

# Magnetic Flow Cytometry

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften

(Dr.-Ing.)



der Technischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Michael Helou**

Kiel 2014



1. Gutachter:

Prof. Dr.-Ing. E. Quandt

2. Gutachter:

Prof. Dr. J. McCord

3. Gutachter:

Prof. Dr. C. Selhuber-Unkel

Datum der mündlichen Prüfung:

18.06.2015





## Kurzfassung

In der in-vitro Diagnostik ist Vollblut eine wichtige Informationsquelle für die Therapieentscheidung des Klinikers. Über die Funktionalität und Konzentration der Blutzellen können beispielsweise die Hämostase oder der Immunstatus bewertet werden. Goldstandard für die Einzelzelldetektion ist die Fluoreszenzdurchflusszytometrie, die aufgrund der aufwendigen Probenvorbereitung des optisch opaken Bluts nicht in der Routinediagnostik einsetzbar ist. Miniaturisierte Durchflusszytometer, die auf mikrofluidischen Technologien basieren, versprechen eine einfachere Bedienbarkeit. Jedoch erfordern auch diese Systeme eine aufwendige Probenvorbereitung.

In dieser Arbeit wird ein Ansatz zur nicht-optischen Durchflusszytometrie, direkt in Vollblut, unter Verwendung eines mikrofluidischen Kanalsystems und GMR-Sensoren präsentiert. Das neuartige Konzept eines Durchflusszytometers basiert auf einem rein magnetischen Arbeitsablauf, mit einfachen Lösungen für Zellanreicherung, hintergrundfreie, magnetische Einzelzelldetektion sowie Quantifizierung der Zellepitope.

Die GMR-Sensoren werden mit einem 70 nm dicken, *Pinhole*-freien ALD-Layer passiviert, der vor hochkorrosiven Bedingungen in Vollblut schützt und höchste Sensitivität bei minimalem Abstand von magnetischem Analyt zu Sensor garantiert. Für hohe Wiederfindungsraten der Zellen mit >95% werden eine *in-situ* magnetische Anreicherung und eine *in-situ* magnetophoretische Führung implementiert. Das ferromagnetische *Chevron*-Pattern zur Analytfokussierung durch Magnetophorese erlaubt zusätzlich eine *in-situ* Filtration der ungebundenen, magnetischen Marker auf Grund des kleinen hydrodynamischen Durchmessers gegenüber markierten Zellen. Die mikrostrukturierten GMR-Sensorelemente sind in einer Wheatstone Brücke angeordnet, wodurch ein charakteristisches Signalmuster für jeden Zellevent generiert wird.

Zum Nachweis der Anwendbarkeit des rein magnetischen Arbeitsablaufes wird eine *Time-of-Flight* Signalanalyse bei Messungen in Vollblut durchgeführt und mit den Resultaten eines optischen Durchflusszytometers sowie eines Coulter Counters verglichen. Die Laufzeitinformation ermöglicht eine volumetrische Größenbestimmung der magnetisch markierten Analyte in Vollblut mit einer hohen Auflösung und in Übereinstimmung mit den Referenzmethoden.

Zusammengefasst schafft die magnetische Durchflusszytometrie mit integrierter Präanalytik und *Time-of-Flight* Signalanalyse die Voraussetzung für die Entwicklung eines nicht-optischen und patientennahen Zellfunktionstests für die Routinediagnostik.



## Abstract

For in-vitro diagnostics a highly important source is blood which comprises for instance the functionality and concentration of cells for hemostasis or immune status. Gold standard for clinical single cell analysis is fluorescence flow cytometry, though this method still requires extensive sample preparation of optically opaque blood and thus is not applicable for routine diagnostics. Next generation cytometers based on microfluidic technologies promise to be more cost-effective and simpler to operate, which would allow broad applications of optical flow cytometry for medical diagnostics. However, extensive sample preparation for such miniaturized optical systems is still required.

This thesis addresses an approach to non-optical flow cytometry directly in whole blood, using a simple microfluidic system and low-cost GMR sensors. The envisioned magnetic flow cytometry system addresses a number of key issues for a novel all magnetic workflow solution, such as clogging, cell enrichment, background-free magnetic cell detection, and quantification of immunomagnetic labeling.

The GMR sensors are passivated with pinhole-free 70 nm  $\text{Al}_2\text{O}_3$  deposited by atomic layer deposition to withstand highly corrosive conditions in blood and ensure highest sensitivity with a minimum sensor to analyte distance. *In-situ* magnetic enrichment and *in-situ* magnetophoretic focusing is applied to ensure ~96% recovery rate for potential absolute cell concentration measurements. The ferromagnetic chevron pattern additionally allows *in-situ* filtration of the unbound magnetic markers. The microstructured GMR sensing elements are arranged in a Wheatstone bridge configuration enabling the generation of characteristic signal pattern.

To proof the applicability of the all magnetic workflow, time-of-flight signal analysis is performed and the results with whole undiluted blood are benchmarked to state-of-the-art optical flow cytometer and Coulter counter instruments. The time-of-flight information allows deriving volumetric measurements with unprecedented resolution in blood which matches the results obtained with the reference methods.

In brief, the novel time-of-flight magnetic flow cytometry with integrated pre-analytics is a potential enabler for the development of a non-optical system for routine point-of-care cell function testing.



<b>1. Motivation</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>4</b>
2.1 GMR-Technologie .....	4
2.2 Hysterese und magnetische Anisotropie .....	8
2.3 Atomlagenabscheidung .....	11
2.4 Immunophänotypisierung mit superparamagnetischen Markern.....	13
<b>3. Spin-Valve Biosensoren</b> .....	<b>15</b>
3.1 GMR-Multilagensystem.....	15
3.2 Herstellung und Integration der einzelnen Sensorkomponenten .....	16
3.3 Charakterisierung der GMR-Sensorelemente .....	22
3.4 Messaufbau und digitale Signalerfassung .....	28
<b>4. Analyte</b> .....	<b>30</b>
4.1 Referenzbeads .....	30
4.2 Biologische Zellproben .....	36
<b>5. Integrierter Workflow</b> .....	<b>42</b>
5.1 Methodik .....	42
5.2 Magnetophoretisches Anreicherungsprinzip.....	45
5.3 GMR-Signalmuster .....	47
5.4 Simulation der GMR-Signalantwort .....	51
<b>6. Optimierung des Messsystems zur Einzelzelldetektion</b> .....	<b>54</b>
6.1 GMR-Sensitivität .....	54
6.2 Screening des Permanentmagneten.....	67
6.3 Chipdesign und Sensorgeometrie.....	79
6.4 Magnetische Zellanreicherung .....	91
6.5 Mechanische Zellanreicherung .....	103
6.6 Auswertesoftware.....	109
<b>7. Messergebnisse</b> .....	<b>112</b>
7.1 Charakterisierung des Systems mit Referenzanalyten .....	112
7.2 Optische Korrelation der magnetischen Signalantwort .....	120
7.3 Zellbewegung und Geschwindigkeit bei Variation der Kanalhöhe .....	124
7.4 Magnetische Messung von FaDu-Tumorzellen und CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	130

<b>8. Time-of-Flight Signalanalyse.....</b>	<b>133</b>
8.1 Signalparameter.....	133
8.2 Magnetischer Zelldurchmesser.....	137
8.3 Benchmark von optischem und magnetischem Durchflusszytometer...	142
8.4 Benchmark - Coulter Counter vs. magnetisches Durchflusszytometer .	155
<b>9. Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>162</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>167</b>
<b>Publikationen mit eigener Beteiligung .....</b>	<b>179</b>
<b>Patentanmeldungen.....</b>	<b>181</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>183</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>185</b>

## 1. Motivation

In der medizinischen Diagnostik sind Funktionalität und Konzentration der Blutzellen, als kleinste integrale Bestandteile unseres Körpers, von zentraler Bedeutung. Wie mittlerweile bekannt ist, hat die zelluläre Umgebung einen maßgeblichen Einfluss auf die Zellfunktion [1]. Dies führt zur Notwendigkeit der Entwicklung von präzisen, diagnostischen Messverfahren, die erlauben, Zellfunktionstests so nahe wie möglich an *in-vivo*-Bedingungen auf Einzelzellebene durchzuführen. Dazu ist es erforderlich, die Einzelzelldiagnostik zum Patienten zu bringen, um Probenverfälschungen durch Präanalytik, Stabilisierungen oder lange Transportwege zu umgehen [2], [3]. Der Bedarf eines kompakten, kostengünstigen Instruments, welches den patientennahen Einsatz ermöglicht und gleichzeitig eine verlässliche Diagnostik sicherstellt, steigt zunehmend [4]. Allerdings ist man bisher nur in Krankenhäusern mit Maximalversorgung und unter oftmals hohem apparativem Aufwand in der Lage Zellfunktionsdiagnostik anzubieten.

Goldstandard für die Einzelzelldetektion ist seit vier Jahrzehnten die optische Durchflusszytometrie [3]. Der Durchbruch zur hochspezifischen Analyse auf Einzelzell-Ebene war die Einführung der Fluoreszenz-basierten Durchflusszytometrie von Göhde im Jahr 1968, die zusätzlich zur Streulichtmessung eine Immunophänotypisierung über Fluoreszenzmarker ermöglicht und damit erstmalig Funktionstestung eröffnete [5]. 1972 entwickelten Bonner et al. das FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) System, das die optische Messung mit der Sortierung einer spezifischen Subpopulationen der Zielanalyte über eine fluoreszenzabhängige, elektrische Aufladung kombiniert [6]. Die Basistechnologie der optischen Durchflusszytometrie blieb über die Jahre weitgehend konstant: Die hydrodynamische Fokussierung über einen Hüllstrom (engl. *Sheath Flow*) garantiert die Vereinzelnung der Zellen und die Detektion von Fluoreszenz- und Streulicht gibt Informationen über Größe und Morphologie der Analyte [2]. Heute ermöglichen moderne Durchflusszytometer die simultane Messung von 32 Parametern, bei Durchflussraten von 200,000 Zellen s<sup>-1</sup> durch Mehrfarbenzytometrie [7], wobei die hochkomplexe Auswertung der mehrdimensionalen Daten keine patientennahe (engl. *Point-of-Care*, POC) Anwendung erlaubt.

Dennoch hat diese breit einsetzbare Technologie den Einzug in die klinische Routinediagnostik nicht geschafft und wird ausschließlich von spezialisierten Laboratorien angeboten [8]. Neben den hohen Anschaffungskosten, der Größe der

Geräte und der Notwendigkeit von Fachpersonal zur Bedienung, liegt dies vor allem an der komplexen und zeitaufwendigen Präanalytik [9]. Typische Probenvorbereitungsschritte beinhalten das Entfernen von ungebundenen Fluoreszenzmarkern, für eine hintergrundfreie Messung, die Hämolyse der Erythrozyten (*Red Blood Cells*, RBCs) als Grundlage für die optische Erfassung und zusätzliche Waschschrte zur Entfernung von Zell-Debris der RBCs [10], [11]. Im Zuge des Hämolyseprozesses, bei dem die RBCs, als Träger des roten Blutfarbstoffs Hämoglobin, in der Vollblutprobe, über osmotische Eigenschaften zum Platzen gebracht werden [12], können zusätzlich Verluste der immunologischen Zielanalyte beobachtet werden. Göhde et al. beschreiben einen 15%igen Verlust an  $CD4^+$ -Zellen und selbst Epitopenveränderungen nach Zugabe des Lysepuffers [13]. Greve et al. beschreiben signifikante Zellverluste von 40-50% bei  $CD34^+$ -Stammzellen und  $CD45^+$ -Zellen [14], was eine Quantifizierung der Zielzellkonzentration erschwert.

Miniaturisierte *Lab-on-a-Chip* Durchflusszytometer, bei denen mikrofluidische Technologien die großen Instrumente der konventionellen Geräte ersetzen, eröffnen die Möglichkeit der Realisierung einer POC-Labordiagnostik (engl. *Point-of-Care-Testing*, POCT) zur schnellen Einzelzelldetektion [2], [15]. Mit unterschiedlichen Technologien werden einzelne Komponenten eines optischen Durchflusszytometers, wie das hydrodynamische Fokussierungsprinzip [2], [16], die Zellseparation [17], [18], die fluoreszenzbasierte Zellsortierung [19] und die optische Zelldetektion [20], [21] adressiert. Dennoch konnte noch kein optisches POC-Durchflusszytometer mit integrierter Präanalytik realisiert werden. Die Integration und Miniaturisierung der Fluoreszenz-basierten Durchflusszytometrie wird vor allem erschwert durch: (1) den Hämolyseprozess als Grundlage zur optischen Detektion, (2) die Probenvorbereitung zur Eliminierung von Hintergrund-Fluoreszenz und (3) die *Sheath Flow* Flüssigkeit zur Zellfokussierung. Damit sind die Limitationen der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie bei Großgeräten die gleichen, wie bei miniaturisierten Ansätzen.

Die größte Limitation zur Integration der Probenvorbereitung in ein miniaturisiertes Durchflusszytometer ist allerdings die Fluoreszenzdetektion. Mehrere Gruppen erarbeiteten alternative Detektionsmechanismen zur kontinuierlichen Einzelzell-erfassung mit superparamagnetischen Nanopartikeln, anstelle von Fluoreszenzmarkern [22], [23], [24], wobei die Motivation der Forschungsansätze immer die Realisierung einer Messung mit hohem Durchsatz ist. Allerdings resultiert aus diesen Bedingungen keine Kontrollmöglichkeit des Abstandes von Analyt zu Magnetsensor, was wiederum keine Quantifizierung der Markierung erlaubt [25]. Die einzige Option diesen Nachteil zu überwinden ist eine Minimierung des Mikrofluidikquerschnitts auf Zelldimensionen.



Dieser Ansatz führt jedoch in eine methodische Sackgasse, da unter diesen Bedingungen auf Grund von Verstopfungen, abnehmendem Durchsatz und mechanischem Scherstress für die Blutzellen keine klinischen Proben gemessen werden können. Zudem kann ohne Abstandskontrolle zwischen Sensor und Analyt keine weitere klinische Information als das Abzählen spezifisch markierter Zellen erreicht werden. Zellfunktionsdiagnostik bedingt aber Information zu Epitopenexpression [26], Zellvolumen [27], [28] und Wechselwirkung der Zellen mit der Umgebung [29], [30]. Um die diskutierten *Workflow*-Probleme zu umgehen und die Vorteile einer magnetischen Durchflusszytometrie in komplexen Medien auszunutzen, werden in dieser Arbeit alle wesentlichen präanalytischen Schritte mit Hilfe magnetischer Prinzipien durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit ist, mit einfachen mikrofluidischen Maßnahmen und kostengünstigen Sensoranordnungen Durchflusszytometrie direkt in Vollblut zu betreiben. Magnetoresistive (MR) *Spin-Valve* Sensoren, speziell GMR (*Giant Magnetoresistance*) Sensoren, werden verwendet, um eine spezifische und volumetrische Zelldetektion von superparamagnetisch markierten Analyten zu etablieren.

Ein magnetisches Detektionssystem, basierend auf MR-Biosensoren wurde erstmals im Jahr 1998 von einer Gruppe der Naval Research Laboratories [31] und der NVE Corporation [24] präsentiert. Analog zur optischen Durchflusszytometrie binden die superparamagnetischen Nanopartikel spezifisch über ein Antikörperkonjugat an die Zielzellen [32]. Die Zellen werden, unter Einfluss eines externen Magnetfeldes, über ein sich ausbildendes, magnetisches Dipolfeld detektiert [33]. MR-Biosensoren zeigen dabei einige entscheidende Vorteile im Gegensatz zu den klassischen fluoreszenz-basierten Technologien. Speziell GMR-Sensoren erweisen sich dabei als ausreichend sensitiv, zur *in-situ* Detektion einzelner, superparamagnetisch markierter Zellen [34], [35]. Zur Realisierung einer POC-Applikation lassen sich MR-Sensoren in mikrofluidische Systeme integrieren [34], [36], ohne die Schwierigkeit der präzisen Ausrichtung der optischen Komponenten [4] und ermöglichen die Auswertung eines direkten elektrischen Signals [37]. Die superparamagnetische Markierung eröffnet die Option der *in-situ* Beeinflussung der Analyte im Mikrofluidikkanal über externe Magnetfelder [34]. Dieser Stand der Technik impliziert, dass Immunophänotypisierung mit superparamagnetischen Markern und die magnetische Messung mit GMR-Sensoren vielversprechend für POC-Anwendungen sind, jedoch bislang die Integration eines klinisch relevanten *Workflow* fehlt.

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1 GMR-Technologie

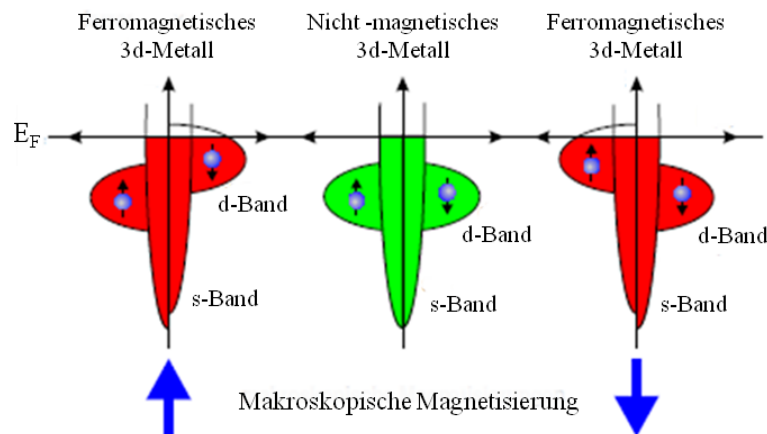
Die Magnetowiderstandseffekte basieren auf der Änderung des elektrischen Widerstands in Abhängigkeit eines äußeren Magnetfeldes [38]. Dabei wird genutzt, dass Elektronen als Ladungsträger in metallischen Festkörpern zusätzlich zu ihren Ladungen auch ein, an ihren Spin gekoppeltes, magnetisches Moment besitzen. Die verschiedenen MR-Effekte, die sich in ihrem physikalischen Wirkprinzip unterscheiden, lassen sich unter dem Sammelbegriff XMR (engl. *X = any*) zusammenfassen. Zum quantitativen Vergleich der Effekte werden die prozentualen Widerstandsänderungen der Systeme errechnet [39].

Bereits 1856 entdeckte W. Thomson [40] den Anisotropen Magnetowiderstand (engl. *Anisotropic Magnetoresistance*, AMR) mit einer maximalen Widerstandsänderung von 5% [41]. Die Entdeckung des Riesenmagnetowiderstands (engl. *Giant Magnetoresistance*, GMR) von Peter Grünberg [42] und Albert Fert [43] im Jahr 1988, mit Widerstandsänderungen von 10-50%, bei einer Temperatur von 4.2 K, wurde 2007 mit dem Nobelpreis honoriert. Aufbauend auf den Forschungsergebnissen von Fert und Grünberg konnten im IBM Almanden Research Center 1991, unter der Leitung von S. Parkin, Widerstandsänderungen von bis zu 65% bei Raumtemperatur mit gesputterten Multilagen erreicht werden, wodurch MR-Effekte erstmals kommerziell in Sensorapplikationen eingesetzt werden konnten [44]. Der kommerzielle Erfolg begründete das neue Forschungsgebiet der Magnetoelektronik bzw. Spintronik, bei dem das magnetische Moment des Spins als Informationsträger genutzt wird [45], [46]. Bekannteste Anwendung des GMR ist die Nutzung als Lesekopf der Speichereinheiten für Festplatten [47].

#### Physikalisches Prinzip des GMR-Effekts

Der GMR-Effekt tritt in Systemen mit alternierenden ferromagnetischen (FM) und nichtmagnetischen (NM), elektrisch leitenden Lagen, mit Schichtdicken von wenigen Nanometern auf [38]. Baibich et al. beobachteten eine Widerstandsänderung in Abhängigkeit der Magnetisierungsrichtungen der ferromagnetischen Schichten an Fe/Cr/Fe Multilagen [43]. Parkin et al. nutzte ein Co/Cu/Co Schichtsystem, um die

Widerstandsänderung zwischen paralleler (P) und antiparalleler (AP) Magnetisierung der ferromagnetischen Schichten bei Raumtemperatur abzubilden [48]. Die relative Widerstandsänderung zwischen den beiden Konfigurationen kann mikroskopisch anhand der spinabhängigen Streuung der stromtragenden 4s-Elektronen der ferromagnetischen Materialien an den Grenzflächen der FM- und NM-Schichten erklärt werden.

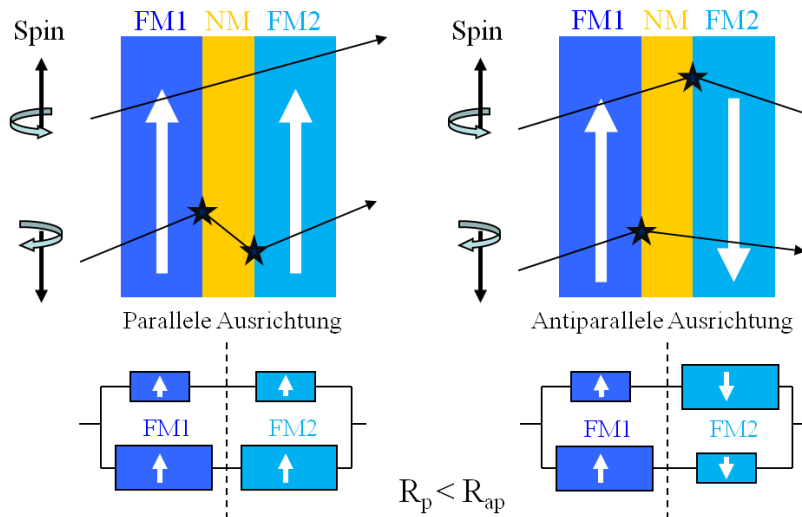


**Abbildung 2.1** Schematische Darstellung der Aufspaltung der 3d- und 4s-Bänder für ein nichtmagnetisches Material und zwei ferromagnetische Übergangsmetalle in Abhängigkeit der makroskopischen Magnetisierung, nach [45].

In einem Übergangsmetall (Fe, Co, Ni) wird der elektrische Strom hauptsächlich von den 4s-Elektronen getragen, wohingegen der spezifische Widerstand weitgehend von der Streuung dieser Elektronen in die freien Zustände des d-Bandes an der Fermi-Kante bestimmt wird. Je höher die 3d-Zustandsdichte, desto höher ist die Streuwahrscheinlichkeit der 4s-Elektronen in die 3d-Zustände, und desto größer ist der spezifische Widerstand [39]. Die schematische Darstellung des Bändermodells für zwei FM-Übergangsmetalle in Abbildung 2.1 zeigt eine spinabhängige Aufspaltung der Energiezustände auf Grund der Austauschwechselwirkung, was zu unterschiedlichen Streuwahrscheinlichkeiten führt. Die d-Bänder der Majoritätsladungsträger der FM-Schicht (parallele Ausrichtung des Spins der Elektronen zur makroskopischen Magnetisierung der FM-Schicht) sowie der NM-Schicht sind voll besetzt und liegen unter der Fermi Energie ( $E_F$ ). Im Gegensatz dazu ist das d-Band der Minoritätselektronen (Spin antiparallel zur makroskopischen Magnetisierung) nicht vollständig besetzt, da  $E_F$  innerhalb des Bandes liegt, was in einer höheren Anzahl an Streuzentren und einer Erhöhung des Widerstands resultiert [45], [49].

Die spinabhängige Streuung in FM-Materialien ist ein bekanntes quantenmechanisches Phänomen, das vereinfacht mit dem Zweistrommodell nach Mott dargestellt werden

kann [50]. Die Elektronen werden dabei entsprechend ihrem Spin in zwei separate, parallel geschaltete Kanäle aufgetrennt [38]. Abbildung 2.2 veranschaulicht die Streuprozesse in einem einfachen Schichtsystem aus zwei FM-Lagen, getrennt durch eine NM-Zwischenschicht (*Spacer*) über das korrespondierende Ersatzschaltbild der Widerstände.



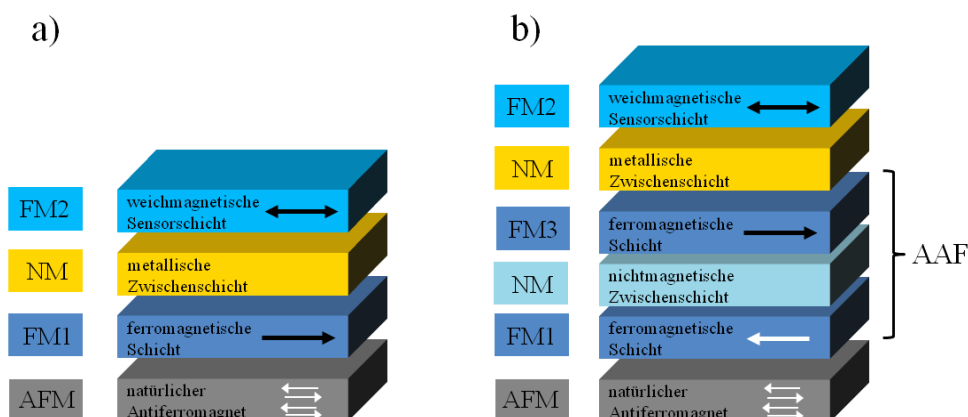
**Abbildung 2.2** Zweistrommodell nach Mott [50] zur schematischen Darstellung der spinabhängigen Streuprozesse in einem GMR-Schichtsystem, bei paralleler (links) und antiparalleler (rechts) Ausrichtung der Magnetisierungsrichtungen der FM-Lagen.

Im Gegensatz zu den Majoritätsladungsträgern, die sich weitgehend ungehindert zwischen FM und NM-Layer bewegen, werden die Minoritätsladungsträger an den Grenzflächen gestreut, was zu einer Erhöhung der Widerstände führt. Der Gesamtwiderstand des Schichtsystems bei antiparalleler Ausrichtung  $R_{ap}$  ist höher als der Widerstand bei paralleler Ausrichtung  $R_p$  [45]. Die Betrachtung der mittleren freien Weglänge (engl. *Mean Free Path*,  $l_{mfp}$ ) zeigt eine kurze  $l_{mfp}$  für Minoritätsladungsträger und eine lange  $l_{mfp}$  für Majoritätsladungsträger [38].

### GMR für Sensoranordnungen

Zur industriellen Nutzung des GMR werden häufig sogenannte *Spin-Valve* Systeme verwendet [25]. Abbildung 2.3 a zeigt eine einfache *Spin-Valve* Anordnung mit zwei FM-Lagen, getrennt von einer NM-Schicht, die mit einer typischen Dicke von 2-3 nm, eine Kopplung der zwei ferromagnetischen Schichten verhindert. Eine antiparallele Magnetisierung der zwei FM-Layer wird dabei über eine Kopplung der FM1-Schicht an einen Antiferromagneten (AFM) im Magnetfeld erreicht. Diese Austausch-Anisotropie (*Exchange-Bias*) wurde bereits 1956 von Meiklejohn und Bean an einem System aus

Kobalt Nanopartikeln entdeckt [51]. Die Aufnahme der Hysteresekennlinie der gekoppelten FM1-Schicht zeigt eine Verschiebung auf der Feldachse um das angelegte Austauschfeld  $H_e$  [39]. Die FM1-Schicht ist dadurch widerstandsfähig gegen Ummagnetisierung und wird auch als hartmagnetische Schicht (engl. *Hard-Layer*), oder Referenzschicht bezeichnet. Die FM2-Lage zeigt weichmagnetisches Verhalten, wodurch die Magnetisierungsrichtung bereits durch niedrige, externe Magnetfelder verändert werden kann. Da sie durch den *Spacer* von der FM1-Schicht entkoppelt ist, wird sie auch als freie Schicht (engl. *Free-Layer*) bezeichnet. Der *Field-Cooling* Prozess zur Ankopplung der FM1-Lage an den natürlichen Antiferromagneten wird in Kapitel 3.2 im Zuge der Herstellung der GMR-Sensoren genauer beschrieben. Für die Anwendung in Sensoren haben sich Legierungen aus Fe und Co als ferromagnetische Schichten durchgesetzt. Speziell Co besitzt eine hohe Spinpolarisation und sorgt deshalb für hohe Magnetowiderstandswerte. Die nichtmagnetische Zwischenschicht besteht üblicherweise aus Cu, Ag oder Au, wobei das Leitungsband der Zwischenschicht dem Leitungsband im ferromagnetischen Material angepasst sein muss [45], [49].



**Abbildung 2.3** Schematische Darstellung eines *Spin-Valve* Schichtsystems (a) sowie einer *Spin-Valve* Anordnung mit künstlichem Antiferromagneten (b).

Ein wesentlicher Vorteil der *Spin-Valve* Anordnung für die Messung superparamagnetisch markierter Analyte ergibt sich aus der frei beweglichen weichmagnetischen Schicht, die sich, entkoppelt vom *Hard-Layer*, parallel und antiparallel dazu einstellen lässt [49]. Damit kann das Dipolfeld der Analyte bei einer magnetoresistiven Einzelzelledetektion mit definiertem Abstand zur Substratoberfläche vor und nach dem GMR-Sensor detektiert werden.

Die exakte Widerstandsänderung des *Spin-Valves* berechnet sich mit [52]

$$R(H) = R_0 + \frac{\Delta R_{max}}{2} * \sin \theta \quad (2.1)$$

wobei  $R_0$  den Widerstand des Systems ohne externes Magnetfeld,  $\Delta R_{max}$  die Widerstandsänderung der gesättigten Zustände und  $\theta$  den Winkel zwischen FM1 und FM2 angeben.

Als Weiterentwicklung des einfachen *Spin-Valves* wird zur Erhöhung der Härte der Referenzschicht ein Multilagensystem mit künstlichem Antiferromagneten (engl. *Artificial Antiferromagnet*, AAF) eingeführt (Abbildung 2.3 b). Wie bisher zwingt der natürliche Antiferromagnet der ihm angrenzenden FM1-Schicht eine unidirektionale Anisotropie auf. Eine zusätzliche ferromagnetische Schicht (FM3) wird über eine antiparallele Zwischenschichtkopplung an die FM1-Lage gekoppelt. Die FM3-Lage bildet das Gegenstück zum *Free-Layer*. Nach außen hin wirkt der AAF wie eine Einzelschicht mit äußerst geringem magnetischem Moment und kann deshalb von einem äußeren Magnetfeld nur sehr schwer verändert werden.

Die von Grünberg et al. 1986 entdeckte Zwischenschicht-Austauschkopplung tritt bei zwei ferromagnetischen Schichten auf, die durch eine dünne nichtmagnetische Schicht getrennt werden [53]. Die Kopplungsstärke und Ausrichtung der FM-Lagen zueinander steht in oszillatorischer Abhängigkeit zur Dicke der Zwischenschicht [44]. Mittlerweile existieren mehrere Modelle und Ansätze, die den oszillierenden Charakter der Zwischenschichtkopplung beschreiben. Das bekannteste ist wohl das RKKY-Modell, das von Ruderman und Kittel [54] eingeführt und von Kasuya und Yoshida [55] erweitert wurde. Das Modell beschreibt den indirekten Austausch zwischen den lokalisierten magnetischen Momenten der Atome eines Metalls. Die Kopplung der magnetischen Momente erfolgt dabei über die Polarisation des Spins der Leitungselektronen der nichtmagnetischen Zwischenschicht.

### 2.2 Hysterese und magnetische Anisotropie

Zum tieferen Verständnis der Abhängigkeit der Magnetisierbarkeit eines *Spin-Valves* von Anisotropien und Kopplungen im Vielschichtsystem wird zunächst das Verhalten eines einfachen, ferromagnetischen Materials diskutiert. Physikalisch betrachtet besteht die spontane Magnetisierung von ferromagnetischen Metallen aus Domänen, den Weisschen Bezirken ( $0.001-0.1 \text{ mm}^3$ ), die durch so genannte Bloch-Wände getrennt

sind. In diesen Wänden kann sich die Magnetisierung um  $90^\circ$  oder auch  $180^\circ$  drehen. In den Bezirken sind die Elektronenspins durch Austauschkopplung in bestimmte Richtungen ausgerichtet, die von Bezirk zu Bezirk variieren können. Ummagnetisierungsvorgänge des Materials durch äußere Magnetfelder führen zu Verschiebungen der Blochwände und sogenannten Blochsprüngen, die Ursache der ferromagnetischen Hysterese sind [56].

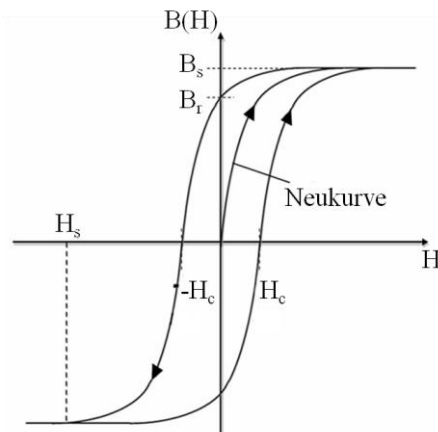


Abbildung 2.4 Hysterese Kennlinie eines ferromagnetischen Materials.

Abbildung 2.4 zeigt die typische Hysteresekurve eines ferromagnetischen Materials, die durch den magnetischen Fluss  $B$  als Funktion des äußeren Magnetfeldes  $H$  beschrieben wird. Ausgehend von einem Magnetwerkstoff im unmagnetisierten Zustand ergibt sich bei Erhöhung des externen Magnetfeldes  $H$  die sogenannte Neukurve. Ab einem bestimmten Magnetfeld  $H_s$  geht die Kurve in Sättigung  $B_s$ . Auf Grund der irreversiblen Verschiebungen der Blochwände bewegt sich die Kurve bei Abnahme des externen Magnetfeldes nicht entlang der Neukurve zurück. Liegt kein Magnetfeld mehr an, bleibt eine Magnetisierung bzw. eine magnetische Flussdichte zurück, die sogenannte magnetische Remanenz  $B_R$ . Erst mit weiterer Abnahme des äußeren Feldes um die Koerzitivfeldstärke  $H_c$  verschwindet die Magnetisierung [56], [57]. Bei Anlegen eines externen Magnetfeldes zeigt der *Free-Layer* der *Spin-Valve*-Konfiguration hysteresisches Verhalten.

### Magnetische Anisotropie

Die natürliche Magnetisierungsrichtung  $M$  innerhalb einer ferromagnetischen oder antiferromagnetischen Domäne liegt in Abwesenheit eines externen Feldes entlang einer Vorzugsrichtung, der sogenannten leichten Richtung (engl. *Easy Axis*) [58]. Die Anisotropieenergie  $E_k$  beschreibt die Energie, die aufgebracht werden muss, um die

## 2 Theoretische Grundlagen

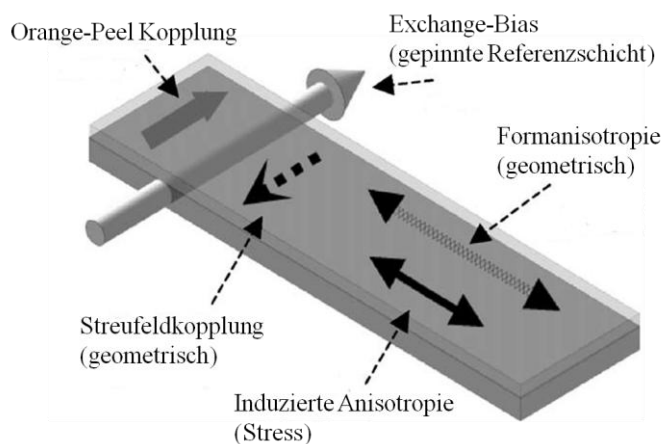
Magnetisierung aus der leichten Richtung in die magnetisch harte Richtung (engl. *Hard Axis*) zu drehen, wobei  $\theta$  der Winkel zwischen  $M$  und der Vorzugsrichtung und  $K_u$  die Anisotropiekonstante sind, abhängig von Material und Kristallstruktur der Probe [59].

$$E_k = K_u \sin^2 \theta \quad (2.2)$$

Das Anisotropiefeld  $H_k$  ist definiert als das äußere Feld, dass angelegt werden muss, um die Magnetisierung eines uniaxialen Kristalls entlang der harten Richtung abzusättigen und wird beschrieben durch

$$H_k = \frac{2K_u}{\mu_0 M_s} \quad (2.3)$$

wobei  $M_s$  die Sättigungsmagnetisierung und  $\mu_0$  die Permeabilitätskonstante im Vakuum sind [59]. Anisotropien erschweren einerseits die Drehprozesse und wirken indirekt auf die Beweglichkeit der Blochwände [56]. Das Anisotropiefeld  $H_k$  dient neben dem GMR-Effekt (vgl. Kapitel 2.1) als Maß für die Sensitivität eines GMR-Schichtstapels.



**Abbildung 2.5** Schematische Darstellung der magnetischen Kopplungen eines GMR-*Spin-Valve* Schichtsystems, nach [60].

Abbildung 2.5 zeigt eine schematische Darstellung der zusätzlichen Kopplungen, die das Schaltverhalten eines *Spin-Valves* beeinflussen können. Die Austauschkopplung (*Exchange-Bias*) beschreibt die feste Ausrichtung der ferromagnetischen Referenzschicht an den natürlichen Antiferromagneten (vgl. Kapitel 2.1). Parallel zur Magnetisierung der Referenzschicht wirkt die Orange-Peel-Kopplung (auch: Néel-Kopplung), die eine minimale Verschiebung der Hysteresekurve aus dem magnetischen



Nullfeld in negative X-Richtung zur Folge hat. Die magnetostatische Kopplung beruht auf der Oberflächenrauigkeit an den Grenzflächen der FM und NM Schichten und bewirkt ein Übersprechen von Referenzschicht zu Messschicht [45]. Bei sehr kleinen Bauteilen kommt es zum Schließen des magnetischen Streuflusses der Probenränder über die angrenzenden Schichten, resultierend in der sogenannten Streufeld-Kopplung, die antiparallel zur Neel-Kopplung wirkt. Bei *Spin-Valve* Systemen mit künstlichem Antiferromagneten ist der Effekt allerdings vernachlässigbar klein [57].

Die Formanisotropie hat ihre Ursache in der Dipol-Dipol Wechselwirkung und kann aus dem Entmagnetisierungsfeld  $H_d$  hergeleitet werden, das sich auf Grund der Ladungsverteilung auf der Oberfläche eines magnetisierten Körpers bildet. Das lokale Feld  $H_d$  stellt eine zusätzliche Quelle des magnetischen Feldes dar und ist auf Grund der Abhängigkeit von der Oberflächenform, nicht durch intrinsische Eigenschaften des Materials definiert [59]. Zusätzlich können durch magnetfeldinduzierte bzw. spannungsinduzierte Anisotropien bestimmte Vorzugsrichtungen eingestellt werden [56]. Die magnetfeldinduzierte Anisotropie, als schwächste Form der Anisotropie, wird dabei durch einen *Annealing*-Prozess im gerichteten externen Magnetfeld generiert. Amorphe und polykristalline Materialien bilden eine solche uniaxiale Anisotropie aus, durch Bildung von Atompaaaren die sich im externen Feld energetisch günstig ausrichten. Der Temperschnitt erhöht dabei die Beweglichkeit der Atome [59].

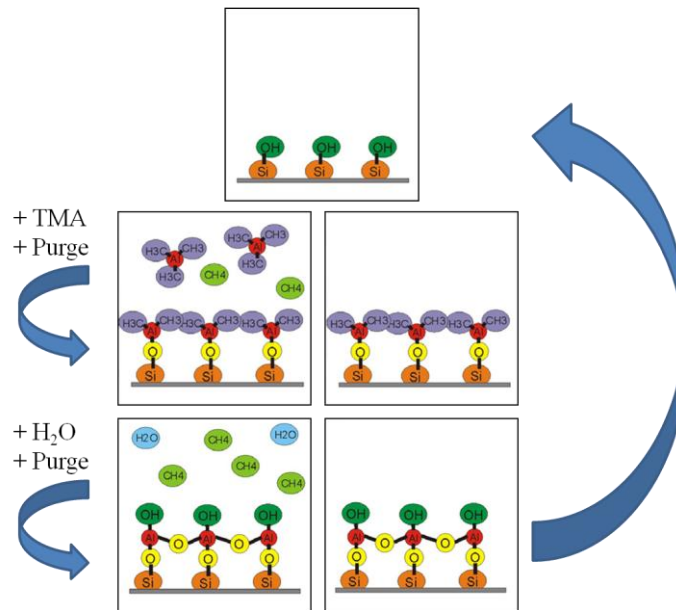
### 2.3 Atomlagenabscheidung

Bei der Atomlagenabscheidung (engl. *Atomic Layer Deposition*, ALD) handelt es sich um ein modifiziertes CVD-Verfahren (*Chemical Vapour Deposition*) zur Herstellung dünner Schichten. Wesentliches Merkmal der ALD ist der charakteristische, selbstlimitierende Wachstumsmechanismus, der eine präzise Kontrolle der Schichtdicken im Angström bzw. Monolagenlevel ermöglicht und zu homogener, winkelgetreuer Bedeckung selbst bei komplex strukturierten Substraten mit hohem Aspektverhältnis führt [61].

Das Verfahren der Atomlagenabscheidung wurde bereits im Jahr 1977 von T. Suntola unter dem Namen Atomlagenepitaxie (eng. *Atomic Layer Epitaxy*, ALE) patentiert [62]. Ursprüngliche Motivation für die Entwicklung des ALD Prozesses war die Abscheidung von polykristallinem ZnS:Mn und amorphen  $Al_2O_3$ -Passivierungsschichten zur Herstellung von elektrolumineszierenden, dünnen Schichten für Flachbild Displays (*Thin Film Electroluminescent Flat Panel Displays*) [63] [64]. Mitte der 90er Jahre, mit

## 2 Theoretische Grundlagen

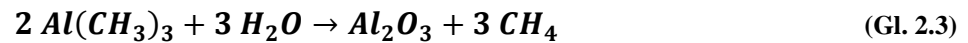
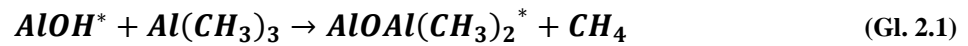
steigendem Interesse an Silizium-basierten mikroelektronischen Bauteilen, erlebte das ALD-Verfahren eine Renaissance als isotropes Dünnschicht Abscheidungsverfahren mit dem größten Potential die kontinuierlich schrumpfenden Bauteilgrößen, bei gleichzeitigem Anstieg der Aspektverhältnisse auf den integrierten Schaltkreisen flächendeckend homogen zu beschichten [65]. Der größte Nachteil des ALD-Prozesses, die geringe Abscheiderate, wird durch die Anforderung der geringen Schichtdicken von wenigen Nanometern kompensiert [63].



**Abbildung 2.6** ALD-Prozess schematisch am Beispiel von  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , nach [66]. Die Reaktanden TMA (Trimethylaluminium) und  $\text{H}_2\text{O}$  werden nacheinander zyklisch in die Reaktionskammer eingeleitet, wobei nach jedem Einzelschritt ein Spülschritt mit Inertgas zwischengeschaltet ist.

Im Unterschied zu herkömmlichen CVD-Verfahren werden die gasförmigen Ausgangsstoffe (engl. *Precursor*) zyklisch nacheinander in die Reaktionskammer eingelassen. Zwischen den Gaseinlässen der *Precursor* wird die Reaktionskammer mit einem Inertgas gespült. Dadurch sollen Teilreaktionen klar voneinander getrennt und auf die Oberfläche begrenzt werden. Ein Wachstumszyklus besteht so im Normalfall aus vier Schritten, wobei pro Einlass eines Reaktanden und Säuberung der Kammer eine Benetzung des Substrats mit einer Monolage erreicht wird [67]. Abbildung 2.6 zeigt die schematische Darstellung eines ALD-Prozesses am Beispiel der Abscheidung von  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , die auf Grund von sehr effizienten und selbstlimitierenden Oberflächenreaktionen als ALD-Modellsystem gilt. Gleichung 2.3 beschreibt den Reaktionsmechanismus der  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -ALD mit den für diesen Prozess am häufigsten verwendeten *Precursors*, Trimethylaluminium (TMA) und Wasser, separiert in zwei

selbstlimitierende Teilreaktionen (Gleichungen 2.1, 2.2), wobei der Asterisk jeweils das an der Oberfläche gebundene Molekül kennzeichnet [61].

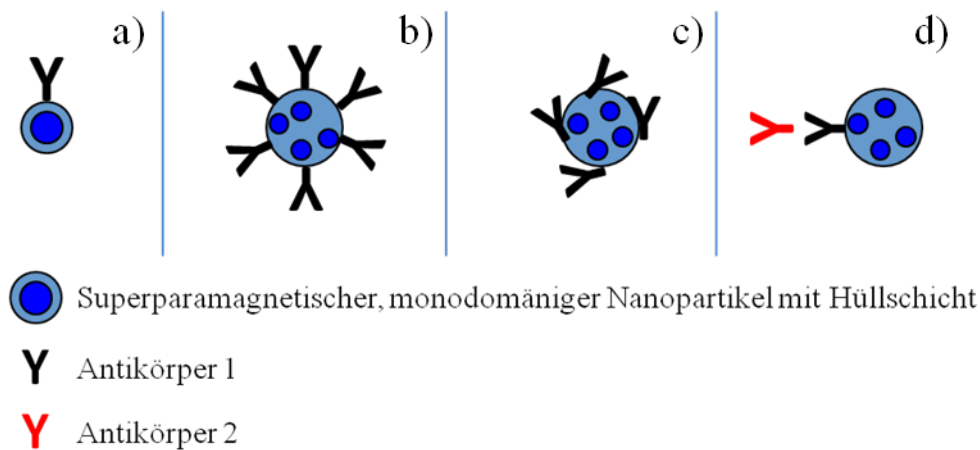


Im ersten Teilschritt nach Einlass des TMA-*Precursors* bildet sich durch Chemisorption eine Dimethylaluminiumschicht (DMA) auf der Substratoberfläche (vgl. Gl. 2.1). Ein Evakuierungsschritt mit Inertgas entfernt überschüssiges TMA-Gas und Methan Reaktionsprodukte. Die Zugabe von H<sub>2</sub>O im zweiten Reaktionsprozess bewirkt eine Hydrolyse des DMA und Ausbildung einer Monolage von Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [67]. Durch eine sich wiederholende sequentielle Ausführung der vier Teilprozesse wird ein homogenes Schichtwachstum erreicht. Typische Abscheideraten einer Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ALD auf Si-Substraten liegen bei 1.1-1.2 Å pro Zyklus bei Reaktionstemperaturen von 177°C [68], [69], [70].

## 2.4 Immunophänotypisierung mit superparamagnetischen Markern

Die magnetoresistive Messung einer Zellpopulation aus einer Blutprobe erfordert eine spezifische Markierung der Zielzellen mit Antikörpern, die an superparamagnetischen Nanopartikeln kovalent gebunden sind. Ferromagnetisches Material, wie Magnetit oder Maghemit, mit einer sehr geringen Partikelgröße (~20 nm bei Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, [32]) bildet energetisch bedingt nur einen Weisschen Bezirk aus und verhält sich superparamagnetisch. Bereits bei Raumtemperatur übersteigt die thermische Energie die Anisotropieenergie und bewirkt die Ausrichtung der Magnetisierung der monodomänen Strukturen in ihre energetisch günstigere Lage [71]. Liegt kein externes Magnetfeld an, ist die magnetische Remanenz superparamagnetischer Materialien auf Grund dieser thermischen Fluktuation, nahezu Null. Unter Einfluss eines Magnetfeldes richten sich die Monodomänen geschlossen aus und verhalten sich ferromagnetisch [72]. Der superparamagnetische Charakter der Marker ist dabei elementar für die Anwendung eines magnetischen *Workflows* zur Einzelzelldetektion. Die Steuerung der magnetischen Eigenschaften der Nanopartikel mit einem externen Magnetfeld ermöglicht einen aggregationsfreien Inkubationsprozess sowie eine magnetische Einzelzelldetektion. Die Referenz [71] gibt einen ausführlichen Überblick über Fabrikation und klinische Applikationen von magnetischen Nanopartikeln.

Analog zur Fluoreszenzdurchflusszytometrie erfolgt die spezifische Kopplung der Nanopartikel über eine Antikörper-Antigen Bindung. Die hohe Bindungsaffinität ist die Summe vieler, relativ schwacher, nicht-kovalenter Kräfte, wie hydrophober Wechselwirkung, Wasserstoff-Brücken, Van-der-Waals-Kräfte und ionischen Bindungsanteilen. Die an einen superparamagnetischen Nanopartikel kovalent gebundenen Antikörper binden mit den Antigen-Bindungsstellen an die komplementären Antigene der Zelle oder Epitope. Im Idealfall liegt ein sterisch gerichteter Antikörperkomplex vor, der an multivalente Antigene bindet wodurch sich die gesamte Bindungsstärke, die sogenannte Avidität, sowie die Bindungskinetik deutlich erhöhen [73]. Abbildung 2.7 zeigt eine Auswahl an mono- und multidomänen magnetischen Markern mit unterschiedlich kovalent gebundenen Antikörper und Bindungsstrategien kommerzieller Anbieter.



**Abbildung 2.7** Schematische Darstellung von immunomagnetischen Markervarianten. Marker für Einschnittmarkierung: Monodomäniger Nanomagnet mit gerichtetem Antikörper (a), multidomänige Nanopartikel mit gerichtetem (b) oder stochastischer (c) Antikörperbedeckung. Alternative Zweischnittkopplung: Magnetischer Marker mit sekundärem Antikörper (d) erkennt primären Antikörper der an der Zielzelle bindet.

### 3. Spin-Valve Biosensoren

Der gesamte Fertigungsprozess der GMR-Demonstratoren wird im Reinraum bei Siemens abgebildet. Die lithographische Herstellung der Sensoren, die Fabrikation der Mikrofluidik und der Großteil der Einzelkomponenten des Messaufbaus wurden im Zuge meiner Diplomarbeit etabliert und optimiert [74]. Die Sensorcharakterisierung wird direkt am Laboraufbau zur Einzelzellmessung durchgeführt.

#### 3.1 GMR-Multilagensystem

Ein *Spin-Valve* System mit künstlichem Antiferromagneten, das Ende der 90er Jahre als Drehfeldsensor mit Fokus auf eine lineare Kennlinie bei Abdeckung eines großen Magnetfeldbereichs in der Zentralforschung von Siemens entwickelt wurde, wird für die Biosensorik adaptiert. Abbildung 3.1 zeigt eine Gegenüberstellung der exakten Schichtkonfiguration und der prinzipiellen Anordnung eines *Spin-Valve* (vgl. Kapitel 2.1).

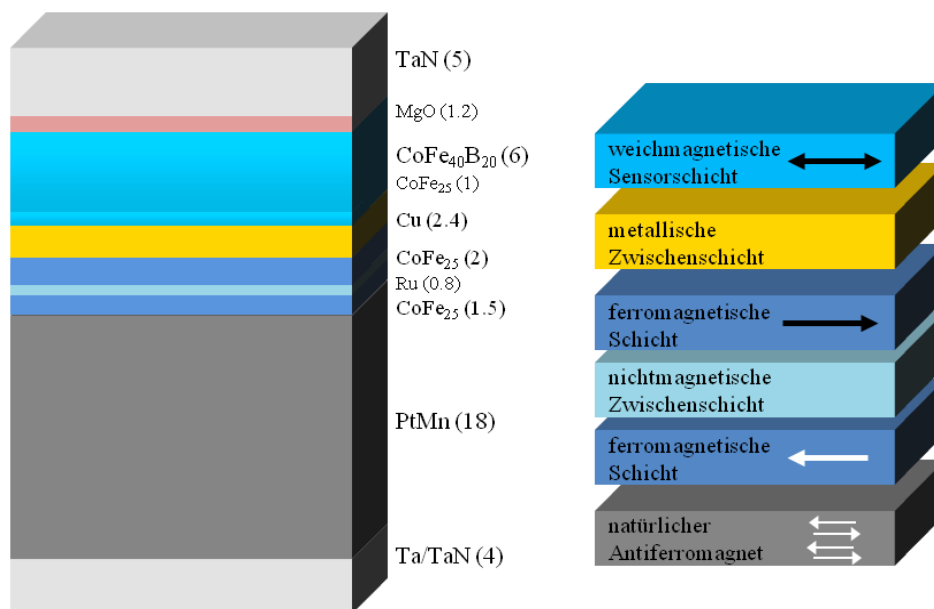


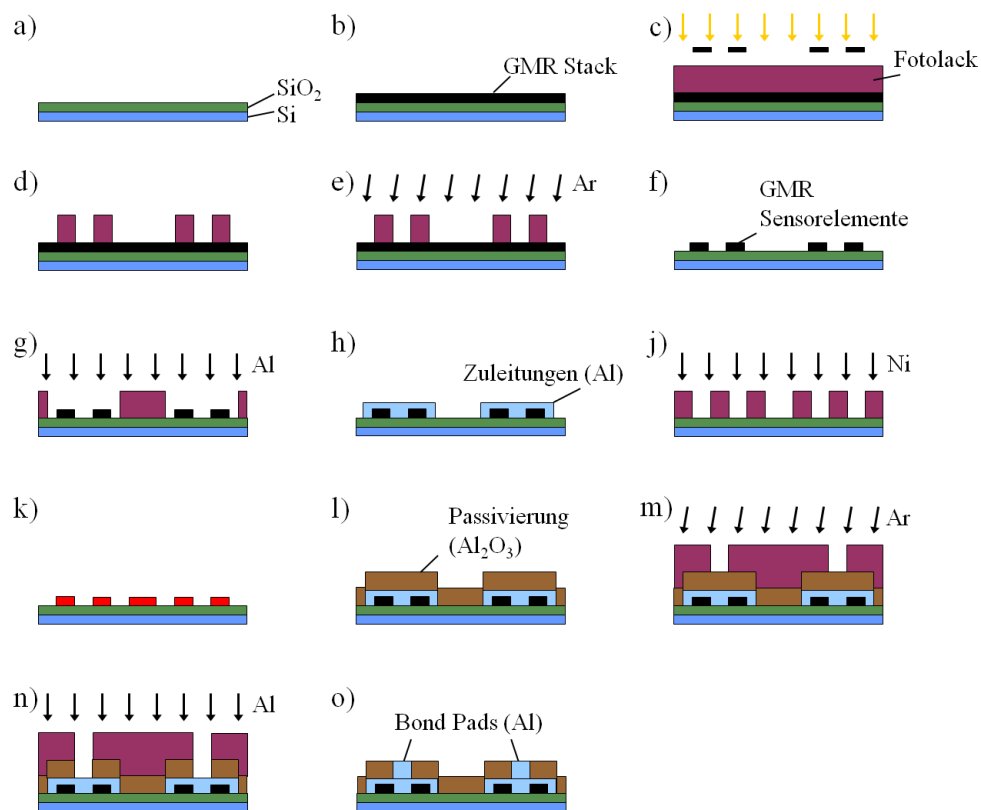
Abbildung 3.1 Siemens GMR-Stack mit Angabe der Schichtdicken. Die Schichteigenschaften des *Spin-Valve* sind farbkodiert dargestellt.

PtMn dient als natürlicher Antiferromagnet, der eine innere magnetische Ordnung von antiparallel angeordneten, magnetischen Momenten ausbildet und daher kein magnetisches Moment nach außen hin aufweist. In einem *Annealing*-Schritt unter einem angelegten, externen Magnetfeld wird die angrenzende CoFe<sub>25</sub>-Schicht an den Antiferromagneten gepinnt. Die Dicke der nichtmagnetischen Ru Zwischenschicht wird so eingestellt, dass die beiden CoFe<sub>25</sub>-Layer über eine oszillatorische Zwischenschichtkopplung antiparallel ausgerichtet sind. Die CoFe<sub>25</sub>-Ru-CoFe<sub>25</sub> Konfiguration bildet einen sogenannten künstlichen Antiferromagneten, der resistent gegen Ummagnetisierung durch äußere Magnetfelder ist (vgl. Kapitel 2.1). Der zweite CoFe<sub>25</sub>-Layer wird dabei als Referenzschicht des magnetoresistiven Systems bezeichnet. Getrennt durch eine metallische Zwischenschicht aus Kupfer, zur Vermeidung von Kopplungseffekten, folgt das weichmagnetische Schichtsystem, bestehend aus CoFe<sub>25</sub> und CoFe<sub>40</sub>B<sub>20</sub>, dessen Magnetisierungsrichtung durch ein äußeres Magnetfeld beeinflussbar ist. CoFe<sub>40</sub>B<sub>20</sub> weist weichmagnetische Eigenschaften bei einer niedrigen Spinpolarisation auf, weshalb der zusätzliche CoFe-Layer aufgebracht wird. Um den magnetoresistiven Effekt zu verstärken, nutzt man eine MgO-Spiegelschicht, an der die Ladungsträger ohne Verlust der Spinpolarisation reflektiert werden. TaN wirkt als Passivierung zum Schutz vor äußeren Einflüssen und zusätzlich als Keimschicht für den PtMn-Layer.

#### 3.2 Herstellung und Integration der einzelnen Sensorkomponenten

Als Substrat für den in Kapitel 3.1 beschriebenen GMR-Stapel dient ein 3“ Silizium Wafer, passiviert mit einer thermisch oxidierten SiO<sub>2</sub>-Isolationsschicht (Abbildung 3.2 a). Die Abscheidung erfolgt in einer Kenotec Sputteranlage, die mit acht Targets ausgerüstet ist, verteilt auf zwei miteinander verbundenen Reaktionskammern. Diese erlaubt die Prozessierung des gesamten Schichtsystems in einem Durchlauf (Abbildung 3.2 b). Mittels lithographischer Prozesse auf Waferebene werden die einzelnen Sensorchips im Reinraum gefertigt. Zur Strukturierung des GMR-Stacks wird die Oberfläche mit dem hochauflösenden *Image Reversal* Fotolack AZ5205e der Firma MicroChemicals GmbH beschichtet und über eine Proximitybelichtung und einer Chrommaske partiell belichtet und ausgehärtet (Abbildung 3.2 c). Durch das Entwickeln in einer Laugenlösung bleibt bei der Positivlithographie nur der Bereich, der nicht belichtet wurde mit Lack bedeckt (Abbildung 3.2 d). Das GMR-System wird an den lackfreien Stellen bis zur SiO<sub>2</sub>-Oxidschicht mittels Ionenstrahlätzen (engl. *Ion Beam Etching*, IBE) herausgeätzt.

Bei dem physikalischen, anisotropen Trockenätzverfahren wird die Probe mit Ar-Ionen beschossen, die im HF-Feld ionisiert und beschleunigt werden (Abbildung 3.2 e). Vor dem Auftreffen durchlaufen die Ar-Ionen einen Neutralisator, um die Aufladung des Substrats zu verhindern und so die Ätzrate konstant zu halten. In einem Barrel-Reaktor folgt ein weiterer Ätzschritt mit O<sub>2</sub>-Plasma, um Lackreste zu entfernen, die sich auf Grund der hohen Temperatur beim Auftreffen der Ar-Ionen quervernetzt haben. Zur vollständigen Lackentschichtung legt man den Wafer für 15 Minuten in ein Ultraschall-Acetonbad.



**Abbildung 3.2** Herstellungsprozess des GMR-Sensorchips: Beschichtung des SiO<sub>2</sub>-Trägermaterials mit dem GMR-Multilagensystem über ein Sputterverfahren (a-b), Strukturierung des Schichtstapels mittels Ionenstrahlätzen (c-f) und Prozessierung der elektrischen Zuleitungen und *Bond-Pads* (g-o). Zusätzlich wird eine ferromagnetische Anreicherungsstruktur lithographisch realisiert (j-k) und mit einer 70 nm dicken Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ALD-Schicht passiviert (l).

Zur Kontaktierung der freiliegenden GMR-Sensorelemente (Abbildung 3.2 f) wird eine strukturierte Metallisierungsebene über einen *Image-Reversal* Lackprozess (AZ5214e, MicroChemicals GmbH) aufgebracht. Hierbei erreicht man durch einen zusätzlichen Tempersschritt in Kombination mit einer Flutbelichtung ein inverses Abbild der Chrommaske und dadurch ein charakteristisches, unterschrittenes Lackprofil. Durch

diesen „*Undercut*“ wird verhindert, dass aufgesputterte Metallschichten nach der Strukturierung scharfe Kanten ausbilden.

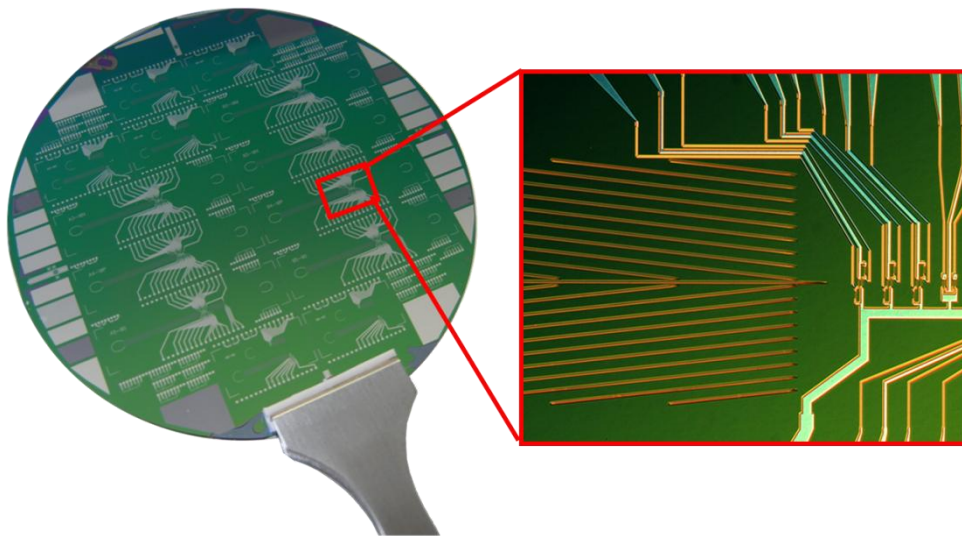
Mit einer Leybold-Haereus Z550S Sputteranlage wird über einen HF-Sputterprozess eine 10 nm dicke Schicht Niob als Haftvermittler und im Anschluss über einen DC-Sputterprozess 150 nm Aluminium aufgebracht (Abbildung 3.2 g). Nach dem Entfernen des Fotolacks über einen dreistufigen Lift-off Prozess bilden sich die Al-Zuleitungen heraus. Der Lack wird dabei 10-15 Minuten in Aceton gequollen, bevor er im Ultraschallbad in Aceton und anschließend in Solvent vollständig vom Wafer gelöst wird. (Abbildung 3.2 h).

In einem Folgeschritt werden auf dem Si-Substrat im Bereich vor dem Sensorarray ferromagnetische Stege aus Nickel hergestellt, die als magnetophoretische Führungsstrukturen für die superparamagnetisch markierten Analyte dienen. Über einen Umkehrlackprozess bei leichter Überbelichtung wird eine Rundung der Gräten erreicht, um magnetische Feldüberhöhungen an den Nickelkanten zu verhindern. Das Nickel wird, je nach Anwendung und Belegungsdichte der magnetischen Marker auf den Zellen, in einer Dicke von 50-400 nm aufgesputtert (Abbildung 3.2 j, k).

Zum Schutz vor den stark korrosiven Bedingungen bei Messungen in Vollblut oder stark ionischen Puffersuspensionen wie PBS (*Phosphate Buffered Saline*), wird der Sensor mit einer Isolationsschicht passiviert. Im Gegensatz zu dem anfänglich getesteten, gesputterten 100 nm SiO<sub>2</sub>-Layer, liefert das Verfahren der Atomlagenabscheidung (vgl. Kapitel 2.3) eine *Pinhole*-freie, homogene und gleichzeitig dünnere Passivierungsschicht, die eine maximale GMR-Sensitivität bei einem minimalen Abstand von Sensor zu Analyt garantiert. Der ALD-Prozess (70 nm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) wird mit dem Savannah 200 ALD-System vorgenommen. Der kritischste Parameter des Abscheideprozesses ist dabei die Kammertemperatur, die mit 150°C relativ niedrig gewählt wird, um thermischen Stress und Korrosionseffekte an den offenen GMR-Widerstandselementen zu vermindern. Bei der daraus resultierenden Abscheiderate von 1.2 Å pro Zyklus und einer Zykluslänge von 40.03 Sekunden beläuft sich die Prozessdauer für eine Passivierungsschicht von 70 nm auf 389 Minuten. Die Spülprozesse mit Stickstoff (N<sub>2</sub> 6.0) als Spülgas zwischen den Einlässen der Reaktanden beanspruchen jeweils ein Zeitfenster von 20 Sekunden bei einem Fluss von 20 sccm (*Standard Cubic Centimeters per Minute*). Um Korrosionseffekte während der Prozessierung am offenen GMR-*Stack* zu verhindern, sollte die Strukturierung der GMR-Elemente am Wafer bis zur Passivierung des Systems (Abbildung 3.2 f-l) innerhalb von 48 Stunden erfolgen.



Mit einem letzten Ätzschritt wird durch die vollflächig abgeschiedene ALD-Schicht bis zur Metallisierungsebene durchkontaktiert, um die Kontaktpads freizulegen. Der Fotolack wird erneut über einen *Image-Reversal* Prozess strukturiert und das  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Substrat mit dem IBE-Verfahren entfernt (Abbildung 3.2 m). Die Ätzgruben werden, unter Verwendung derselben Lackmaske, über einen Sputterprozess mit 10 nm Niob als Haftvermittler und 200 nm Aluminium metallisiert. (Abbildung 3.2 n). Das zuvor beschriebene dreistufige Lift-Off Verfahren schließt die Prozessierung der GMR-Messchips ab (Abbildung 3.2 o). Abbildung 3.3 zeigt den GMR-Wafer nach Abschluss der lithographischen Strukturierung sowie eine Vergrößerung der ferromagnetischen Nickel Fokussierungsstrukturen, die zu den GMR-Sensoren führen.

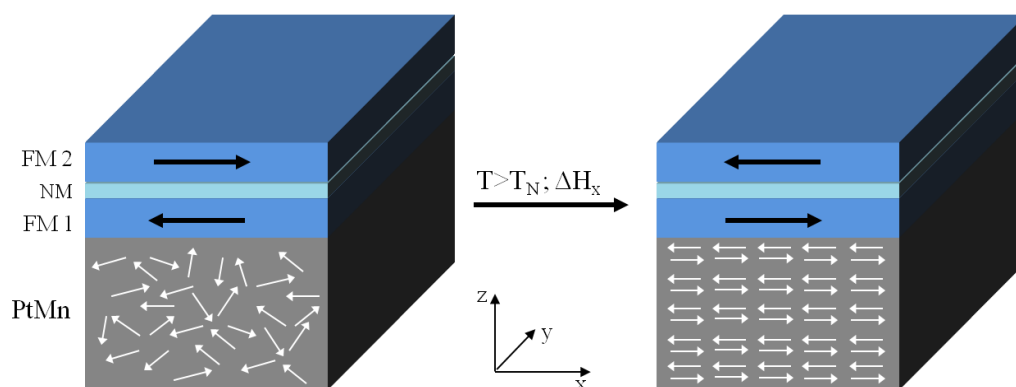


**Abbildung 3.3** Strukturierter GMR-Wafer sowie Mikroskopaufnahme der Magnetophorese und der seriell angeordneten GMR-Brückensensoren.

Zur Einprägung der magnetoresistiven Bauteileigenschaften werden die funktionellen Schichten des GMR-Stacks thermomagnetisch ausgerichtet. Während des sogenannten *Field-Cooling* werden die GMR-Elemente in einer Kammer unter Schutzgasatmosphäre auf eine Temperatur oberhalb der Néel-Temperatur ( $T_N$ ) des antiferromagnetischen Materials geheizt und in einem definierten Magnetfeld wieder abgekühlt [75]. Ziel ist es, die Sensorkennlinie zu linearisieren, indem die Referenzschicht orthogonal zur Messschicht ausgerichtet wird. Durch die Ankopplung der Referenzschicht an den natürlichen Antiferromagneten PtMn, über eine sogenannte direkte Austauschkopplung (vgl. Kapitel 2.1), wird die Magnetisierung der Referenzschicht zudem auch gegen die Einwirkung externer Magnetfelder stabilisiert. Die Einstellung der Austauschkopplung zum natürlichen Antiferromagneten erfolgt dabei so, dass die Magnetisierung der Referenzschicht senkrecht zum GMR-Streifen (Magnetisierungsachse der freien

### 3 Spin-Valve Biosensoren

Messschicht) ausgerichtet ist. Im Gegensatz zu anderen antiferromagnetischen Materialien, wie IrMn, verhält sich PtMn direkt nach dem Sputterprozess paramagnetisch. Der *Annealing* Prozess bewirkt einen kristallographischen Übergang von einer ungerichteten, paramagnetischen fcc (111) in eine geordnete, antiferromagnetische fct (111) Gitterstruktur [76] [77]. Die Umordnung führt zu einer unidirektionalen Ausrichtung der Spins, die eine direkte Austauschkopplung über die Grenzschicht mit der ferromagnetischen Nachbarschicht FM1 bewirkt. Bei einer Temperatur von 270°C und einem Magnetfeld von 400 kA m<sup>-1</sup> wird das magnetische Moment der obersten Lage des PtMn, über eine Dauer von 100 min, von der FM 1-Schicht in Phase gezwungen, während sich die restlichen Lagen an dieser ersten Lage orientiert, antiparallel ausrichten (Abbildung 3.4). Der FM 1-Layer ist dadurch fest an den Antiferromagneten gepinnt [78]. Da die zweite ferromagnetische Schicht FM 2 mit FM 1 einen sogenannten künstlichen Antiferromagneten bildet, richtet sich FM 2 im feldfreien Zustand antiparallel zu FM 1 aus (vgl. Kapitel 2.1). In einem externen Magnetfeld, parallel zum GMR-Sensorelement, wird ein zweiter Tempersschritt, das Anisotropietempern, durchgeführt. Da die Temperatur und das angelegte Magnetfeld klein sind, hat der zweite *Annealing*-Prozess keinen Einfluss mehr auf die Referenzschicht. Für 40 min wird der *Free-Layer*, bei 240°C und 40 kA m<sup>-1</sup> in Y-Richtung, in einem 90° Winkel zur magnetischen Polarisation des *Hard-Layers* ausgerichtet. Dadurch wird eine uniaxiale Anisotropie senkrecht zur Referenzschicht induziert, die ein lineares Verhalten der Sensorkennlinie zur Folge hat und die magnetoresistive Erfassung des Dipolfeldes eines magnetisierten Analyten vor und nach dem Sensorelement ermöglicht.

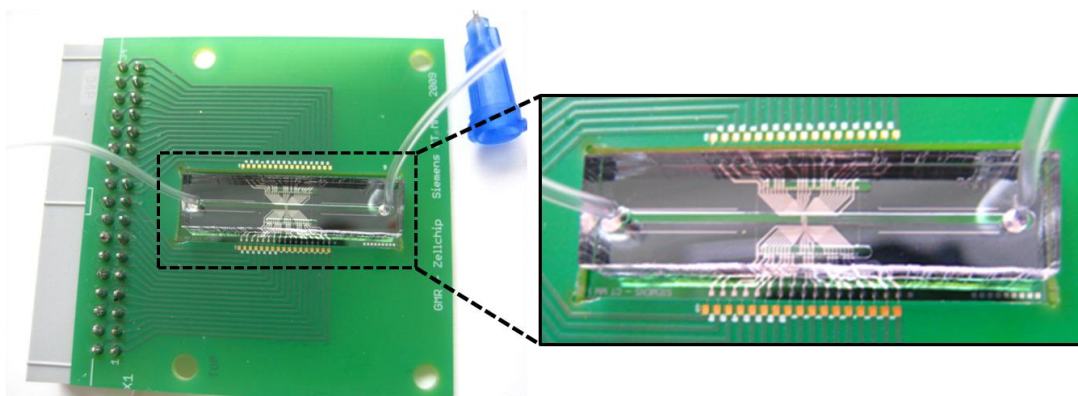


**Abbildung 3.4** Prinzipdarstellung der thermomagnetischen Ausrichtung der magnetischen Referenzschicht über eine *Exchange-Bias* Kopplung an einem PtMn-Antiferromagneten.

Im Zuge der Back-End Fertigung, außerhalb des Reinraums, werden die strukturierten Wafer mit einer Wafersäge zu 30 x 10 mm Messchips (*Dies*) vereinzelt. Zur elektrischen

Kontaktierung platziert man die Chips in der Aussparung, einer speziell angefertigten Leiterplatte (engl. *Printed Circuit Board*, PCB), getragen von einem Glasplättchen, das mit doppelseitigem Klebeband an der Rückseite des Carriers angebracht wurde. Über eine, an das PCB angelötete, 34-pin Wannenneiste kann mittels eines Flachbandkabels eine speziell konstruierte Steckbox kontaktiert werden, die es erlaubt die verschiedenen GMR-Sensoren einzeln anzusprechen und zu vermessen. Der elektrische Kontakt zwischen GMR-Chips und PCB wird über ein Ultraschall *Wedge*-Bondverfahren, mit einem Aluminiumdraht realisiert.

Um die Zellsuspension, abgeschirmt von den nicht elektrisch isolierten Komponenten, über den Sensorbereich zu leiten, wird ein Mikrofluidikkanal aus Polydimethylsiloxan (PDMS) hergestellt. Speziell bei biologischen Anwendungen in wässrigen Lösungen hat sich PDMS als kostengünstiges, biokompatibles, transparentes und chemisch resistentes Material für mikrofluidische Systeme bewährt [79]. Zunächst wird mit Hilfe einer Negativlithographie eine Reliefstruktur auf einen  $\text{SiO}_2$ -Wafer prozessiert, der als Abgussform für das PDMS dient. Hierzu werden mit einer Folienmaske und einem SU-8-100 Fotolack der Firma Microchem. Corp. 700  $\mu\text{m}$  breite und 150  $\mu\text{m}$  hohe lineare Lackstege herausgebildet, welche die Kanaldimensionen definieren. Das flüssige, unvernetzte PDMS, bestehend aus der zähviskosen Silicon Basis Lösung und einem Katalysator für die Quervernetzung (Mischverhältnis 10:1), wird blasenfrei auf den Masterwafer in eine Plastikpetrischale gegossen und 60 Minuten bei 65°C im Ofen ausgehärtet [80].



**Abbildung 3.5** Elektrisch kontaktierter GMR-Chip im PCB mit angelöteter Steckleiste zur Spannungsversorgung und Datenauslesung. Die Vergrößerung zeigt die PDMS-Fluidik mit dem linearen Einkanalssystem zum Transport der magnetisch markierten Analyten über die magnetoresistive Sensoranordnung.

Die einzelnen mikrofluidischen Strukturen können nach dem Herauslösen der PDMS-Gussform vom Wafer mit Hilfe einer Rasierklinge separiert werden. Mit einer geschliffenen Kanüle werden orthogonal zum Kanal Löcher für Ein- und Auslass der Zellsuspension gestochen, in denen später PVC-Schläuche, mit einem Innendurchmesser von 0.5 mm und einem Außendurchmesser von 1 mm, gesteckt werden.

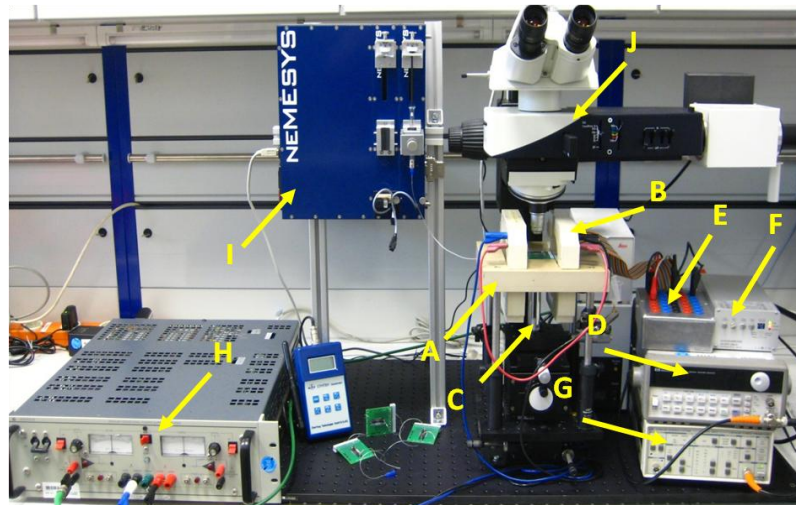
Trotz guter Hafteigenschaften an PDMS- und Glassubstraten [80], kann selbst nach Behandlung im Sauerstoffplasma, keine zufriedenstellende Abdichtung zwischen der PDMS-Fluidik und der ALD-Oberfläche des Sensors erreicht werden. Aus diesem Grund wird eine dünne Lage flüssiges, unvernetztes PDMS auf ein Glasplättchen geschleudert, auf das der Kanal für wenige Sekunden abgesetzt wird, um dann, unter einem Mikroskop, manuell auf den *Si-Die* platziert zu werden [81]. Das Siliziumpolymer wird anschließend erneut für 60 Minuten bei 65°C im Ofen ausgehärtet. Bei geringer Höhe des Mikrofluidikkanals ( $< 70 \mu\text{m}$ ) steigt die Wahrscheinlichkeit, dass während des *Microcontact-Printing*-Prozesses flüssiges PDMS, ohne äußeren Einfluss, in den Kanal einzieht und diesen verstopft, wohingegen dieser Effekt bei Kanaldimensionen um 150  $\mu\text{m}$  Höhe nahezu ausgeschlossen werden kann. Abbildung 3.5 zeigt einen einsatzfähigen Messchip mit elektrischer Kontaktierung auf einer Leiterplatte und positioniertem, mit PVC (Polyvinylchlorid) Schläuchen bestücktem PDMS-Mikrofluidikkanal.

