhang mit der Optimierung der Montageabläufe auch versucht, bestimmte Interfaces durch Kleben herzustellen, nachdem die entsprechenden Oberflächen zunächst durch Plasmaaktivierung grundsätzlich klebfähig gemacht wurden. Dazu wurden ein Zweikomponentenkleber auf Epoxidharzbasis DuoPox 6747 und verschiedene UV-härtende Einkomponentenkleber, wie Photobond 4494 und Katiobond 4552 probiert. Die Kleber wurden mit Hilfe einer Rakeleinrichtung auf den Chip-Grundkörper oder die Folien gebracht und anschließend das Interface mit der dafür vorgesehenen UV-Lampe 10 min bei 1000 W ausgehärtet. Die Klebstoffschicht war $\leq 20 \mu\text{m}$ dick. Auf diese Weise konnten die schwierigen Folienverbände FEP-PC hergestellt werden. Auch die notwendige Stabilität der Verbindung gegenüber Wasser während der Lagerung der Zellkulturchips bzw. gegenüber Zellkulturmedien war gegeben. Jedoch wirkte sich die Klebung nicht positiv auf das Zellverhalten auf der Bodenfolie aus. Sicher könnte die Dicke der Klebung noch verringert werden. Aber trotzdem dürfte es unmöglich sein, sie sehr viel geringer als die Höhe von Zellen (d.h. $\ll 1 \mu\text{m}$) zu gestalten. Es muss also immer mit einer ringförmigen Kontaktzone des Zellrasens mit dem Kleber gerechnet werden. Auch konnte bei noch so genauem Arbeiten nicht verhindert werden, dass Kleber auf die Grundfläche der Zellkammer gelangte und damit die biokompatible Oberfläche veränderte.

Bisher war die Möglichkeit des Plasmabondens nur für das Fügen miteinander verträglicher und miteinander mischbarer, gleicher oder sehr ähnlicher Kohlenwasserstoffe nach einer Sauerstoffplasmabehandlung bekannt [22, 23]. Auch das Fügen von Silikon nach einer oxidierenden Plasmabehandlung ist bekannt. Im Vorhaben konnte nachgewiesen werden, dass Plasmabonden auch für hochgradig inkompatible Polymere wie FEP und PC in Frage kommt, wenn neben einer Sauerstofffunktionalisierung eine Funktionalisierung in einem stickstoffhaltigen Plasma (Ammoniak) verwendet wird und dass dies zu sehr brauchbaren Resultaten (Festigkeiten) führt.

FEP-Folien wurden stets im NH_3 -Plasma funktionalisiert. Typische Prozesszeiten im Ammoniakplasma betragen 5-10 s bei 20 Pa und einer eingekoppelten Leistung von 500 W. Der Stickstoffeintrag wurde mittel XPS untersucht. Er ist abhängig von der Art der

Prozessführung und lag auch im günstigsten Fall nicht über 5 %, bezogen auf Kohlenstoff. Über den Grad der Aminofunktionalisierung können keine sicheren Aussagen getroffen werden. Es wurde versucht, diese durch Derivatisierungsreaktionen der Folienoberfläche zu bestimmen. Leider kann bei fluorhaltigen Oberflächen wie FEP die standardmäßige, zuverlässige Derivatisierungsreaktion mit 4-(Trifluormethyl)-benzaldehyd (TFBA) nicht eingesetzt werden, da nicht zwischen Fluoratomen aus der Oberfläche und Fluoratomen vom TFBA unterschieden werden kann. Die ersatzweise Derivatisierung mit 4-Chlorbenzaldehyd weist deutliche Unsicherheiten in der Bestimmung auf. Es wird angenommen, dass maximal etwa 0,5 % Aminogruppen (NH_2/C) erreicht wurden.

Die Polycarbonat(PC)-Folie und der PC-Grundkörper sind im O_2 -Plasma funktionalisiert worden. Hier sollte eine möglichst hohe C=O Dichte vorhanden sein.

In der Regel wurden die Bauteile möglichst bald nach der Plasmamodifizierung gebondet. Eine Lagerung über wenige Tage erwies sich aber nicht als nachteilig.

Während der ersten Hälfte der Vorhabenslaufzeit wurden die Bauteile mit wechselndem Erfolg mit einem kommerziell verfügbaren Rollenlaminator der Firma Stork gebondet, der eine mit einer elastischen Beschichtung versehene, über ein Förderband rollende Walze zum Laminieren benutzt. Die Walze konnte auf etwa 70 °C geheizt werden. Es wurde ein Anpressdruck von 5 bar und eine Laufgeschwindigkeit des Bandes von 2,2 m/min verwendet. Schließlich stellte sich heraus, dass mit dieser Lösung, trotz mehrfacher Verbesserungen, offensichtlich nicht die für reproduzierbares Plasma-bonden erforderliche Präzision und Gleichmäßigkeit des Anpressens gewährleistet werden kann.

Daraufhin wurde zum Bonden der Folien auf den Chip-Grundkörper eine selbstgebaute pneumatische Presse mit Timer und Temperatursteuergerät verwendet. Mit Hilfe dieses Gerätes konnten Parameterstudien zum Bonden betrieben werden. Als Maß für die Festigkeit der Bondung wurde jeweils die Abzugskraft in N/m mit Hilfe des 90°-Schältests mit einer Zugprüfmaschine (Zwick GmbH Ulm) ermittelt.

Um den Einfluss der Temperatur auf die erzielte Abzugskraft zu untersuchen, wurden FEP-Folien bei 8 bar und 120 s zwischen 30 und 140 °C auf den Grundkörper laminiert. Als optimale Temperatur wurde 100 °C ermittelt. Dabei wurden Abzugskräfte von etwa 270 N/m erzielt. Hieraus ist zu erkennen, dass die beim Rollenlaminator mögliche Temperatur von 70 °C zu niedrig war. Abgesehen davon ist dort auch die gleichmäßige

thermische Ankopplung an das Substrat wegen des Abrollens nicht einfach. Allerdings konnten mit Hilfe der Presse auch bei 70°C immer noch gute Festigkeiten von bis zu 180 N/m erzielt werden.

Beim Einfluss des Druckes auf die Abzugskraft der gebondeten FEP-Folie wurde die Abhängigkeit zwischen 1 und 8 bar bei 120 °C und 120 s getestet. Die gemessenen Werte streuen. Sie steigen von 150 N/m in etwa linear auf 280 N/m an.

Um den Einfluss der Zeit des Anpressens auf die erzielte Abzugskraft zu untersuchen, wurde FEP-Folie zwischen 15 und 240 s lang bei 8 bar und 120 °C auf den Grundkörper laminiert. Die gemessenen Festigkeiten steigen anfänglich von 200 N/m auf 270 N/m an, um dann wieder etwas abzufallen. Unabhängig vom verwendeten Anpressdruck war zu erkennen, dass die Festigkeitswerte mit abnehmender Anpresszeit in etwa gegen Null extrapolierbar sind. Hier dürfte das eigentliche Problem bei der Verwendung des Rollenlaminators gelegen haben.

2.3 Analytische Untersuchungen und Eigenschaften der Zellchips

Die Arbeiten im Vorhaben stützten sich auf umfangreiche analytische Untersuchungen an funktionalisierten Oberflächen und fertigen Zellkulturchips. Wichtige bzw. typische Ergebnisse werden nachfolgend mitgeteilt.

2.3.1 Kontaktwinkel

Von den plasmachemisch behandelten Folien wurden regelmäßig Kontaktwinkel mit einem Digidrop Kontaktwinkelmessgerät (GBX Instrumentation Scientifique, Romans, Frankreich) bestimmt. Die unbehandelten FEP-Folien ergaben Kontaktwinkel von 85° (A-Seite) und 106° (B-Seite) und die Polycarbonat-Folien 106°. Für eine typische NH₃-Plasmabehandlung auf FEP lagen die Winkel zwischen 40 und 60° und für eine O₂-Plasmabehandlung auf PC bei etwa 20°, wenn die Behandlung erfolgreich war. Die Werte für FEP mussten unabhängig vom Ausgangszustand der Oberflächen erreicht werden.

