



SCHWEIZERISCHE Eidgenossenschaft
EIDGENÖSSISCHES INSTITUT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(11) **CH** **705 287 B1**

(51) Int. Cl.: **B01L 3/00** (2006.01)
B01D 17/00 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

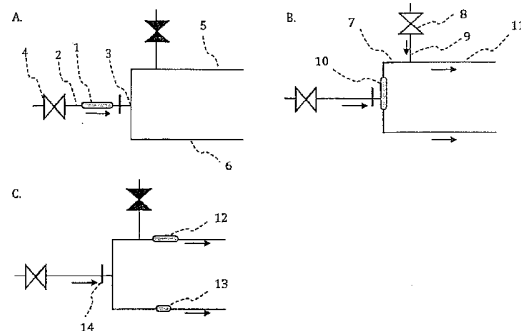
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(12) **PATENTCHRIFT**

(21) Anmeldenummer:	00834/12	(73) Inhaber:	Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk, ul. Kasprzaka 44/52 01-224 Warszawa (PL)
(22) Anmeldedatum:	14.06.2012	(72) Erfinder:	Slawomir Jakiela, 01-224 Warszawa (PL) Tomasz Kaminski, 01-224 Warszawa (PL) Krzystof Churski, 01-224 Warszawa (PL) Piotr Garstecki, 01-224 Warszawa (PL)
(43) Anmeldung veröffentlicht:	31.01.2013	(74) Vertreter:	Riederer Hasler & Partner Patentanwälte AG, Kappelstrasse 15 9492 Eschen (LI)
(30) Priorität:	27.07.2011 PL P-395778		
(24) Patent erteilt:	13.12.2013		
(45) Patentschrift veröffentlicht:	13.12.2013		

(54) **Verfahren zur Teilung von Tropfen an einer mikrofluidischen Kreuzung.**

(57) Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Teilung eines Tropfens an einer mikrofluidischen Kreuzung, umfassend einen Zufuhrkanal, einen ersten Abfuhrkanal, ausgerüstet mit einem zusätzlichen Kanal, und einen zweiten Abfuhrkanal, gekennzeichnet dadurch, dass es die folgenden Etappen umfasst:
a. Zuführung des Tropfens (1) an die mikrofluidische Kreuzung (3) durch den Zufuhrkanal (2) mithilfe einer Strömung einer kontinuierlichen Phase durch den Zufuhrkanal sowie den ersten Abfuhrkanal (5) und den zweiten Abfuhrkanal (6),
b. Steuerung des Verhältnisses der Flussraten in den Abfuhrkanälen (5, 6) durch Fördern oder Absaugen der kontinuierlichen Phase durch den zusätzlichen Kanal (9), mindestens bis zum Zeitpunkt, wenn der sich im ersten Abfuhrkanal (5) befindende Teil des Tropfens (1) von dem sich im zweiten Abfuhrkanal (6) befindenden Teil des Tropfens abreisst.



Beschreibung

[0001] Der Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Teilung eines Tropfens nach Bedarf (engl. on demand droplets) an einer mikrofluidischen Kreuzung, d.h. ein Verfahren zur Teilung von Tropfen mit bekannter Zusammensetzung in zwei Tropfen in einstellbaren Verhältnissen.

[0002] Die erfindungsgemässe Lösung, in Verbindung mit den Modulen, die in vorhergehenden Patentanmeldungen der Arbeitsgruppe von Doz. Piotr Garstecki (veröffentlichte polnische Anmeldungen Nr. P-390 250, P-390 251, P-393 619 und internationale Anmeldung Nr. WO 2011/090 396) beschrieben sind, können bei langfristiger Kultivierung von Mikroorganismen oder Zellkulturen, oder auch zur Durchführung von chemischen Analysen innerhalb der Tropfen sowie zur Ablesung der Ergebnisse dieser Reaktionen in der Abhängigkeit von der kontrollierten chemischen Zusammensetzung der Fluidproben und deren Position in den mikrofluidischen Systemen, verwendet werden. Besonders bevorzugte Systeme gemäss der Erfindung können bei langfristigen Untersuchungen des Wachstums der Mikroorganismen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen benutzt werden, d.h. bei verschiedenen Nährbodenkonzentrationen oder in Gegenwart wachstumshemmender Mittel, z.B. Antibiotika, und auch anderer Substanzen, die die Physiologie der Mikroorganismen beeinflussen. Die Grundlage für eine langfristige Kultivierung ist die zyklische Beseitigung eines Teils der Kultur und Zusetzen einer genau festgelegten Portion neuen Nährbodens.

[0003] Immer zahlreichere Mitteilungen über die Anwendung der mikrofluidischen Systemen, in biologischen Wissenschaften erlauben eine sehr schnelle Entwicklung der Lab-on-a-Chip-Technologie in nächster Zukunft vorzusehen. Besonders versprechend ist die Verwendung der in den Mikrokanälen zu erzeugenden Tropfen als miniaturisierte Reaktoren wegen ihrer kleinen Volumina von Mikrolitern, durch Nanoliter bis Pikoliter.

[0004] Die tropfenbasierten Mikrosysteme zeichnen sich normalerweise durch eine Vielzahl von mikrofluidischen Kanälen mit ihren Einlässen und Auslässen aus, die innerhalb des Systems sich verbinden können und in denen Tropfen erzeugt werden, die mit einer mit den Tropfen nicht mischbaren kontinuierlichen Phase umgeben sind. Weiterhin können die Tropfen in den Mikrosystemen vereinigt, entlang der Kanäle bei Durchmischen ihres Gehalts transportiert, unter fixierten oder variablen Bedingungen festgehalten oder letztendlich an Kanalkreuzungen sortiert oder geteilt und aus dem System zurückgewonnen werden. Die Verwendung der Mikrolabors bei der Durchführung von chemischen und biochemischen Reaktionen innerhalb der Mikrotropfen hat folgende Vorteile [H. Song, D. L. Chen and R. F. Ismagilov, Ang. Chem. Int. Ed., 2006, 45, 7336-7356]: i) keine Zeitdispersion der Aufenthaltsdauer des Fluids im Kanal, ii) schnelle Durchmischung, iii) Möglichkeit einer einfachen Kontrolle über die Reaktionskinetik, iv) parallele Durchführung vieler Reaktionen möglich, v) reduzierter Verbrauch von Reagenzien, vi) schnellerer Nachweis von Reaktionsergebnissen (durch kleines Tropfenvolumen erreichen die Reaktionsprodukte schneller eine messbare Konzentration).