### 3.3 Charakterisierung der GMR-Sensorelemente

Zur Ermittlung der Sensitivität und des magnetischen Verhaltens der Sensoren, wird eine Hysteresekennlinie aufgenommen, bei der die funktionellen Layer des magnetoresistiven Systems durch Anlegen eines externen magnetischen Feldes in antiparallele bzw. parallele Konfiguration gezwungen werden. Auf Grund der Verschaltung der GMR-Einzelemente in einer Wheatstone Brückenarchitektur, kann nur das Verhalten der gesamten Messbrücke und kein Einzelstreifen analysiert werden. Zur Vergleichbarkeit der verschiedenen GMR-Sensoren über die Hysteresemessung, werden Einstellungen der Messgeräte und äußere Bedingungen konstant gehalten.

Abbildung 3.6 beschreibt den Laboraufbau an dem sowohl die Charakterisierung der magnetoresistiven Sensoren, als auch die magnetische Einzelzelldetektion durchgeführt werden. Die extra gefertigte Polyetheretherketon (PEEK) Kunststoffplatte (A) besitzt eine mittige Aussparung, in die das PCB eingesetzt und fixiert wird. Von unten kann ein

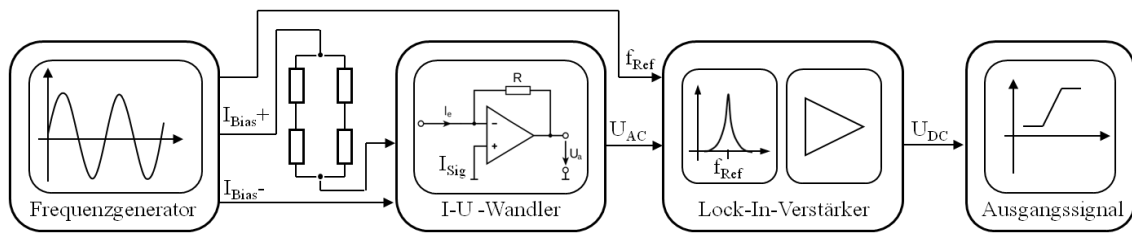
Permanentmagnet über einer Hebevorrichtung (C) positioniert werden. Das dadurch erzeugte vertikale Magnetfeld ist bei der Zellmessung von elementarer Bedeutung. Das Helmholtzspulenpaar (B), die spannungsabhängige Stromquelle (H) und der Strom-Spannungswandler (G) sind Bestandteile der Aufnahme der Hysterese Kennlinie. Das Spritzensystem (I) und Mikroskop (J) kommen bei der Zellmessung zur Anwendung, die in Kapitel 3.4 ausführlich beschrieben wird. Über ein Flachbandkabel ist der GMR-Chip mit einem Steckkasten (E) verbunden, mit dem einzelne GMR-Brücken über den Frequenzgenerator (D) mit Spannung versorgt werden können.



**Abbildung 3.6** Laboraufbau zur Charakterisierung der magnetoresistiven Sensoren und zur Einzelzellmessung mit allen relevanten elektrischen, magnetischen, optischen und mikrofluidischen Komponenten. Ein integriertes Mikroskop und eine CCD (*Charged Coupled Device*) Kamera ermöglichen zeitkorrelierte optische und magnetische Messungen.

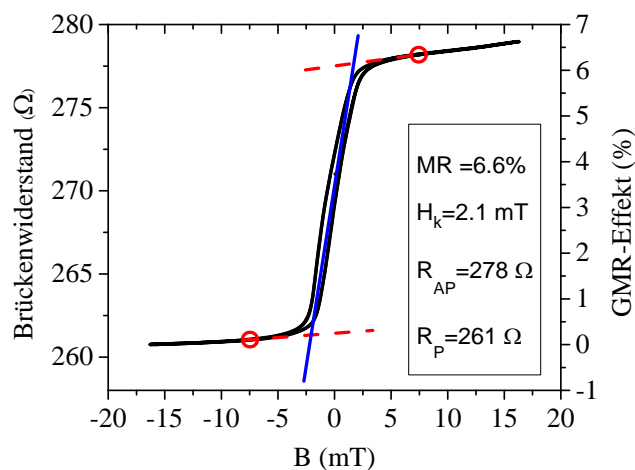
Abbildung 3.7 zeigt das Ersatzschaltbild der Aufnahme der Hysteresekurve zur Charakterisierung der magnetoresistiven Sensoren. Die Leiterplatte sitzt mittig zwischen dem Helmholtzspulenpaar in der Aussparung der PEEK-Platte. Das Spulenpaar generiert ein homogenes magnetisches Wechselfeld von  $\pm 15.6$  mT, orthogonal zur Vorzugsrichtung der GMR-Messschicht.

### 3 Spin-Valve Biosensoren



**Abbildung 3.7** Ersatzschaltbild der Messung der Transferkennlinie zur Charakterisierung der magnetoresistiven Bauteile.

Durch eine 2-Punktmessung wird der Strom an der Masseleitung der Brücke, die über einen Frequenzgenerator der Firma Hewlett Packard mit einer Sinusspannung von  $100 \text{ mV}_{pp}$  bei einer Frequenz von  $1 \text{ kHz}$  versorgt wird, abgegriffen und mit einem Transimpedanzverstärker (Stanford SR 570) in eine Spannung gewandelt. Ein Lock-In-Verstärker der Firma Femto (LIA-MV(D)-200) verstärkt das Signal 30-fach, bei einer Zeitkonstante des internen Tiefpassfilters von  $30 \text{ ms}$ . Eine graphische Benutzeroberfläche (engl. *Graphical User Interface*, GUI) erlaubt neben der Steuerung der Messung, verknüpft mit der Einbindung einer spannungsabhängigen Stromquelle zur Versorgung der Helmholtzspule, auch die Konvertierung der Messdaten in ein \*.xls Format, wobei die Messwerterfassung über eine LabVIEW DAQ-Karte (engl. *Data Acquisition*) von National Instruments (NI PCI 6251) erfolgt.



**Abbildung 3.8** Typische Hysteresekennlinie mit einer Widerstandsänderung von  $17 \text{ } \Omega$ , resultierend in einem GMR-Effekt von  $6.6\%$ . Die im Sättigungsbereich angelegten Asymptoten (rot) indizieren die Bestimmung der Anisotropiefeldstärke  $H_k$  der magnetischen Sensoren, als zweiten Parameter zur Bewertung der Sensitivität der magnetoresistiven Bauteile.

Abbildung 3.8 zeigt eine typische Hysteresekennlinie einer GMR-Messbrücke am Beispiel eines Multilagensystems des Instituts für Photonische Technologien (IPHT) Jena. Dabei wird das externe magnetische Feld des Helmholtzspulenpaars gegen die



prozentuale Widerstandsänderung des *Spin-Valve* Schichtstapels aufgetragen. Die Widerstandsänderung wird dabei aus den aufgezeichneten Werten der Referenzbrückenspannung  $U(x)$  und den Spannungswerten der Sättigungszustände  $U_{max}$  und  $U_{min}$  berechnet.

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{U_{max} - U(x)}{U_{min}} * 100\% \quad (3.1)$$

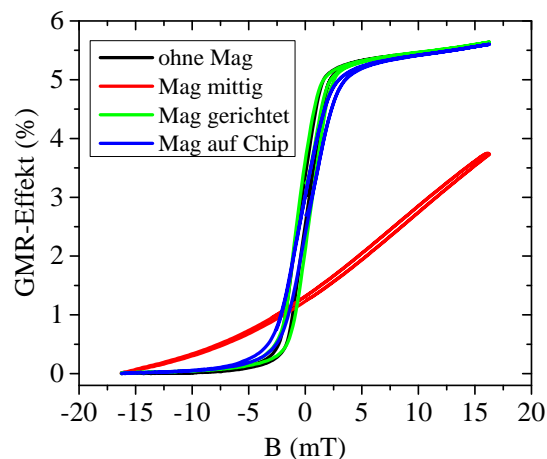
Zusätzlich dargestellt ist die Absolutwiderstandsänderung des Brückensystems, die sich auf  $17 \Omega$  beläuft. Durchschnittlich erreichen die IPHT-Sensoren, bei Brückenwiderständen von  $\sim 270 \Omega$ , einen maximalen GMR-Effekt von 6.6%, der sich aus der Spannungsdifferenz der Sättigungszustände errechnet.

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{U_{max} - U_{min}}{U_{min}} * 100\% \quad (3.2)$$

Zur Bewertung der Sensitivität eines GMR-Brückensensors dient neben dem GMR-Effekt, als Kenngröße für die maximale Widerstandsänderung des Systems, auch die Anisotropiefeldstärke  $H_k$  des weichmagnetischen Schichtsystems. Um letzteres zu bestimmen wird jeweils eine Asymptote in den Sättigungsbereichen der Kurve angelegt, wobei die roten Kreise in Abbildung 3.8 die Sättigungspunkte der Kennlinie indizieren. Die Ausbildung eines horizontalen Kurvenverlaufs im Sättigungsbereich wird durch Kopplungen der Drehbewegung anderer Schichten im externen Magnetfeld verhindert, die allerdings irrelevant zur Bewertung des weichmagnetischen Systems sind und so ausgeblendet werden können. Die Schnittpunkte der Asymptoten mit einer, aus den linearen Teilstücken gemittelten Geraden, legen das Anisotropiefeld fest. Gütekriterium für die magnetische Einzelzellerfassung, über die Detektion sehr geringer *in-plane* Komponenten des Dipolfeldes einer superparamagnetisch markierten Zelle, ist die Steigung der Transferkennlinie im linearen Bereich um das Nullfeld, als Kombination der zwei charakteristischen Größen. Die in Abbildung 3.8 diskutierte Kurve zeigt eine Steigung von  $1.59 \% \text{ mT}^{-1}$ , bei einer Anisotropiefeldstärke  $H_k$  von 2.1 mT.

Neben der Charakterisierung der GMR-Sensorelemente wird die Messung der Transferkennlinie genutzt, um vor jeder Einzelzellmessung die Störfelder eines vertikal zur Substratoberfläche magnetisierten Permanentmagneten zu minimieren, der unter der PEEK-Platte an einem Acrylglasstab befestigt ist. Das vertikale Feld ermöglicht dabei die magnetische Erfassung von superparamagnetisch markierten Analyten, die unter Einfluss dieses externen Feldes eine lokale Feldverzerrung bewirken. Über eine

Hebevorrichtung lässt sich der Abstand des Permanentmagneten zum Chip regulieren, um auf Sensorebene Magnetfelder von 40-220 mT zu realisieren. Die GMR-Elemente sind unempfindlich gegen das orthogonal zur Substratoberfläche ausgerichtete Feld, wohingegen nicht-orthogonale Magnetfeldkomponenten zu einer Bauteilsättigung führen. Deshalb muss der NdFeB-Permanentmagnet mit Außenmaßen von 32 x 27 x 6 mm während der HystereseMessung mit einem, im Messaufbau integrierten Präzisions-Kreuztisch, bei einer Schrittweite von 10  $\mu\text{m}$ , positioniert werden, um exakt unter den GMR-Brücken ein möglichst homogenes, vertikales Feld und somit maximale Steilheit der Hystereseurve zu erreichen. Gleichzeitig wird durch das Stützfild des externen Permanentmagneten die natürliche Nullpunktverschiebung der Kennlinie in einem *Spin-Valve* System, bedingt durch die *Orange-Peel*-Kopplung, kompensiert (vgl. Kapitel 2.2).

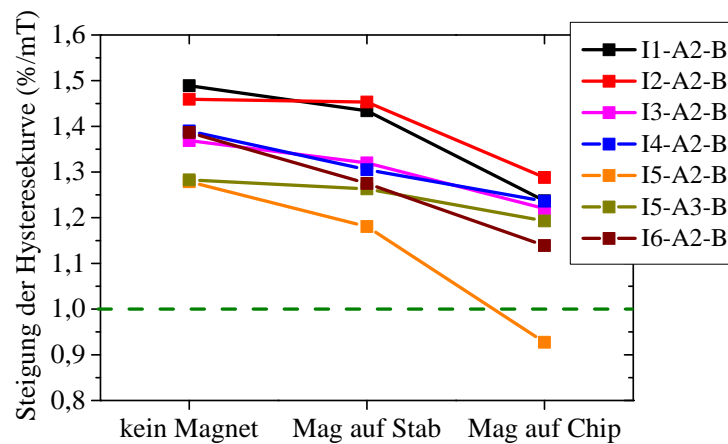


**Abbildung 3.9** Minimierung der X- und Y-Magnetfeldkomponenten des Permanentmagneten um die Sensitivität der GMR-Sensoren zu maximieren. Die Verschiebung der Transferkennlinien bei zentrierter, planparalleler Anordnung des Magneten unter der GMR-Brücke erfolgt durch: (1) ohne Positionierhilfe (rot), (2) mit Positionierung durch einen Kreuztisch (10  $\mu\text{m}$  Präzision; grün) und (3) Permanentmagnet angeklebt nach präziser Ausrichtung mit doppelseitigem Klebeband (blau). Zum Vergleich die Kennlinie der Brücke ohne Permanentmagnet (schwarz). Minimaler Steigungsverlust kann trotz des starken NdFeB-Magneten mit einer Remanenzflussdichte von 1170-1250 mT erreicht werden.

Für Zellmessungen außerhalb der PEEK-Halterung des Messaufbaus wird der Magnet mit doppelseitigem Klebeband an die Rückseite der Platine fixiert. Dabei wird der Permanentmagnet, der mit einem Klebestreifen inklusive Schutzfolie präpariert ist, bis auf Anschlag an den Carrier gefahren und wie oben beschrieben mit dem Präzisions-Kreuztisch ausgerichtet wird. Nach Entfernen der Schutzfolie kann der Magnet mit der Hebevorrichtung angedrückt und der Acrylglasstab langsam wieder abgesenkt werden. Der Vorteil dieses Prozesses ist eine planparallele und zentrierte Ausrichtung des



Permanentmagneten unter dem GMR-Sensor unabhängig von Einbautoleranzen in allen 3 Achsen. Darüber hinaus erlaubt die Anordnung die Möglichkeit einer GMR-Messung mit vertikaler Positionierung des Messcarrier in kurzer Distanz zum Spritzenpumpensystem. Damit erreicht man minimale Schlauchlängen, um Sedimentationsverluste der magnetischen Analyte zu minimieren. Abbildung 3.9 zeigt eine Sensorkennlinie (schwarz) eines IPHT-Schichtsystems mit und ohne positioniertem 32 x 27 x 6 mm NdFeB-Magneten. Die planparallele, zentrische Justage des Magneten unter dem Chip erlaubt eine nahezu unveränderte Bauteilkennlinie der Brücke im Vergleich zur Kennlinie ohne Permanentmagneten. Die blaue Kurve resultiert aus der Charakterisierung nach dem Ankleben des ausgerichteten Magneten auf der Rückseite des PCB.

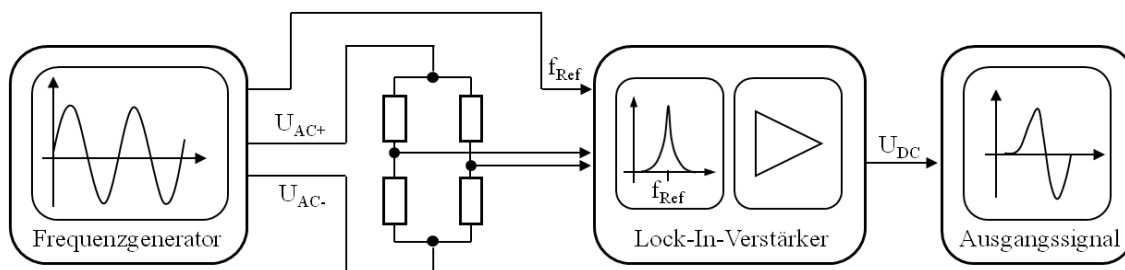


**Abbildung 3.10** Steigungsabfall im linearen Bereich der Hysterese Kennlinie durch Fixierung des positionierten Permanentmagneten an die Unterseite des PCBs.

Der Vergleich der Steigungen der Kennlinien ohne, und mit positioniertem Permanentmagneten über dem gleichen Sensor, auf sechs verschiedenen IPHT-Wafern, zeigt einen durchschnittlichen Verlust von 3.9% zum unbeeinflussten Wert, was einem Absolutwert von  $0.08 \text{ \% mT}^{-1}$  entspricht. Der Prozess der Fixierung des Magneten direkt an den Messcarrier, verursacht einen signifikant höheren Verlust der Steilheit der Hysterese Kurve von  $0.20 \text{ \% mT}^{-1}$  im Vergleich zur Kennlinie ohne Magnet (Abbildung 3.10). Als Qualitätsmerkmal für eine erfolgreiche Ausrichtung des Permanentmagneten hat sich in der experimentellen Arbeit ein Schwellwert von  $1.0 \text{ \% mT}^{-1}$  ergeben, der eine reproduzierbare, magnetoresistive Zelldetektion erlaubt.

### 3.4 Messaufbau und digitale Signalerfassung

Die Zellmessung erfolgt am selben Laboraufbau wie die Aufnahme der Hysteresekennlinie. Dabei wird das GMR-Sensorsystem mit einer Sinusspannung von  $100 \text{ mV}_{\text{pp}}$  bei einer Frequenz von  $13 \text{ kHz}$  versorgt, was bei einem Brückenwiderstand von  $300 \Omega$  zu einer Stromstärke von  $235 \mu\text{A}$  führt. Als Messsignal wird die Differenzspannung der Wheatstone Brücke abgegriffen und direkt mit dem Lock-In-Verstärker moduliert. Der 2-Phasen Lock-In stellt einen extrem schmalbandigen Bandpassfilter dar, der es ermöglicht sehr kleine Nutzsignale von bis zu wenigen Nanovolt, frequenzabhängig aus einem großen Störspektrum zu filtern [82]. Kernstücke des Verstärkers sind zwei phasenempfindliche Gleichrichter (engl. *Phase Sensitive Demodulator*, PSD), die das Messsignal mit einem Trägersignal bekannter Frequenz, bei einer Phasenverschiebung von  $0^\circ$  und  $90^\circ$  multiplizieren. Die Vektorsumme der beiden Produkte liefert das Ausgangssignal, das in einem Tiefpass integriert und dabei in ein DC-Signal umgewandelt wird. Das Referenzsignal wird dabei direkt am Frequenzgenerator abgegriffen, wobei eine phasenunabhängige Messung nur mit einem sinusförmigen Spannungssignal möglich ist [83]. Die mit einem Drehschalter am Gerät variabel einstellbare Zeitkonstante des Tiefpassfilters wird in Abhängigkeit von der Analytgeschwindigkeit, welche die Frequenzkomponente des Signalmusters direkt beeinflusst, zwischen  $300 \mu\text{s}$  und  $3 \text{ ms}$  variiert. Die Wahl des Verstärkungsfaktors richtet sich nach dem analogen Eingangssignal, generiert von der *in-plane* Komponente des Dipolfeldes der magnetischen Analyten. Bei spezifisch markierten biologischen Zellproben, mit einem Signalhub von  $3\text{-}10 \mu\text{V}_{\text{pp}}/100 \text{ mV}_{\text{pp}}$ , wird mit der Maximalverstärkung von  $90 \text{ dB}$  (Faktor:  $30000$ ) gearbeitet. Magnetisch markierte Referenzpartikel erzeugen einen um das 2-3-fache höheren Signalhub und erlauben eine Messung bei  $80 \text{ dB}$  (Faktor:  $10000$ ).

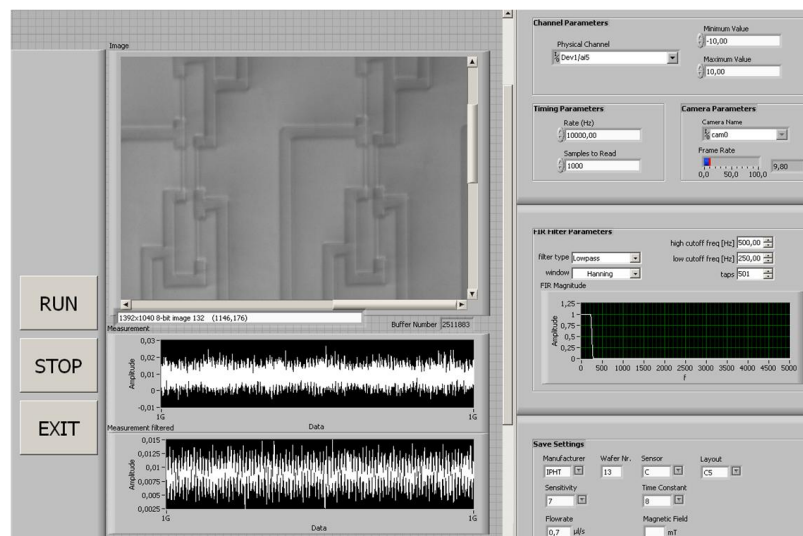


**Abbildung 3.11** Ersatzschaltbild der Einzelzelldetektion an einer Wheatstone Brückenordnung mit frequenzabhängiger Spannungsverstärkung.

Die PC-basierte Datenerfassung erfolgt erneut über die LabVIEW DAQ-Karte, die eine Auflösung von 16 bit bei maximaler Abtastrate von  $1 \text{ MS/s}$  und einem Eingangsbereich

von -10 V bis +10 V liefert. Abbildung 3.12 zeigt die LabVIEW GUI zur Steuerung der Messung mit graphischer Aufbereitung des Rohsignals und einem *in-situ* gefilterten Signalstream, unter Verwendung eines FIR-Filters (*Finite Impulse Response Filter*). Zusätzlich ermöglicht ein im Laboraufbau integriertes Mikroskop, das an eine TXG 14f CCD (*Charged-Coupled Device*) Kamera von Baumer gekoppelt ist, eine optische Kontrolle der Zellbewegungen über dem Sensorbereich bei 200-facher Vergrößerung. Dadurch kann bei zeitkorrelierten Messungen in Puffersuspension, dank der Transparenz der PDMS-Mikrofluidik, eine optische Referenz zum magnetischen Signal generiert werden. Die Messdaten werden bei einer *Sample Rate* von 10 kHz kontinuierlich in das LabVIEW interne, binäre Dateiformat \*.tdms (*Technical Data Management Streaming*) konvertiert und abgelegt.

Zum Einleiten der Analytsuspension in das mikrofluidische System werden eine 500  $\mu\text{L}$  Hamilton-Spritze und die nMESYS Präzisions-Spritzenpumpe von Cetoni genutzt. Ein Gleichstrom Servomotor erzeugt pulsationsfreie Fluidströme und garantiert eine konstante Bewegung der Analyten über den Sensorbereich, als Grundvoraussetzung für die Analyse zellspezifischer Informationen aus den charakteristischen Signalverläufen der magneto-resistiven Messung.



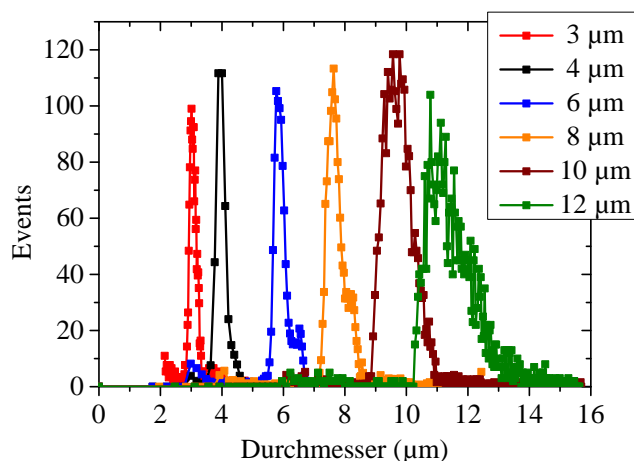
**Abbildung 3.12** LabVIEW GUI zur Steuerung der Datenerfassung und des digital implementierten FIR-Filters mit integrierter optischer Kontrolle.

## 4. Analyte

Grundlage der magnetischen Einzelzelldetektion in Puffersuspensionen und komplexen Medien, wie Vollblut, ist der superparamagnetische Charakter der Nanopartikel, durch den eine Aggregationsbildung der Zielzellen während des Inkubationsprozesses verhindert wird. Homogen magnetisierte, superparamagnetische Referenzbeads werden verwendet, um das magnetoresistive Messverfahren für biologische Proben hinsichtlich Kanaldimensionen, Brückenlayout, magnetischer Zellanreicherung und magnetophoretischer Zellführung zu adaptieren. Spezifisch markierte FaDu-Tumorzellen und  $CD4^+$  T-Zellen, als klinisch relevante Modellanalyte, dienen zur Validierung des Messverfahrens für diagnostische Anwendungen.

### 4.1 Referenzbeads

Um die ausreichende Qualität der Referenzen für die Entwicklung des Messverfahrens sicherzustellen, werden die Beads optisch, volumetrisch und magnetisch charakterisiert. Bei den ausgewählten Referenzanalyten handelt es sich um monodisperse, magnetische Partikel der Firma Micromod Partikeltechnologie GmbH mit Durchmessern von 3-12  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 4.1** Größenverteilungen der Micromod Referenzbeads im Durchmesserbereich von 3-12  $\mu\text{m}$  ermittelt, über eine Impedanzmessung mit dem Beckman Coulter Z2.

Die sphärischen Beads besitzen einen Polystyrolkern und sind in ihrer äußeren Hülle superparamagnetisch funktionalisiert, wodurch sich das, im externen Magnetfeld

ausbildende, Dipolfeld sehr ähnlich zu spezifisch markierten, biologischen Zellen verhält. Nach Herstellerangaben werden kegelförmige, nanoskalige Vertiefungen in die Außenschicht der Kugeln geätzt und mit superparamagnetischem Eisenoxid befüllt. Als Passivierung dient eine Ummantelung aus Methacrylat, die eine Lagerung bei Raumtemperatur erlaubt sowie die Messung in einem hochionischen Medium ermöglicht [84].

Abbildung 4.1 zeigt die Größenverteilung der magnetischen Partikel im Durchmesserbereich von 3-12  $\mu\text{m}$ , gemessen mit einem Z2 Coulter Counter von Beckman Coulter. Zur statistischen Analyse werden Gauß-Fits über die Messungen gelegt und ausgewertet. Mit Ausnahme der 3  $\mu\text{m}$  Partikel liegen die Mittelwerte der Verteilungen knapp unter den angegebenen Durchmessern, wobei die 12  $\mu\text{m}$  Partikel bei einem Absolutwert von 11.3  $\mu\text{m}$  mit ~6% die größte Abweichung zur Herstellerangabe aufweisen. Die Halbwertsbreite (engl. *Full Width at Half Maximum*, FWHM) der Verteilungskurven nimmt mit ansteigendem Durchmesser herstellungsbedingt zu. Die Kurve der 12  $\mu\text{m}$  Partikel zeigt mit einer FWHM von 1.6  $\mu\text{m}$  eine mehr als fünf Mal so breite Verteilung als die 3  $\mu\text{m}$  Population, wodurch die 12 und 10  $\mu\text{m}$  Partikelsuspensionen über die Impedanzmessung nicht mehr vollständig trennbar sind. Magnetische Partikel mit einem Durchmesser größer als 12  $\mu\text{m}$  sind nicht lieferbar, da, laut Herstellerangabe, eine ausreichend scharfe Verteilung, bei derzeitigem Produktionsstandard, nicht gewährleistet werden kann.

**Tabelle 4-1** Statistische Auswertung der Coulter Messdaten der Micromod Referenzpartikel.

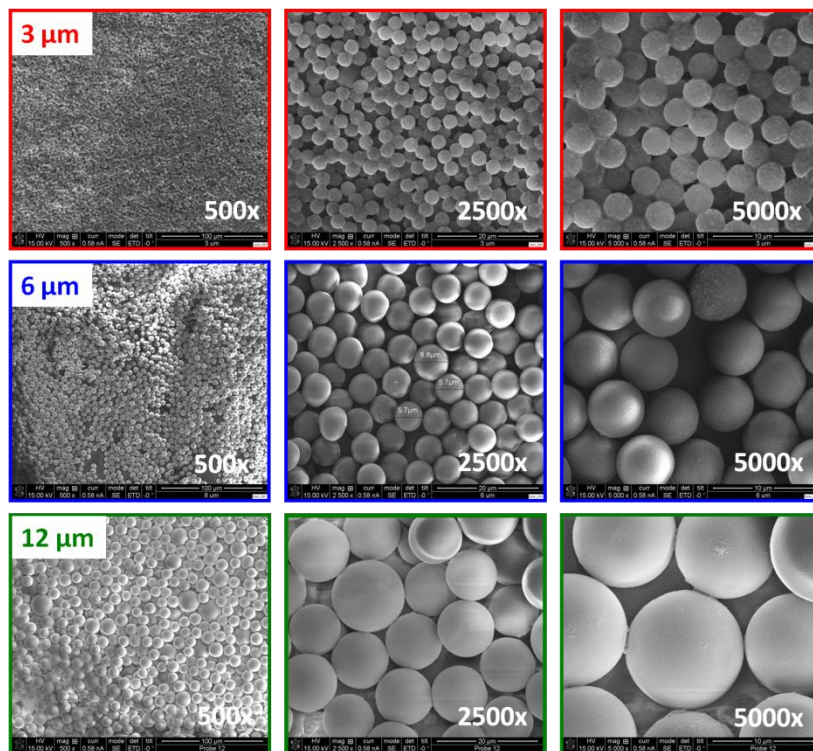
<b>Beadtyp</b>	<b>Mittelwert (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Standardabweichung (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>FWHM (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Cv (%)</b>
<b>3 <math>\mu\text{m}</math></b>	3.1	0.1	0.3	3.9
<b>4 <math>\mu\text{m}</math></b>	4.0	0.1	0.3	3.5
<b>6 <math>\mu\text{m}</math></b>	5.9	0.2	0.4	2.7
<b>8 <math>\mu\text{m}</math></b>	7.6	0.2	0.6	3.3
<b>10 <math>\mu\text{m}</math></b>	9.7	0.5	1.1	4.9
<b>12 <math>\mu\text{m}</math></b>	11.3	0.7	1.6	6.2

#### 4 Analyte

Als relatives Maß für die Streuung wird der Variationskoeffizient (engl. *Coefficient of Variation*,  $Cv$ ) eingeführt, der durch

$$Cv = \frac{\sigma}{\mu} \quad (4.1)$$

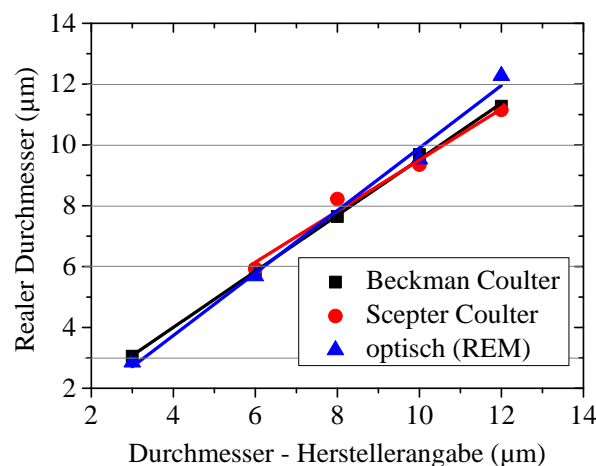
definiert ist, wobei  $\sigma$  die Standardabweichung und  $\mu$  den Mittelwert der Verteilungen darstellt. Die ermittelten  $Cv$ -Werte, die im Datenblatt bei Partikeln bis 8  $\mu\text{m}$  mit <5% angegeben sind, liegen zwischen 3-4%. Die 6  $\mu\text{m}$  Referenzbeads zeigen mit einem  $Cv$ -Wert von 2.7% die schärfste Verteilung relativ zum Durchmesser, während die 12  $\mu\text{m}$  Partikel mit 6.2% den höchsten Wert aufweisen (Datenblatt: <10%). Tabelle 4-1 fasst die diskutierten Daten zusammen.



**Abbildung 4.2** REM-Aufnahmen zur Analyse der Größenverteilung der 3, 6 und 12  $\mu\text{m}$  Micromod Referenzbeads bei 500, 2500 und 5000-facher Vergrößerung.

Eine Oberflächenanalyse mit Rasterelektronenmikroskopie (REM) der 3, 6 und 12  $\mu\text{m}$  Referenzbeads ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Für eine verbesserte Leitfähigkeit der Probe wird eine dünne Pt-Schicht auf die getrocknete Partikelprobe aufgesputtert. Vergleicht man die Aufnahmen der 3 Analyten bei 2500-facher Vergrößerung, bestätigt sich der Trend der Coulter Messungen bezüglich der Schärfe der Größenverteilungen. Vor allem die 12  $\mu\text{m}$  Population zeigt optisch deutlich inhomogenere

Partikeldimensionen. Zur Darstellung der Mittelwerte der Verteilungen werden 100 Analyte pro Durchmesser optisch, mit Hilfe der REM-Aufnahmen, ausgewertet und mit den Coulter Daten des Beckman Coulter Z2 sowie dem Scepter Coulter Counter, einem Handheld-Gerät von Millipore, gegenübergestellt (Abbildung 4.3). Das Handheld Coulter Messgerät eignet sich als volumetrische Vergleichsmethode zu dem angestrebten magnetischen Messverfahren mit GMR-Sensoren hinsichtlich des Einsatzbereichs als Einwegprodukt, der Präzision und dem Dynamikbereich. Als Goldstandard für die magnetische Durchmesserbestimmung dient der Beckman Coulter Z2, der für Benchmark Experimente herangezogen wird.



**Abbildung 4.3** Gegenüberstellung der gemittelten Durchmesser der 3, 6, 8, 10 und 12 µm Micromod Referenzanalyten über Messungen mit dem Beckman Coulter Z2, einem Handheld Coulter Counter von Scepter und der optischen Auswertung der REM-Aufnahmen.

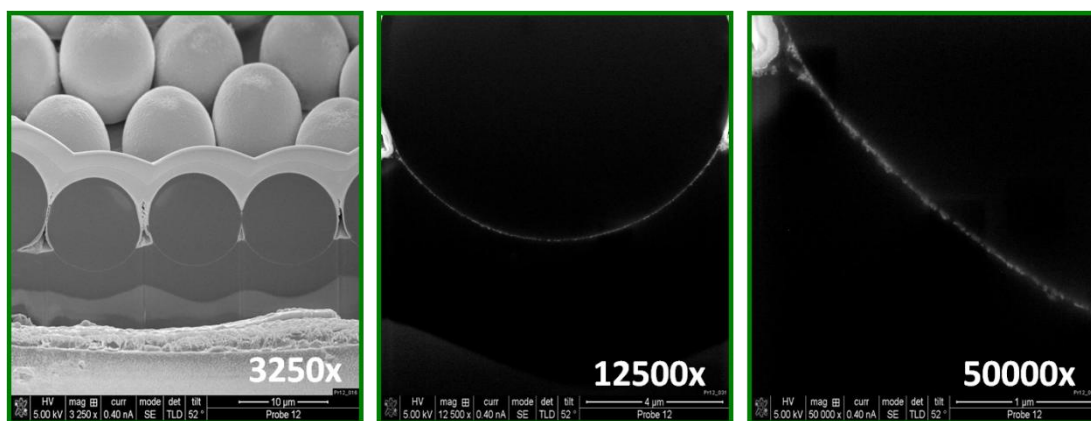
Im Vergleich zu den Ergebnissen des Beckman Coulter zeigt die optische Auswertung bei den 12 µm Referenzpartikeln eine Abweichung des Mittelwertes um 10%, was mit der Betrachtung der REM-Aufnahmen in Abbildung 4.2 korreliert. Bei den übrigen Populationen bestätigt die optische Analyse, als Absolutmessverfahren, die Ergebnisse der Impedanzmessung zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers ( $d_{hydro}$ ). Die Analyse der Größenverteilung der Micromod Beads mit dem miniaturisierten Scepter Coulter Counter ist auf den Durchmesserbereich von 6-12 µm beschränkt. Auf Grund der minimalen Porengröße der Scepter Sensoren von 40 µm können Partikelgrößen  $\leq 4$  µm nicht mehr aufgelöst werden. Die Aufstellung der  $C_V$ -Werte der Messungen zeigt im Gegensatz zu den Ergebnissen des Benchtop Systems von Beckman eine deutliche Zunahme über den gesamten Durchmesserbereich. Bei den 6 µm Partikeln nimmt die relative Streuung um einen Faktor 2.6 zu, während der  $C_V$ -Wert der 12 µm Partikel um das 1.3 fache ansteigt (Tabelle 4-2).



**Tabelle 4-2 Vergleich der ermittelten Größenverteilungen der Micromod Referenzpartikel durch Beckman Coulter Z2, Scepter Coulter Counter von Milipore und REM-Aufnahmen.**

Beadtyp	Beckman Coulter Z2		Scepter Coulter		optisch (REM)
	Mittelwert (µm)	Cv (%)	Mittelwert (µm)	Cv (%)	Mittelwert (µm)
<b>3</b>	3.1	3.9	-	-	2.9
<b>6</b>	5.9	2.7	5.4	6.9	5.7
<b>8</b>	7.6	3.3	7.2	6.2	-
<b>10</b>	9.7	4.9	8.9	6.8	9.5
<b>12</b>	11.3	6.2	10.6	7.9	12.3

Zur Ermittlung der Dicke der FeO<sub>x</sub>-Schicht und der Homogenität des superparamagnetischen Materials auf der Kugeloberfläche wird mit der *Focused Ion Beam*-Technik (fokussierter Ionenstrahl, FIB), ein Querschnitt der getrockneten Partikel erzeugt, die zur Stabilisierung mit einem Platin-Layer beschichtet werden. Abbildung 4.4 zeigt den Querschnitt einer Probe von 12 µm Referenzbeads, visualisiert mit einem Rasterelektronenmikroskop als bildgebendes Verfahren. Eine Analyse der REM-Aufnahmen zeigt eine relativ homogene Verteilung des im Kontrast hell leuchtenden magnetischen Materials im Außenbereich der Polystyrol Kugel. Die Dicke der magnetischen Schicht, welche aus der REM-Aufnahme bei 50,000-facher Vergrößerung ermittelt wurde, beläuft sich auf ~100-200 nm.

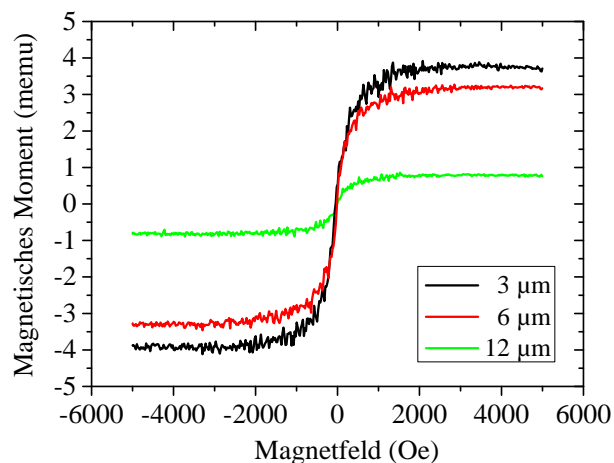


**Abbildung 4.4 FIB-Schnitt und REM-Visualisierung der 12 µm Referenzbeads zur Ermittlung der Tiefe und Homogenität der superparamagnetischen Ablagerungen in der äußeren Hülle.**



Dieses Ergebnis widerspricht der Darstellung des Herstellers. Die superparamagnetischen Domänen scheinen als Cluster aus der Beadoberfläche herauszuwachsen. Diese Eigenschaft bietet sich hervorragend als Referenz zu immunomagnetisch markierten Zellen an.

Die magnetischen Eigenschaften der Beads werden mit einem *Vibrating Sample Magnetometer* (VSM) der Firma Princeton Measurement Corporation charakterisiert. Die von S. Foner 1959 publizierte Messtechnik ermöglicht die Ermittlung des magnetischen Moments einer Probe mit einer Genauigkeit von  $10^{-5}$  bis  $10^{-6}$  emu [85]. Dabei wird die zu untersuchende Substanz an einem Stab zwischen den Polschuhen eines Elektromagneten fixiert und von einem statischen Feld senkrecht magnetisiert. Gleichzeitig wird der Stab in sinusförmige Vibrationen versetzt. Das oszillierende, magnetische Feld der Probe induziert eine Spannung in den Detektorspulen, die ausgelesen werden kann und sich proportional zu den magnetischen Eigenschaften der Probe verhält [85] [86]. Zur Probenvorbereitung der VSM-Messung der 3, 6 und 12  $\mu\text{m}$  Micromod Partikel werden je 20  $\mu\text{L}$  der unverdünnten Beadsuspension auf ein gereinigtes Si-Plättchen pipettiert und im Exsikkator getrocknet. Die Si-Dies werden mit einem Wachs des Herstellers an den Messstab fixiert, der direkt zwischen die Spulen in das externe Magnetfeld gefahren wird.



**Abbildung 4.5** Magnetisierungskurven der 3, 6 und 12  $\mu\text{m}$  Referenzanalyten ermittelt über eine VSM-Messung (Partikelkonzentrationen variieren in den 20  $\mu\text{L}$  Proben).

Abbildung 4.5 zeigt die Messung des magnetischen Moments der Referenzpartikel als Funktion des angelegten Magnetfeldes, aus der die Sättigungsmagnetisierung der Analyte bestimmt werden kann. Da alle Partikelsuspensionen vom Hersteller in einer Konzentration von  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  ausgegeben werden, variiert die Anzahl der Magnetpartikel in den 20  $\mu\text{L}$  Proben. Als Konsequenz zeigt die um 100-fach niedriger

konzentrierte Probe der 12  $\mu\text{m}$  Partikel das signifikant niedrigste magnetische Moment. Die Berechnung der Magnetisierung pro Referenzbead liefert mit  $7.84 \times 10^{-10}$  emu erwartungsgemäß den höchsten Wert bei den 12  $\mu\text{m}$  Analyten mit maximalem magnetischem Material. Die Gesamtmagnetisierung pro Gramm Partikel nimmt mit Zunahme des Durchmessers ab, wobei die 12  $\mu\text{m}$  Partikel mit  $0.8 \text{ emu g}^{-1}$  (Datenblatt:  $0.6 \text{ emu g}^{-1}$ ) und die 3  $\mu\text{m}$  Partikel mit  $7.4 \text{ emu g}^{-1}$  (Datenblatt:  $6.6 \text{ emu g}^{-1}$ ) ähnliche Werte zu den Angaben in den Datenblättern zeigen. Die 6  $\mu\text{m}$  Analyten weisen mit  $3.3 \text{ emu g}^{-1}$  einen  $\sim 50\%$  niedrigeren Wert bei der VSM-Messung auf (Datenblatt:  $5.8 \text{ emu g}^{-1}$ ). Die gemessenen Daten dienen als Grundlage zur Simulation der GMR-Messsignale für die Modellierung der Signalamplituden (vgl. Kapitel 7.1).

**Tabelle 4-3 VSM-Messung der 3, 6 und 12  $\mu\text{m}$  Micromod Partikel.**

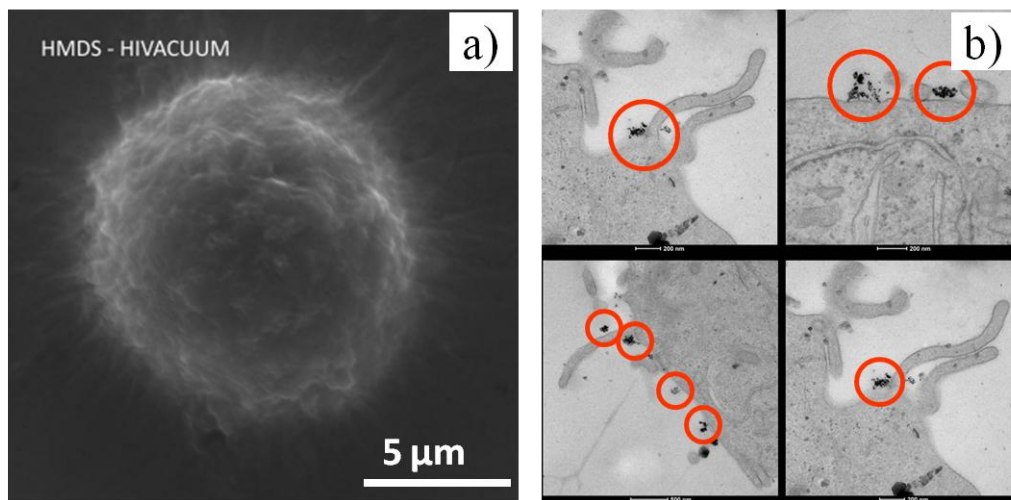
Beadtyp	Micromod Spezifikationen		VSM-Messung			
	Durchmesser ( $\mu\text{m}$ )	Magnetisierung (emu/g Partikel)	Konzentration (Anzahl/ $\mu\text{L}$ )	magn. Moment (memu)	Magnetisierung (emu/Partikel)	Magnetisierung (emu/g Partikel)
<b>3</b>		6.6	$1.6 \times 10^6$	3.70	$1.16 \times 10^{-10}$	7.4
<b>6</b>		5.8	$4.0 \times 10^5$	3.25	$4.06 \times 10^{-10}$	3.3
<b>12</b>		0.6	$5.1 \times 10^4$	0.80	$7.84 \times 10^{-10}$	0.8

## 4.2 Biologische Zellproben

Die Zellkultivierung und Charakterisierung der biologischen Analyte sowie der Inkubationsprozess mit spezifischen Antikörpern und superparamagnetischen Markern werden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Dr. Jacobus Bosch, Medizinische Klinik 5, Hämatologie und Internistische Onkologie, am Universitätsklinikum Erlangen durchgeführt. Für Messungen unter *in-vivo* Bedingungen in stabilisiertem Vollblut werden Blutproben gesunder Spender bereitgestellt, in die immunomagnetisch markierte Zellen unmittelbar vor der magnetischen Messung eingespielt werden. Eine Analyse mit einem Sysmex Hämatologie Analysator liefert die Angabe des Hämatokritwertes (zellulärer Bestandteil der Blutprobe), der in mikrofluiden Bedingungen sowohl die magnetische Anreicherung der markierten Zellen auf die Substratoberfläche, als auch die magnetophoretische Transportgeschwindigkeit über die Führungsstrukturen zum GMR-Sensor beeinflusst [87].

## FaDu-Tumorzellen

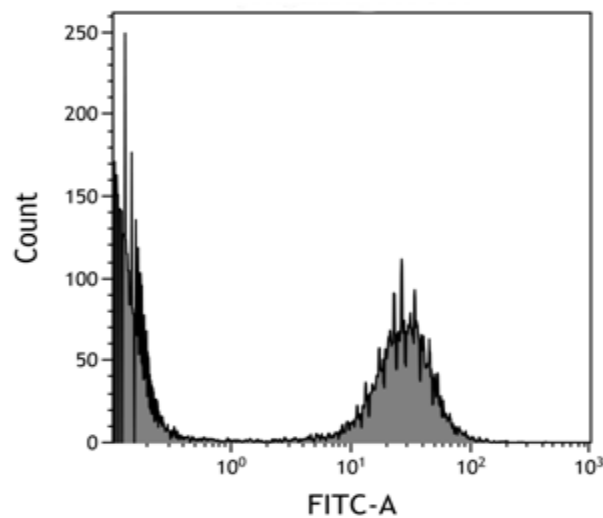
Die FaDu-Zelllinie wurde aus einem menschlichen Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx eines Patienten aus Kalkutta im Jahr 1968 isoliert und etabliert [88]. Abbildung 4.6 a zeigt eine REM-Aufnahme einer FaDu-Zelle, die mit Glutaraldehyd fixiert und unter Zugabe von Ethanol entwässert und getrocknet worden ist. Die Aufnahme, inklusive Probenvorbereitung, wurde an der University of Applied Life Science Vienna nach [89] durchgeführt.



**Abbildung 4.6** REM-Aufnahme einer fixierten und in Alkohol entwässerten FaDu-Tumorzelle (a). Eine Analyse mit dem Transmissionselektronenmikroskop zeigt die Oberfläche der superparamagnetisch markierten FaDu-Zellen (b). Die roten Markierungen heben die auf der Zelloberfläche verteilten Anhäufungen von magnetischen Nanopartikeln hervor. Die REM-Aufnahmen, inklusive der Probenvorbereitung, wurden an der University of Applied Life Science Vienna nach [89] durchgeführt.

Zur spezifischen Markierung der FaDu-Zellen mit superparamagnetischen Eisenoxid Nanopartikeln (engl. *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*, SPION) wird ein kommerzielles Labeling Kit (*Human EpCAM Positive Selection Kit*) der Firma Stemcell Technologies verwendet. Das EpCAM (*Ephitelial Cell Adhesion Molecule*, CD326) Oberflächenprotein der Tumorzelle dient dabei als Zielantigen zur spezifischen Antikörperbindung [90]. Die Zellen werden mit Trypsin von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst und in einer phosphatgepufferten Salzlösung gewaschen. Dabei nehmen die adhärenen Analyte ihre kugelförmige Gestalt an. In einem zweistufigen Markierungsprozess nach Vorschrift des Herstellers werden für je 30 Minuten bei 4°C zuerst die gegen das EpCAM-Protein gerichteten Antikörper mit den FaDu-Zellen inkubiert, bevor die Funktionalisierung mit den SPION erfolgt. Die Zellen liegen in PBS bei pH 7.4 vor, wodurch der osmotische Druck im Gewebe simuliert wird. Die

Transmissionselektronenmikroskop (TEM) Aufnahmen in Abbildung 4.6 b zeigen die Zelloberfläche von superparamagnetisch markierten FaDu-Zellen. Zur TEM-Analyse werden die Zellen in Glutaraldehyd fixiert, mit Ethanol entwässert und mit einem Epoxidharz vergossen, das in ~50 nm dicke Scheiben geschnitten wird [91]. Die roten Markierungen in den Aufnahmen heben die Ansammlungen der superparamagnetischen Nanopartikel auf der Zelloberfläche hervor.

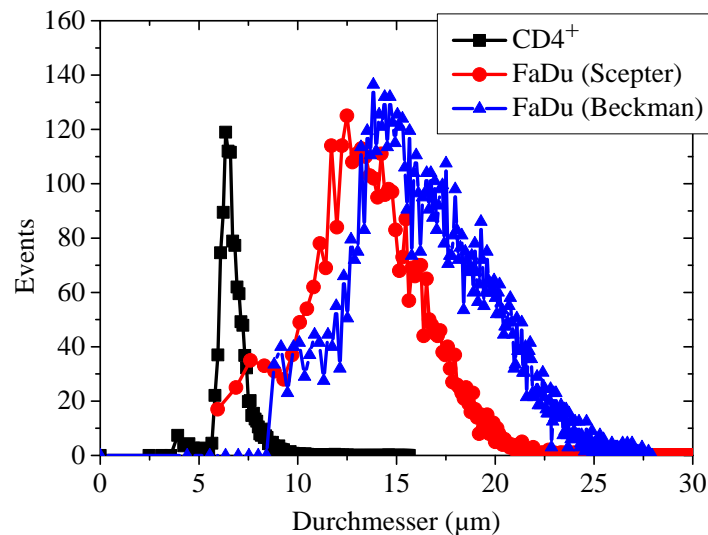


**Abbildung 4.7** Bewertung der Labelingeffizienz der EpCAM<sup>+</sup> FaDu-Tumorzellen mit superparamagnetischen Nanopartikeln, über eine zusätzliche FITC-Markierung.

Die Güte der EpCAM-Expression auf den EpCAM<sup>+</sup> FaDu-Zellen wird mittels optischer Durchflusszytometrie am Uniklinikum Erlangen ermittelt. Dazu wird ein Aliquot der magnetisch markierten Tumorzellen zusätzlich mit *Goat-Anti-Mouse* IgG-FITC (*Fluorescein Isothiocyanate*) fluoreszierenden, monoklonalen Antikörpern (Dianova) gefärbt. Parallel dazu wird eine EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*) Vollblutprobe mit dem *EasySep Lysis Buffer* (Stemcell Technologies) lysiert und in einem Verhältnis von 1:1 mit PBS verdünnt. Die markierten Zellen werden in einer Konzentration von  $50 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$  in die Suspension eingespielt und mit dem optischen Durchflusszytometer (FACS Canto II, BD Bioscience) analysiert. Abbildung 4.7 zeigt die Verschiebung der Fluoreszenzintensität der FITC-EpCAM<sup>+</sup> FaDu-Zellen in der hämolysierten Blutprobe bei einer Messung von 10,000 Einzelevents.

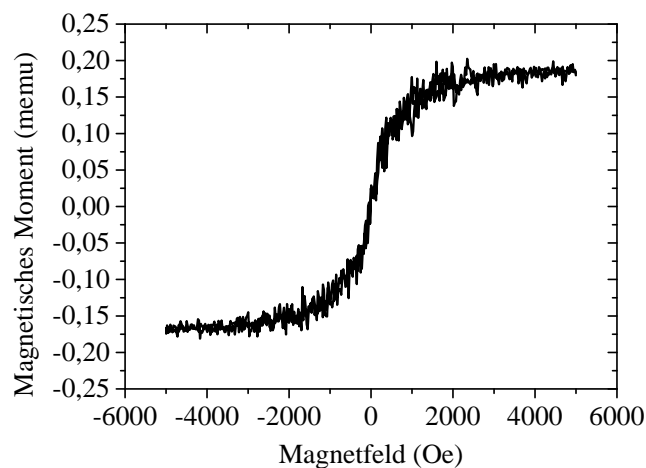
Die Messung der Größenverteilung der FaDu-Tumorzellen mit dem Beckman Coulter Z2 liefert eine breite Verteilung der Analyten von 12-20  $\mu\text{m}$  mit einem Mittelwert bei 16  $\mu\text{m}$  und einer *FWHM* von ~8.8  $\mu\text{m}$ . Im Gegensatz dazu zeigen die CD4<sup>+</sup> Helfer-T-Zellen eine scharfe Durchmesser-Verteilung mit einem Mittelwert von 6.5  $\mu\text{m}$  und einer Halbwertsbreite von 1.1  $\mu\text{m}$ . Bei der Betrachtung der *Cv*-Werte liegen die FaDu-Zellen

bei 24%, während die Immunzellen mit 7.3% um einen Faktor 3 homogenere Durchmesser besitzen. Im Vergleich zu den  $CD4^+$  ist die Verteilungsbreite der 12  $\mu\text{m}$  Referenzbeads von 6.8% nur unerheblich kleiner. Die Größenbestimmung der FaDu-Suspension mit dem *Handheld* Coulter Counter von Scepter liefert einen mittleren Zelldurchmesser von 13.5  $\mu\text{m}$ , was im Vergleich zur Messung mit dem Beckman Coulter Z2 eine Verschiebung der Verteilung um  $\sim 2.5$   $\mu\text{m}$  bedeutet (vgl. Kapitel 8.4).



**Abbildung 4.8** Größenverteilung der FaDu-Tumorzellen und der  $CD4^+$  T-Zellen.

Die Charakterisierung der magnetischen Eigenschaften der superparamagnetisch markierten FaDu-Tumorzellen wird analog zu den Referenzpartikeln mit einer VSM-Messung durchgeführt (vgl. Kapitel 4.1). Zur Probenvorbereitung werden 70  $\mu\text{L}$  einer hochkonzentrierten Zellsuspension ( $4 \times 10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ ) auf die gereinigten Si-Plättchen pipettiert und im Exsikkator getrocknet. Abbildung 4.9 zeigt die Auftragung des magnetischen Moments der Probe über das angelegte, externe Magnetfeld, wobei die graphisch ermittelte Sättigungsmagnetisierung der Probe bei 0.18  $\text{memu}$  liegt. Die Berechnung der Magnetisierung pro Zelle liefert einen durchschnittlichen Wert von  $6.43 \times 10^{-10}$  emu, der knapp unter der Magnetisierung eines 12  $\mu\text{m}$  Referenzanalyten liegt ( $7.84 \times 10^{-10}$  emu).



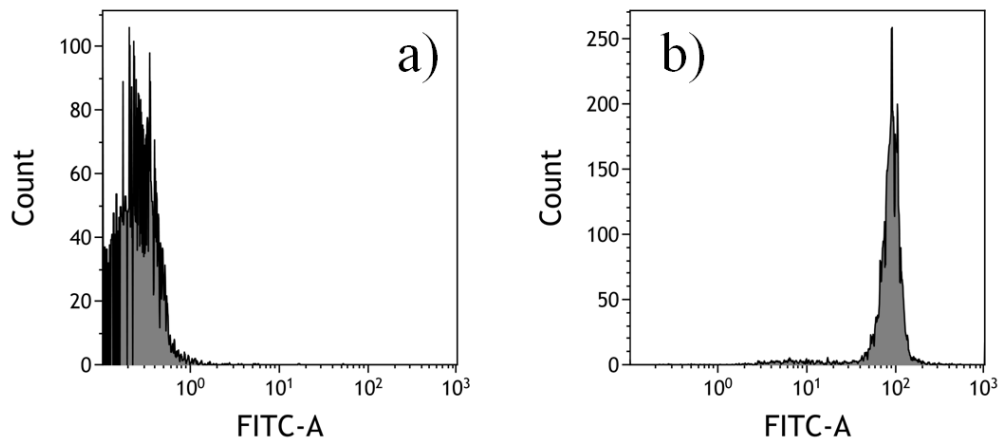
**Abbildung 4.9** Ermittlung der Sättigungsmagnetisierung der superparamagnetisch markierten FaDu-Tumorzellen über eine VSM-Messung.

### CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Die Helfer-T-Zellen (6-8  $\mu\text{m}$  Durchmesser) sind Teil des adaptiven Immunsystems und stimulieren sowohl Makrophagen als auch zytotoxische T-Zellen. Im Gegensatz zu den Monozyten und Makrophagen exprimieren Helfer-T-Zellen das Glykoprotein CD4 (*Cluster of Differentiation 4*) in hohem Maße und können daher von anderen CD4 exprimierenden Zellen diskriminiert werden. Das CD4-Molekül dient als Rezeptor für das HI-Virus (engl. *Human Immunodeficiency Virus*, HIV), welches über einen unbekanntem Mechanismus die Zahl der Helfer-T-Zellen verringert und AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) hervorruft. Über die spezifische Anzahl der im Blut enthaltenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen kann eine Aussage über Immunstatus und den Fortschritt der Erkrankung vorgenommen werden [73].

Zur magnetischen Messung werden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen über eine Leukapherese von gesunden Spendern gewonnen. Dabei wird die Blutprobe nach der Entnahme zentrifugiert und in seine einzelnen Fraktionen zerlegt, wobei die mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) entnommen und die restlichen Bestandteile direkt rückgeführt werden. Im Zuge einer Dichtegradientenzentrifugation lagern sich Erythrozyten im unteren Teil des Röhrchens ab, während die Thrombozyten auf Grund geringerer Sedimentationsgeschwindigkeit, im oberen Teil angereichert werden. Die Immunzellen als Zielzellen können so aus dem mittleren Teil des Röhrchens von der Probe isoliert werden. Die Aufreinigung der CD4<sup>+</sup> Zellen erfolgt über eine Negativ-Selektion mit einem Separationskit von Miltenyi. Dabei werden der Probe Biotin

funktionalisierte Antikörper gegen CD8 (Zytotoxische-T-Zellen), CD14 (Monozyten), CD19 (B-Zellen) und CD61 (Thrombozyten) zugegeben, über die eine Markierung mit Anti-Biotin Magnetbeads erfolgt. Die magnetisch markierten Zellen werden in einer Säule mit einem Ringmagneten von der Suspension isoliert, die nun sogenannte „Untouched“ CD4<sup>+</sup> Zellen, mit einer Reinheit von ~80% enthält.



**Abbildung 4.10** Indirekter Nachweis des spezifischen magnetischen Labelings der CD4<sup>+</sup> T-Zellen über die Zugabe eines zusätzlichen fluoreszierenden Antikörpers (FITC). Die Negativprobe der unmarkierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigt auch nach Zugabe der FITC-Antikörper keine Fluoreszenz (a). Bei den superparamagnetisch markierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist eine Verschiebung der Fluoreszenzintensität um zwei Zehnerpotenzen zu beobachten (b).

Zur Markierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit superparamagnetischen Nanopartikeln wird das *Human Whole Blood CD4 Positive Selection Kit* von Stemcell Technologies verwendet. Analog zum Labeling der FaDu-Tumorzellen werden in einem zweistufigen Prozess zuerst die Antikörper mit den Zielzellen inkubiert, bevor eine Funktionalisierung mit den SPION erfolgt.

Die Labelingeffizienz wird indirekt über eine zusätzliche Markierung mit goat-anti-mouse IgG-FITC monoklonalen, fluoreszierenden Antikörpern im optischen Durchflusszytometer (FACS Canto II, BD Bioscience) bewertet, die an die CD4-Antikörper binden. Abbildung 4.10 a zeigt die Negativkontrolle der unmarkierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Zugabe der FITC-Antikörper. Bei der analogen Messung der magnetisch markierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist eine Verschiebung der Fluoreszenzintensität um zwei Zehnerpotenzen zu beobachten, welche eine Kopplung der CD4-Antikörper mit superparamagnetischen Nanopartikeln an die Zielzellen bestätigt.

### 5. Integrierter Workflow

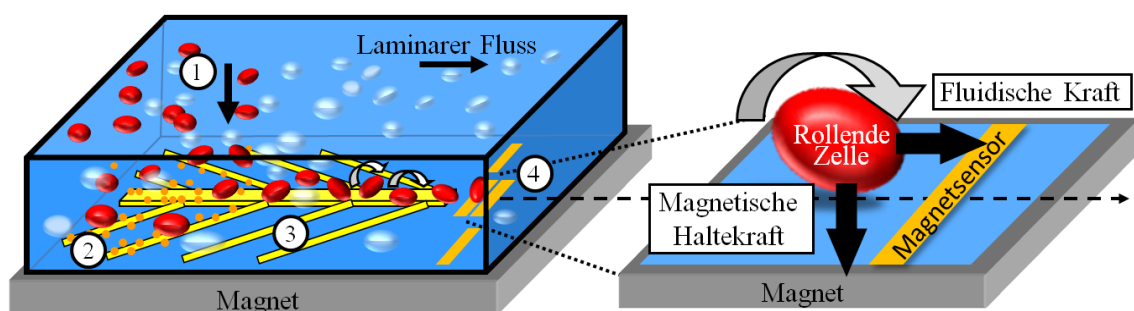
Im Folgenden wird das Konzept der magnetischen und hintergrundfreien Einzelzelldetektion in komplexen Medien, wie Liquor, Harn oder Vollblut beschrieben, das die Realisierung eines POC nicht-optischen Durchflusszytometers mit integrierter Probenvorbereitung ermöglichen soll. Der Einsatz eines externen Permanentmagneten in Kombination mit Magnetophoresestructuren in einem linearen Mikrofluidikkanal erlaubt eine *in-situ* Zellanreicherung an der Substratoberfläche, Zellführung sowie Filterung der ungebundenen, magnetischen Marker. Durch das Abrollen der magnetisch markierten Zellen über die magneto-resistiven Sensorelemente wird ein charakteristisches Signalmuster generiert. Die Laufzeitinformation der magnetischen Analyte dient zur Berechnung der Zellfließgeschwindigkeit und des magnetischen Zelldurchmessers. Damit wird in dieser Arbeit ein integrierter *Workflow* dargestellt, der mit Ausnahme des Inkubationsschrittes alle Funktionen für eine magnetische Durchflusszytometrie beinhaltet.

#### 5.1 Methodik

Der Schlüssel zur Realisierung eines miniaturisierten Systems zur Einzelzelldetektion ist die Kombination aus zwei etablierten Technologien: GMR-Sensoren, als nicht-optische Ausleseeinheiten [92], sowie immunomagnetische Zellanreicherung und Separation als Goldstandard in der Probenaufreinigung [93]. Abbildung 5.1 illustriert schematisch den *Workflow* der magnetischen Einzelzellmessung, mit Ausnahme der Analytmarkierung. Die vier Teilschritte, Zellanreicherung (1), Filtern von Überschussmarker (2), Zellfokussierung (3) und die magneto-resistive Einzelzelldetektion (4) erfolgen kontinuierlich im unverdünnten Vollblut in einem einzigen Mikrofluidikkanal. Die Zellsuspension mit den superparamagnetisch markierten Analyten (rote Kugeln) wird unter definiertem Volumenstrom in den linearen Kanal eingeleitet, der mit einer Breite von 700  $\mu\text{m}$  und einer Höhe von 150  $\mu\text{m}$  um ein Vielfaches größer ist als die Analytdurchmesser. Diese Dimensionen dienen zur Minimierung des Drucks im Kanal, um Deformationen der Zellen zu vermeiden, erhöhen die Durchsatzrate und ermöglichen Messungen von nicht hämolysierten Vollblutproben, ohne den Kanal zu verstopfen. In einem ersten Schritt werden die stochastisch verteilten, magnetischen Analyte im Gradientenfeld eines unter der Fluidik platzierten NdFeB-Permanentmagneten, an der Substratoberfläche angereichert. Je nach



gewähltem Abstand zwischen Magnet und Si-Chip wird ein vertikales Magnetfeld  $H_{ext}$  von 40 bis 220 mT generiert. Die nicht markierten zellulären Bestandteile der Vollblut-Probe (weiße Kugeln; hauptsächlich Erythrozyten) erfahren keine Beeinflussung durch  $H_{ext}$  und haben daher keine Relevanz für die magnetische Messung. Die *in-situ* Zellanreicherung über das Gradientenfeld des Magneten dient als Grundvoraussetzung für das magnetische Messprinzip, da die Sensitivität eines magnetoresistiven Sensors mit der dritten Potenz der Entfernung des Analyten zum Sensorelement abnimmt [25]. Dieser magnetisch kontrollierte Abstand zwischen Analyt und Messelement ermöglicht eine nicht-stochastische Zelldetektion.



**Abbildung 5.1** Integrierter *Workflow* der magnetischen TOF-Einzelzelldetektion in Vollblut: (1) *In-situ* magnetische Anreicherung von superparamagnetisch markierten Analyten (rote Kugeln) im Gradientenfeld eines externen NdFeB-Permanentmagneten, (2) *in-situ* Filtration von ungebundenen magnetischen Nanopartikeln (orange Punkte) auf einer ferromagnetischen Ni-Chevron-Struktur (gelbe Streifen), (3) *in-situ* magnetophoretische Fokussierung der Analyte im laminaren Flussprofil auf dem Chevron-Pattern zur Mitte des Fluidikkanals, (4) magnetoresistive Einzelzellerfassung mit GMR-Sensoren (orange Streifen entsprechen einer GMR-Wheatstone Brückenordnung). Unter Einfluss der magnetischen Haltekraft, der magnetophoretischen Kraft des Ni-Chevrons und der Fluidreibungskraft wird eine Rollbewegung der superparamagnetisch markierten Analyte über die Substratoberfläche generiert.

Die mittig im Fluidikkanal liegenden GMR-Sensorelemente sind mit einer Länge von  $30\ \mu\text{m}$  und einer Breite von  $2\ \mu\text{m}$  an die Dimensionen der zellulären Analyt adaptiert, um einen maximalen magnetoresistiven Effekt beim Überrollen zu generieren. Ferromagnetische Fischgrätenstrukturen aus Nickel werden genutzt, um die Zellen zur Kanalmitte zu führen. Im Gegensatz zur magnetophoretischen Zellseparation [94], [95], [18] wird dieses Prinzip hier zur *in-situ* Fokussierung der magnetischen Analyt eingesetzt. Durch ein sich einstellendes Gleichgewicht im laminaren Strömungsprofil des Mikrofluidikkanals zwischen der Stokes Reibung  $F_d$ , der magnetischen Haltekraft  $F_m$  und der magnetophoretischen Kraft  $F_{mag}$ , die den Analyten eine Richtungsänderung entlang der Fischgrätenbahnen aufzwingt, beginnen die markierten Zellen am

Kanalboden zu rollen. Dies ist vergleichbar mit den Bedingungen in unseren Blutgefäßen, wo Immunzellen entlang der Endothelzellen abrollen [96].

Die laminaren Strömungsbedingungen im Kanal sind dabei eine Grundvoraussetzung für die *in-situ* magnetische Anreicherung sowie für die magnetophoretische Fokussierung und somit für die nicht-stochastische magnetische Einzelzelldetektion. Zur Bewertung des Turbulenzverhaltens und der Strömungsform einer Flüssigkeit in einem mikrofluidischen Kanalsystem wird die dimensionslose Reynolds-Zahl ( $Re$ ) berechnet, die Trägheitskräfte und Reibungskräfte des Systems ins Verhältnis setzt [97]. Unterschreitet die ermittelte  $Re$ -Zahl einen kritischen Wert  $Re_{krit}$  liegt eine laminare Strömung vor, bei Überschreitung verhält sich das Fluid im Kanal turbulent. Wibel et.al. [98] dokumentiert einen Umschaltbereich zwischen laminarer und turbulenter Strömung im Bereich  $1900 \leq Re \leq 2220$  in Fluidikkanälen mit einem hydraulischen Durchmesser  $D_h$  von 133  $\mu\text{m}$ , ähnlich den aus der Literatur bekannten Werten unter makroskopischen Bedingungen von  $\sim 2100$  [99]. Als Berechnungsgrundlage für die  $Re$ -Zahl dient

$$Re = \frac{\rho * v_m * D_h}{\eta} \quad \text{mit } D_h = \frac{2wh}{w + h} = \frac{4A}{U} \quad (5.1)$$

wobei  $\rho$  die Dichte des Fluids,  $v_m$  die mittlere Fluidgeschwindigkeit und  $\eta$  die dynamische Viskosität darstellen. Anstelle der Gesamtlänge für Messungen in Rohrleitungen wird bei rechteckigen Kanalsystemen der hydraulische Durchmesser  $D_h$  eingesetzt, der als vierfache Querschnittsfläche gegen den Umfang definiert ist [99]. Die mittlere Fluidgeschwindigkeit wird aus dem Verhältnis von Volumenstrom  $Q$  und der Querschnittsfläche des Kanals ermittelt. Das verwendete Kanaldesign mit Dimensionen von 700 x 150  $\mu\text{m}$  weist ein  $D_h$  von 247  $\mu\text{m}$  auf. Unter Annahme einer dynamischen Viskosität von 1.0 mPas ( $\text{H}_2\text{O}$ , 20°C) und einer Dichte von 0.998  $\text{g cm}^{-3}$ , bei maximalem Volumenstrom von 3  $\mu\text{L s}^{-1}$  und daraus ermittelter  $v_m$  von 28.6  $\text{mm s}^{-1}$  ergibt sich eine  $Re$  Zahl von 7, die laminare Bedingungen im Kanalsystem bestätigt.

Zusätzlich zur magnetophoretischen Zellführung ermöglichen die Ni-Strukturen eine *in-situ* Filtration von ungebundenen, magnetischen Markern. Superparamagnetische Nanopartikel im Durchmesserbereich von 200 nm werden an den ferromagnetischen Streifen zurückgehalten, da die magnetophoretische Haltekraft größer ist als die fluidische Zugkraft im laminaren Fluss. Dieser Mechanismus dient als wichtiger Baustein zur hintergrundfreien, rauscharmen, magneto-resistiven Zelldetektion, da im Inkubationsprozess immer ein Überschuss an spezifischen Antikörpern und magnetischen Nanopartikeln zugegeben wird, mit dem Ziel 100% der Zielzellen zu

markieren. Schließlich erreichen die fokussierten Zellen, wie Perlen auf einer Kette, den magnetoresistiven Sensor und werden dort einzeln detektiert.

Die Sensorelemente sind in einer Wheatstone Brückenarchitektur verschaltet, um Offset-Effekte und Temperatureinflüsse zu vermeiden [100]. Das detektierte Messsignal wird über die Auslenkung der Brückenspannung aus ihrem Nullabgleich berechnet, mit der Versorgungsspannung  $V_{cc}$  und den Widerständen  $R_1$  und  $R_2$  bzw.  $R_3$  und  $R_4$  der zwei parallelen Spannungsteiler der Brückenschaltung (Formel 5.2).

$$\Delta V_{Signal} = V_{sig,high} - V_{sig,low} = \left[ \left( \frac{R_1}{R_1 + R_2} \right) - \left( \frac{R_3}{R_3 + R_4} \right) \right] * V_{cc} \quad (5.2)$$

Die magnetische Zellfokussierung ist dabei der Schlüssel zur Durchführung einer absoluten Zellzählung bei hoher Sensitivität, mit einer einzigen Sensoreinheit, anstatt eines aufwendigen Sensorarrays über die gesamte Kanalbreite. Das hohe, externe Magnetfeld des Permanentmagneten garantiert eine definierte Abstandskontrolle der Analyte zum GMR-Sensor, die neben der Detektierbarkeit der Zellen auf Grund der hohen Sensitivität im Nahbereich des Sensors, auch eine statistische Evaluation des Einzelzellsignals über eine TOF-Analyse ermöglicht.

## 5.2 Magnetophoretisches Anreicherungsprinzip

Das *in-situ* Anreicherungsprinzip zur Durchführung einer magnetoresistiven Einzelzelldetektion setzt sich aus zwei Teilschritten zusammen: (1) Die magnetische Anreicherung auf das Substrat in einem Gradientenfeld und (2) die magnetophoretische Zellfokussierung zur Kanalmitte, um eine sensitive Detektion der Analyte auf einem GMR-Sensor zu realisieren, der mit einer Länge von  $30 \mu\text{m}$  die Dimensionen der Zielanalyte nur minimal überschreitet. Abbildung 5.2 a zeigt einen Querschnitt der stochastisch verteilten, magnetischen Analyte (rote Kugeln) im Fluidikkanal. Die superparamagnetisch markierten Zellen bilden unter Einfluss von  $H_{ext}$  ein Dipolfeld aus, das mit

$$\vec{B}(\vec{r}) = \frac{\mu_0}{4\pi} \left( \frac{3(\vec{r}\vec{m}) * \vec{r}}{|\vec{r}|^5} - \frac{\vec{m}}{|\vec{r}|^3} \right) \quad (5.3)$$

beschrieben werden kann, wobei  $\mu_0$  die magnetische Feldkonstante,  $m$  das magnetische Moment und  $r$  den Ortsvektor darstellt [101].

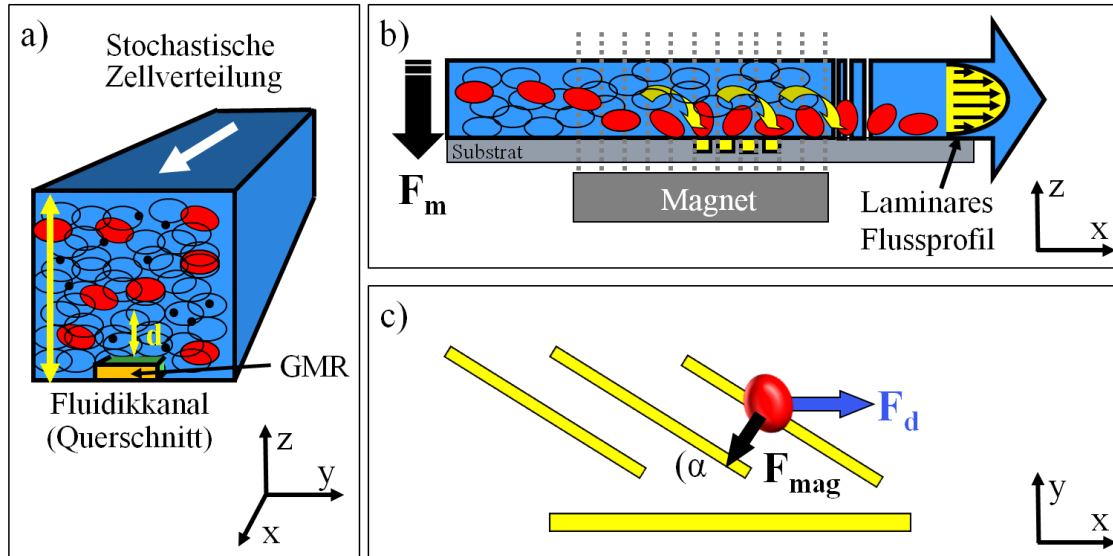


Abbildung 5.2 Magnetisches Prinzip der Zellanreicherung. Die stochastisch verteilten, superparamagnetisch markierten Analyte bilden im externen Magnetfeld einen Dipol aus und werden magnetisch über das Gradientenfeld des Permanentmagneten an die Substratoberfläche angereichert (a&b). Die Fokussierung in die Kanalmitte erfolgt über Magnetophoresenstrukturen, die fischgrätenförmig am Kanalboden angeordnet sind (c).