2.3.2 Rauigkeit der Folien

Die Plasmabehandlungen der Folien verändern deren Rauigkeit. Dies trat besonders bei der Abstandsfolie aus Polycarbonat auf. Eine gewisse Rauigkeit ist für das anschließende Plasmabonden sicherlich von Vorteil. Wie hoch diese sein darf, wurde durch systematische Versuche ermittelt.

Dazu wurden neben O₂/Ar- auch solche aus stärker ätzenden CF₄/O₂-Plasmabehandlungen mit unterschiedlichen Prozesszeiten miteinander verglichen. Die erzielten Rauigkeiten wurden mit einem Profilometer Dektak³ST (Santa Barbara, USA) bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 10 dargestellt.

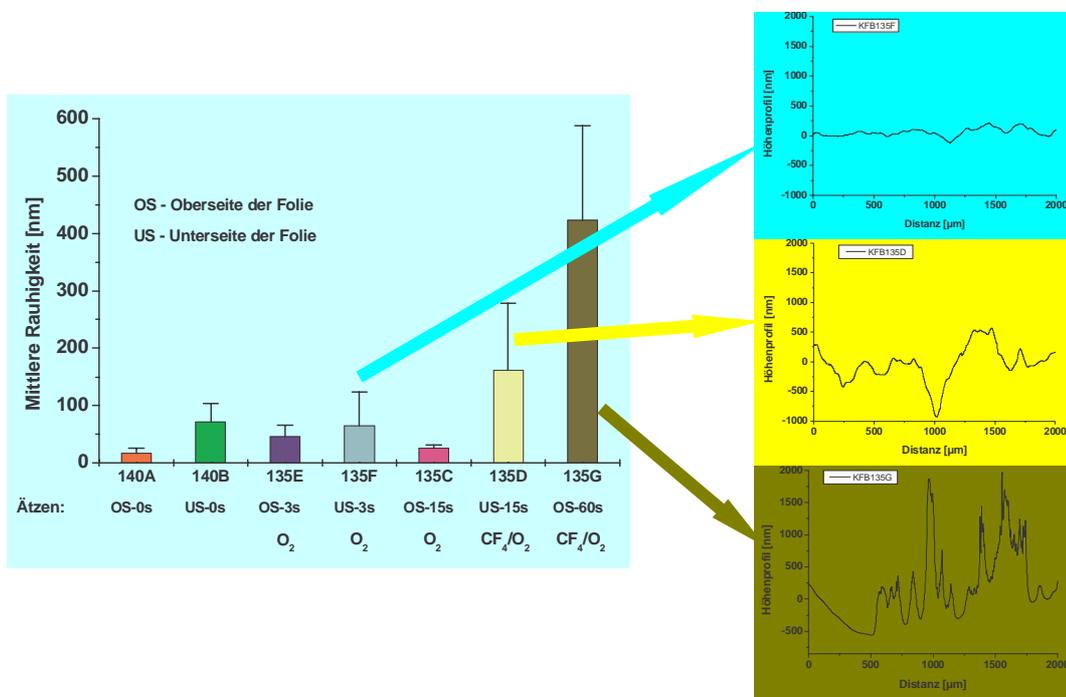


Abb. 10: Oberflächenbeschaffenheit (Rauigkeit) der Polycarbonat-Folie nach unterschiedlichem Plasmaätzen

Durch das CF₄/O₂-Plasma wurde die Oberfläche der PC-Folie so stark verändert (bis 400 nm Rauigkeit), dass diese für das Bonden unbrauchbar wurde.

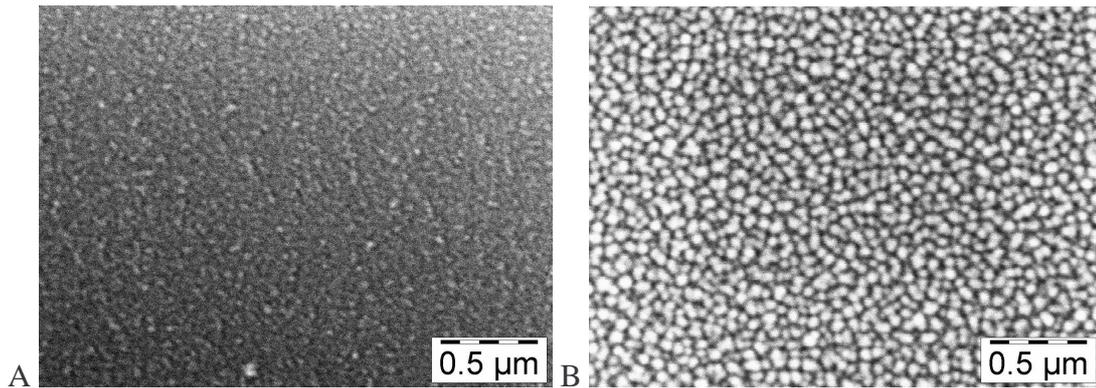


Abb. 11: REM-Untersuchungen zur Oberflächenbeschaffenheit der Oberseite von Polycarbonat-Folie, 125 µm, (A) unbehandelt und (B) nach 60 s eff. CF₄/O₂-Plasmaätzen. (Vergrößerung x50000)

Die REM-Untersuchung zeigt die Veränderung der plasmabehandelten Folie in Abb. 11B gegenüber der unbehandelten. Als günstig erwiesen sich Rauigkeiten von etwa 80 nm, die nach Behandlung im O₂/Ar-Plasma mit Behandlungszeiten von etwa 15 s auftraten.

2.3.3 Abzugskräfte

Abb. 12 zeigt einen fast fertigen Chip nach dem Ausschneiden aus dem Montage-rahmen. In diesem Zustand wurden Chips bezüglich der erzielten Abzugskräfte getestet. Die Folienüberstände dienten als Angriffspunkte für 90°-Schältests mit Hilfe einer Zugprüfmaschine (Zwick GmbH Ulm). Für diesen Zweck war die Maschine mit einem passenden Kraftaufnehmer für die in Polymerverbänden auftretenden geringen Kräfte ausgerüstet. Weiterhin war es notwendig, die Vorrichtung mit einer speziellen Abzugszange für das Ergreifen der Folien auszurüsten (Abb. 13).

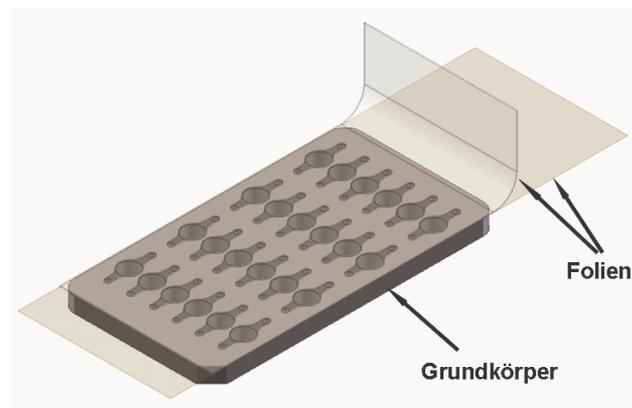


Abb. 12: Montage der Folien auf den Grundkörper des Zellkulturchips

Das präzise Ergreifen der möglichst unverformt überstehenden Folie, parallel zur Abzugskante, war Grundvoraussetzung für verwertbare Messergebnisse.