[0005] Hinsichtlich dieser Eigenschaften können die tropfenbasierten Mikrosysteme ein wertvolles Werkzeug für analytische Chemie, Biochemie, Mikrobiologie, medizinische Diagnostik oder auch molekulare Diagnostik darstellen.

[0006] Eine der unerlässlichen, in tropfenbasierten mikrofluidischen Systemen durchzuführenden Operationen ist die Teilung der Tropfen. Im Stand der Technik gibt es einige Verfahren zur Aufteilung der Tropfen an einer T-Kreuzung in einem mikrofluidischen System, wo die kontinuierliche (Kanalwände benetzende) Phase eine Flüssigkeit ist [D. R. Link, S. L. Anna, D. A. Weitz, and H. A. Stone. Phys. Rev. Lett. 2004, 92, 4] [J. Nie and R. T. Kennedy, Anal. Chem. 2010, 82, 7852–7856]. Mithilfe entsprechender Geometrie ist es möglich, einen Tropfen im umgekehrt proportionalen Verhältnis zu Flusswiderständen an jedem der zwei Abzweigungen einer T-Kreuzung zu zerspalten. Eine ungünstige Eigenschaft dieser Lösung ist es jedoch, dass die Proportion der Teilung durch die Geometrie des mikrofluidischen Systems im Voraus definiert sind sowie die Tatsache, dass sich die Teilungsproportion über eine kontrollierbare Änderung beim Systembetrieb nicht steuern lässt.

[0007] Im Stand der Technik gibt es viele Beispiele für durchgeführte Untersuchungen und Bestimmungen von Zellkulturen (Bakterien, Hefen und Säugerzellen) innerhalb der Tropfen in einem mikrofluidischen System [J. Q. Boedicker, L. Li, T. R. Kline, and R. F. Ismagilov, Lab Chip 2008, 8, 1265–1272] [C. H. J. Schmitz, A. C. Rowat, S. Köster, and D. A. Weitz, Lab Chip 2009, 9, 44–49] [J. Clausell-Tormos, D. Lieber, J. C. Baret, A. El-Harrak, O. J. Miller, L. Frenz, J. Blouwolf, K. J. Humphry, S. Köster, H. Duan, C. Holtze, D. A. Weitz, A. D. Griffiths, and C. A. Merten, Chemistry & Biology 2008, 25, 427–437]. Die mit diesen Systemen durchgeführten Messungen betrafen jedoch in der Regel nicht die Analyse der Zellenphysiologie in einer langen Zeitspanne. Die Analyse in einer langen Zeitspanne erfordert, dass die Bedingungen des Zellenwachstums konstant bleiben. Bei der Kultivierung der Mikroorganismen werden die Nährsubstanzen schon nach einigen Stunden knapp, die Kultur wird gesättigt und das Wachstum gehemmt. Durch zyklische oder permanente Beseitigung von Kulturteilen und Zugabe von frischem Nährboden können ein gleichmässiges Tempo und nach Möglichkeit gleichmässige Bedingungen des Wachstums eingehalten werden. Im Stand der Technik gibt es eine Vorrichtung – das Chemostat [A. Novick and L. Szilard, Science 1950, 112, 715–716], das über die Fähigkeit verfügt, einen Teil der Kultur kontinuierlich mit einem frischen Nährmedium zu ersetzen, wobei die Rate des Austausches einstellbar sein kann. Im Stand der Technik gibt es einige Lösungen, die eine Miniaturisierung des Chemostats ermöglichen: i) Systeme, die auf multilagigen Elastomer-Systemen basieren [F. K. Baiagadde, L. You, C. L. Hansen, F. H. Arnold, S. R. Quake, Science 2005, 309, 137] ii) miniaturisierte Systeme, deren Ausführung den in der Makroskala verwendeten Chemostaten ähnlich ist [N. Szita, P. Boccazzi, Z. Zhang, P. Boyle, A. J. Sinskey, K. F. Jensen, Lab Chip 2005, 5, 819] iii) Systeme, die Tropfenbewegung

auf der Elektrodenoberfläche ausnutzen, sog. «digitale Mikrofluidik» [S. H. Au, S. C. C. Shih, A. R. Wheeler, Biomed. Microdevices 2011,13,41].

[0008] Im Stand der Technik gibt es kein Verfahren, das eine bedeutende Vervielfachung der Anzahl von Chemostaten ermöglicht und erlaubt sowie gleichzeitig die Kulturzüchtung in jedem der Chemostaten ermöglicht. In allen genannten Beispielen ist die Vervielfachung der Anzahl von Chemostaten mit einer bedeutenden Erhöhung der Systemkomplexität verbunden, und die Anzahl von Schlüsselementen in der Chiparchitektur nimmt in linearer Proportion zu der Anzahl von Chemostaten zu.

[0009] Es ist ratsam, dass 2-Phasen-Mikroflüsse, d.h. Mikrotropfen, die sich in Mikrokanälen mit einem Durchmesser von einigen bis einigen hundert Mikrometer bewegen, als eine bei einer langfristigen Züchtung von Mikroorganismen nutzbare Technologie, verwendet werden.

[0010] Unerwartet haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung bemerkt, dass es möglich ist, ein die Führung und Beobachtungen einer langfristigen Kultivierung von Mikroorganismen erlaubendes Mikrofluidiksystem so zu konstruieren, dass jeder Tropfen als getrenntes Chemostat funktioniert. Ferner hat es sich herausgestellt, dass ein gemäss der Erfindung gefertigtes System die Kultivierung von Mikroorganismen unter variablen Bedingungen erlaubt, insbesondere bei variabler Konzentration der Substanzen, die das Wachstum der Mikroorganismen beeinflussen, z.B., Antibiotika, sowie auch bei variabler Verdünnungsrate (D), d.h. bei variablem Tempo der Beseitigung der gesättigten Kultur und der Zugabe des frischen Nährmediums.

[0011] Gemäss der Erfindung zeichnet sich das Verfahren zur Teilung eines Tropfens an einer mikrofluidischen Kreuzung, umfassend einen Zufuhrkanal, einen ersten Abfuhrkanal, ausgerüstet mit einem zusätzlichen Kanal, und einen zweiten Abfuhrkanal, dadurch aus, dass es die folgenden Etappen umfasst:

- a. Zuführung des Tropfens an die mikrofluidische Kreuzung durch den Zufuhrkanal mithilfe einer Strömung einer kontinuierlichen Phase durch den Zufuhrkanal sowie den ersten Abfuhrkanal und den zweiten Abfuhrkanal,
- b. Steuerung des Verhältnisses der Flussraten in den Abfuhrkanälen durch Fördern oder Absaugen der kontinuierlichen Phase durch den zusätzlichen Kanal, mindestens bis zum Zeitpunkt, wenn der sich im ersten Abfuhrkanal befindende Teil des Tropfens von dem sich im zweiten Abfuhrkanal befindenden Teil des Tropfens abreißt.