Im Gradientenfeld des externen Permanentmagneten wird bei Eintritt der Analyte in den Mikrofluidikkanal eine Kraft  $F_m$  auf den magnetischen Dipol ausgeübt, die zu einer Anreicherung an der Substratoberfläche in Z-Richtung führt (Abbildung 5.2 b).

$$\vec{F}_m = \vec{m}_{analyt} \hat{E} * \nabla \vec{B} \quad (5.4)$$

Die Kraft  $F_m$  wird in Formel 5.4 definiert, wobei  $m_{analyt}$  das magnetische Moment der Analyte und  $B$  das Magnetfeld des Permanentmagneten mit  $\hat{E}$  als Einheitsvektor in Richtung von  $B$  beschreibt [94]. Die Analytbewegung in Flussrichtung (X-Richtung) wird über die Fluidreibungskraft  $F_d$  beschrieben, die vom Medium auf die Analyte ausgeübt wird. Für sphärische Partikel in Kanalsystemen mit niedrigen Reynoldszahlen kann  $F_d$  über die Stokes Reibung beschrieben werden [95], [32],

$$\vec{F}_d = 3\pi\eta d_{hydro}(v_m - v_a) \quad (5.5)$$

wobei  $\eta$  die Viskosität der Analytsuspension,  $d_{hydro}$  den hydrodynamischen Durchmesser und  $v_m - v_a$  die Geschwindigkeitsdifferenz zwischen Medium und superparamagnetisch markierter Zelle darstellt. Bei konstanten Kanaldimensionen kann  $F_d$ , während der magnetischen Messung, über den frei einstellbaren Volumenstrom  $Q$  gesteuert werden.

Die Fokussierung in die Kanalmitte (Abbildung 5.2 c, Y-Richtung) wird mittels der ferromagnetischen *Chevron* Ni-Strukturen realisiert, die an den Strukturkanten einen hohen Feldgradienten  $\nabla B_{Ni}$  ausbilden. Abbildung 5.2 c zeigt eine schematische Darstellung der Fokussierungsstrukturen und der resultierenden Kraft  $F_{mag}$  auf die magnetisierten Analyte.

$$\vec{F}_{mag} = \frac{4\pi}{3} M r^3 \nabla B_{Ni} \quad (5.6)$$

$F_{mag}$  berechnet sich aus dem Analytvolumen, der Magnetisierung  $M$  der Analyte und dem Feldgradienten der ferromagnetischen Stege. Formel 5.7 stellt die Ungleichung zur Analytbewegung dar, bei der eine Führung im laminaren Fluss entlang der Magnetophorese garantiert wird [95].

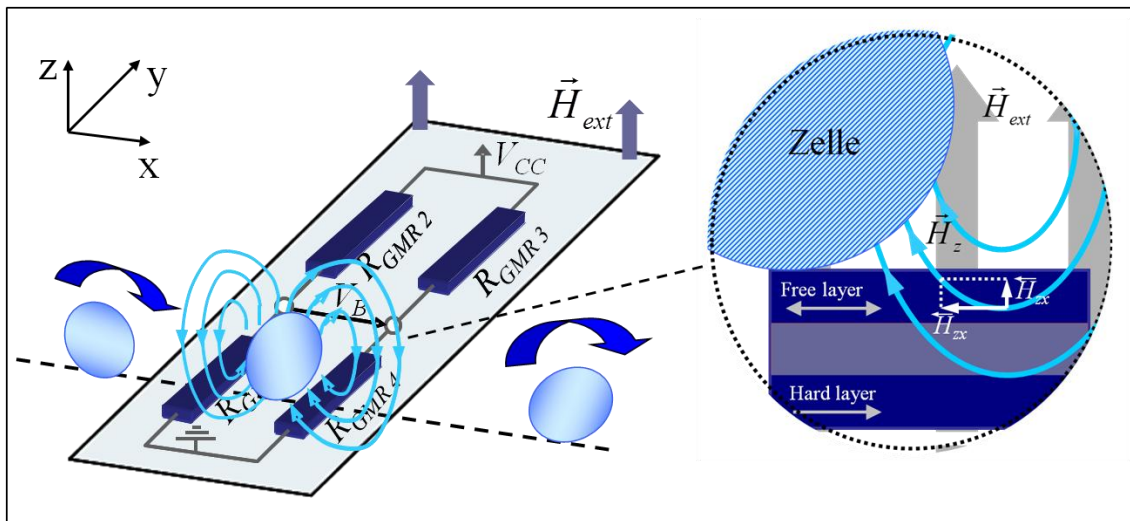
$$\vec{F}_{mag} > \vec{F}_d * \sin \alpha \quad (5.7)$$

Mit der Wahl geeigneter Parameter ( $H_{ext}$ ,  $Q$ ) kann so bei Analyten mit unterschiedlichen Magnetisierungen eine magnetophoretische Fokussierung mit hoher Wiederfindungsrate für die Einzelzelldetektion etabliert werden.

### 5.3 GMR-Signalmuster

Das Magnetfeld des Permanentmagneten  $H_{ext}$  dient zur Anreicherung der magnetisch markierten Analyte an der Substratoberfläche und zur Ausbildung eines magnetischen Dipolfeldes um die superparamagnetisch markierten Analyte. Die magnetoresistiven Sensoren sind, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, unempfindlich gegenüber der orthogonal zur Substratoberfläche ausgerichteten Feldkomponente  $H_z$  des externen Permanentmagneten. Die Feldkomponenten in X- und Y-Richtung können nahezu ausgeblendet werden, indem der externe Magnet während der Aufnahme der Hysteresekennlinie präzise unter dem Chip platziert wird. Die in Flussrichtung (X-Richtung) sensitiven GMR-Sensoren erfassen die magnetischen Analyte über die *in-plane* Streufeldkomponente  $H_{zx}$  des Dipolfeldes, das sich im externen Feld des Permanentmagneten auf Grund von Feldverzerrungen, um den superparamagnetisch markierten Körper, ausbildet [33]. Abbildung 5.3 zeigt eine schematische Darstellung des Sensor-Layouts mit einer superparamagnetisch markierten Zelle, die über eine GMR-Halbbrücke rollt. Die Position des Analyten beim Überstreichen eines

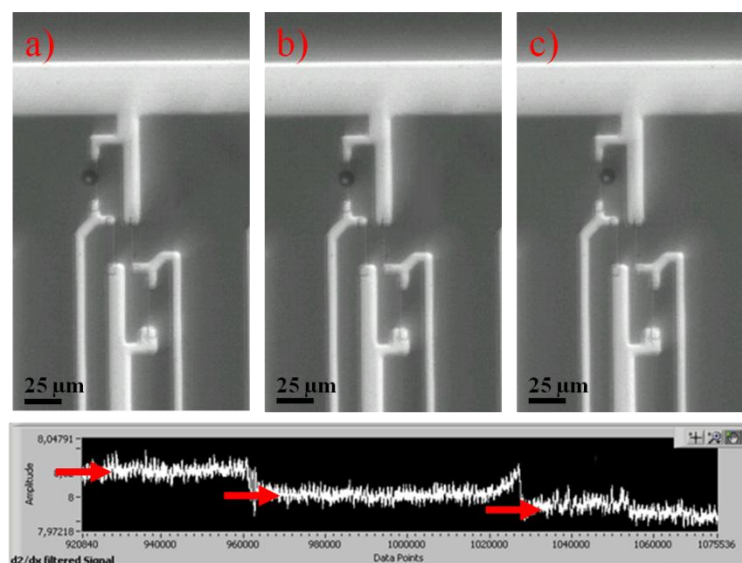
Widerstandselements wird im Querschnitt herausgehoben und indiziert die Ausrichtung der funktionellen Schichten unter Einfluss der signalgebenden Dipolkomponente  $H_{zx}$ .



**Abbildung 5.3** Schematische Darstellung der GMR-Wheatstone Brückengeometrie und einer superparamagnetisch markierten Zelle, die zwei Widerstände der Anordnung überstreicht. Die Vergrößerung verdeutlicht die Beeinflussung der Dipolkomponente der Zelle in X-Richtung auf das weichmagnetische Schichtsystem des magnetoresistiven Multilagensystems.

Überstreicht ein magnetisch markierter Analyt ein GMR-Sensorelement dreht die Messschicht, abhängig von der Polarität des Dipolfeldes der Zelle, in antiparallele bzw. parallele Konfiguration zur Referenzschicht, wodurch eine Änderung des Widerstands generiert wird. Durch die Ausrichtung der Referenzschicht entlang der Flussrichtung, orthogonal zur weichmagnetischen Messschicht, wird eine Linearisierung der Sensorkennlinie erreicht, die eine Detektion von  $H_{zx}$  in positive sowie negative X-Richtung ermöglicht. In Abbildung 5.4 wird die zeitkorrelierte Messung der Signalantwort eines GMR-Einzelements in Abhängigkeit der spezifischen Position eines  $12\ \mu\text{m}$  Micromod Referenzbeads zur Validierung der Sensorantwort dargestellt. Die Brückenreferenzspannung weist ein Maximum bzw. Minimum auf, wenn sich das Bead kurz vor bzw. nach dem Widerstandselement befindet. Keine Widerstandsänderung ist zu beobachten, wenn der Referenzanalyt genau über dem Streifen positioniert ist, da sich in diesem Fall, bei homogener Magnetisierung des Analyten, die X-Komponenten des Streufeldes um die Zelle kompensieren. Somit liegt weder eine parallele, noch eine antiparallele Konfiguration der funktionellen Schichten vor.

Durch Kombination von parallelen bzw. diagonalen Einzelwiderständen der Wheatstone Brückenordnung können charakteristische Signalmuster erzeugt werden. Bei der Analyse der Messergebnisse werden diese Signalfolgen gezielt ausgewertet, um eine zu hohe Gewichtung der Signalamplitude als Auswertekriterium zu vermeiden. Ein einfaches schwellwertbasiertes Auswerteverfahren birgt die Gefahr falsch-positive Signale zu erfassen und die Absolutzellzählung zu verfälschen. Bei der Messung spezifisch markierter, biologischer Proben tritt eine natürliche Schwankung der Signalamplitude auf, die auf Variationen der Zelldurchmesser, der Anzahl der Epitope pro Zelle und der Bindungsspezifität der Antikörper bei verschiedenen Zelltypen zurückzuführen ist [102].

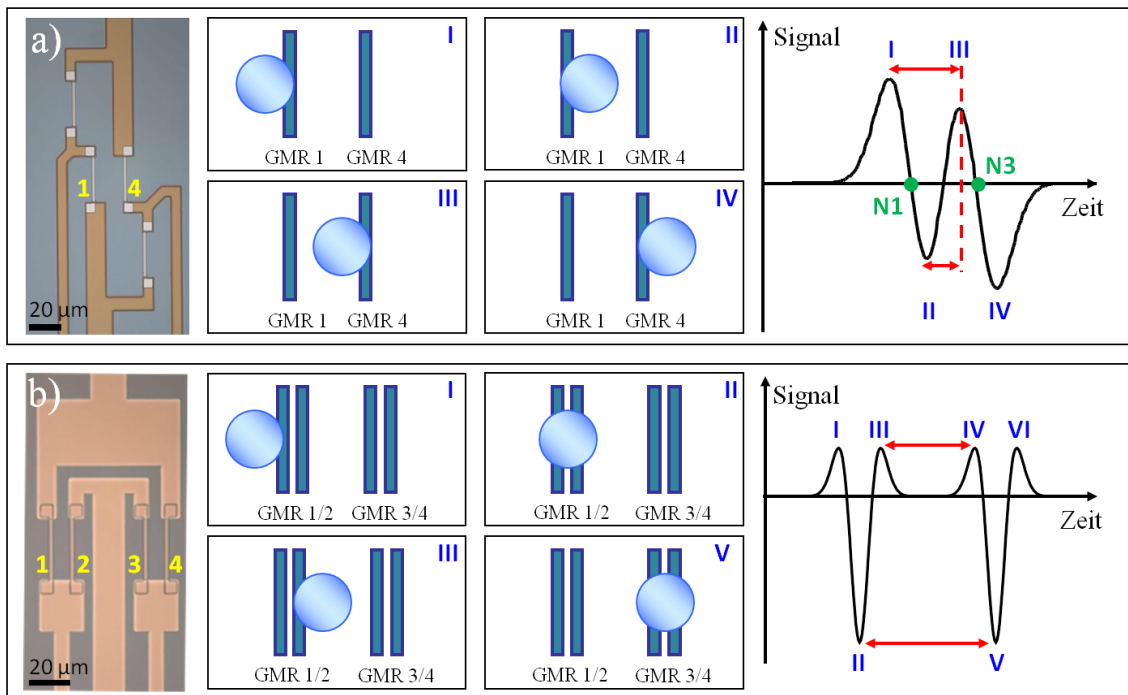


**Abbildung 5.4** Zeitkorrelierte Signalantwort eines 12 µm Referenzanalyten bei Überstreichen eines GMR-Einzelwiderstands in Abhängigkeit der Position des Analyten. Bei Positionierung des Beads kurz vor bzw. nach dem Sensorstreifen ist ein Maximum bzw. Minimum im Ausgangssignal zu beobachten (a&c). Sitzt der superparamagnetisch markierte Analyt genau auf dem GMR-Element liegt keine Widerstandsänderung vor (b).

Abbildung 5.5 fasst die zwei, in dieser Arbeit verwendeten Sensoranordnungen mit entsprechender Signalfolge und zugeordneten Zellpositionen zusammen. Das diagonale Layout (a) nutzt nur die halbe Wheatstone Brücke und kombiniert zwei diagonale Widerstandselemente, die jeweils exakt gleiche Signalverläufe generieren und gekoppelt in einem alternierenden 4-Peak-Signal resultieren. Mit abnehmendem Abstand der beiden signalgebenden GMR-Sensoren bei konstantem Analytdurchmesser überlagern die Einzelsignale, wodurch die Signalstärke der mittleren Peaks (II und III) abnimmt.

Im Gegensatz dazu kombiniert das parallele Layout (b) zwei Paare paralleler Brückenwiderstände, die bei Überstreichen einer magnetisch markierten Zelle ein

charakteristisches 6-Peak-Signal bilden. Zwei parallele Brückenelemente liefern zueinander invertierte Signale, die bei geeigneter Wahl des Abstandes, im Vergleich zur diagonalen Brückenordnung (II und V), bis zu einem doppelten Signalhub führen können.



**Abbildung 5.5** Korrelation der charakteristischen Signalantworten bei diagonalem (a) und parallelem (b) Sensordesign mit der spezifischen Zellposition bezüglich der GMR-Widerstandselemente.

Zusammengefasst wird ein signifikantes Signalmuster zur Einzelzeldetektion durch Kombination einzelner Brückenwiderstände generiert. Mit der parallelen Brückenkonfiguration, unter Verwendung der gesamten Wheatstone Brücke, wird eine Messung bei höchstem Signal-Rausch-Verhältnis (*signal-to-noise ratio*, SNR) ermöglicht, während mit der diagonalen Ausführung, bei nur zwei aktiven Sensorelementen, maximaler Durchsatz realisiert wird. Zusätzlich liefert das charakteristische Signalmuster – der Fingerprint einer Einzelzelle - bei bekanntem Abstand der GMR-Elemente, zellspezifische Informationen, wie zum Beispiel die Analytgeschwindigkeit bei Überstreichen der Zelle.

Grundvoraussetzung für die Geschwindigkeitsberechnung ist eine homogene Flussgeschwindigkeit im Kanal, die durch das pulsationsfreie neMESYS Spritzenpumpensystem gewährleistet ist sowie eine homogene Magnetisierung der Analyte. Unter dem Einfluss der Z-Komponente des Magnetfeldes generiert die



homogene Verteilung der Superparamagneten auf der Zelloberfläche näherungsweise einen Dipol, der zu diskutierte, charakteristischen Signalmuster führt. Bei einer sehr geringen Belegungsdichte wird ein Multipol generiert, was in einem komplexeren Signalmuster resultiert. Damit dient das Muster als Qualitätsmerkmal für die Markierung der Zellen.

$$v_a = \frac{d_{GMR} * samplerate}{\text{Datenpunkte } (N1N3)} \quad (5.8)$$

Über die Datenpunkte zwischen den Nullstellen  $N1$  und  $N3$  der Einzelsignale (vgl. Abbildung 5.5 a), die den Zellpositionen direkt über den Widerstandselementen entsprechen und dem definierten Abstand der zwei GMR Elemente  $d_{GMR}$ , kann für das Diagonalsignal die Analytgeschwindigkeit  $v_a$  ermittelt werden. Analog dazu werden für das parallele Sensordesign der Abstand der beiden Widerstandspaare zueinander mit dem zeitlichen Verlauf der dominanten Peaks II und V korreliert. Die zum Analytdurchmesser proportionale Zellgeschwindigkeit dient neben dem charakteristischen Einzelzellpattern als zusätzliches Kriterium, um rheologische Einflüsse *in-situ* für jedes Zellevent zu bestimmen.

#### 5.4 Simulation der GMR-Signalantwort

Zur theoretischen Analyse der magnetoresistiven Signalausbildung wird ein Simulationsskript, unter der Verwendung der *Open-Source* Softwareoberfläche Scilab, erstellt. Um nahe am Anwendungsfall zu bleiben, wird eine Zelle als sphärischer Körper mit einer frei wählbaren Anzahl an superparamagnetischen Nanopartikeln bestückt, wobei jedes Dipolfeld eines Nanopartikels einzeln betrachtet und aufsummiert wird. So wird eine Analyse der Signalausbildung bei geringer Epitopendichte auf der Zelle ermöglicht.

Für die Erstellung des Skripts wird eine Gleichverteilung des exprimierten Antigens an der Zelloberfläche angenommen. G. Marsaglia stellte 1972 eine effiziente Methode zur Bestimmung gleichverteilter Koordinaten auf einer Kugeloberfläche vor [103], welche für die Simulation implementiert wurde. Diese basiert auf der Wahl zweier im Wertebereich  $[-1;1]$  gleichverteilter Variablen  $V_1$  und  $V_2$ , welche für  $S = V_1^2 + V_2^2 < 1$  akzeptiert werden. Zur Berechnung der gleichverteilten Koordinaten muss für beide Variablen gelten:

$$\begin{aligned}
 x &= 2V_1 * \sqrt{1 - S} \\
 y &= 2V_2 * \sqrt{1 - S} \\
 z &= 1 - 2S
 \end{aligned}
 \tag{5.9}$$

Die Analytantwort über einem magnetoresistiven Element berechnet sich aus der Streufeldkomponente des magnetischen Dipols in Flussrichtung der Zelle. Dabei wird das gemittelte Dipolfeld über die Sensorfläche in X-Richtung für jeden Nanopartikel zu dem Gesamtfeld  $B_{sig}$  aufaddiert. Die Sensitivität des GMR-Sensors  $S_{GMR}$  wird über die Steigung der Kennlinie im linearen Bereich definiert. Die Signalantwort  $V_{sig}$  der Zelle eines Einzelwiderstands der Wheatstone Brückenordnung kann schließlich über die Formel eines einfachen Spannungsteilers berechnet werden.

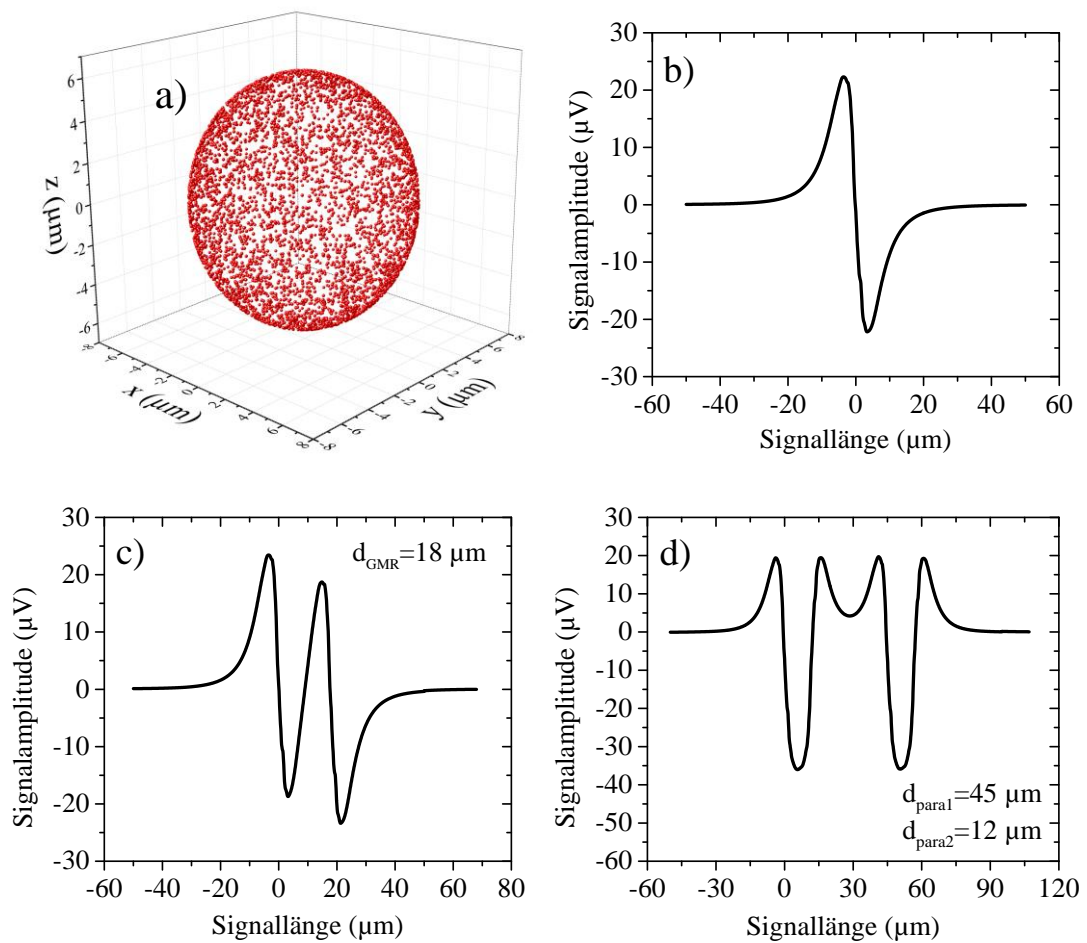
$$V_{sig} = \left( \frac{R_{sig}}{R + R_{sig}} \right) * V_{cc} - \frac{V_{cc}}{2}
 \tag{5.10}$$

mit

$$R_{sig} = B_{sig} * \frac{S_{GMR}}{100\%} * R + R
 \tag{5.11}$$

Der Widerstand  $R$  beschreibt ein GMR-Element im magnetischen Nullfeld und  $V_{cc}$  die applizierte Versorgungsspannung der Wheatstonebrücke. Eine Kombination von mehreren GMR-Widerstandselementen der Wheatstonebrücke wird über eine Verschiebung der definierten Kopie des Ursprungssignals erreicht.

Abbildung 5.6 zeigt Simulationsergebnisse mit einer  $12 \mu\text{m}$  Kugel, die mit 5,000 Nanopartikeln homogen bedeckt ist (a) und über ein  $30 \times 2 \mu\text{m}$  GMR-Widerstandselement bewegt wird (b). Die Addition der Einzelsignalantworten führt, bei der Kombination von zwei diagonalen GMR-Streifen zu dem in Kapitel 5.3 diskutierten, charakteristischen 4-Peak-Signal (c) und zu einem 6-Peak-Signalmuster, unter Verwendung der gesamten Wheatstonebrücke, bei Kombination der parallelen Brückenelemente (d). Die Simulation bestätigt die theoretischen Überlegungen in Kapitel 5.3 zur Ausbildung der magnetoresistiven Signale.



**Abbildung 5.6** Scilab Simulation der magnetischen Erfassung einer in der Außenhülle magnetisierten Kugel mit magneto-resistiven Sensorstreifen. Ein spezifisch markierter, biologischer Analyt wird über eine  $12 \mu\text{m}$  Kugel mit einer homogenen Verteilung von 5,000 magnetischen Nanopartikel ( $200 \text{ nm}$  Durchmesser) nachgebildet (a). Simulationsergebnisse über ein GMR-Einzelement (b) und über eine Kombination von zwei bzw. vier GMR-Widerstandselementen, die in den charakteristischen 4 bzw. 6-Peak-Signalmustern resultieren (c&d).

### 6. Optimierung des Messsystems zur Einzelzelldetektion

Im Zuge meiner Diplomarbeit [74] wurde die prinzipielle Realisierbarkeit eines magnetischen Durchflusszytometers mit Micromod Referenzbeads erbracht. Unspezifisch gelabelte Raji-Zellen, etabliert aus einer humanen Tumorzelllinie, die von einem Burkitts-Lymphom abstammt [104], konnten stochastisch in Pufferlösungen detektiert werden. Ziel dieses Kapitels ist die Adaptierung, der in Kapitel 3 vorgestellten Einzelkomponenten des Sensorsystems, zur kontinuierlichen, nicht-stochastischen Messung von spezifisch markierten, biologischen Zellen in Vollblut sowie zur statistischen Validierung des Messprinzips mit den Micromod Referenzanalyten. Eine signifikante Erhöhung der GMR-Sensitivität, kombiniert mit der Optimierung des Brückenlayouts, ist der Schlüssel zur Detektion von verhältnismäßig schwach markierten Analyten mit ausreichend Signal-Rausch-Verhältnis. Eine Variation der Dimensionen der magnetophoretischen Anreicherungsstrukturen soll Wiederfindungsraten  $>96\%$ , sowohl bei Referenzanalyten, als auch bei biologischen Zellen garantieren. Zusätzlich wird die Homogenität des externen Permanentmagneten untersucht, die maßgeblichen Anteil an der Funktionalität des magnetischen Messprinzips hat und eine entscheidende Größe zur seriellen Fertigung eines magnetischen Durchflusszytometers darstellt. Um die Größe eines *Si-Dies* für die nicht-stochastische Zelldetektion zu minimieren, wird die Anreicherung und Führung der Zellen durch mechanische, anstelle von magnetophoretischen Prinzipien analysiert. Für die Etablierung einer Auswertesoftware werden Filtermethoden untersucht, die es erlauben, über eine amplitudenunabhängige Signalinterpretation, wie charakteristische Signalverläufe, Integrale oder Extremwerte, Einzelevents zu erfassen.

#### 6.1 GMR-Sensitivität

Zur Bewertung der Sensitivität der GMR-Brücke dienen der GMR-Effekt, als Kenngröße der maximalen Widerstandsänderung und die Anisotropiefeldstärke  $H_k$ , die das weichmagnetische Schichtsystem charakterisiert. Im Fall der Messung einer sehr geringen *in-plane* Komponente des Dipolfeldes einer superparamagnetisch markierten Zelle, die das Schichtsystem nicht in Sättigung bringt, wird final die Steigung der Transferkennlinie im linearen Bereich um das Nullfeld, als Kombination der beiden Parameter, betrachtet.

Mit dem in Kapitel 3.1 beschriebenen Siemens GMR-*Stack* wurde die Realisierungsmöglichkeit der magnetoresistiven Einzelzelldetektion mit Micromod Referenzbeads untersucht [74]. Das System wurde ursprünglich für magnetische Drehfeldsensoren konzipiert, mit dem Ziel einen großen, linearen Feldbereich abzudecken. Der in Wheatstone Brückenordnung strukturierte Schichtstapel weist mit einem magnetoresistiven Gesamteffekt von 4.7%, bei einer Anisotropiefeldstärke von 7 mT, eine relativ flache Kennlinie mit einer Steigung von  $0.3 \% \text{ mT}^{-1}$  auf. Dieser Sensortyp hat dadurch eine nur unzureichende Sensitivität für schwach magnetische Zielanalyte, wie spezifisch markierte Tumorzellen. Eine Erhöhung der Sensitivität ist daher zwingend erforderlich.

### Variation der *Annealing* Temperatur

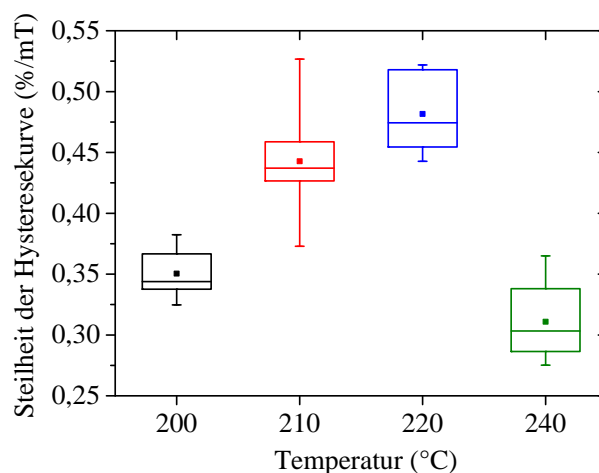
In einem ersten Ansatz wird versucht die Sensitivität des magnetoresistiven Systems, durch Variation der magnetfeldinduzierten Anisotropie zu steigern, ohne den Siemens GMR-Schichtstapel zu verändern. Verringert man die Temperatur des *Annealing* Prozesses, bei dem der Messschicht, im gerichteten Magnetfeld von  $40 \text{ kA m}^{-1}$ , eine Vorzugsrichtung entlang der Sensorelemente induziert wird (vgl. Kapitel 3.2), nimmt in der Theorie die Anisotropie der Messschicht ab. Dadurch verringert sich die Anisotropiefeldstärke  $H_k$ , bei der die freie Schicht in einem Feld entlang der „schweren Richtung“, also senkrecht zur induzierten Anisotropie, in Sättigung geht. Dies ist gleichbedeutend mit einer Zunahme der Sensitivität. Der amorphe Charakter der CoFeB-Schicht, als Bestandteil des weichmagnetischen Schichtsystems des GMR-*Stacks*, eignet sich für die Anwendung magnetischer *Annealing* Prozesse [59]. Ab einer Temperatur von  $250^\circ\text{C}$  geht allerdings die Amorphizität des Materials verloren und eine Kristallisation des CoFeB-Layers setzt ein. Durch die Kristallisation geht der weichmagnetische Charakter der amorphen Messschicht verloren, wodurch das Material härter wird und andere isotrope Eigenschaften dominieren [105].

Vier GMR-Chips mit je 10 diagonalen Sensorbrücken werden nach dem *Annealing* Prozess zur Ausrichtung des künstlichen Antiferromagneten aus dem Waferverbund getrennt und separat bei unterschiedlichen Temperaturen behandelt, wobei die restlichen Prozessparameter konstant gehalten werden. Neben der Standardtemperatur von  $240^\circ\text{C}$  wird die Vorzugsrichtung bei  $200^\circ\text{C}$ ,  $210^\circ\text{C}$  und  $220^\circ\text{C}$  über eine Prozesszeit von 40 Minuten und einem Magnetfeld von  $40 \text{ kA m}^{-1}$  induziert. Abbildung 6.1 vergleicht die Steigungen der Kennlinien im linearen Bereich um das Nullfeld. Der Prozess bei

220°C liefert mit einem Mittelwert von 0.48 % mT<sup>-1</sup> die steilste Kennlinie, was verglichen mit der Steilheit bei 240°C eine Erhöhung um fast 25% bedeutet. Bei der Prozesstemperatur von 210 °C ist mit einer mittleren Steigung von 0.44 % mT<sup>-1</sup> eine leichte Abnahme zu beobachten, während bei 200°C mit 0.35 % mT<sup>-1</sup> ein deutlicher Abfall eintritt. Zur Deutung des Kurvenverlaufs aus Abbildung 6.1 und zur genaueren Analyse des Temperatureinflusses auf die Steigung der Hysteresekennlinie werden Anisotropiefeldstärke  $H_k$  und GMR-Effekt der einzelnen Messkurven ausgewertet.

$$\text{Steigung}(T) = \frac{\text{GMR} - \text{Effekt}(T)}{H_k(T)} \quad (6.1)$$

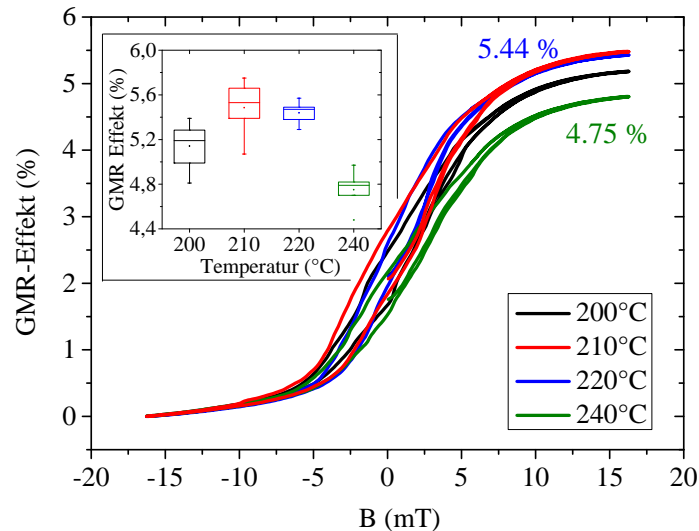
Eine Zunahme der Steigung der Kennlinie im linearen Bereich kann über eine Abnahme von  $H_k$ , bzw. eine Zunahme des GMR-Effekts erreicht werden (Formel 6.1).



**Abbildung 6.1** Gegenüberstellung der Steilheit der Hysteresekennlinien im linearen Bereich, bei Variation der Temperatur des *Annealing* Schrittes, zur Induktion der magnetischen Vorzugsrichtung.

Abbildung 6.2 zeigt typische Kennlinien, exemplarisch für die vier gewählten Temperaturen. Auf Grund der Zunahme der Temperatur nimmt die Oberflächenrauigkeit des amorphen CoFeB zu, resultierend in einer Zunahme der Néel-Kopplung und einer stärkeren Streuung der Elektronen an Fehlstellen, wodurch der Gesamtwiderstand des Systems steigt. Diese Steigung des Widerstands hat eine Abnahme des GMR-Effekts zur Folge, der im Bereich von 210°C bis 240°C zu beobachten ist. Der Vergleich der GMR-Effekte bei 240°C als Standardtemperatur und 220°C bei maximaler Steigung der Kennlinie zeigt eine Erhöhung des Gesamteffektes um 0.69% von 4.75% auf 5.44%. Auffallend ist die Ausbildung des GMR-Effekts bei 200°C, der mit durchschnittlich 5.14% deutlich abfällt und nicht mit den restlichen Ergebnissen Versuchsreihe

korreliert. Diese Abnahme des GMR-Effekts ist zunächst nicht unbedingt erklärbar. Auffällig ist allerdings eine zunehmende Verschiebung der Kurven hin zu positiven Feldern. Folglich ist die antiparallele Ausrichtung im positiven Magnetfeld mit zunehmender Temperatur weniger begünstigt als die parallele. Diese Kopplung entspricht phänomenologisch einer Néel-Kopplung (vgl. Kapitel 2.2).



**Abbildung 6.2** Vergleich der Hysteresekurven und GMR-Effekte der prozessierten GMR-Sensoren mit dem Siemens Vielschichtsystem bei Variation der Temperatur des *Annealing* Prozesses zur Induktion der magnetischen Vorzugsrichtung.

Der unerwartete Abfall der Steigung der Hysteresekurven im linearen Teilstück von 220°C auf 200°C aus Abbildung 6.1 lässt sich mit Betrachtung der GMR-Effekte der Kurven nur unzureichend erklären. Einen dominanteren Einfluss auf die Steigung der Kennlinien hat die Anisotropiefeldstärke, die indirekt proportional eine exakt gleiche Ausbildung über die vier Temperaturpunkte zeigt. Ein Minimum von 5.1 mT bei 220°C steht einer Steigung der Werte sowohl bei 240°C (7.0 mT), als auch bei 210°C (5.9 mT) gegenüber. Der Grund des Verlaufs der Anisotropiefeldstärke über den gegebenen Temperaturbereich kann im Detail, trotz Reproduzierbarkeit der Messungen nicht erklärt werden. Der starke Anstieg von  $H_k$  bei 240°C könnte die Folge einer beginnenden Kristallisation des CoFeB und dem damit verbundenen Verlust der Amorphizität sein.

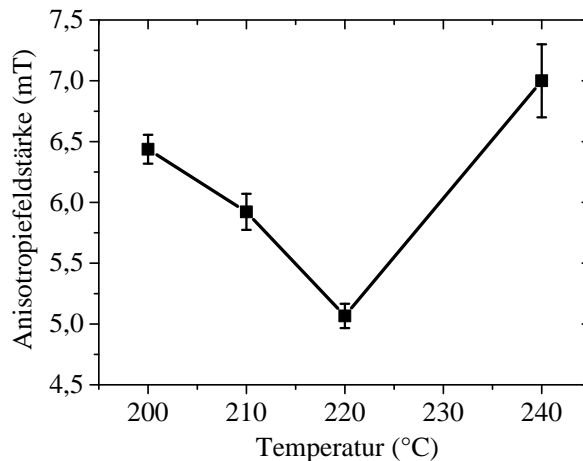


Abbildung 6.3 Verlauf der Anisotropiefeldstärke  $H_k$  der Hysteresekurven der GMR-Brücken des Siemens Multilagensystems, bei Variation der *Annealing* Temperatur von 240°C auf 200°C.

### Alternative GMR-Multilagensysteme

Die stark divergenten Anforderungen an einen magnetoresistiven Drehfeldsensor im Vergleich zu einem GMR-Biosensor begrenzen die Erhöhung der Sensitivität des Siemens Schichtstapels. Aus diesem Grund werden GMR-Multilagensysteme bekannter Hersteller auf Wafer Ebene eingekauft und vor Ort im Reinraum prozessiert. Abbildung 6.4 stellt die Schichtenfolge der *Stacks* von Infineon Technologies (IFX), dem Institut für Photonische Technologien (IPHT) Jena und der Sensitec GmbH gegenüber und vergleicht sie mit dem Siemens System. Alle drei Hersteller verwenden, ähnlich zum Siemens-*Stack*, ein *Spin-Valve* System mit künstlichem Antiferromagneten. Das hartmagnetische Schichtsystem unterscheidet sich dabei nur in der Dicke der einzelnen Layer und setzt sich aus zwei magnetischen CoFe-Schichten zusammen, die über einen dünnen Ru-Layer, eine antiparallele Zwischenschichtkopplung ausbilden und an den PtMn-Antiferromagneten gekoppelt sind. Der Ta-Layer, als Keimschicht für das NiFe, bzw. NiFe oder alternativ TaN, als Keimschicht für den Antiferromagneten, haben keinen Einfluss auf die Sensitivität der Schichtsysteme, beeinflussen aber die Wachstumsbedingungen des Schichtsystems (z.B. Rauigkeit). Die genaue Schichtkonfiguration inklusive Schichtdicke ist bei den Systemen von Infineon und IPHT bekannt, während Sensitec nur begrenzt Informationen zum Schichtaufbau angibt. Nach Siemens Vorgabe wird ein Multilagensystem mit maximalem Gesamteffekt und Steilheit der Kennlinie geliefert, das noch keinen schaltenden Charakter im Messbetrieb zeigt.



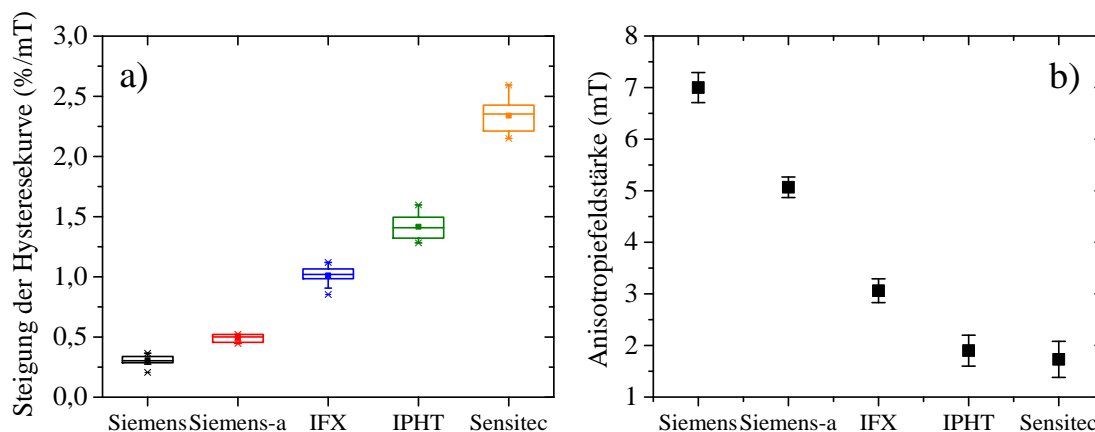
Die Adaptierung des Lithographieprozesses zur Strukturierung der GMR-Brückensensoren läuft bei den IPHT-Scheiben ohne Probleme, wohingegen bei den Infineon und Sensitec Wafern Haftprobleme im Zuge der Lackprozesse sowie Korrosionseffekte auftreten, die zu einer geringen Ausbeute an funktionsfähigen Sensoren führen. Die Ursache dieser Effekte konnte auch nach Rücksprache mit den Herstellern nicht ermittelt werden. Die Lackbenetzung und Haftung konnte aber durch Optimierung einiger Prozessparameter deutlich verbessert werden. Dazu erfolgt, nach der Entfernung von organischen Verunreinigungen durch Aceton und der Reinigung mit Isopropanol, eine Konditionierung der Waferoberfläche im O<sub>2</sub>-Plasma. Im nächsten Schritt wird der Wafer bei 120°C ausgeheizt, um die Oberfläche zu hydrophilisieren und im ausgeheizten Zustand mit Hexamethyldisilazan (HMDS) als Haftvermittler zu beschichten.

Siemens (42.9 nm)	Infineon (42 nm)	IPHT (45.7 nm)	Sensitec (35 nm)	
TaN 5	TaN 10	TaN 10	Ta	Passivierung
MgO 1.2				Spiegelschicht
CoFeB 6		NiFe 5	NiFe 3	Soft Layer
CoFe 1	CoFe 5	CoFe 0.8	CoFe 1	
Cu 2.4	Cu 2	Cu 2.1	Cu	Zwischenschicht
CoFe 2	CoFe 2	CoFe 2.5	CoFe	Hard Layer
Ru 0.8	Ru 1	Ru 0.8	Ru	(Künstlicher Antiferromagnet)
CoFe 1.5	CoFe 2	CoFe 2.5	CoFe	
PtMn 18	PtMn 15	PtMn 20	PtMn	Antiferromagnet
	NiFe 2	NiFe 3		Keimschicht
Ta/TaN 4	Ta 3	Ta 4	Ta	Passivierung

**Abbildung 6.4** Gegenüberstellung der vier verwendeten GMR-Multilagensysteme mit farblicher Kodierung der funktionellen Layer und Schichtdickenangaben, falls vorhanden.

Abbildung 6.5 a vergleicht die Steigung der vier strukturierten Multilagensysteme im linearen Bereich der Hysteresekurve von je 25 GMR-Brücken aus zwei Wafern pro *Stack*. Mit einer mittleren Steigung von 1.01 % mT<sup>-1</sup> erreicht der IFX-*Stack* eine Verdopplung im Vergleich zu dem optimierten Siemens-*Stack* (Siemens-a) und das System von IPHT mit 1.42 % mT<sup>-1</sup> sogar eine Verdreifachung. Der Sensitec GMR-*Stack* weist mit 2.34 % mT<sup>-1</sup> den mit Abstand höchsten Kennwert auf.

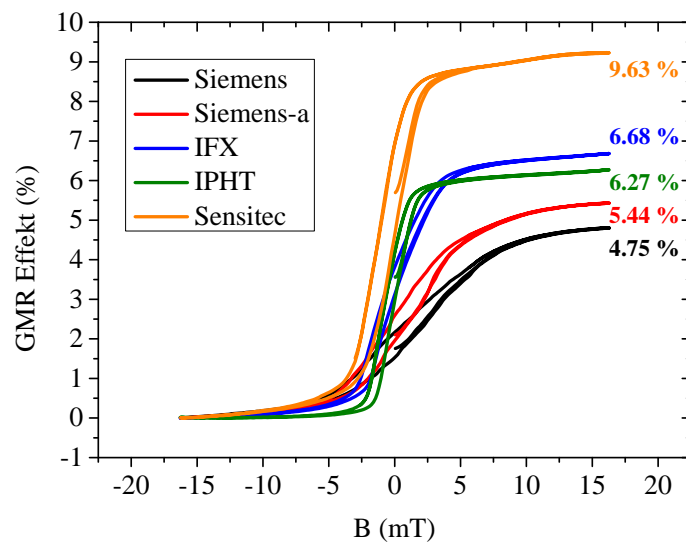
Zur Analyse des Sensitivitätsverhaltens der vier Multilagensysteme wird zunächst die Anisotropiefeldstärke  $H_k$ , als Indikator des reinen Schaltverhaltens der weichmagnetischen Schicht, betrachtet (Abbildung 6.5 b). Der amorphe CoFeB-Layer des Siemens-Stacks weist eine geringe Spinpolarisation auf, die in einer geringen mittleren freien Weglänge der Elektronen resultiert und damit zu einer Reduktion des GMR-Effekts führt [106]. Im Gegensatz dazu besitzt der im IFX-Stack dominierende CoFe-Layer eine hohe Spinpolarisation und eine sehr hohe Sättigungsmagnetisierung. Zusätzlich ist das weichmagnetische Schichtsystem des IFX-Stacks um 2 nm dünner als der Siemens-Stack was ebenfalls zu einem Anstieg der Sensitivität führt - ersichtlich als Abfall der Anisotropiefeldstärke um nahezu 2 mT von 5.07 mT auf 3.06 mT. Der NiFe-Anteil des weichmagnetischen Layers des IPHT-Systems zeichnet sich, im Vergleich zu CoFeB und CoFe, als extrem weichmagnetisch aus, was bei geringerer Anisotropie eine leichtere Drehung der funktionellen Schicht ermöglicht und so mit einem  $H_k$  von 1.90 mT zu einer Sensitivitätssteigerung führt. Das Sensitec System ist ausschließlich auf Grund der geringeren Schichtdicken bei einem  $H_k$  von 1.72 mT minimal sensitiver als das IPHT-System.



**Abbildung 6.5** Vergleich der Sensitivität über die Steigung der Kennlinie im linearen Bereich (a) und der Anisotropiefeldstärke typischer Hysteresekennlinien (b) der GMR-Vielschichtsysteme von Siemens, IFX, IPHT und Sensitec.

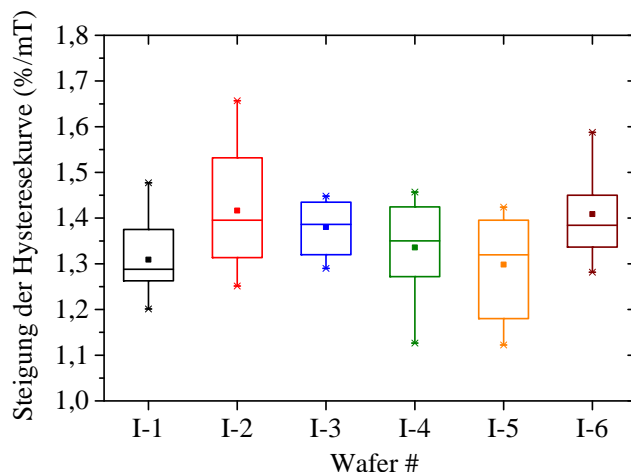
Bei der Betrachtung des GMR-Effekts (Abbildung 6.6) liefert der Siemens-Stack mit einem mittleren Gesamteffekt von 5.44% den geringsten Wert. Das amorphe CoFeB hat einen deutlich höheren Widerstand als die kristallinen Layer der anderen Hersteller. Zusätzlich trägt die nichtmagnetische Zwischenschicht aus Kupfer mit einer Dicke von 2.4 nm auf Grund der erhöhten Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Elektronen und der damit verbundenen Abnahme der Streuprozesse zu einer Abnahme des GMR-Effekts bei. Je dicker allerdings die nichtleitende Zwischenschicht, desto geringer wirkt die

Néel-Kopplung, die einen Offset der gesamten Hystereseurve aus dem Nullpunkt generiert. Der IFX-Stack zeigt mit einer Gesamtschichtdicke von 42 nm bei einem Cu-Layer von 2 nm, eine geringere Schichtdicke als der IPHT-Stack, was sich gegenläufig zum Verhalten der Anisotropiefeldstärke der beiden Systeme in einem leicht höheren GMR-Effekt widerspiegelt. Dominantes Kriterium für die steilere Kennlinie des IPHT-Systems ist die geringere Anisotropiefeldstärke. Im Vergleich dazu liefert der Stack von Sensitec, mit einer Gesamtschichtdicke von 35 nm, einen sehr hohen GMR-Effekt von 9.63%. Dieser deutliche Anstieg zu den Alternativsystemen von IPHT und IFX führt, bei nahezu konstanter Anisotropiefeldstärke, zu einer signifikanten Sensitivitätssteigerung bei der Betrachtung der Steilheit der Hystereseurve im linearen Bereich (vgl. Abbildung 6.5).



**Abbildung 6.6** Typische Transferkennlinien der vier verwendeten GMR-Vielschichtsysteme mit Angabe des maximalen GMR-Effekts.

Ein Großteil der Messungen zur Optimierung der Einzelkomponenten der magnetischen Durchflusszytometrie und zur Charakterisierung des Messsystems sind mit dem GMR-Schichtstapel des IPHT durchgeführt worden. Mit Steigungen der Kennlinien von  $\sim 1.2$  bis  $1.5 \text{ \% mT}^{-1}$ , abhängig von der Genauigkeit des Lithographieprozesses zur Strukturierung der GMR-Widerstandselemente, liefern die IPHT-Sensoren ausreichend Sensitivität zur Detektion von spezifisch markierten, biologischen Analyten (Abbildung 6.7). Die Messung ist allerdings beschränkt auf die Verwendung des parallelen Sensordesign, das bei optimaler Platzierung zweier Widerstandselemente eine Verdopplung des Sensorsignals durch Signalüberlappung ermöglicht (vgl. Kapitel 5.3).



**Abbildung 6.7** Vergleich der Sensitivität der strukturierten GMR-Multilagensysteme des IPHT. Die Steigung des linearen Bereichs der Sensorkennlinie wird auf sieben Chips pro Wafer für je drei Brücken ermittelt.

### Sensitec GMR-Multilagensystem

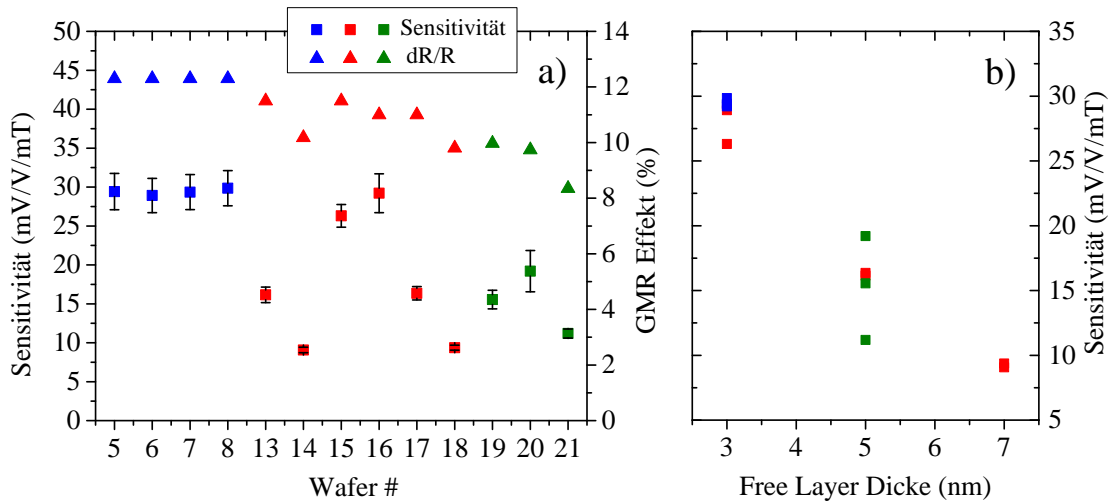
Zur Realisierung der Einzelzelldetektion superparamagnetisch markierter, biologischer Zellen unter Verwendung des diagonalen Brückenlayouts, bei höchstem Durchsatz, wird das hochsensitive Sensitec Multilagensystem näher analysiert. Der Herstellungsprozess der Sensoren auf Waferebene, inklusive Strukturierung der GMR-Elemente und Prozessierung der magnetophoretischen Führungseinheiten, wurde nach Bereitstellung der Layout Vorgaben - auf der Basis der Erfahrungswerte mit dem IPHT-Stack - nach Lahnau zu Sensitec verlagert. Die GMR-Sensorbrücken liefern bei der Detektion der Micromod Referenzanalyten mit  $20\text{-}30 \mu\text{V}/100 \text{mV}_{\text{pp}}$  durchschnittlich doppelt so hohe Signalsprünge als vergleichbare Messungen mit dem IPHT-Stack. Allerdings reagiert das empfindliche, magnetoresistive Sensorsystem im ungeschirmten Laboraufbau auf magnetisches Umgebungsrauschen, resultierend in kontinuierlichen Störsprüngen, die mit  $20 \mu\text{V}/100 \text{mV}_{\text{pp}}$  nahezu an das Signalniveau der Referenzanalyten heranreichen und zu einer signifikanten Störung der Laufzeitbetrachtung der Signalmuster führen. Zusätzlich kommt es bei Übergang eines stark markierten Analyten nach dem vierten Signalpeak zu einem zeitverzögerten Rücklauf in den Grundzustand. Eine fehlerfreie Erkennung der Signalsignatur und die Berechnung signalformabhängiger Parameter, wie das Gesamtintegral des Signalmusters, kann daher nicht gewährleistet werden. Es wird angenommen, dass hysteretische Effekte die reversible Widerstandsänderung an den hochsensitiven GMR-Sensoren beeinflussen. Dafür spricht auch ein unstabiles

Grundsignal der empfindlichen, magnetischen Sensoren, das unregelmäßig um mehrere 100  $\mu\text{V}$  steigt bzw. absinkt und eine Analyse des Messstreams erschwert.

**Tabelle 6-1 Zusammenfassung der Variationen des weichmagnetischen Schichtsystems und des Materials des Antiferromagneten am Sensitec GMR-Stack.**

Wafer #	Free-Layer (nm)	Stack	dR/R (%)	Sensitivität (mV/V/mT)	H <sub>c</sub> (mT)
S8	3	Standard	12.3	29.85	0.36
S13	5	PtMn	11.5	16.15	0.03
S14	7	PtMn	10.2	9.07	0.02
S15	3	PtMn	11.5	26.31	0.10
S16	3	PtMn	11.0	29.21	0.20
S17	5	PtMn	11.0	16.36	0.02
S18	7	PtMn	9.8	9.37	0.02
S19	5	IrMn	10.0	15.55	0.02
S20	5	IrMn	9.7	19.20	0.08
S21	5	IrMn	8.3	11.19	0.03

Unter der Vorgabe, ein Optimum an Sensitivität, Stabilität und Empfindlichkeit des Sensors gegen äußere magnetische Einflüsse zu erreichen, lieferte Sensitec 9 Wafer mit Variationen des bereits charakterisierten GMR-Stacks, die in Tabelle 6-1 gegenübergestellt sind. Die spezifischen Parameter zur Bewertung der GMR-Multilagen sind dabei direkt nach der Herstellung auf Wafer Ebene bei Sensitec vermessen worden. Abbildung 6.8 a vergleicht die Sensitivität und den resultierenden GMR-Effekt des ursprünglichen Schichtsystems (blau) mit einer Serie von Wafern mit leicht veränderter Stack-Zusammensetzung. In einem ersten Ansatz wird die Dicke der weichmagnetischen Schicht in Kombination mit einer vom Hersteller nicht preisgegebenen Feinjustierung der Gesamtschichtdicke variiert (rot). In einer weiteren Versuchsreihe (grün) wird bei 3 Wafern PtMn als antiferromagnetisches Material durch IrMn ersetzt, wobei die Dicke der weichmagnetischen Schichten mit 5 nm konstant gehalten wird.



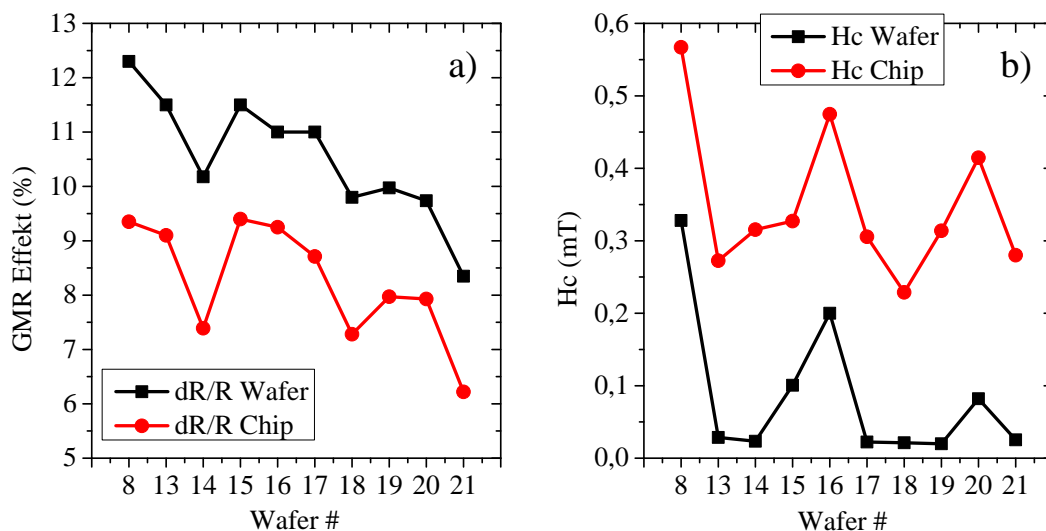
**Abbildung 6.8** (a) Gegenüberstellung der Sensitivität und des GMR-Effekts des ursprünglichen Sensitec GMR-Multilagensystems (blau) mit den modifizierten *Stacks* S13-S18, die eine Änderung der Dicke der weichmagnetischen Schicht und der Gesamtdicke des *Stacks* aufweisen (rot), und mit den Versuchswafern S19-S21, die IrMn als alternativen Antiferromagneten verwenden (grün). Beachten: Alle Messpunkte zur Sensitivität zeigen die Standardabweichungen (mindestens 3 Messungen). (b) Zusammenhang der Sensitivität der magnetoresistiven Schichtsysteme und der Dicke des *Free-Layers*. Die Messdaten wurden bei Sensitec ermittelt.

In Abbildung 6.8 b wird die Abhängigkeit der Sensitivität des magnetoresistiven Systems von der Dicke der weichmagnetischen Schicht dargestellt. Unabhängig von den Variationen am Antiferromagneten gilt, je dünner der *Free-Layer*, desto sensitiver das Gesamtsystem. Zur Bewertung der Schichtvariationen auf Chipebene mit strukturierten GMR-Widerstandselementen werden je drei *Si-Dies* pro Wafer elektrisch kontaktiert, über die Aufnahme der Kennlinie charakterisiert und mit Referenzanalyten experimentell vermessen. Verglichen mit den Kennwerten der Messungen auf Waferebene, liefern die strukturierten Sensoren einen um durchschnittlich 3% niedrigeren GMR-Effekt (Abbildung 6.9 a).

$$R_z = R_{\square} \frac{l}{b}, \quad \text{mit } R_{\square} = \frac{\rho_{Au}}{d} \quad (6.2)$$

Die Abnahme der Gesamtwiderstandsänderung kann über die nicht-MR aktiven Leitungswiderstände zur elektrischen Kontaktierung der Brückenelemente erklärt werden. Die 2-Punkt-Hysteresemessung an der strukturierten GMR-Brücke wird, sowohl von den Leitungswiderständen  $R_{z1}$  innerhalb der Wheatstone Brückenordnung, als auch von den Kontaktierungen zu den *Bond-Pads*  $R_{z2}$  im Außenbereich der *Si-Dies* beeinflusst. Über den spezifischen Flächenwiderstand  $R_{\square}$  von  $0.2 \Omega \square^{-1}$ , der 200 nm dicken Au-Zuleitungen ( $\rho_{Au}=2.214 \times 10^{-8} \Omega m$ ), können die

Widerstände über die Formel 6.1 ermittelt werden, wobei  $l$ ,  $b$  und  $d$  die Dimensionen der Goldzuleitungen beschreiben. Die Berechnung liefert einen Widerstand  $R_{z1}$  von  $1.53 \Omega$  innerhalb der Brückengeometrie und einen Wert  $R_{z2}$  von  $29.63 \Omega$ . Am Beispiel einer GMR-Brücke mit dem magnetoresistiven Schichtsystem S17, bei durchschnittlich 8.8% Widerstandsänderung und einem Brückenwiderstand von  $\sim 287 \Omega$ , liefert die Rückrechnung, unter Abzug der Zuleitungswiderstände von  $31.16 \Omega$ , einen GMR-Effekt von 10.1%.

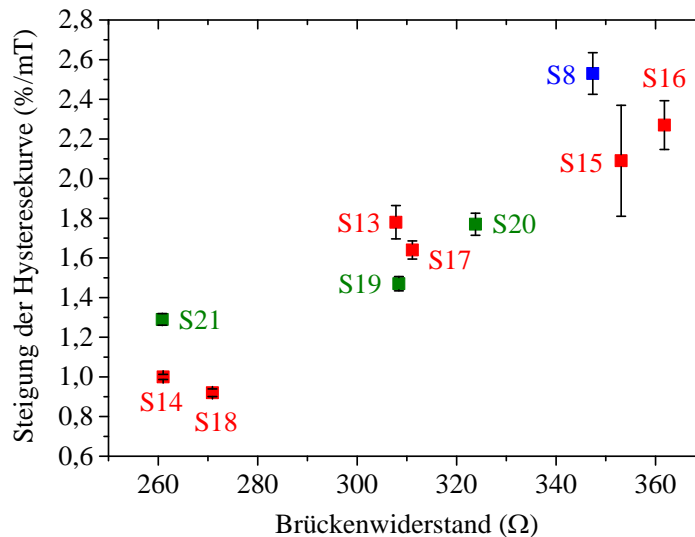


**Abbildung 6.9** Charakterisierung der Gesamtwiderstandsänderung (a) und der Koerzitivfeldstärke (b) der modulierten GMR-Stacks auf Wafer- und Chip-Ebene (schwarz) und an den strukturierten Sensorstegen (rot).

Ein zusätzlicher Verlust des GMR-Effekts bei strukturierten *Devices* ist vermutlich auf den physikalischen Ätzprozess mit der IBE-Anlage zurückzuführen [107]. Am Rand der Widerstandsstege wird die magnetoresistive Fläche beeinträchtigt, wodurch sich ein elektrisch aktiver, aber magnetisch toter Bereich bildet, der die Widerstandsänderung des Gesamtsystems verkleinert und einen magnetoresistiv nicht aktiven Parallelschluss bildet.

Ähnlich verhält sich die Koerzitivfeldstärke als Maß für die irreversiblen Ummagnetisierungsprozesse in den Elementen [56]. Es wird vermutet, dass der Anstieg von  $H_c$  um durchschnittlich 0.3 mT bei den strukturierten Chips ebenfalls auf die Beschädigung der GMR-Widerstände im Zuge der IBE-Prozessierung zurückzuführen ist. Die in Abbildung 6.9 b gezeigten Koerzitivfeldstärken haben jedoch keinen großen Einfluss auf das Messverfahren, da der Sensor durch die horizontalen Dipolkomponenten ( $\sim 90 \mu\text{T}$ ) der Analyte weit weniger ausgelenkt wird, als von der

Sättigungsfeldstärke ( $\sim 2.5$  mT) bei der Messung der Transferkennlinie (vgl. Abbildung 6.6). Die Magnetisierung während der Messung der superparamagnetisch markierten Analyte folgt stattdessen einer inneren Schleife [56].



**Abbildung 6.10** Darstellung der Steigung der Hysteresekennlinien der Brückensensoren gegen den jeweiligen Widerstand der Multilagensysteme, resultierend in drei Populationen, deren Sensitivität mit ansteigendem Gesamtwiderstand zunimmt. Beachten: Standardabweichungen sind für alle *Stacks* abgebildet (15-20 Messungen je *Stack*).

Die Betrachtung der Steigung der Hysteresekennlinien im Laboraufbau, aufgetragen gegen den jeweiligen Brückenwiderstand der Systeme, zeigt die Ausbildung von drei Populationen mit ansteigender Sensitivität (Abbildung 6.10). Verglichen mit dem hochsensitiven *Stack* S8 zeigen die zwei Variationen, die ebenfalls eine *Free-Layer* Dicke von 3 nm aufweisen, ähnlich steile Verläufe (S15 und S16). Die Variationen mit einer *Free-Layer* Dicke von 5 nm weisen, unabhängig vom Material des Antiferromagneten, eine Steigung von 1.5 bis 1.8 % mT<sup>-1</sup> auf und liegen somit im Schnitt um 30% unter dem Referenz-*Stack* S8. Der IrMn-Ansatz S21 bildet dabei die Ausnahme und liegt trotz der weichmagnetischen Schichtdicke von 5 nm auf Grund des mit 6.2% geringsten GMR-Effekts im Bereich der *Stacks* S14 und S18, die mit 7 nm die höchste *Free-Layer* Dicke aufweisen. Die Anfälligkeit der Multilagensysteme auf magnetisches Umgebungsrauschen sowie das Schaltverhalten der weichmagnetischen Systeme wird durch Messungen der Micromod Referenzanalyten bei konstantem externem Feld  $H_{ext}$  von 100 mT im Laboraufbau charakterisiert. Die Variationen S13 und S17 liefern dabei ein stabiles, driftfreies Grundrauschen ohne Basisliniensprünge



bei der Signalausbildung. Messungen mit spezifisch markierten FaDu-Tumorzellen zeigen ein ausreichendes SNR zur Detektion mit einem diagonalen Sensorlayout. Die sensitiveren Zusammensetzungen S15 und S16 können in einer späteren Version des Messaufbaus mit integrierter elektrischer Schaltung und magnetischer Schirmung angedacht werden.

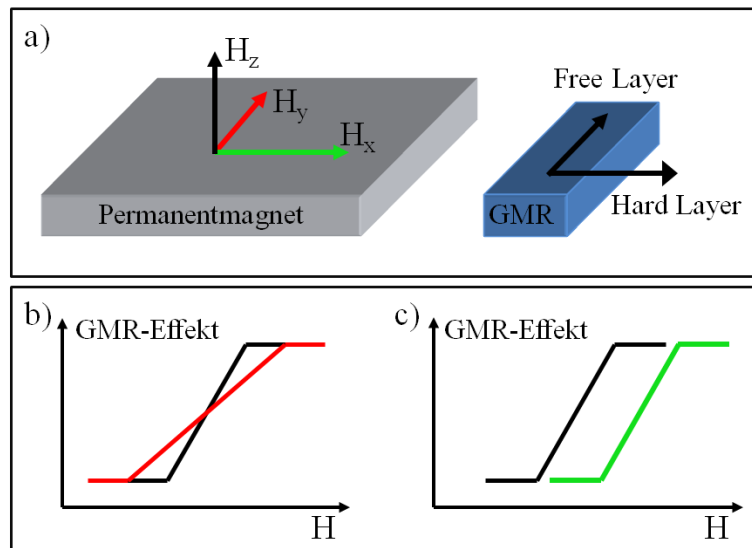
### 6.2 Screening des Permanentmagneten

Elementarer Bestandteil der Messmethodik der magnetischen Einzelzellerfassung ist der externe Permanentmagnet, der, fixiert an einem Acrylglasstab, von unten an den Chip gefahren wird. Im Gradientenfeld des Magneten, der orthogonal zum Si-Die magnetisiert ist, werden die stochastisch im Kanal verteilten, superparamagnetisch markierten Zielzellen an die Substratoberfläche angereichert und bilden ein lokales Streufeld aus, das eine magnetische Detektion ermöglicht. Der Permanentmagnet wird wie in Kapitel 3.3 beschrieben mit einem Präzisions-Kreuztisch, während der Aufnahme der Transferkennlinie ausgerichtet, mit dem Ziel den homogensten Bereich des Magneten, der ein Minimum an X- und Y-Komponenten in der Sensorebene aufweist, direkt unter den GMR-Sensorelementen zu platzieren. Um den homogenen Bereich zu charakterisieren erfolgt ein 3D-Mapping der Magnetfelder mit Hilfe einer Hall-Sonde. Da die Hall-Sonde durch die Eigengröße des Bauteils nur eine eingeschränkte Auflösung erlaubt, werden zusätzlich Transferkennlinien entlang des Magneten mit dem GMR-Sensor aufgenommen. Diese erlauben, durch Auswertung der Steigung im linearen Bereich der Kennlinie indirekt den besten Magnetbereich für den Sensorbetrieb zu ermitteln. Im Hinblick auf eine Messgerätefertigung werden Magnete unterschiedlicher Lose des Herstellers auf eine Reproduzierbarkeit des für den Sensorbetrieb homogenen Messbereichs geprüft.

#### Theoretischer Einfluss des Permanentmagneten

Bei Betrachtung der Feldkomponenten des bei der Herstellung in Z-Richtung magnetisierten Permanentmagneten kann das vertikale Feld  $H_z$  vernachlässigt werden, da sich die Beeinflussung der funktionellen Schichten der magnetoresistiven Sensoren auf die X- und Y-Ebene beschränkt. Abbildung 6.11 a stellt dem Permanentmagneten ein Widerstandselement, mit definierten Magnetisierungsrichtungen des *Free-Layer* und

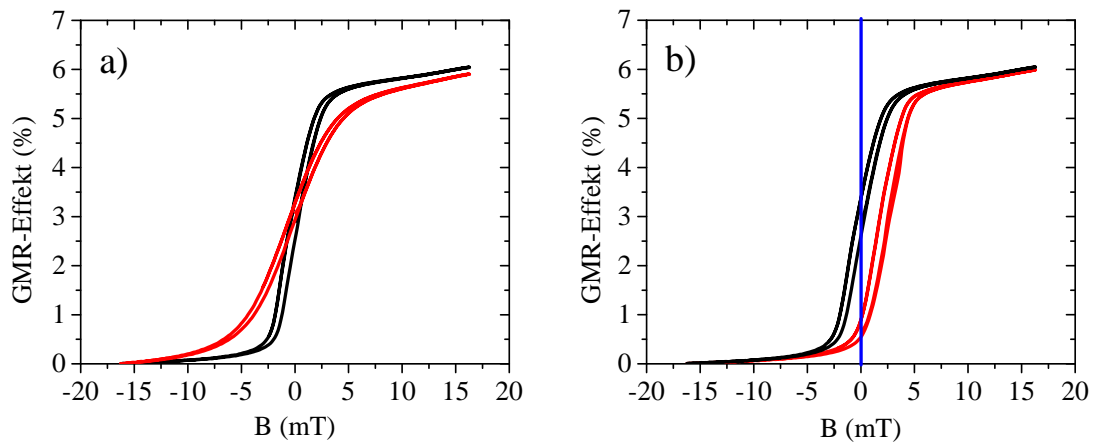
des *Hard-Layer* zur räumlichen Orientierung, gegenüber. Die Magnetisierung des *Hard-Layer* zeigt dabei in X-Richtung - parallel zur Flussrichtung der magnetischen Analyte - wohingegen dem *Free-Layer* über einen *Annealing* Prozess eine Vorzugsrichtung orthogonal zum *Hard-Layer* in Y-Richtung eingeprägt wurde.



**Abbildung 6.11** Theoretischer Einfluss des externen Permanentmagneten auf das weichmagnetische Schichtsystem der GMR-Sensoren. Die Magnetfeldkomponente  $H_y$  (rot) generiert einen Pseudo-Anisotropieeffekt auf den *Free-Layer* in Y-Richtung, resultierend in einer Verflachung der Kennlinie und Abnahme der Sensitivität im Nullfeldbereich (b). Die Magnetfeldkomponente  $H_x$  hingegen generiert einen Offset, indem der *Free-Layer* aus der Vorzugsrichtung gedreht wird, was bei Kompensation durch die Spule zu einer Verschiebung der gesamten Hysteresekurve auf der X-Achse führt (c).

Wird das GMR-Sensorsystem von einer Feldkomponente  $H_y$  des externen Magneten beeinflusst, wirkt ein Pseudo-Anisotropieeffekt auf den *Free-Layer*. Die Magnetisierung in Y-Richtung wird verstärkt, was zur Folge hat, dass ein höheres Magnetfeld nötig ist, um eine parallel beziehungsweise antiparallele Konfiguration der funktionellen Schichten zu erreichen. Daraus resultiert eine Verflachung der Hysteresekurve und somit eine Abnahme der Sensitivität des GMR-Sensors (Abbildung 6.11 b). Im Gegensatz dazu bewirkt die Magnetfeldkomponente  $H_x$  eine Drehung des *Free-Layer* - je nach Vorzeichen - in parallel beziehungsweise antiparallele Richtung zum *Hard-Layer*. Es liegt also kein  $90^\circ$  Winkel mehr zwischen den funktionellen Schichten vor. Das Querfeld des Permanentmagneten generiert einen Offset, der bei der Hysteresemessung durch das Feld der Spule kompensiert werden muss. Folglich kommt es zu einer Gesamtverschiebung der Kennlinie auf der X-Achse (Abbildung 6.11 c). Im Extremfall bewirkt eine Verschiebung des linearen und steilsten Teilbereichs der

Kennlinie aus dem magnetischen Nullfeld eine Abnahme der Sensitivität, bis hin zur Sättigung des magnetoresistiven Sensors.



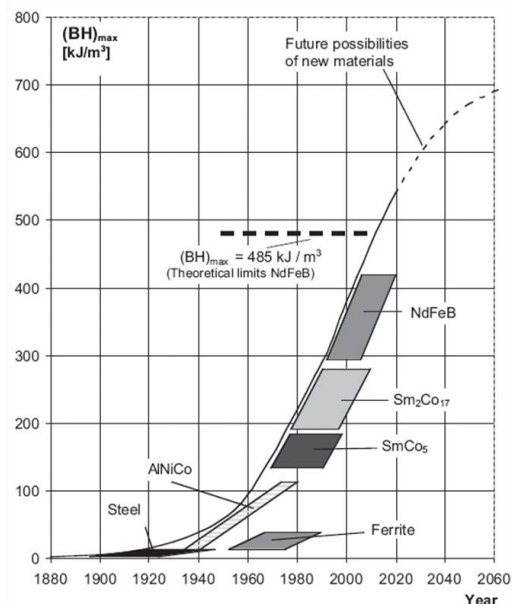
**Abbildung 6.12** Simulation des Einflusses der X- und Y-Magnetfeldkomponenten auf die Ausbildung der Kennlinie der magnetoresistiven Sensoren. Ein Stützfeld einer Spule in Y-Richtung entlang der Widerstandsstreifen demonstriert die Verflachung der Hysteresekurve unter Einfluss von  $H_y$  (a).  $H_x$  wird über eine Offsetspannung von 10 V bei der Ansteuerung der Helmholtzspule nachgebildet, was in einer Verschiebung der Kurve aus dem Nullpunkt entlang der X-Achse resultiert (b).

Zur praktischen Verifizierung der Effekte der Magnetfeldkomponenten auf die Kennlinie der magnetischen Sensoren wird, bei der in Abbildung 6.13 a dargestellten Messung (rote Kurve), mit einer Spule ein Stützfeld in Y-Richtung entlang der Widerstandsstreifen angelegt, das eine Verflachung der Kennlinie im Vergleich zur unbeeinflussten Kurve (schwarz) bewirkt. Die Magnetfeldkomponente  $H_x$  des Permanentmagneten wird durch eine Offsetspannung von 10 V an der spannungsabhängigen Stromquelle, die die Helmholtzspule versorgt, simuliert. Die 10 V Offsetspannung generiert ein Feld von ca. 2.9 mT, um das die Kurve auf der X-Achse verschoben ist (Abbildung 6.12).

### Magnetspezifikationen

Als Standardmagnet wird ein Neodym-Eisen-Bor (NdFeB) Blockmagnet (32 x 27 x 6 mm) der Firma IBS Magnet verwendet, der durch Formteil-Pressen in einem axialen Magnetfeld hergestellt wird und in Z-Richtung, orthogonal zum Si-Die magnetisiert ist. Die maximale magnetische Feldstärke von 280 mT auf Sensorebene soll die Anreicherung der magnetisch markierten Analyte auf der Substratoberfläche,

auch in einem komplexen Medium, wie Vollblut, bei Kanalhöhen von 100-200  $\mu\text{m}$  garantieren und so einen definierten Abstand von Analyt zu Sensor sicherstellen. Die Magnete mit einer 15  $\mu\text{m}$  dicken, galvanisch verzinnnten Passivierungsschicht weisen ein Maximalenergieprodukt  $(BxH)_{max}$  von 262-288  $\text{kJ m}^{-3}$ , bei einer Remanenzflussdichte  $B_r$  von 1170-1250 mT und einer Koerzitivfeldstärke  $H_c$  größer 860  $\text{kA m}^{-1}$  auf [108]. Das Maximalenergieprodukt als Kenngröße, abhängig von  $B_r$  und  $H_c$ , ist dabei der wichtigste Parameter zur Charakterisierung eines Permanentmagneten, wobei Magnete mit einem höheren  $(BxH)_{max}$  weniger Volumen für gleiche Performance benötigen [109] [110]. Die Koerzitivfeldstärke beschreibt die Beständigkeit der Entmagnetisierung des Magneten gegen äußere Gegenfelder, während die Remanenzflussdichte die verbleibende Magnetisierung eines bis zur Sättigung aufmagnetisierten Magneten, ohne angelegtes, äußeres Feld ist.