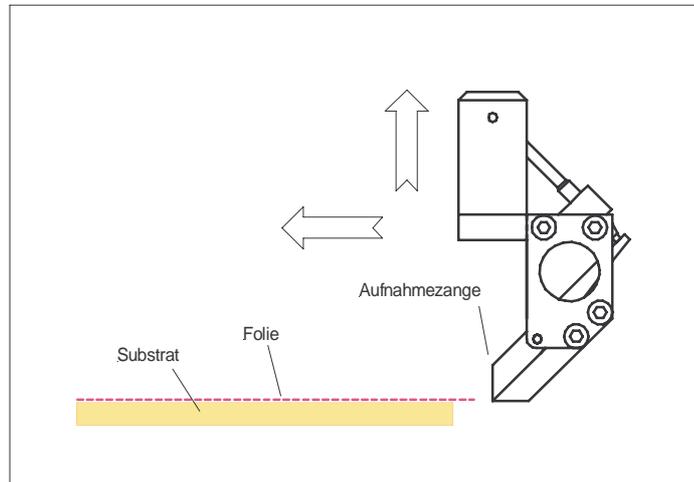


Abb. 13: Schema der Folien-Abzugstests

Die erhaltenen Abhängigkeiten der Abzugskräfte (in N/m quer zur Probe) von der Position längs des Chips geben über die Festigkeit der einzelnen Interfaces und über die laterale Gleichmäßigkeit der Bondung Auskunft.

Abb. 14 zeigt typische Abzugskraft-Messkurven brauchbarer Interfaces zwischen FEP-Folien und Grundkörper. Beide Kurven zeigen einen gleichmäßigen Anstieg der Kraft im Anfangsbereich, der als Indiz für gültige Messungen herangezogen werden kann. Die Modulation der Kurve entsteht durch die Durchbrüche im Grundkörper. Die zum allgemeinen Vergleich der Chips herangezogene Messgröße ist die mittlere Abzugskraft der Maxima der Kurven. Dort weisen die Chips jeweils keine Durchbrüche auf. Die Schwankungen der Maxima, wie sie in der unteren Kurve zu sehen sind, sind eher auf den durch die Messanordnung nicht vollständig vermeidbaren, ungleichmäßigen Abriss der Folien in den Lochbereichen zurückzuführen. Hingegen sind die langwellige Änderungen in der oberen Kurve Ausdruck von Bondfehlern oder Inhomogenitäten des Grundkörpers oder Folien. Insbesondere für den Grundkörper wurde die Möglichkeit von Fehlern infolge von Inhomogenitäten mehrfach nachgewiesen.

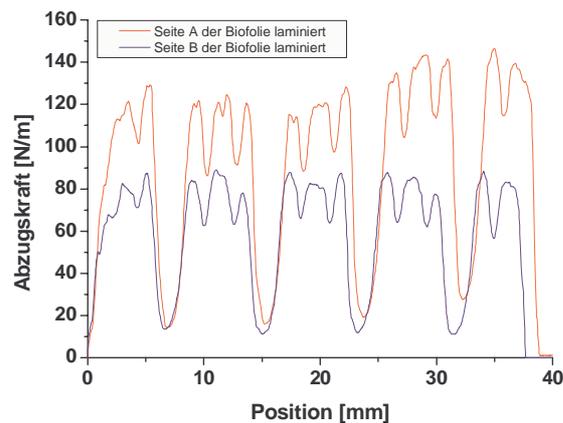


Abb. 14: Beispiel von Abzugskraft-Messkurven von auf PC-Chips gebundenen FEP-Folien.

Verglichen werden in Abb. 14 die A- und B-Seite der FEP-Folien, die beide in demselben Plasmaprozess modifiziert wurden. Tatsächlich konnten auf der bereits vorbehandelten Seite immer größere Abzugskräfte erzielt werden. Erst durch individuelle Anpassung der Plasmaprozesse konnte dieser Effekt ausgeglichen werden. Für eine Fertigung des Chips empfiehlt es sich deshalb, zur Aufwandsminimierung mit beidseitig gleichartigen Folien zu arbeiten. Die in der Abbildung nachgewiesenen Festigkeiten sind für die Stabilität der gebundenen Chips bereits vollkommen ausreichend. Bei einer verbesserten Laminierung konnten im Verlauf des Vorhabens sogar Abzugskräfte von bis zu 400 N/m erreicht werden.

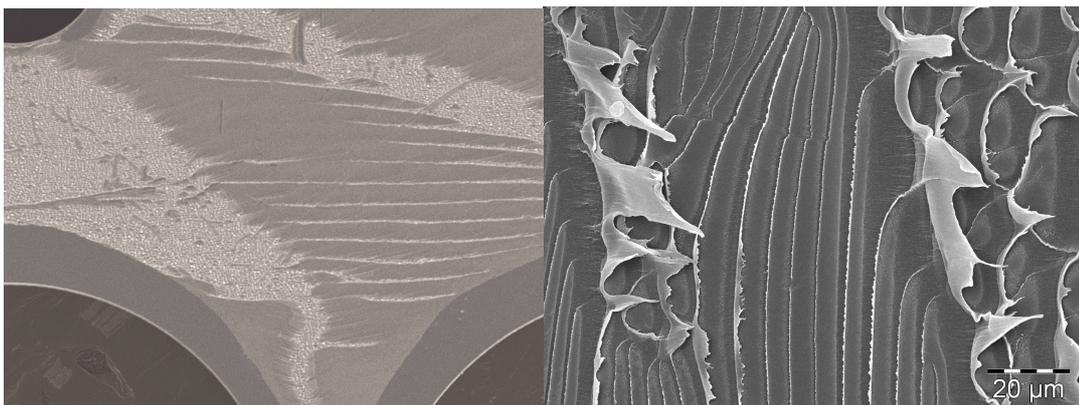


Abb. 15: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Abrissbereiches einer vom Grundkörper abgezogenen laminierten FEP-Folie. Das Foto links zeigt das Gebiet zwischen Befüll- und Absauglöchern. Rechts sind Reste der zerrissenen Folie zu sehen. (Links: Vergrößerung x 50, Bildbreite 2,6 mm; Rechts: Vergrößerung x1000, Bildbreite 132 µm)

Diese Abzugskräfte sind so groß, dass die FEP-Folie beim Abziehen vom PC-Grundkörper zerrissen wurde (Abb. 15).

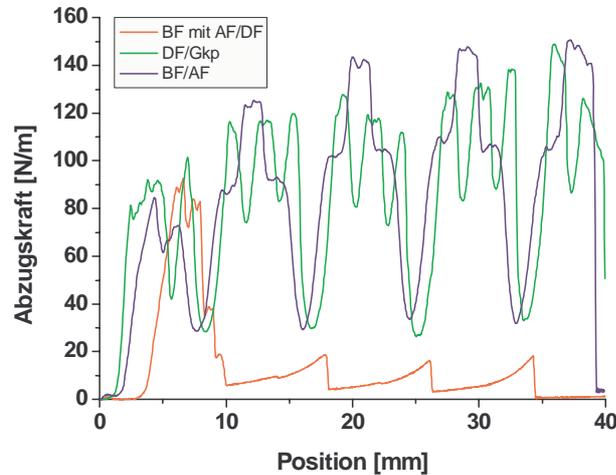


Abb. 16: Einfluss unterschiedlicher Reihenfolgen des Abziehens der Folien auf die Ergebnisse der Abzugstests bei einem Chip mit 250 μm Abstandsfolie. Untere Kurve (rot): Bodenfolie (BF) zusammen mit der Abstandsfolie (AF) von der Deckfolie (DF) abgezogen, mittlere Kurve (grün): Deckfolie vom Grundkörper (Gkp) abgezogen und obere Kurve (blau): Bodenfolie von der Abstandsfolie abgezogen

Durch die Steifheit der 125 μm starken Abstandsfolie aus Polycarbonat ist es schwierig, komplette Folienstapel hinsichtlich des Abzugsverhaltens zu bewerten. Insbesondere das Interface zwischen Abstandsfolie und Deckfolie war davon betroffen. Dieser Effekt zeigte sich besonders deutlich, als im Laufe der Untersuchungen dickere Abstandsfolien von 250 μm eingesetzt wurden, weil festgestellt worden war, dass höhere Zellkulturkammern eine bessere Zelladhäsion und –proliferation bewirken. Ein typisches Ergebnis ist in Abb. 16 zu sehen. Bei derartigen Abzugskurven kann man trotzdem davon ausgehen, dass alle Interfaces gleich fest gebondet sind.