[0012] Das Verfahren umfasst somit automatisierte Techniken zur bedarfsgemässen Teilung der Tropfen in einem solchen Mikrofluidiksystem.

[0013] Vorzugsweise werden die Strömungen automatisch gesteuert, wobei ein Sensor, bevorzugt eine Kamera, in der Nähe der mikrofluidischen Kreuzung angebracht und unmittelbar oder mittelbar mit dem Ventil verbunden ist, über das die Strömung in dem zusätzlichen Kanal kontrolliert wird.

[0014] In einer bevorzugten Ausführungsvariante ist die mikrofluidische Kreuzung eine T-Kreuzung, d.h. eine Kreuzung, in der der Zufuhrkanal, der Abfuhrkanal und der zweite Zufuhrkanal miteinander die Winkel von entsprechend 90° , 180° und 90° bilden.

[0015] In einer anderen bevorzugten Ausführungsvariante ist die mikrofluidische Kreuzung eine Y-Kreuzung, d.h. die Kreuzung, in der der Zufuhrkanal, der erste Abfuhrkanal und der zweite Abfuhrkanal miteinander die Winkel von entsprechend 150° , 60° und 150° bilden.

[0016] In einer noch weiteren bevorzugten Ausführungsvariante ist die mikrofluidische Kreuzung eine Kreuzung, in der der Zufuhrkanal, der erste Abfuhrkanal und der zweite Abfuhrkanal miteinander die Winkel von entsprechend 120° , 120° und 120° bilden.

[0017] Vorzugsweise, gemäss der Erfindung, wird der Tropfen im Volumenverhältnis von 1:9 bis 9:1, mehr bevorzugt von 1:99 bis 99:1, und am meisten bevorzugt von 1:999 bis 999:1, geteilt.

[0018] In der nachfolgenden Beschreibung wird ein Verfahren zur Teilung von Tropfen mittels einer kontrollierten Tropfenpositionierung und Steuerung der Öffnungszeit der Ventile, die den Abfluss der Flüssigkeit aus den Armen einer T-Kreuzung verschliessen, dargestellt. Die T-Kreuzung wird hier als eine beispielhafte und nicht einschränkende Ausführung der Erfindung diskutiert. Als eine T-Kreuzung wird im Fall der vorliegenden Erfindung eine Verbindung von drei Kanälen definiert, wobei einer von denen die Fluide zur Kreuzung zuführt, und die zwei übriggebliebenen die Fluide abführen. Charakteristisch ist, dass die die Flüssigkeit aus der T-Kreuzung abführenden Kanäle sich bedeutsam durch die Widerstände voneinander unterscheiden – der Unterschied kann sich beispielweise, aber nicht einschränkend, aus verschiedenen Querschnittflächen der Kanäle oder aus verschiedenen Kanallängen ergeben. Die Arme einer T-Kreuzung sind unter den Winkeln entsprechend von 90° , 90° und 180° zueinander positioniert. Die Fachkundigen werden doch leicht bemerken, dass die vorgestellten Verfahren bei beliebigen anderen Winkeln direkt anwendbar sind.

[0019] Unerwartet haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung bemerkt, dass es möglich ist, ein Mikrofluidiksystem zu konstruieren, das die Tropfen in einem sehr breiten und variablen Verhältnis so zu teilen erlaubt, dass das Teilungsverhältnis für die nacheinander zu teilenden Tropfen verschieden sein kann. Ähnlich unerwartet haben die Erfinder dieser Erfindung bemerkt, dass man das Ventil im zusätzlichen Kanal, das die kontinuierliche Phase zu einem der die kontinuierliche Phase aus der T-Kreuzung abführenden Abfuhrkanäle zuführt, zu dem Zeitpunkt öffnen kann, wenn sich der zu teilende Tropfen an der T-Kreuzung befindet, oder bevor der Tropfen die Kreuzung eintritt. Dieses Verfahren reduziert den

Unterschied der Widerstände zwischen den zwei Kanälen, die Flüssigkeiten aus der Kreuzung abführen. Es ist charakteristisch, dass die Tropfenposition sowie die den partiellen Ausgleich erzeugende Öffnungszeit des Ventils über die Volumina der zwei neu zu erzeugenden Tropfen entscheiden. Das Teilungsverhältnis hängt gewissermassen von der Geometrie des Systems ab, es hat sich aber unerwartet herausgestellt, dass es möglich ist, das Volumenverhältnis von zwei neu entstehenden Tropfen mithilfe entsprechender Tropfenpositionierung und an der T-Kreuzung, und anschliessend durch Erhöhung des Widerstands in einem der die Flüssigkeit aus der T-Kreuzung abführenden Kanäle, zu manipulieren. Es ist charakteristisch, dass der Unterschied der Widerstände bei dem geschlossenen Ventil im zusätzlichen Kanal das maximale Teilungsverhältnis eines Tropfens mit einem Volumen von 1 μL , für eine beispielhafte Geometrie einer T-Kreuzung, bestimmt (ein Einlasskanal mit Abmessungen grösser als $100 \cdot 100 \mu\text{m}$, bei Auslasskanälen mit einem Durchmesser von $100 \cdot 100 \mu\text{m}$ erlaubt die Tropfen in einem beliebigen Volumenverhältnis von 1:999 bis 999:1 zu teilen).