**Abbildung 6.13 Entwicklung permanent-magnetischer Werkstoffe und des maximalen Energieproduktes, nach [109].**

Im Vergleich zu alternativen Magnetwerkstoffen, wie Hartferriten ( $(BxH)_{max} \sim 36 \text{ kJ m}^{-3}$ ), oder Samarium-Cobalt ( $\text{Sm}_2\text{Co}_{17}$ ,  $(BxH)_{max} \sim 210 \text{ kJ m}^{-3}$ ) liefern Seltenerd-Werkstoffe, wie NdFeB, relativ starke Permanentmagnete [111]. Abbildung 6.13 zeigt die Entwicklung verschiedener Permanentmagnete mit ihren maximalen Energieprodukten über die Zeit. Die intermetallische Materialkombination NdFeB wird als magnetischer Werkstoff erstmals im Jahr 1983 von Dr. M. Sagawa [112] und Dr. J. Croat [113], unabhängig voneinander beschrieben. Das Seltenerdmetall Neodym kombiniert mit dem Übergangsmetall Eisen, mit einer hohen spontanen Polarisation, besitzt durch seine Kristallstruktur eine große axiale Anisotropie und weist so

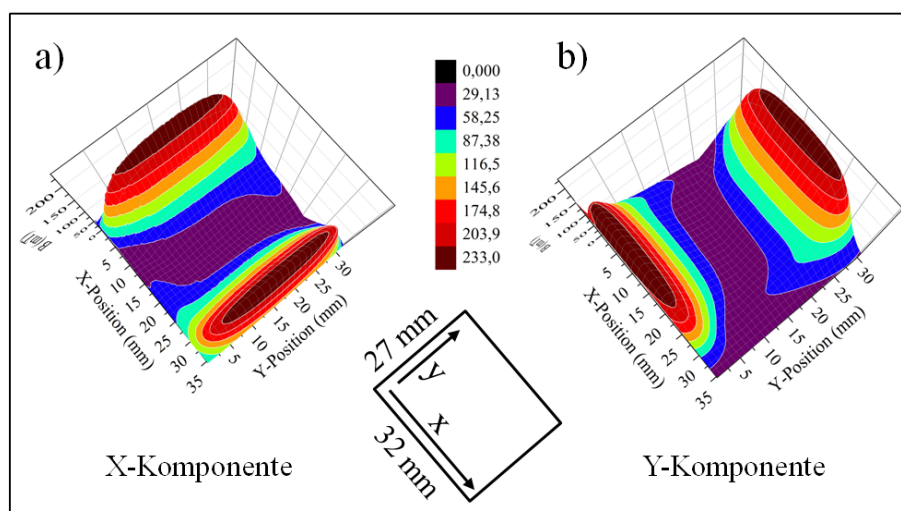
ausgezeichnete Eigenschaften für einen Dauermagneten auf [114]. Charakteristische Merkmale eines NdFeB-Permanentmagneten sind deshalb ein hohes Maximalenergieprodukt, eine hohe Remanenzfeldstärke sowie eine hohe Koerzitivfeldstärke [115]. Der wesentliche Nachteil gegenüber anderen Magnetwerkstoffen, nämlich die starke Temperaturabhängigkeit des maximalen Energieprodukts, das nur für Temperaturen unter 100-150°C maximal ist [111], kann vernachlässigt werden, da die magnetische Einzelzelmessung bei Raumtemperatur durchgeführt wird.

Zur Herstellung anisotroper Magnete aus den reaktiv oxidationsempfindlichen Seltenerd-Übergangsmetallen, werden die Legierungen unter Schutzgasatmosphäre gebrochen und zu feinem Legierungspulver, mit einer mittleren Teilchengröße von 3-5  $\mu\text{m}$ , zermahlen, die sich gut in einem magnetischen Feld ausrichten lassen. In der industriellen Massenfertigung haben sich 2 Pressverfahren zur parallelen Ausrichtung der magnetischen Momente etabliert. Während das Legierungspulver im Zuge des Axialfeldpressens (AP) in einem Presswerkzeug, mit einem Magnetfeld parallel zur Pressrichtung, bearbeitet wird, legt man beim Transversalfeldpressen (TP) ein Querfeld, orthogonal zur Pressrichtung an. Die Fertigung im AP-Prozess ist wirtschaftlicher, allerdings lässt sich mit dem TP-Prozess eine Verbesserung der Remanenz um nahezu 4% erreichen [116]. Weikmann et.al. zeigt in einer detaillierten Analyse die Ausbildung verschiedener Feldverteilungen auf der Ober- und Unterseite von AP gefertigten Magneten, hervorgerufen durch die Positionierung der Pressform zum Magnetblock. Die Berechnung der magnetischen Flussdichte in einem definiertem Abstand auf der Ober- (*Hot Side*) und Unterseite (*Cold Side*) des Magneten zeigt eine Variation von ~14%, bei einer Änderung der Winkel um  $\pm 12^\circ$  [109]. Eine Homogenisierung des magnetischen Feldes in Z-Richtung, orthogonal zum *Si-Die*, würde die Präzisionsausrichtung des externen Permanentmagneten deutlich erleichtern. Ein Permanentmagnet mit diskutierten Eigenschaften war während dem Zeitpunkt der Dissertation nicht zugänglich.

### **3D-Mapping des Permanentmagneten**

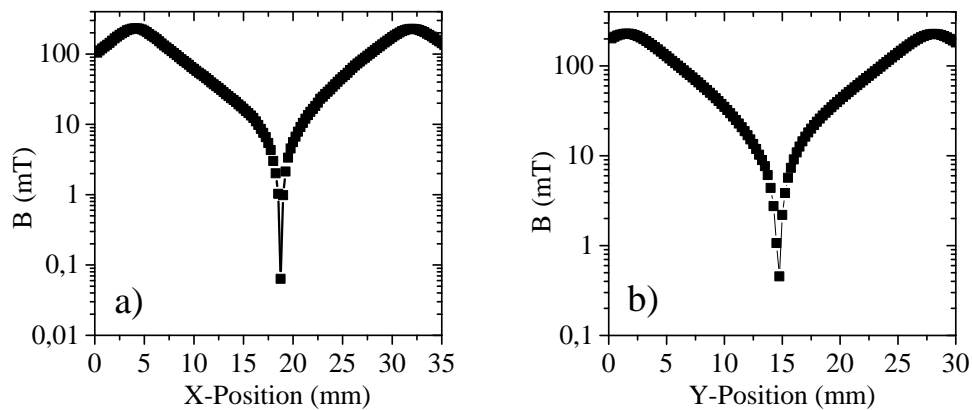
Zur Charakterisierung der Homogenität des Magnetfeldes in Z-Richtung werden die X- und Y-Komponente des NdFeB-Magneten über dem 32 x 27 mm Magnetbereich analysiert. Die Messungen mit einem Gaussmeter 460 der Firma Brockhaus Messtechnik mit integrierten Hall-Sensoren basieren auf der Proportionalität der

gemessenen Hall-Spannung zur magnetischen Flussdichte. Eine 3-Achsen Hall-Sonde erlaubt die parallele Erfassung der Magnetfeldkomponenten in alle 3 Raumachsen, bei einer Auflösung von 1 mT. Zur Abrasterung des Permanentmagneten wird ein bestehender Messaufbau genutzt, der die Ansteuerung eines Präzisions-Kreuztisches über eine LabVIEW GUI erlaubt. Der Magnet wird dabei am beweglichen Kreuztisch fixiert, während der Messfühler in einem konstanten Abstand von 0.5 mm über einem Eckpunkt des Magneten platziert wird. Die Schrittweite der Messwerterfassung wird von den Dimensionen der Hall-Sonden, die vom Hersteller nicht angegeben werden, an der Spitze des 4 x 4 mm Messstabs begrenzt. Das Magnetmapping wird über einen Bereich von 40 x 37.5 mm mit einer Schrittweite von 0.5 mm durchgeführt.



**Abbildung 6.14** Bestimmung der X- und Y-Magnetfeldkomponente des 32 x 27 x 6 mm NdFeB-Magneten mit einem Gaussmeter. Der Magnet wird bei der Herstellung in Z-Richtung magnetisiert.

Abbildung 6.14 stellt die 3-dimensionalen Auftragsungen der magnetischen Flussdichte in X- (a) und Y-Richtung (b) im Betrag, über die gesamte Fläche des Permanentmagneten dar, wobei maximale Werte von  $\sim 230$  mT jeweils an den Kanten des Magneten, parallel zur detektierten Feldkomponente gemessen werden. Die Erfassung von  $B_x$  zeigt einen  $\sim 10$  mm breiten Streifen mittig auf dem Magneten und nahezu parallel zur Y-Kante, über dem minimale Magnetfelder  $< 29$  mT gemessen werden. Analog bildet sich ein Minimum der Feldstärke bei Erfassung von  $B_y$  parallel zur Längsseite des Magneten. In Abbildung 6.15 wird die Ausbildung des magnetischen Flusses entlang dem mittigen Querschnitt des Magneten, parallel (a) sowie orthogonal (b) zur 32 mm Längsseite aufgezeigt. Die Auswertung der Kurven ergibt in beiden Fällen einen  $\sim 500$   $\mu\text{m}$  langen Bereich, indem  $B_x$  bzw.  $B_y < 1$  mT sind.



**Abbildung 6.15** Ausbildung des magnetischen Flusses entlang des mittigen Querschnitts, parallel (a) und orthogonal (b) zur 32 mm Längsseite des Permanentmagneten.

Das 3D-Mapping der X und Y-Magnetkomponenten mit der Hall-Sonde gibt erste Informationen über die Dimensionen der homogenen Bereiche des NdFeB-Magneten und Größenordnungen der magnetischen Felder über der gesamten Magnetfläche. Eine Aussage über die Beeinflussung der Sensitivität der hochsensiblen GMR-Sensoren durch die parasitären Magnetkomponenten  $B_x$  und  $B_y$  muss direkt am magneto-resistiven Bauteil erfolgen.

### Relativmessung des homogenen Magnetbereichs

Zur Bestimmung der, unter einer GMR-Sensorbrücke tolerablen Magnetfläche wird der Standard NdFeB-Magnet, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, an einem Acrylglasstab fixiert und während der Aufnahme der Hystereseurve in X und Y positioniert, um eine maximale Steilheit der Kennlinie und eine Kompensation der Nullpunktverschiebung einzustellen. Der Magnet wird dabei mit einem Abstand von 5 mm an den Messcarrier gefahren und generiert auf Sensorebene ein magnetisches Feld von 150 mT, analog zu den Messbedingungen bei der Detektion magnetischer Analyte. Mit der Länge von 32 mm deckt der Permanentmagnet den gesamten Kanalbereich ab. Auf Grund der Chipdimension von 30 x 10 mm, kann bei zentrierter Positionierung des Magneten unter dem GMR-Sensor eine, vom starken Gradientenfeld am Randbereich des Magneten generierte Feldüberhöhung innerhalb des fluidischen Systems vermieden werden.

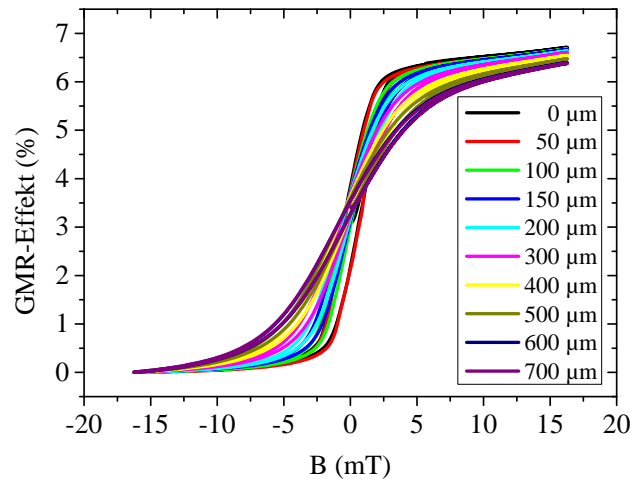


Abbildung 6.16 Einfluss der Y-Verschiebung des Permanentmagneten auf die Ausbildung der Hysteresekurve einer GMR-Sensorbrücke.

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Sensitivität einer Messbrücke von der Magnetpositionierung, wird der Permanentmagnet mit einer Schrittweite von  $10\ \mu\text{m}$  in positive und negative Y-Richtung aus der Idealposition gefahren. Abbildung 6.16 zeigt die Aufnahmen der Hysteresekurven bei den gewählten Magnetpositionen eines IPHT-Wafers. Eine Verschiebung des Magneten um  $700\ \mu\text{m}$  aus der Idealposition bewirkt eine deutliche Verflachung der Kennlinie und einen Rückgang des GMR-Effekts von  $6.73\%$  auf  $6.23\%$ . Zur präzisen Analyse wird die normierte Steigung der einzelnen Kurven bewertet und gegen den Magnetversatz aufgetragen (Abbildung 6.17).

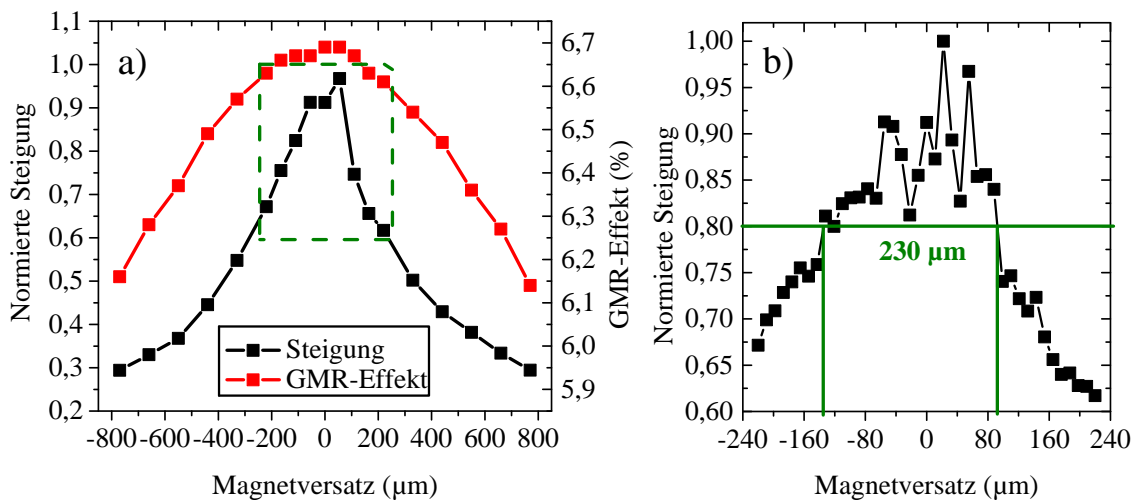
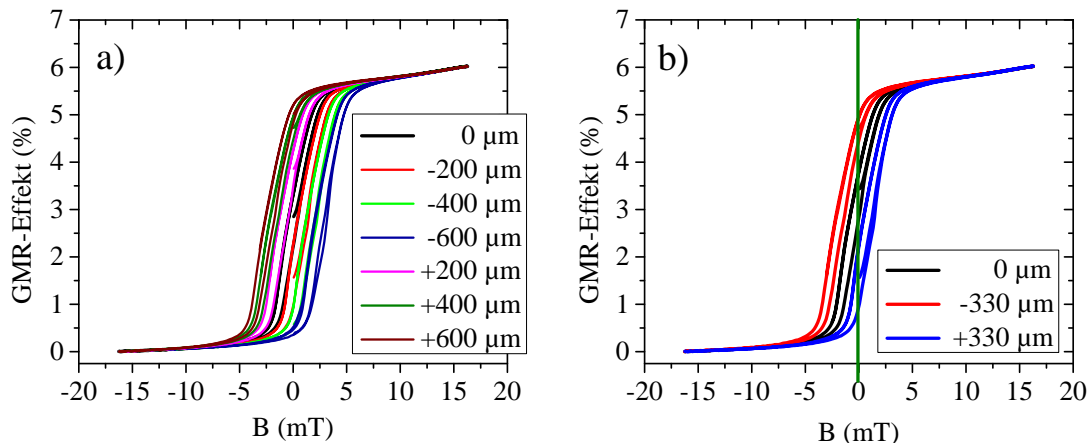


Abbildung 6.17 Untersuchung der Steigung der Kennlinie im linearen Bereich, bei Verschiebung des Permanentmagneten in Y-Richtung aus der magnetisch ermittelten Idealposition unter der GMR-Brücke (a). Über eine Strecke von  $230\ \mu\text{m}$  wird die normierte Steigung von  $80\%$  des Maximalwertes nicht unterschritten (b).



Die Fläche des Permanentmagneten, die eine magnetoresistive Messung erlaubt, wird über einen festgelegten Schwellwert von 80% der Maximalsteigung definiert. Diese Anforderung entspricht einer Kennliniensteilheit von  $>1.0\% \text{ mT}^{-1}$  bei IPHT-Sensoren. Der Erfahrungswert resultiert aus den Mindestanforderungen an die Sensitivität des GMR-Systems, zur Detektion spezifisch markierter FaDu-Zellen mit IPHT-Sensoren, bei einem durchschnittlichen Rauschlevel von  $2 \mu\text{V}/100 \text{ mV}_{\text{pp}}$  und einem  $\text{SNR} > 2$ . Die Betrachtung des GMR-Effekts bei definiertem Schwellwert in Abbildung 6.17 a zeigt einen Verlust der Widerstandsänderung von 4% gegenüber dem Maximalwert (6.73%) auf 6.45%. Abbildung 6.17 b stellt den Verlauf der Steigung im Nahbereich, um die Idealposition des Magneten, dar. Bei Anwendung der gewählten Grenzbedingungen ergibt sich ein absoluter Magnetversatz von  $230 \mu\text{m}$  um den Maximalwert in Y, indem die geforderte Sensitivität, trotz Beeinflussung der parasitären Feldkomponente  $H_y$ , gewährleistet ist.

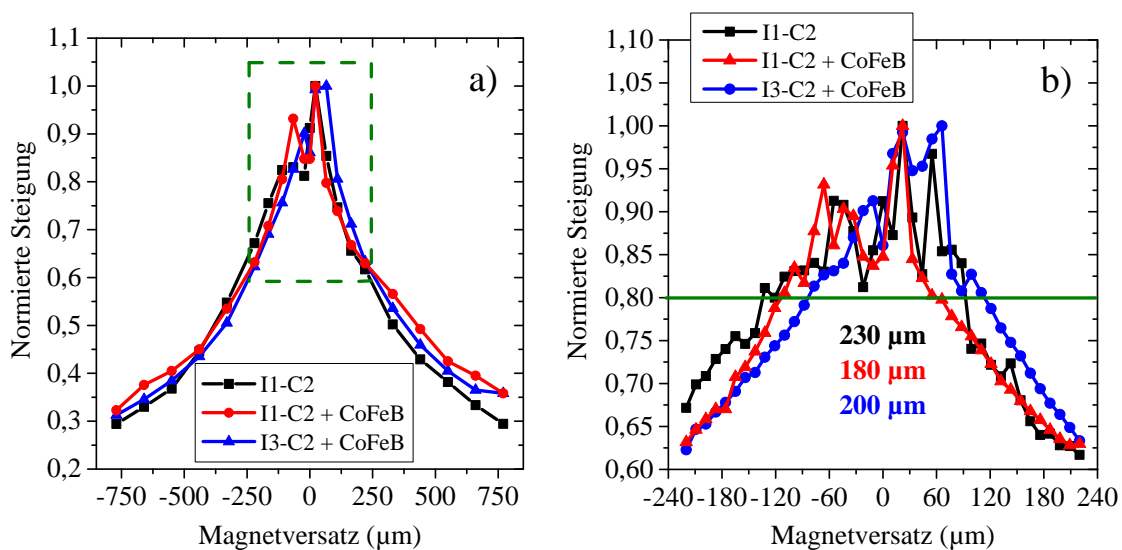


**Abbildung 6.18** Verschiebung der Hysteresekurve aus dem Nullpunkt, bei Versatz des Permanentmagneten in  $200 \mu\text{m}$  Schritten aus der Idealposition in positive und negative X-Richtung (a). Die Detektion relativ kleiner Dipolkomponenten magnetisch markierter Analyte im Nullfeld begrenzt den tolerablen Maximalversatz des Magneten in X-Richtung auf  $\pm 300 \mu\text{m}$  (b).

Analog dazu wird mit einer Schrittweite von  $100 \mu\text{m}$  die X-Komponente des  $32 \text{ mm}$  langen Magneten, bei konstanter Y-Position, analysiert. Bereits ein Versatz des Permanentmagneten von  $600 \mu\text{m}$  verschiebt den Messpunkt in den Sättigungsbereich der Kennlinie. Ein homogener Bereich von  $660 \mu\text{m}$  um den Maximalwert in X, der sich im Gegensatz zur Beeinflussung durch die Feldkomponente  $H_y$  weitgehend symmetrisch verhält, erlaubt eine magnetoresistive Messung mit ausreichend Sensitivität (Abbildung 6.18 b). In Kombination definieren die zwei Relativmessungen zur Homogenität des Magnetfeldes in Z-Richtung, eine Fläche von  $230 \times 660 \mu\text{m}$  für die Positionierung der GMR-Brücke, um mit gewünschter Sensitivität superparamagnetisch markierte Einzelzellen erfassen zu können.

## 6 Optimierung des Messsystems zur Einzelzelldetektion

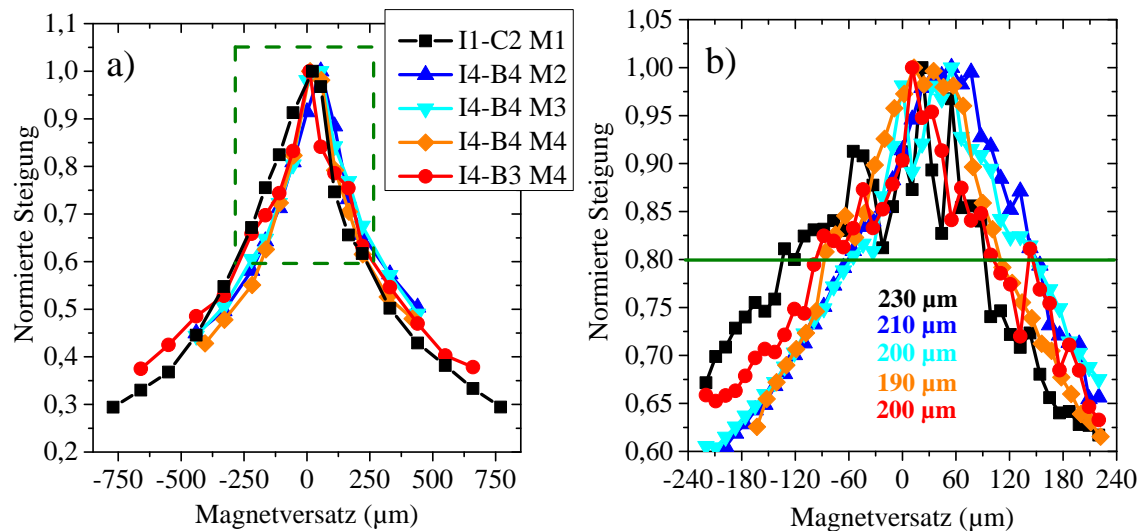
Mit dem Ziel den homogenen Magnetbereich für den Sensorbetrieb zu vergrößern wird auf die unbearbeitete Rückseite des gesägten Si-Chips eine 500 nm dicke CoFeB-Schicht aufgesputtert. Das weichmagnetische Material, zwischen Permanentmagnet und Sensor, soll die Magnetfeldlinien homogenisieren und so die Störkomponenten  $H_x$  und  $H_y$  minimieren. Dabei wird, neben dem bereits analysierten Chip I1-C2, ein Vergleichschip (I3-C2) mit CoFeB beschichtet und mit demselben Magneten vermessen. Abbildung 6.19 vergleicht die normierte Steigung der drei Proben unter Einfluss des Magnetversatzes in Y-Richtung. Mit keiner der beiden beschichteten Proben kann eine Vergrößerung des Messbereichs der Magnetfläche erzielt werden. Der Vergleich von Chip I1-C2 mit und ohne CoFeB-Beschichtung zeigt sogar einen etwa um 20% geringen tolerablen Bereich von maximal 180  $\mu\text{m}$  für den Sensor mit weichmagnetischer Schicht. Der Referenzschip hat mit 200  $\mu\text{m}$  einen nur etwa 10% kleineren Messbereich. Der Effekt der Magnetkomponente  $H_x$  auf die Steilheit der Kurve zeigt keinen Unterschied zur unbehandelten Probe und erlaubt ebenfalls einen Magnetversatz von  $\pm 330 \mu\text{m}$  um den Nullpunkt.



**Abbildung 6.19** Vergleich der Steigung der Hysteresekennlinien bei Versatz des Permanentmagneten aus der Idealposition in positive und negative Y-Richtung vor und nach der Beschichtung mit 500 nm dickem CoFeB auf der Chipunterseite. Mit dem Aufbringen der weichmagnetischen Schicht konnte keine Homogenisierung der magnetischen Feldlinien in Z auf der Sensorebene erreicht werden (b).

In einem weiteren Ansatz wird versucht, einen zweiten NdFeB-Magneten, gleicher Dimension, planparallel zum Magneten unter dem Chip, mit einer Glashalterung, direkt über der PDMS-Mikrofluidik zu fixieren. Die Kombination der vertikal aufmagnetisierten Einzelmagnete soll vor allem die Feldlinien im zentralen Bereich in Z-Richtung homogenisieren und so die Störkomponenten minimieren. Auf Grund der

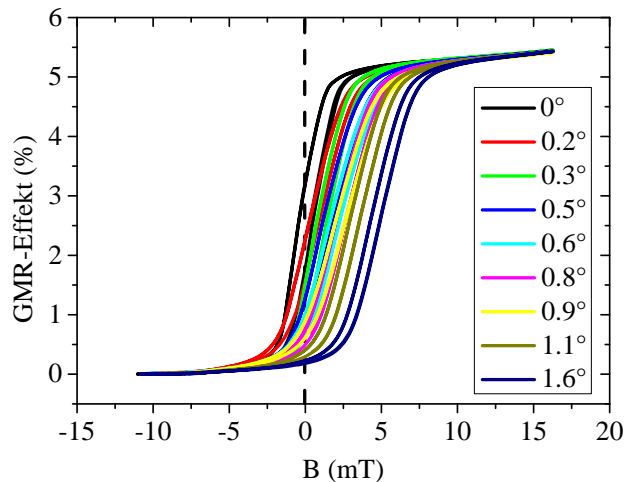
limitierten Aussparung in der PEEK-Platte ist es nicht möglich einen geschlossenen Hufeisenmagneten zu implementieren. Die starke Anziehung der NdFeB-Magnete verhindert jedoch eine exakte Platzierung des zweiten Magneten auf der Glashalterung sowie die Rasterung in 10  $\mu\text{m}$  Schritten über die Bewegung des ersten Magneten am Acrylglasstab mit dem Präzisionskreuztisch. Zusätzlich geht die Möglichkeit einer optischen Kontrolle bei der Einzelzellmessung mit zwei Magneten verloren.



**Abbildung 6.20** Vergleich des homogenen Bereichs zur magnetoresistiven Messung von vier Permanentmagneten aus zwei unterschiedlichen Herstellungslosen. Der tolerable Versatz der Magnete in Y-Richtung bei 80%igem Erhalt der Steilheit pendelt sich zwischen 190-230  $\mu\text{m}$  ein (b).

Zum Nachweis der Reproduzierbarkeit der Magnethomogenität werden, neben dem bereits untersuchten Magneten M1 (Abbildung 6.17), noch drei weitere Magnete mit gleichen Spezifikationen aus zwei verschiedenen Herstellungslosen analysiert. Die Proben M2, M3 und M4 werden dabei mit dem Sensor I4-B4 unter konstanten Bedingungen vermessen. Der Magnetabstand zum Si-Die beträgt 5 mm, resultierend in einer Feldstärke von 150 mT. Vergleicht man die normierte Steigung der Kennlinien über den Magnetversatz, unter Berücksichtigung des gewählten Schwellwertes bei 80% liefern die vier Permanentmagnete sehr ähnliche Ergebnisse mit einer Schwankung von 5% (Abbildung 6.20 b). Um Beeinflussungen der GMR-Brücke auszuschließen, wurde die Abrasterung des Magnetbereichs für den Sensorbetrieb mit dem Magneten M4 und einer zweiten GMR-Brückenschaltung vorgenommen. Für den Versatz in Y sind nahezu idente Ergebnisse mit M4 und der alternativen GMR-Brücke erzielt worden. In Summe konnte mit allen 32 x 27 x 6 mm NdFeB-Magneten eine vergleichbare Magnetfläche für den Sensorbetrieb von etwa 200 x 600  $\mu\text{m}$  erhalten werden, die eine ausreichende Toleranz für die Integration der Sensoren erlaubt. Im Vergleich dazu hat ein

Rundmagnet mit Außenmaßen von 20 x 5 mm eine um den Faktor 3 kleinere Fläche für den Sensorbetrieb, was mit der um 60% geringeren Magnetfläche des Rundmagneten korreliert.

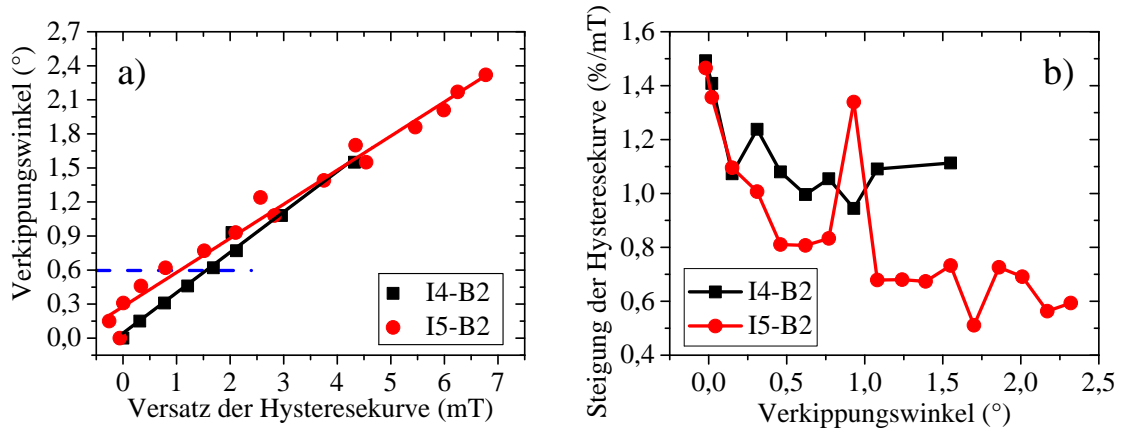


**Abbildung 6.21** Auswirkungen auf die Sensorkennlinie durch Verkipfung der GMR-Brücke in ZX bei konstanter Ausrichtung des Permanentmagneten.

Nach der Charakterisierung der Einflussfaktoren des Permanentmagneten auf der X- und Y-Ebene des empfindlichen magnetischen Messsystems, soll mit einer kontrollierten Verkipfung der Brücke in ZX der Einfluss von  $H_z$  Feldern des Permanentmagneten charakterisiert werden. Um die Rahmenbedingungen während des Versuchs konstant zu halten, wird der Permanentmagnet fest an den Acrylglasstab fixiert und die Verkipfung über eine Variation des Messcarriers generiert, wobei der Startwert der optimalen Positionierung vom Sensor über dem Magnet entspricht. Dazu werden 1 mm Streifen eines doppelseitigen Klebebandes mit 100  $\mu\text{m}$  Dicke am Randbereich des Carriers aufgebracht, um Neigungswinkel von  $0^\circ$ - $2.5^\circ$  zu erzeugen. Abbildung 6.21 zeigt die starke Verschiebung der am Präzisionskreuztisch ausgerichteten Originalkurve (schwarz) mit idealer Kennlinie. Bereits ab Neigungswinkeln von  $0.3^\circ$  ist eine Verschiebung der Kennlinie aus dem Nullfeld und eine zunehmende Verflachung der Kennlinie zu beobachten, die ab etwa  $0.5^\circ$ - $1.0^\circ$  konstant bleibt. Die Verschiebung der Hysteresekurven aus dem vordefinierten Nullpunkt, errechnet über den Mittelwert der Hystereseflanken, übersteigt bereits bei einem Winkel von  $0.6^\circ$ - $0.9^\circ$  mit einem Wert von 2 mT die Anisotropiefeldstärke der Messbrücken von 1.9 mT (Abbildung 6.22 a).

Die Analyse der Steilheit der Kennlinien im linearen Teilstück beider Messungen zeigt einen rapiden Abfall von  $0.5\% \text{ mT}^{-1}$  bis zu einer Verkipfung von  $0.5^\circ$ , gefolgt von einem sich einstellenden konstanten Plateau bis zu einem Winkel von  $1.0^\circ$ . Auf Grund

des starken Offsets kann der Einfluss der Sensitivität bei Neigungen  $>0.6^\circ$  vernachlässigt werden, da in diesem Regime keine magnetoresistive Messung mehr durchführbar ist.



**Abbildung 6.22** Versatz der Hysteresekurve in Abhängigkeit des Verkippungswinkels (a). Die blaue Linie indiziert die maximal tolerable Verkippung von  $0.6^\circ$  die der Anisotropiefeldstärke der Brücken von 1.9 mT entspricht. Die Steigung der Kennlinien gegen den Verkippungswinkel zeigt eine Sättigung (b).

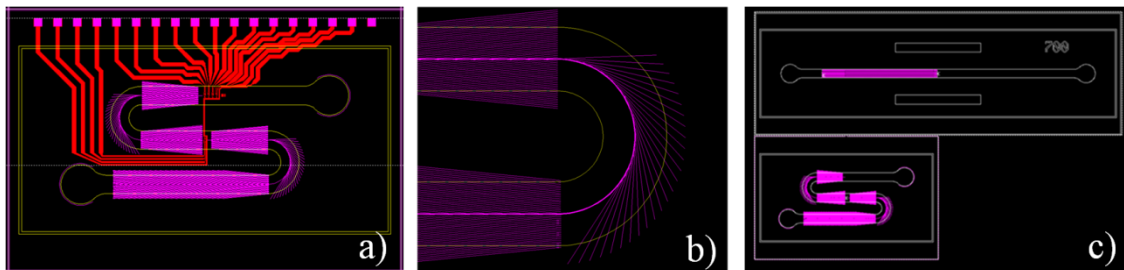
Zusammenfassend kann bei einem  $32 \times 27 \times 6$  mm NdFeB-Magnet unter Verwendung des IPHT-Multilagensystems, bei einer externen Magnetfeldstärke von 150 mT eine Fläche von  $200 \times 600 \mu\text{m}$  für hochsensitive, magnetoresistive Messungen an superparamagnetisch markierten Zellen verwendet werden. Damit kann das Messsystem ohne elektromagnetische Felder betrieben werden. Die angelegten Magnetfelder erlauben zugleich eine magnetophoretische Anreicherung und Ausrichtung der Zellen im Gradientenfeld.

### 6.3 Chipdesign und Sensorgeometrie

Zur Minimierung der Dimensionen des Si-Chips und zur Optimierung der Kanalgeometrie sowie des Sensorlayouts werden im Laufe der Arbeit zwei Chrommaskensätze mit der CAD-Software Catena LAYED erstellt, die jeweils den gesamten lithographischen Herstellungsprozess abdecken. Der erste Maskensatz mit Fokus auf eine Minimierung der Größe des Si-Dies als wesentlichen Kostenfaktor wird in Zusammenarbeit mit M. Reisbeck erarbeitet, der, im Zuge seiner Bachelorarbeit, den Laboraufbau zur magnetischen Einzelzelldetektion in einem miniaturisierten Demonstrator realisiert [117].

## Chipdesign

Mit dem Ziel die Kosten für die Chipherstellung zu senken, wird der lineare Anreicherungskanal in einem ersten Ansatz durch ein mäanderförmiges Kanalsystem ersetzt. Die Chipdimension von 30 x 10 mm von der nur die linke Hälfte vom mittig platzierten GMR-Array aktiv genutzt wird, kann dabei auf 15 x 10 mm halbiert werden, was die Chipausbeute pro 3“ Wafer um einen Faktor zwei auf 20 *Dies* steigert. Die mäanderförmige Ausgestaltung ermöglicht, bei gleichbleibender Kanalbreite von 700  $\mu\text{m}$  und ohne Verringerung der Länge der ferromagnetischen Anreicherungsstrecke zur Führung der superparamagnetisch markierten Analyte, die Einsparung der Hälfte der Si-Fläche.



**Abbildung 6.23** CAD-Entwurf des Chiplayouts mit mäanderförmiger Kanalausgestaltung bei Überlagerung aller relevanter Ebenen (a). Kurvenbereich des Mäanders mit implementierten ferromagnetischen Führungsstrukturen (b). Vergleich der Dimensionen und Längen der Anreicherungsstrecken des 30 x 10 mm Chipdesigns mit dem 15 x 10 mm Mäander Design (c).

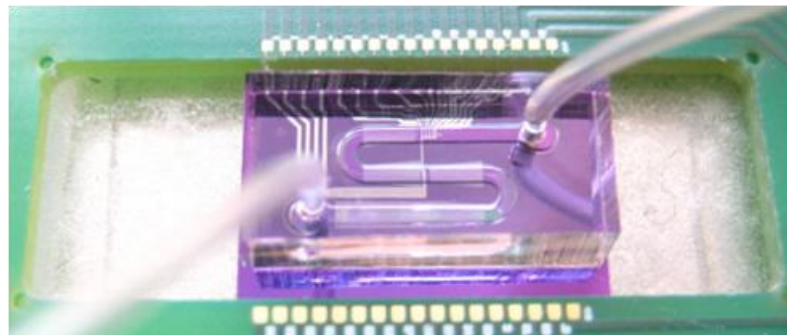
Im Hinblick auf die Stabilität der PDMS-Mikrofluidik und die Dichtigkeit nach dem Klebprozess, werden die drei linearen Bereiche der Mäandergeometrie im Abstand von 1 mm angeordnet und die Einstichlöcher mit einem Mindestabstand von 1 mm zum Mikrofluidikrand gesetzt. Der Nachweis der laminaren Flussbedingungen in den Krümmungen des Kanals, als Grundvoraussetzung zur magnetophoretischen Zellfokussierung (vgl. Kapitel 5.1), erfolgt über die Berechnung der dimensionslosen Dean-Zahl  $De$  [118].

$$De = \frac{\rho * v_m * D_h}{\eta} * \sqrt{\frac{D_h}{R_{mäander}}} = Re \sqrt{\frac{D_h}{R_{mäander}}} \quad (6.3)$$

Dabei wird die Reynoldszahl als Indikator des Flussprofils in linearen, rechteckigen Kanalsystemen (vgl. Formel 5.1) mit dem hydraulischen Durchmesser  $D_h$  und dem Krümmungsradius des Mäander  $R_{mäander}$  verrechnet. Bei hohen Dean-Zahlen bilden sich auf Grund von Zentrifugalkräften sekundäre Wirbel (Dean-Fluss) im mäanderförmigen

Kanal, wohingegen für  $De \ll 30$  ein laminarer Fluss garantiert ist [119]. Das Kanaldesign zeigt ein  $R_{m\ddot{a}nder}$  von  $850 \mu\text{m}$  und ein  $D_h$  von  $247 \mu\text{m}$  bei Kanaldimensionen von  $700 \times 150 \mu\text{m}$ . Unter Annahme einer dynamischen Viskosität  $\eta$  von  $1.0 \text{ mPas}$  ( $\text{H}_2\text{O}$ ,  $20^\circ\text{C}$ ), einer Dichte  $\rho$  von  $0.998 \text{ g cm}^{-3}$ , bei maximalem Volumenstrom von  $3 \mu\text{L s}^{-1}$  und daraus ermittelter  $v_m$  von  $28.6 \text{ mm s}^{-1}$  ergibt sich eine *Dean-Zahl* von 3.7, die die laminaren Bedingungen in den Krümmungen des Mäanderlayouts bestätigt.

Von den sechs integrierten, magnetoresistiven Wheatstone Brücken sind fünf seriell, mittig auf dem letzten linearen Teilstück angeordnet. Eine Brücke sitzt zu Testzwecken im Mittelteil des Kanals, eingerahmt von Nickel Blöcken (Abbildung 6.23 a). Die Fischgrätenstrukturen zur magnetophoretischen Zellfokussierung sind entlang der linearen Kanalbereiche auf einer kumulierten Gesamtlänge von  $16 \text{ mm}$  angeordnet. Auf Grund des laminaren Strömungsprofils im Fluidikkanal ist ein Abdriften der magnetisch markierten Analyten in den Kurven nicht zu erwarten. Dennoch werden die Kurven mit einer Ni-Mittelsee und im Außenbereich schräg einlaufenden, ferromagnetischen Führungslinien ausgekleidet (Abbildung 6.23 b). Abbildung 6.23 c vergleicht die Chipvarianten mit implementierten Führungsstrukturen und Justagemarkierungen zur Positionierung der PDMS-Mikrofluidik.



**Abbildung 6.24** GMR-Sensor im Messbetrieb mit *Wire-Bonding* zum GMR-Chip, aufgesetzter PDMS-Mikrofluidik und PVC-Schläuchen.

Auf Grund der hohen Abhängigkeit der Wiederfindungsrate der magnetophoretischen Führung von der exakten Platzierung des PDMS-Kanals auf dem Si-Chip, wird der platzsparende Designansatz einer Mäandergeometrie nicht weiter verfolgt und durch ein lineares Kanalsystem ersetzt. Der manuelle Vorgang des Aufsetzens des PDMS-Kanals unter dem Mikroskop kann eine Genauigkeit mit einem Versatz unter  $100 \mu\text{m}$  nicht garantieren. Diese Präzision ist allerdings notwendig um eine hohe Wiederfindungsrate im Anreicherungskanal sicherzustellen. Im Gegensatz zur linearen Kanalauslegung hat



eine Fehlpositionierung der PDMS-Fluidik in X- und Y-Richtung, verstärkt durch die Kurven im Mäander, eine größere Auswirkung auf die Führungseigenschaften.

### Sensorgeometrie

Zur Erzeugung des charakteristischen Signalmusters werden die GMR-Einzelemente, wie in Kapitel 5.3 veranschaulicht, in einer Wheatstone Brückenarchitektur angeordnet und kombiniert. Abbildung 6.25 zeigt eine Gegenüberstellung der ersten Generation der GMR-Brückenschaltung [74] und der finalen Ausarbeitung des diagonalen Sensorkonzepts, verglichen mit der schematischen Darstellung einer Wheatstone Brücke.

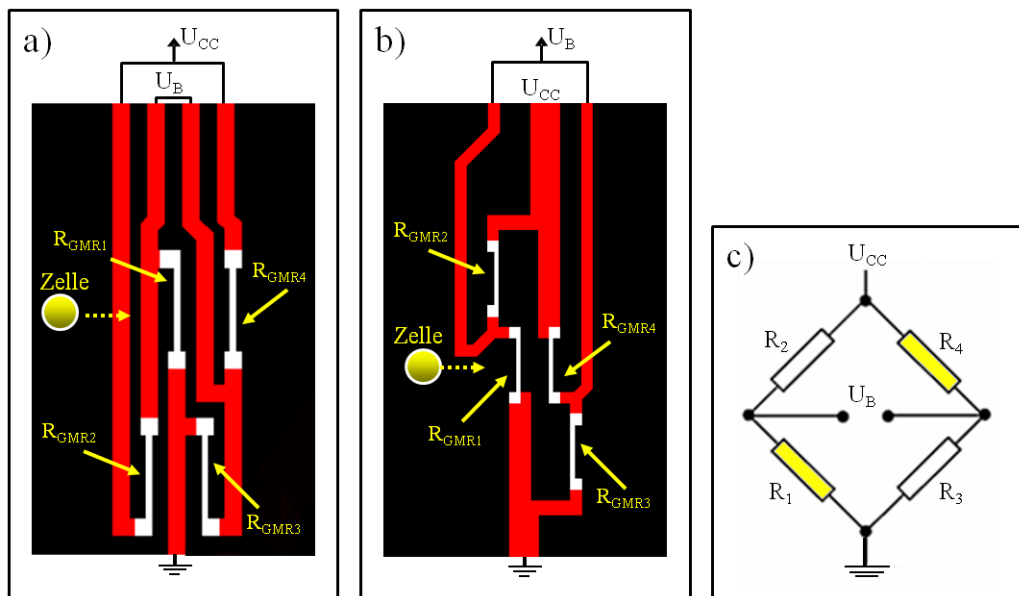


Abbildung 6.25 Gegenüberstellung der ersten Generation der diagonalen Ausführung des GMR-Wheatstone Brückenlayouts (a) mit der finalen Ausgestaltung (b), bei der die passiven GMR-Elemente getrennt nach außen gezogen werden, um falsch positive Events zu vermeiden. Das Ersatzschaltbild hebt die zur Signalerzeugung aktiven magnetoresistiven Elemente hervor (c).

Die Bemaßungen der GMR-Sensorelemente werden mit einer Länge von  $30\ \mu\text{m}$  und einer Breite von  $2\ \mu\text{m}$  unverändert übernommen. Die Dimensionierung der einzelnen Widerstände, angepasst an den Analytdurchmesser, garantiert eine maximale Beeinflussung des Schichtsystems bei Übergang einer magnetisch markierten Zelle und somit maximale Sensitivität bei minimalen Koinzidenzen (minimale Wahrscheinlichkeit mehr als eine Zelle zeitgleich zu messen). Entlang des Widerstandstreifens bildet sich auf Grund der länglichen äußeren Form eine Vorzugsrichtung der Magnetisierung der



Messschicht aus (vgl. Kapitel 2.2). Diese Formanisotropie, orthogonal zur magnetischen Referenzschicht, verstärkt durch den Anisotropie Temperschnitt (vgl. Kapitel 3.2), ermöglicht eine magnetische Detektion des gesamten Dipolfeldes eines magnetisierten Objektes.

Markantester Unterschied der beiden Ausführungen ist die Trennung der passiven Widerstandselemente  $R_2$  und  $R_3$ , die separiert nach außen gezogen werden, um die Ausbildung falsch positiver Signale zu vermeiden. Auf Grund der einfacheren Schaltmatrix kann die Leitung zur Spannungsversorgung der Brücke ( $V_{cc}$ ) problemlos zu den *Bond-Pads* geführt werden, wohingegen das ältere Brückendesign auf einen Zwischenbond am Chip, zur Verbindung der Versorgungsleitungen, zurückgreift, um die Notwendigkeit einer zweiten Lithographieebene zu vermeiden.

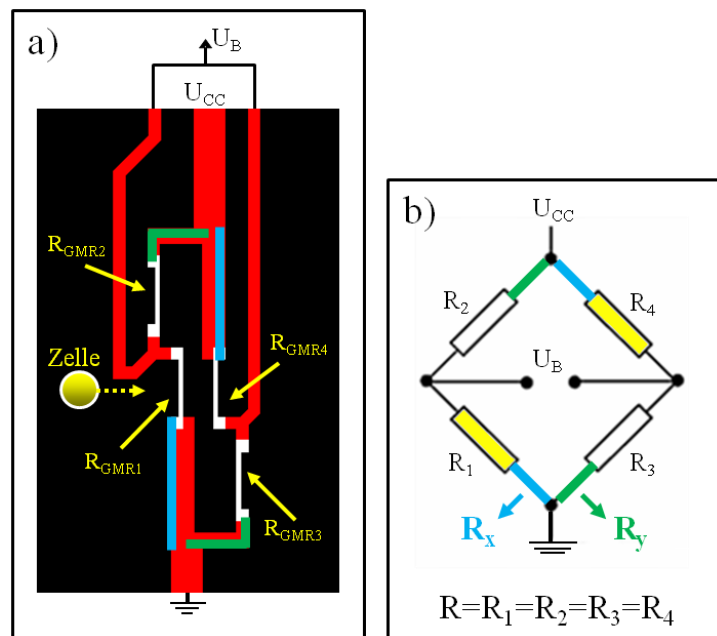


Abbildung 6.26 Betrachtung der asymmetrischen Zuleitungen innerhalb der diagonalen Ausführung des GMR-Wheatstone Brückenlayouts (a). Das Ersatzschaltbild hebt die zur Signalerzeugung aktiven GMR-Elemente sowie die Leitungswiderstände farblich hervor (b).

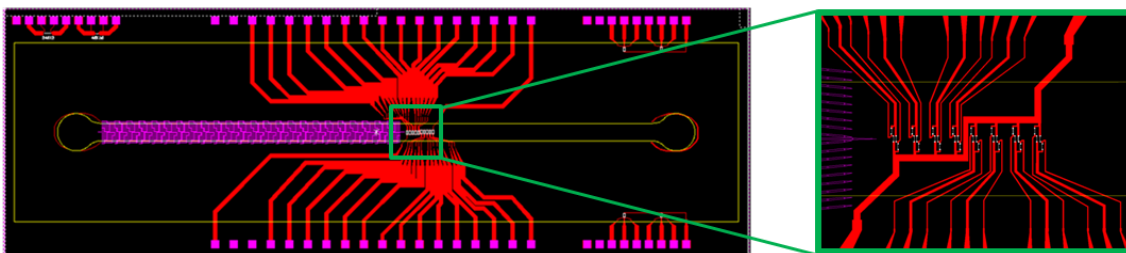
Da das Brückenlayout auf Grund der *Design-Rules* nicht symmetrisch gestaltet werden kann, müssen die Widerstände der Zuleitungen innerhalb der Brücke untereinander abgestimmt werden, um einen optimalen Abgleich des Systems im Nullzustand zu erhalten. Der Brückenabgleich der Wheatstone Brücke hat maßgeblichen Anteil an der maximal möglichen Verstärkung des Ausgangssignals mit dem Lock-In-Verstärker, der bei 10 V in Sättigung geht. Die Leiterbahnen zur Außenkontaktierung, die im Verhältnis zu den Brückenpfaden relativ lang sind, werden fächerförmig aufgeweitet. Die

Verbreiterung der Strukturen resultiert in einer Abnahme des Leitungswiderstands und kann deshalb bei der Betrachtung vernachlässigt werden

Auf Grund der identischen Ansteuerung der Widerstände  $R_{GMR1}$  und  $R_{GMR4}$  bzw.  $R_{GMR2}$  und  $R_{GMR3}$  (Abbildung 6.26 a) kann die Berechnung der Offsetspannung der Wheatstone Brücke auf die Leitungswiderstände  $R_x$  und  $R_y$  reduziert werden. Der spezifische Flächenwiderstand  $R_{\square}$  der Al-Zuleitungen wird nach Formel 6.2 über den spezifischen Widerstand von Aluminium ( $\rho_{Al}=2.65 \times 10^{-8} \Omega m$ ) und die Höhe der Strukturen (150 nm) auf  $0.177 \Omega \square^{-1}$  festgelegt. Daraus ergeben sich nach dem Auszählen der Strukturquadrate die Widerstände für  $R_x$  mit einem Wert von  $0.9859 \Omega$  und  $R_y$  mit  $0.9965 \Omega$ . Der Nullabgleich der Wheatstone Anordnung wird nach Formel 5.2 unter Berücksichtigung der Zuleitungswiderstände errechnet.

$$\Delta V = \left( \frac{R_y - R_x}{2R + R_y + R_x} \right) * V_{cc} \quad (6.4)$$

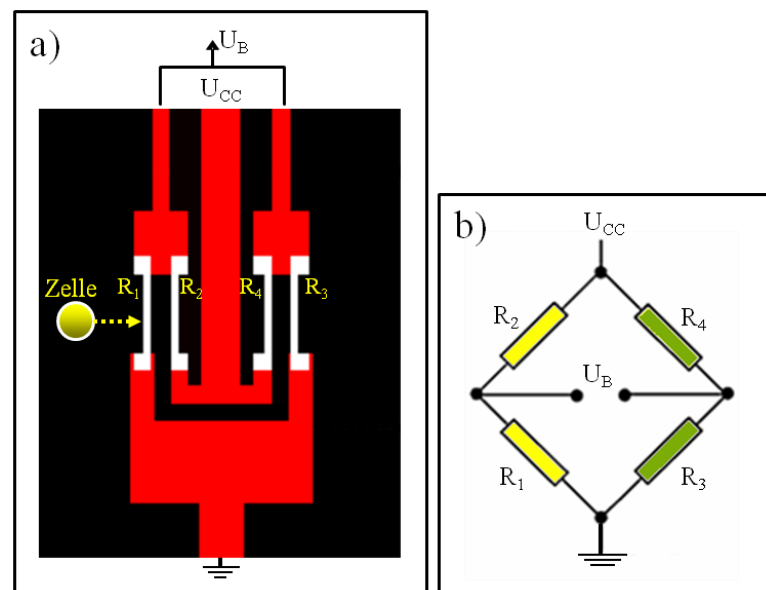
Bei applizierter Eingangsspannung  $V_{cc}$  von  $100 \text{ mV}_{pp}$  und einem Widerstand  $R$  der GMR-Elemente von  $280 \Omega$  ergibt sich ein Brückenoffset von  $1.9 \mu\text{V}$ . Dieser Wert ist ausreichend klein, um den Lock-In mit der Maximalverstärkung von 30,000 zu betreiben, die bei magnetischen Messungen von spezifisch markierten Zellen erforderlich ist.



**Abbildung 6.27** CAD-Entwurf des finalen Chiplayouts mit Einblendung aller Zeichenebenen (a) sowie Vergrößerung des Sensorarrays, das 8 einzeln kontaktierbaren GMR-Sensorbrücken flussabwärts zur magnetophoretischen Anreicherungsstrecke beinhaltet (b).

Abbildung 6.27 zeigt das CAD-Design des finalen Chips mit einer Überlagerung aller Maskenebenen, wobei der gelbe Layer (dünne gelbe Linien) als Justagemarke für das Aufsetzen der PDMS-Mikrofluidik dient. Die Gesamtlänge von 30 mm, bei einer Chipbreite von 10 mm ermöglicht eine magnetophoretische Anreicherungsstrecke mit einer Länge von 12 mm, die eine Wiederfindungsrate  $>97\%$  der magnetisch markierten Analyte garantieren soll. Das Sensorarray besteht aus acht bis zehn seriell angeordneten

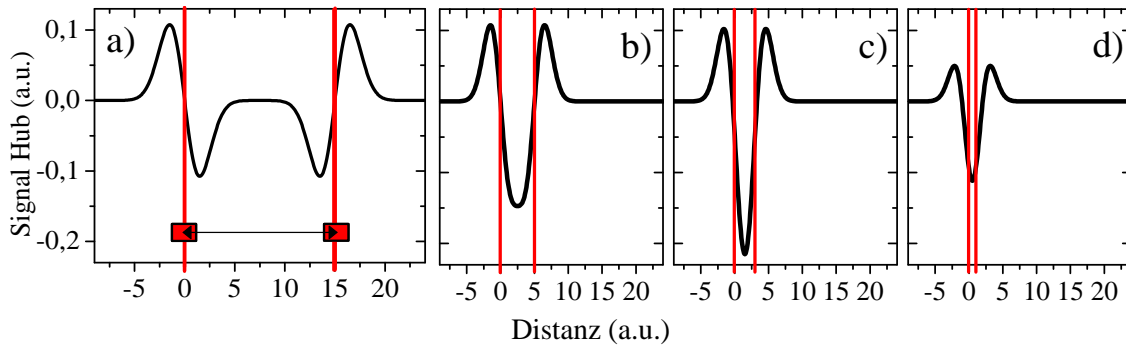
GMR Messbrücken pro Chip, die individuell adressierbar sind. Die Brücken unterscheiden sich ausschließlich im Abstand der signalgebenden GMR-Widerstände ( $d_{GMR}$ ) mit 14, 16, 18 und 20  $\mu\text{m}$ , um Analyte mit hydrodynamischen Durchmesser  $< 20 \mu\text{m}$  zu detektieren. Die Al-Zuleitungen (roter Layer) von den *Bond-Pads* bis zur elektrischen Kontaktierung der Brückenelemente, werden fächerförmig mit einem Mindestabstand von 12  $\mu\text{m}$  aus dem Bereich des Mikrofluidikkanals geführt. Im Design wurde darauf geachtet, dass alle Brücken dieselbe Masseleitung besitzen und alle spannungsführenden Zuleitungen zum GMR durch eine Passivierungsschicht ausreichend vor Durchbrüchen und Korrosion geschützt werden.



**Abbildung 6.28** Paralleles Sensorlayout unter Einsatz aller Wheatstone Brückenelemente (a) und Ersatzschaltbild der Brückenordnung (b). Die Farbkodierung indiziert die Kombination der parallelen Einzelemente zu einem Widerstandspaar.

Das zweite Brückenlayout verdoppelt das magnetoresistive Signal durch Addition der Signalantworten von je zwei Einzelwiderständen für einen Event. Dabei werden jeweils zwei parallele Elemente der Messbrücke zu einem Widerstandspaar kombiniert, resultierend in einem charakteristischen 6-Peak-Signal (vgl. Kapitel 5.3). Im Gegensatz zum diagonalen Ansatz, ermöglicht das symmetrische Brückendesign der parallelen Variante einen theoretisch perfekten Brückenabgleich, der eine Messung bei 30,000-facher Verstärkung des Lock-In-Verstärkers erlaubt. Das Ersatzschaltbild der Wheatstone Brückenordnung in Abbildung 6.28 b verdeutlicht farblich die gewählte Kombination der Einzelemente. Die Signalüberlappungen der Einzelsignale mit der Ausbildung einer dominanten Signalamplitude bieten die Möglichkeit schwach markierte Analyte, mit einem ausreichenden SNR, zu detektieren. Wesentlicher Nachteil

der parallelen Ausführung ist die Gesamtlänge der aktiven Fläche von 50  $\mu\text{m}$ , die somit fast 2.5 mal länger als die diagonale Anordnung ist, was bei konstanter Geschwindigkeit in einem signifikanten Abfall der maximal möglichen Zählfrequenz durch Koinzidenzen resultiert.



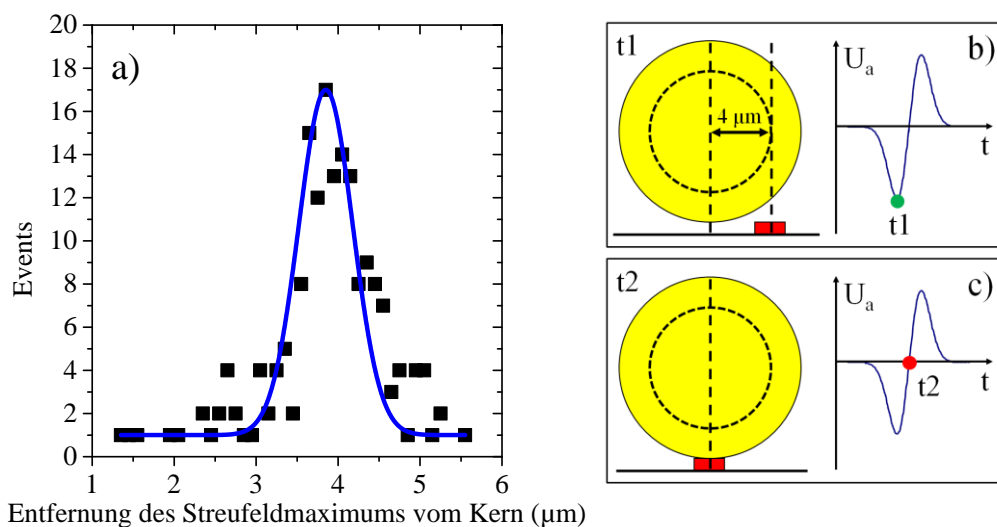
**Abbildung 6.29** Simulation des parallelen Sensorsignals, unter Kombination von zwei invertierten Signalverläufen über die zweite Ableitung der Gaußfunktion (a). Die Annäherung der Einzelsignale soll die Abstandsabhängigkeit der Ausbildung der Signale vom Abstand der GMR-Sensorelemente, bei konstantem Analytdurchmesser hervorheben (b-d).

Abbildung 6.29 zeigt die Problematik des Sensorlayouts hinsichtlich der starken Abhängigkeit der Abstände der Sensorelemente auf die Signalantwort, am Beispiel eines Widerstandspaars. Zur einfachen Veranschaulichung wird ein magnetisches Dipolfeld über die erste Ableitung einer Gauß-Funktion simuliert, wobei unter Annahme einer konstanten Analytgröße für die Standardabweichung  $\sigma$  der Wert 1.5 gewählt wird.

$$g'(x) = \left( -\frac{x - \mu}{\sqrt{2\pi} * \sigma^3} \right) * \exp\left( -\frac{(x - \mu)^2}{2\sigma^2} \right) \quad (6.5)$$

Eine zweite, invertierte Kurve wird durch Variation des Erwartungswertes  $\mu$  sukzessive angenähert (Abbildung 6.29 b-d) und simuliert die Bildung des Gesamtsignals bei Verringerung des Widerstandabstandes. Bei optimaler Platzierung der Einzelemente, in Abhängigkeit des Analytdurchmessers, kann eine Verdopplung des Signalhubs erreicht werden (c). Eine Vergrößerung des Abstandes verhindert die ideale Überlagerung der Signalteile und bewirkt eine Abnahme und Verbreiterung des dominanten Peaks (b). Verringert man die Distanz der Sensorelemente resultiert ebenfalls eine Abnahme des dominanten Signalteils. Zusätzlich dazu verlieren die positiven Außenpeaks an Stärke, bedingt durch den inversen Effekt des jeweils zweiten Widerstands, der zunehmenden Einfluss an der Signalbildung nimmt (d).

Zur Abschätzung der optimalen Anordnung der Widerstandselemente für die Erstellung des parallelen Layouts werden magnetische Messungen der 12  $\mu\text{m}$  Referenzanalyten mit einem 2  $\mu\text{m}$  breiten GMR-Streifen auf die Lage des maximalen magnetischen Streufeldes, relativ zum hydrodynamischen Durchmesser, analysiert. Dabei wird die exakte Zellposition bei Ausbildung der Peaks des charakteristischen Signalverlaufs durch einen einzigen Widerstand ermittelt (2 Peaks mit jeweils einer Widerstandserhöhung und Erniedrigung je Event). Über die Laufzeit vom ersten Peak zum Nulldurchgang, bei dem der Analyt auf dem Widerstand positioniert ist, kann über die Beadgeschwindigkeit (vgl. Kapitel 5.3), das maximale Streufeld im Bezug auf den Mittelpunkt des magnetischen Analyten errechnet werden (Abbildung 6.30 b&c).

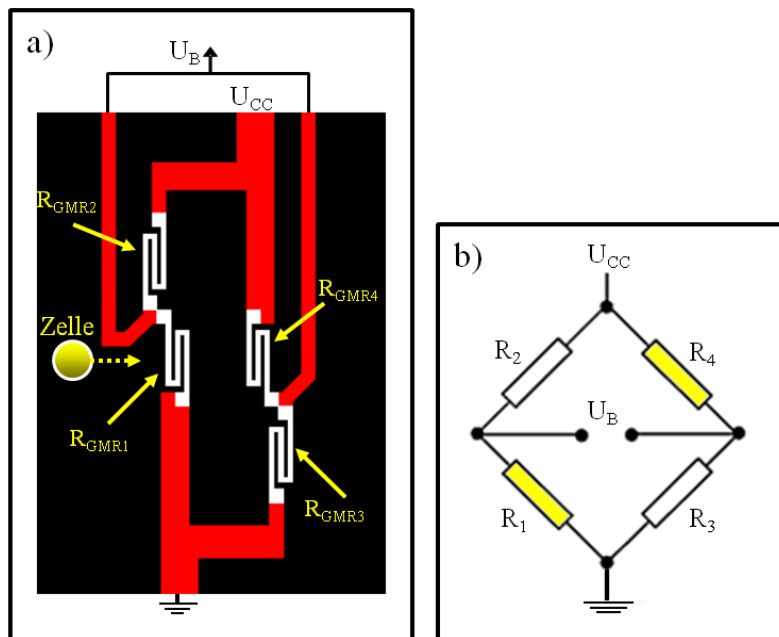


**Abbildung 6.30** Ermittlung der Lage des Streufeldmaximums eines 12  $\mu\text{m}$  Referenzpartikels über die Bildung des Signalmusters an einem magnetoresistiven Einzelement, ausgehend vom Analytkern, mit dem Ziel den idealen Abstand der Widerstandselemente in Abhängigkeit des Analytdurchmessers für optimale Signalinterferenz zu ermitteln (a). Das Schaubild zeigt die Analytposition zum Zeitpunkt  $t_1$  bei der das Signalminimum ausgebildet wird (b) und die Position direkt auf dem GMR-Element ( $t_2$ ), die einen Nulldurchgang im Signalmuster bewirkt (c).

Unter Annahme einer homogenen Magnetisierung des Referenzanalyten und Ausbildung eines magnetischen Dipols im externen Feld, zeigt die Auswertung von 200 Referenzanalyten eine, von den magnetoresistiven Sensoren detektierte, maximale X-Komponente des magnetischen Streufeldes innerhalb des 12  $\mu\text{m}$  Referenzanalyten -  $\sim 4 \mu\text{m}$  vom Mittelpunkt des Referenzbeads entfernt (Abbildung 6.30 a). Der magnetisch erfasste Durchmesser, der etwa  $2/3$  des hydrodynamischen Beaddurchmessers entspricht, ist in den schematischen Darstellungen des Referenzbeads in Abbildung 6.30 b,c maßstabsgetreu eingezeichnet. Aus diesem Ergebnis lässt sich ableiten, dass im Grenzfall von zwei hintereinander durchströmenden 12  $\mu\text{m}$  Beads, für das parallele

## 6 Optimierung des Messsystems zur Einzelzeldetektion

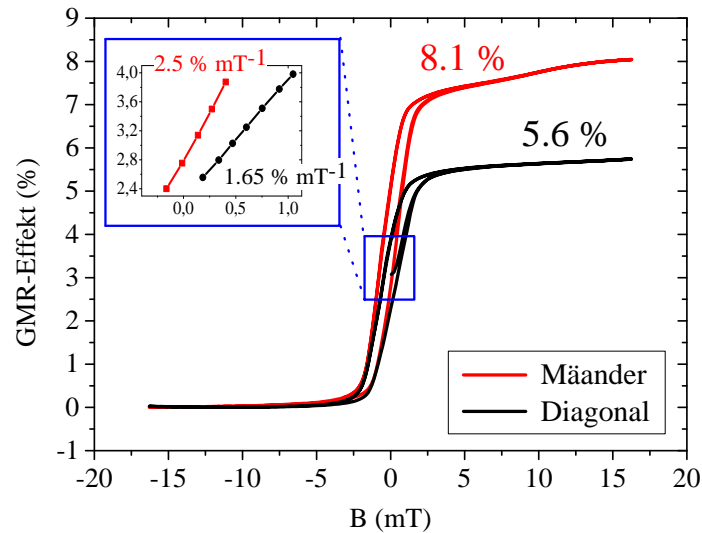
Sensorlayout, der Abstand der Einzelelemente eines GMR-Widerstandspaares ( $d_{para1}$ ) für eine optimale Signalüberlagerung  $8\ \mu\text{m}$  betragen muss. Im Hinblick auf die Detektion von  $15\ \mu\text{m}$  FaDu-Tumorzellen mit einer Halbwertsbreite von  $5\ \mu\text{m}$  (Abbildung 4.8) sind für das parallele Layout Abstände von  $8, 10, 12$  und  $16\ \mu\text{m}$  festgelegt worden. Für die Widerstandspaare wird ein Abstand ( $d_{para2}$ ) von  $35\ \mu\text{m}$  gewählt, um zusätzlich ein Übersprechen der Widerstandspaare untereinander zu verhindern.



**Abbildung 6.31** Alternative Ausgestaltung der GMR-Einzelelemente in Mäanderform, unter Verwendung des diagonalen Wheatstone Brückendesigns. Anstelle der linearen  $30 \times 2\ \mu\text{m}$  Einzelstreifen werden drei lineare Stege mit einer Breite von  $2\ \mu\text{m}$  im Abstand von  $2\ \mu\text{m}$  parallel angeordnet und an den Enden verbunden.

Inspiziert von der Arbeit von Mark Tondra (NVE Corporation) und Marc Porter (Iowa State University) [120] wird ein drittes Brückendesign auf der Maske integriert (Abbildung 6.31). Angelehnt an die diagonale Brückenmatrix werden die Einzelstege ersetzt durch GMR-Mäanderstrukturen. Die Mäander überdecken eine Fläche von  $30 \times 10\ \mu\text{m}$  bei einer Stegbreite von  $2\ \mu\text{m}$ . Der lithographische Herstellungsprozess limitiert die Abstände zwischen den GMR-Steigen auf  $2\ \mu\text{m}$ . Durch die Verlängerung des GMR-Streifens erhöht sich der Gesamtbrückenwiderstand, um einen Faktor 2.5 von  $200\ \Omega$  auf durchschnittlich  $\sim 510\ \Omega$ . Damit reduziert sich der Einfluss der Zuleitungswiderstände relativ zu den GMR-Widerständen, was einen geringeren Brückenoffset der Wheatstone Anordnung zur Folge hat. Die Verdreifachung der Fläche des magnetoresistiven Materials verringert zusätzlich die Beeinflussung, durch Prozessungenauigkeiten der  $2 \times 30\ \mu\text{m}$  GMR-Stege und erlaubt eine Lock-In-Messung

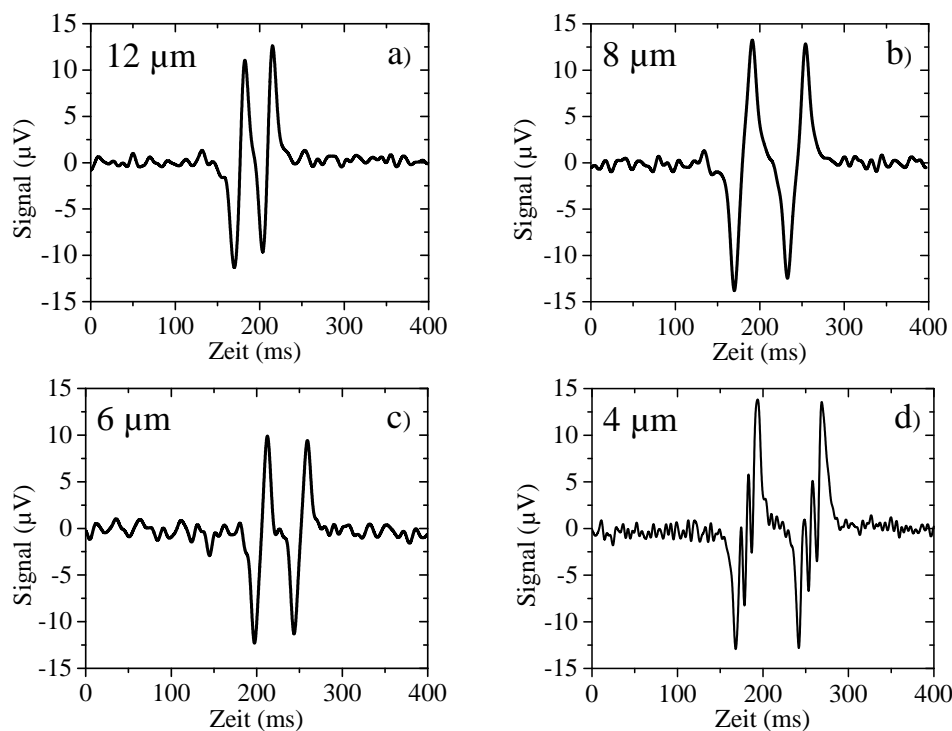
bei maximaler Verstärkungsstufe. Zudem wird der Brückenabgleich unempfindlicher gegenüber Prozessvariationen. Neben einer einfacheren Brückenmessung erhöht die Mäanderstruktur den Gesamteffekt der magnetoresistiven Messung von durchschnittlich 5.5% auf 8.0% (Abbildung 6.32).



**Abbildung 6.32** Vergleich der Hysteresekennlinien eines diagonalen Brückendesigns mit linearen GMR-Streifen und der diagonalen Ausgestaltung unter Verwendung von mäanderförmigen GMR-Elementen. Die vergrößerte Darstellung im magnetischen Nullfeld zeigt die Steigungen im linearen Kennlinienbereich.

Das entscheidende Kriterium für den Biosensor ist neben dem GMR-Effekt die Kennliniensteilheit im Nullfeldbereich (Abbildung 6.32, blaues Insert), die von  $1.65 \text{ \% mT}^{-1}$  auf  $2.5 \text{ \% mT}^{-1}$  ansteigt. Die höhere Stabilität und Sensitivität des Layouts erfordert eine höhere Brückenversorgungsspannung von 300 mV für einen analogen Signalhub, im Vergleich zum diagonalen Sensorlayout mit einfachen GMR-Streifen. Unter diesen Bedingungen ist die Passivierung der Sensoren noch ausreichend gewährleistet.

Trotz der deutlichen Sensitivitätssteigerung im Vergleich zu den Brückengeometrien mit GMR-Einzelstreifen und der Option der Erhöhung der Eingangsspannung des Systems ist die Mäanderauslegung zur Einzelzellanalyse auf Grund der Ausbildung von komplexeren Signalmustern bei kleineren Analyten nur eingeschränkt praktikabel. Abbildung 6.33 zeigt die magnetischen Signalmuster der Referenzanalyten im Durchmesserbereich von 4 bis 12  $\mu\text{m}$  unter Verwendung der GMR-Sensorbrücke von Abbildung 6.31, bei einem konstanten, externen Magnetfeld von 100 mT.



**Abbildung 6.33** Magnetische Erfassung von Referenzanalyten im Durchmesserbereich von 4-12  $\mu\text{m}$  mit den mäanderförmig strukturierten GMR-Elementen. Unter gegebenen Layoutbedingungen (vgl. Abbildung 6.31) formen 12  $\mu\text{m}$  und 8  $\mu\text{m}$  Analyte ein klassisches 4-Peak-Signal, während bei den 6  $\mu\text{m}$  Partikeln bereits schwache Zwischenpeaks ausgebildet werden. Kleinere Analytdurchmesser ( $d_{\text{hydro}} < 6 \mu\text{m}$ ) generieren bei dem konstanten Abstand der linearen Mäander-Teilbereiche von 2  $\mu\text{m}$  ein 6-Peak-Signal pro GMR-Element (d).

Mit dem gewählten Abstand der linearen GMR-Stege von 2  $\mu\text{m}$  generieren die 12  $\mu\text{m}$  und 8  $\mu\text{m}$  Analyte ein klassisches 4-Peak-Signal, analog zur diagonalen Verschaltung (Abbildung 6.33 a,b). Bei 6  $\mu\text{m}$  Referenzpartikeln fängt der Übergangsbereich an (Abbildung 6.33 c), ab dem sich das Signalmuster, bei Analytdimensionen in der Größenordnung des GMR-Mäander-Pitch kontinuierlich in ein 12-Peak-Signal verwandelt (Abbildung 6.33 d). Bei unzureichend hohem SNR kann ein derart komplexes Signalmuster nicht automatisiert ausgewertet werden. Selbst bei Ausformung eines charakteristischen 4-Peak-Patterns beruht die Signalbildung ausschließlich auf Überlappung der Sensorantworten der linearen Einzelemente. Im Fall von inhomogenem Labeling der Zielanalyte, führt dies zu einem nicht abschätzbaren Fehler in der Geschwindigkeitsberechnung und folglich zu einer Unschärfe bei der Berechnung des magnetischen Durchmessers.

Abbildung 6.34 zeigt den CAD Entwurf des finalen 3“ Waferlayouts, bei Überlagerung aller zur Prozessierung essentiellen Maskenebenen. Neben den sieben 30 mm langen Si-



Chips werden sechs Si-Dies mit einer Länge von 15 mm realisiert. Die Sensorlayouts umfassen dabei nur diagonale und parallele Verschaltungen der Brücken, die eine präzise TOF-Auswertung der spezifischen Signalantworten bei der Messung von Bioanalyten ermöglichen.

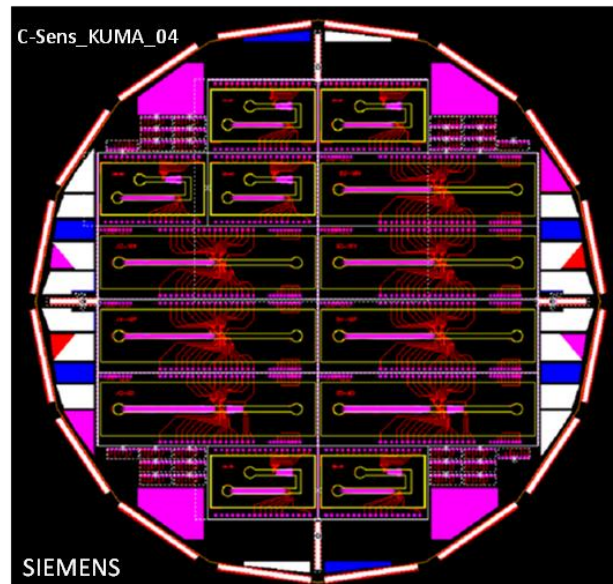


Abbildung 6.34 CAD-Zeichnung der finalen 3-Maske mit Überlagerung aller relevanten Maskenebenen.