2.3.4 XPS-Messungen

Röntgenphotoelektronen-spektroskopische Messungen (XPS) der oberflächenmodifizierten Bauteile wurden mit einem AXIS ULTRA Spektrometer der Firma Kratos (Manchester, GB), ausgestattet mit einer monochromatischen Al K_{α} Quelle, durchgeführt. Die Spektren wurden bei einer Passierenergie von 80 eV für die Bestimmung der chemischen Elementzusammensetzung und von 10 eV für die Bestimmung der

hochaufgelösten C 1s Peaks aufgenommen. Die Bindungsenergien wurden auf den aliphatischen Kohlenstoff-Peak von 285,0 eV bezogen.

Im Verlaufe des Vorhabens wurden immer wieder die Ergebnisse der Plasmaprozesse mit Hilfe der XPS kontrolliert.

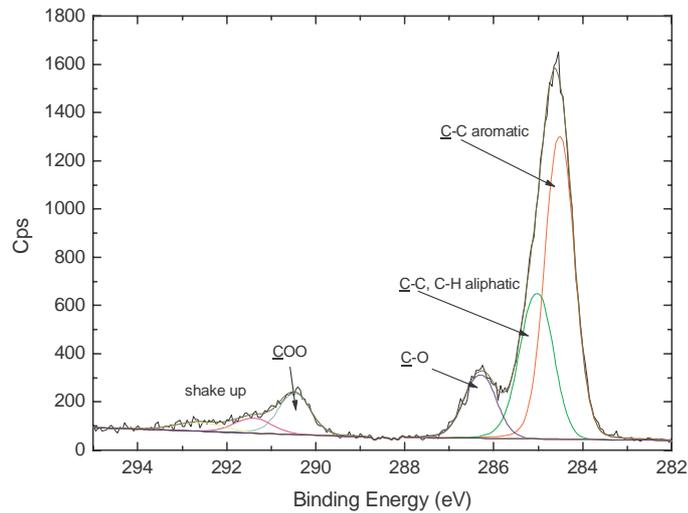


Abb. 17: Hochaufgelöster C 1s Peak von dem für den Zellchip eingesetzten Polycarbonat

Abb. 17 zeigt ein typisches XPS-Spektrum des verwendeten PC-Grundkörpers und Abb. 18 das Spektrum einer im Ammoniakplasma modifizierten FEP Folie. Der Fit des XPS-Spektrums für Polycarbonat stimmt gut mit der Literatur überein.

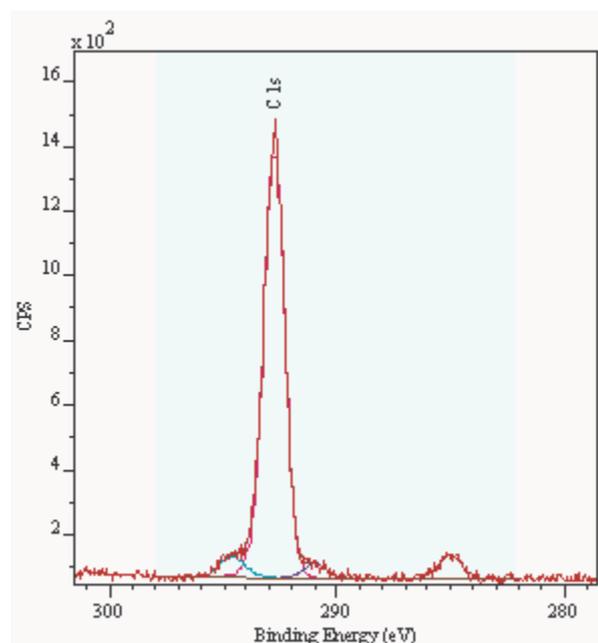


Abb. 18: Hochaufgelöster C 1s Peak der NH₃-plasmafunktionalisierten FEP-Folie

Bei den Untersuchungen zum Bonden hatte sich herausgestellt, dass es wichtig ist, auf die chemische Zusammensetzung des Polycarbonats zu achten. Neben der Tatsache, dass besonders Folien je nach Anbieter, Charge und vorausgehender Behandlung unterschiedlich sein können, hat auch die Verarbeitung im Spritzguss Einfluss auf die Oberflächeneigenschaften. In Tabelle 1 sind Ergebnisse einer dazu angestellten XPS-Untersuchung zusammengestellt, die das demonstrieren.

Tabelle 1: Elementzusammensetzung des verwendeten Polycarbonats ($[\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_3]_n$, $\text{O/C}_{\text{theoret}} = 18,75 \%$) in Abhängigkeit von der Verarbeitung

XPS-Messung (%)	O/C	N/C	F/C	Si/C
PC-Granulat	16.9	0	0.08	0.12
Makrolon-Folie	19.3	0.03	0.04	2.49
Zellchip-Grundkörper	25.3	0	1.67	0.27
Testplatte	25.7	0.08	0.13	6.55

Wie aus der Tabelle hervorgeht, entsprach der O/C-Gehalt auf der Oberfläche des Polycarbonat-Granulats für die Abformung der Chip-Grundkörper und für die Makrolon Folie als Material für die Abstandsfolie mit 16,9 bzw. 19,3 % etwa dem theoretischen Wert. Bei der Verarbeitung im Spritzguss zu Grundkörpern bzw. Testplatten stieg dieser Wert auf etwa 25 %. Bekanntlich treten beim Spritzguss auch immer wieder andere Kontaminationen auf. Hier waren es Fluor bzw. Silizium. Wie zu erwarten, war die Silizium-Kontamination sehr kritisch für die Bondqualität.

Mit Hilfe der XPS wurde auch das Trennverhalten der plasmagebondeten Interfaces einer genaueren Untersuchung unterzogen. Ein überzeugendes Ergebnis ist in den Abb. 19 und Abb. 20 dargestellt. Wie die erste Abbildung zeigt, wurde hier von einer Chipunterseite die Folie zur Hälfte abgezogen. Anschließend wurde auf beiden Seiten an den Punkten, die zuvor zusammenhafteten, gemessen.

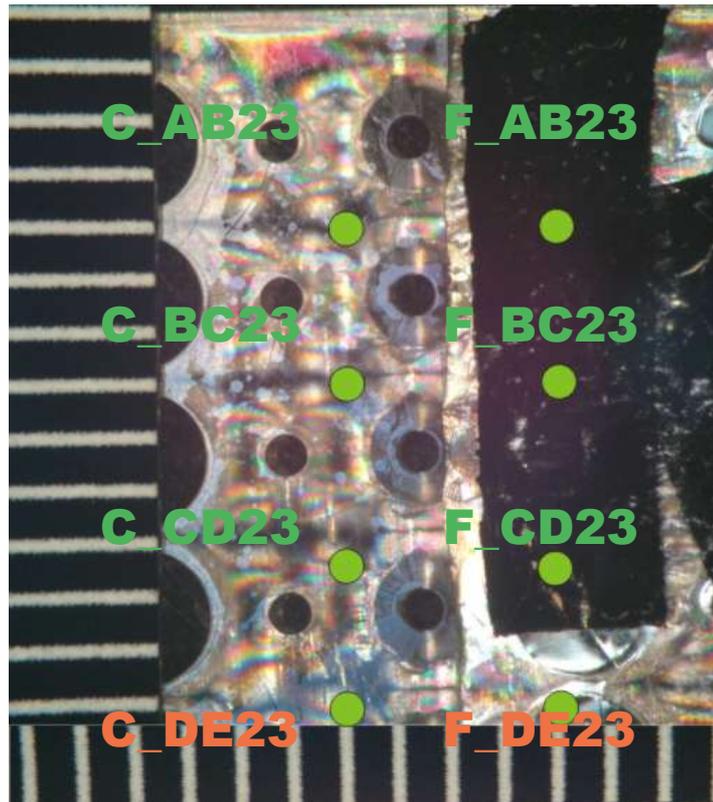


Abb. 19: Chipunterseite mit zur Hälfte abgezogener Folie (rechts im Bild), XPS Messpunkte sind grün markiert

FEP weist ein F/C von 250 % auf. Das ist der Wert, der auch auf der Unterseite der abgezogenen Folie zu finden ist. Fast dieser Wert wird aber auch auf der Polycarbonatseite gefunden. Für die abweichende Messpunktkombination DE23 war aus der visuellen Beurteilung das Abziehverhalten erkennbar, dass dort etwas geringere Haftfestigkeiten waren.