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0020] Bevorzugte Ausführungsbeispiele der Erfindung werden nun in Bezug auf die beigelegten Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

- Fig. 1 Schematische Darstellung eines erfindungsgemässen Mikrosystems, das zur Teilung der Tropfen an einer T-Kreuzung verwendet ist;
- Fig. 2 Schematische Darstellung eines Mikrosystem gemäss der Erfindung, das zur Realisierung eines vervielfachten Chemostats innerhalb der Tropfen verwendet ist;
- Fig. 3 Diagrammdarstellung der Tropfenvolumina nach einer asymmetrischen Teilung mit relativen Abweichungen des Tropfenvolumens;
- Fig. 4 Diagrammdarstellung der Änderung der Farbstoffkonzentration im gegebenen Tropfen infolge seiner Teilung und Ergänzung des Anfangsvolumens des Tropfens mit dem vorgegebenen Fluid;
- Fig. 5 Diagrammdarstellung der in der Zeit zunehmenden optischen Dichte in einem vervielfachten Chemostat in der Abhängigkeit von der Konzentration der Antibiotika;
- Fig. 6 Diagrammdarstellung der in der Zeit zunehmenden optischen Dichte in 9 ausgewählten Mikrotropfen, die 3 verschiedene Konzentrationen der Antibiotika enthalten;
- Fig. 7 Diagrammdarstellung der zyklisch zunehmenden optischen Dichte in der Zeit im gegebenen Tropfen infolge seiner Teilung und Ergänzung des Anfangsvolumens des Tropfens mit dem vorgegebenen Fluid bei mangelnder Zunahme der optischen Dichte im Kontrolltropfen, der keine Bakterien enthält, und
- Fig. 8 Diagrammdarstellung der optischen Dichte für alle Tropfen des vervielfachten Chemostats an zwei ausgewählten Messpunkten.

Beispiel 1

[0021] In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel wird der im Mikrokanal befindliche Tropfen in zwei Tropfen mit einstellbarem Volumenverhältnis an einer T-Kreuzung geteilt. In dem in Fig. 1a schematisch dargestellten Beispiel wird der im Kanal 2 befindliche Tropfen 1 zur T-Kreuzung 3 mithilfe einer mit dem Ventil 4 einstellbaren Strömung der kontinuierlichen Flüssigkeit verlagert. Vorzugsweise besitzt eine T-Kreuzung zwei Abfuhrkanäle 5, 6, mit verschiedenen hydrodynamischen Widerständen. Vorzugsweise zeichnet sich der Kanal 5 durch einen wesentlich kleineren hydrodynamischen Widerstand als der hydrodynamische Widerstand der Leitung 6 aus. Durch eine solche Widerstandsverteilung fliesst das die Kreuzung 3 eintretende Fluid in die Kanäle 5 und 6 mit verschiedenen volumetrischen Flussraten ein. Insbesondere ist das Verhältnis des volumetrischen Flusses im Kanal 5 zu dem volumetrischen Fluss im Kanal 6 umgekehrt proportional zu dem Verhältnis der hydrodynamischen Widerstände der Kanäle 5 und 6. Ein die Kreuzung 3 eintretender Tropfen wird in zwei Tropfen zerrissen, wobei das Verhältnis des Volumens des Tropfen, der in den Kanal 5 einfluss, zu dem Volumen des gebildeten Tropfens, der in den Kanal 6 einfluss, in einer sehr guten Annäherung dem Verhältnis der volumetrischen Flüsse durch die Kanäle gleich ist. Um das Verhältnis der zu entstehenden Tropfen einstellen zu können, ist der Kanal 5 mit einem zusätzlichen Einlauf 9 mit dem durch das Ventil 8 einstellbaren Fluss ausgerüstet. Der Kanal 5 teilt sich in zwei Segmente: das Segment 10 – von der Kreuzung 3 bis zur Kreuzung mit dem Kanal 9, sowie das Segment 11 – hinter der Kreuzung mit dem Kanal 9. Wenn das Ventil 8 geöffnet ist, ändert das aus dem Kanal 9 in den Kanal 5 ausfliessende Fluid das volumetrische Verhältnis der Flussraten in den Kanälen 11 und 6. Dadurch wird der Tropfen in einem von der Tropfenposition zum Zeitpunkt, in dem das Ventil 8 im zusätzlichen Kanal 9 geöffnet wird, und von der Öffnungszeit dieses Ventils abhängigen Verhältnis geteilt. Anschliessend wird das Ventil 8 gesperrt, und die neugebildeten Tropfen mit den festgelegten Volumina 12,13 werden in einen weiteren Teil des Systems verlagert. In einem bevorzugten Beispiel ist über/unter der Kreuzung 3 ein Sensor 14 angebracht, der die elektronische Vorrichtung (nicht gezeigt in der Abbildung) über den Fluss der Tropfen informiert. In einer bevorzugten Ausführung, aber nicht einschränkend, ist es ein optischer oder

ein elektrischer Sensor. In dem Beispiel schaltet die elektronische Vorrichtung die Ventile 4, 8 so um, dass es möglich ist, verschiedene Teilungsverhältnisse der Tropfen zu erzielen. Vorzugsweise ist die Länge des zu teilenden Tropfens gleich einigen Kanalbreiten – dies kann durch die Verengung des Kanals vor der T-Kreuzung erzielt werden.

Beispiel 2

[0022] In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel eines vervielfachten Chemostats innerhalb der Tropfen in einem Mikrofluidiksystem wird eine Bakterienkulturen enthaltende Tropfensequenz 15 in das System eingeführt und zwecks Inkubation und Beobachtung des Wachstums der Mikroorganismen 16 hin und zurück rezirkuliert (Fig. 2a). Nach einer vorgegebenen Zeit T werden die Tropfen bedarfsgemäss 17 geteilt und ein Teil der Kultur 18 (Fig. 2b) beseitigt. Diese Teilung kann in verschiedenen, im Voraus vorgegebenen oder von den Messergebnissen der Konzentration der Mikroorganismen (gemessen an optischer Dichte, Turbidität, Lumineszenz oder an einem anderen Marker des Wachstums und der Lebendigkeit der Mikroorganismen) abhängigen Verhältnissen durchgeführt werden. Die Häufigkeit der Teilungen und das Volumen der zu beseitigenden Fraktion entscheiden über die Verdünnungsrate D:

$$D = \frac{\ln(1 - F)}{T} \quad (1)$$

wo D die Verdünnungsrate und F die in aufeinanderfolgenden Verdünnungen zu ersetzende Fraktion bedeuten, und T der Zeitraum zwischen den aufeinanderfolgenden Verdünnungen ist. Die nächste Stufe ist die Ergänzung der Tropfen 19 mit einer Portion frischen Nährbodens 20, dessen Volumen dem der beseitigten Zuchtkultur 18 gleich ist (Fig. 2c). Dieser Zyklus kann theoretisch beliebig viele Male wiederholt werden.