#### 6.4 Magnetische Zellanreicherung

Kernstück der magnetischen Zellanreicherung in Vollblut ist die, auf dem Si-Chip integrierte, magnetophoretische Anreicherungsstruktur, die die im 700  $\mu\text{m}$  breiten Mikrofluidikkanal stochastisch verteilten Analyte in die Mitte des Kanals konzentriert und zielgerichtet über die orthogonal im Kanal positionierte, 30  $\mu\text{m}$  lange Sensoranordnung führt. Als ferromagnetisches Material wird Nickel (Curie-Temperatur  $T_C$  bei 375  $^\circ\text{C}$ ) auf Grund seiner Korrosionsbeständigkeit gegen Luft, Wasser und diverse Laugen, gewählt [121]. Abbildung 6.35 vergleicht die ersten Ansätze einer Führungsstruktur mit dem finalen *Chevron*-Layout für magnetische Referenzanalyten im Durchmesserbereich von 6-15  $\mu\text{m}$ . Mit den Teststrukturen in Abbildung 6.35 a wurde beobachtet, ob sich magnetische Beads entlang ferromagnetischer Linien über dem Permanentmagneten führen lassen. Diese magnetophoretische Führung wurde von Inglis et.al. vorgeschlagen, um Zellseparation in mikrofluidischen Systemen vorzunehmen [122]. In unserem Problemfeld geht es hingegen um eine gezielte Anreicherung von markierten Zellen. In der Reihenfolge der Entwicklung von linearen

## 6 Optimierung des Messsystems zur Einzelzelldetektion

zu linear durchbrochenen Führungen, parallel zur Flussrichtung, wurde eine Führung wie auch die Möglichkeit der Vereinzelung von magnetischen Beads in Ketten beobachtet. Durch Zentrierung der Führungslinien konnten die ersten Ansätze zur Anreicherung realisiert werden.

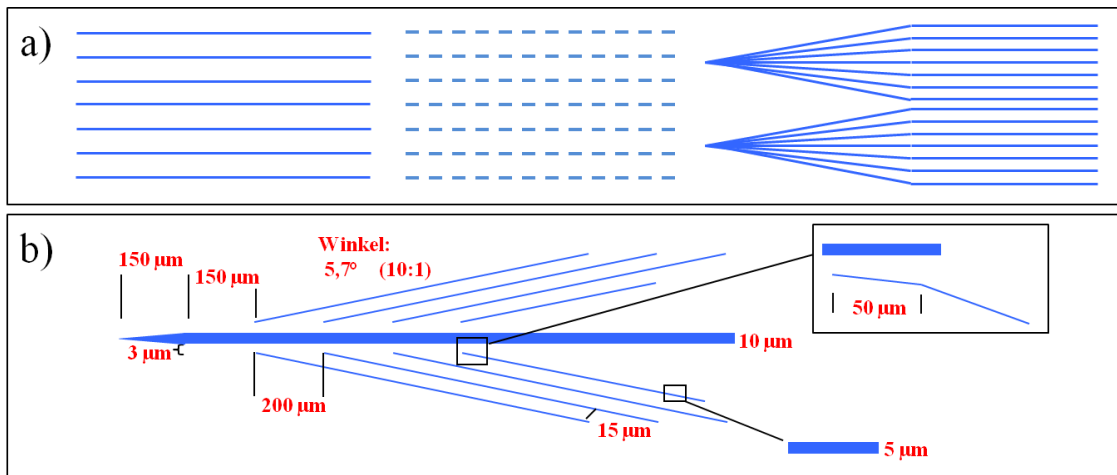
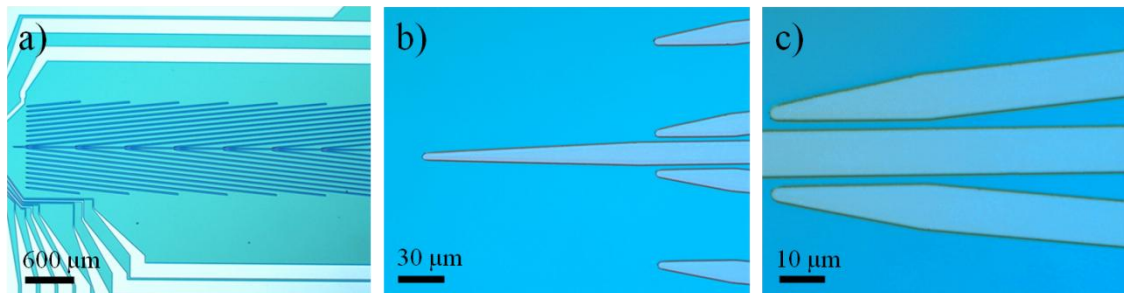


Abbildung 6.35 Schematische Darstellungen der ersten Ansätze einer magnetophoretischen Zellfokussierung (a). Detaillierte Illustration des finalen Layouts der ferromagnetischen Fokussierungsstrukturen für magnetische Referenzanalyten (b).

Der finalen Version der magnetophoretischen Zellanreicherung (Abbildung 6.35 b) lagen die folgenden, wesentlichen Anforderungen zu Grunde: (1) Anreicherung der Zellen zur Mikrofluidikmitte, wo sich Objekte im laminaren Fluss entlang der höchsten Flussgeschwindigkeiten orientieren. (2) Transfer der angereicherten Zellen von der Spitze der Magnetophorese zur GMR-Brücke, sodass die Zellen zentriert über die GMR-Widerstände rollen können. (3) Kontinuierlicher Anreicherungsprozess ohne Verluste durch lokale magnetische Feldüberhöhungen entlang des *Chevron*-Patterns.

Ferromagnetische Ni-Gräten, mit einer Breite von 5 µm, sind in einem Neigungswinkel von 5.7° (10:1) zur laminaren Flussrichtung der Analyte angeordnet und führen die Zellen auf eine doppelt so breite Mittelseele. Mit der relativ flachen 10:1 Ausrichtung konnte im Gegensatz zu vier alternativen Ansätzen, mit steileren Winkeln (26.6°, 18.4°, 11.3°, 8.1°) mikroskopisch eine signifikante Steigerung der Wiederfindungsrate beobachtet werden. Die geringe Richtungsänderung der superparamagnetisch markierten und am Substratboden angereicherten Analyte ist wichtig, um ein ausgewogenes Kräfteverhältnis zwischen der Stokes Reibung  $F_d$  im laminaren Fluss und der magnetophoretischen Kraft  $F_{mag}$  im Gradientenfeld der Ni-Strukturen zu erreichen (vgl. Formel 5.6). Bei zu steilen Neigungswinkeln kann beispielsweise eine magnetophoretische Führung nur durch Erhöhung der lokalen Feldstärke bzw.

Absenkung der Durchflussrate erreicht werden. Unter diesen Bedingungen beobachtet man jedoch eine irreversible Arretierung der Referenzbeads an den Führungsstrukturen. Die seitlich einlaufenden Ni-Gräten enden in einem Abstand von  $5\ \mu\text{m}$  zur Mittelseele und weisen ein sich parallel zuspitzendes Ende mit einer Länge von  $50\ \mu\text{m}$  auf (Abbildung 6.36 c). Dadurch wird eine Vervielfachung des Gradientenfeldes an sich kreuzenden Ni-Teilstücken vermieden, die zu einem Anhaften der magnetischen Analyte an die Ni-Strukturen führt.

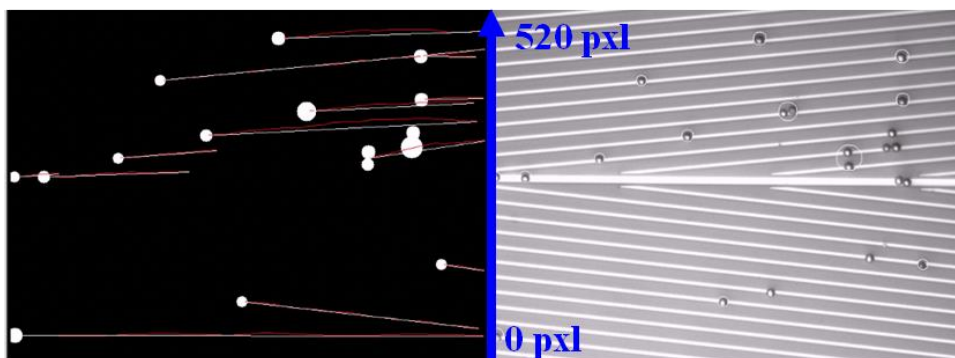


**Abbildung 6.36** Mikroskopaufnahmen der lithographisch hergestellten Führungsstrukturen zur Fokussierung der magnetisch markierten Analyte (a). Zur Unterdrückung von Aggregationseffekten bei Verlassen der magnetischen Stege läuft die Mittelseele in einer Länge von  $150\ \mu\text{m}$  spitz zu (b). Der Übergang der Analyte von den seitlich zulaufenden Fischgräten zur Mittelseele wird realisiert mittels parallel zur Seele auslaufenden Flanken, die in einem Abstand von  $3\ \mu\text{m}$  angeordnet sind (c).

Die Zuspitzung der Mittelseele in einem flachen Winkel über eine Distanz von  $150\ \mu\text{m}$  soll einen ähnlichen Effekt der Überhöhung der Kraft  $F_{mag}$  bei Verlassen der superparamagnetisch markierten Analyte vermeiden und eine kontinuierliche Führung über die  $30\ \mu\text{m}$  GMR-Streifen garantieren (Abbildung 6.36 b). Der Abstand der Spitze zum ersten GMR-Brückenelement wird mit  $150\ \mu\text{m}$ , und somit zehnfachem Analytdurchmesser großzügig gewählt, um bei Überstreichen des Widerstands eine von der magnetophoretischen Kraft  $F_{mag}$  unabhängige Analytgeschwindigkeit zu garantieren. Die Geschwindigkeit bleibt so eine Funktion der Analytgröße im laminaren Flussprofil der Trägerflüssigkeit und erlaubt statistische Auswertungen bezüglich des Durchmessers.

Zur Bewertung der Führungseigenschaften der magnetophoretischen Fokussierungsstrukturen ist, im Zuge einer Masterarbeit an der Technischen Universität Graz, ein Softwaretool zur Trajektorienanalyse entwickelt worden [123]. Das Verfahren basiert auf dem Prinzip der *Background Subtraction*, bei dem bewegte Objekte über Subtraktion von zwei aufeinanderfolgenden *Frames* nachgewiesen werden, und nutzt einen *Three Frame Differencing* Algorithmus zur Segmentierung der Analyten [124].

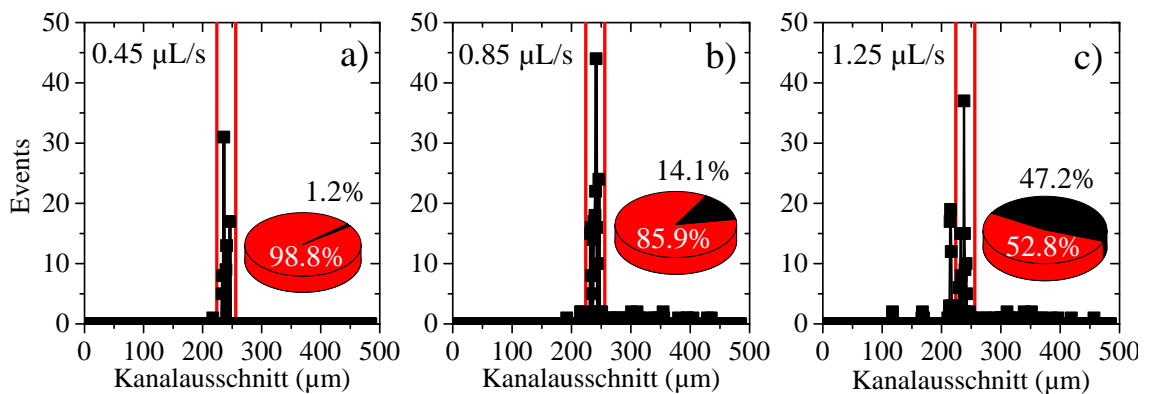
Als *Input-Files* für die in Java programmierte Software dienen \*.avi Videos, aufgenommen mit der im Laboraufbau implementierten CCD-Kamera TXG14f von Baumer. Zur Erhöhung der *Frame-Rate* auf 60 Bilder pro Sekunde (engl. *Frames per Second*, fps) wird die Kamera, auf Kosten der Auflösung, in einem 2 x 2 *Binning*-Modus betrieben, resultierend in einem Bildausschnitt von 696 x 520 pxl. Je nach Vergrößerung des Objektivs, kann so ein 650 x 485  $\mu\text{m}$  (200 x Vergrößerung) bzw. ein 1275 x 953  $\mu\text{m}$  (100 x Vergrößerung) großer Bildausschnitt analysiert werden. Abbildung 6.37 zeigt das Analysefenster der Auswertung, wobei der blaue Pfeil die Pixel-Position des Austrittsortes der magnetischen Analyte indiziert. Im rechten Fenster wird ein *Frame* der Mikroskopaufnahme dargestellt, in dem die erfassten Objekte mit weißer Umrandung hervorgehoben sind. Im linken Teil wird, durch die Korrespondenz der identifizierten, sich bewegenden Objekte über mehrere *Frames* eine Trajektorie aufgebaut. Die rote Linie bildet dabei den exakten Weg der Analyte nach, während mit der weißen Linie ein linearer Fit gelegt wird.



**Abbildung 6.37** Analysefenster der Trajektoriensoftware mit integriertem Bildausschnitt der CCD-Kamera (rechts) und Nachbildung der Zelltrajektorie (links).

Zur Ermittlung der Führungseffizienz wird die Austrittsposition der magnetischen Referenzanalyte am Ende des 10 mm langen *Chevron*-Layouts über die Trajektoriensoftware bestimmt. Die Länge des *Chevron*-Patterns wurde abgestimmt auf die Außenmaße des Permanentmagneten, um eine Führung bei weitgehend konstantem, externem Gradientenfeld zu gewährleisten. Daher wurde das äußere Drittel der Permanentmagnetfläche für die Magnetophorese ausgespart. Abbildung 6.38 vergleicht die Güte der magnetophoretischen Fokussierung, unter Verwendung von 100 nm dicken Anreicherungsstrukturen in einem konstanten, externen magnetischen Feld von 150 mT, bei variierenden Durchflussraten von 0.45, 0.85 und 1.25  $\mu\text{L s}^{-1}$ . Die optische Erfassung bei 200-facher Vergrößerung erlaubt die Aufnahme eines knapp 500  $\mu\text{m}$  langen Teilstücks des Kanalquerschnitts um die Kanalmitte, wobei die roten Markierungen die Position der 30  $\mu\text{m}$  langen GMR-Elemente indizieren. Unter den definierten

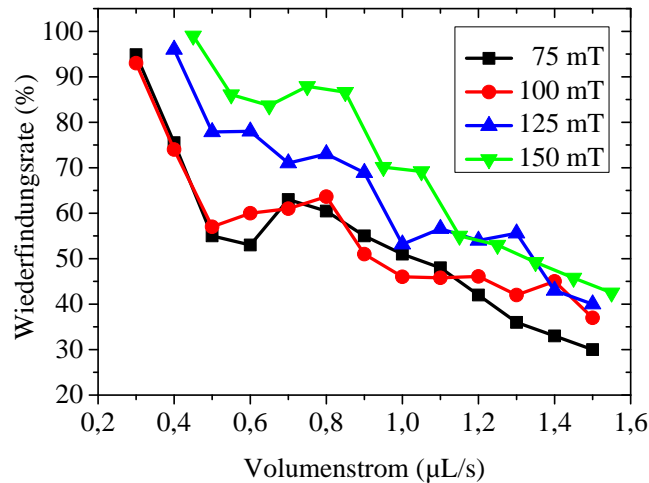
Messbedingungen werden bei einer Spritzenpumpgeschwindigkeit von  $0.45 \mu\text{L s}^{-1}$  knapp 99% der Analyte über die Sensorelemente geführt (Abbildung 6.38 a). Die Erhöhung der Pumpgeschwindigkeit auf  $0.85 \mu\text{L s}^{-1}$  bzw.  $1.25 \mu\text{L s}^{-1}$  demonstriert die starke Abhängigkeit der Wiederfindungsrate von einem Optimum zwischen externem Magnetfeld und der Zellgeschwindigkeit im laminaren Flussprofil (Abbildung 6.38 b&c). Die Verdreifachung der Durchflussrate resultiert in einer signifikanten Beeinflussung der Analytfokussierung und führt zu einem Verlust von 50%. Mit den  $12 \mu\text{m}$  Referenzbeads wird eine präzise Validierung der magnetophoretischen Zellführung mit Fokus auf die beiden kritischen Einflussgrößen ( $H_{ext}$ ,  $Q$ ), bei konstanter Dicke der Ni-Stege ( $d_{Ni}$ ) von  $100 \text{ nm}$ , erarbeitet. In vier separaten Messungen mit externen Magnetfeldern von  $75$ ,  $100$ ,  $125$  und  $150 \text{ mT}$  auf Sensorebene wird die Analytfokussierung in einem Geschwindigkeitsbereich von  $0.3$ - $1.5 \mu\text{L s}^{-1}$  analysiert.



**Abbildung 6.38** Optische Validierung der magnetophoretischen Zellführung über eine Trajektoriensoftware mit  $12 \mu\text{m}$  Referenzpartikeln, bei konstantem, externem Magnetfeld ( $150 \text{ mT}$ ) und einer Schichtdicke der Führungsstrukturen von  $100 \text{ nm}$ . Die Analyse der Austrittsposition der Analyte nach dem ferromagnetischen *Chevron*-Pattern zeigt eine hohe Wiederfindungsrate bei einer Durchflussrate von  $0.45 \mu\text{L s}^{-1}$ , die mit steigender Geschwindigkeit abnimmt. Beachte: Die roten Markierungen deuten die Position des  $30 \mu\text{m}$  langen GMR-Sensors an.

Abbildung 6.39 vergleicht den prozentualen, über die GMR-Elemente geführten Anteil der Referenzpartikel in einem Kanalquerschnitt von  $700 \times 150 \mu\text{m}$ , bei Zunahme des Volumenstroms, wobei für jeden Datenpunkt mindestens  $80$  Events detektiert wurden. Aggregationseffekte der Partikel am Nickel bei niedrigen Durchflussraten, die bei Messungen von stark magnetisierten Referenzpartikeln in PBS auftreten können, sind bei der Auswertung vernachlässigt worden. Dieser Effekt tritt bei der magnetischen Detektion von biologischen Zellen in Vollblut, begünstigt durch stochastische Stöße des zellulären Blutbestandteils ( $\sim 40\%$  Hämatokrit), so gut wie gar nicht auf (qualitative Beobachtung vor und nach Bluttransport; vgl. Kapitel 7.3). Der erste Messpunkt jeder

Kurve gibt den Mindestvolumenstrom an, bei dem die Fluidreibungskraft die jeweilige magnetophoretische Haltekraft übersteigt und eine Bewegung der Analyte über die Substratoberfläche generiert wird.



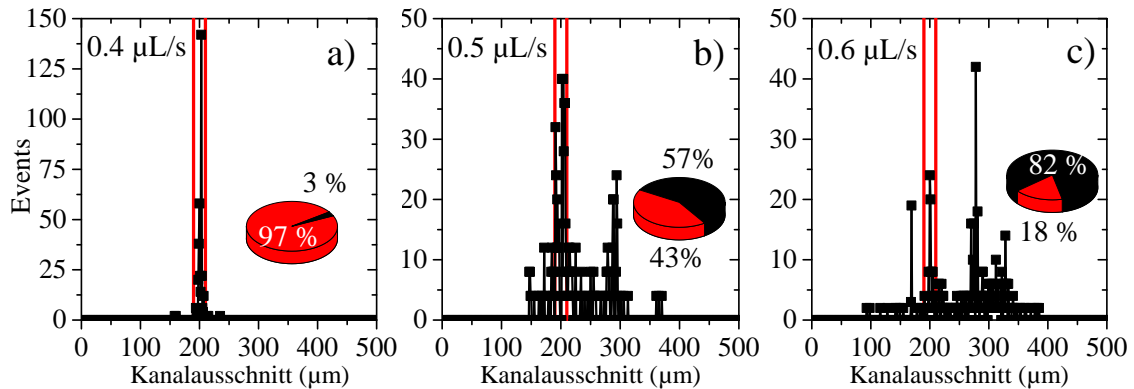
**Abbildung 6.39** Wiederfindungsrate der 12 µm Referenzanalyte bei vier definierten, externen Magnetfeldern unter Variation der Durchflussrate und einem Kanalquerschnitt von 700 x 150 µm.

Die vier Kurven zeigen, unabhängig von den unterschiedlichen, externen Gradientenfeldern, ähnliche Verläufe der Wiederfindungsraten bei Volumenströmen von  $>0.8 \mu\text{L s}^{-1}$ . Dies bedeutet, dass bei höheren Volumenströmen und gegebenem Flussprofil (Fluidikquerschnitt) magnetophoretische Führungen schwach ausgeprägt sind und gute Führungen nur durch eine Verlängerung des *Chevron*-Patterns zu erwarten sind. Im Bereich von  $0.5-0.8 \mu\text{L s}^{-1}$  sieht man vor allem bei kleinen, externen Gradientenfeldern eine ausgeprägte Konstanz der Wiederfindungsraten, die bei Volumenströmen von  $<0.5 \mu\text{L s}^{-1}$  schnell bis zu quantitativen Werten ansteigen. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass mit abnehmenden Volumenströmen die magnetophoretische Führungskraft im Verhältnis zur fluidischen Reibungskraft nach Gleichung 5.7 überwiegt.

Im Gegensatz zur exzellenten magnetophoretischen Fokussierung der Referenzbeads, mit Wiederfindungsraten von  $>97\%$ , eignet sich das Layout nicht für die Anreicherung von superparamagnetisch markierten FaDu-Tumorzellen. Die geringe Wiederfindungsrate bei Tumorzellen korreliert mit einer ungenügenden Führung der Zellen zur Fluidikmitte. Auf Grund der größeren Durchmesser der FaDu-Zellen von bis zu 20 µm wird daher die Anzahl der zur Mitte laufenden Ni-Gräten halbiert, um bei einem Abstand von nun 30 µm, ein Springen der Analyte von Gräte zu Gräte zu verhindern. Im Extremfall beobachtet man sogar eine Abreicherung der Zellen bei



einem flachen Grätenwinkel von  $5.7^\circ$ . Zusätzlich zur Vergrößerung der Grätenabstände wird die Distanz der Gräten zur Mittelseele von  $3\ \mu\text{m}$  auf  $5\ \mu\text{m}$  vergrößert, wodurch ein Übergang ohne Zellaggregationseffekte garantiert werden soll.

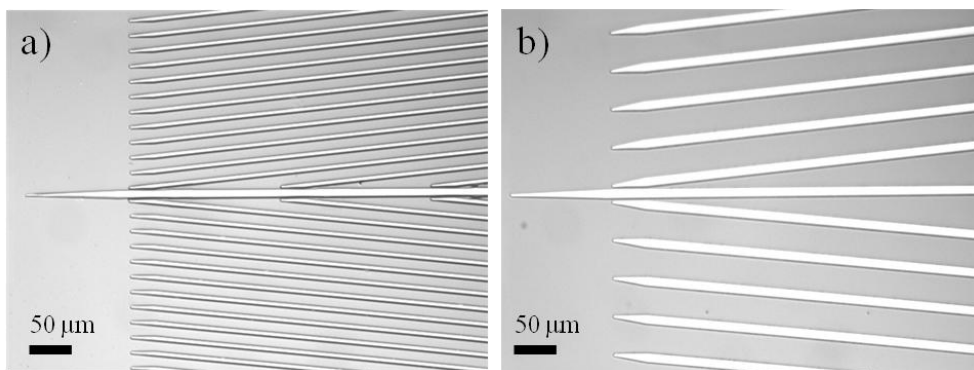


**Abbildung 6.40** Bewertung der magnetophoretischen Fokussierung von spezifisch markierten FaDu-Tumorzellen über die Austrittsposition am Ende der ferromagnetischen *Chevron*-Struktur bei einem Kanalquerschnitt von  $700 \times 150\ \mu\text{m}$ . Die optische Auswertung bei einer Ni-Dicke von  $300\ \text{nm}$  und einem konstanten, externen Magnetfeld von  $150\ \text{mT}$  zeigt einen drastischen Abfall der Wiederfindungsrate von  $0.4\ \mu\text{L s}^{-1}$  (97%) auf  $0.6\ \mu\text{L s}^{-1}$  (18%). Beachte: Die roten Markierungen entsprechen einem  $20\ \mu\text{m}$  breiten Kanalauschnitt innerhalb des, quer zur Flussrichtung ausgerichteten,  $30\ \mu\text{m}$  langen GMR-Sensors.

Die magnetophoretische Führung der schwächer magnetisierten, biologischen Zellen erfordert eine einheitliche Breite aller Ni-Stege von  $10\ \mu\text{m}$  und eine Mindestdicke des ferromagnetischen Ni-Layers von  $300\ \text{nm}$ . Abbildung 6.40 vergleicht die Führungseffizienz superparamagnetisch markierter FaDu-Zellen auf einem  $300\ \text{nm}$  dicken Ni-*Chevron* und einem externen Magnetfeld von  $150\ \text{mT}$ . Zur Bewertung der Wiederfindungsrate wird - anders als bei den Referenzanalyten - der Zielkanalquerschnitt mit einer Länge von  $20\ \mu\text{m}$  definiert, wodurch ein Überstreichen der Zellen im Randbereich der  $30\ \mu\text{m}$  langen GMR-Elemente als unzureichend geführt bewertet wird. Auf Grund der inhomogeneren Verteilung der magnetischen Nanopartikel an der Zelloberfläche kann eine Einzelzellendetektion, mit charakteristischer Signatur und ausreichend SNR, nur bei Detektion des gesamten Dipolfeldes der Zelle gewährleistet werden.

Unter konstantem, externem Magnetfeld und einer Durchflussrate von  $0.4\ \mu\text{L s}^{-1}$  werden 97% der Tumorzellen über die GMR-Widerstände geführt (Abbildung 6.40 a), wohingegen eine Erhöhung des Volumenstroms auf  $0.5\ \mu\text{L s}^{-1}$  zu einem signifikanten Abfall der Wiederfindungsrate auf 43% führt (Abbildung 6.40 b). Der Verlust von 82% der erfassten Analyte, bei Erhöhung der Durchflussrate um 50% auf  $0.6\ \mu\text{L s}^{-1}$

(Abbildung 6.40 c), zeigt eine weitaus höhere Abhängigkeit der Führungseffizienz von  $Q$ ,  $H_{ext}$  und  $d_{Ni}$ , als bei der analogen Betrachtung der Referenzpartikel. Eine Steigerung der Zählfrequenz bei hoher Wiederfindungsrate kann mit Erhöhung der Durchflussrate über die Anpassung des externen Magnetfeldes und der Ni-Dicke erreicht werden. Abbildung 6.41 stellt das finale Layout der 10 mm langen *Chevron*-Strukturen für Referenzanalyte und superparamagnetisch markierte Tumorzellen gegenüber. Für beide Analyte kann, im Zuge einer *in-situ* magnetischen Anreicherung und *in-situ* magnetophoretischen Fokussierung bei geeigneter Wahl von  $H_{ext}$  und  $d_{Ni}$ , eine Wiederfindungsrate von >97% erreicht werden.

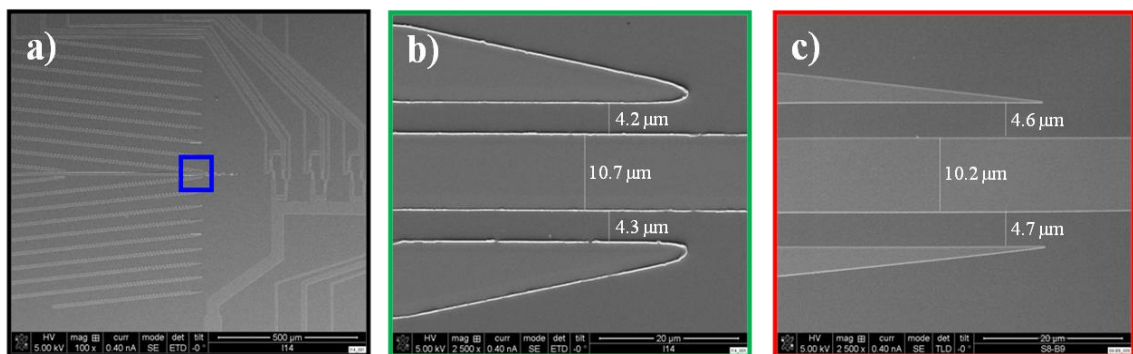


**Abbildung 6.41** Gegenüberstellung der magnetophoretischen Führungsstrukturen für homogen magnetisierte Referenzbeads im Durchmesserbereich von 3-12 µm (a) und spezifisch markierte 15-20 µm Tumorzellen (b) bei 200-facher Vergrößerung.

Mit dem gewonnenen Verständnis für die Magnetophorese am Fallbeispiel FaDu-Tumorzellen wird neben dem Prozess-*Know-How* für die magneto-resistiven Multilagensysteme auch die Herstellung der ferromagnetischen Führungsstrukturen zur Sensitec GmbH nach Lahnau verlagert. Im Zuge eines Technologietransfers werden dabei die erarbeiteten Layoutspezifikationen übergeben und für das Design der Fotomasken exakt übernommen. Die Chipdimensionen werden herstellungsbedingt von 30 x 10 mm auf 20.4 x 10 mm verkürzt, was zu einer Reduzierung der Länge der *Chevron*-Struktur auf 9 mm führt. Anstelle von Ni wird NiFe als ferromagnetisches Material für die Magnetophoresestrukturen aufgebracht. In einer Zusammensetzung von 80% Ni und 20% Fe weist die Legierung mit ~1 mT eine um ~40% höhere Sättigungspolarisation auf, als reines Ni mit 0.6 mT [125]. Der Unterschied der magnetischen Eigenschaft wird durch eine Anpassung der Schichtdicke kompensiert. Überraschenderweise zeigen die ersten Messungen mit den extern gefertigten Magnetophoresestrukturen, unter den gewohnten Parametereinstellungen ( $Q$ ,  $H_{ext}$ ,  $d_{Ni}$ ), sowohl bei Referenzanalyten als auch bei FaDu-Tumorzellen eine nur ungenügende Führungseffizienz von <60%.



Zur Untersuchung der signifikanten Abnahme der Wiederfindungsrate wird eine REM-Analyse der ferromagnetischen Strukturen bei Siemens CT in München durchgeführt. Abbildung 6.42 verdeutlicht die Unterschiede der Prozessgenauigkeit der lithographischen Fertigung bei Siemens (b) und Sensitec (c). Die höhere Genauigkeit der Strukturgrößen wirkt sich vor allem auf die Ausbildung der Ni-Spitzen und den Abstand der Ni-Gräten zur Mittelseele aus, der im Layout mit 5  $\mu\text{m}$  definiert wurde. Die Siemens Strukturen zeigen einen durchschnittlichen Abstand von 4.2  $\mu\text{m}$  und eine Abrundung der Spitzen. Die Sensitec Strukturen zeigen einen durchschnittlichen Abstand von 4.7  $\mu\text{m}$  und scharfe Endungen der Gräten.



**Abbildung 6.42** Bewertung der lithographischen Prozessgenauigkeit über REM-Aufnahmen der seitlich zur Ni-Mittelseele einlaufenden Führungsstrukturen. Mit dem Siemens Ätzprozess wird der 5  $\mu\text{m}$  Abstand zwischen Seele und Fischgräten mit durchschnittlich 4.2  $\mu\text{m}$  gefertigt (b), während der Sensitec Ätzprozess mit Abständen von 4.7  $\mu\text{m}$  präziser ist. Man beachte zudem auch die scharfen Endungen der Gräten durch die industrielle Fertigungspräzision (c).

Die Zunahme dieser Distanz um durchschnittlich 0.5  $\mu\text{m}$  und die stark ausgeprägte Zuspitzung der Ni-Enden auf dem Sensitec Chip wirken sich negativ auf den finalen Übergang der magnetischen Analyte zur Nickel-Seele aus. Als Konsequenz bewegt sich ein Großteil der zur Mitte geführten Analyte parallel zur Mittelseele auf Höhe der Ni-Spitzen und überstreicht die GMR-Elemente nicht mittig, sondern nur im Randbereich des Sensors. Bei Referenzanalyten führt dies zu einer Abschwächung der Signalamplitude, wohingegen spezifisch markierte Zellen im Fall einer inhomogenen Verteilung der Nanopartikel kein charakteristisches Signalmuster ausbilden. Zur Analyse der signifikant schlechteren Führungseigenschaften der Sensitec *Chevron*-Strukturen entlang der NiFe-Gräten wird die Topographie dieser Strukturen über einen FIB-Schnitt untersucht und mit dem REM visualisiert (Abbildung 6.43). Bei einer geplanten Zielschichtdicke von 100 nm zeigen die Siemens Strukturen (a-d) eine durchschnittliche, gesputterte Ni-Dicke von 130 nm, während die Sensitec NiFe-Dies (f-h) eine Schichtdicke von 120 nm aufweisen. Markantester Unterschied des ferromagnetischen Patterns ist die Ausbildung der Metallflanken durch die unterschiedlichen Lithographie- und Sputterbedingungen.

## 6 Optimierung des Messsystems zur Einzelzeldetektion

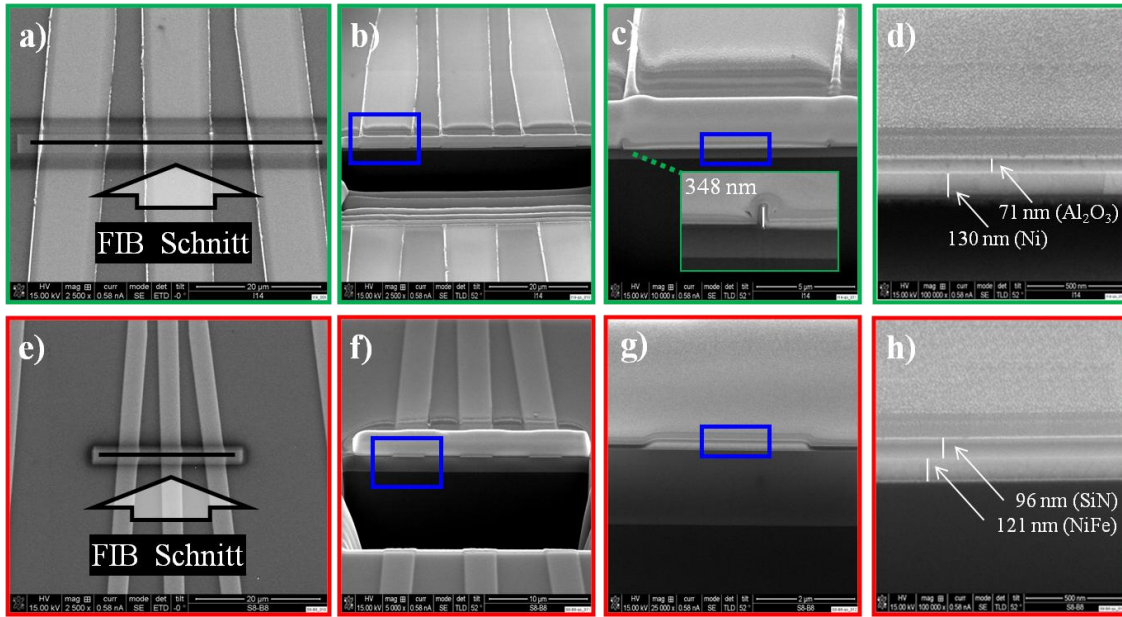


Abbildung 6.43 FIB-Schnitt und REM-Visualisierung der lithographisch prozessierten, magnetophoretischen Führungsstrukturen bei Siemens (a-d) und Sensitec (e-h).

Die Siemens-Dies zeigen Erhebungen, die mit durchschnittlich 345 nm die prozessierte ferromagnetische Schicht nahezu um einen Faktor 3 überragen (Abbildung 6.43 c). Im Gegensatz dazu weisen die Sensitec Strukturen eine deutlich flach auslaufende Kante auf, die in einem  $\sim 45^\circ$  Winkel abfällt (Abbildung 6.43 g). Davon lässt sich ableiten, dass die Magnetophorese bei gleichen Führungsbedingungen stark beeinflusst wird durch eine Feldüberhöhung an den 348 nm Kanten, die sich auf Grund der Sputterbedingungen bei Siemens bilden.

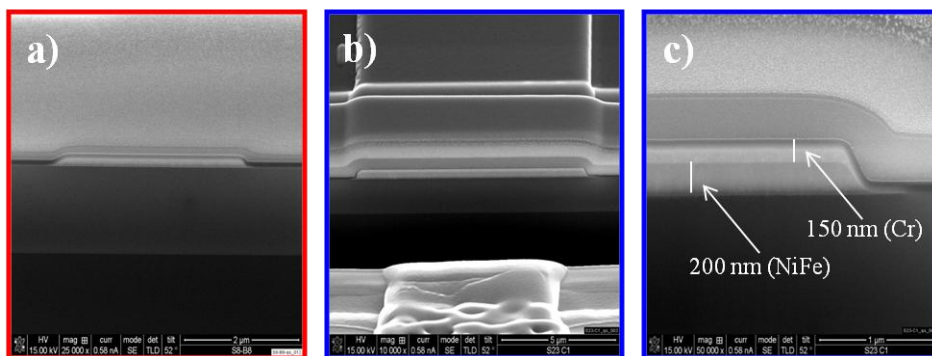
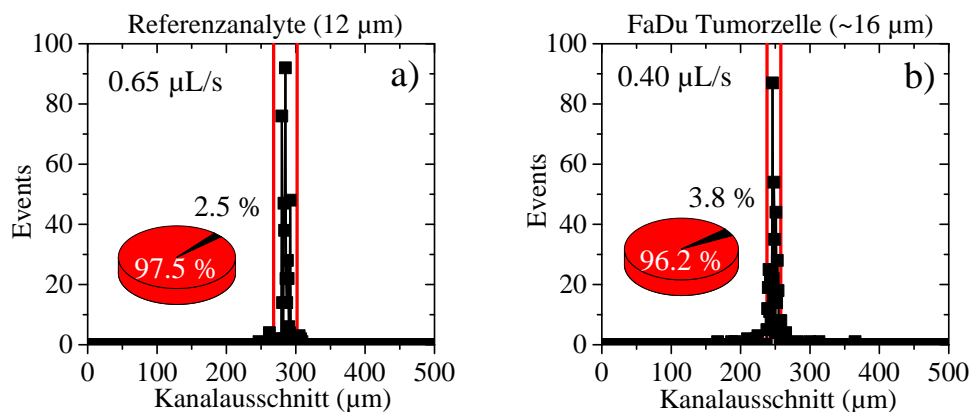


Abbildung 6.44 Vergleich der Flankensteilheit der bei Sensitec prozessierten, ferromagnetischen NiFe-Führungsstrukturen der ersten Generation (a) und der optimierten Fischgräten (b&c). Zur Erhöhung der Flankensteilheit und der Gesamtschichtdicke wurde ein zusätzlicher nichtmagnetischer Chrom-Layer aufgebracht.

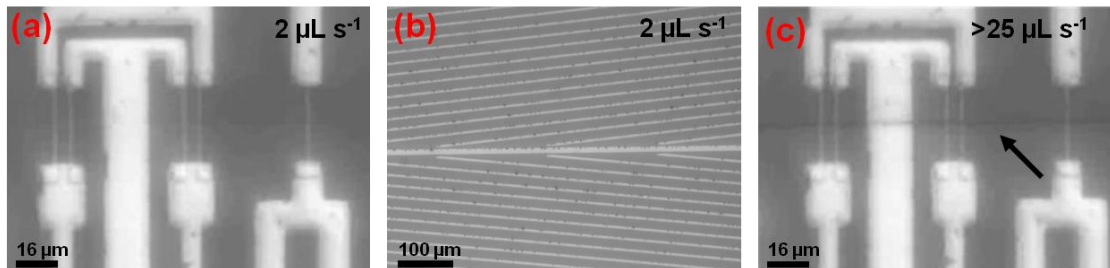
Um die Fokussierungseffizienz bei der Industriefertigung zu erreichen und um nicht auf exotische Prozesse ausweichen zu müssen, wird die Flankensteilheit der ferromagnetischen NiFe-Strukturen durch Optimierung der Standardprozessparameter erhöht. Zusätzlich wird ein nichtmagnetischer Cr-Layer aufgebracht, um die Gesamtschichtdicke (maximal: 350 nm) der Siemens Kantenhöhe anzugleichen. Die Analyse der FIB-Schnitte der optimierten Sensitec Strukturen zeigen eine durchschnittliche Ausbildung der Flanken von  $\sim 65^\circ$ , wohingegen die ursprünglichen *Chevron*-Strukturen eine Steigung von  $\sim 45^\circ$  aufweisen (Abbildung 6.44).



**Abbildung 6.45 Führungseffizienz der 12  $\mu\text{m}$  Micromod (a) sowie der spezifisch markierten FaDu-Tumorzellen (b) am Ende der optimierten, ferromagnetischen *Chevron*-Strukturen bei einem Kanalquerschnitt von  $700 \times 150 \mu\text{m}$ . Als geführt bewertet wird der Kanalquerschnitt entlang der GMR-Sensoren, gekennzeichnet durch die roten Linien ( $30 \mu\text{m}$  bei Referenzbeads und  $20 \mu\text{m}$  bei FaDu-Tumorzellen).**

Im Zuge einer weiterführenden Messreihe von variierenden Cr/NiFe und NiFe/Cr Kombinationen mit unterschiedlichen Schichtdicken - bei Gesamtschichtdicken bis maximal 350 nm - wurde beobachtet, unter welchen Bedingungen eine optimale Magnetophorese mit dem Industrieprozess erreicht wird. Die Wiederfindungsrate der  $12 \mu\text{m}$  Referenzbeads und der FaDu-Tumorzellen auf den optimierten Fokussierungsstrukturen wird erneut über Trajektorienanalysen bestimmt. Für beide Analyte kann, mit unterschiedlichen Schichtkonfigurationen und optimierten Einstellungen der Einflussgrößen ( $Q$ ,  $H_{ext}$ ,  $d_{Ni}$ ), eine Führungseffizienz  $>96\%$  erreicht werden (Abbildung 6.45), die den Wiederfindungsraten mit Siemens Bauteilen entsprechen. Die stark magnetisierten Referenzbeads werden dabei mit einer Durchflussrate von  $0.65 \mu\text{L s}^{-1}$  und einem  $H_{ext}$  von 150 mT auf einer 150 nm dicken NiFe-Schicht geführt, die von einem 200 nm Cr Layer abgedeckt wird. Im Gegensatz zum Schichtsystem Cr/NiFe wird bei NiFe/Cr beobachtet, dass eine Arretierung der Referenzanalyte an den ferromagnetischen Fischgräten bei hohem, externem

Magnetfeld bzw. niedrigem Volumenstrom reduziert werden kann. Die maximale Wiederfindungsrate für spezifisch markierte Tumorzellen wird bei  $0.4 \mu\text{L s}^{-1}$  und 150 mT auf einer 300 nm dicken NiFe-Schicht erreicht, die zur Erhöhung der Kantensteilheit auf eine 50 nm hohe Chromschicht gesputtert wird.

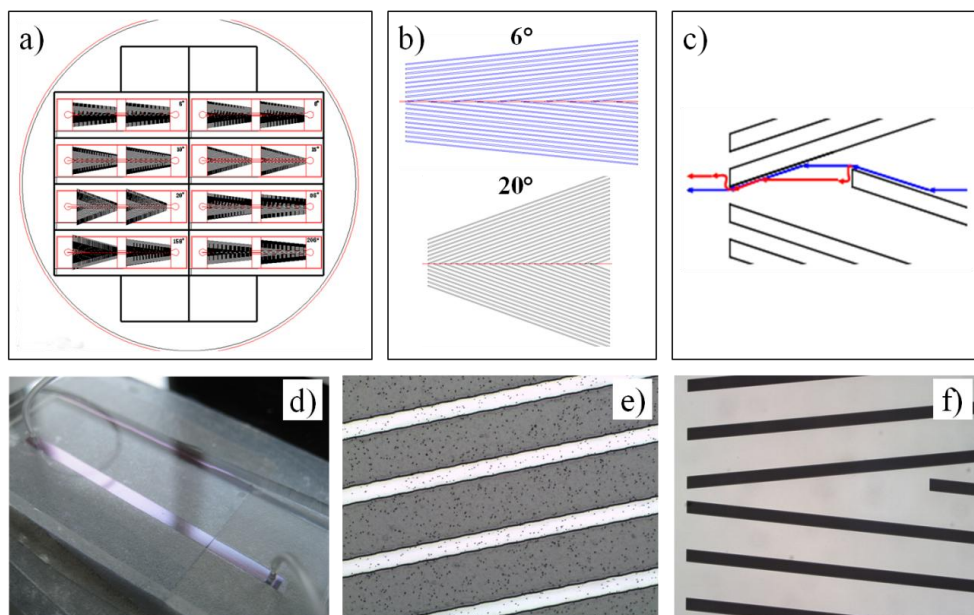


**Abbildung 6.46** *In-situ* Filterung der superparamagnetischen Nanopartikel bei Zugabe einer Suspension mit hoher Partikelkonzentration. Bei einem Volumenstrom von  $2 \mu\text{L s}^{-1}$  aggregieren die 200 nm Partikel an den ferromagnetischen Fischgrätenstrukturen und erlauben eine hintergrundfreie, magnetoresistive Messung (a&b). Erhöht man die Durchflussrate auf  $>25 \mu\text{L s}^{-1}$  überwiegt die Stokes Reibung im laminaren Fluss gegenüber der magnetischen Haltekraft und die Nanopartikel lösen sich von den Ni-Strukturen (c). Der schwarze Pfeil indiziert die aufkonzentrierten Partikel, die den GMR-Sensor mittig überstreichen.

Neben der magnetophoretischen Analytfokussierung dienen die ferromagnetischen Fischgrätenstrukturen als Mechanismus zur *in-situ* Filtration von ungebundenen, superparamagnetischen Nanopartikeln, die im Inkubationsprozess im Überschuss eingesetzt werden, um eine maximale Markierung der Zellen zu garantieren. Die 200 nm Partikel aggregieren im laminaren Fluss, unter typischen Messbedingungen ( $H_{ext}=50\text{-}150$  mT,  $d_{Ni}=50\text{-}400$  nm,  $Q=0.1\text{-}4.0 \mu\text{L s}^{-1}$ ) an den Magnetophorese-Ästen, da die magnetische Haltekraft  $F_{mag}$  gegenüber der Stokes Reibung  $F_d$  bei laminaren Flussbedingungen überwiegt. Superparamagnetisch markierte Zellen bzw. Referenzanalyte im Durchmesserbereich von mehreren  $\mu\text{m}$  entwickeln, bei diskutierten Messbedingungen, eine Rollbewegung über die Strukturen (vgl. Kapitel 7.3). Die Effektivität der *in-situ* Filtration wird mit einer hohen Konzentration an Nanopartikeln aus dem Stemcell Labeling Kit in PBS demonstriert. Abbildung 6.46 zeigt Mikroskopaufnahmen der GMR-Sensorregion (a) bei 200-facher Vergrößerung und der Magnetophoresestrukturen (b) bei 100-facher Vergrößerung. Bei einem angelegten Volumenstrom von  $2 \mu\text{L s}^{-1}$  und einem externen Feld von 120 mT halten die Ni-Fischgräten die Nanopartikel und Partikelaggregate zurück und ermöglichen so eine hintergrundfreie, magnetoresistive Detektion der magnetischen Analyte. Bei einer Durchflussrate von  $>25 \mu\text{L s}^{-1}$  lösen sich die Nanopartikel und bewegen sich konzentriert mittig über den GMR-Sensor (c).

## 6.5 Mechanische Zellanreicherung

Zur Realisierung eines kostengünstigen POC-Instruments, mit minimalem *Si-Die Footprint*, wird ein zur magnetophoretischen Anreicherung alternatives Konzept entwickelt. In einem hybriden Ansatz soll die Magnetophorese mit vorgeschalteten mechanischen Führungseinheiten kombiniert werden. Die Integration der mechanischen Barrieren soll über ein Spritzgussverfahren in den Kanalboden erfolgen, wobei die ferromagnetischen Anreicherungsstrukturen auf dem Si-Chip als finale Ausrichtung der magnetischen Analyte, zur Kompensation eines möglichen Versatzes, bei Übergang von Spritzguss auf Chip dienen.



**Abbildung 6.47 Mechanische Analytfokussierung.** Das CAD-Design der Fotomaske zur lithographischen Prozessierung (a) umfasst 8 Chips mit je zwei Führungsblöcken, die sich durch die Winkel der mittig zulaufenden Stege unterscheiden (b). Die rote Trajektorie kennzeichnet die mikroskopisch beobachtete Bewegung magnetisch markierter Analyte im Vergleich zur theoretischen Fließrichtung (blau) im Laminarstrom (c). Provisorischer Aufbau des Mikrofluidikkanals zur Machbarkeit einer mechanischen Anreicherung (d). Vergleich der Linienrauigkeit der Folienmaske und der Chrommaske mit überarbeitetem Design bei 200-facher Vergrößerung (e&f).

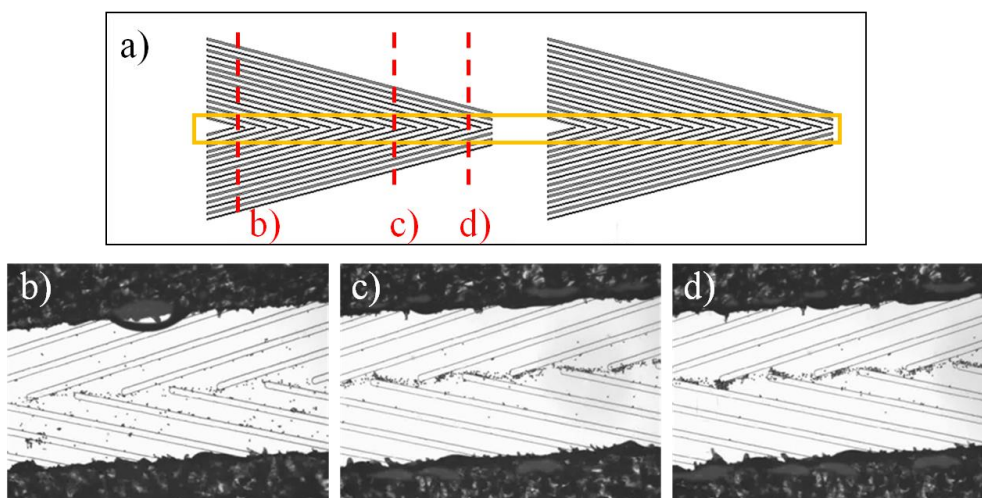
Zum Machbarkeitsnachweis einer zielgerichteten, mechanischen Führung von superparamagnetisch markierten Analyten unter Einfluss eines externen, vertikalen Magnetfeldes wird zunächst eine rein mechanische Anreicherungsstruktur realisiert. Abbildung 6.47 a zeigt den CAD-Entwurf der Folienmaske im 3“ Waferformat zur lithographischen Herstellung der Fokussierungsstrukturen. Dabei werden je zwei Führungseinheiten mit einer Länge von jeweils 10 mm auf die Standard



## 6 Optimierung des Messsystems zur Einzelzelldetektion

Chipdimensionen von 30 x 10 mm platziert. Mit einer Breite von 50  $\mu\text{m}$  werden die mechanischen Stege mittig überlappend angeordnet, was bei idealer Führung der magnetisch markierten Zellen in einer ‚Zick-Zack‘ Bewegung resultiert (Abbildung 6.47 b&c). Die roten Trajektorien in Abbildung 6.47 b veranschaulichen den Weg der magnetischen Analyte im Mittelbereich der Führungsbarrieren am Beispiel einer 20° bzw. 6° Einheit. Die mittig zulaufenden Stege werden in fünf verschiedenen Neigungswinkeln (6°, 8°, 12°, 15°, und 20°) realisiert. Die minimale Distanz der auslaufenden Stege zueinander wird in der ersten Ausführung auf 50  $\mu\text{m}$  festgelegt, um das Verhalten rund um den kritischen Engpass bei hohen Analytkonzentrationen, beziehungsweise komplexen Medien wie Vollblut abzuschätzen.

Als Trägermaterial dient ein 3“ Silizium Wafer, passiviert mit einer thermisch oxidierten  $\text{SiO}_2$ -Isolationsschicht, auf dem die Führungsstrukturen mittels einer Negativlithographie mit SU-8-100 Fotolack der Firma Microchem. Corp. hergestellt werden. Die Strukturhöhe von 30  $\mu\text{m}$  orientiert sich an der dreifachen Dimension der 12  $\mu\text{m}$  Referenzanalyten. Zur Herstellung der mikrofluidischen Komponente wird ein provisorischer Fluidikkanal mit doppelseitigem Klebeband und einer Deckelung aus PDMS erzeugt (Abbildung 6.47 d).



**Abbildung 6.48** *Proof-of-Principle* der mechanischen Analytfokussierung. Über Videoaufnahmen werden drei ausgewählte Bereiche entlang der Führungsstrukturen (~8 mm) bei Messung von 12  $\mu\text{m}$  Referenzanalyten ( $H_{ext}=120$  mT) optisch analysiert.

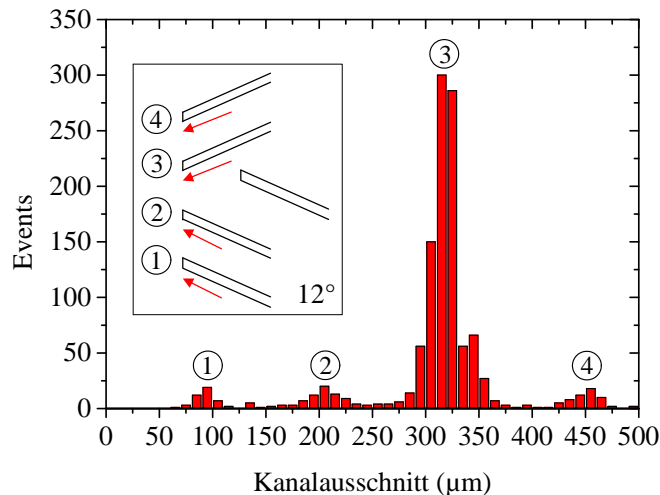
Erste Messungen zur Wiederfindungsrate werden mit 12  $\mu\text{m}$  Referenzanalyten bei einem  $H_{ext}$  von 120 mT und einem Volumenstrom von 1.5  $\mu\text{L s}^{-1}$  durchgeführt und bestätigen grundsätzlich die Durchführbarkeit einer mechanischen Zellführung superparamagnetisch markierter Analyte unter magnetischer Anreicherung in einem externen Gradientenfeld. Die mikroskopische Analyse in Abbildung 6.48 vergleicht drei

ausgewählte Bereiche einer Fokussierungseinheit bei Messung einer extrem hohen Analytkonzentration in einem provisorischen 1 mm breiten und 200  $\mu\text{m}$  hohen Fluidikkanal. Einer stochastischen Verteilung der magnetischen Analyte im Anfangsbereich des Kanals (b) stehen mittig angereicherte Analyte im Mittel- und Endbereich (c&d) gegenüber. Dabei verlassen die Analyte aufgrund der Laminarströmung einen SU-8 Führungssteg exakt mittig zur Stegbreite (Abbildung 6.47, rote Trajektorie). Die rote Trajektorie in Abbildung 6.47 c beschreibt den experimentell ermittelten Weg der magnetisch markierten Analyte, im Gegensatz zur Annahme der Bewegung (blau). Die kritische Öffnung von 50  $\mu\text{m}$  zwischen den mechanischen Strukturen erlaubt die Messung einer Suspension von  $\sim 40$  Zellen  $\mu\text{L}^{-1}$  ohne optisch sichtbare Aggregationsbildung und Verstopfung, was bei einem typischen Probevolumen von 500  $\mu\text{L}$  und einer Messzeit von 10 Minuten einer maximalen Zählfrequenz von 33 Zellen  $\mu\text{L}^{-1}$  entspricht. Nachteile der kostengünstigen Folienmaske und der provisorischen Fluidiklösung sind die hohe Linienrauigkeit der Führungsstege (Abbildung 6.47 e), an denen Referenzanalyte aggregieren, sowie die raue Kanalwand, die die konstante Zellbewegung im laminaren Fluss stört.

Auf Basis der gewonnenen Erkenntnisse wird ein Layout zur Herstellung der Fokussierungseinheiten für eine Chrommaske gezeichnet, wobei die Dimensionen der Strukturen auf die Breite des Standard Fluidikkanals von 700  $\mu\text{m}$  limitiert werden. Dadurch können, analog zum Magnetophorese *Device*, PDMS Fluidiken zur Fertigung des fluidischen Kanalsystems verwendet werden. Die 30 x 10 mm *Si-Dies* werden jeweils mit einer 15 mm langen Führungseinheit versehen, wobei fünf verschiedene Ausführungen mit unterschiedlichem Neigungswinkel (6°, 8°, 12°, 15°, und 20°) relativ zur Durchflussrichtung realisiert werden. Abbildung 6.47 f vergleicht Mikroskopaufnahmen der Folienmaske und der Chrommaske bei 200-facher Vergrößerung, mit der die Strukturgenauigkeit des lithographischen Herstellungsprozesses signifikant erhöht werden kann, mit dem Ziel Analytverluste an den Strukturwänden zu vermeiden.

Zur Bewertung der Führungseigenschaften der 12.5 mm langen mechanischen Strukturen wird die Bewegung der 12  $\mu\text{m}$  Referenzanalyte in PBS über die Trajektoriensoftware ausgewertet (vgl. Kapitel 6.4). Abbildung 6.49 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Austrittsposition der Analyte über einen 500  $\mu\text{m}$  breiten Kanalabschnitt, bei einer Genauigkeit von 10  $\mu\text{m}$ . Eine Analyse der Messung der 12° Ausführung bei einem  $Q$  von 1  $\mu\text{L s}^{-1}$  und einem  $H_{ext}$  von 80 mT führt zu 4 Peaks, die mit den Öffnungen am Ende der mechanischen Strukturen korrelieren. 81% der 1,171 detektierten Events verlassen die Führungsbarrieren im gewünschten 50  $\mu\text{m}$  breiten

Zielbereich mittig im Kanal. Der 19%ige Verlust der Analyte verteilt sich nahezu gleichmäßig auf die angrenzenden Öffnungen. Bei Positionierung der 30  $\mu\text{m}$  langen GMR-Sensoren mittig zum letzten 50  $\mu\text{m}$  breiten Führungssteg (Abbildung 6.49, 3) würde eine rein mechanische Anreicherung unter beschriebenen Bedingungen  $\sim 65\%$  der Analyte über die magnetoresistiven Bauteile führen.



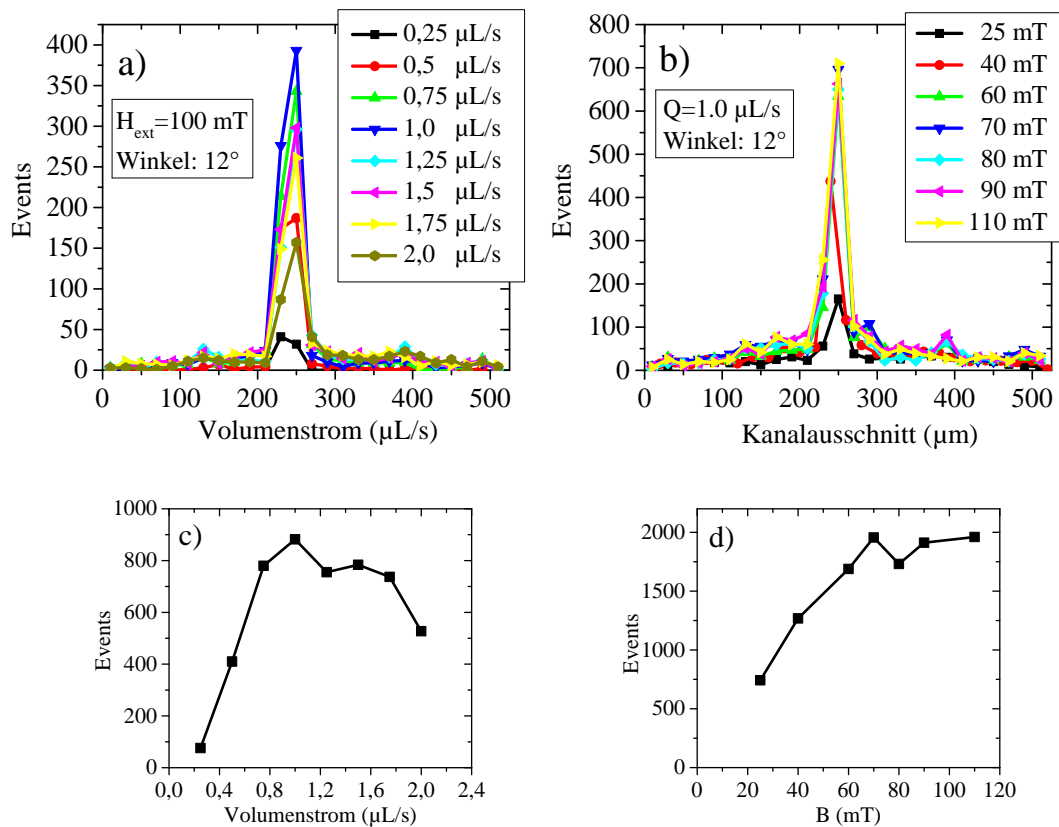
**Abbildung 6.49** Bewertung der mechanischen Analytfokussierung mit 12  $\mu\text{m}$  Referenzanalyten auf einem *Device* mit einem 12° Neigungswinkel der zur Kanalmitte zulaufenden Stege. Das Schaubild zeigt die vier Austrittsöffnungen am Ende der Fokussierungsstrukturen, die mit den vier Peaks der Häufigkeitsdarstellung der Trajektorienanalyse korrelieren.

Im Zuge einer ausführlichen mikroskopischen Analyse der Führungseigenschaften bei Variation der Strukturwinkel liefern 12° Barrieren die besten Resultate und werden weiterführend untersucht. Bei appliziertem *Workflow* von *in-situ* magnetischer Anreicherung und *in-situ* mechanischer Führung zeigen die Vorversuche, bei konstanter Länge der Führungsstrukturen von 12.5 mm, eine hohe Abhängigkeit der Wiederfindungsrate von externem Magnetfeld und Volumenstrom. Im Gegensatz zur Fokussierung über Magnetophorese bleiben magnetische Analyte, die auf der Substratoberfläche angereichert sind, auf der von der Führungseinheit vorgegebenen Bahn. Einzig eine Erhöhung von  $Q$  bei konstantem  $H_{ext}$  kann eine Bewegung der Analyte entlang des Gradienten im laminaren Fluss in Z-Richtung und ein Verlassen der aufgezwungenen Bewegungsrichtung zur Folge haben. Auf Basis der gewonnen Erkenntnisse wird eine Messreihe unter Variation der kritischen Parameter  $Q$  und  $H_{ext}$  durchgeführt (Abbildung 6.50).

Bei konstantem  $H_{ext}$  von 100 mT stellt sich bei Durchflussgeschwindigkeiten  $\leq 0.5 \mu\text{L s}^{-1}$  eine Wiederfindungsrate von  $\sim 98\%$  ein, die sich mit Erhöhung auf  $1 \mu\text{L s}^{-1}$  bei  $\sim 80\%$



einpendelt (a). Für Volumenströme  $>1.25 \mu\text{L s}^{-1}$  wird unter gegebenen Bedingungen eine maximale Führung von  $\sim 64\%$  erreicht. Ein höheres  $Q$  bei konstantem  $H_{ext}$  bewirkt dabei eine spätere Anreicherung auf der Substratoberfläche, die bei der Länge der Fokussierungsstrukturen von 12.5 mm in einer unzureichenden Führung resultieren kann. Die Analyse der Gesamtanzahl der optisch detektierten Events gegen die Durchflussrate veranschaulicht das Zusammenspiel der Einflussgrößen  $Q$  und  $H_{ext}$  (c). Bei niedrigen Durchflussraten arretieren Analyte entlang des Mikrofluidikkanals, da die magnetische Haltekraft  $F_m$  die Fluidreibungskraft übersteigt. Zwischen  $0.8\text{-}1.5 \mu\text{L s}^{-1}$  stellt sich ein Optimum der Analytbewegung ein, während bei Volumenströmen  $>1.5 \mu\text{L s}^{-1}$  magnetische Analyte auf Grund zu geringer  $F_m$  die Substratoberfläche im laminaren Profil verlassen.

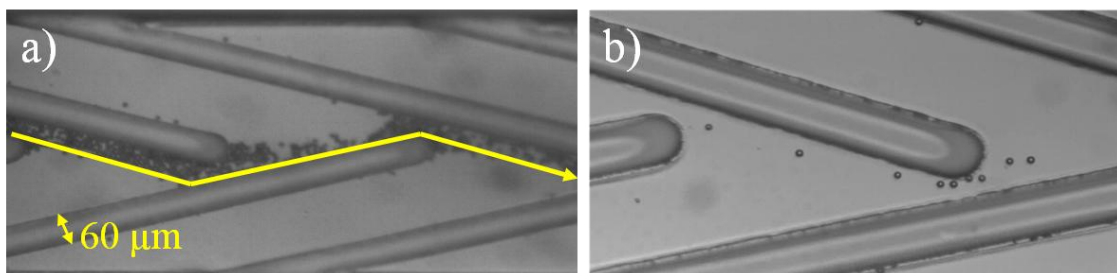


**Abbildung 6.50** Trajektorienanalysen zur Bewertung der Fokussierung der  $12 \mu\text{m}$  Referenzpartikel bei Variation des Volumenstroms (a) bzw. externen Magnetfeldes (b) unter Verwendung der  $12^\circ$  Führungsstrukturen sowie die Auftragungen der Absolutevents in Abhängigkeit von  $Q$  (c) und  $H_{ext}$  (d).

Analog wird die Wiederfindungsrate über die Austrittsposition der Analyte bei einem konstanten  $Q$  von  $1.0 \mu\text{L s}^{-1}$  und variierendem  $H_{ext}$  bewertet. Bei einem externen Magnetfeld  $<60 \text{ mT}$  erreichen  $\sim 40\%$  der Analyte die  $50 \mu\text{m}$  breite Zielregion. Die

Annäherung des Permanentmagneten und Erhöhung auf 80 mT resultiert in einer Wiederfindungsrate von ~60% während bei 110 mT ~80% der Analyte geführt werden, was mit den Ergebnissen aus Messung (a) korreliert. Im niedrigen Feldbereich liegt eine geringe Absolutanzahl an detektierten Events vor, was auf eine unzureichende Anreicherung der Analyte auf die Substratoberfläche zurückzuführen ist (d). Ab einem  $H_{ext}$  von 60 mT stellt sich bei einem  $Q$  von  $1.0 \mu\text{L s}^{-1}$  ein nahezu konstanter Wert ein. Würde man  $H_{ext}$  weiter erhöhen, wird durch verstärkte Aggregation der Partikel ein Absinken der erfassten Analyte erwartet.

Auf Basis der ermittelten Layoutspezifikationen wird ein Spritzguss-Bauteil mit integrierten Führungsbarrieren von microfluidic ChipShop gefertigt, mit dem eine mechanische Führung der Analyte unter definierten Bedingungen gezeigt werden kann. Die Abrundung der Strukturen minimiert den Analytverlust im fluidischen Totbereich an den Enden der Barrieren.

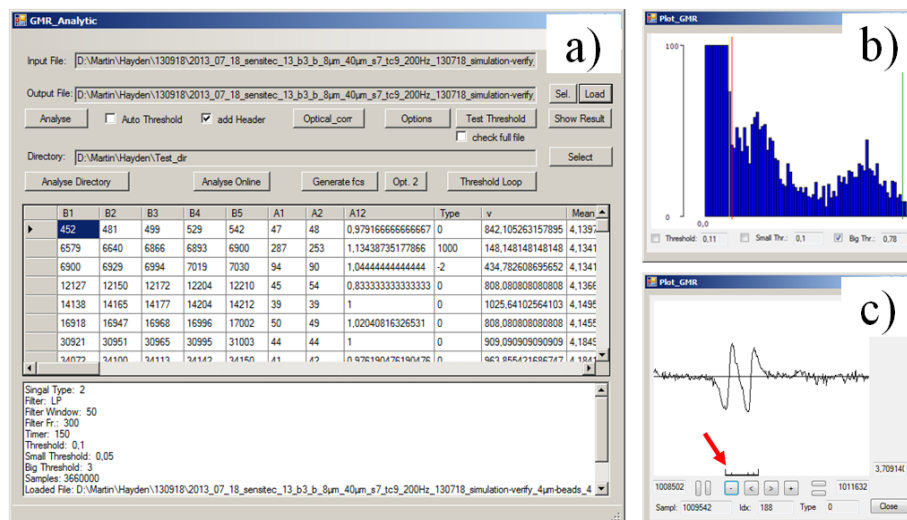


**Abbildung 6.51 Spritzguss Fokussierungsstrukturen von microfluidic ChipShop nach ermittelten Layoutvorgaben. Mit Stegbreiten von  $60 \mu\text{m}$  und abgerundeten Enden werden  $12 \mu\text{m}$  Referenzanalyten in hohen (a) und niedrigen Konzentrationen (b) geführt.**

Auf Grund der Dimensionen der mechanischen Führungsstege mit einer Breite von  $50 \mu\text{m}$  und Mindestabstände von  $50 \mu\text{m}$ , die im Gegensatz zu den GMR-Elementen mit Längen von  $30 \mu\text{m}$  großzügig designt worden sind, kann eine rein mechanische Anreicherung mit hoher Präzision nicht realisiert werden. Ein hybrider Ansatz mit der mechanischen Fokussierung als Voranreicherung kombiniert mit der Magnetophorese als finale Ausrichtung vor den GMR-Brücken ist sehr vielversprechend, konnte im Zuge der Arbeit aber nicht mehr getestet werden.

## 6.6 Auswertesoftware

Zur automatisierten Signalmusterauswertung wurde in Zusammenarbeit mit Kollegen von Siemens Österreich ein Analysetool auf Basis der experimentell erarbeiteten Parameter entwickelt und iterativ im Experiment verbessert bzw. der Parametersatz für die Signalinterpretation kontinuierlich erweitert. Die auf HTML Basis programmierte Software verarbeitet das Rohsignal im ersten Kanal der LabVIEW \*.tdms-Datei. Kern des Programms ist eine *State-Event-Machine*, die es ermöglicht eine vordefinierte Folge an Signalsprüngen als charakteristisches Pattern zu identifizieren. Im Gegensatz zu einem rein schwellwertbasierten Verfahren wird die Auswertung dadurch unabhängig von der Signalamplitude, die auf Grund von biologischen Einflussfaktoren, wie der Epitopenexpression, eine hohe Variation aufweisen kann. Zusätzlich können Variationen des Nullabgleichs der Brückenspannung kompensiert werden. Abbildung 6.52 zeigt die graphische Benutzeroberfläche der aktuellen Version des Programms, die am Beispiel der charakteristischen 4-Peak Signatur der diagonalen Wheatstone Brückenordnung 59 vordefinierte Signalparameter für jeden Einzelevent ausgibt.



**Abbildung 6.52** GUI zur Datenauswertung der LabVIEW \*.tdms Files inklusive Auflistung der 59 signalspezifischen Parametern pro Event (a). Die Erstellung eines Histogramms über die Sprunghöhen der Halbwellen erlaubt das manuelle Setzen geeigneter Schwellwerte für den Auswertalgorithmus (b). Jeder Event kann automatisiert direkt in dem Analysefenster aufgerufen werden, wobei die errechneten Peakpositionen (siehe roter Pfeil) angezeigt werden (c).

Auf Grund der Variation der Messparameter im Forschungsaufbau werden die Einstellungen der *State-Event-Machine* manuell an die experimentellen Bedingungen angeglichen, um eine exakte Erfassung der magnetischen Signale unabhängig vom SNR zu garantieren. Zur Erhöhung des SNR bietet die Softwareoberfläche die Möglichkeit

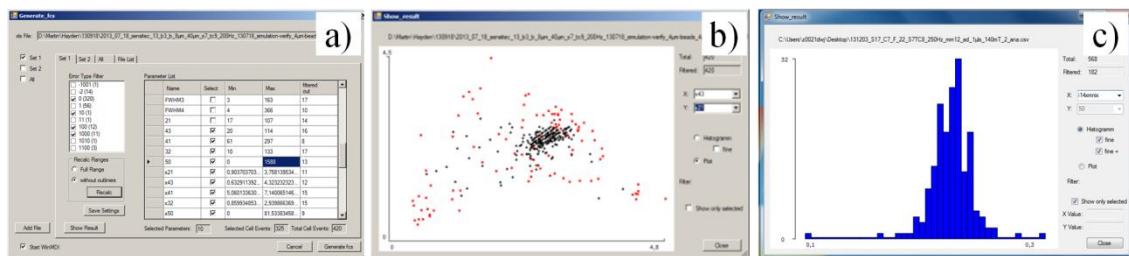
einen FIR-Tiefpassfilter [126] mit manuell einstellbarer Grenzfrequenz auszuwählen. Die Wahl der Grenzfrequenz orientiert sich an der Analytgeschwindigkeit im laminaren Flussprofil des mikrofluidischen Systems. Ein generischer Ansatz zur Definition der Orientierungen der charakteristischen Signalfolge mit maximal acht Peaks erlaubt eine Analyse, unabhängig von der Anordnung der GMR-Wheatstone Brückenelemente. Mit Angabe mehrerer Schwellwerte und einer maximalen Gesamtlaufzeit eines Einzelevents wird das Detektionsverhalten der *State-Event-Machine* festgelegt. Der Parameter *Threshold* definiert die Sprunghöhe zwischen zwei aufeinanderfolgenden Peaks, ab der eine Spannungsänderung als positiver Event bewertet wird. Zur Schwellwertbestimmung kann eine Häufigkeitsdarstellung über die Sprunghöhe der ersten 10,000 Sprünge oder alternativ der gesamten Messdatei generiert werden, die es erlaubt den Wert direkt in der Graphik per Mauszeiger auszuwählen (Abbildung 6.52 b). Die Implementierung der optionalen Eingabe *Small Threshold* adressiert ausschließlich das diagonale 4-Peak-Pattern und ersetzt den Parameter *Threshold* bei der Erfassung des mittleren Signalteils (Peak 2 und 3). Die Detektion der magnetischen Signatur kann dadurch auch bei starker Signalüberlappung von Peak 2 und 3 gewährleistet werden. Zusätzlich können Einzelevents, die eine frei wählbare Obergrenze (*Big Threshold*) überschreiten, in der Ausgabedatei über eine definierte Kodierung (*Type* Bezeichnung) gekennzeichnet werden. Diese Option erlaubt die Identifizierung von Zellaggregaten oder stark magnetisierten Referenzanalyten, die als interner Standard in Zellsuspensionen eingespielt werden. Als zusätzliches Kriterium kann das maximal tolerable Zeitfenster einer charakteristischen Signalfolge über den Abstand der signalgebenden Widerstände und der Fließgeschwindigkeit der Analyte im Fluidikkanal definiert werden. Dadurch können falsch-positive Zellevents erkannt werden, die auf Grund von Variationen im Durchmesser eine signifikant abweichende Zellgeschwindigkeit aufweisen. Über die *Type* Spalte in der Ausgabedatei kann man das Verhalten der *State-Event-Machine* nachvollziehen und mit einer definierten Kodierung fehlerhaft detektierte bzw. nur zum Teil erkannten Signale nachverfolgen. Mit der Option einer Anzeige der magnetischen Signatur, inklusive Zuordnung der detektierten Sprünge des Auswertalgorithmus ermöglicht das Tool eine zusätzliche manuelle Qualitätskontrolle (Abbildung 6.52 c).

Grundvoraussetzung zur Erarbeitung der spezifischen Signaleigenschaften aus der magnetischen Signatur ist die Ermittlung einer Basislinie, die eine klare Definition der Halbwellen erlaubt. Durch kontrollierte Abtastung der Basislinie vor und nach jedem Signalmuster werden die Spannungswerte im magnetischen Nullfeld über einen gleitenden Mittelwert für jedes Einzelsignal festgelegt. Die gemittelte Ausgleichsgerade ermöglicht die Bestimmung der Nullstellen, zum Beispiel im Fall des 4-Peak-Signals

die Nulldurchgänge zwischen Peak 1 und 2 ( $N1$ ) und Peak 3 und 4 ( $N3$ ). Daraus werden die Signalamplituden der einzelnen Signalpeaks errechnet und die Flächen zur Bestimmung der Integrale der Signalanteile definiert. Das numerische Gesamtintegral  $i(f)$  wird dabei über

$$i(f) = \sum_{i=1}^{N-1} \frac{1}{2 * \text{samplerate}} * (f(t_{i+1}) + f(t_i)) \quad (6.6)$$

ermittelt. Mit Angabe der Datenerfassungsrate (*Sample Rate*) der Signalübertragung und des Abstandes der signalformenden GMR-Widerstände wird die *in-situ* Analytgeschwindigkeit für jeden einzelnen Analyten bestimmt (vgl. Kapitel 5.3, Formel 5.8). Die Fließgeschwindigkeit der Zellen wird genutzt, um die charakteristischen Signalanteile vom Zeit- in den Wegbereich zu transformieren.



**Abbildung 6.53** Software Oberfläche zur Erzeugung einer *Flow Cytometry Standard* Datei, die eine Analyse der magnetischen Daten mit kommerziellen Auswerteprogrammen der optischen Durchflusszytometrie ermöglicht (a). Parallel dazu können farbkodierte, zweidimensionale Dot-Plots (alternativ: Histogramme) für eine vertiefende Auswertung direkt im Analysetool erstellt werden (b&c).