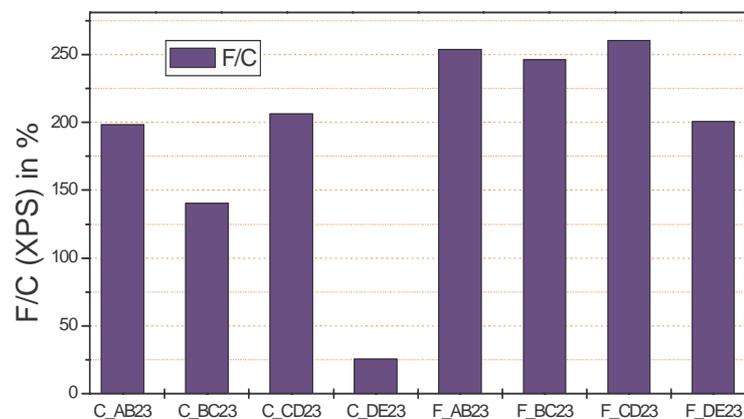


Abb. 20: Ergebnisse der XPS-Messungen (F/C) zu Abb. 19

Aber auch in diesem Punkt ist F/C immer noch 25 %. Damit liegt hier eindeutig ein Bruch im Material FEP vor. Es ist also so, dass die im Vorhaben gemessenen maximalen Abzugskräfte das Material charakterisieren. Am Interface können noch höhere Festigkeiten angenommen werden.

2.3.5 Befüllverhalten

Im Unterschied zu makroskopischen Zellkultursystemen ist bei Mikrosystemen die Befüllung keine ganz einfache technische Aufgabe, denn sie wird durch Kapillarkräfte bestimmt. Auf diese Kräfte haben die Geometrie des Systems, die Benetzungs- und Fließeigenschaften (Viskosität) der Flüssigkeiten und die Oberflächenenergie aller benetzten Flächen entscheidenden Einfluss. Letzteres ist bei Zellkultursystemen mit den Forderungen an die Oberflächen-Biokompatibilität und speziell beim hier untersuchten System auch mit den Forderungen des Plasmabondens in Übereinstimmung zu bringen. Während der gesamten Projektlaufzeit musste deshalb bei Änderungen der Oberflächenmodifikationen das Befüllverhalten sorgfältig mit untersucht werden.

Nach einiger Übung konnten die Befüllungen in der Regel noch von Hand mit Hilfe der kleinsten am Markt verfügbaren Pipettenspitzen und einer Eppendorf-Pipette vorgenommen werden. Dabei zeigte sich ein relativ problemloses Befüllverhalten (vollständige, blasenfreie Befüllung), wenn die Zellkammern geometrisch einwandfrei waren. Die hier empirisch gewählte Zellkammer-Geometrie kann also als relativ brauchbar angesehen werden. Zu Fehlern führten vor allem die durch fehlerhaftes Bonden zustande kommenden Verwerfungen der Deckel- und Bodenfolien, vor allem im Mittenbereich.

Bei den Befülltests zeigte sich jedoch, dass beim Bonden besonders darauf geachtet werden muss, keine Ansatzstellen für Folienablösungen zu produzieren. Das ist eine prinzipiell zu erwartende Besonderheit des Plasmabondens, denn im Vergleich zum Kleben kommt hier nur eine sehr dünne „Bondsicht“ zustande. Schon sehr kleine Unebenheiten und Partikel können nicht mehr durch Einbetten in diese Schicht ausgeglichen werden. An den Rändern der Strukturen ergeben sich auch sehr leicht enge keilförmige Spalte, in die Flüssigkeiten hineinkriechen und die Folien abscheren

können. Neben entsprechender Sorgfalt bei der Montage kann das Anpressen hier ausgleichend wirken.



Abb. 21: Chip nach Befülltest mit farbstoffhaltiger Detergens-Lösung.

Solcherart Schichtablösungen treten nicht unbedingt sofort beim Befüllen auf. Sie können auch erst nach längerer Lagerung im befüllten Zustand sichtbar werden. Deshalb wurde im Vorhaben ein besonders anspruchsvoller Test der Qualität der Bondung eingesetzt: die Befüllung mit einer wässrigen, mit Farbstoff eingefärbten und mit Tween versetzten PBS-Lösung. Tween ist der Handelsname für ein Polysorbit-Detergens, das bei Lösung in Wasser oder Alkohol für eine extreme Kriechfähigkeit in feinste Spalte sorgt. Abb. 21 gibt ein Beispiel für das Ergebnis eines solchen Tests. Die Gefäßreihen im rechten Bildteil sind intakt. Der fein verlaufende Farbschleier in der Nähe des linken Randes ist auf einen keilförmigen Fertigungsfehler zurückzuführen.

Für zellhaltige Medien erwies sich die Befüllung von Hand als nur begrenzt brauchbar. Vor allem konnten die Geschwindigkeiten der sich in den Mikrogefäßen ausbreitenden Flüssigkeitsfronten kaum beeinflusst werden. Sie waren so hoch, dass die Befüllung nicht mehr als durch den Kapillareffekt gesteuert, also gut reproduzierbar, angesehen werden konnte.

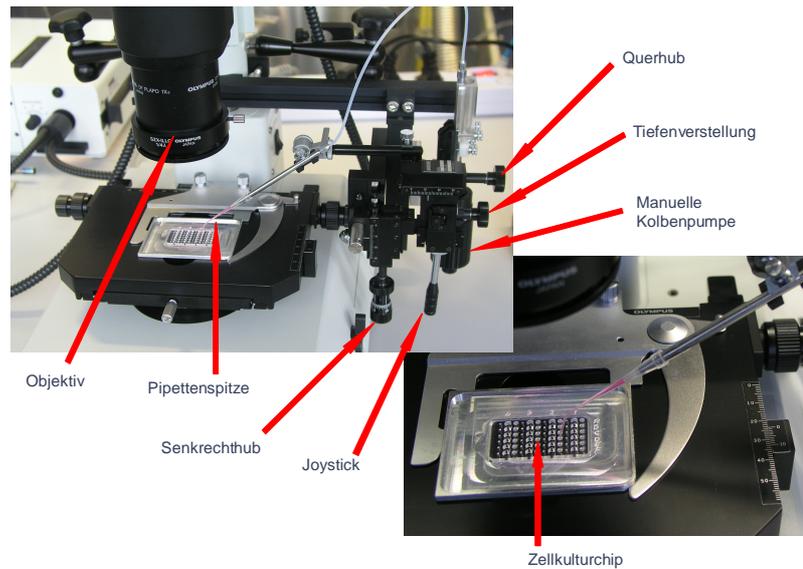


Abb. 22: Mikrodosiereinrichtung am Mikroskop

Das unerwünschte Resultat waren ungleichmäßige Zellablagerungen bei der Zellaussaat, also unter Umständen unbrauchbare Zellkulturen. Deshalb wurde für weitere Befülltests eine Mikrodosiereinrichtung zu Hilfe genommen, bei der die Befüllgeschwindigkeit gesteuert werden konnte. Mit videomikroskopischen Aufnahmen der Befüllung mit Teilchensuspensionen, später auch mit Zellsuspensionen, wurde so nachgewiesen, dass sich die Gefäße des Chips bei hinreichend langsamer Befüllung auf der Basis des Kapillareffekts mit guter flächiger Gleichmäßigkeit der Zellablage und abzählbaren Dichten der Zellen auf der Bodenfolie befüllen lassen. Anhäufungen von Zellen im Einfüllkanal sind eine Folge von Befüllfehlern. Sie können also vermieden werden.