Beispiel 3

[0023] In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel der Teilung der Tropfen ist eine hochgenaue Tropfenteilung möglich, worin der Fehler 1% nicht überschreitet und für grosse Tropfen kleiner ist. Ein beispielhaftes Diagramm stellt das Volumen eines 2- μ l-Tropfens nach der Teilung vor. Es ist charakteristisch, dass die Teilung des Tropfens von der vom Operator vorgegebenen Teilung nicht abweicht, und, wie schon erwähnt, dass der relative Fehler zwischen dem gewünschten und dem erzielten Volumen nicht grösser als 1% ist.

Beispiel 4

[0024] In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel der Teilung der Tropfen (Fig. 4) ist es möglich, einen Farbstoff enthaltenden Tropfen zu teilen, und anschliessend einen der neu entstandenen Tropfen mit einem Farbstoff nicht enthaltenden Tropfen oder einem Farbstoff enthaltenden Tropfen so zu vereinigen, dass die Farbstoffkonzentration in demselben Tropfen durch sehr viele Teilungen erhöht oder reduziert werden kann. Ein beispielhaftes Diagramm stellt die Änderung der Farbstoffkonzentration im gegebenen Tropfen (in diesem Fall 1 μ l) infolge deren Teilung und Ergänzung des Tropfenanfangsvolumens mit dem vorgegebenen Fluid vor. Sowohl die bevorzugte Auswirkung der Teilung des Tropfens wie auch das Verfahren zur Tropfenvereinigung haben zur Folge, dass sich die Konzentration innerhalb des Tropfens wesentlich ändert, und zwar nach einem vorher festgelegten, mit der vorgegebenen Tropfenteilung völlig gebundenen Schema. Die bevorzugte Wiederholbarkeit dieses Phänomens, dessen relative Abweichung (zwischen der vom Operator des Mikrofluidiksystems vorgegebenen und der tatsächlich erzielten Konzentration) in der zu beschreibenden Erfindung unter 1% liegt, erweist sich als entscheidend, insbesondere bei präziser Kontrolle der Tropfenzusammensetzung.

Beispiel 5

[0025] In einem anderen bevorzugten Ausführungsbeispiel kann ein System gemäss der Erfindung bei einer langfristigen Züchtung von Mikroorganismen zum Einsatz kommen (Fig. 5), darunter bei der Kultivierung von Bakterien E.coli in Gegenwart von Antibiotika oder anderen das Wachstum von Mikroorganismen beeinflussenden Substanzen. In dem Beispiel, in einer zum System (Fig. 2) analogen Anordnung, wurden langfristig Mikroorganismen bei 6 verschiedenen Konzentrationen von Antibiotikum Tetracyclin kultiviert, wobei jede Konzentration in mindestens drei Tropfen, jeder von denen ein Mikrochemostat war (Fig. 6), geprüft wurde. In gleichen Zeitabständen war das Wachstum von Bakterien in einer spektrophotometrischen Messung mit einem mit dem System integrierten Lichtleiter verfolgt. Unerwartet haben die Erfinder bemerkt, dass es möglich ist, Bakterienwachstumskurven für verschiedene Konzentrationen des Antibiotikums zu bestimmen. Ähnlich unerwartet stellte es sich heraus, dass sich die Kurven durch eine hohe Reproduzierbarkeit auszeichnen.

Beispiel 6

[0026] Ähnlich ist es möglich, dasselbe System zur Kultivierung einschliesslich der Kulturverdünnung (Fig. 7) einzusetzen. In dem dargestellten Beispiel wurde der Tropfen nach einem gewissen Zeitraum des kontinuierlichen Wachstums mit der in dem vorliegenden Antrag beschriebenen Erfindung asymmetrisch geteilt, wodurch 70% des Tropfenvolumens beseitigt und die übriggebliebenen 30% des Anfangstropfens mit einem Tropfen des frischen Nährmediums, mit einem Volumen gleich der beseitigten Portion der Zuchtkultur, vereinigt wurden. Dadurch bekamen die Bakterien neue Quellen von Nährsubstanzen und konnten ihr Wachstum fortsetzen. Unerwartet haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung bemerkt,

es kommt zu keiner unvorteilhaften Kreuzkontamination zwischen den Bakterien enthaltenden Tropfen und den allein das Nährmedium enthaltenden Kontrolltropfen, die keinen nachweisbaren Wachstum von Mikroorganismen zeigten (Fig. 8).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Teilung eines Tropfens an einer mikrofluidischen Kreuzung, umfassend einen Zufuhrkanal, einen ersten Abfuhrkanal mit einem zusätzlichen Kanal und einen zweiten Abfuhrkanal, gekennzeichnet dadurch, dass es die folgenden Etappen umfasst:
 - a. Zuführung des Tropfens (1) an die mikrofluidische Kreuzung (3) durch den Zufuhrkanal (2) mithilfe einer Strömung einer kontinuierlichen Phase durch den Zufuhrkanal (2) sowie den ersten Abfuhrkanal (5) und den zweiten Abfuhrkanal (6),
 - b. Steuerung des Verhältnisses der Flussraten in den Abfuhrkanälen (5, 6) durch Fördern oder Absaugen der kontinuierlichen Phase durch den zusätzlichen Kanal (9), mindestens bis zum Zeitpunkt, wenn der sich im ersten Abfuhrkanal (5) befindende Teil des Tropfens (1) von dem sich im zweiten Abfuhrkanal (6) befindenden Teil des Tropfens abreißt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, dass die Strömung automatisch gesteuert wird, wobei ein Sensor (14) über oder unter der mikrofluidischen Kreuzung (3) angebracht und unmittelbar oder mittelbar mit einem Ventil (8) verbunden ist, über das die Strömung in dem zusätzlichen Kanal (9) kontrolliert wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, gekennzeichnet dadurch, dass der Sensor (14) eine Kamera beinhaltet.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, dass der Zufuhrkanal (2), der erste Abfuhrkanal (5) und der zweite Abfuhrkanal (6) miteinander die Winkel von entsprechend 180°, 90° und 90° bilden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, dass der Zufuhrkanal (2), der erste Abfuhrkanal (5) und der zweite Abfuhrkanal (6) miteinander die Winkel von entsprechend 150°, 60° und 150° bilden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, dass der Zufuhrkanal (2), der erste Abfuhrkanal (5) und der zweite Abfuhrkanal (6) miteinander die Winkel von entsprechend 120°, 120° und 120° bilden.
7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche 1 bis 6, gekennzeichnet dadurch, dass der Tropfen (1) im Volumenverhältnis von 1:999 bis 999:1 geteilt wird.
8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche 1 bis 6, gekennzeichnet dadurch, dass der Tropfen (1) im Volumenverhältnis von 1:99 bis 99:1 geteilt wird.
9. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche 1 bis 6, gekennzeichnet dadurch, dass der Tropfen (1) im Volumenverhältnis von 1:9 bis 9:1 geteilt wird.