Zur manuellen Auswertung werden die Ergebnisse in einer \*.csv-Datei abgespeichert, die im *Header* die gewählten Einstellungen der *State-Event-Machine* sichert. Zusätzlich bietet die Software Oberfläche die Möglichkeit die ermittelten Parameter direkt aufzutragen. Hierzu können Grenzen gesetzt werden, die als Filter dienen, um die Datenpunkte farblich kodiert in zweidimensionalen Dot Plots darzustellen (Abbildung 6.53). Um mit standardisierten Durchflusszytometer Softwareoberflächen wie der Kaluza Flow Analysis Software von Beckman Coulter zu arbeiten, bietet das Tool die Option aus der ursprünglichen \*.tdms-Datei und der generierten \*.csv Datei eine *Flow Cytometry Standard* Datei (\*.fcs) zu erstellen. Neben der Erstellung eines programmspezifischen ASCII-kodierten *Headers*, werden die Parameterwerte dabei in einer 10 bit Auflösung umskaliert. Die Konvertierung ermöglicht einen Vergleich der optischen und magnetischen Durchflusszytometriedaten.

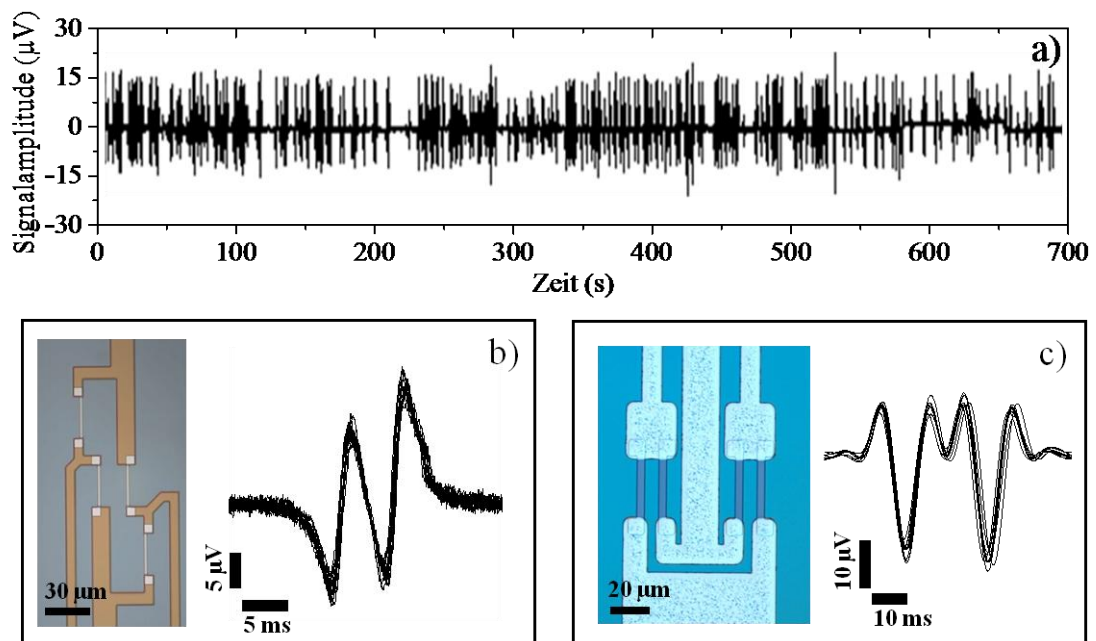
## 7. Messergebnisse

Zur Validierung des *Workflows* der magnetischen Durchflusszytometrie hinsichtlich *in-situ* Analytanreicherung, *in-situ* magnetophoretischer Fokussierung, Sensitivität des magnetoresistiven Schichtstapels, Signalausbildung über dem Wheatstone Brückenlayout und Limitationen des Detektionssystems, werden Referenzanalyte in PBS magnetisch erfasst und analysiert. Über eine optische Korrelation der magnetischen Signale sollen Grenzfälle erarbeitet und definiert werden, mit dem Ziel falsch-positive Events zu vermeiden und Koinzidenzen der Analyte zu bewerten. Um die Anwendbarkeit zur Detektion biologischer Proben zu demonstrieren, wird der Nachweis der magnetoresistiven Messung von superparamagnetisch markierten FaDu-Tumorzellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen in PBS erbracht. Eine Untersuchung der Interaktion der superparamagnetisch markierten Analyte mit der Substratoberfläche charakterisiert die Analytbewegung über die Sensorelemente in PBS. Zum Nachweis der magnetischen Detektion in Nicht-Newton'schen Flüssigkeiten, wie stabilisiertem Vollblut, wird die Analytgeschwindigkeit bei definiertem Hämatokrit und variierenden Kanalhöhen errechnet und mit dem theoretischen Verhalten im laminaren Flussprofil ionischer Puffer verglichen. Die Bestimmung der Analytgeschwindigkeit nimmt dabei, als Umrechnungsfaktor zur Transformation der Messdaten vom Zeit- in den Wegbereich und zur Ermittlung eines magnetischen Analytdurchmessers, eine zentrale Rolle in der Signalanalyse ein.

### 7.1 Charakterisierung des Systems mit Referenzanalyten

Zur Bewertung des optimierten Messsystems werden 12 µm Referenzpartikel in einem Verhältnis von 1:8,000 zur Herstellersuspension auf eine Konzentration von 6,300 Partikel mL<sup>-1</sup> in ionischem Puffer aufbereitet. Abbildung 7.1 a zeigt einen typischen Datenstream eines IPHT-Schichtstapels mit einem diagonalen Sensorlayout, bei einer Spritzenpumpgeschwindigkeit von 1.0 µL s<sup>-1</sup> sowie einem externen Magnetfeld des Permanentmagneten von 100 mT. In Kombination mit der Dicke der ferromagnetischen Führungsstrukturen von 150 nm garantieren die gewählten Parameter eine magnetische Zellfokussierung mit einer Wiederfindungsrate >97%. Die stabile, driftfreie magnetische Erfassung über eine Messzeit von mehr als 10 Minuten demonstriert die hohe Stabilität der ultradünnen 70 nm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ALD-Passivierung in einem stark ionischen Medium. Zur Auswertung werden die Rohdaten mit einem

Tiefpassfilter bei einer Grenzfrequenz von 200 Hz geglättet und unter Festlegung eines Schwellwertes von  $0.2 \mu\text{V}$  und der Begrenzung einer maximal tolerablen Signallänge von 900 Datenpunkten im Analysetool nach Einzelevents gescannt. Die Signalerkennungssoftware dokumentiert 680 charakteristische Signaturen, die zu einer Zählfrequenz von ungefähr einem Analyten pro Sekunde führen. Die Reproduzierbarkeit des charakteristischen Signalpatterns von einem Einzelanalyten kann anhand der Überlagerung von 15 magnetischen Signalen nachgewiesen werden (Abbildung 7.1 b).

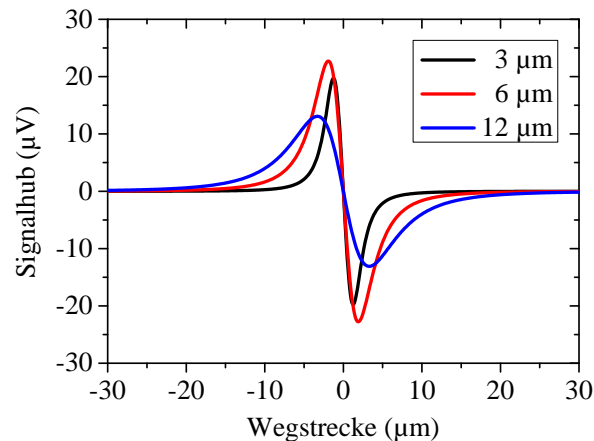


**Abbildung 7.1** Messergebnisse der magneto-resistiven Detektion mit  $12 \mu\text{m}$  Referenzanalyten in PBS. Die ALD-Passivierung garantiert eine stabile, driftfreie Messung ( $>10$  Minuten) in ionischem Puffer (a). 15 überlagerte Einzelsignale aus dem Messstream des diagonalen Sensorlayouts demonstrieren die Reproduzierbarkeit des charakteristischen Signalmusters (b). Die Reproduzierbarkeit der magnetischen Analyterfassung mit dem parallelen Sensordesign bei Ausbildung des charakteristischen 6-Peak-Signals wird unter analogen Messbedingungen durchgeführt (c).

Mit einem Abstand der aktiven GMR-Elemente  $d_{GMR}$  von  $16 \mu\text{m}$  bildet sich das typische 4-Peak-Signalmuster aus, wobei ein leichter Rückgang der beiden mittleren Peaks auffällt, hervorgerufen durch Signalinterferenzen der alternierenden Halbwellen der Einzelsignale. Analog dazu werden 15 gefilterte 6-Peak-Signale eines parallelen Sensordesigns aufgetragen, die unter analogen Bedingungen am gleichen GMR-Chip mit  $12 \mu\text{m}$  Referenzanalyten aufgenommen werden (Abbildung 7.1 c). Die Anordnung der Einzelelemente mit einer Distanz der Widerstandspaare von  $40 \mu\text{m}$  und einem Abstand der Einzelwiderstände von  $8 \mu\text{m}$ , führt im Mittel zu dominanten



Signalamplituden von  $22 \mu\text{V}$ , was einer Erhöhung der Sensitivität von  $\sim 50\%$  im Vergleich zu einer diagonalen Amplitude entspricht. Bei der Messung der  $12 \mu\text{m}$  Analyte und gewähltem  $d_{\text{GMR}}$  von  $16 \mu\text{m}$  kann die erhoffte Verdopplung zum diagonalen Signalhub nicht erreicht werden.



**Abbildung 7.2** Scilab-Simulation der magnetischen Signalantworten der  $3, 6$  und  $12 \mu\text{m}$  Referenzanalyten, bei einer GMR-Sensitivität von  $1.3 \text{ \% mT}^{-1}$ . Die magnetischen Momente der Analyte sind über VSM-Messungen ermittelt worden (vgl. Kapitel 4.1).

Die Analyse der  $12 \mu\text{m}$  Messung mit diagonalen GMR-Anordnung liefert einen durchschnittlichen Signalhub von  $25 \mu\text{V}_{\text{pp}}$ , was im Vergleich zum Siemens-Stack ( $\sim 5\text{--}8 \mu\text{V}_{\text{pp}}$ ) unter ähnlichen Bedingungen nahezu eine Verfünfachung der Brückendifferenzspannung bedeutet. Zur Bewertung der gemessenen Signale wird mit der Scilab-Simulation die magneto-resistive Antwort eines GMR-Widerstandsstreifens bei Überstreichen einer in der Außenhülle magnetisierten  $12 \mu\text{m}$  Kugel theoretisch errechnet. Das bei der VSM-Messung ermittelte magnetische Moment für  $12 \mu\text{m}$  Referenzanalyten von  $7.8 \times 10^{-10} \text{ emu Partikel}^{-1}$  (vgl. Kapitel 4.1, Tabelle 4-3) liefert bei einer Steigung der Hysteresekennlinie von  $1.3 \text{ \% mT}^{-1}$  einen Signalhub von  $23 \mu\text{V}_{\text{pp}}$ . Damit wird bei der magneto-resistiven Messung im ungeschirmten Laboraufbau der theoretische ermittelte Signalhub erreicht. Abbildung 7.2 zeigt zusätzlich die simulierten Signalantworten der  $3$  und  $6 \mu\text{m}$  Referenzanalyten auf Basis der VSM-Ergebnisse bei einer Steigung von  $1.3 \text{ \% mT}^{-1}$  und einer Versorgungsspannung von  $100 \text{ mV}_{\text{pp}}$ . Verglichen mit GMR-Messungen unter analogen Bedingungen liegen die magnetisch gemessenen Daten im Gegensatz zu den  $12 \mu\text{m}$  Ergebnissen  $\sim 15\%$  unter den Simulationsergebnissen (Tabelle 7-1). Die  $6 \mu\text{m}$  Referenzanalyten liefern mit  $39 \mu\text{V}_{\text{pp}}$  den höchsten theoretischen Signalhub, während die  $12 \mu\text{m}$  Analyte mit  $22.5 \mu\text{V}_{\text{pp}}$  den geringsten Wert aufweisen. Dieser Trend der Simulation korreliert mit den



magneto-resistiven Messungen. Die theoretische Signalantwort wird somit über die magneto-resistive Messung im ungeschirmten Laboraufbau gut abgebildet.

**Tabelle 7-1** Gegenüberstellung der simulierten Signalstärke, auf Basis der magnetischen Momente der VSM-Messung und der magneto-resistiv gemessenen Signale der 3, 6 und 12  $\mu\text{m}$  Referenzanalyte bei einer Kennliniensteilheit von 1.3 %  $\text{mT}^{-1}$ .

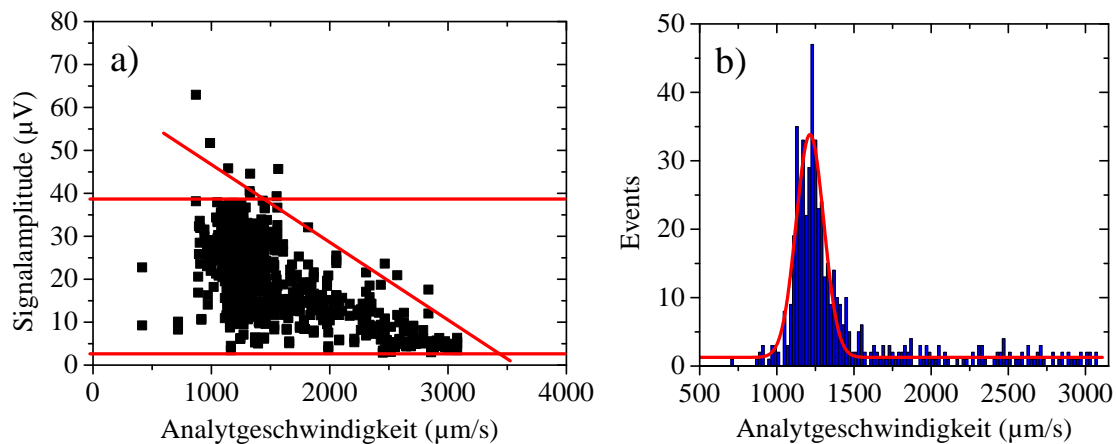
Beadtyp	VSM	Simulation	GMR
Durchmesser ( $\mu\text{m}$ )	Magnetisierung (emu/Partikel)	Signalhub ( $\mu\text{V}$ )	Signalhub ( $\mu\text{V}$ )
3	$1.16 \times 10^{-10}$	34	30
6	$4.06 \times 10^{-10}$	39	33
12	$7.84 \times 10^{-10}$	22.5	25

### Limitation der magnetischen Zelldetektion

Auf Grund der theoretischen Abnahme der Sensitivität einer *Spin-Valve* Struktur mit der dritten Potenz des Abstandes von Analyt zu Sensor [25], ist die magnetische Anreicherung der Analyte an der Substratoberfläche eine Grundvoraussetzung zur magnetischen Erfassung einzelner Zellen, sowie volumetrischer Analysen. Die Grenzbedingungen der magneto-resistiven Messung in einem mikrofluidischen Kanalsystem werden dabei durch das externe Magnetfeld - zur Anreicherung der Analyte - und den Volumenstrom der Suspension - zur Steuerung der Zellgeschwindigkeit ( $v_a$ ) - definiert.

Die experimentelle Evaluierung der Grenzbedingungen wird am Beispiel der Messung der 12  $\mu\text{m}$  Referenzanalyte aus Abbildung 7.1 bei einem  $H_{ext}$  von 100 mT durchgeführt. Mit steigender Analytgeschwindigkeit löst die Auftriebskraft im laminaren, parabolischen Flussprofil die magnetischen Referenzpartikel von der Substratoberfläche ab, resultierend in einem Abfall des SNR bei zunehmendem Abstand von Analyt zu Sensor. Bei definiertem  $H_{ext}$  und einem durchschnittlichem magnetischen Moment pro Referenzpartikel von  $7.84 \times 10^{-10}$  emu, ermittelt aus einer VSM-Messung, stellt sich ein Detektionslimit von  $3,100 \mu\text{m s}^{-1}$  ein (Abbildung 7.3 a). Mit einem Grundrauschen der magneto-resistiven Brückenschaltung von  $\sim 1.5 \mu\text{V}_{pp}$  werden magnetische Signale der Referenzanalyten ab einem Signalhub von  $\sim 3 \mu\text{V}_{pp}$  detektiert. Die Häufigkeitsverteilung der Analytgeschwindigkeit, aufgetragen mit einer Schrittweite von  $20 \mu\text{m s}^{-1}$ , zeigt eine Hauptpopulation der magnetisch detektierten Events zwischen  $1,000$  und  $1,500 \mu\text{m s}^{-1}$

bei einem Mittelwert von  $1,434 \mu\text{m s}^{-1}$  und einer maximalen Signalamplitude der Peaks 1&4 von  $30 \mu\text{V}_{\text{pp}}$  (Abbildung 7.3 b).



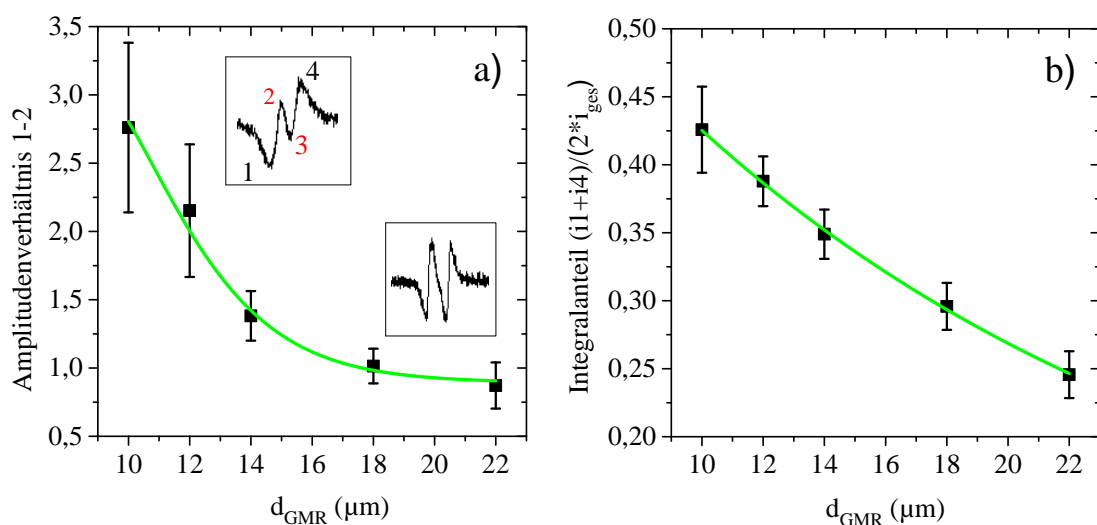
**Abbildung 7.3** Limitation der magnetischen Durchflusszytometrie. Bei konstantem  $H_{\text{ext}}$  und steigender  $v_a$  heben die magnetischen Analyte im Gradienten des laminaren Flussprofils ab, resultierend in einer Abnahme des SNR. Die magnetische Erfassung von  $12 \mu\text{m}$  Referenzpartikeln bei einem  $H_{\text{ext}}$  von  $100 \text{ mT}$  und Kanaldimensionen von  $700 \times 150 \mu\text{m}$  führt zu einer Detektionsgrenze von  $3,100 \mu\text{m s}^{-1}$  und einer maximalen Fließgeschwindigkeit  $v_a$  der Beads von  $\sim 1,500 \mu\text{m s}^{-1}$  für eine Detektion mit maximalem SNR (a). Die Häufigkeitsverteilung der Analytgeschwindigkeit zeigt ein Maximum bei  $1,250 \mu\text{m s}^{-1}$  (b).

Die Realisierung einer magnetischen Einzelzelldetektion wird zusätzlich vom Design der Wheatstone Brücke, hinsichtlich der maximalen Zählfrequenz aufgrund von Koinzidenzen limitiert. Um Signalüberlagerungen von zwei superparamagnetisch markierten Analyten auszuschließen, muss der Abstand der Zellmittelpunkte in erster Näherung mindestens dem zweifachen Analytdurchmesser und zusätzlich dem Abstand der GMR-Widerstände in der diagonalen Verschaltung entsprechen (vgl. Kapitel 7.2). Bei der magnetischen Erfassung der  $12 \mu\text{m}$  Referenzpartikel, einem  $d_{\text{GMR}}$  von  $18 \mu\text{m}$  und der ermittelten maximal tolerablen Geschwindigkeit von  $1,500 \mu\text{m s}^{-1}$  führen diese Grenzbedingungen zu einer maximalen Zählrate von  $36 \text{ Events s}^{-1}$ . Durch Verstärkung des externen Magnetfeldes kann die Zählrate über die Regulierung des Volumenstroms erhöht werden.

### Ausbildung des charakteristischen Signalmusters

Zur Untersuchung der Ausbildung der charakteristischen, magnetischen Signatur und des auftretenden Effekts der Signalüberlappung der mittleren Extrema wird eine Messreihe mit  $12 \mu\text{m}$  Referenzbeads über 5 diagonale GMR-Brücken mit variierendem

Abstand der signalgebenden Widerstandselemente unter konstanten Messbedingungen durchgeführt. Für die magnetische Erfassung wird die Sensitec *Stack-Variation* S17 (vgl. Abbildung 6.10) verwendet, wobei das externe Magnetfeld mit 140 mT auf Grund der Reduzierung der Chipdimension auf ein 20 x 10 mm Format relativ hoch angesetzt wird, um eine maximale magnetische Anreicherung auf der Substratoberfläche zu garantieren. Die Einzeldetektion wird bei einem Volumenstrom von  $1 \mu\text{L s}^{-1}$  und GMR-Abständen von 10, 12, 14, 18 und 22  $\mu\text{m}$  durchgeführt, wobei jede Messung  $>200$  magnetische Signale aufweist. Abbildung 7.4 vergleicht zwei ausgewählte Signalparameter, die sowohl die Ausformung der Signalform, als auch auftretende Signalinterferenzen der alternierenden mittleren Signalteile beschreiben.

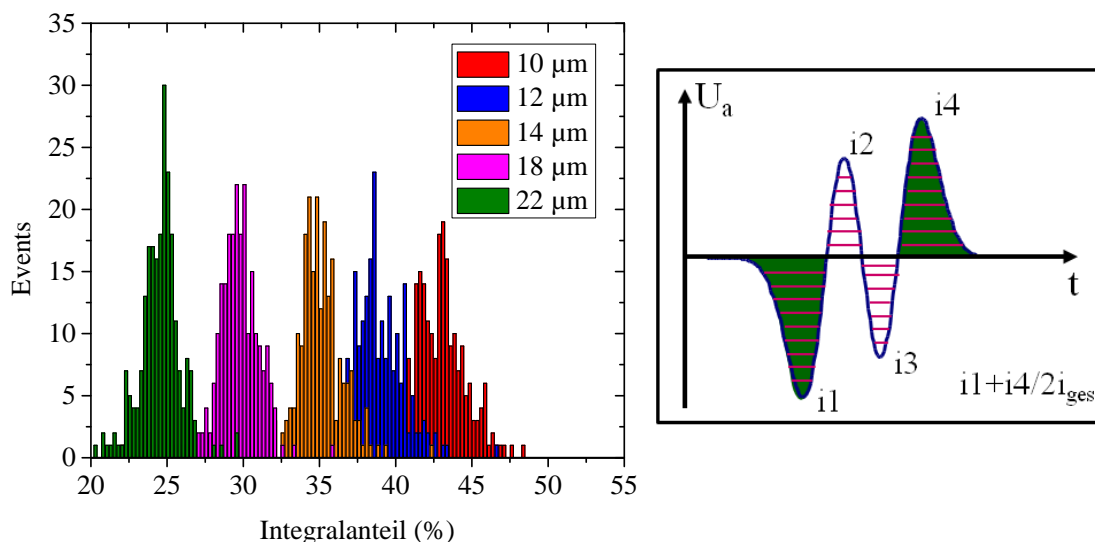


**Abbildung 7.4** Ausbildung des charakteristischen, magnetischen Signalmusters unter Variation von  $d_{\text{GMR}}$ , bei konstantem Analytdurchmesser. Über das Amplitudenverhältnis des ersten und zweiten Signalpeaks kann bei Detektion der 12  $\mu\text{m}$  Referenzanalyte ein  $d_{\text{GMR}}$  von 10, 12 und 14  $\mu\text{m}$  differenziert werden (a). Mit der Auftragung des Integralanteils des ersten und vierten Peaks im Verhältnis zum Gesamtintegral wird eine vollständige Differenzierung der Signalmuster erreicht (b).

Das Verhältnis der ersten zur zweiten Halbwelle des 4-Peak-Signalmusters führt zu einer eindeutigen Diskriminierung der unterschiedlichen Signalausbildung bei einem  $d_{\text{GMR}}$  von 10, 12 und 14  $\mu\text{m}$  (Abbildung 7.4 a). Die Amplitude der ersten Halbwelle resultiert ausschließlich aus der magnetoresistiven Änderung des ersten Sensorelements, während die zweite Signalamplitude bei geringerem  $d_{\text{GMR}}$  auf Grund der überlagernden alternierenden Peaks 2 und 3 absinkt. Ab einem  $d_{\text{GMR}}$  von 16  $\mu\text{m}$  ist nur noch eine schwache Signalüberlagerung zu beobachten und das Amplitudenverhältnis pendelt sich bei dem Wert 1 ein. Zur Bewertung verschiedener Analytdurchmesser über variierende Widerstandsabstände wird der Faktor  $K$  eingeführt, der die Beziehung des hydrodynamischen Analytdurchmessers  $d_{\text{hydro}}$  zu  $d_{\text{GMR}}$  beschreibt.

$$K = \frac{d_{hydro}}{d_{GMR}} \quad (7.1)$$

Ab einem  $K < 0.66$  ist keine Differenzierung der Signalmuster mehr über eine reine Amplitudenbetrachtung möglich. Daher ist die Summe der Integrale der ersten und vierten Halbperiode, normiert auf das Gesamtintegral der Signatur ( $i_{1+4}$ ) ein stabilerer Parameter zur Differenzierung der Signalausbildung bei einer Variation von  $d_{GMR}$ . Abbildung 7.4 b demonstriert die Unterscheidung der Signalmuster selbst bei großen  $d_{GMR}$  und einem  $K$  von  $\sim 0.5$ . Die Häufigkeitsdarstellung über  $i_{1+4}$  mit einer Schrittweite von 0.25% zeigt den hohen Informationsgehalt des spezifischen Signalmusters bei geeigneter Wahl der Parameter. Die Ausbildung des Signalmusters bei konstantem  $d_{GMR}$  und Variation des Analytdurchmessers verhält sich analog zur diskutierten Messung in Abbildung 7.4 mit variierendem GMR-Abstand.

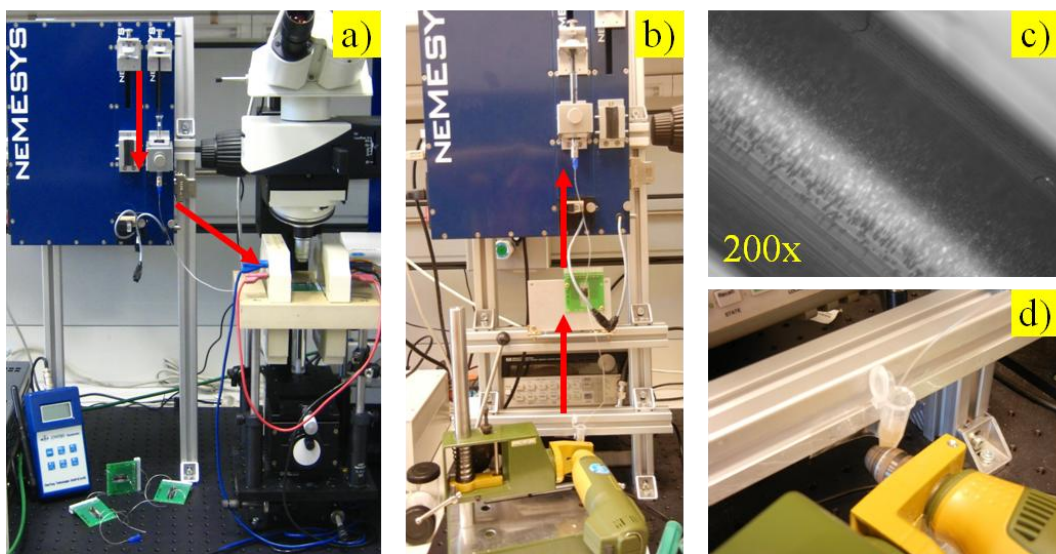


**Abbildung 7.5** Vergleich der Integrale der fünf magnetischen Messungen mit  $12 \mu\text{m}$  Referenzanalyten bei variierendem  $d_{GMR}$ . Das Schaubild beschreibt die Berechnung des gewählten Parameters für den Integralanteil.

### Magnetische Messung der Absolutzellkonzentration

Zur Vorbereitung der Messung der Absolutkonzentration einer bekannten Analytsuspension wird in einem ersten Ansatz der Weg der Analyte vom Spritzensystem, über die Dosiernadel, in den PVC-Schlauch simuliert, um diese kritischen Komponenten als Verlustquellen auszuschließen. Die  $500 \mu\text{L}$  Hamilton

Spritze wird dabei senkrecht, oberhalb der PEEK-Platte fixiert, um bei minimaler Länge des PVC-Schlauchs eine kontinuierliche Bewegung der Flüssigkeit nach unten garantieren zu können. Die Suspension einer 12  $\mu\text{m}$  Micromod Probenlösung von  $2,647 \text{ Partikel } \mu\text{L}^{-1}$  - bestimmt durch eine Neubauer-Zählkammer - wird mit einer Durchflussrate von  $1 \mu\text{L s}^{-1}$  durch den 30 cm langen PVC-Schlauch (Innendurchmesser: 0.5 mm) über 8 Minuten gepumpt und in einem Eppendorf Tube gesammelt. Die Analyse der Beadkonzentration von  $858 \text{ Partikel } \mu\text{L}^{-1}$  in der durchgepumpten Suspension zeigt einen durchschnittlichen Verlust an Referenzanalyten von fast 60%. Die Wiederholung der Messung mit integriertem Messcarrier und einem  $H_{ext}$  von 100 mT unterstreicht den Trend, bei nahezu gleichen Ergebnissen und belegt einen massiven Verlust der Analyte bei genauer Betrachtung des PVC-Schlauches (Abbildung 7.6 a&c). Durch die hohen Verluste im Schlauch und Sedimentationseffekte der Analyte in der Spritze, bzw. Dosiernadel können herstellungsbedingte Schwachstellen im Kanalsystem, wie das senkrechte Einstichloch in der PDMS-Fluidik vernachlässigt werden.



**Abbildung 7.6** Bewertung der Verluste der magnetischen Analyte im provisorischen Laboraufbau. Hoher Verlust (~60%) im PVC-Schlauch zwischen Spritzenpumpe und Messkanal (a&c). Eine Aspiration der Analytsuspension kombiniert mit einem provisorischen Schüttler reduzieren den Verlust auf 20% (b&d).

Alternativ wird in Abbildung 7.6 b die Probenzufuhr modifiziert, wobei der Messcarrier vertikal fixiert wird und die Partikelbewegung über eine Aspiration der Messsuspension aus einem Eppendorf Tube erfolgt, das dabei provisorisch mit dem Kopf einer Handbohrmaschine kontinuierlich geschüttelt wird (Abbildung 7.6 d). Bei gleicher Gesamtlänge der Schlauchstrecke von 30 cm und einer Aspirationsgeschwindigkeit von

$1.5 \mu\text{L s}^{-1}$  kann der Verlust der Analyte auf durchschnittlich 20% reduziert werden. Der Nachteil dieser Anordnung ist neben dem Verlust der optischen Kontrolleinheit, die Notwendigkeit den Permanentmagnet nach der Positionierung am Präzisionskreuztisch auf die Rückseite des Carriers zu arretieren, was zu einem Verlust der GMR-Sensitivität führt (vgl. Abbildung 3.10).

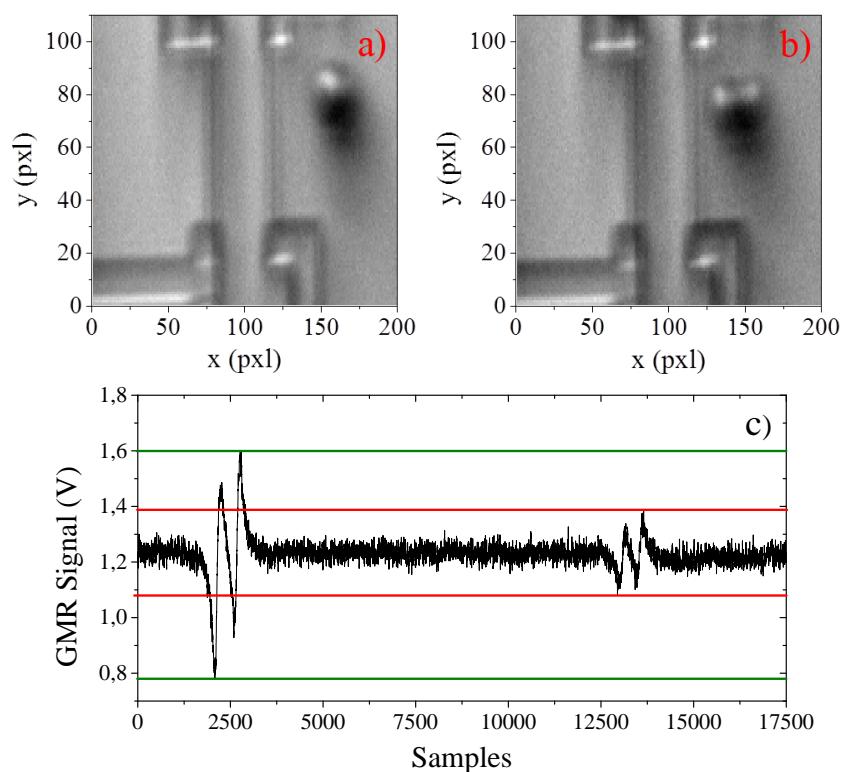
Zusammenfassend kann eine magnetische Absolutzellzählung auf Grund der hohen Verluste in PVC-Schlauch und Spritzensystem mit dem provisorischen Messaufbau nicht durchgeführt werden. Die Messung erfordert eine integrierte Lösung, die eine Zufuhr der Suspension aus der Spritze optimiert und die Distanz zum Messkanal minimiert.

### 7.2 Optische Korrelation der magnetischen Signalantwort

Zur präzisen Analyse der magneto-resistiven Signalantwort wird eine zeitkorrelierte optische Erfassung der Zellbewegung über die GMR-Sensoren vorgenommen. Ziel ist dabei die Evaluierung von Grenzbedingungen hinsichtlich der Einzelzelldetektion sowie die Untersuchung der Ausbildung des charakteristischen, magnetischen Patterns bei der Detektion von Koinzidenzen bzw. Analytaggregationen. Die magnetischen Messwerte werden, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, über die LabVIEW DAQ-Karte bei konstanter Bittiefe (16 bit) ausgelesen und in einem spezifischen \*.tdms File abgelegt. Die Korrelation der optischen Daten erfolgt mit der, im Messaufbau integrierten Baumer TXG-14 CCD-Kamera, die über ein Videofenster in der LabVIEW GUI implementiert ist. Die maximale Bilderfassungsrate von 30 fps, die durch die Einbettung in die LabVIEW Oberfläche beschränkt wird, ist auf Grund von leichten Schwankungen ungeeignet zur Synchronisation mit der 10 kHz *Sample Rate* der DAQ-Karte. Die Zuordnung der magnetischen Signale erfolgt deshalb manuell über einen mit den Bildern abgelegten Zeitstempel. Zur Reduzierung der Dateigröße wird ein aktives Videofenster von 250 x 150 pxl, um den Bereich der signalgebenden GMR-Widerstände gesetzt. Die 8 bit Pixelwerte der Kamera werden in Stringwerte gewandelt und in einer zweidimensionalen Textdatei hinterlegt, wobei jeder *Frame* mit dem Zeitstempel spezifiziert ist.

Die magnetische Detektion wird mit  $12 \mu\text{m}$  Referenzanalyten und einem  $H_{ext}$  von 110 mT durchgeführt, wobei eine niedrige Spritzengeschwindigkeit von  $0.3 \mu\text{L s}^{-1}$  die Bildung von Beadaggregaten auf den 200 nm dicken Ni-Strukturen verstärken soll. Abbildung 7.7 zeigt zwei Bildausschnitte (200 x 110 pxl) von direkt

aufeinanderfolgenden Analyten, die das diagonale Sensorpaar auf nahezu gleicher Höhe überstreichen. Die Analyse der korrespondierenden magnetischen Signaturen validiert in beiden Fällen die Ausbildung des charakteristischen 4-Peak-Signalmusters (Abbildung 7.7 c). Die Amplitudenbetrachtung der 30,000-fach verstärkten Brückendifferenzspannung liefert beim ersten Event einen um das 2.5-fach höheren Signalhub im Vergleich zum zweiten. Die starke Variation der Signalamplituden, selbst bei der Detektion von homogen magnetisierten Referenzanalyten bestätigt die Problematik eines rein schwellwertbasierten Auswerteverfahrens. Die Auswertung nach einem spezifischen Signalmuster verhindert die Detektion Falsch-Positiver Zellevents bei Schwellwerten nahe der Rauschgrenze.

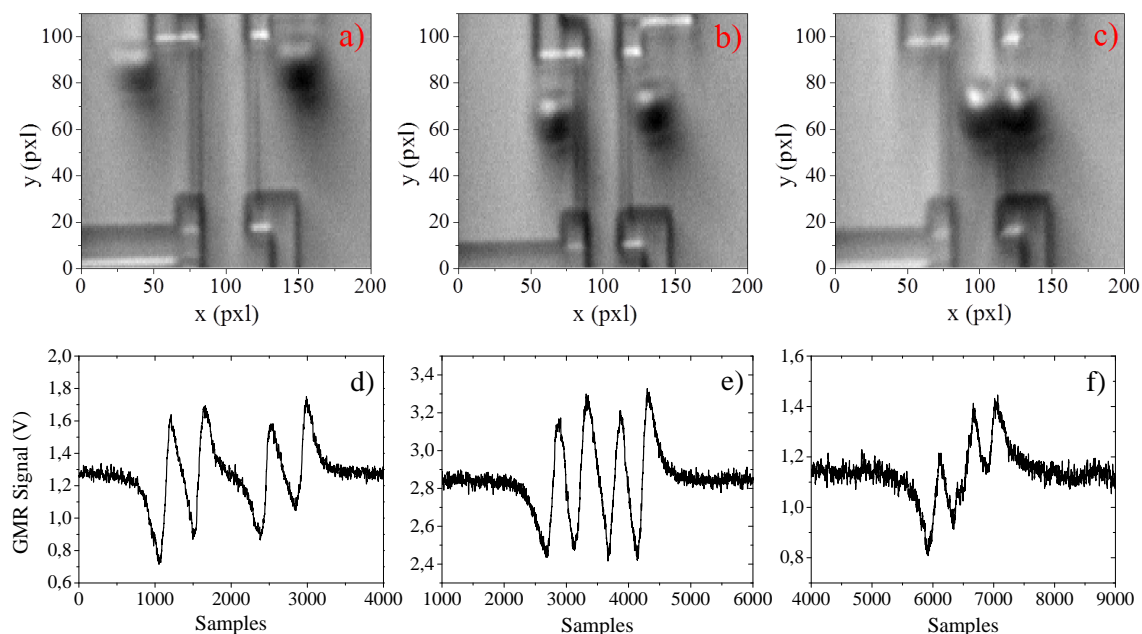


**Abbildung 7.7** Optische Korrelation der magnetischen Signalantworten. Zwei  $12\ \mu\text{m}$  Referenzanalyte überstreichen die diagonalen GMR-Sensoren an ähnlicher Position (a&b). Die generierten, charakteristischen 4-Peak-Signalmuster unterscheiden sich im Signalhub um einen Faktor 2.5 (c).

Die Limitation der magnetoresistiven Detektion hinsichtlich der maximal auflösbaren Zellfrequenz ist abhängig vom Analytdurchmesser,  $d_{GMR}$  und dem Abstand der magnetischen Partikel zueinander. Abbildung 7.8 zeigt optische Daten und korrespondierende magnetische Signalantworten der Grenzfälle bezüglich der magnetischen Erfassung von zwei aufeinanderfolgenden  $12\ \mu\text{m}$  Analyten. Mit einem Abstand der Analytkerne von  $\sim 55\ \mu\text{m}$  können die Referenzpartikel bei einem



vorliegenden  $d_{GMR}$  von  $18\ \mu\text{m}$  als Einzelevents aufgelöst werden (a&d). Überstreichen die Analyte die GMR-Elemente direkt hintereinander überlagern sich die magnetischen Einzelsignale und führen zu einem 6-Peak-Pattern (c&f). Eine Trennung der Analyte sowie eine weiterführende TOF-Betrachtung sind in diesem Extremfall nicht mehr durchführbar. Der minimale Abstand von zwei magnetischen  $12\ \mu\text{m}$  Analyten zur vollständigen Differenzierung der Signalantworten bei einem  $d_{GMR}$  von  $16\ \mu\text{m}$  kann aus der Mikroskopaufnahme auf  $\sim 33\ \mu\text{m}$  abgeschätzt werden (b&e). In Abhängigkeit der signifikanten Einflussgrößen entspricht das ungefähr der Summe des Abstandes der GMR-Elemente und des 1.5-fachen hydrodynamischen Durchmessers.

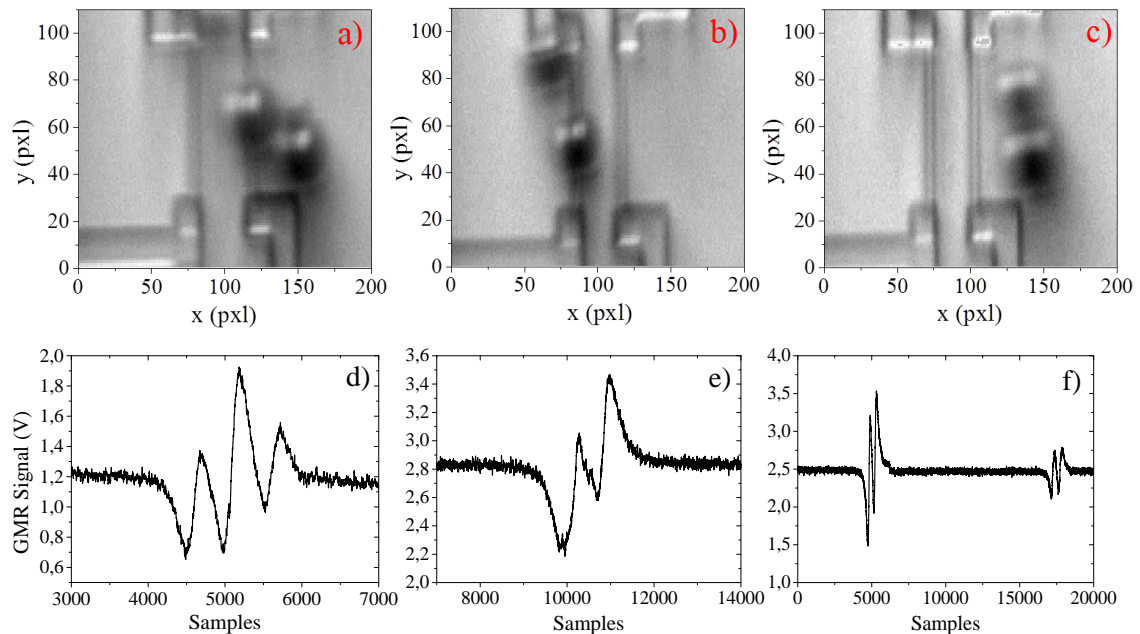


**Abbildung 7.8** Korrelation der optischen und magnetischen Daten von zwei  $12\ \mu\text{m}$  Referenzanalyten, die das diagonale Brückendesign horizontal direkt aufeinanderfolgend überstreichen. Eine Distanz der Analytkerne von  $\sim 55\ \mu\text{m}$  garantiert eine vollständige Auflösung der Einzelsignale bei einem  $d_{GMR}$  von  $18\ \mu\text{m}$  (a&d). Zwei direkt zusammenhängende Referenzanalyte generieren ein 6-Peak-Pattern, das keine TOF-Analyse erlaubt (c&f). Der minimale Abstand zur Differenzierung der magnetischen Signalantworten mit einem  $d_{GMR}$  von  $16\ \mu\text{m}$  liegt bei  $\sim 33\ \mu\text{m}$  (b&e).

In Abbildung 7.9 wird die magnetische Signalantwort von zwei Referenzanalyten diskutiert, die entlang den GMR-Widerständen vertikal angeordnet sind. Die Messung von zwei Analyten, die nahezu ohne Überlappung versetzt zueinander angeordnet sind, (a&d) resultiert in einem 6-Peak-Signal ähnlich der in Durchflussrichtung unmittelbar hintereinander abrollenden Analyte aus Abbildung 7.8 c. Die Zunahme der Überlappung der vertikal verschobenen Referenzpartikel resultiert in der Ausbildung eines 4-Peak-



Signalmustern mit stark minimiertem Mittelteil (b&e). In der TOF-Signalauswertung würde dieses Signalmuster als ein großer Analyt bewertet werden. Liegen die Analyte direkt übereinander wird ein charakteristisches 4-Peak-Pattern generiert, das nahezu doppelten Signalhub im Vergleich zur Detektion eines Einzelevents aufweist (c&f).

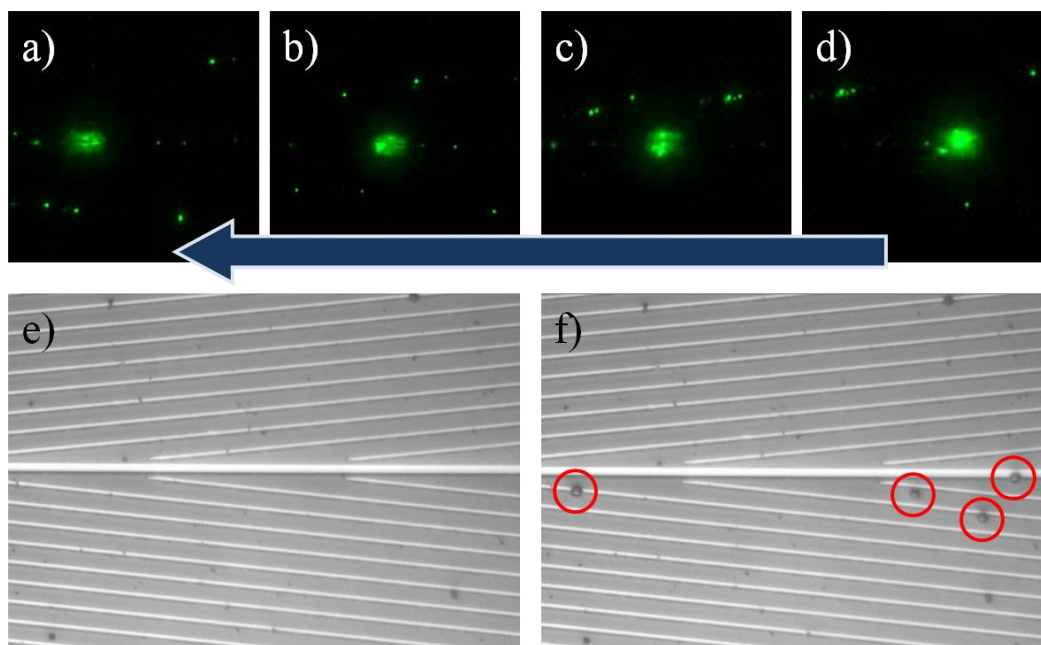


**Abbildung 7.9** Korrelation der optischen und magnetischen Daten von zwei  $12\ \mu\text{m}$  Referenzanalyten, die das diagonale Brückendesign vertikal versetzt überstreichen. Passieren die Analyte vertikal versetzt und direkt hintereinander den GMR-Sensor wird ein 6-Peak-Signal generiert (a&d). Eine Zunahme der Überlappung resultiert in einem 4-Peak-Signal mit vermindertem Signalhub der mittleren Peaks (b&e). Zwei Analyte die direkt übereinander angeordnet sind zeigen ein sauberes 4-Peak-Pattern mit doppeltem Signalhub im Vergleich zu einem Einzelevent (c&f).

Eine Zuordnung der Signalantworten über die Amplitude ist auf Grund der hohen Variation nur bedingt möglich. Eine alternative Signalauswertung hinsichtlich des Gesamtintegrals kann vermutlich zu einer Diskriminierung zwischen Einzelzellevent und Koinzidenz führen. Eine ausführliche Analyse zeigt, dass das diskutierte 6-Peak-Signal bei diagonalem Sensordesign als Koinzidenz von zwei Analyten bewertet und in der Statistik einer Absolutzellzählung berücksichtigt werden kann.

### 7.3 Zellbewegung und Geschwindigkeit bei Variation der Kanalhöhe

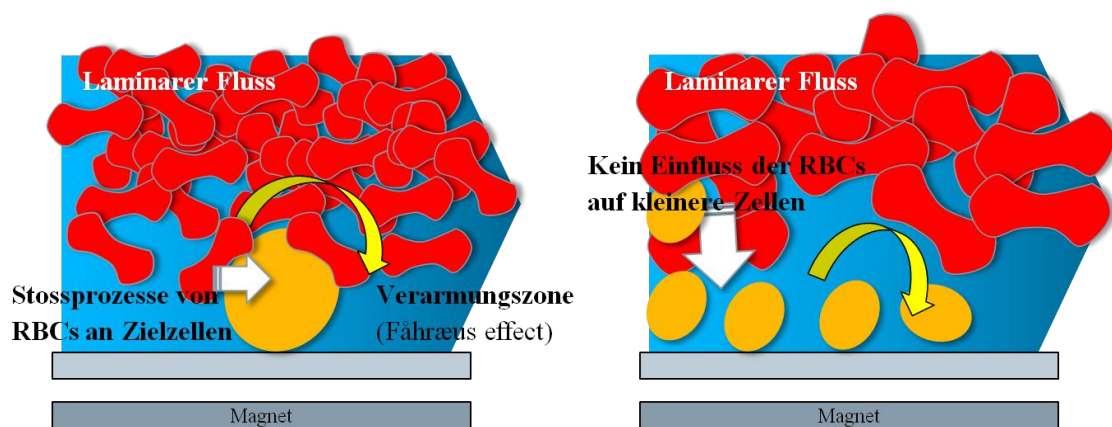
Die TOF-Analyse von superparamagnetisch markierten Zellen entlang des Sensorbereichs (je nach Layout: 10-50  $\mu\text{m}$ ) erfordert ein tieferes Verständnis der Zellbewegung und Zellinteraktion mit der Substratoberfläche. Im fluidischen Kanalsystem wird die Bewegung der magnetisch angereicherten Zellen in Abhängigkeit der magnetischen Haltekraft des Permanentmagneten und der Fluidreibungskraft generiert (vgl. Kapitel 5.2). Über fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen kann ein Abrollen der Analyte über die Substratoberfläche nachgewiesen werden. Dazu werden 13  $\mu\text{m}$  Polystyrolkugeln der Firma Micromod GmbH mit 200 nm Chemicell Nanopartikeln funktionalisiert, die einen superparamagnetischen Kern besitzen und in der Außenhülle einen grünen Fluoreszenzfarbstoff (Emissionswellenlänge: 488 nm) tragen.



**Abbildung 7.10** Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis einer Rollbewegung der funktionalisierten Polystyrolkugeln in PBS (a-d). Bei Messungen in EDTA-Vollblut ist nach dem Durchlauf keine Beadaggregation an den magnetophoretischen Ni-Strukturen zu beobachten (e). Die analoge Messung in PBS, mit auf das Medium abgestimmten Messparametern, zeigt einige arretierte Beads an der Magnetophoresestruktur (f).

Abbildung 7.10 a-d vergleicht Ausschnitte der Analytbewegung über einen 500  $\mu\text{m}$  langen Kanalabschnitt. Die Änderungen der Fluoreszenzintensität über die Zeit deuten auf unterschiedliche Analytbereiche im Sichtfeld hin und indizieren eine Rollbewegung des Analyten über das Substrat. In dem optisch opaken Medium Vollblut ist bei einem

Kanalquerschnitt von  $700 \times 150 \mu\text{m}$  keine Beobachtung der Analytbewegung über Fluoreszenzmarkierung möglich. Eine qualitative Beobachtung zeigt, dass nach Messungen der Referenzanalyten in EDTA-Vollblut keine Beadaggregationen an den magnetophoretischen Führungstreifen vorliegen. Im Gegensatz dazu kommt es bei analogen Messungen der Analyte in PBS unter optimierten Führungsbedingungen ( $H_{ext}$ ,  $Q$ ,  $d_{Ni}$ ) vereinzelt zu Arretierungen der Referenzanalyte am ferromagnetischen Material. Abbildung 7.10 e zeigt einen Kanalabschnitt nach der Messung von  $12 \mu\text{m}$  Analyten in EDTA-Vollblut, wobei die Vollblutprobe ohne Luftblasenbildung von einem ionischen Puffer verdrängt wurde. Im gleichen Kanalabschnitt sind nach der Messung mit Referenzanalyten in PBS Rückstände der aggregierten Partikel zu beobachten.



**Abbildung 7.11 Fåhræus-Effekt in mikrofluidischen Kanalsystemen.** Die Erythrozyten orientieren sich entlang des Geschwindigkeitsgradienten in die Kanalmitte, was zur Bildung einer  $2\text{-}4 \mu\text{m}$  hohen Verarmungszone an zellulären Blutbestandteilen führt und wodurch kleinere Zellen, wie Blutplättchen, an den Kapillarrand verdrängt werden [127].

Zur Erklärung dieser Beobachtung wird die komplexe Rheologie des Blutes betrachtet. Die inhomogene Suspension Blut setzt sich aus einem flüssigen Anteil, dem Blutplasma und zellulären Bestandteilen zusammen, wobei die Erythrozyten mit  $\sim 45\%$  den größten Volumenanteil (Hämatokrit) ausmachen [73]. Die Deformierbarkeit der RBCs hat maßgeblichen Anteil an der unbeständigen Viskosität einer Blutprobe, die deshalb zu den Nicht-Newtonschen Flüssigkeiten gezählt wird und ein flacheres Flussprofil aufweist [128] [129]. Abbildung 7.12 vergleicht das laminare und zeitgemittelte turbulente Geschwindigkeitsprofil am Beispiel einer Rohrströmung [97]. Die Viskosität ist dabei direkt von der Scherrate abhängig. Bei niedriger Scherrate in den Blutgefäßen formen sich die Erythrozyten zu Aggregaten (*Rouleaux*), die stapelförmig angeordnet sind, was zu einer hohen dynamischen Viskosität führt [130]. Bei hohen Scherraten lösen sich die RBC-Stapel auf, resultierend in einer Abnahme der dynamischen Viskosität. Alizadehrad et al. beschreibt ein zusätzliches Phänomen, den Fåhræus-

Effekt, wonach sich verformbare RBCs entlang des Geschwindigkeitsgradienten von der Kanalwand wegbewegen und zu einer Erhöhung des Hämatokrit im Volumenstrom führen [87]. Dadurch wird bereits bei Scherraten ab  $\sim 30 \text{ s}^{-1}$  und Kanaldurchmessern  $> 30 \mu\text{m}$  eine 2-4  $\mu\text{m}$  hohe Verarmungszone geschaffen, in der das Blutplasma vorherrscht und nur ein sehr geringer Anteil an zellulärem Blutbestandteil zu beobachten ist, was nahezu zu einem Newtonschen Fließverhalten führt.

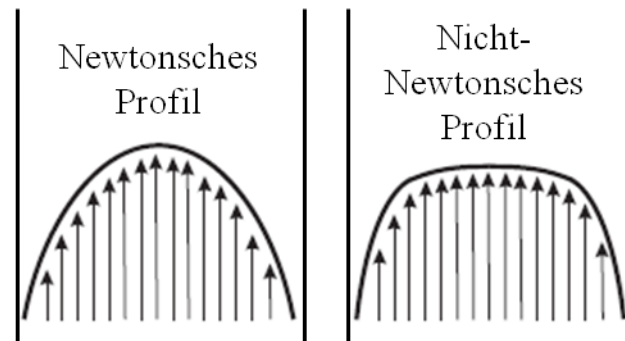


Abbildung 7.12 Newtonsches und Nicht-Newtonsches Flussprofil einer laminaren Rohrströmung, nach [97].

Mit maximalen Durchflussraten von  $1.0 \mu\text{L s}^{-1}$  bei der magnetischen Messung von spezifisch markierten Analyten in EDTA-Vollblut und Kanaldimensionen von  $700 \times 150 \mu\text{m}$  ( $w \times h$ ) kann die Scherrate  $\dot{\gamma}$  nach Formel 7.2 auf  $54 \text{ s}^{-1}$  berechnet werden.

$$\dot{\gamma} = \frac{4Q}{w^2 * h} \quad (7.2)$$

Unter Annahme der Ausbildung des Fåhræus-Effekts bei Messung von Vollblutproben in den mikrofluidischen Kanalsystemen kann das Ausbleiben von Aggregationen an den ferromagnetischen *Chevron*-Strukturen erklärt werden. Der Einfluss der Erythrozyten auf einen Bereich von  $\sim 60\%$  des Durchmessers der  $12 \mu\text{m}$  Referenzanalyte führt zu Stoßprozessen, die eine zusätzliche Antriebskraft für die magnetisch markierten Analyte generieren (Abbildung 7.11). Eine magnetische Anreicherung der Erythrozyten auf Grund des Eisen-Anteils im Hämoglobin, bei externen Magnetfeldern von  $\sim 150 \text{ mT}$  und minimalen Volumenströmen von  $\sim 0.2 \mu\text{L s}^{-1}$  ( $\sim 800 \mu\text{m s}^{-1}$ ), ist in erster Näherung nicht zu erwarten. Jung et.al. dokumentiert eine magnetophoretische Separation der RBCs aus einer Vollblutprobe bei einem  $H_{ext}$  von  $300 \text{ mT}$  und einer Durchflussrate von  $0.02 \mu\text{L s}^{-1}$  ( $\sim 80 \mu\text{m s}^{-1}$ ), die um eine Zehnerpotenz unter dem applizierten Volumenstrom der magnetischen Durchflusszytometrie liegt [131].

Im Zuge der Realisierung der magnetischen Durchflusszytometrie als POC-Anwendung zur Einzelzelldetektion bleibt der Volumenstrom  $Q$ , bei fixiertem Permanentmagneten, die einzige variable Kenngröße des Messsystems zur Steuerung der Wiederfindungsrate und Zählfrequenz. Eine stabile Bestimmung der Einzelzellgeschwindigkeit  $v_a$  über den GMR-Elementen garantiert die Transformation der Datenpunkte vom Zeitbereich in den Wegbereich und erlaubt die Berechnung einer Vielzahl von zusätzlichen, charakteristischen Parametern zur Signalinterpretation. Zur Analyse der Ausbildung der analytisch errechneten Einzelzellgeschwindigkeiten bei Variation von  $Q$  und den Kanalhöhen wird die theoretisch vorherrschende Analytgeschwindigkeit im rechteckigen Kanalsystem ermittelt. In einer ersten Näherung wird die mittlere Strömungsgeschwindigkeit  $v_m$  der Suspension über den Kanalquerschnitt  $A$  bestimmt [99]:

$$Q = v_m * A \quad (7.3)$$

Die Betrachtung der Messung der 12  $\mu\text{m}$  Referenzanalyten aus Kapitel 7.1 ( $Q=1.0 \mu\text{L s}^{-1}$ ;  $H_{ext}=100 \text{ mT}$ ;  $d_{Ni}=150 \text{ nm}$ ) führt dabei zu einer  $v_m$  von  $9524 \mu\text{m s}^{-1}$ , welche die tatsächlich vorliegende mittlere Analytgeschwindigkeit um einen Faktor 6.6 übersteigt. Zur exakten Berechnung der theoretischen Analytgeschwindigkeit im laminaren, parabolischen Flussprofil wird die Poiseuille-Strömung in rechteckigen Kanalsystemen für Newtonsche-Fluide über eine Fourier-Reihe hergeleitet [128],

$$v_x(y, z) = \frac{4h^2 \Delta p}{\pi^3 \eta L} \sum_{n, \text{ungerade}}^{\infty} \frac{1}{n^3} \left[ 1 - \frac{\cosh(n\pi \frac{y}{h})}{\cosh(n\pi \frac{w}{2h})} \right] \sin(n\pi \frac{z}{h}) \quad (7.4)$$

wobei  $h$ ,  $w$  und  $L$  die Kanaldimensionen,  $\Delta p$  die Druckdifferenz am Anfang und Ende des Kanals und  $\eta$  die dynamische Viskosität der Suspension beschreiben. Der Volumenstrom wird dabei durch Integration über die halbe Kanalbreite und über die Kanalhöhe definiert als:

$$Q = \frac{h^3 w \Delta p}{12 \eta L} \left[ 1 - \sum_{n, \text{ungerade}}^{\infty} \frac{1}{n^5} \frac{192}{\pi^5} \frac{h}{w} \tanh(n\pi \frac{w}{2h}) \right] \quad (7.5)$$

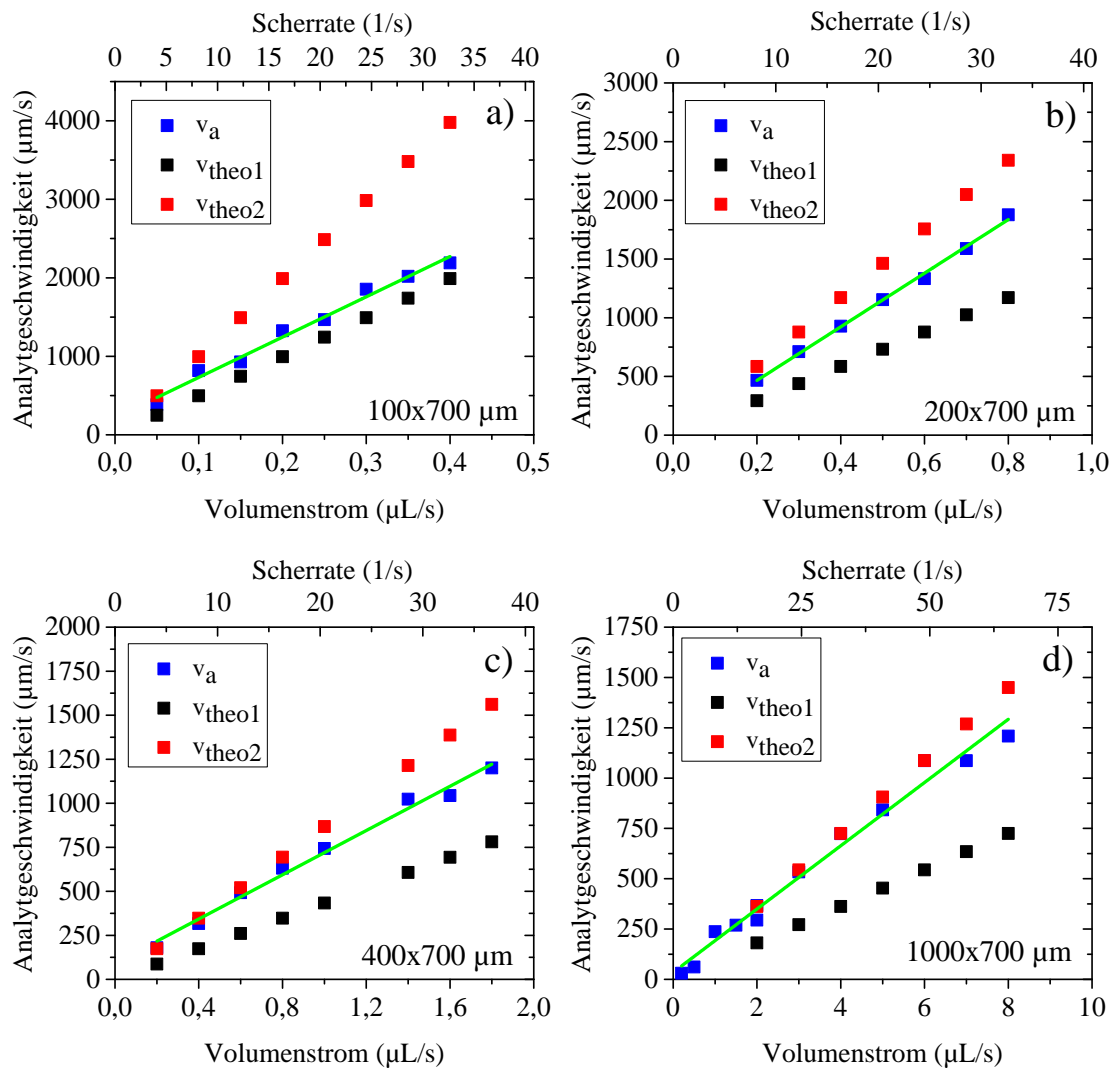
Die Kombination der beiden Formeln ermöglicht die Berechnung von  $v_x(y, z)$  ausschließlich über den gewählten Volumenstrom und den Kanaldimensionen. Gilt  $h < w$  kann  $Q$  über nachfolgende analytische Näherung bestimmt werden,

$$Q = \frac{h^3 w \Delta p}{12 \eta L} \left[ 1 - 0,63 \frac{h}{w} \right], \text{ für } h < \omega \quad (7.6)$$

wobei der Grenzfall  $h=w$  zu einem Fehler von 13% führt, während ein Aspektverhältnis von  $h=w/2$  den Fehler auf 0.2% reduziert [128]. Angewendet auf oben diskutierte Messung kann eine theoretische Analytgeschwindigkeit von  $2,534 \mu\text{m s}^{-1}$  im laminaren Flussprofil, auf Höhe des Partikelmittelpunkts ermittelt werden. Der Geschwindigkeitsverlust von 40% zum mittleren magnetisch gemessenen Wert, der bei  $1,430 \mu\text{m s}^{-1}$  liegt, kann auf die Rückhaltekraft des Feldgradienten des Permanentmagneten zurückgeführt werden. Zusätzlich weisen die kanalformenden Stege des lithographisch strukturierten SU-8 Masterwafers Schwankungen von  $\pm 20 \mu\text{m}$  auf, die auf Grund der starken Abhängigkeit der Teilchengeschwindigkeit von der Kanalhöhe zu einem signifikanten Fehler führen können. Mit dem Ziel einer exakten Validierung der Partikelbewegung wird eine metallische Gussform zur Herstellung der Mikrofluidiken geplant und extern gefertigt, die konstante Kanaldimensionen garantiert und vier alternative Auslegungen mit variierenden Kanalhöhen (100, 200, 400, 1,000  $\mu\text{m}$ ) bei einer Kanalbreite von 700  $\mu\text{m}$  beinhaltet.

Zur Analyse des Fließverhaltens unter Anwendungsbedingungen wird eine magnetoresistive Messreihe der 12  $\mu\text{m}$  Referenzanalyten in unverdünntem EDTA-Vollblut (Hämatokrit: 46%), bei einem konstanten  $H_{ext}$  von 150 mT und einer  $d_{Ni}$  von 150 nm durchgeführt. Trotz des deutlich flacheren Flussprofils der Nicht-Newtonschen Flüssigkeit im Kanal (vgl. Abbildung 7.12) wird in erster Näherung die Gleichung 7.5 für laminares Strömungsverhalten zur Berechnung der theoretischen Geschwindigkeit angewendet. Abbildung 7.13 vergleicht die aus der magnetischen Signalantwort errechnete Analytgeschwindigkeit  $v_a$  mit den, sich im Flussprofil ausbildenden theoretischen Geschwindigkeiten  $v_{theo1}$  auf Höhe des Radius und  $v_{theo2}$  auf Höhe des Partikeldurchmessers, unter Variation des Volumenstroms und der Kanalhöhe, wobei die Fourier-Reihe für die ersten 100 Partialsummen approximiert wird. Bei einem Volumenstrom von  $0.4 \mu\text{L s}^{-1}$ , der typischen Messbedingungen bei markierten Zellen entspricht, erfolgt eine indirekt proportionale Änderung der Scherrate mit zunehmender Kanalhöhe (vgl. Formel 7.2) und damit eine einhergehende Reduktion der Analytgeschwindigkeit (2,250 auf  $100 \mu\text{m s}^{-1}$ ). Trotz der Änderungen des damit verbundenen Strömungsprofils kann über den gemessenen Volumenstrombereich eine definierte und vom Volumenstrom linear abhängige Analytgeschwindigkeit beobachtet werden. In flachen Kanälen (Abbildung 7.13 a) nähert sich die Analytbewegung der

mittleren Flussgeschwindigkeit  $v_{theo1}$  an, während mit höheren Fluidikkanälen (Abbildung 7.13 b-d) zunehmend die Maximalgeschwindigkeit  $v_{theo2}$  ausgebildet wird.



**Abbildung 7.13** Vergleich der errechneten Analytgeschwindigkeit  $v_a$  aus einer 12  $\mu\text{m}$  Messung in EDTA-Vollblut, mit den theoretischen Werten bei  $d_{hydro}/2$  ( $v_{theo1}$ ) und  $d_{hydro}$  ( $v_{theo2}$ ) unter Verwendung von vier verschiedenen Kanalhöhen. Für die Berechnung der theoretischen Analytgeschwindigkeit werden laminare Flussbedingungen im rechteckigen Kanalsystem angenommen.

Die Resultate demonstrieren bei Scherraten im Bereich bis  $\sim 75 \text{ s}^{-1}$  stabile Messbedingungen für Laufzeitmessungen im Nicht-Newtonschen Vollblut, unabhängig von der Ausbildung der Verarmungszone durch den Fähræus-Effekt, was Grundlage für eine Kalibrierung und Größenbestimmung von Zielanalyten ist.

#### 7.4 Magnetische Messung von FaDu-Tumorzellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Die magnetische Detektion von spezifisch markierten, klinisch relevanten Zelltypen mit dem IPHT-Multilagensystem beschränkt sich auf die Verwendung des parallelen Sensorlayouts. Bei typischen IPHT-Sensitivitätswerten von  $1.4\% \text{ mT}^{-1}$  (vgl. Kapitel 6.1, Abbildung 6.7) kann ohne die additive Signalüberlagerung durch Kombination von zwei parallelen GMR-Elementen der Wheatstone Brücke kein ausreichendes SNR zur Durchführung einer TOF-Analyse gewährleistet werden. Abbildung 7.14 vergleicht das charakteristische 6-Peak-Pattern eines  $12\ \mu\text{m}$  Referenzanalyten in PBS und einer FaDu-Tumorzelle in EDTA-Vollblut, bei konstanten Abständen der Einzelwiderstandselemente der Paare von  $12\ \mu\text{m}$  und einem  $H_{ext}$  von  $120\ \text{mT}$ . Um eine Wiederfindungsrate  $>90\%$  zu gewährleisten wird der Volumenstrom bei der Erfassung der schwächer magnetisierten FaDu-Zellen um einen Faktor 2.5 auf  $0.4\ \mu\text{L s}^{-1}$  reduziert. Mit einer konstanten  $V_{cc}$  von  $100\ \text{mV}$  und einer FIR -3 dB Grenzfrequenz von  $200\ \text{Hz}$  generieren die Referenzanalyten ein durchschnittliches magnetisches Signal von  $40\ \mu\text{V}_{pp}$ , wohingegen die FaDu-Zellen einen Signalhub von  $15\ \mu\text{V}_{pp}$  liefern.

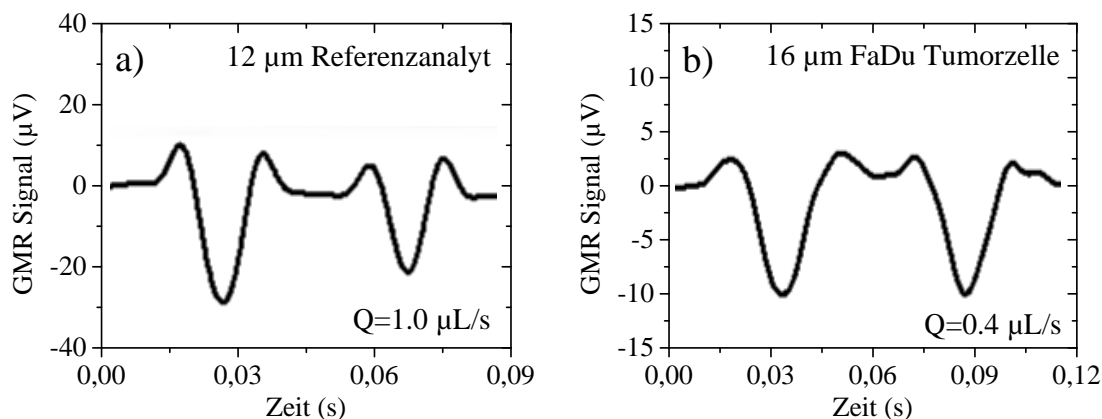
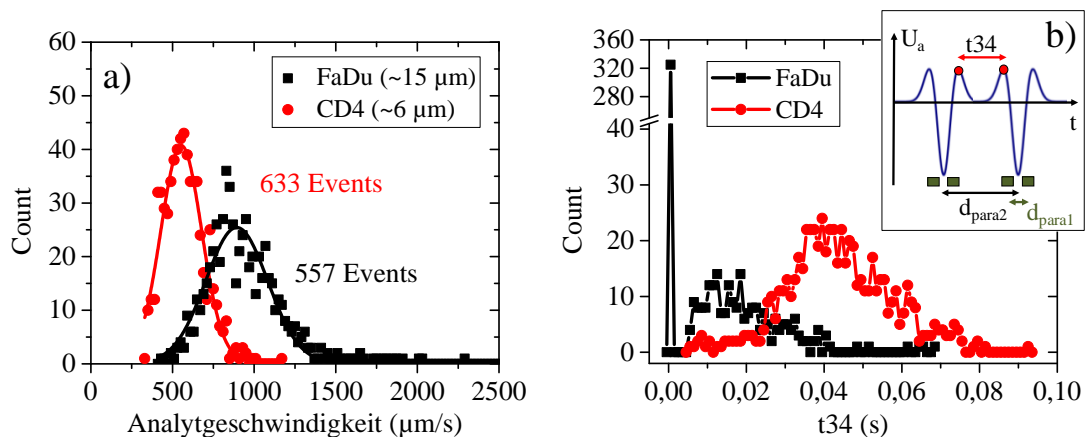


Abbildung 7.14 Charakteristische 6-Peak-Signale eines  $12\ \mu\text{m}$  Referenzanalyten in PBS (a), im Vergleich zu einer superparamagnetisch markierten FaDu-Tumorzelle in EDTA-Vollblut (b).

Der optimierte GMR-Schichtstapel von Sensitec (vgl. Abbildung 6.10, *Stack S13*) mit einer mittleren Sensitivität von  $1.8\% \text{ mT}^{-1}$  ermöglicht eine magnetische Erfassung der FaDu-Tumorzellen, auch mit dem diagonalen Sensorlayout. Bei mittleren Signalsprüngen von  $\sim 14\ \mu\text{V}_{pp}$  können die spezifisch markierten Zellen einzeln detektiert und über eine Laufzeitmessung ausgewertet werden. Abbildung 7.15 a vergleicht die magnetisch ermittelte Analytgeschwindigkeit von FaDu-Tumorzellen ( $\sim 15\ \mu\text{m}$ ) und CD4<sup>+</sup> T-Zellen ( $6\ \mu\text{m}$ ), die separat mit einem parallelen GMR-Brückendesign unter konstanten Bedingungen ( $Q=0.2\ \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $H_{ext}=120\ \text{mT}$ ) detektiert werden. Die CD4<sup>+</sup>-Zellen bewegen sich mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit



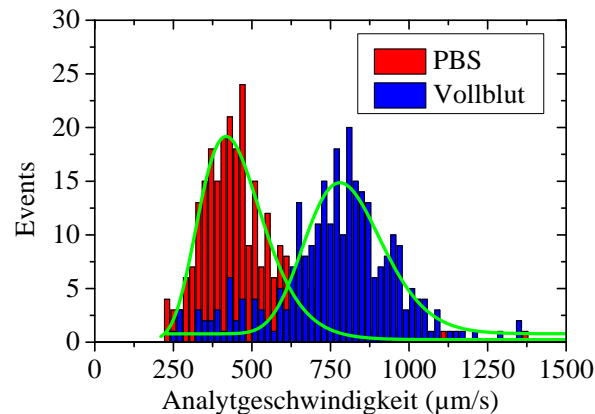
von  $550 \mu\text{m s}^{-1}$ , während die 2.5-fach größeren FaDu-Tumorzellen eine mittlere Analytgeschwindigkeit von  $890 \mu\text{m s}^{-1}$  aufzeigen. Eine Analyse des durchschnittlichen Signalhubs der  $\text{CD4}^+$  Zellen zeigt mit  $\sim 10 \mu\text{V}$  eine um 30% geringere Signalantwort als die analoge FaDu-Messung. Die im Verhältnis zur Durchmesseränderung ( $\sim 2.3$ ) geringe Zunahme der Analytgeschwindigkeit um den Faktor 1.6, kann so über die magnetische Haltekraft im Gradientenfeld des externen Permanentmagneten erklärt werden.