2.3.6 Statistische Funktionstests und Langzeitverhalten

Aus den bisherigen Ausführungen geht hervor, dass die experimentelle Fertigung von Labormustern eines solchen neuartigen Zellkultur-Mikrochips mit einer Vielzahl zu lösender Probleme und dementsprechend mit einer großen Zahl von Unwägbarkeiten und Fehlermöglichkeiten verbunden ist. Das hat zur Folge, dass einzelne brauchbare, oder gar nur teilweise brauchbare Chips – mit z.B. nur einigen wenigen wirklich funktionierenden Kulturgefäßen – kaum als zuverlässige Demonstratoren möglicher praktischer Brauchbarkeit angesehen werden können. Schon gar nicht bei Zellkulturen,

denn dafür werden wegen der grundsätzlich großen statistischen Unsicherheiten immer größere Gefäß- bzw. Chip-Zahlen benötigt.

Während des Vorhabens wurden deshalb mehrfach anhand von Serien von Zellchips mit größeren Stückzahlen (Größenordnung 100 Stück) die Fertigungsgüte und die Funktion der Chips statistischen Tests unterworfen. So wurden u. a. nach dem in Abb. 8 dargestellten Fertigungsablauf 125 Zellkulturchips für Parameteruntersuchungen mittels statistischer Schätzverfahren hergestellt. Nach der zufälligen Auswahl von 20 Stichproben wurden mit diesen Chips folgende Parameter getestet:

- Befüllung,
- Befüllungszeit,
- Blasenbildung bei der Befüllung und
- Hydrolysestabilität der Bondung nach 24 h.

Stichprobenartig wurden auch die Befüllung mit Zellsuspension und das Zellwachstum getestet.

Wie aus Tabelle 2 zu ersehen ist, waren 99,2 % der Zellgefäße aller Chips mit Standard-PBS-Puffer in weniger als 4 s befüllbar, in der Regel innerhalb einer Sekunde. Nur 1,6 Gefäße/ Chip waren nach 24 h undicht. Das sind 6,7 %. Dieser Test wurde mit Chips aus der gleichen Herstellungsladung nach 1 Monat und mit neu hergestellten nach 3 Monaten wiederholt. Wie zu erwarten (Lernkurve – Anstieg der Fertigungsqualität) haben danach neu hergestellte Chips noch bessere Ergebnisse geliefert.

Tabelle 2: Statistische Tests von jeweils 20 zufälligen Stichproben Zellkulturchips

Befüll-Medium*	Charge	Alter der Chips (d)	Befüllzeit (s)	Gefäße/Chip befüllbar (%)	Folien-Ablösungen nach 24 h (%)
PBS	1	47	4,0 ± 2,5	99,2	0
PBS + Tween	1	47	1,6 ± 0,6	99,2	0
PBS	1 **	80	1,1 ± 0,2	100,0	0
PBS	2	51	2,3 ± 2,2	100,0	0
PBS + Tween	2	51	1,3 ± 0,7	99,2	0,8

* PBS – Phosphatpuffer pH 7,0, 0,3 % NaCl und 0,025 % Resorufin; Tween 20

** Versuch wurde wiederholt

2.3.7 Zellkulturtests

Die Erprobung der Chips in Zellkulturtests war nicht die primäre Aufgabe dieses Teilvorhabens. Sie wurde hier nur stichprobenartig durchgeführt, um eine schnelle Rückkopplung von Informationen über etwaige Einflüsse von technischen Änderungen zu bekommen.

Darüber hinaus wurden Zellkultur-Brauchbarkeitstests an den funktionalisierten Folien und während Chipmontage durchgeführt. Mit letzteren sollte festgestellt werden, ob Zwischenschritte der Montage Einfluss auf die Zellkultureigenschaften haben. Die Abbildungen 23 - 25 demonstrieren wichtige Aussagen dieser Tests. Abb. 23 zeigt die prinzipiell gute Brauchbarkeit der funktionalisierten Folien für die Zellkultur. Grundsätzlich war es aber wegen der zu schnellen Verdunstung der sehr kleinen Flüssigkeitsmengen schwierig, Zellkulturtests in offenen Mikrosystemen durchzuführen. Das zeigt sich beim Vergleich mit Abb. 24. Die Zellen adhären nicht gut. Das Verdunstungsproblem ist durch Lagerung in einer hoch wasserdampfgesättigten Atmosphäre nicht richtig zu lösen. Erst die verschlossenen Zellkammern bringen eine Besserung (Abb. 25), obwohl auch dann wegen der offenen Zuleitungskanäle auf guten Verdunstungsschutz geachtet werden muss. Als Vorteil erwies sich die Fixierung der Flüssigkeiten in den Mikrogefäßen infolge der Kapillareffekte. Es besteht kaum eine Gefahr, während Hantierungen Flüssigkeiten zu verschütten.

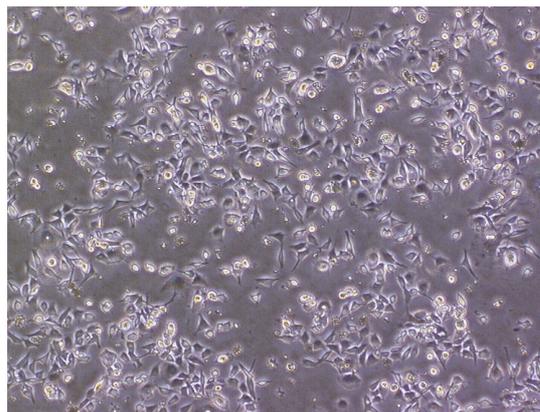


Abb. 23: Zellkultur auf funktionalisierter FEP-Folie (HEK-Zellen, 4h nach Aussaat)

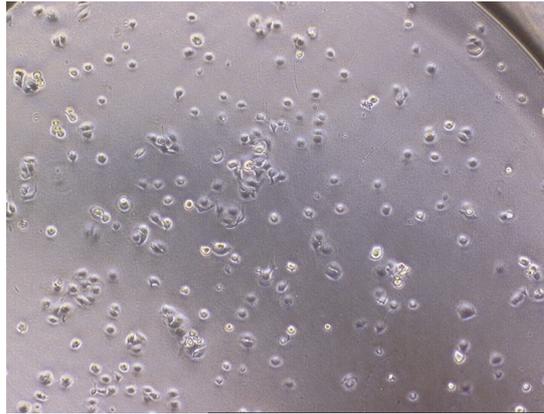


Abb. 24: Zellkultur auf einer an den Grundkörper montierten Folie 4h nach Aussaat (offenes Gefäß, HEK-Zellen, gleiche Dichte und Vergrößerung wie Abb. 23)



Abb. 25: Zellkultur in einer Zellchip-Kulturkammer 4h nach Aussaat (HEK-Zellen, stärkere Vergrößerung)

Die kompletten Zellkulturchips wurden vom Projektpartner In-Vitro Systems & Services (IVSS) zellbiologisch analysiert. Im Laufe der Untersuchungen kam es dabei zu einer Änderung der Dicke der Abstandsfolie von 125 μm auf aktuell 250 μm . Dies bewirkte eine bessere Zellanheftung und –proliferation. Die Experimente bei IVSS hatten das Ziel, mit Hilfe einer verlässlichen Anzahl von Zellkulturchips verschiedene relevante Parameter zu beurteilen. Neben der allgemeinen Handhabung waren dies u. a. die Mikrofluidik von Zellsuspensionen, die Adhärenz und Proliferation verschiedener Zelllinien, die Bestimmung der Vitalität über unterschiedlich lange Zellkulturdauer sowie die Anwendbarkeit bestimmter Analyse- und Auswerteverfahren. Die für IVSS gefertigten Chip-Chargen wurden, nachdem Chips mit offensichtlichen Herstellungsfehlern (< 5 %) verworfen wurden, ohne weitere Aussortierungen übergeben. Abb. 26

zeigt einen typischen Chip einer solchen Charge aus dem letzten Vorhabensabschnitt: alle Zellgefäße sind rein visuell so eben, dass der Folienstapel mit den Gefäßen auf den ersten Blick nicht zu erkennen ist.