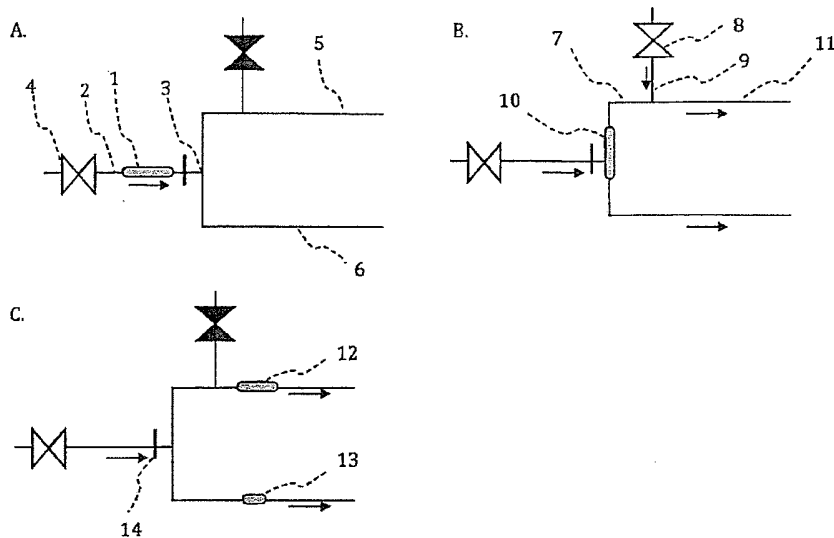


Fig.1

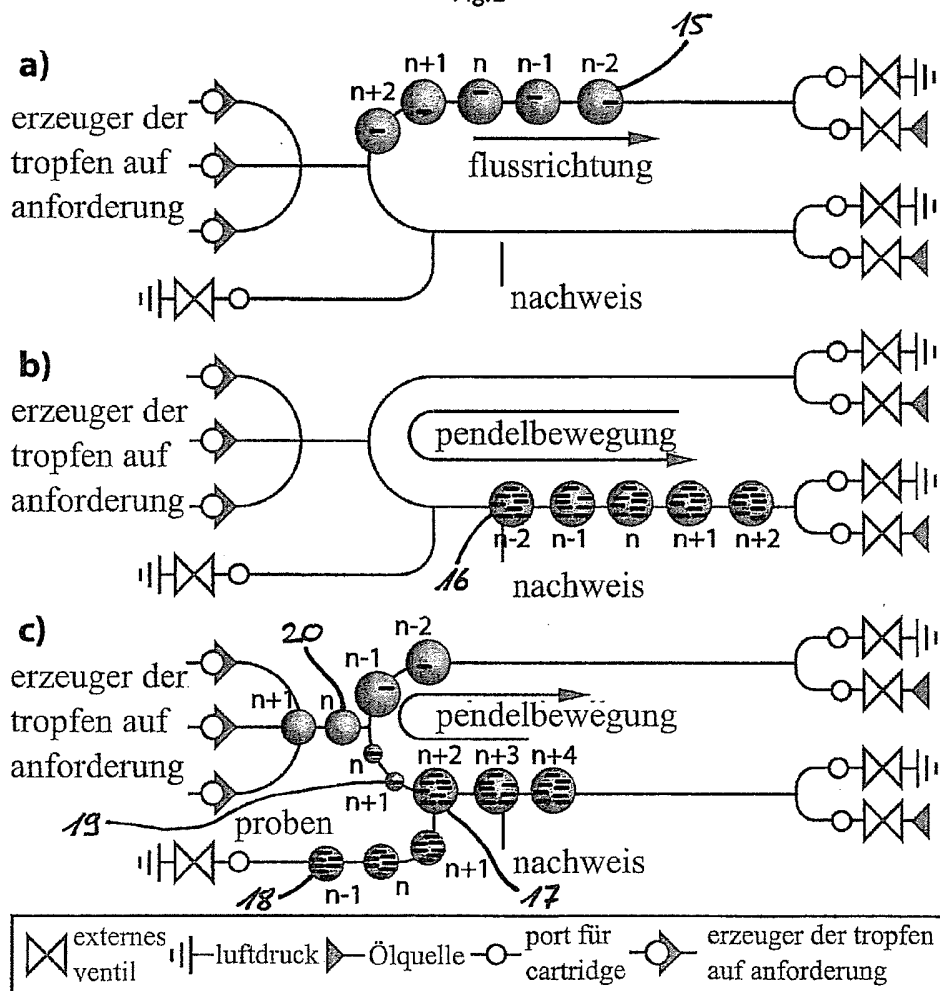


Fig.2

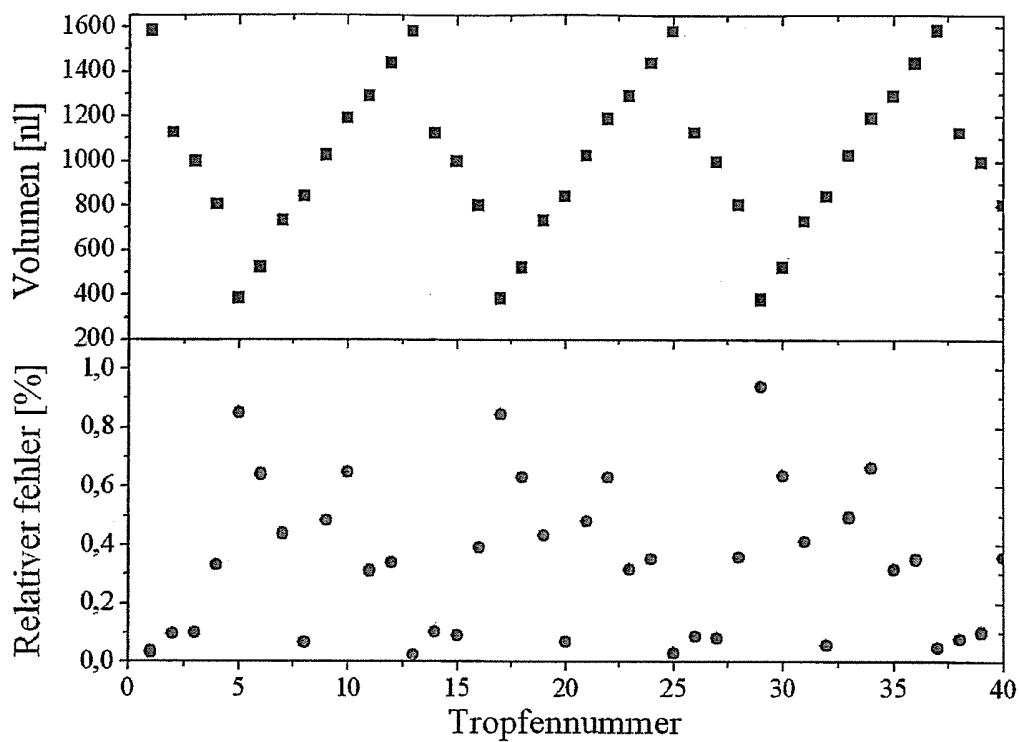