**Abbildung 7.15** Magneto-resistive Einzelzellerfassung von EpCAM FaDu-Tumorzellen und  $\text{CD4}^+$  T-Zellen mit einem parallelen Sensordesign. Die FaDu-Tumorzellen zeigen bei einem  $d_{hydro}$  von  $\sim 16 \mu\text{m}$  eine mittlere Analytgeschwindigkeit von  $890 \mu\text{m s}^{-1}$ , während die  $6 \mu\text{m}$  Immunzellen eine Geschwindigkeit von  $550 \mu\text{m s}^{-1}$  ausbilden (a). Die TOF-Analyse über Peak 3&4 des angestrebten 6-Peak-Signalmusters liefert eine Unterscheidung der Zellpopulationen über die Signalüberlagerung der untersuchten Halbwellen zu einem dominanten Signalpeak bei größeren Analyten (b).

Analog zur hydrodynamischen Größenbestimmung nach Coulter (vgl. Abbildung 4.8) zeigen die Geschwindigkeitsverteilungen der  $\text{CD4}^+$ -Zellen mit einem  $FWHM$  von  $293 \mu\text{m s}^{-1}$  eine schärfere Verteilung als die FaDu-Zellen mit  $446 \mu\text{m s}^{-1}$ . Die Auswertung der beiden magneto-resistiven Messungen liefert bei  $\sim 60\%$  der FaDu-Analyten die Ausbildung eines 5-Peak-Signalmusters. Mit den gewählten GMR-Widerstandsabständen  $d_{para1}$  von  $10 \mu\text{m}$  und einem relativ geringen Abstand  $d_{para2}$  von  $40 \mu\text{m}$  der zwei Paare zueinander überlagern sich Peak 3 und Peak 4 des charakteristischen 6-Peak-Patterns zu einem dominanten Signalanteil. Abbildung 7.15 b zeigt die TOF-Analyse über die Halbwellen 3 und 4, bei der sich die biologischen Analyte, zwischen den zwei GMR-Paaren befinden (vgl. Schaubild Abbildung 7.15 b). Die Majorität der FaDu-Population liefert eine Laufzeit  $t_{34}$  von Null, während ein geringer Teil eine Verteilung um  $0.015 \text{ s}$  zeigt. Die Impedanzmessung der FaDu-Analyte in Abbildung 4.8 bestätigt eine Population mit einem hydrodynamischen Durchmesser  $< 10 \mu\text{m}$ . Die im Durchmesser um einen Faktor 2.5 kleineren  $\text{CD4}^+$ -Zellen bilden in 100% der detektierten Events ein charakteristisches 6-Peak-Signalmuster aus und

liefern eine TOF von 40 ms. Bei geeigneter Anpassung der GMR-Abstände  $d_{para1}$  und  $d_{para2}$  an die Analytdurchmesser kann eine vollständige Trennung der biologischen Zellproben über die Auswertung der charakteristischen Signalfolge erreicht werden.



**Abbildung 7.16 Vergleich der magnetisch ermittelten Analytgeschwindigkeiten der FaDu-Tumorzellen in PBS und EDTA-Vollblut unter konstanten Bedingungen ( $Q=0.25 \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $H_{ext}=120 \text{ mT}$ ,  $d_{GMR}=22 \mu\text{m}$ ).**

Abbildung 7.16 vergleicht die Ausbildung der magnetisch ermittelten Analytgeschwindigkeiten von FaDu-Tumorzellen in PBS sowie EDTA-Vollblut, wobei die Messungen mit einem Sensitec GMR-Multilagensystem auf einer diagonalen GMR-Brücke unter konstanten Bedingungen ( $Q=0.25 \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $H_{ext}=120 \text{ mT}$ ,  $d_{GMR}=22 \mu\text{m}$ ) durchgeführt werden. Dabei ist eine Zunahme der mittleren Analytgeschwindigkeit um  $\sim 80\%$  von  $434 \mu\text{m s}^{-1}$  (PBS) auf  $793 \mu\text{m s}^{-1}$  (Vollblut) zu beobachten. Erwartungsgemäß bewegen sich die Zellen in der viskosereren Vollblutprobe (Hämatokrit: 46.2%) mit einer höheren Geschwindigkeit. Verglichen mit der errechneten, theoretischen Zellgeschwindigkeit für einen Kanalquerschnitt von  $200 \times 700 \mu\text{m}$  in Abbildung 7.13 b orientieren sich die FaDu-Zellen in der Newtonschen Flüssigkeit PBS an der mittleren Analytgeschwindigkeit  $v_{theo1}$ . Die Tumorzellen in der Vollblutsuspension als Nicht-Newtonsche Flüssigkeit folgen dem Trend der vermessenen Referenzanalyten in Vollblut und bilden annähernd die Maximalgeschwindigkeit  $v_{theo2}$  aus.

Im Gegensatz zur Messung mit dem parallelen GMR-Layout in Abbildung 7.15 a liefert die diagonale Ausführung eine signifikant schärfere Verteilung der Analytgeschwindigkeit, was auf Interferenzeffekte der Signalantworten der Einzelwiderstände beim parallelen Design zurückzuführen ist. Die Messergebnisse demonstrieren, dass alternativ zur optischen Durchflusszytometrie eine magnetoresistive Zelltestung mit superparamagnetisch markierten Zellen im Vollblut ohne *Sheath Flow* vorgenommen werden kann.

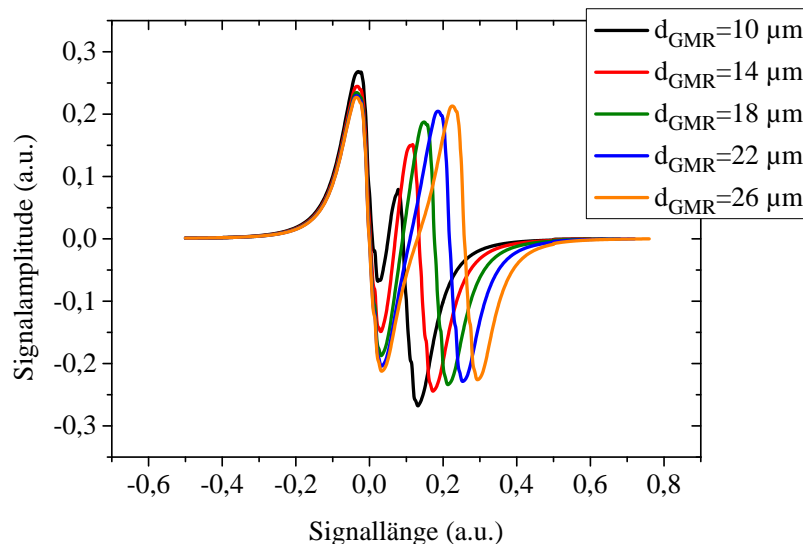
## 8. Time-of-Flight Signalanalyse

Zur Auswertung der magnetoresistiven Messungen werden spezifische Signalanteile analysiert, basierend auf der charakteristischen Signatur einer Einzelzelle aus der magnetischen Laufzeit über die zwei GMR Sensoren der Brücke. Über die analytisch ermittelte Zellgeschwindigkeit können die Daten zusätzlich vom Zeitbereich in den Wegbereich transformiert werden. Im Zuge der Masterarbeit von M. Reisbeck wurde eine Vorauswahl und Bewertung der signalbeschreibenden Parameter durchgeführt [132]. Eine multivariante Analyse der Datensätze ermöglicht die Diskriminierung mehrerer Analytpopulationen mit unterschiedlichen Durchmessern im Zuge einer magnetischen Messung. Die Trenneffizienz von Analyte mit unterschiedlichen Durchmessern in ionischem Puffer und stabilisiertem Vollblut wird evaluiert und mit der Streulichtmessung eines optischen Durchflusszytometers verglichen. Die Einführung eines magnetischen Durchmessers, errechnet aus den Streufeldmaxima im Wegbereich, erlaubt die präzise Ermittlung der Größenverteilung, respektive des Zellvolumens einer Analytpopulation, unter Annahme einer kugelförmigen Morphologie. Die direkte Proportionalität des magnetischen zum hydrodynamischen Zelldurchmesser wird im Vergleich mit der Impedanzmessung eines Coulter Counters demonstriert.

### 8.1 Signalparameter

Die Differenzierung verschiedener Analytpopulationen über eine TOF-Betrachtung wird ausschließlich mit dem diagonalen Sensordesign durchgeführt. Die parallele Auslegung der Brücke, mit dem Ziel zwei dominante Peaks über eine additive Signalüberlagerung zu formen, generiert auf Grund dieser Signalüberlagerung eine Unschärfe in der Berechnung des Zelldurchmessers. In einer Scilab-Simulation wird der Einfluss des Analytdurchmesser sowie der Abstand der magnetoresistiven Sensorelemente auf die Ausbildung des 4-Peak-Signalmusters bei Überstreichen einer superparamagnetisch markierten Zelle analysiert. Die Darstellung der simulierten Sensorantworten eines, in seiner Außenhülle homogen magnetisierten Analyten mit einem hydrodynamischen Durchmesser  $d_{hydro}$  von 12  $\mu\text{m}$ , bei variierenden Abständen der Sensorelemente  $d_{GMR}$ , veranschaulicht die Ausbildung des mittleren Teilstücks der Signalfolge (Abbildung 8.1). Analog dazu wird die Signalformung durch die Ausdehnung des Dipolfeldes bei unterschiedlichen Analytdurchmessern und konstantem  $d_{GMR}$  beeinflusst.

Zur Diskriminierung verschiedener Analytdurchmesser können bei ausreichendem Sensorabstand ( $d_{GMR} > 22 \mu\text{m}$  bei  $d_{hydro} = 12 \mu\text{m}$ ) die Signalanteile ohne Signalüberlappung über einen TOF-Auswertung analysiert werden. Die Auswahl signifikanter Signalanteile ermöglicht in einem zweiten Ansatz, bei geeignetem  $d_{GMR}$  eine Trennung der Analytpopulationen über die vom Durchmesser abhängige magnetische Signalform.

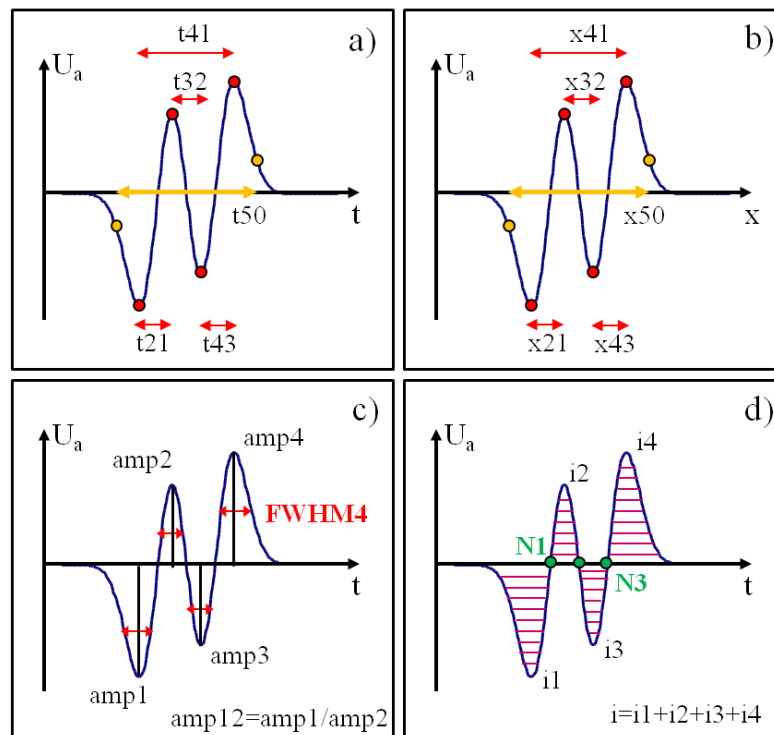


**Abbildung 8.1** Scilab-Simulation der Signalantwort eines  $12 \mu\text{m}$  Referenzbeads bei Überstreichen einer diagonalen GMR-Brückenordnung mit variierenden Abständen der aktiven Sensorelemente.

Grundgerüst der Laufzeitanalyse sind die zeitlichen Differenzen der Peakamplituden,  $t_{21}$  und  $t_{43}$ , die den Signalverlauf über das erste bzw. zweite magnetoresistive Element bestimmen sowie  $t_{41}$ , dass die Laufzeit zwischen den beiden äußeren Peaks definiert (Abbildung 8.2 a). Zusätzlich wird die zeitliche Ausdehnung  $t_{32}$  des mittleren Signalteils errechnet, die im Gegensatz zu  $t_{21}$ ,  $t_{43}$  und  $t_{41}$ , bei größeren Zelldurchmessern die Einflüsse durch ansteigende Fließgeschwindigkeit und zunehmende Ausdehnung des Dipolfeldes aufaddiert. Zur Bewertung der Gesamtlaufzeit eines Signals  $t_{50}$  werden die Wendepunkte der Steigungen als Grenzen für die Signallaufzeit über die zweite Ableitung der beiden äußeren Signalfanken im Zeitbereich definiert, da eine exakte Trennung von Grundrauschen und flach auslaufender Signalantwort nicht möglich ist. Zusätzlich zu den zeitlichen Differenzen der Peaks im Signal werden Amplitudenwerte der 4 Einzelpeaks  $amp1 - amp4$  und die Halbwertsbreiten  $FWHM1 - FWHM4$  als signifikante Signalparameter gewählt (Abbildung 8.2 c).

Für die Berechnung des Zelldurchmessers ist ein Vergleich der TOF-Analysen bei Messungen mit unterschiedlichen Strömungsgeschwindigkeiten nicht möglich. Die

Laufzeiten werden dazu über die analytisch ermittelte Zellgeschwindigkeit in Wegstrecken umgerechnet (Abbildung 8.2 b). Die angegebenen Werte im Wegbereich sind dabei unabhängig vom Volumenstrom und hängen lediglich von Analytdurchmesser und Sensorabstand ab. Theoretisch sollten selbst rheologische Veränderungen die Berechnung des Analytdurchmessers nicht beeinflussen, da *in-situ* für jedes Event eine Fließgeschwindigkeit errechnet wird. Darüber hinaus wird das Gesamtsensorintegral über das Signalmuster sowohl im Zeitbereich  $i$ , als auch im Wegbereich  $ix$  angegeben, wobei beide Parameter eine Differenzierung von Zellpopulationen mit signifikant abweichenden Signalamplituden ermöglichen (Abbildung 8.2 d). Somit stellt das Gesamtintegral eine ideale Grundlage zur Differenzierung von Markierungsdichten dar.



**Abbildung 8.2** Beschreibung der charakteristischen Signalanteile: Laufzeitbetrachtung im Zeitbereich (a); Transformation der TOF in den Wegbereich (b); Analyse der Halbwellen über Amplitudenwerte, Halbwertsbreiten (c) und Integralanteile (d).

Um das Integral unabhängig von der Signalamplitude zu betrachten, wird mit Hilfe einer Normierung der Events jede Halbwelle des Signalverlaufs auf einen konstanten Wert von 1 V skaliert.

$$ixna = v * \sum_{n=1}^4 \frac{i(f)_n}{amp_n} \quad (8.1)$$

Damit wird eine geringere Variation der Signalmuster innerhalb einer Population erreicht. Eine alternative Variante berücksichtigt ausschließlich die normierten äußeren Teilintegrale,  $i1$  und  $i4$ , transformiert in den Wegbereich, die keine Signalüberlappung erfahren.

$$i14xna = v * \left( \frac{i(f)_1}{amp_1} + \frac{i(f)_4}{amp_4} \right) \quad (8.2)$$

Zusätzlich werden charakteristische Signaleigenschaften ausgewertet, die bei geeigneter Anordnung der Einzelelemente der Wheatstonebrücke im Verhältnis zu den Analytdurchmessern den Grad der Signalüberlappung der alternierenden mittleren Peaks der Signatur beschreiben. Ein erster Ansatz zur Differenzierung von Zellpopulationen setzt die Amplitudenwerte  $amp1$  und  $amp2$  des ersten GMR Elements und  $amp3$  und  $amp4$  des zweiten GMR-Elements ins Verhältnis ( $amp12$  und  $amp34$ ). Alternativ werden die Integralanteile  $i12$  bzw.  $i34$  verrechnet, wobei sich die inneren Peaks bei konstantem  $d_{GMR}$  indirekt proportional zum Analytdurchmesser entwickeln. Analog dazu kann das Gesamtintegral im Verhältnis zum Summenintegral der inneren Peaks gesetzt werden (vgl. Abbildung 7.4 b).

$$i14mni = \frac{i(f)_1 + i(f)_4}{2 * i(f)} \quad (8.3)$$

Als Kontrollgrößen zur Bewertung der Messqualität werden die äußeren und die inneren Halbwellen bezüglich Amplitude ( $amp14$ ,  $amp23$ ) und Integral ( $i14$ ,  $i23$ ) ins Verhältnis gesetzt. Diese Parameter erlauben eine Charakterisierung der Homogenität der Magnetisierung über den gesamten Analyten. Der Parameter  $amp14$  bietet darüber hinaus die Möglichkeit, eine eventuelle Inhomogenität der Sensitivität der beiden aktiven GMR Elemente durch Prozessbedingungen oder Bauteilausfälle festzustellen. Zusätzlich können unter Betrachtung des Gesamtintegrals  $i$  magnetische Analyte diskriminiert werden, die die GMR-Widerstände in Randbereichen überstreichen, wodurch nur Anteile des Dipols die aktive magnetoresistive Sensorfläche beeinflussen. Mit der Relation der Zeitdifferenzen  $t13$  und  $t24$  kann zudem eine pulsationsfreie, und homogene Bewegung des magnetischen Analyten über den Sensorbereich ermittelt werden. Falsch erkannte Peaks in einem Signalmuster können mit  $t31/t42$  identifiziert und ausgeschlossen werden.

**Tabelle 8-1** Aufstellung der ausgewählten Signalcharakteristika, geordnet nach der Einflussgröße.

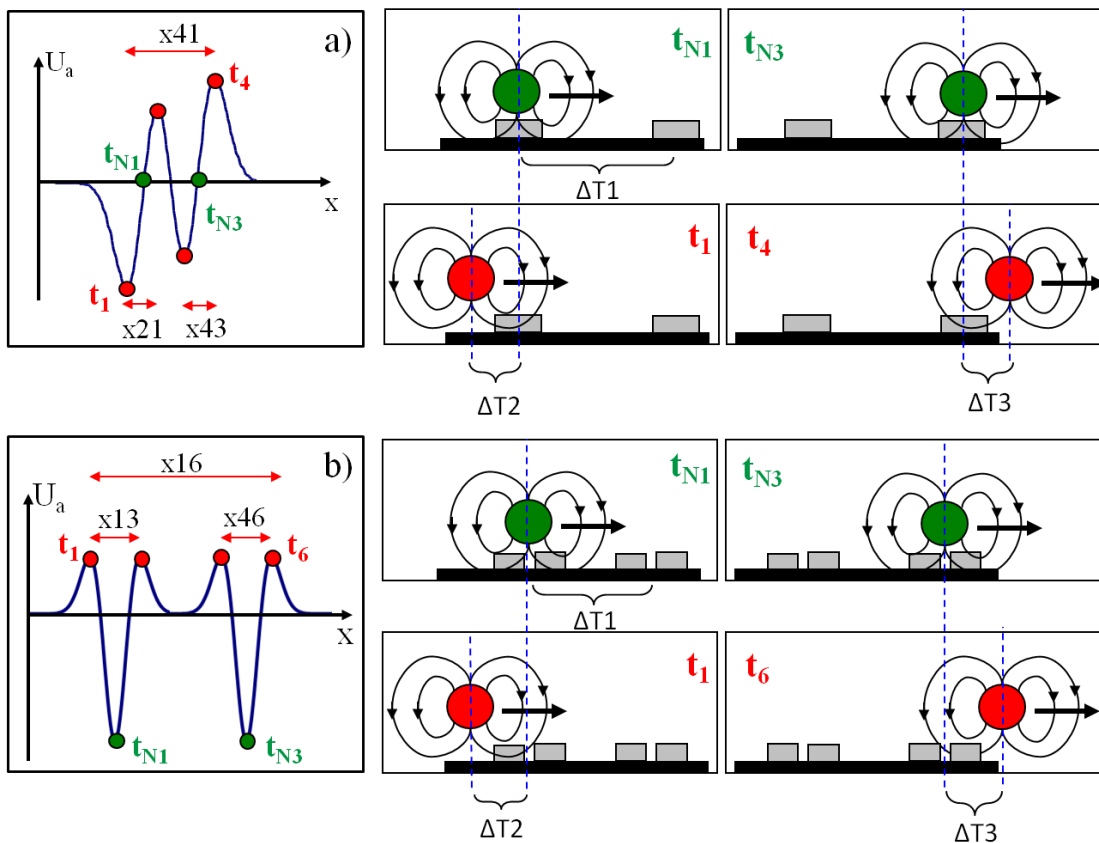
<i>Time-of-Flight</i> Parameter		Alternative Einflussgrößen		
Zeitbereich	Wegbereich	Signalform	Signalintensität	Kontrollparameter
$t_{21}$	$x_{21}$	$ix_{na}$	$amp_{1-4}$	$amp_{14}$
$t_{43}$	$x_{43}$	$i_{14xna}$	$i_{1-4}$	$amp_{23}$
$t_{32}$	$x_{32}$	$i_{14mni}$	$FWHM_{1-4}$	$i_{14}$
$t_{41}$	$x_{41}$	$i_{12}$		$i_{23}$
$t_{50}$	$x_{50}$	$amp_{12}$		$t_{31}/t_{42}$
$v$				

## 8.2 Magnetischer Zelldurchmesser

Zur präzisen Ermittlung der Größenverteilungen der Analytpopulationen wird sowohl für das diagonale 4-Peak-Signal als auch für die 6-Peak-Signatur des parallelen Layouts ein magnetischer Durchmesser definiert. In beiden Ausführungen werden charakteristische TOF-Signalanteile über die ermittelte Analytgeschwindigkeit in den Wegbereich transformiert. Im Fall des diagonalen Wheatstone Layouts wird die Zellbewegung zwischen erstem und zweitem Signalpeak ( $x_{21}$ ), bei denen die maximale Streufeldkomponente in positive bzw. negative X-Richtung auf das erste magnetoresistive Element wirkt, relativ zum Zellkern errechnet. Analog dazu kann die Zellbewegung  $x_{43}$  am zweiten GMR-Sensor bestimmt werden. Die Betrachtung über beide aktive Widerstandselemente liefert nach Auswertung der zurückgelegten Distanz zwischen Peak 1 und Peak 4 und Abzug des Abstandes der GMR-Elemente  $d_{GMR}$  mit  $x_{41}$  eine dritte Kontrollgröße. Abbildung 8.3 a beschreibt die Ermittlung des magnetischen Zelldurchmessers  $x_{41}$ , der über die Summe der TOF-Anteile  $\Delta T_2$  und  $\Delta T_3$  definiert ist und mit der Analytgeschwindigkeit in den Wegbereich umgewandelt wird.

Aus dem parallelen Brückenlayout mit vier GMR-Elementen, angeordnet zu zwei Paaren mit je zwei Sensorelementen, kann der magnetische Durchmesser ebenfalls aus drei Signalanteilen errechnet werden. Analog zum diagonalen Design werden die Zellbewegungen aus den jeweiligen Zellpositionen bei maximaler Streufeldkomponente über Peak 1 und Peak 3 bzw. Peak 4 und Peak 6 ermittelt und mit der Geschwindigkeit verrechnet. Aus der Subtraktion der Distanz der Einzelemente innerhalb der Paare resultieren die magnetischen Durchmesser  $x_{13}$  und  $x_{46}$ . Der Parameter  $x_{16}$  wird über

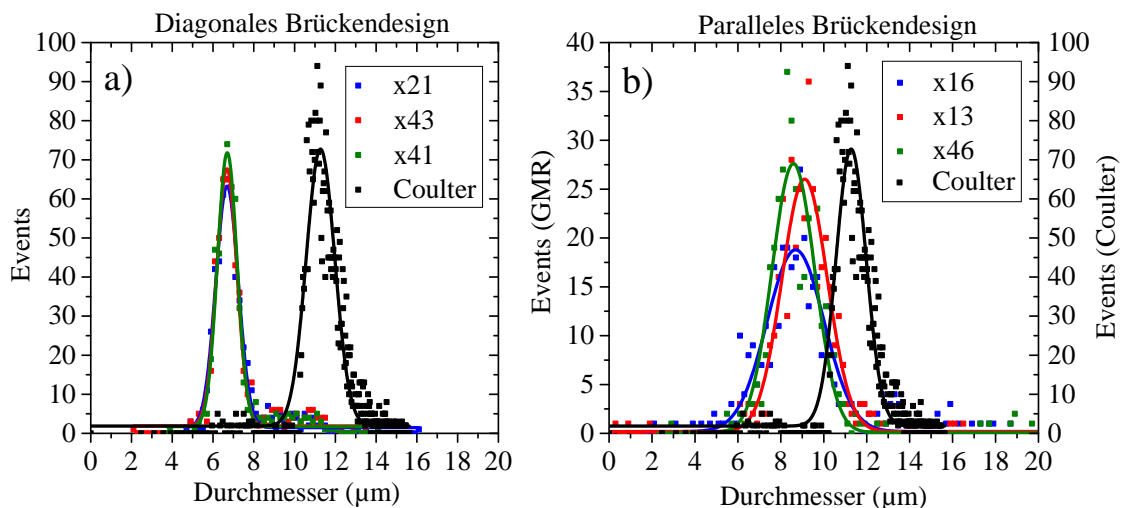
die Zellbewegung zwischen Peak 1 und Peak 6 nach Abzug des Abstandes der Außenwiderstände der gesamten Anordnung bestimmt (Abbildung 8.3 b). Unter Annahme eines kugelförmigen Analyten erlaubt die Einführung eines magnetischen Durchmessers zusätzlich die Ermittlung des Volumens. Grundvoraussetzung für den Vergleich bzw. die Diskriminierung verschiedener Analytpopulationen über den magnetischen Durchmesser ist die magnetische Anreicherung der Analyte an der Substratoberfläche. Ohne definierte Abstandskontrolle – ein Abrollen der Zellen muss sichergestellt sein - zeigt die Bestimmung des Durchmessers einer Analytpopulation über die Ausbildung des Dipolfeldes eine starke Variation und Unschärfe in der Verteilungsbreite, die keine Rückrechnung auf den hydrodynamischen Durchmesser erlaubt.



**Abbildung 8.3** Definition eines magnetischen Zelldurchmessers ermittelt aus den charakteristischen magnetischen Signaturen. Über die Berechnung der Analytgeschwindigkeit, aus der Zeitdifferenz  $t_{N2}-t_{N1}$  und dem bekannten Abstand der GMR-Elemente, werden ausgewählte TOF-Signalanteile in den Wegbereich transformiert (grüne Schaubilder). Aus dem 4-Peak-Signal des diagonalen Wheatstone Layouts werden so die Wegdifferenzen  $x_{21}$ ,  $x_{43}$  und  $x_{41}$  bestimmt, wobei der Parameter  $x_{41}$  die Subtraktion des Abstandes der beiden magnetoresistiven Sensoren erfordert (a). Die 6-Peak-Signatur der parallelen Wheatstone Anordnung liefert nach Abzug der Abstände der Einzelemente der Paare ( $x_{13}$ ,  $x_{46}$ ) bzw. nach Abzug des Abstandes der äußeren GMR-Elemente des Gesamtsystems ( $x_{16}$ ) ebenfalls drei magnetische Durchmesser (b).



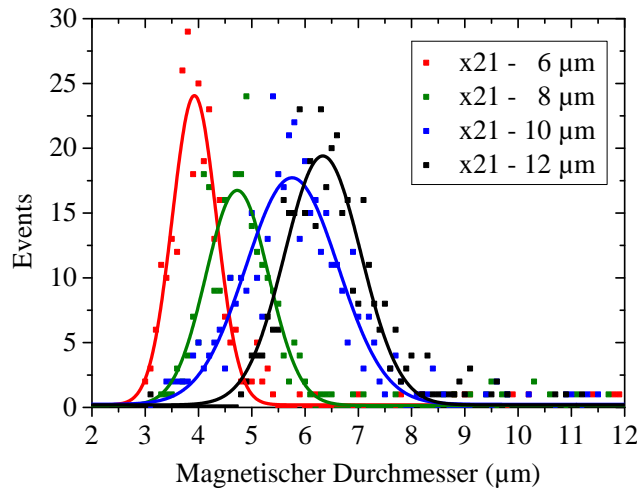
Die Auswertung der charakteristischen Signale einer magnetischen Erfassung von  $12\ \mu\text{m}$  Referenzanalyten mit einer diagonalen Sensoranordnung ( $d_{GMR}=18\ \mu\text{m}$ ) und einem GMR-Multilagensystem des IPHT liefert einen mittleren magnetischen Durchmesser von  $6.7\ \mu\text{m}$  (Abbildung 8.4 a). Im Vergleich zum mittleren hydrodynamischen Durchmesser von  $11.3\ \mu\text{m}$ , mittels Impedanzmessung, ist eine Differenz von knapp 40% zu beobachten. Folglich liegt das maximale Streufeld eines superparamagnetisch markierten Analyten innerhalb des Analyten, was die Erkenntnisse aus Kapitel 6.3 bestätigt. Die drei definierten Signalanteile  $x21$ ,  $x43$  und  $x41$  zur Ermittlung des magnetischen Durchmessers zeigen mit einem durchschnittlichen Bereich von  $6.68\text{-}6.70\ \mu\text{m}$  eine präzise Übereinstimmung. Mit einer mittleren Halbwertsbreite von  $1.23\ \mu\text{m}$  werden sogar schärfere Verteilungskurven erreicht als bei der Methode nach Coulter ( $1.35\ \mu\text{m}$ ).



**Abbildung 8.4** Gegenüberstellung des hydrodynamischen Durchmessers aus einer Impedanzmessung mit den magnetisch ermittelten Durchmessern unter Verwendung eines diagonalen (a) und parallelen (b) Sensordesigns (IPHT GMR-Stack,  $1.4\ \% \text{ mT}^{-1}$ ).

Die magnetische Detektion der  $12\ \mu\text{m}$  Referenzanalyte mit einem parallelen Wheatstone Design zeigt eine Schwankung der drei Durchmesserparameter  $x13$ ,  $x46$  und  $x16$  von  $0.53\ \mu\text{m}$  ( $\sim 6\%$ ), bei einem Mittelwert von  $8.8\ \mu\text{m}$ . Nachteil der parallelen Ausführung ist der geringe Abstand der GMR-Einzelemente von  $12\ \mu\text{m}$ , der bereits bei Ausbildung von Peak 1 zu einer Beeinflussung beider GMR-Elemente des ersten Paares führt und in Signalinterferenzen resultiert. Analog tritt Signalüberlappung bei Ausbildung aller Peaks des parallelen Designs auf, was zu einer Unschärfe bei der Bestimmung des magnetischen Durchmessers führt. Im Gegensatz dazu zeigt die magnetische Messung der  $12\ \mu\text{m}$  Analyte mit der diagonalen Ausführung bei einem  $d_{GMR}$  von  $18\ \mu\text{m}$  ( $K=0.66$ ) nahezu keine Überlappungen der Einzelsignale. Selbst bei

Messung größerer Analyte bietet das diagonale Layout mit dem Parameter  $x41$  eine stabile Größe, deren Ausbildung ausschließlich von jeweils einem GMR-Element abhängt. Dadurch kann eine präzise Durchmesserbestimmung auch bei Signalüberlagerungen der beiden mittleren Signalpeaks garantiert werden.



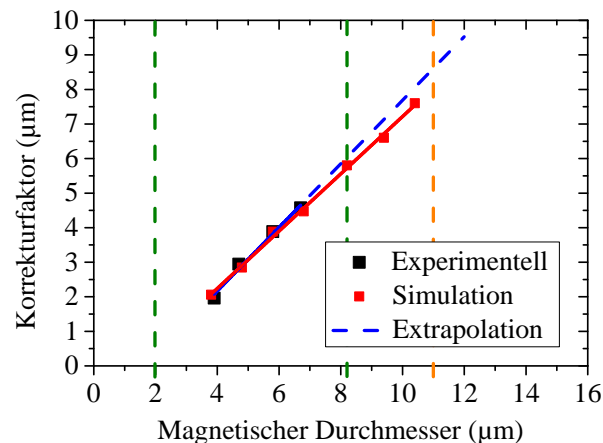
**Abbildung 8.5** Verteilungen der magnetischen Durchmesser der 6, 8, 10 und 12  $\mu\text{m}$  Referenzanalyte. Bei der Messung mit einem diagonalen Sensorlayout ( $d_{\text{GMR}}=22 \mu\text{m}$ ) wird eine Wiederfindungsrate  $>90\%$  über Variation von  $Q$ , bei einem konstanten  $H_{\text{ext}}$  von 100 mT eingestellt.

Abbildung 8.5 zeigt die magnetische Durchmesserverteilung der 6, 8, 10 und 12  $\mu\text{m}$  Referenzanalyte unter Verwendung eines GMR-Vielschichtsystems von Sensitec und eines diagonalen Sensorlayouts mit einem Abstand der aktiven GMR-Elemente von 22  $\mu\text{m}$ . Über die Variation des Volumenstroms bei einem konstanten  $H_{\text{ext}}$  von 100 mT wird für jede Population eine Wiederfindungsrate  $>90\%$  eingestellt. Tabelle 8-2 stellt die Verteilungen der hydrodynamischen und magnetischen Durchmesser aus Coulter und GMR-Messungen gegenüber.

**Tabelle 8-2** Gegenüberstellung des hydrodynamischen Durchmessers der Referenzpartikel ermittelt über Coulter Messungen (vgl. Tabelle 4-2) mit den magnetischen Durchmessern aus den magnetoresistiven Messungen (Sensitec GMR-Stack;  $1.9 \% \text{ mT}^{-1}$ ).

Beadtyp	Beckman Coulter Z2		Scepter Coulter		GMR	
	Durchmesser ( $\mu\text{m}$ )	$c_v$ (%)	Durchmesser ( $\mu\text{m}$ )	$c_v$ (%)	Durchmesser ( $\mu\text{m}$ )	$c_v$ (%)
<b>6</b>	5.9	2.7	5.4	6.9	3.9	10.4
<b>8</b>	7.6	3.3	7.2	6.2	4.7	12.2
<b>10</b>	9.7	4.9	8.9	6.8	5.8	14.9
<b>12</b>	11.3	6.2	10.6	7.9	6.6	11.2

In erster Näherung werden zur Umrechnung von hydrodynamischem zu magnetischem Analytdurchmesser die experimentell ermittelten Werte  $d_{mag}$  gegen einen Korrekturwert, die Differenz des magnetischen Durchmessers zu den Beckman Coulter Ergebnissen, aufgetragen (Abbildung 8.6). Auf Grund der herstellerbedingten Limitation der Referenzanalyse auf einen Maximaldurchmesser von  $12\ \mu\text{m}$  liegen nur vier experimentelle Datenpunkte vor, durch die eine lineare Ausgleichsgerade gelegt und extrapoliert wird. (blaue, gestrichelte Linie). Scilab-Simulationsdaten des magnetischen Durchmessers über einen hydrodynamischen Durchmesserbereich von  $6\text{--}18\ \mu\text{m}$  bestätigen die vier magneto-resistiv ermittelten Messwerte mit Abweichungen  $<2.5\%$ . Die grünen, vertikalen Geraden deuten die Limitationen der magnetischen Durchmesserbestimmung bei gewählten Bedingungen an. Die Stegbreite der GMR-Widerstände von  $2\ \mu\text{m}$  definiert eine feste Untergrenze der Analytdimension, die über eine TOF-Messung aufgelöst werden kann.



**Abbildung 8.6** Korrekturfaktor zur Bestimmung des hydrodynamischen Analytdurchmessers aus den experimentell ermittelten Werten der  $6\text{--}12\ \mu\text{m}$  Referenzanalyte. Die Extrapolation der Messdaten wird mit simulierten Werten verglichen. Die grüne Begrenzung bei  $2\ \mu\text{m}$  gibt die Limitation der Durchmesserbestimmung durch die Breite der GMR-Widerstände. Bei hohen Durchmessern ist mit gewähltem  $d_{GMR}$  von  $22\ \mu\text{m}$  ab einem  $K > 0.66$  (grüne, gestrichelte Linie) Signalüberlappung zu beobachten, die bis zu einem  $K \sim 0.85$  (orange, gestrichelte Linie) einen Fehler  $<5\%$  bei der magnetischen Durchmesserbestimmung verursacht.

Die Obergrenze einer präzisen Laufzeitanalyse wird im Fall des diagonalen GMR-Layouts vom Abstand der aktiven GMR-Elemente bestimmt und ist Indikator für eine Überlagerung der magnetischen Signalantworten. Bei vorliegendem  $d_{GMR}$  von  $22\ \mu\text{m}$  treten ab einem  $d_{hydro}$  von  $15\ \mu\text{m}$  ( $K > 0.66$ ) Überlagerungen der magneto-resistiven Einzelsignale auf, die eine Bestimmung der Analytgeschwindigkeit und des Analytdurchmessers beeinflussen. Im Zuge der Diplomarbeit von A. Wiemhöfer wurde über eine Comsol-Simulation gezeigt, dass der Fehler der Durchmesserbestimmung bis

zu einem  $K \sim 0.85$  (orange, gestrichelte Linie) kleiner 5% ist [133]. Die Grenze in Abbildung 8.6 für ein  $d_{hydro}$  von  $15 \mu\text{m}$  wird graphisch über die Ausgleichsgerade der Simulationsdaten (rot) ermittelt und auf einen magnetischen Durchmesserwert von  $8.2 \mu\text{m}$  gesetzt. Der Vergleich der extrapolierten Messdaten mit den Simulationsergebnissen zeigt eine Aufspaltung der Ausgleichsgeraden, die bei einem  $d_{mag}$  von  $10.4 \mu\text{m}$  in einer Differenz des Korrekturfaktors von  $0.5 \mu\text{m}$  resultiert.

### 8.3 Benchmark von optischem und magnetischem Durchflusszytometer

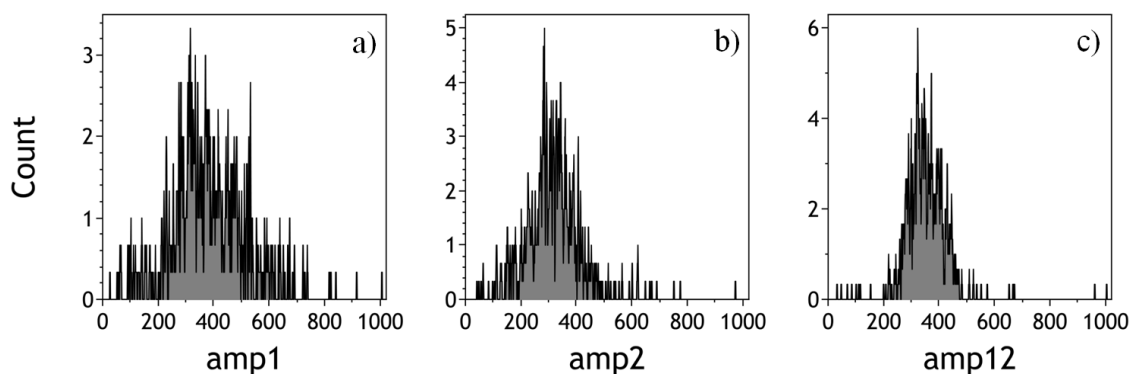
Zunächst wird anhand von Referenzmessungen bewertet, ob eine Diskriminierung von Beadpopulationen unterschiedlicher Durchmesser mit den in Kapitel 8.1 gewählten Parametern durchführbar ist. Dabei werden einzelne oder gemischte Referenzanalyte ( $6\text{-}12 \mu\text{m}$ ) in einer Puffersuspension vermessen. Die Micromod Partikelsuspensionen verschiedener Durchmesser werden laut Hersteller auf eine Konzentration von  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  bei konstantem Volumen von  $10 \text{ mL}$  eingewogen, was zu einer Variation der Partikelanzahl pro Volumen führt (vgl. Kapitel 4.1, Tabelle 4-2), die bei der Herstellung der Messprobe berücksichtigt werden muss. Der diskrete Messaufbau mit Spritzenpumpe und PDMS-Fluidik führt bei den geringen Fließgeschwindigkeiten zu hohen Verlusten entlang des Schlauchs und im Einlassbereich zum Mikrofluidikkanal (vgl. Kapitel 7.1).

Bei Messungen mit verschiedenen Analytdurchmessern, die herstellerbedingte Variationen im magnetischen Moment aufweisen, bedarf es einer präzisen Einstellung der magnetophoretischen Führung über das externe Magnetfeld und die Spritzengeschwindigkeit. Zudem bilden die Referenzbeads eine steigende Fließgeschwindigkeit mit zunehmenden Durchmessern im laminaren Fluss aus. Bei Kombination der  $3, 6$  und  $12 \mu\text{m}$  Analyte über einen GMR-Chip, muss ein Kompromiss bei der Wahl dieser Parameter eingegangen werden, da kein optimales Gleichgewicht zwischen der magnetophoretischen Haltekraft und Fluidreibung für alle Populationen gleichzeitig eingestellt werden kann. Unter den gewählten Messbedingungen wird eine niedrige Wiederfindungsrate für  $3 \mu\text{m}$  Beads (höchste Magnetisierung und geringste Fließgeschwindigkeit) und eine moderate Anreicherung von  $12 \mu\text{m}$  Partikel (niedrige Magnetisierung und höchste Fließgeschwindigkeit) beobachtet.

In einem ersten Ansatz werden  $6 \mu\text{m}$  und  $12 \mu\text{m}$  Referenzanalyte in einer Verdünnung von  $1:8,000$  bzw.  $1:10,000$  in PBS aufbereitet. Bei einem konstanten  $H_{ext}$  von  $100 \text{ mT}$  und einer Ni-Schichtdicke von  $100 \text{ nm}$  wird die Spritzengeschwindigkeit nach optischer

Kontrolle der Führungseigenschaften auf  $0.6 \mu\text{L s}^{-1}$  gesetzt. Mit einem Abstand der aktiven Widerstandselemente von  $18 \mu\text{m}$  werden unter konstanten Messbedingungen mindestens 400 Einzelereignisse gesammelt, um eine statistische Evaluierung vornehmen zu können. Bei der Auswertung der Messstreams werden die Auswahlkriterien zur Signalerkennung jeweils an die dominante Analytpopulation angepasst. Die  $12 \mu\text{m}$  Partikel mit der höchsten Geschwindigkeit im laminaren Fluss und der daraus resultierenden höchsten Frequenzkomponente bestimmen die Grenzfrequenz des FIR-Filters, die hier auf  $200 \text{ Hz}$  gesetzt wird. Die Wahl des *Timers* zur Definition der maximalen Signallänge orientiert sich an der  $6 \mu\text{m}$  Population mit der niedrigsten Partikelgeschwindigkeit und führt zu einer ausreichenden Signaldauer von 800 Datenpunkten pro Event. Die Schwellwerte zur Detektion der Sprunghöhen müssen an alle Analyte gleichzeitig angeglichen werden, während der *Small Threshold* Wert auf die  $12 \mu\text{m}$  Population eingestellt wird, die das größte Verhältnis von Analytdurchmesser zu Widerstandsabstand besitzt.

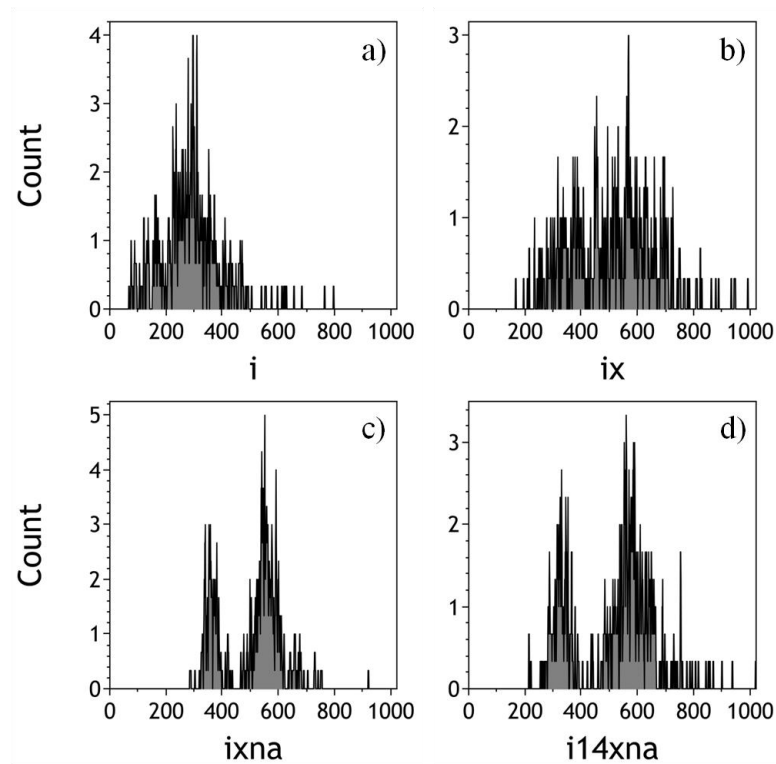
Nach Analyse der Ergebnisse und Festlegung der Grenzbedingungen zur Transformation der charakteristischen Signalparameter in das 10 bit fcs-Format verbleiben 495 Einzelereignisse. Die Diskriminierung der im Durchmesser variierenden Analytpopulationen wird mit der *Kaluza Flow Analysis* Software, über Histogramme und mehrdimensionale Dot-Plots realisiert, wodurch ein direkter Vergleich mit Daten der Streulichtmessung eines optischen Durchflusszytometers ermöglicht wird.



**Abbildung 8.7** Häufigkeitsverteilungen der Amplitudenparameter *amp1* (a), *amp2* (b) sowie *amp12* (c) der  $6 \mu\text{m}$  und  $12 \mu\text{m}$  Referenzanalyte aus dem charakteristischen diagonalen 4-Peak-Signalmuster bei einem  $d_{GMR}$  von  $18 \mu\text{m}$ .

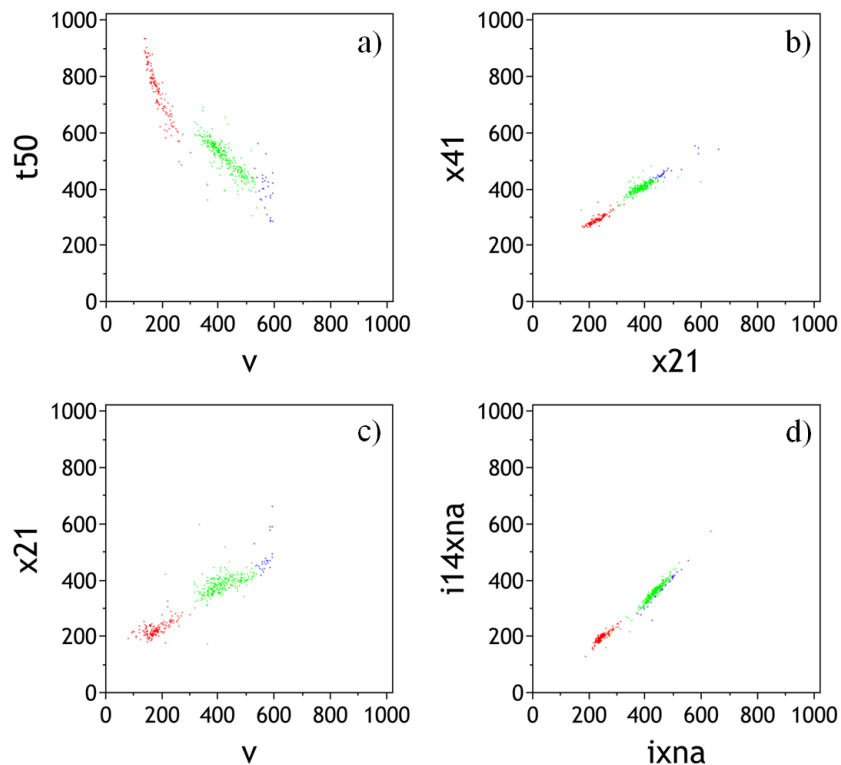
Die Betrachtung der reinen Signalamplituden in Abbildung 8.7 führt zunächst zu keiner Differenzierung der  $6 \mu\text{m}$  und  $12 \mu\text{m}$  Populationen. Selbst *amp12*, das stark vom Grad der Signalüberlappung abhängt, liefert keine Auftrennung der Populationen. Eine Simulation auf Basis der durchschnittlichen magnetischen Momente pro Partikel,

ermittelt aus einer VSM-Analyse bei gegebener GMR-Sensitivität von  $1.3 \% \text{ mT}^{-1}$ , resultiert in durchschnittlichen Signalamplituden von  $17 \mu\text{V}$  für die  $6 \mu\text{m}$  Partikel und  $12 \mu\text{V}$  für die  $12 \mu\text{m}$  Probe. Dieses herstellerbedingte Amplitudenverhältnis zwischen den Populationen wird experimentell beobachtet, jedoch werden diese Populationen durch die großen Halbwertsbreiten der Peaks für eine Diskriminierung zu stark überlagert.



**Abbildung 8.8** Gegenüberstellung der Häufigkeitsverteilung der Integrale in Zeit- (a) und Wegbereich (b) sowie der normierten Integrale  $ixna$  (c) und  $i14xna$  (d) bei magnetischer Erfassung der  $6 \mu\text{m}$  und  $12 \mu\text{m}$  Referenzanalyse mit einer diagonalen GMR-Wheatstonebrücke.

Im nächsten Schritt werden die Gesamtintegrale  $i$  im Zeitbereich und  $ix$  im Wegbereich analysiert (Abbildung 8.8 a&b). Durch die hohe Abhängigkeit von den Signalamplituden ist auch in diesem Fall keine Diskriminierung über Integrale möglich. Hingegen wird mit dem normierten Gesamtintegral  $ixna$  eine quantitative Trennung der gemessenen Analytpopulationen erreicht (Abbildung 8.8 c). Mit einer Reduzierung der Analyse auf die Integrale der äußeren Flanken  $i14xna$ , beobachtet man eine leichte Aufweitung der Verteilungen gegenüber  $ixna$ , die, trotz massiver Peaküberlagerung im Wegbereich, für eine quantitative Trennung der Populationen ausreicht (Abbildung 8.8 d). Dieses Fallbeispiel betont die herausragende Bedeutung der TOF für die magnetische Durchflusszytometrie.

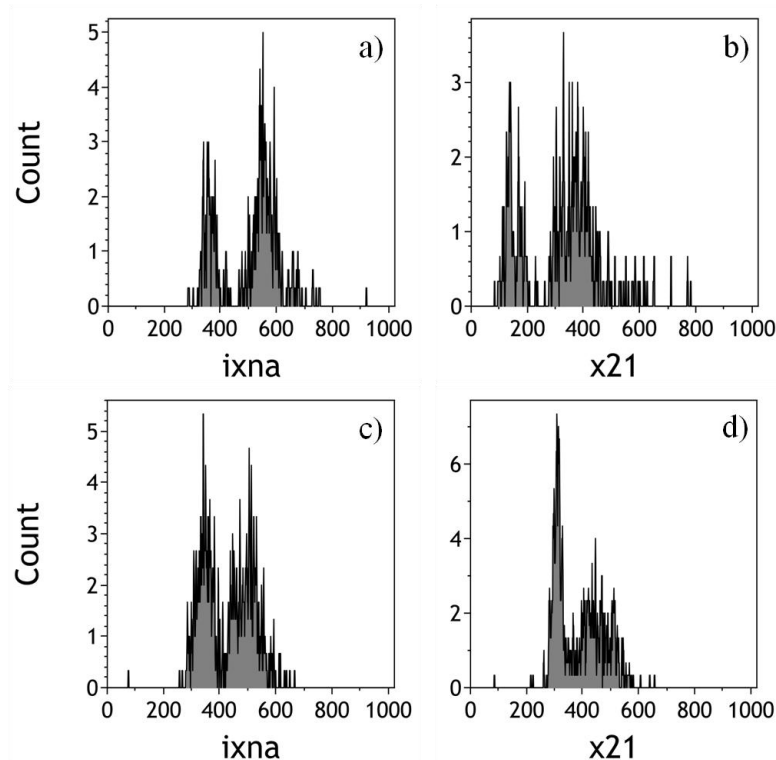


**Abbildung 8.9** Mehrdimensionale Analyse zur Diskriminierung der 6  $\mu\text{m}$  und 12  $\mu\text{m}$  Populationen der Referenzanalyte über die Kombination von TOF-Parametern im Zeitbereich (a), im Wegbereich (b) sowie über die Auftragung der normierten Integrale  $ixna$  und  $i14xna$  (d). Die Farbkodierung der Populationen wird manuell in (c) gesetzt und für die übrigen Abbildungen übernommen.

In Anlehnung an die Auswertestrategie der optischen Durchflusszytometrie wird eine vollständige Diskriminierung der Referenzanalyte über mehrdimensionale Auftragungen diverser Parameter demonstriert (Abbildung 8.9): (a) Differenzierung im Zeitbereich unter Verwendung der Analytgeschwindigkeit und der Signallaufzeit der äußeren Wendepunkte  $t50$ , (b) scharfe Trennung im Wegbereich durch die Kombination von  $x21$  und  $x41$ , (c) Gegenüberstellung der Analytgeschwindigkeit  $v$  und  $x21$  und (d) normiertes Gesamtintegral  $ixna$  gegen normiertes Integral  $i14xna$  der ersten und vierten Halbwelle. Durch das manuelle Setzen von Gates in Abbildung 8.9 c werden die einzelnen Populationen in allen Teilabbildungen auf der Basis des Gates von (c) eingefärbt.

Die roten 6  $\mu\text{m}$  Referenzpartikel stellen 35% der detektierten Signale während die grünen 12  $\mu\text{m}$  Partikel mit 60% die Majorität der gemessenen Analyte darstellen. Dieses Verhältnis an detektierten Referenzbeads spiegelt die Verluste der höher magnetisierten 6  $\mu\text{m}$  Beads bei der Magnetophorese wider. Zusätzlich werden 5% aller Signale als eigenständige blaue Population bei hoher Geschwindigkeit und großem  $x21$

identifiziert. Hierbei handelt es sich vermutlich um wenige Koinzidenzen von zwei oder mehreren  $6\ \mu\text{m}$  Analyten sowie extreme Ausreißer der  $12\ \mu\text{m}$  Referenzen mit Beaddurchmessern von bis zu  $20\ \mu\text{m}$  (vgl. Abbildung 4.2). Die Darstellung der normierten Integrale (Abbildung 8.9 d) differenziert die  $6\ \mu\text{m}$  und  $12\ \mu\text{m}$  Populationen ebenfalls, allerdings löst sich die blaue Wolke auf und ordnet sich entlang der  $12\ \mu\text{m}$  Verteilung an, einzig nachvollziehbar über die farbliche Kodierung durch das Gating in (c).



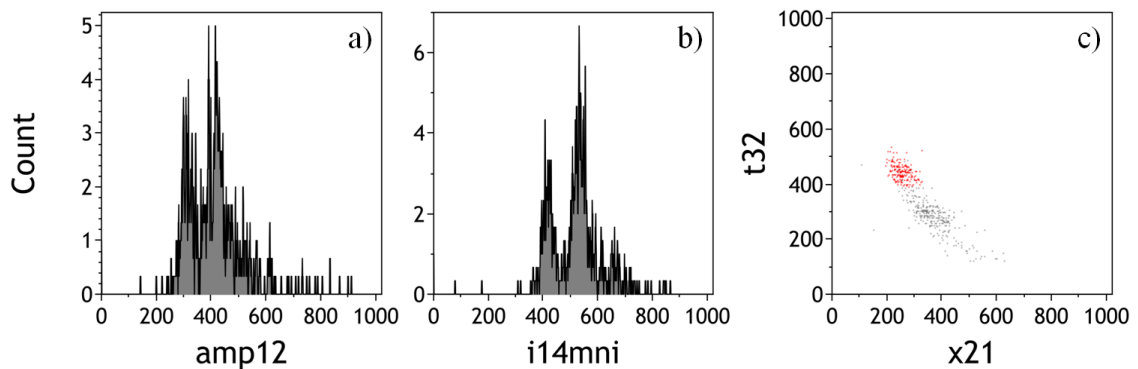
**Abbildung 8.10** Gegenüberstellung der Häufigkeitsverteilungen der charakteristischen Parameter im Wegbereich  $ixna$  und  $x21$  der  $6$  und  $12\ \mu\text{m}$  Suspension bei einem  $d_{GMR}$  von  $18\ \mu\text{m}$  (a&b) und der  $8$  und  $12\ \mu\text{m}$  Probe bei einem  $d_{GMR}$  von  $16\ \mu\text{m}$  (c&d) Die magnetoresistiven Messungen werden unter einer Variation von  $d_{Ni}$  und  $Q$  bei einem konstanten  $H_{ext}$  von  $100\ \text{mT}$  durchgeführt.

Die gleiche Auswertung zur Diskriminierung von Beadpopulationen wird mit einer Mischung von  $8$  und  $12\ \mu\text{m}$  Referenzbeads vorgenommen. Abbildung 8.10 vergleicht die zwei charakteristischen Signalparameter im Wegbereich der  $6$  und  $12\ \mu\text{m}$  Mischung mit einer magnetischen Erfassung einer  $8\ \mu\text{m}$  und  $12\ \mu\text{m}$  Partikelsuspension, die bei einem  $H_{ext}$  von  $100\ \text{mT}$  und einem, der Dicke der magnetophoretischen Strukturen von  $150\ \text{nm}$  angepasstem, höherem Volumenstrom von  $1.5\ \mu\text{L s}^{-1}$  gemessen worden ist. Zur Untersuchung einer Diskriminierung unter erschwerten Bedingungen reduziert sich der Abstand der signalformenden GMR-Widerstände um  $2\ \mu\text{m}$  auf  $16\ \mu\text{m}$ . Die Häufigkeitsverteilung über das normierte Integral zeigt auch bei der  $8\&12\ \mu\text{m}$  Probe



eine quantitative Trennung der Populationen bei geringer Peaküberlappung (Abbildung 8.10 a&c). Eine Gegenüberstellung des magnetischen Durchmessers  $x21$ , bei einer Schrittweite von 13 nm, zeigt eine signifikant scharfe Ausbildung der 8  $\mu\text{m}$  Verteilung.

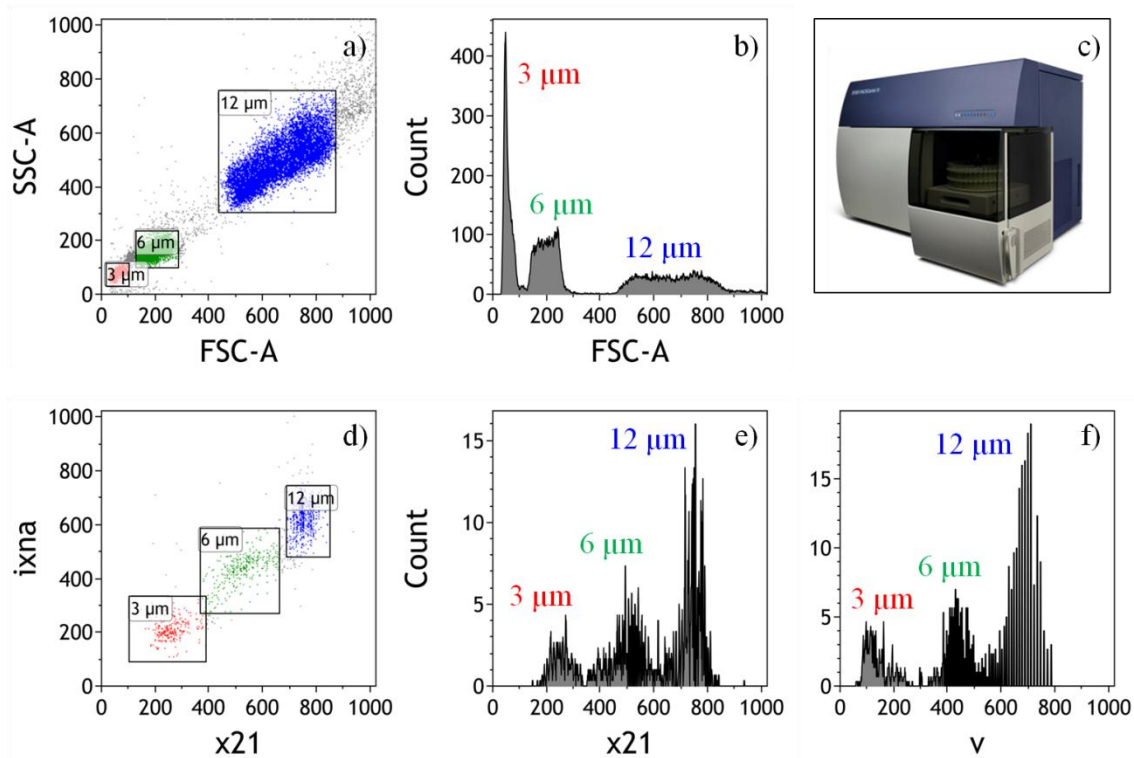
Ein alternativer Ansatz zur Diskriminierung von 8&12  $\mu\text{m}$  Analyten wird in Abbildung 8.11 dargestellt. Das Verhältnis der ersten zur zweiten Signalamplitude  $amp12$  und noch effektiver die Integralanteile der äußeren Halbwellen zum Gesamtintegral  $i14xna$  ermöglichen die Trennbarkeit auf Basis des Grads der Ausbildung der mittleren Peaks im Signalmuster. Im Vergleich zu einem Verhältnis  $K$  der Partikeldurchmesser zum Abstand der magnetoresistiven Elemente (16  $\mu\text{m}$ ) von 0.5 im Fall der 8  $\mu\text{m}$  Analyte, führt ein Faktor von 0.75 der 12  $\mu\text{m}$  Analyte zu einer höheren Interferenz der alternierenden Mittelteile. Abbildung 8.11 c zeigt schließlich eine vollständige Differenzierung über eine mehrdimensionale Betrachtung der TOF-Parameter, wobei die 8  $\mu\text{m}$  Probe rot gekennzeichnet ist und mit 198 von 492 detektierten Events knapp 40% der Gesamtkonzentration beträgt.



**Abbildung 8.11** Diskriminierung der 8 und 12  $\mu\text{m}$  Partikelsuspension auf Basis der Ausbildung des charakteristischen Signalmusters über das Amplitudenverhältnis  $amp12$  (a) und das normierte Verhältnis der äußeren Teilintegrale zum Gesamtintegral  $i14mni$  (b) bei einem  $d_{GMR}$  von 16  $\mu\text{m}$ . Die Mehrdimensionale Betrachtung der TOF-Parameter  $x21$  und  $t32$  führt zu einer vollständigen Differenzierung der Population, wobei die Wolke der 8  $\mu\text{m}$  Analyte rot eingefärbt ist.

Final werden die 3, 6 und 12  $\mu\text{m}$  Analyte separat, unter konstanten Bedingungen, in ionischem Puffer vermessen und mit dem Goldstandard der Einzelzelledetektion, einem optischen Durchflusszytometer, verglichen. Dabei werden die Analyte in einem fluidischen Kanalsystem über ein hydrodynamisches Fokussierungsprinzip mit einem *Sheath Flow* mittig angereichert und einzeln von einem Laserstrahl erfasst (vgl. Kapitel 1). Zur Charakterisierung der Probe werden Streulichtinformationen sowie die Fluoreszenzemission von spezifisch markierten Analyten ausgewertet. Die Detektion des Vorwärtstreulichts (engl. *Foward Light Scatter*, *FSC*) bei kleinen Streuwinkeln gibt

Information über die relative Zellgröße, während das Seitwärtsstreulicht (engl. *Side Scatter Light, SSC*), die orthogonale Streuung, Informationen über die Granularität der Zelle liefert [2], [7]. Analog zur magnetischen Detektion werden die einstellbaren Parameter des optischen Zytometers FACS Canto II von Beckton Dickinson vor der Differenzierung festgelegt, um konstante Bedingungen über den gewählten Durchmesserbereich zu gewährleisten. Über ein Optimum der Intensität des Laserstrahls und der Spannung der Fotomultiplier zur Detektion des Streulichts werden die Populationen der 3 und 12  $\mu\text{m}$  Referenzanalyten im dynamischen Messbereich platziert, um in einem Histogramm verglichen werden zu können. Eine ausreichend hohe Zählfrequenz bei der Messung der 12  $\mu\text{m}$  Partikel wird über eine Erhöhung der Geschwindigkeit des Hüllstroms sichergestellt, was einen Sensitivitätsverlust der optischen Detektion zur Folge hat, der auf einen Verlust der Präzision bei der Ausrichtung der Analyte im Detektionsbereich des Laserstrahls zurückzuführen ist.



**Abbildung 8.12** Benchmark von optischem und magnetischem Durchflusszytometer im Hinblick auf die Differenzierung der 3, 6 und 12  $\mu\text{m}$  Analyte bei separaten Messungen in PBS. Die optische Messung mit dem FACS Canto II von Beckton Dickinson (c) nutzt Streulichtinformationen zur Bestimmung der Größe (*FSC-A*) und Granularität (*SSC-A*) der Analyte (a&b). Analog dazu wird der magnetische Durchmesser *x21* und das normierte Integral *ixna* zur Trennung der Beads mit der magnetischen Methode verwendet (d&e). Die TOF-Betrachtung der charakteristischen Signalmuster bietet weitere Parameter zur Diskriminierung der Populationen (f).

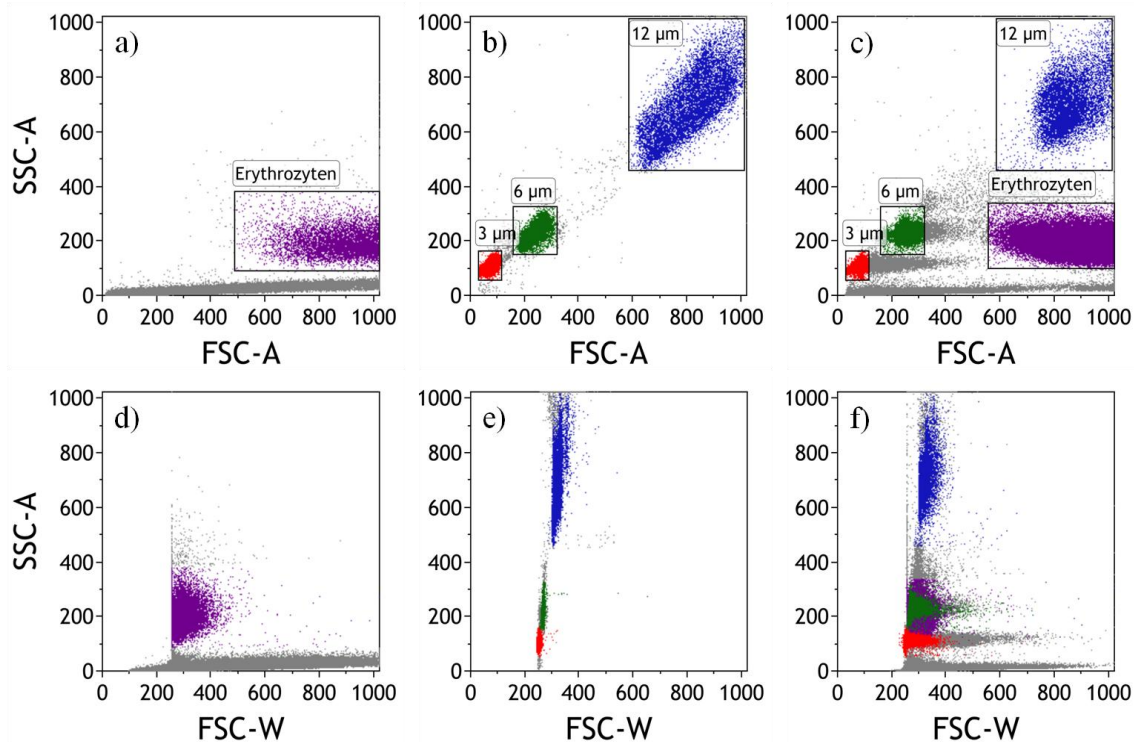
Für die magnetischen Einzelmessungen wird eine Spritzengeschwindigkeit von  $1.2 \mu\text{L s}^{-1}$  ( $H_{ext}$  von 100 mT) eingestellt und ein Sensor mit einem  $d_{GMR}$  von 14  $\mu\text{m}$  bei einer Ni-Dicke von 100 nm ausgewählt. Das *Gating* erfolgt separat für jede Population und umfasst 90% der detektierten Events. Abbildung 8.12 stellt die Auftragung der *FSC* und *SSC* Flächeninformationen (*FSC-A*, *SSC-A*) der Streulichtmessung und ausgewählte Signalparameter der magnetoresistiven Erfassung gegenüber. Beide Messmethoden liefern eine vollständige Trennung der Referenzanalyten, wobei das FACS Canto II eine Zunahme der Streuung der Wolken hin zu größeren Durchmessern aufweist, wohingegen sich die GMR-Messung invers dazu verhält (Abbildung 8.12 b&d). Die magnetische Detektion erlaubt in diesem Fall eine Trennung der Analyte rein auf Basis der Fließgeschwindigkeiten (Abbildung 8.12 e).

### **Magnetische Beaddetektion in EDTA-Vollblut**

Zur Vorbereitung auf die Messung der Referenzpartikel in EDTA-Vollblut wird das Verhalten der Beads mit Hilfe des optischen Durchflusszytometers am Uniklinikum Erlangen analysiert. Dazu werden die Zielanalyte in eine lysierte Blutprobe eingespielt und über eine Streulichtmessung charakterisiert. In einem ersten Schritt wird eine Blindprobe zur Definition der Wolke des zellulären Blutbestandteils untersucht, die über die Kombination der Größe (*FSC*) und Granularität (*SSC*) klar von den Referenzpartikeln getrennt werden kann (Abbildung 8.13 a&d). Ein Vergleich der Einzelmessungen der 3 Durchmesser in PBS (b&e) und Vollblut (c&f), bei konstanter Position der Gates zur farblichen Kennzeichnung der einzelnen Analyte, deutet auf eine unspezifische Wechselwirkung der Methacrylat Oberfläche mit freien Proteinen im komplexen Lysat hin (Abbildung 8.13 b&c). Die Ausmaße der Kettenbildung werden anhand der Auftragung der Breite der *Forward Scatter* Information (*FSC-W*) gegen *SSC-A* aufgeschlüsselt (f). Im Gegensatz zur optischen Messmethode ist die magnetoresistive Detektion der Analyte in nicht lysiertem EDTA Vollblut unempfindlich gegen die unspezifische Wechselwirkung mit nichtmagnetischen, organischen Blutbestandteilen.

Um Störeffekte komplett auszuschließen und eine konstante Rollbewegung der Analyte sicherzustellen wird eine 0.1 %ige BSA-Lösung (*Bovine Serum Albumin*, Rinderalbumin) hergestellt, in die magnetische Beads resuspendiert werden. In der Forschung wird BSA vor allem bei immunologischen Nachweisverfahren, wie ELISA oder Western-Blot genutzt, um unspezifische Bindungen von organischem Material an

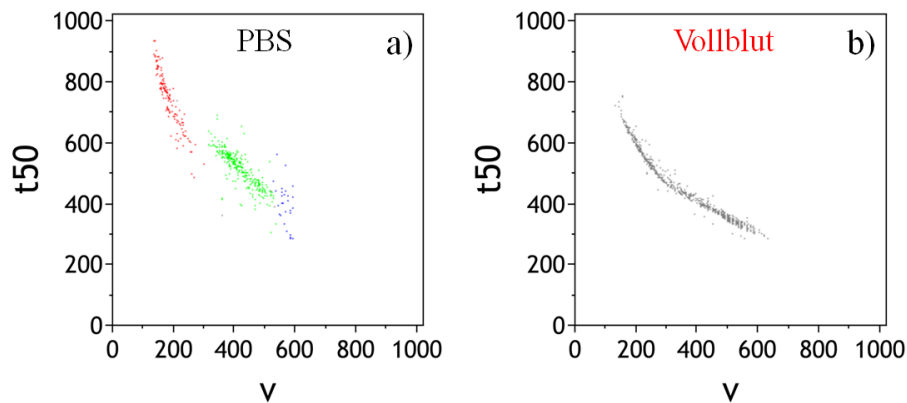
Testmembranen oder Mikrotiterplatten zu verhindern [134]. Die in Wasser gelagerten Micromod Beads werden aus der Originalsuspension pipettiert und auf eine 1:40 Verdünnung in der BSA-Lösung resuspendiert. Die Konzentrationsbereiche der Zielanalyte sind so eingestellt, dass ein Gesamtvolumen von maximal 15  $\mu\text{L}$  Referenzbeads in 1 ml Vollblut ausreicht, um eine statistische Auswertung zu ermöglichen und Verdünnungseffekte der Vollblutprobe durch das 'Einspiken' zu minimieren. Mit dem Ziel Aggregationen von Analyten sowie Proteinen an der Kanalwand zu unterdrücken wird der PDMS-Mikrofluidikkanal zusätzlich vor jeder Messung mit BSA ausgekleidet.



**Abbildung 8.13** Vergleich der Streulichtmessung der 3, 6 und 12  $\mu\text{m}$  Referenzanalyte in PBS (b&e) und lysiertem Vollblut (c&f). Zur farblichen Kodierung der zellulären Blutbestandteile wird eine Messung des Lysats ohne eingespikte Analyte durchgeführt (a&d). Die Breite der *Forward Scatter Information* (*FSC-W*) wird genutzt, um eine Kettenbildung von organischen Blutbestandteilen an den Referenzanalyten nachzuweisen (d-f).

Als Vorbereitung auf die Messung von zwei oder mehreren Referenzbeads in dem optisch opaken Medium, werden ausgewählte Proben, einzeln in Vollblut magnetisch erfasst, mit dem Ziel, ein Optimum aus externem Magnetfeld und der Spritzenpumpgeschwindigkeit bei gegebener Ni-Dicke einzustellen. Im Gegensatz zu Messungen in ionischem Puffer ist ein höheres  $H_{ext}$  in der Nicht-Newtonschen Blutsuspension erforderlich, um in Kombination mit einer Absenkung des

Volumenstroms eine hinreichende Anreicherung und magnetophoretische Führung der  $12\ \mu\text{m}$  Analyte zu garantieren. Der Effekt der Aggregation kleinerer Analyte an den Ni-Ästen ist dabei über den Vergleich der Anzahl der detektierten Events bei konstantem Mischverhältnis nicht zu beobachten, da der zelluläre Bestandteil der Blutprobe durch Stoßprozesse eine magnetische Arretierung von Beads an Magnetophoresestrukturen vermindert (vgl. Kapitel 7.3).

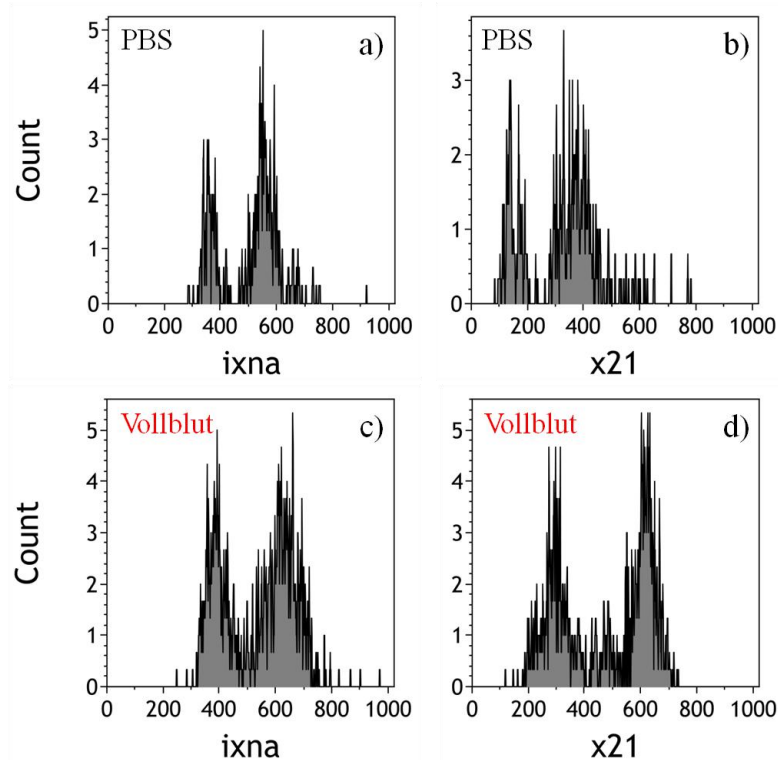


**Abbildung 8.14** Gegenüberstellung der Diskriminierung von  $6$  und  $12\ \mu\text{m}$  Referenzanalyten unter Verwendung der TOF-Parameter im Zeitbereich in PBS (a) und EDTA-Vollblut (b) bei einem  $d_{\text{GMR}}$  von  $18\ \mu\text{m}$ .