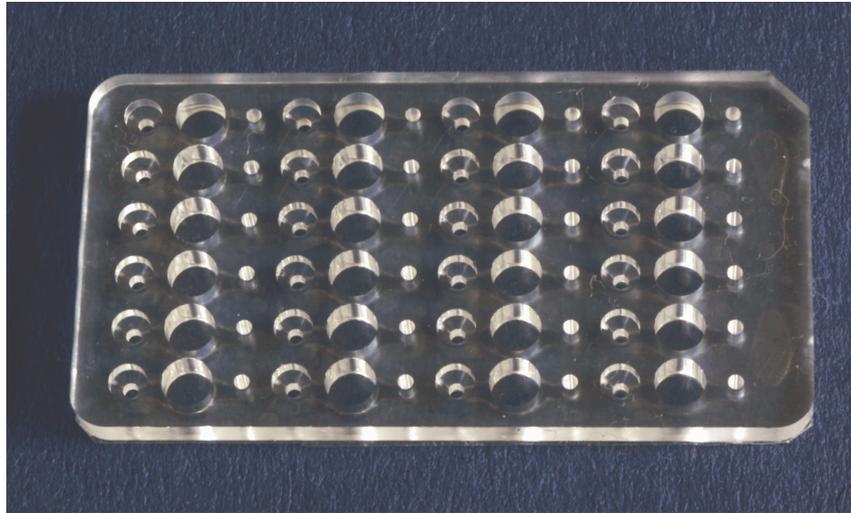


Abb. 26: Kompletter Zellkulturchip

3 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Im Rahmen dieses Vorhabens wurde die besondere Brauchbarkeit von Plasmaverfahren für die Herstellung mikrofluidischer Systeme am exemplarischen Beispiel einer neuartigen, miniaturisierten Zellkulturplattform demonstriert. Damit konnte gezeigt werden, dass eine extreme Miniaturisierung der klassischen Zellkultur bis in Abmessungen, die der in-vivo Situation ähnlich ist, fertigungstechnisch und zellkulturtechnisch möglich ist. Die hergestellten Labormuster dieses Zellkulturchips weisen die angestrebten Vorteile gegenüber herkömmlichen makroskopischen Plattformen auf: Steigerung der Analyseneffizienz und des Untersuchungsdurchsatzes, Reduktion der Zell-, Medien-, Reagenz- und Wirkstoffvolumina sowie des Platzbedarfs, hohe statistische Sicherheit durch mögliche Parallelversuche sowie einfache Handhabung. Damit sind beachtliche Zeitersparnisse und Kostensenkungen möglich, bei kosten-trächtigen Medien bis zu zwei Größenordnungen. Auch der niedrige Platzbedarf ist nicht unbedeutend, denn Zellkulturplattformen sind in hohen Stückzahlen verwendete Einmalgebrauchsartikel, die versendet, bevorratet und entsorgt werden müssen.

Diese Vorteile sind besonders für das Hochdurchsatz-Screening interessant. In dieser Hinsicht hat das Vorhaben sehr viel nützliches Know-How für die beteiligten Industriepartner geliefert, die beide - in unterschiedlicher Weise und an unterschiedlichen Stellen der Wertschöpfungskette – am Hochdurchsatz-Screening Interesse haben. Ausgehend von den Erfahrungen mit dem Labormuster können Fertigungsprototypen entworfen und erprobt werden.

Darüber hinaus wurde im Vorhaben die Technologie des Plasmabondens im Detail untersucht. Sie ist nicht nur für Zellkulturchips interessant, sondern kann in der Mikrotechnologie auch überall dort nützlich sein, wo besonders präzise Fügungen von Kunststoffbauteilen erforderlich sind.

4 Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Mikrofluidische Systeme (Lab-on-a-chip) sind für die Bioanalytik von großer Bedeutung und integrieren Analysenfunktionen wie Probenaufgabe, Trennung, chemische Reaktion und Detektion sowie Zelldiagnostik auf einem Chip. Gegenwärtig existieren eine Reihe von Ansätzen zur Herstellung von 3D-Trägersystemen für solche Zwecke. Jedoch sind uns keine Publikationen bekannt, die das Herstellen von miniaturisierten 3D-Fluidikstrukturen für die Zelldiagnostik in der hier erprobten Art und Weise zum Ziel hatten.

Die Miniaturisierung von Plattformen für die Untersuchungen von Zellkulturen ist eine hoch aktuelle Entwicklungsrichtung. Dies gilt für eine große Zahl sehr unterschiedlicher Aufgaben der zellbiologischen Forschung und biomedizinischen Diagnostik. Dementsprechend werden laufend neue Ansätze solcher Systeme publiziert. Erst kürzlich hat das erst vor wenigen Jahren entstandene Journal „Lab on a Chip“, das als wichtigster Veröffentlichungsort von Fortschritten auf dem Gebiet der miniaturisierten chemischen und biologischen Analysensysteme angesehen werden kann, eine Special Issue, 'Cell and Tissue Engineering in Microsystems' (Nr.6, 2007) herausgebracht. Ein Großteil der Arbeiten zielt auf Systeme, mit denen eine Steuerung der Parameter der zellulären Mikroumgebung mit Hilfe von permanent durchflossenen Mikrosystemen möglich ist. In der Regel handelt es sich dabei um auf attraktive Aufgaben der Grundlagenforschung orientierte Systeme. Allerdings werden auch Schritt für Schritt nützliche Informationen für die Miniaturisierung bereits in Anwendung befindlicher Zellkultur-Diagnostik publiziert.

Die plasmachemische Funktionalisierung von Polymeroberflächen als Voraussetzung für das Herstellen von Diagnostikplattformen ist ein unverändert aktuelles Forschungsthema in der Plasmatechnologie mit absehbaren Anwendungen in Medizin, Pharmazie und Biotechnologie. Zur Entwicklung des Plasmabondens in der hier gezeigten Art und Weise sind von anderer Stelle keine Fortschritte bekannt.

5 Vorträge und Veröffentlichungen

5.1 Vorträge

1. W. Besch, K. Schröder, A. Ohl. Access of plasma polymerization and plasma induced vapor phase grafting processes to high aspect ratio trenches in polymeric microstructures analyzed by XPS. Ninth International Conference on Plasma Surface Engineering 2004, 13.-17.09.2004 in Garmisch-Partenkirchen.