Fig. 3

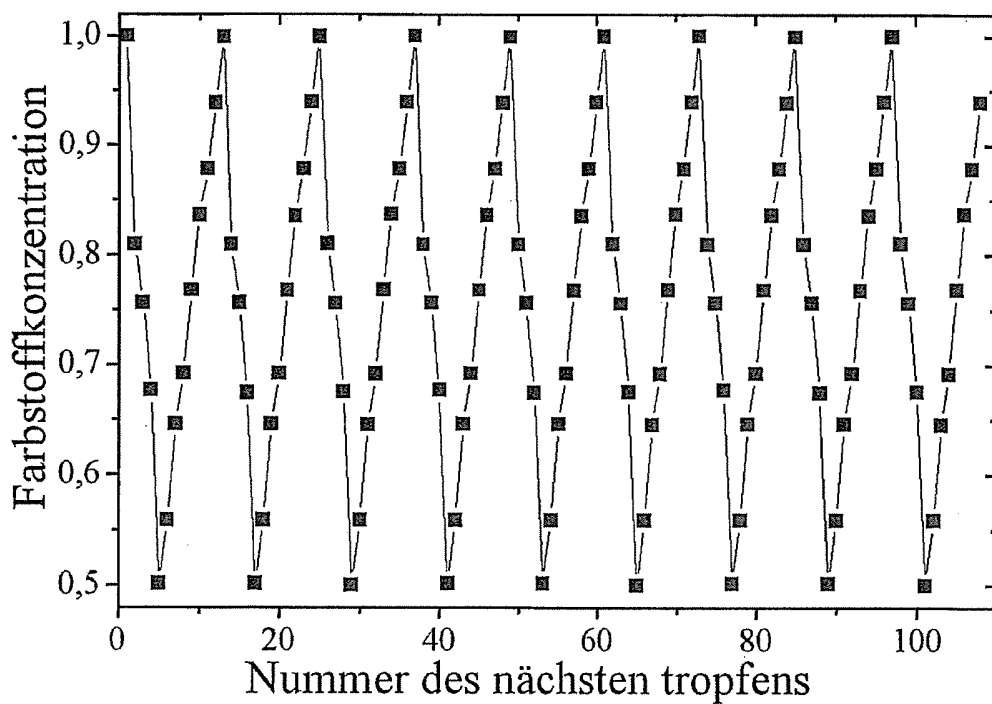


Fig.4

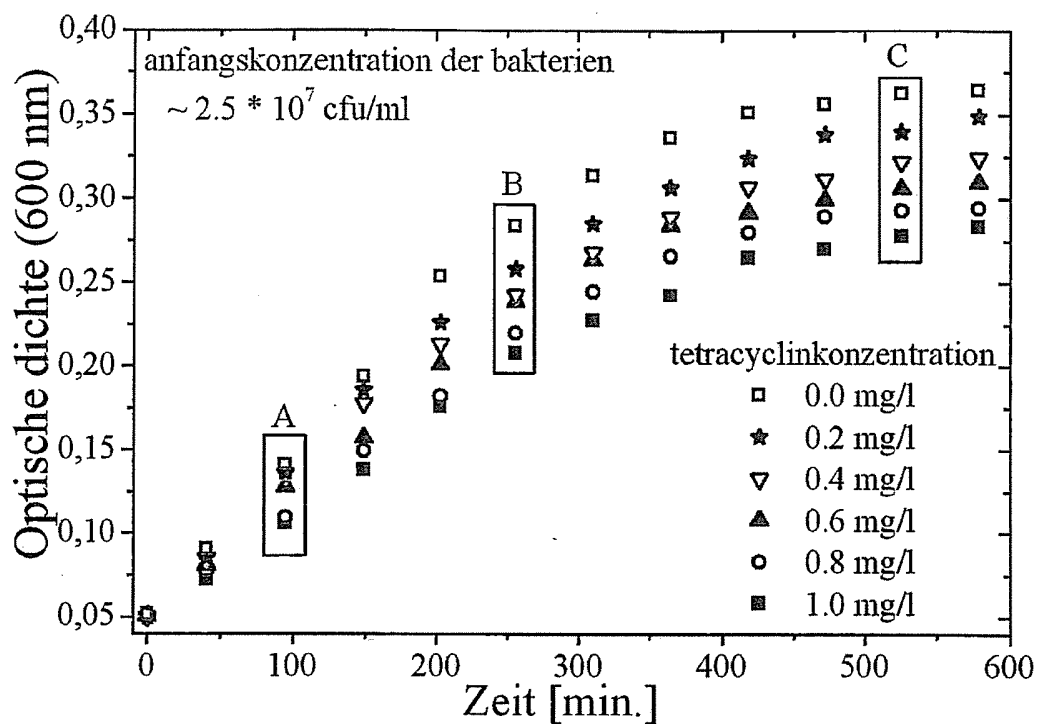


Fig.5

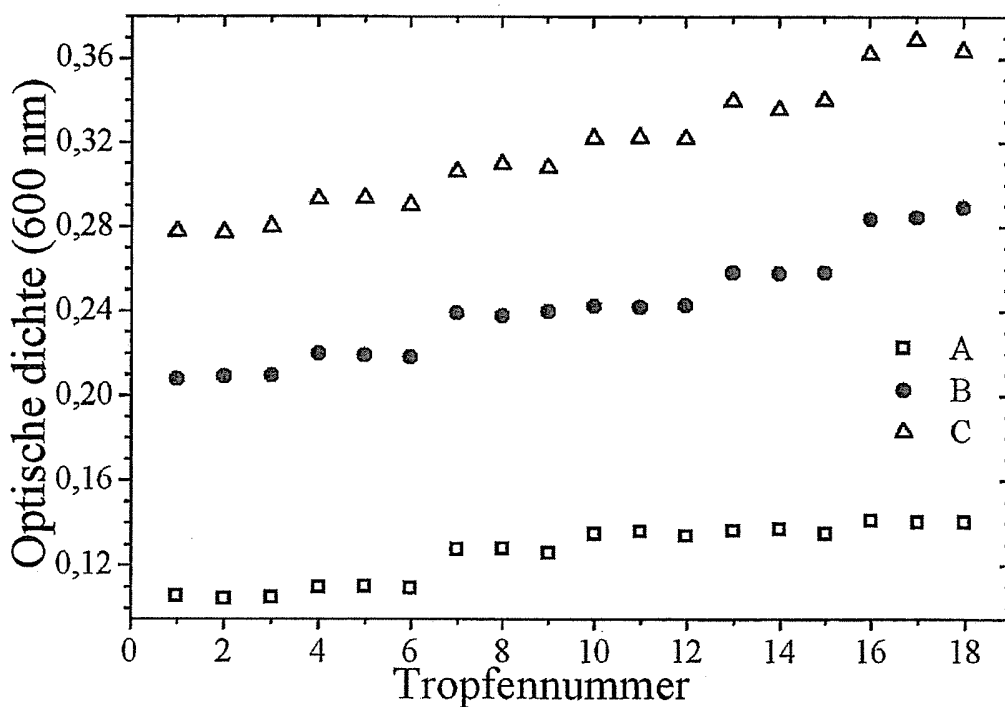


Fig.6

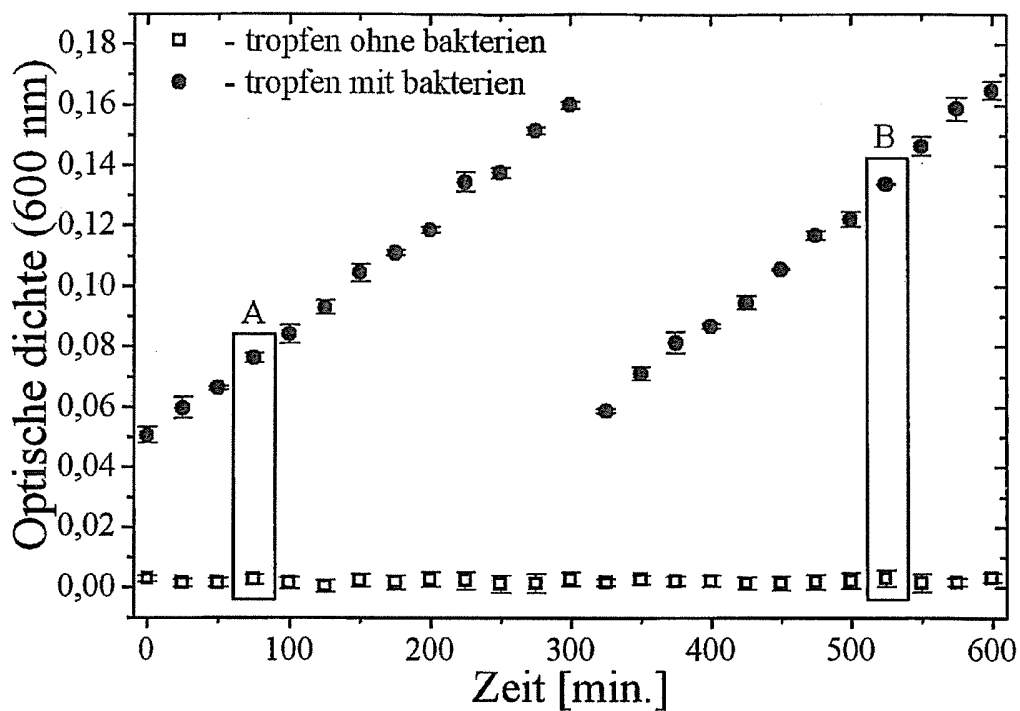


Fig.7

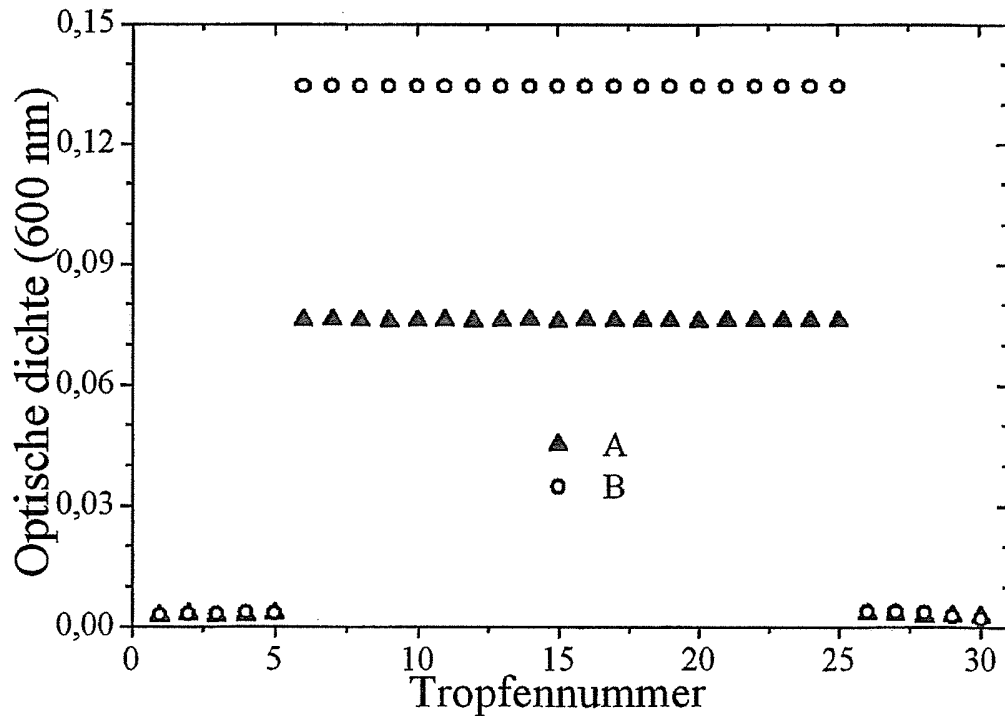


Fig. 8