5.2 Veröffentlichungen

1. W. Besch, K. Schröder, A. Ohl. Access of plasma polymerization and plasma induced vapor phase grafting processes to high aspect ratio trenches in polymeric microstructures analyzed by XPS. Plasma Process. Polym. **2** (2005) 97-103.
2. W. Besch, K. Schröder, A. Ohl. Plasmagestützte Oberflächenfunktionalisierung komplex strukturierter, miniaturisierter Kunststoff-Formteile. Vakuum in Forschung und Praxis **17** (2005) 126-130.
3. H. Reinecke, O. Lippold, A. Ohl, W. Besch, K. Schröder, F. Götz. Funktionalisierung der Oberfläche von Mikrostrukturen - Technologie und Anwendungen. Vakuum in Forschung und Praxis **17** (2005) 135-139.

6 Zusammenfassung

Das Ziel des Vorhabens war es, verschiedene, für die konsequente Miniaturisierung polymerer 3D-Fluidikstrukturen für die standardmäßige Labordiagnostik vorteilhafte und neuartige Plasmaprozesse zu untersuchen und deren Nutzen an einem exemplarischen Beispiel zu demonstrieren. Dieses Ziel ist erreicht worden.

In enger, arbeitsteiliger Zusammenarbeit mit den Verbundpartnern konnte eine neuartige, miniaturisierte Zellkulturplattform, der so genannte „Zellkulturchip“, realisiert werden. Mit deren Hilfe konnte gezeigt werden, dass eine extreme Miniaturisierung der klassischen Zellkulturtechniken bis in Abmessungen, die der in-vivo Situation ähnlich sind, fertigungstechnisch und zellkulturtechnisch möglich ist. Die typischen Zellkulturkammern hatte eine Höhe von 125 μm bei einem Volumen von unter 1 μl und noch geringere Abmessungen sind möglich. Von einer derartigen Miniaturisierung der Zellkultur können Aufwands- und Kostenersparnisse um bis zu zwei Größenordnungen erwartet werden.

Plasmaprozesse wurden verwendet, um die Mikrofluidik in den Hohlräumen der Mikrostruktur einzustellen, um das Fügen der Einzelteile zu ermöglichen und um hochwertige Zell-Wachstumsflächen in den Mikrokavitäten zu erzeugen. Dazu wurde eine umfangreiche Methodenoptimierung betrieben. Im Ergebnis dessen konnten die genannten Ziele durch geeignete Kombination nur zweier Plasmaprozesse und dementsprechend nur wenigen Prozessschritten erreicht werden. Auch das zeigt die besondere Nützlichkeit von Plasmaprozessen für die vorliegende Miniaturisierungsaufgabe.

Für das Fügen wurde ein neuer Prozess des Plasmabondens verwendet. Er ermöglicht erstmalig das Fügen von hochgradig inkompatiblen und inerten Polymeren wie FEP und PC ohne Zuhilfenahme von Klebstoffen. Die Verwendung dieser Kunststoffe war aus funktionellen Gründen erforderlich. Der Verzicht auf Klebstoffe sichert die Biokompatibilität der Fügung. Es wurden Festigkeiten bis zu 400 N/m im Schälabzugstest erreicht.

Im Vorhaben wurde eine größere Zahl von Versuchsmustern erzeugt und verschiedenen Tests unterworfen. Auf diese Weise konnte die Fertigungsqualität systematisch

verbessert werden. Mit statistischen Untersuchungen konnte eine hohe Befüllsicherheit, gute Dichtigkeit und auch eine Lagerfähigkeit über mehrere Monate nachgewiesen werden. Die Zellkulturchips waren damit für weitergehende zellkulturtechnische Untersuchungen durch den Projektpartner IVSS tauglich.

7 Literatur

- [1] S. Brahmamandra, V. Ugaz, D. Burke, C. Mastrangelo, M. Burns. Electrophoresis in microfabricated devices using photopolymerized polyacrylamide gels and electrode-defined sample injection. *Electrophoresis* 22 (2001) 300.
- [2] J. Ruano, D. Ortega, J. Bonar, A. McLaughlin, M. Jubber, J. Cooper, J. Aitchison. Fabrication of integrated microanalytical chambers and channels for biological assays using plasma hydrolysis deposition glass. *Microelectron. Eng.* 46 (1999) 419.
- [3] H. Becker, L.E. Locascio. Polymer microfluidic devices. *Talanta* 56 (2002) 267.
- [4] M. Oles, D. Landwehr, L. Heinrich. Zellträgersystem für Zell-, Gewebe- und Organkulturen. Patent-Nr. DE 19919241 28.4.1999.
- [5] M. Paulitschke, T. Bernstein. Kammer mit mikroskopierfähigem Strömungskanal zur Perfusion von adhärenen Zell- und Gewebekulturen. Patent-Nr. DE 10007398 12.2.2000.
- [6] M.L. Alajoki, H.G. Wada, A. Chow, J. Farinas, J.W. Parce. On-chip dye loading for microfluidic cell-based assays. *Faseb J.* 16 (2002) A541.
- [7] L.J. Kricka. Microchips, microarrays, biochips and nanochips: personal laboratories for the 21st century. *Clin. Chim. Acta* 307 (2001) 219.
- [8] C.M. Chang, T.M. Ko, H. Hiraoka. Polymer surface modification by plasma and photons. *Surf. Sci. Rep.* 24 (1996) 1.
- [9] R. d'Agostino, Plasma deposition, treatment and etching of polymers, Academic Press Inc. New York 1990.
- [10] B.D. Ratner. Plasma Deposition for Biomedical Applications - A Brief Review. *J. Biomater. Sci.-Polym. Ed.* 4 (1992) 3.
- [11] P. Favia, R. d'Agostino. Plasma treatments and plasma deposition of polymers for biomedical applications. *Surface & Coatings Technology* 98 (1998) 1102.
- [12] D. Klee, H. Höcker. Optimierung der Bioverträglichkeit von Kunststoff-Implantaten. *Spekt. Wiss.* 9 (1995) 90.
- [13] Technical Report „CellBIND Surface: An Improved Surface for Enhanced Cell Attachment“, Corning Incorporated Life Sciences, 2005.
- [14] K. Wende, K. Schröder, U. Lindequist, A. Ohl. Plasma-based modification of polystyrene surfaces for serum-free culture of osteoblastic cell lines. *Plasma Process. Polym.* 3 (2006) 524.

- [15] A. Ohl, K. Schroder. Plasma-induced chemical micropatterning for cell culturing applications: a brief review. *Surf. Coat. Technol.* 119 (1999) 820.
- [16] K. Schröder, A. Meyer-Plath, D. Keller, W. Besch, G. Babucke, A. Ohl. Plasma-induced surface functionalization of polymeric biomaterials in ammonia plasma. *Contrib. Plasma Phys.* 41 (2001) 562.
- [17] W. Besch, O. Lippold, H. Reinecke, K. Schröder, A. Ohl. A test specimen for investigation of plasma modification of interior surfaces in polymeric three-dimensional microstructures. *Surf. Coat. Technol.* 174 (2003) 112.
- [18] R.M. France, R.D. Short. Plasma Treatment of Polymers - Effects of Energy-Transfer from an Argon Plasma and Post-Plasma Storage on the Surface-Chemistry of Polystyrene. *Polym. Degrad. Stability* 45 (1994) 339.
- [19] A. Ohl, W. Besch, K. Schröder. Plasmachemische Funktionalisierung von Teststrukturen zur Verbesserung des Fließverhaltens. Abschlussbericht (2003) 36 Seiten.
- [20] H.S. Munro, D.I. McBriar. Influence of Post Treatment Storage on the Surface-Chemistry of Plasma Oxidized Polymers. *J. Coat. Technol.* 60 (1988) 41.
- [21] T.R. Gengenbach, Z.R. Vasic, R.C. Chatelier, H.J. Griesser. A Multitechnique Study of the Spontaneous Oxidation of N-Hexane Plasma Polymers. *J. Polym. Sci., Part a-Polymer Chemistry* 32 (1994) 1399.
- [22] Patent Nr. DE 1981068 A1.
- [23] Patent Nr. WO 0270901 12.