Zur Bewertung der Diskriminierung von zwei Analytsuspensionen in Vollblut wird analog zur Messung in PBS eine Probe aus  $6\ \mu\text{m}$  und  $12\ \mu\text{m}$  Referenzpartikel bei einem GMR-Abstand von  $18\ \mu\text{m}$ , einem Volumenstrom von  $0.3\ \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $140\ \text{mT}$  externes Gradientenfeld und einer Nickeldicke von  $100\ \text{nm}$  analysiert. Abbildung 8.14 zeigt Ansätze der Diskriminierung über die Analytgeschwindigkeit und die Gesamtsignallänge  $t50$  in Phosphatpuffer und Vollblut. Im Gegensatz zu der vollständigen Trennung der Referenzanalyte im Puffer, kann in komplexen Medium Blut keine ausreichende Diskriminierung der Populationen unter Verwendung der Signalparameter im Zeitbereich erreicht werden.

Diese Beobachtung kann mit der Variation der Viskosität einer Blutprobe erklärt werden, die durch Verformungseffekte der Erythrozyten hervorgerufen wird und im Gegensatz zu PBS zu einem flacheren Nicht-Newtonschen Flussprofil führt (vgl. Kapitel 7.3). Zusätzlich treten Interaktionen des zellulären Anteils der Vollblutprobe ( $46\%$  des Gesamtvolumens) auf, der mit einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen  $\mu\text{L}^{-1}$  fast ausschließlich aus Erythrozyten besteht, die eine homogene Bewegung der Analyte über die Distanz der signalgebenden magnetoresistiven Streifen verhindern und so die zeitliche TOF-Betrachtung verfälschen [73]. Eine Transformation in den Wegbereich

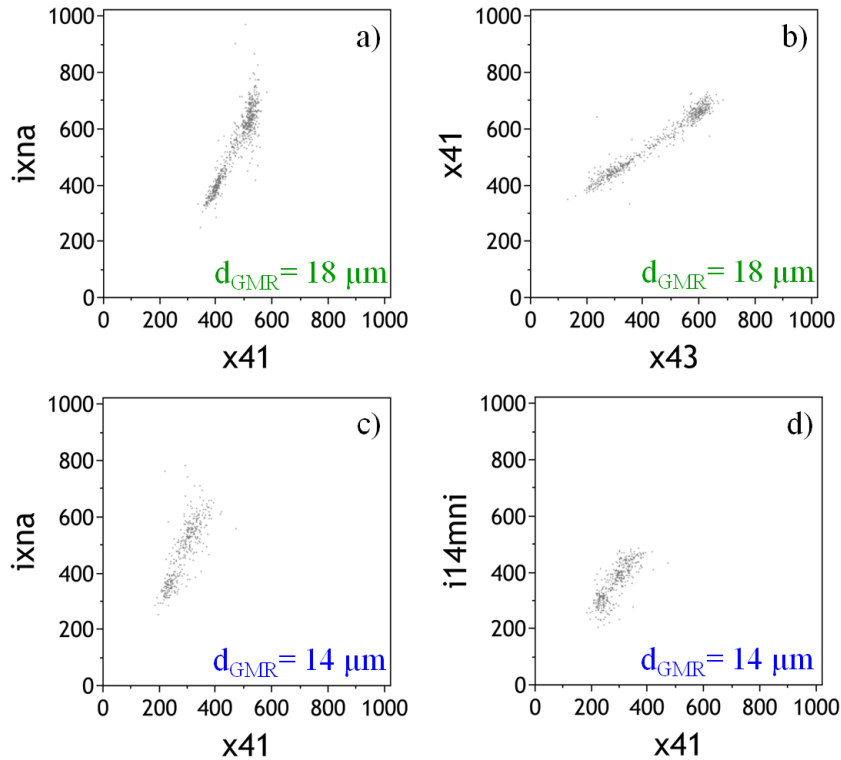
führt am Beispiel des normierten Gesamtintegrals und des magnetischen Durchmessers mit einer Schrittweite von 13 nm zu einer Aufspaltung der Analytpopulationen, die im Vergleich zur Messung in Puffer nur wenig an Schärfe verliert (Abbildung 8.15).



**Abbildung 8.15** Vergleich der Diskriminierung von 6 und 12  $\mu\text{m}$  Referenzanalyten bei einem  $d_{GMR}$  von 18  $\mu\text{m}$  in PBS (a&b) und EDTA-Vollblut (c&d) über das normierte Integral und einen TOF-Parameter im Wegbereich.

Abbildung 8.16 a bestätigt die vollständige Diskriminierung in einer zweidimensionalen Auftragung über  $x41$  und das normierte Integral  $ixna$ , während (b) eine reine TOF-Analyse im Wegbereich demonstriert. Zur Abschätzung des Einflusses von  $d_{GMR}$  im komplexen Medium wird die magnetische Detektion der 6 und 12  $\mu\text{m}$  Probe bei einer Reduzierung des Abstandes der aktiven GMR-Elemente auf 14  $\mu\text{m}$ , unter konstanten Messbedingungen ( $Q=0.3 \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $H_{ext}=140 \text{ mT}$ ,  $d_{Ni}=100 \text{ nm}$ ) wiederholt. Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse (Abbildung 8.16 a&c), die sich in der Zahl der detektierten Events um einen Faktor zwei unterscheiden, belegt grundsätzlich eine Differenzierung bei beiden Messungen, obwohl sich die Signalparameter  $x41$  sowie  $ixna$  der einzelnen Populationen bei geringerem  $d_{GMR}$  deutlich annähern. Analog zur Puffermessung kann der Grad der Signalüberlappung der mittleren Peaks zur Differenzierung der Analyte eingesetzt werden (Abbildung 8.16 d), wobei die 12  $\mu\text{m}$

Partikel mit einem  $K$  von 0.88 ein signifikant höheres Verhältnis der Integrale der äußeren Halbwellen zum Gesamtintegral  $i14mni$  erzeugen, als die  $6\ \mu\text{m}$  Partikel ( $K=0.43$ ).

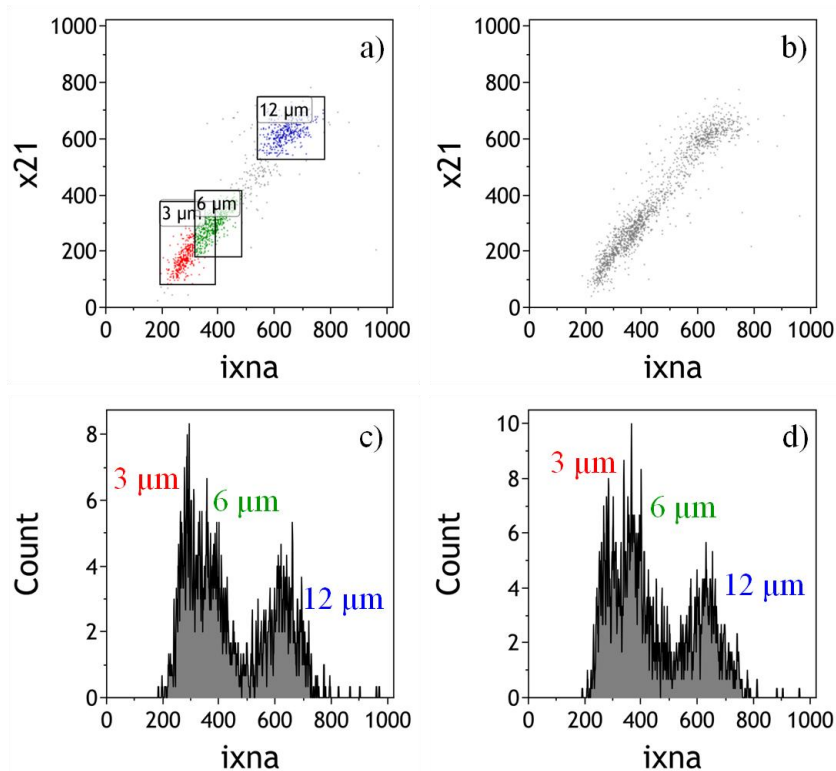


**Abbildung 8.16** Diskriminierung der  $6$  und  $12\ \mu\text{m}$  Referenzanalyte in Vollblut bei Variation des Abstandes der signalgebenden GMR-Elemente von  $18\ \mu\text{m}$  (a) auf  $14\ \mu\text{m}$  (c) unter gleichen Messbedingungen ( $Q$ ,  $H_{ext}$ ,  $d_{Ni}$ ). Die magnetoresistive Erfassung mit einem  $d_{GMR}$  von  $18\ \mu\text{m}$  erlaubt eine Trennung der Analytpopulationen durch eine reine TOF-Analyse im Wegbereich (b). Die Reduzierung von  $d_{GMR}$  auf  $14\ \mu\text{m}$  ermöglicht eine Differenzierung über den Grad der Ausbildung des charakteristischen Signalmusters (d).

Zum Benchmark der magnetoresistiven Diskriminierung der Referenzanalyte in Vollblut mit der Streulichtmessung des optischen Durchflusszytometers in Puffer werden die bisher gewählten Messbedingungen, bei einem  $d_{GMR}$  von  $18\ \mu\text{m}$  übernommen. Da eine Durchführung der optischen Messung im optisch opaken Medium nicht möglich ist, werden die Messdaten in PBS aus Abbildung 8.12 übernommen. In separaten Messungen der  $3$ ,  $6$  und  $12\ \mu\text{m}$  Analyte unter konstanten Bedingungen, werden in den Einzelauftragungen jeweils  $90\%$  der detektierten Events mit *Gates* farblich markiert. Die Zusammenführung der Ergebnisse führt zu einer deutlichen Differenzierung der  $6$  und  $12\ \mu\text{m}$  Populationen, während die  $3\ \mu\text{m}$  Partikel nur unzureichend von der  $6\ \mu\text{m}$  Population getrennt werden kann (Abbildung 8.17 a&c).



Die Ergebnisse der magnetoresistiven Erfassung einer Suspension die alle Referenzanalyte gleichzeitig umfasst wird in Abbildung 8.17 b&d dargestellt. Im Vergleich zur Einzelmessungen der Referenzbeads sieht man keinen erkennbaren Verlust an Messgenauigkeit.

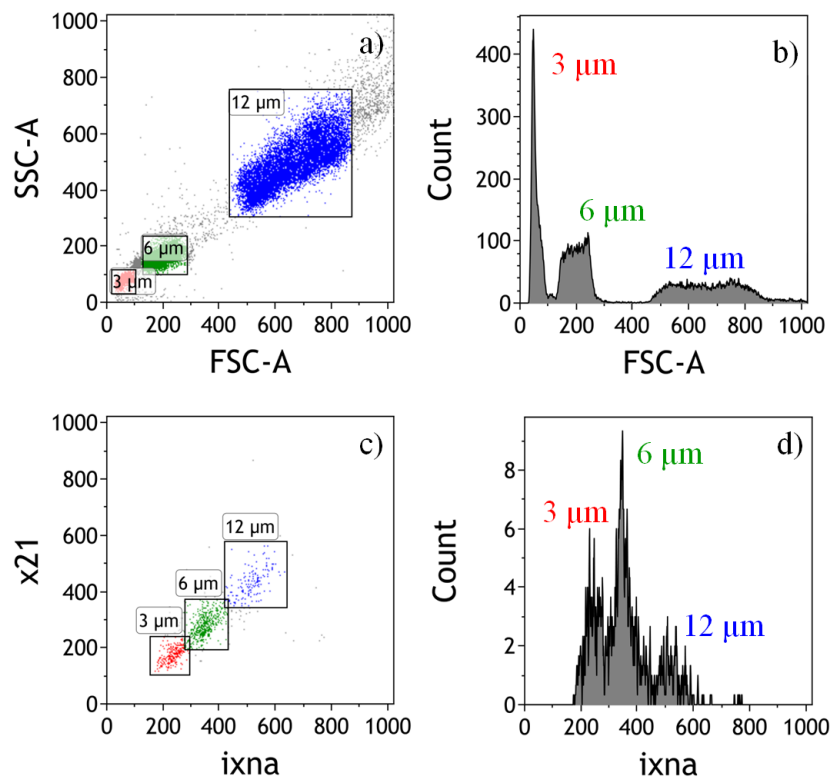


**Abbildung 8.17** Gegenüberstellung der separaten, magnetoresistiven Erfassung der 3, 6 und 12 µm Referenzanalyte in Vollblut (a&c) bei einem  $d_{GMR}$  von 18 µm mit der Messung einer Probe unter konstanten Bedingungen, die alle drei Analyte umfasst (b&d).

Um eine vollständige Diskriminierung zu erreichen, werden die separaten Messungen der 3, 6 und 12 µm Analyte mit einem GMR-Abstand von 14 µm wiederholt. Abbildung 8.17 vergleicht die magnetische Detektion mit den über die Streulichtparameter optisch generierten Daten. Die Verringerung von  $d_{GMR}$  resultiert in einer nahezu vollständigen Diskriminierung der drei Populationen. Der deutliche Abfall der detektierten 12 µm Partikel ist auf eine Absenkung des externen Magnetfeldes um 40 mT zurückzuführen, dass nicht ausreichend war, um alle Analyte in der Vollblutumgebung auf der Substratoberfläche anzureichern. Auffallend ist die Streuung der 12 µm Population bei der optischen Messmethode, die bei nahezu identen Größen der *Gates*, mit dem magnetischen Durchflusszytometer nicht zu beobachten sind. Zusammenfassend bestätigt die Gegenüberstellung eine vergleichbare Qualität der nicht-optischen Datenerfassung in Vollblut mit dem Gold-Standard der Einzelzelldetektion und liefert



eine erste Validierung der magnetischen Durchflusszytometrie als potentielle Messmethode in Vollblut.

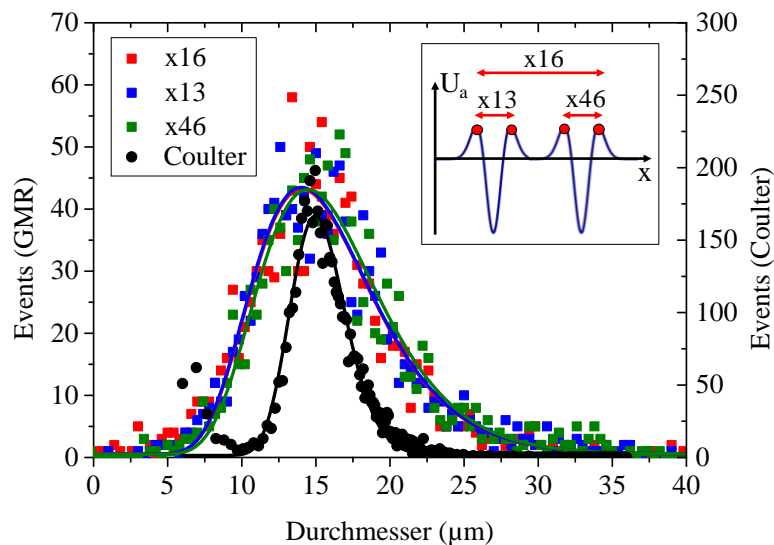


**Abbildung 8.18** Vergleich der Diskriminierung der 3, 6 und 12 µm Referenzanalyte aus separaten Messungen über die Streulichterfassung in PBS im optischen Durchflusszytometer (a&b) mit der magnetoresistiven TOF-Detektion in EDTA-Vollblut bei einem  $d_{GMR}$  von 14 µm (c&d). Die Farbkodierungen der optischen Messung resultieren aus den Einzelmessungen der Analyte (Gating von 90% der detektierten Events).

#### 8.4 Benchmark - Coulter Counter vs. magnetisches Durchflusszytometer

Zur Bewertung der Messpräzision der Größen- und Volumenbestimmung von biologischen Analyten mit der magnetoresistiven Einzelzelldetektion in EDTA-Vollblut wird der magnetische Analytdurchmesser aus der TOF-Signalbetrachtung mit der hydrodynamischen Durchmesser- und Volumenbestimmung der Impedanzmessung verglichen. Superparamagnetisch markierte EpCAM-FaDu-Tumorzellen dienen als biologische Referenzanalyte und werden mit dem *Handheld* Coulter-Counter ‚Scepter‘ von Millipore charakterisiert (vgl. Abbildung 4.8).

Die magnetischen Messungen werden auf Grund der limitierten Sensitivität des IPHT-Multilagensystems von  $\sim 1.4\% \text{ mT}^{-1}$  zunächst unter Verwendung des parallelen Sensorlayouts bei GMR-Widerstandsabständen  $d_{\text{para1}}$  von  $12 \mu\text{m}$  und  $d_{\text{para2}}$  von  $45 \mu\text{m}$  durchgeführt. Die magnetische Zellanreicherung und magnetophoretische Fokussierung wird über einen Volumenstrom von  $0.4 \mu\text{L s}^{-1}$  und ein  $H_{\text{ext}}$  von  $120 \text{ mT}$  so eingestellt, dass, bei einer Wiederfindungsrate von  $\sim 97\%$ , mehr als  $1,000$  magnetische Zellevents zur statistischen Validierung detektiert werden.



**Abbildung 8.19** Magneto-resistive Detektion der superparamagnetisch markierten FaDu-Tumorzellen mit einem parallelen Sensordesign, im Vergleich zur Impedanzmessung der Zellsuspension. Der magnetische Durchmesser, ermittelt aus der TOF-Signalanalyse ( $x13$ ,  $x46$ ,  $x16$ ), entspricht nahezu  $d_{\text{hydro}}$ , während die Schärfe der Kurve um das 2.2-fache abnimmt.

Abbildung 8.19 vergleicht die drei Parameter  $x13$ ,  $x46$  und  $x16$ , die den magnetischen Durchmesser beschreiben und aus dem charakteristischen 6-Peak-Signal errechnet werden, mit der Coulter Verteilung der FaDu-Zellsuspension, bei einer Auflösung von  $400 \text{ nm}$ . Im Gegensatz zu den Messkurven der magnetischen Referenzpartikel werden die Verteilungen der superparamagnetisch markierten biologischen Analyte mit einer normal logarithmischen Kurve angenähert [135]. Die drei magnetischen Verteilungen, die einen Mittelwert von  $15.3 \mu\text{m}$ , mit einer Schwankung von  $<3\%$  aufweisen, sind nahezu identisch mit dem mittleren hydrodynamischen Durchmesser von  $15.1 \mu\text{m}$ . Auffallend ist die Halbwertsbreite der magnetischen Kurven von durchschnittlich  $9.7 \mu\text{m}$ , die im Gegensatz zur Coulter Messung mit  $4.4 \mu\text{m}$  signifikant größer ist. Die Betrachtung der Detektion der  $12 \mu\text{m}$  Referenzpartikeln unter analogen Bedingungen (vgl. Abbildung 8.4 b) führt zu magnetischen Durchmessern, die mit  $8.8 \mu\text{m}$  deutlich unter dem hydrodynamischen Durchmesser von  $11.3 \mu\text{m}$  liegen. Hinsichtlich der

Schärfe der Verteilungskurven zeigt die magnetische Erfassung der Referenzpartikel mit einer mittleren  $FWHM$  von  $2.60 \mu\text{m}$  im Vergleich zur Coulter Messung ( $1.65 \mu\text{m}$ ) eine deutlich geringere Zunahme, als die Kurven der biologischen Analyten.

Die Zunahme des magnetischen Durchmessers in Kombination mit dem starken Anstieg der Verteilungsbreite kann mit einer Formveränderung der sphärischen Zellen im mikrofluidischen Kanalsystem erklärt werden. Es wird angenommen, dass die, mit superparamagnetischen Markern umhüllte, flexible Zellmembran durch die vertikale Komponente des externen Magnetfeldes deformiert wird, resultierend in einer Verflachung der Zelle auf der Substratoberfläche. Zur Untersuchung dieser Hypothese wird die magnetische Kraft  $F_m$  des Permanentmagneten auf die magnetisierten Analyte im Mikrofluidikkanal errechnet. Die Kraft  $F_m$  errechnet sich dabei aus dem magnetischen Moment der Zelle und dem Gradienten der magnetischen Flussdichte des Permanentmagneten (vgl. Formel 5.4). In erster Näherung wird die Betrachtung des magnetischen Feldes auf die Z-Komponente des Magneten, orthogonal zur Substratoberfläche, reduziert, resultierend in einer eindimensionalen Berechnung von  $F_{mz}$ .

$$F_{mz} = m_{zelle} \cdot \frac{\delta B_z}{\delta z} \quad (8.4)$$

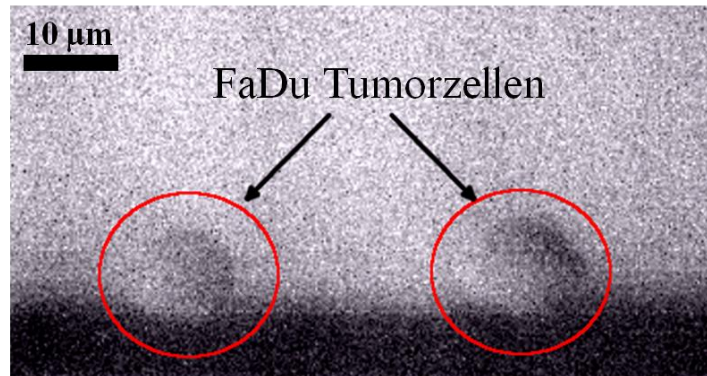
Die magnetische Flussdichte  $B(z)$  auf der Symmetrieachse des axial magnetisierten NdFeB-Magneten wird mit Formel 8.5 für einen Abstand  $z$  von Permanentmagnet zu Analyt errechnet, wobei  $L$ ,  $W$  und  $D$  die Dimensionen des Magneten definieren und  $B_r$  die Remanenzfeldstärke beschreibt [108].

$$B(z) = \frac{B_r}{\pi} \left[ \arctan \left( \frac{LW}{2z\sqrt{4z^2 + L^2 + W^2}} \right) - \arctan \left( \frac{LW}{2(D+z)\sqrt{4(D+z)^2 + L^2 + W^2}} \right) \right] \quad (8.5)$$

Bei einem Abstand zwischen Magnet und Zelle von  $5 \text{ mm}$  und dem durchschnittlichen magnetischen Moment für eine FaDu-Tumorzelle von  $6.43 \times 10^{-13} \text{ Am}^2$ , ermittelt aus einer VSM-Messung (vgl. Kapitel 4.2) übt der  $32 \times 27 \times 6 \text{ mm}$  NdFeB-Magnet mit einem  $B_r$  von  $1.1 \text{ T}$  eine Kraft von  $-13 \text{ pN}$  auf den Analyten aus.

Eine mikroskopische Aufnahme der biologischen Analyte bei 1,000-facher Vergrößerung bestätigt die sphärische Form der Zellen unter Einfluss eines  $H_{ext}$  von

~150 mT ( $z \sim 3$  mm). Die roten Umrandungen in Abbildung 8.20 heben zwei superparamagnetisch markierte FaDu-Zellen hervor, die über den positionierten NdFeB-Magneten an der PDMS-Seitenwand angereichert werden. Die magnetische Kraft von ~13 pN auf die superparamagnetisch markierten Zellen führt zu keiner Verformung der Analyte, die optisch bei 1,000-facher Vergrößerung aufgelöst werden kann.

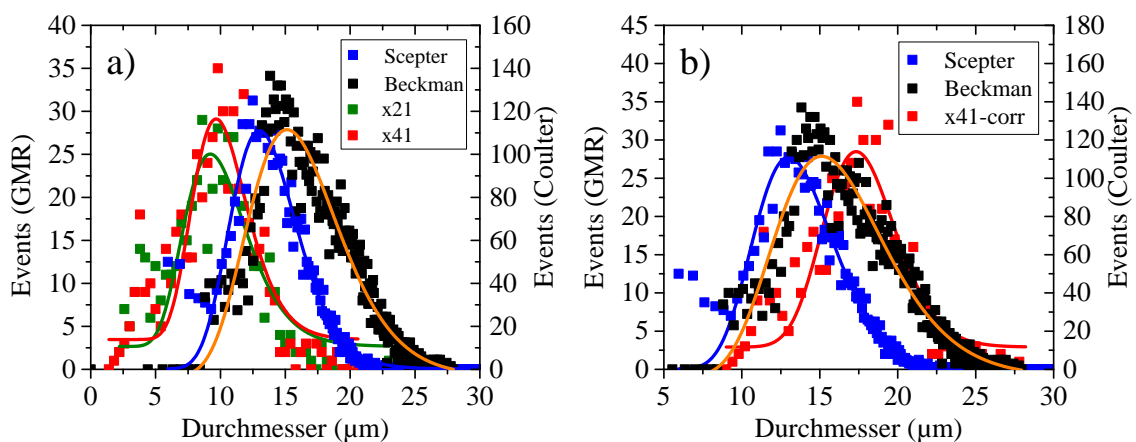


**Abbildung 8.20** Mikroskopaufnahme von zwei superparamagnetisch markierten FaDu-Tumorzellen an der Seitenwand des PDMS-Mikrofluidikkanals unter Einfluss eines externen Magnetfeldes von ~150 mT bei 1,000-facher Vergrößerung.

Zusätzlich kann die Unschärfe der magnetischen Durchmesserbestimmung von FaDu-Tumorzellen über die Signalauswertung unter Verwendung der parallelen Sensorgeometrie erklärt werden. Im Gegensatz zur Messung mit der diagonalen Sensorausführung führen Interferenzen der Signalantworten der GMR-Einzelwiderstände bereits bei der Detektion der homogen magnetisierten 12  $\mu\text{m}$  Referenzpartikel zu einer signifikant breiteren Verteilung der errechneten Geschwindigkeiten (vgl. Abbildung 7.15 a & Abbildung 7.16) und zu einer Variation der drei magnetischen Durchmesser  $x13$ ,  $x46$  und  $x16$  (vgl. Abbildung 8.4).

Mit dem Sensitec GMR-Multilagensystem S13 (vgl. Abbildung 6.10) wird die magnetoresistive Messung der FaDu-Tumorzellen unter ähnlichen Bedingungen ( $Q=0.25 \mu\text{L s}^{-1}$ ,  $H_{ext}=120$  mT) auf einer diagonalen GMR-Brücke mit einem  $d_{GMR}$  von 22  $\mu\text{m}$  wiederholt. Die maximale Auflösung der Durchmesserbestimmung einer 15  $\mu\text{m}$  FaDu Zelle bei gegebenen Bedingungen wird über die ermittelte Gesamtlaufzeit der Zelle von 48.4 ms und die Sample Rate von 10,000  $\text{S s}^{-1}$  auf 33  $\text{nm S}^{-1}$  abgeschätzt. Die Gesamtlaufzeit der Analyte wird dabei aus der errechneten mittleren Analytgeschwindigkeit von 790  $\mu\text{m s}^{-1}$ , bei einer Standardabweichung von 130  $\mu\text{m s}^{-1}$  (vgl. Abbildung 7.16) und dem Mindestabstand von zwei einzeln magnetisch detektierbaren Zellen ( $d_{GMR} + 1.5 \times d_{hydro}$ ) bestimmt. Abbildung 8.21 a vergleicht die magnetischen Durchmesser  $x21$  und  $x41$ , ermittelt aus dem charakteristischen

diagonalen Signalmuster bei einer Auflösung von 400 nm mit den Coulter Messungen der FaDu-Tumorzellen. Die Ergebnisse der biologischen Analyte korrelieren mit der analogen Erfassung der 12  $\mu\text{m}$  Referenzpartikel, bei der die Werte des magnetischen Durchmessers in einer groben Abschätzung ebenfalls um 40% geringer sind als der durchschnittliche hydrodynamische Durchmesser (vgl. Abbildung 8.4 a). Der TOF-Parameter  $x41$  liefert einen Mittelwert von 10.1  $\mu\text{m}$  und zeigt eine Abweichung  $<3\%$  zum Referenzwert  $x21$  mit 9.9  $\mu\text{m}$ . Der mittlere hydrodynamische Durchmesser der Scepter Messung liegt bei 13.5  $\mu\text{m}$ , was eine Variation von  $\sim 15\%$  im Vergleich zu den Beckman Coulter Ergebnissen bedeutet (15.95  $\mu\text{m}$ ).

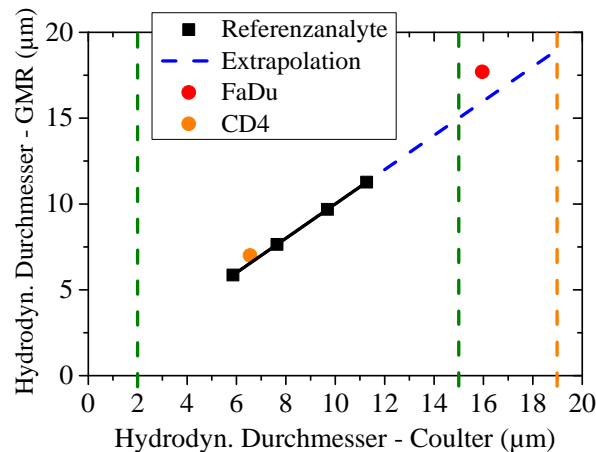


**Abbildung 8.21** Magneto-resistive Durchmesserbestimmung der FaDu-Tumorzellen in EDTA-Vollblut mit einem diagonalen GMR-Sensorlayout ( $d_{GMR}=22 \mu\text{m}$ ). Zur Umrechnung des magnetischen in den hydrodynamischen Durchmesser wird ein experimentell ermittelter Korrekturfaktor aus Abbildung 8.6 graphisch bestimmt. Der magnetische Durchmesser  $x41$  (a) und der korrigierte magnetische Durchmesser (b) werden mit den Ergebnissen der Impedanzmessungen des Beckman Coulter Z2 und des Scepter Handheld Coulter verglichen.

Der Korrekturfaktor zur Umrechnung von  $d_{mag}$  in  $d_{hydro}$  wird graphisch aus den experimentellen Messdaten der Referenzanalyse in Abbildung 8.6 bestimmt und auf 7.6  $\mu\text{m}$  festgelegt. Abbildung 8.21 b zeigt den korrigierten magnetischen Durchmesser  $x41$  der FaDu-Tumorzellen, der mit einem Mittelwert von 17.6  $\mu\text{m}$  eine Abweichung von 1.6  $\mu\text{m}$  zum mittleren hydrodynamischen Durchmesser der Beckman Coulter Messung aufweist. Im Vergleich zu den Ergebnissen mit dem Präzisionsmessgerät Z2 von Beckman zeigt die magneto-resistive Größenbestimmung eine Abweichung von  $+10\%$ , während die Verteilung des Scepter Handheld Coulter um  $-16\%$  verschoben ist.

Zur Bewertung des Korrekturfaktors (vgl. Abbildung 8.6) werden die aus den magnetischen Messungen errechneten hydrodynamischen Durchmesser von  $\text{CD4}^+$ -Zellen (Messdaten nicht gezeigt) in Vollblut sowie FaDu-Tumorzellen in Vollblut mit

den Coulter Daten verglichen (Abbildung 8.22). Die magnetischen Messungen der 6, 8, 10 und 12  $\mu\text{m}$  Referenzanalyte als experimentelle Grundlage des Korrekturfaktors bilden dabei eine Ursprungshalbgerade. Mit einem durchschnittlichen  $d_{mag}$  von  $\sim 4.5 \mu\text{m}$  und einem graphisch ermittelten Korrekturfaktor von  $2.5 \mu\text{m}$  kann der tatsächliche Durchmesser der CD4-Zellen nach Coulter ( $6.55 \mu\text{m}$ ) mit einer Abweichung von  $\sim 4\%$  magnetisch bestimmt werden.

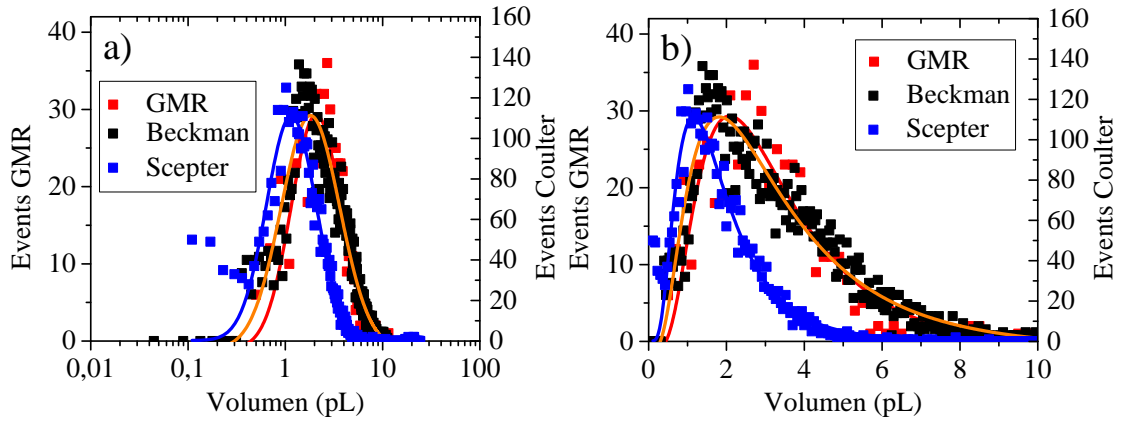


**Abbildung 8.22** Bewertung des experimentell, aus den magnetischen Messungen der 6, 8, 10 und 12  $\mu\text{m}$  Referenzanalyten, ermittelten Korrekturfaktors (vgl. Abbildung 8.6), zur Bestimmung von  $d_{hydro}$  bei biologischen Proben. Eine magnetoresistive Messung von  $\text{CD4}^+$ -Zellen in Vollblut (Ergebnisse nicht gezeigt) liegt mit einem Fehler von 4% nahezu auf der Ursprungshalbgeraden. Die magnetische Durchmesserbestimmung der FaDu-Tumorzellen weist mit einer Abweichung von 10% einen signifikant größeren Fehler auf.

Die magnetische TOF-Messung der FaDu-Tumorzellen zeigt mit einem Fehler von 10% eine signifikant höhere Abweichung, die vermutlich der Extrapolation der Messdaten der Referenzanalyte, als Basis für den Korrekturfaktor geschuldet ist. Die gestrichelten, vertikalen Linien in Abbildung 8.22 markieren die Grenzbedingungen der Durchmesserbestimmung bei gewähltem  $d_{GMR}$  von  $22 \mu\text{m}$  (vgl. Kapitel 8.2, Abbildung 8.6). Ab einem  $d_{hydro}$  von  $15 \mu\text{m}$  ist eine leichte Signalüberlappung der mittleren Peaks im Signalmuster zu beobachten, die allerdings bis zu einem  $d_{hydro}$  von  $\sim 19 \mu\text{m}$  nur einen 5%igen Fehler in der Größenbestimmung verursacht [133].

Unter der Annahme einer sphärischen Form der FaDu-Zellen wird über den magnetischen Durchmesser eine volumetrische Größenbestimmung der Analyte realisiert. Abbildung 8.23 zeigt einen Vergleich der korrigierten magnetischen Größenverteilung mit den Volumenbestimmungen der Scepter und Beckman Coulter Geräte, bei logarithmischer (a) und linearer Auftragung (b). Der Mittelwert der magnetisch ermittelten Verteilung mit einer Auflösung von  $200 \text{ nL}$  liegt bei  $2.96 \text{ pL}$  und

korreliert mit der Beckman Messung von 2.94 pL. Zusätzlich bildet die magnetische Volumenbestimmung die auslaufende Flanke der Zellverteilung ab, im Gegensatz zur Messung mit dem Scepter Coulter.



**Abbildung 8.23** Volumetrische Größenbestimmung der FaDu-Tumorzellen in EDTA-Vollblut über die magnetoresistive TOF-Signalanalyse, im Vergleich zu den Impedanzmessungen mit dem Beckman Coulter Z2 und dem Scepter *Handheld* Coulter von Millipore.

Der Vergleich mit der Coulter Messung als Goldstandard der Zellvolumenbestimmung bestätigt das Messverfahren der magnetoresistiven Einzelzelldetektion als präzises System zur Größenbestimmung von spezifisch markierten Zellen.

### 9. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Realisierung eines miniaturisierten Systems zur kontinuierlichen, nicht-stochastischen Detektion von spezifisch immunomagnetisch markierten Zellen, direkt in Vollblut. Die optische Ausleseeinheit eines fluoreszenzbasierten Durchflusszytometers, dem Goldstandard in der klinischen Einzelzelldetektion, wird dabei durch magnetoresistive Sensoren ersetzt. Darüber hinaus wird der Großteil der Präanalytik im fluidischen *Workflow* integriert, was gegenwärtig mit keinem fluoreszenzbasierten *Workflow* realisierbar ist. Anstelle der Immunophänotypisierung mit Fluoreszenzpartikeln werden die Zielzellen spezifisch mit superparamagnetischen Nanopartikeln markiert. Ein linearer Mikrofluidikkanal mit Dimensionen von 700 x 150 µm garantiert einen hohen Durchsatz und ermöglicht Messungen in einer nicht-hämolytierten Vollblutprobe, bei gleichzeitiger Reduktion von Verstopfungsproblemen. Zur Analytfokussierung im Kanal, dessen Querschnitt ein Vielfaches von einem Zelldurchmesser entspricht, wird ein rein magnetischer *Workflow* etabliert, der eine *in-situ* magnetische Zellanreicherung, eine *in-situ* magnetophoretische Zellführung und eine *in-situ* Filtration von ungebundenen, magnetischen Nanopartikeln für eine hintergrundfreie Detektion kombiniert. Im Gradientenfeld eines präzise unter den MR-Sensoren platzierten NdFeB-Permanentmagneten werden die superparamagnetisch markierten Analyte auf der Substratoberfläche angereichert. Ein ferromagnetisches *Chevron*-Pattern konzentriert die Zellen in die Kanalmitte und garantiert ein definiertes Abrollen über die 30 x 2 µm GMR-Sensorstreifen. Zusätzlich binden die Führungsstrukturen freie, magnetische Marker, da die magnetische Haltekraft auf die 200 nm Partikel größer ist als die Stokes Reibung im laminaren Fluss. Die Anordnung der GMR-Sensoren in einer Wheatstone Brückenarchitektur ermöglicht eine *Time-of-Flight* Signalanalyse zur Geschwindigkeits- und Größenbestimmung der Analyte. Damit wird in dieser Arbeit ein integrierter *Workflow* dargestellt, der mit Ausnahme des Inkubationsschrittes alle Funktionen für eine magnetische Durchflusszytometrie mit integrierter Präanalytik beinhaltet. Die Einzelkomponenten des Systems wurden sukzessive optimiert, um eine magnetoresistive TOF-Einzelzelldetektion mit ausreichend Signal-Rausch-Verhältnis und Wiederfindungsraten >96% zu erreichen.

Der Nachweis einer magnetoresistiven Detektion von Referenzanalyten wurde mit einem Siemens GMR-Multilagensystem gezeigt, dass ursprünglich für Drehfeldsensoren entwickelt worden ist. Zur Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses



konnte die Steilheit im linearen Bereich der Hysteresekurve, als Maß für die GMR-Sensitivität, durch eine Variation der magnetfeldinduzierten Anisotropie um fast 25% auf  $0.48 \% \text{ mT}^{-1}$  gesteigert werden. Eine magnetische Erfassung von schwach markierten, biologischen Analyten konnte auf Grund der stark divergenten Anforderungen eines magnetischen Drehfeldsensors im Vergleich zu einem GMR-Biosensor nicht erreicht werden. In einem Folgeschritt wurden daher GMR-Multilagensysteme verschiedener Hersteller auf Waferebene eingekauft und vor Ort im Reinraum prozessiert. Mit einer Steigung der Hysteresekurve von  $1.43 \% \text{ mT}^{-1}$  erreicht das Vielschichtsystem von IPHT eine Verdreifachung des optimierten Siemens-Stacks und erlaubt die magnetoresistive Detektion von spezifisch markierten FaDu-Tumorzellen in Vollblut, in Kombination mit der additiven Signalüberlagerung von zwei parallelen GMR-Elementen der Wheatstonebrücke. Höchste Sensitivitäten von durchschnittlich  $2.3 \% \text{ mT}^{-1}$  konnten mit dem GMR-Schichtstapel von der Sensitec GmbH mit einem Einzelwiderstand ohne Signalinterferenzen realisiert werden.

Elementarer Bestandteil des magnetischen *Workflows* zur Einzelzelldetektion ist der unter dem Si-Chip platzierte NdFeB-Magnet. Die superparamagnetisch markierten Zellen bilden im externen Magnetfeld ein lokales Streufeld aus und werden an der Substanoberfläche angereichert. Eine Analyse der Beeinflussung des externen Magnetfeldes auf die GMR-Sensoren mit einem Präzisionskreuztisch zeigt, dass die X- und Y-Komponenten des Magneten auf Ebene der funktionellen Schichten des GMR-Stapels die Sensitivität stark beeinträchtigen. Über die Steilheit der Hysteresekennlinie wird der homogene Magnetbereich des Permanentmagneten definiert, der eine magnetische Messung mit dem empfindlichen magnetoresistiven System erlaubt. Für das IPHT-Multilagensystem, bei einem Magnetfeld von 150 mT, kann so eine Fläche von  $200 \times 600 \mu\text{m}$  des  $32 \times 27 \times 6 \text{ mm}$  Magneten definiert werden, die bei drei Magneten aus zwei verschiedenen Herstellungslosen nahezu konstant bleibt. Der externe Permanentmagnet erlaubt somit eine *in-situ* magnetische Anreicherung im Gradientenfeld und eine sensitive, magnetische Einzelzellerfassung über einem ausreichend homogenen Magnetbereich. Die Durchflusszytometrie kann damit ohne aufwendigen Einsatz von Spulen und hohem Energieaufwand für Magnetfelder  $>100 \text{ mT}$  realisiert werden.

Die Wheatstone Brückenordnung der GMR-Sensoren ermöglicht die Erzeugung von charakteristischen Signalmustern, durch Kombination von diagonalen bzw. parallelen Einzelwiderständen. Das diagonale Design kombiniert zwei diagonale Brückenwiderstände, die ein 4-Peak-Signalmuster liefern, und wird in dieser Arbeit im Hinblick auf einen optimalen Brückenabgleich des Systems im Nullzustand optimiert.

Zusätzlich wird ein paralleles Design eingeführt, das alle 4 Brückenelemente aktiv nutzt und, anordnet zu zwei Paaren paralleler Elemente, in einem charakteristischen 6-Peak-Signal resultiert. Vorteil der parallelen Ausführung ist die Ausbildung eines dominanten Signalanteils durch Überlagerungen von zwei Einzelsignalen. Zusätzlich wird ein Designansatz getestet, der aus mäanderförmigen GMR-Elementen besteht und an das diagonale Layout angelehnt ist. Paralleles Design sowie Mäander Layout wurden verworfen auf Grund der starken Überlagerungen der Signale der Einzelemente, was zu einer Unschärfe in der Laufzeitbetrachtung der Signalmuster führt. In Kombination mit den hochsensitiven GMR-Sensoren von Sensitec können superparamagnetisch markierte Tumorzellen über eine TOF-Signalanalyse unter Verwendung der diagonalen Brückenanordnung bei ausreichend SNR ausgewertet werden.

Durch Optimierung der ferromagnetischen *Chevron*-Pattern wurde sowohl für Referenzanalyte, als auch für FaDu-Tumorzellen und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen eine magnetophoretische Führungseffizienz von >96% nachgewiesen. Ungebundene superparamagnetische Marker mit einem Durchmesser von ~200 nm aggregieren an den Ni-Strukturen und werden bei durchschnittlichen Magnetfelder von 150 mT erst bei Durchflussraten von >25  $\mu\text{L s}^{-1}$  im laminaren Fluss mitgetragen, was mehr als dem zehnfachen der Messgeschwindigkeit entspricht. Zusätzlich wird ein zur magnetophoretischen Anreicherung alternatives Konzept entwickelt. Mit dem Ziel einer Minimierung des *Si-Footprints* soll die Magnetophorese in einem hybriden Ansatz mit einer vorgeschalteten mechanischen Anreicherung kombiniert werden. Hier wurde die Funktionalität eines rein mechanischen Anreicherungsmechanismus an selbstgefertigten Lackstegen demonstriert, wobei die ermittelten Layoutspezifikationen über einen Technologietransfer zur Fertigung eines Spritzguss-Bauteils beigetragen haben.

Zum tieferen Verständnis der Analytbewegung im fluidischen Kanalsystem und der Interaktion mit der Substratoberfläche für die TOF-Signalanalyse konnte fluoreszenzmikroskopisch eine Rollbewegung der Analyte in PBS nachgewiesen werden. Ein Vergleich des *Chevron*-Patterns nach einer Messung von Referenzanalyten in EDTA-Vollblut zeigt im Gegensatz zur analogen Erfassung in PBS in einer qualitativen Beobachtung keine Beadaggregationen an den ferromagnetischen Strukturen. Dies kann durch den Fåhræus-Effekt erklärt werden, wonach sich verformbare RBCs entlang des Geschwindigkeitsgradienten von der Kanalwand wegbewegen und bereits bei Scherraten ab  $\sim 30 \text{ s}^{-1}$  eine 2-4  $\mu\text{m}$  hohe Verarmungszone bilden. Unter Annahme der Ausbildung des Fåhræus-Effekts bei einer vorherrschenden Scherrate von  $\sim 54 \text{ s}^{-1}$  kann das Ausbleiben der Beadaggregationen über Stoßprozesse der Erythrozyten erklärt werden, die  $\sim 60\%$  einer 12  $\mu\text{m}$  Zelle aktiv beeinflussen. Stabile

Messbedingungen in Nicht-Newtonschem Vollblut konnten unabhängig von der Verarmungszone mit einer Gegenüberstellung der errechneten, theoretischen Zellgeschwindigkeit im laminaren Fluss in PBS und der magnetisch ermittelten Geschwindigkeit der Analyte in Vollblut nachgewiesen werden. Das charakteristische Signalmuster kann unter diesen stabilen Bedingungen sowohl in PBS, als auch in EDTA-Vollblut mit magnetischen Referenzanalyten und spezifisch markierten Zellen bei nahezu konstantem Signal-Rausch-Verhältnis reproduzierbar abgebildet werden.

Für die TOF-Signalauswertung werden charakteristische Parameter auf Basis des 4-Peak-Signalmusters definiert, die über die ermittelte Zellgeschwindigkeit vom Zeit- in den Wegbereich transformiert werden können. Zur Größenbestimmung wird ein magnetischer Durchmesser eingeführt. Die Umrechnung des magnetischen in den hydrodynamischen Durchmesser erfolgt über einen simulierten Korrekturfaktor, der mit einer Messreihe von Referenzanalyten verifiziert wird. Die magnetische Differenzierung von 3, 6 und 12  $\mu\text{m}$  Referenzanalyten wird in drei separaten Durchläufen mit der Streulichtmessung eines optischen Durchflusszytometers, dem Goldstandard in der Einzelzelldetektion, verglichen. Auf Basis der magnetischen TOF-Parameter kann sowohl in PBS, als auch in Vollblut eine vollständige Trennung der Populationen erreicht werden. Die vergleichbare Qualität zur optischen Datenerfassung in PBS, liefert somit eine erste Validierung der magnetischen Durchflusszytometrie als potentielle Messmethode zur Einzelzelldetektion in Vollblut.

Zur Bewertung der Messpräzision bei der Größen- und Volumenbestimmung von FaDu-Tumorzellen mit der magneto-resistiven TOF-Einzelzelldetektion in EDTA-Vollblut wird der magnetisch ermittelte Durchmesser mit den Ergebnissen einer Coulter-Counter Messung, dem Goldstandard der Zellvolumenbestimmung, verglichen. Ein Beckman Coulter Z2 dient dabei als Referenzinstrument, während der Handheld Scepter Coulter-Counter von Millipore, als tragbares Gerät ein Pendant zur magnetischen Detektion darstellt. Bei der Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers zeigt die magneto-resistive Messung eine Abweichung von +10% zum durchschnittlichen Wert des Beckman Coulter, während das mittlere Ergebnis des Scepter Coulter eine Verschiebung von -16% aufweist. Unter Annahme einer sphärischen Form der FaDu-Tumorzellen wird eine volumetrische Größenbestimmung mit einer Auflösung von 200 nL im Blut realisiert. Eine Gegenüberstellung mit den Ergebnissen des Beckman Coulter zeigt eine Abweichung der Mittelwerte <2%, wodurch die magneto-resistive Einzelzelldetektion als präzises Messverfahren zur Größenbestimmung von spezifisch markierten Zellen in Vollblut bestätigt wird.



---

## Literaturverzeichnis

- [1] S. Lindström und H. Andersson-Svahn, „Overview of single-cell analysis: microdevices and applications,“ *Lab Chip*, Bd. 10, pp. 3363-3372, 2010.
- [2] S. Cho, J. Godin, C.-H. Chen, W. Qiao, H. Lee und Y.-H. Lo, „Recent advancements in optofluidic flow cytometer,“ *Biomicrofluidics*, Bd. 4, Nr. 043001, pp. 1-24.
- [3] H. Maecker und J. McCroy Jr., „A model for harmonizing flow cytometry in clinical trials,“ *Nature Immunol.*, Bd. 11, Nr. 11, pp. 975-978, 2010.
- [4] S. Schumacher, J. Nestler, M. Wegener, S. Palzer, A. Teichert und F. Bier, „Highly-integrated lab-on-chip system for point of care multiparameter analysis,“ *Lab Chip*, Bd. 12, pp. 464-473, 2012.
- [5] W. Ghöde, „Automatisches Mess- und Zählgerät für die Teilchen einer Dispersion“. Patent DE1815352, 1968.
- [6] W. Bonner, H. Hulett, R. Sweet und L. Herzenberg, „Fluorescence activated cell sorting,“ *Rev Sci Instrum*, Bd. 43, Nr. 3, pp. 404-409, 1972.
- [7] J. Picot, C. Guerin, C. Le Van Kim und C. Boulanger, „Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation,“ *Cytotechnology*, Bd. 64, pp. 109-130.
- [8] F. DiSerio, M. Petronelli und E. Sammartino, „Laboratory testing during critical care transport: point-of-care testing in air ambulances,“ *Clin. Chem. Lab. Med.*, Bd. 48, Nr. 7, pp. 955-961, 2010.
- [9] X. Mao, A. Nawaz, S.-C. Lin, M. Lapsley, Y. Zhao, J. McCoy, W. El-Deiry und T. Huang, „An integrated, multiparametric flow cytometry chip using "microfluidic drifting" based three-dimensional hydrodynamic focusing,“ *Biomicrofluidics*, Bd. 6, Nr. 024113, pp. 1-9.
- [10] S. Arpali, C. Arpali, A. Coskun, H.-H. Chiang und A. Ozcan, „High-throughput screening of large volumes of whole blood using structured illumination and fluorescent on-chip imaging,“ *Lab Chip*, Bd. 12, pp. 4968-4971, 2012.

- [11] M. Piyasena und S. Graves, „The intersection of flow cytometry with microfluidics and microfabrication,“ *Lab Chip*, Bd. 14, pp. 1044-1059, 2014.
- [12] H. Shapiro, *Practical Flow Cytometry*, John Wiley & Sons, 2003, p. 480.
- [13] W. Ghöde, U. Cassens, L. Lehman, Y. Traore, W. Ghöde jun., B. Perkes, C. Westerberg und B. Greve, „Individual patient-dependent influence of erythrocyte lysing procedures on flow-cytometric analysis of leukocyte subpopulations,“ *Transfus Med Hemother*, Bd. 30, pp. 165-170, 2003.
- [14] B. Greve, C. Beller, U. Cassens, W. Sebrowski und W. Ghöde, „The impact of erythrocyte lysing procedures on the recovery of hematopoietic progenitor cells in flow cytometric analysis,“ *Stem Cells*, Bd. 24, Nr. 3, pp. 793-799, 2006.
- [15] D. Huh, W. Gu, Y. Kamotani, J. Grotberg und S. Takayama, „Microfluidics for flow cytometric analysis of cells and particles,“ *Physiol. Meas.*, Bd. 26, pp. R73-R98, 2005.
- [16] A. Kose und A. Koser, „Ferrofluid mediated nanocytometry,“ *Lab Chip*, Bd. 12, pp. 190-196, 2012.
- [17] K. Chung, Y. Choi, J.-H. Yang, C. Park, W.-J. Kim, C. Ah und G. Sung, „Magnetically-actuated blood filter unit attachable to pre-made biochips,“ *Lab Chip*, Bd. 12, pp. 3272-3276, 2012.
- [18] T. Forbes und S. Forry, „Microfluidic magnetophoretic separations of immunomagnetically labeled rare mammalian cells,“ *Lab on Chip*, Bd. 12, pp. 1471-1479, 2012.
- [19] A. Fu, C. Spence, A. Scherer, F. Arnold und S. Quake, „A microfabricated fluorescence-activated cell sorter,“ *Nature Biotechnol.*, Bd. 17, pp. 1109-1111, 1999.
- [20] P. Kiesel, M. Beck, N. Johnson und M. Bassler, „Microfluidic-based detection platform for on-the-flow analyte characterization,“ *Proc. of SPIE*, Bd. 7606, pp. 760608-1-8, 2010.
- [21] B. McKenna, J. Evans, M. Cheung und D. Ehrlich, „A parallel microfluidic flow cytometer for high-content screening,“ *Nature Methods*, Bd. 8, pp. 401-403, 2011.

- 
- [22] J. Loureiro, P. Andrade, S. Cardoso, C. da Silva, J. Cabral und P. Freitas, „Magnetoresistive chip cytometer,“ *Lab Chip*, Nr. 11, pp. 2255-2261, 2011.
- [23] P. Liu, K. Skucha, M. Megens und B. Boser, „A CMOS Hall-effect sensor for the characterization and detection of magnetic nanoparticles for biomedical applications,“ *IEEE Trans. Magn.*, Bd. 47, Nr. 10, pp. 1-4, 2011.
- [24] M. Tondra, M. Porter und R. Lipert, „Model for detection of immobilized superparamagnetic nanosphere assay labels using giant magnetoresistive sensors,“ *J. Vac. Sci. Technol. A*, Bd. 18, Nr. 4, pp. 1125-1129, 2000.
- [25] S. Wang und G. Li, „Advances in giant magnetoresistance biosensors with magnetic nanoparticle tags: Review and outlook,“ *IEEE Transactions on Magnetics*, Bd. 44, Nr. 7, pp. 1687-1702, 2008.
- [26] R. Vogt, W. Whitfield, L. Hendersen und W. Hannon, „Fluorescence intensity calibration for immunophenotyping by flow cytometry,“ *Methods*, Nr. 21, pp. 289-296.
- [27] J. Higgins und L. Mahadevan, „Physiological and pathological population dynamics of circulating human red blood cells,“ *PNAS*, Bd. 107, Nr. 47, pp. 20587-20592, 2010.
- [28] G. Rothe und G. Valet, „Phagocytosis, intracellular pH, and cell volume in the multifunctional analysis of granulocytes by flow cytometry,“ *Cytometry*, Nr. 9, pp. 316-324, 1988.
- [29] M. Kutcher und M. Cohen, „Characterization of platelet dysfunction after trauma,“ *Trauma Acute Care Surg.*, Bd. 73, Nr. 1, pp. 13-19, 2012.
- [30] M. Hoffman und D. Monroe, „Coagulation 2006: A modern view of hemostasis,“ *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.*, Nr. 21, pp. 1--11, 2007.
- [31] D. Baselt, G. Lee, M. Natesan, S. Metzger, P. Sheehan und R. Colton, „A biosensor based on magnetoresistance technology,“ *Biosens. Bioelectron.*, Bd. 13, pp. 731-739, 1998.
- [32] C. Liu, T. Stakenborg, S. Peeters und L. Lagae, „Cell manipulation with magnetic particles toward microfluidic cytometry,“ *Journal of applied physics*, Bd. 105, Nr. 102014, pp. 1-11, 2009.

- [33] M. Gijs, F. Lacharme und U. Lehmann, „Microfluidic applications of magnetic particles for biological analysis and catalysis,“ *Chem. Rev.*, Bd. 110, Nr. 3, pp. 1518-1563, 2010.
- [34] N. Pamme, „Magnetism and microfluidics,“ *Lab Chip*, Nr. 6, pp. 24-38, 2006.
- [35] M. Djamal, R. Ramli, F. Haryanto und K. Khairurrijal, „GMR biosensors for clinical diagnostic,“ in *s Biosensors for health, environment and biosecurity*, Intech, 2011, pp. 149-164.
- [36] M. Megens und M. Prins, „Magnetic biochips: a new option for sensitive diagnostics,“ *J. Magn. Magn. Mater.*, Nr. 293, pp. 702-708, 2005.
- [37] J. Schotter, P. Kamp, A. Becker, A. Pühler, D. Brinkmann, W. Schepper, H. Brückl und G. Reiss, „A biochip based on magnetoresistive sensors,“ *IEEE T. Magn.*, Bd. 38, Nr. 5, pp. 3365-3367, 2002.
- [38] R. Weiss, R. Mattheis und G. Reiss, „Advanced giant magnetoresistance technology for measurement applications,“ *Meas. Sci. Technol.*, Bd. 24, Nr. 082001, pp. 1-17, 2013.
- [39] R. Groß, Grundlagen der Magnetoelektronik, Walther-Meissner-Institut, 2000, pp. 9,10,81,211.
- [40] W. Thomson, „On the electrodynamic qualities of metals: effects of magnetization on the electric conductivity of nickel and of iron,“ *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, Bd. 146, Nr. 3, pp. 546-550, 1856.
- [41] R. McGuire und R. Potter, „Anisotropic magnetoresistance in ferromagnetic 3d alloys,“ *IEEE Trans. Magn.*, Bd. 11, Nr. 4, pp. 1018-1038, 1975.
- [42] G. Binasch, P. Grünberg, F. Saurenbach und W. Zinn, „Enhanced magnetoresistance in layered magnetic structures with antiferromagnetic interlayer exchange,“ *Phys. Rev. B*, Bd. 39, Nr. 7, pp. 4828-4830, 1989.
- [43] M. Baibich, M. Broto, A. Fert, F. Nguyen und F. Petroff, „Giant magnetoresistance of (001) Fe / (001) Cr magnetic superlattices,“ *Phys. Rev. Lett.*, Bd. 61, Nr. 21, pp. 2472-2475, 1988.
- [44] S. Parkin, N. More und K. Roche, „Oscillations in exchange coupling and magnetoresistance in metallic superlattice structures: Co/Ru, Co/Cr, and Fe/Cr,“ *Phys. Rev. Lett.*, Bd. 64, Nr. 19, pp. 2304-2308, 1990.



- 
- [45] A. Paetzold, Thermische Stabilität und Modifizierung der Austauschisotropie in Schichtsystemen, Dissertation, 2002, pp. 5-7,10,11.
- [46] S. Wolf, D. Awschalom, R. Buhrman, J. Daughton, S. von Molnar, M. Roukes, A. Chtchelkanova und D. Treger, „Spintronics: A spin-based electronics vision for the future,“ *Magnetism and Materials*, Nr. 294, pp. 1488-1495, 2001.
- [47] A. Fert, „The present and the future of spintronics,“ *Thin Solid Films*, Nr. 517, pp. 2-5, 2008.
- [48] S. Parkin, Z. Lee und D. Smith, „Giant magnetoresistance in antiferromagnetic Co/Cu multilayers,“ *Appl. Phys. Lett.*, Bd. 58, pp. 2710-2712, 1991.
- [49] B. Dieny, „Giant magnetoresistance in spin-valve multilayers,“ *J. Magn. Magn. Mater.*, Nr. 136, pp. 335-359, 1994.
- [50] N. Mott, „Electrons in transition metals,“ *Adv. Phys.*, pp. 325-422, 1964.
- [51] W. Meiklejohn und C. Bean, „New magnetic anisotropy,“ *Phys. Rev.*, Bd. 102, Nr. 5, pp. 1413-1414, 1956.
- [52] R. Wirix-Speetjens, W. Fyen, J. de Boeck und G. Borghs, „Single magnetic particle detection: Experimental verification of simulated behavior,“ *J. Appl. Phys.*, Bd. 99, Nr. 103903, pp. 1-4, 2006.
- [53] P. Grünberg, R. Schreiber und Y. Pang, „Layered magnetic structures: evidence for antiferromagnetic coupling of Fe layers across Cr interlayers,“ *Phys. Rev. Lett.*, Bd. 57, Nr. 19, pp. 2442-2445, 1986.
- [54] M. Ruderman und C. Kittel, „Indirect exchange coupling of nuclear magnetic moments by conduction electrons,“ *Phys. Rev.*, Bd. 96, Nr. 1, pp. 99-102, 1954.
- [55] K. Yosida, „Magnetic properties of Cu-Mn alloys,“ *Phys. Rev.*, Bd. 106, Nr. 5, pp. 893-899, 1957.
- [56] R. Boll, Weichmagnetische Werkstoffe, Siemens Aktiengesellschaft, 1990, pp. 18-21, 35, 39.
- [57] I. Jedlicska, Modellierung und Echtzeit-Kompensation der Hystereseeffekte bei GMR-Gradientenmessbrücken, Dissertation, 2009, pp. 13-15.

- [58] Bergmann/Schäfer, Lehrbuch der Experimentalphysik, Band 6, Festkörper, de Gruyter, 2005, p. 440; 444.
- [59] J. M. D. Coey, Magnetism and Magnetic Materials, Cambridge Univ. Press, 2010, pp. 10, 36, 168-173.
- [60] K. Ludwig, J. Hauch, K.-U. Barholz und G. Rieger, „Adapting GMR sensors for integrated devices,“ *Sens. Act. A*, Nr. 106, pp. 15-18, 2003.
- [61] S. George, „Atomic Layer Deposition: An Overview,“ *Chem. Rev.*, Nr. 110, pp. 111-131, 2010.
- [62] T. Suntola und J. Antson, „Method for producing compound thin films“. Patent 4,058,430, 1977.
- [63] M. Leskelä und M. Ritala, „Atomic layer deposition (ALD): from precursors to thin film structures,“ *Thin Solid Films*, Nr. 409, pp. 138-146, 2002.
- [64] T. Suntola, „Atomic layer epitaxy,“ *Mater. Sci. Rep.*, Bd. 4, Nr. 5, pp. 261-312, 1989.
- [65] M. Leskelä und M. Ritala, „Atomic Layer Deposition Chemistry: Recent Developments and Future Challenges,“ *Angew. Chem. Int. Ed.*, Nr. 42, pp. 5548-5554, 2003.
- [66] Cambridge NanoTech, Savannah 200 - Atomic Layer Deposition, User Manual, 2007, p. 10.
- [67] A. Langner, M. Knez und U. Gösele, „Herstellung von Nanostrukturen mittels Atomlagenabscheidung,“ *Chemie Ingenieur Technik*, Bd. 80, Nr. 11, pp. 1719-1724, 2008.
- [68] J. Elam, M. Groner und S. George, „Viscous flow reactor with quartz crystal microbalance for thin film growth,“ *Rev. Sci. Instrum.*, Bd. 73, Nr. 8, pp. 2981-2987, 2002.
- [69] R. Matero, A. Rahtu, M. Ritala, M. Leskelä und T. Sajavaara, „Effect of water dose on the atomic layer deposition rate of oxide thin films,“ *Thin Solid Films*, Nr. 368, pp. 1-7, 2000.

- 
- [70] A. Ott, J. Klaus, J. Johnson und S. George, „Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> thin film growth on Si (100) using binary reaction sequence chemistry,“ *Thin Solid Films*, Nr. 292, pp. 135-144, 1997.
- [71] N. Thanh, *Magnetic nanoparticles - from fabrication to clinical applications*, CRC Press, 2012, pp. 19-23.
- [72] A.-H. Lu, E. Salabas und S. Schüth, „Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application,“ *Angew. Chem. Int. Ed.*, Nr. 46, pp. 1222-1244, 2007.
- [73] B. Alberts, *Molekularbiologie der Zelle*, Weinheim: VCH, 1995, p. 1375.
- [74] M. Helou, „Magnetische Durchflusszytometrie,“ Diplomarbeit, 2010.
- [75] J. Mejía-López, R. Ramírez und M. Kiwi, „Analytic treatment of the incomplete ferromagnetic domain-wall model for exchange bias,“ *J. Magn. Magn. Mater.*, Nr. 241, pp. 364-370, 2002.
- [76] M. Kim, H. Kim, K. Kim, S. Jang und T. Kang, „The annealing effect on GMR properties of PtMn-based spin valve,“ *J. Magn. Magn. Mater.*, Bd. 239, pp. 195-197, 2002.
- [77] R. Öksüzoglu, C. Schug und B. York, „Influence of stress and unidirectional field annealing on structural and magnetic performance of PtMn bottom spin-filter spin valves,“ *J. Magn. Magn. Mater.*, Bd. 280, pp. 304-310, 2004.
- [78] H. Yang, K.-I. Min, Y. Kim, S. Lee, G.-S. Park und S. Song, „Microstructural evolution in PtMn-based spin-valves induced by heat treatment,“ *J. Magn. Magn. Mater.*, Nr. 226, pp. 2070-2072, 2001.
- [79] J. McDonald, D. Duffy, J. Anderson, D. Chiu, H. Wu, O. Schueller und G. Whitesides, „Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane),“ *Electrophoresis*, Nr. 27, pp. 27-40, 2000.
- [80] D. Duffy, J. McDonald, O. Schueller und G. Whitesides, „Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane),“ *Anal. Chem.*, Bd. 70, Nr. 23, pp. 4974-4984, 1998.
- [81] H. Wu, B. Huang und R. Zare, „Construction of microfluidic chips using polydimethylsiloxane for adhesive bonding,“ *Lab on a Chip*, Nr. 5, pp. 1393-1398, 2005.

- [82] Stanford Research Systems, About lock in amplifiers, Application Note.
- [83] Femto, Lock-In-Verstärker Serie LIA-MV(D)-200, User Manual, 2006.
- [84] „Micromod Partikeltechnologie GmbH,“ [Online]. Available: [www.micromod.de](http://www.micromod.de). [Zugriff am 10 01 2014].
- [85] S. Foner, „Versatile and sensitive Vibrating-sample Magnetometer,“ *The Review of Scientific Instruments*, Bd. 13, Nr. 7, pp. 548-557, 1959.
- [86] W. Burgei, M. Pechan und H. Jaeger, „A simple vibrating sample magnetometer for use in a materials physics course,“ *Am. J. Phys.*, Bd. 71, Nr. 8, pp. 825-828, 2003.
- [87] D. Alizahderad, Y. Imai, K. Nakaaki, T. Ishikawa und T. Yamaguchi, „Parallel Simulation of Cellular flow in microvessels using particle method,“ *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, Bd. 7, Nr. 1, pp. 57-68, 2012.
- [88] S. Rangan, „A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma,“ *Cancer*, Bd. 29, Nr. 1, pp. 117-121, 1972.
- [89] D. Bray, J. Bagu und J. Kögler, „Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri II, and critical-point drying methods for scanning electron microscopy of biological specimens,“ *Microscopy Research and Technique*, Bd. 26, Nr. 6, pp. 489-495, 1993.
- [90] P. Baeuerle und O. Gires, „EpCAM (CD326) finding its role in cancer,“ *British Journal of Cancer*, Bd. 96, Nr. 3, pp. 417-423, 2007.
- [91] M. Pavelka, A. Ellinger, B. Debagge, C. Löwe, M. Vetterlein und J. Roth, „Endocytic routes to the Golgi apparatus,“ *Histochemistry and cell biology*, Bd. 109, Nr. 5-6, pp. 555-570, 1998.
- [92] J. Daughton, „GMR applications,“ *Journal of Magnetism and magnetic materials*, Bd. 192, pp. 334-342, 1999.
- [93] S. Miltenyi, W. Müller, W. Weichel und A. Radbruch, „High Gradient Magnetic Cell Separation With MACS,“ *Cytometry*, Bd. 11, pp. 231-238, 1990.
- [94] N. Xia, P. Hunt, T. Mayers, E. Alsberg und G. Whitesides, „Combined microfluidic-micromagnetic separation of living cells in continuous flow,“ *Biomed. Microdevices*, Bd. 8, pp. 299-308, 2006.

- 
- [95] J. Adams, U. Kim und H. Soh, „Multitarget magnetic activated cell sorter,“ *PNAS*, Bd. 105, Nr. 47, pp. 18165-18170, 2008.
- [96] D. Vestweeber und J. Blanks, „Mechanisms that regulate the functions of the selectins and their ligands,“ *Physiological Reviews*, Bd. 79, Nr. 1, pp. 182-213, 1999.
- [97] W. Wibel, „Untersuchungen zu laminarer, transitioneller und turbulenter Strömung in rechteckigen Mikrokanälen,“ Institut für Mikroverfahrenstechnik, Forschungszentrum Karlsruhe, 2009.
- [98] W. Wibel und P. Ehrhard, „Experiments on the laminar/turbular transition of liquid flows in rectangular microchannels,“ *Heat Transfer Engineering*, Bd. 30, pp. 70-77, 2009.
- [99] B. Munson, D. Young und T. Okiishi, *Fundamentals of Fluid Mechanics*, Wiley, 2006, pp. 115ff, 448.
- [100] S. Ganzer, J. Bayreuther, J. Hauch und G. Rieger, „High speed signal transmission with magneto-couplers,“ *Journal of Applied Physics*, Bd. 93, Nr. 10, pp. 6867-6869, 2003.
- [101] R. Chaves, D. Bensimon und P. Freitas, „Single molecule actuation and detection on a lab-on-a-chip magnetoresistive platform,“ *Journal of applied physics*, Bd. 109, Nr. 064702, pp. 1-8, 2011.
- [102] M. Ormerod, *Flow Cytometry - A Basic Introduction*, DeNovo Software, 2008.
- [103] G. Marsaglia, „Choosing a point from the surface of a sphere,“ *The annals of mathematical statistics*, Bd. 43, Nr. 2, pp. 645-646, 1979.
- [104] R. Pulvertaft, „Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma),“ *Lancet*, Bd. 283, Nr. 7327, pp. 238-240, 1964.
- [105] M. Jimbo, K. Komiyama, Y. Shirota, Y. Fujiware, S. Tsunashima und M. Matsuura, „Thermal stability of spin valves using amorphous CoFeB,“ *Journal of Magn. and Magn. Mat.*, Nr. 165, pp. 308-311, 1997.
- [106] NVE Corporation, *GMR sensors, Application Note*, p. 80.
- [107] R. Weiss, *Private Kommunikation, Siemens Corporate Technology*, 2014.

- [108] „IBS Magnet,“ [Online]. Available: [www.ibsmagnet.de](http://www.ibsmagnet.de). [Zugriff am 10.01.2014].
- [109] M. Weickhmann, „Nd-Fe-B Magnets, properties and applications,“ Vacuumschmelze GmbH & Co. KG, Hanau.
- [110] B. Ma, J. Herchenroeder, B. Smith, M. Suda, D. Brown und Z. Chen, „Recent development in bonded NdFeB magnets,“ *J. Magn. Magn. Mater.*, Nr. 239, pp. 418-423, 2002.
- [111] H. Warlimont, *Magnetwerkstoffe und Magnetsysteme*, DGM, 1990, pp. 8-9;13.
- [112] M. Sagawa, S. Fujimura, N. Togawa, H. Yamamoto und Y. Matsuura, „New material for permanent magnets on base of Nd and Fe,“ *J. Appl. Phys.*, Bd. 55, Nr. 6, pp. 2083-2088, 1984.
- [113] J. Croat, J. Herbst, R. Lee und F. Pinkerton, „Pr-Fe and Nd-Fe-based materials: A new class of high-performance permanent magnets,“ *J. Appl. Phys.*, Bd. 55, Nr. 6, pp. 2078-2083, 1984.
- [114] J. Herbst, J. Croat und F. Pinkerton, „Relationships Between Crystal Structure and Magnetic Properties in Nd<sub>2</sub>Fe<sub>14</sub>B,“ *Phys. Rev. B*, Bd. 29, Nr. 7, pp. 1-4, 1984.
- [115] F. Liu, X. Yang, Y. Dai, F. Luo, S. Wang und H. Zhang, „Corrosion resistance of environment-friendly sealing layer for Zn-coated sintered NdFeB magnet,“ *Materials and Corrosion*, Bd. 62, Nr. 12, pp. 1141-1148, 2011.
- [116] W. Rodewald, M. Katter und G. Reppel, „Fortschritte bei pulvermetallurgisch hergestellten Neodym-Eisen-Bor Magneten,“ Vacuumschmelze GmbH & Co KG, Hanau.
- [117] M. Reisbeck, „Aufbau eines Demonstrators zur magnetischen Durchflusssyztometrie,“ Bachelorarbeit, pp. 33-41, 2011.
- [118] Z. Wu und K. Hjort, „Microfluidic Hydrodynamic Cell Separation: A Review,“ *Micro and Nanosystems*, Bd. 1, Nr. 3, pp. 1-12, 2009.
- [119] F. Jiang, K. Drese, S. Hardt, M. Küpper und F. Schönfeld, „Helical Flows and Chaotic Mixing in Curved Micro Channels,“ *AIChE Journal*, Bd. 50, Nr. 9, pp. 2297-2305, 2004.

- [120] R. Millen, T. Kawaguchi, M. Granger, M. Porter und M. Tondra, „Giant Magnetoresistive Sensors and superparamagnetic nanoparticles: achip-scale detection strategy for immunosorbent assays,“ *Anal. Chem.*, Bd. 77, Nr. 20, pp. 6581-6587, 2005.
- [121] A. Holleman und N. Wiberg, Lehrbuch der anorganischen Chemie, de Gruyter, 2007, pp. 1709-1711.
- [122] D. Inglis, R. Riehn, R. Austin und J. Sturm, „Continuous microfluidic immunomagnetic cell separation,“ *Applied Physics Letters*, Bd. 85, Nr. 21, pp. 5093-5095, 2004.
- [123] J. Thonhauser, „Vision-based ground truth for a magnetic flow cytometry sensor,“ Masterarbeit, 2011.
- [124] R. Girisha und S. Murali, „Segmentation of Motion Objects from Four Successive Video Frames Simultaneously Using Multiple Correlation,“ *Advances in Computing, Control, & Telecommunication Technologies, International Conference*, pp. 319-323, 2009.
- [125] R. Bozorth, Ferromagnetism, IEEE Press, 1993, p. 109.
- [126] M. M., Signalverarbeitung, Vieweg+Teuber, 2009, p. 287ff.
- [127] D. Reasor, „Numerical Simulation of cellular blood flow,“ Dissertation, pp. 118, 2011.
- [128] H. Bruus, Theoretical Microfluidics, Oxford University Press, 2008, p. 48ff.
- [129] H. Lipowsky, „Microvascular rheology and hemodynamics,“ *Microcirculation*, Bd. 12, Nr. 1, pp. 5-15, 2005.
- [130] S. Kim, A. Popel, M. Intaglietta und P. Johnson, „Aggregate formation of erythrocytes in postcapillary venules,“ *American Journal of Physiology. Heart and circulatory Physiology*, Bd. 288, Nr. 2, pp. H584-H590, 2005.
- [131] J. Jung und K.-H. Han, „Lateral-driven continuous magnetophoretic separation of blood cells,“ *Applied Physics Letter*, Bd. 93, Nr. 223902, pp. 1-3, 2008.
- [132] M. Reisbeck, „Laufzeitmessung zur Zelldurchmesserbestimmung mit der magnetischen Durchflusszytometrie,“ Masterarbeit, 2013.

- [133] A. Wiemhöfer, „Magnetic Flow Cytometry - Simulation and TOF Measurement of Superparamagnetic Analytes,“ Diplomarbeit, p. 62, 2013.
- [134] E. Wedege und G. Svenneby, „Effects of the blocking agents bovine serum albumin and Tween 20 in different buffers on immunoblotting of brain proteins and marker proteins,“ *Journal of Immunological Methods*, Bd. 88, Nr. 2, pp. 233-237, 1986.
- [135] A. Waser, „Die logarithmische Verteilung in der Natur,“ *Raum&Zeit*, Nr. 123, 2003.



## Publikationen mit eigener Beteiligung

- [136] M. Helou, M. Reisbeck, S. Tedde, L. Richter, L. Bär, J. Bosch, R. Stauber, E. Quandt und O. Hayden, „Time-of-flight magnetic flow cytometry in whole blood with integrated sample preparation,“ *Lab Chip*, Nr. 13, 1035-1038, 2013.
- [137] M. Helou, M. Reisbeck, S. Tedde, L. Richter, L. Bär, J. Bosch, R. Stauber, E. Quandt und O. Hayden, „Integrating sample preparation for magnetic flow cytometry,“ *Magnetoresistive Sensors and Magnetic Systems, 12th Symposium*, 2013.
- [138] M. Helou, L. Richter und O. Hayden, „Durchflusszytometrie: Erste Schritte zur patientennahen Einzelzelldiagnostik,“ *Forum Aktuell*, Nr. 2, 9-10, 2013, (eingeladener Beitrag für die Kundenzeitschrift von Siemens Healthcare Diagnostics).



## Patentanmeldungen

- [139] M. Helou, S.F. Tedde und O. Hayden, „Magnetische Zelldetektion“. Patentanmeldung WO2012059414 A1, 2010.
- [140] M. Helou, S.F. Tedde und O. Hayden, „Magnetische Durchflusszytometrie zur Einzelzelldetektion“. Patentanmeldung WO2012031918 A1, 2010.
- [141] M. Helou, M. Reisbeck, S.F. Tedde und O. Hayden, „Magnetische Durchflusszytometrie für hohen Probendurchsatz“. Patentanmeldung WO2012116913 A1, 2010.
- [142] M. Helou, M. Reisbeck, S.F. Tedde und O. Hayden, „Miniaturisierte magnetische Durchflusszytometrie“. Patentanmeldung WO2012116906 A1, 2010.
- [143] M. Helou, M. Reisbeck, L. Bär, M. Rührig, M. Megens, S.F. Tedde und O. Hayden, „Method and apparatus for magnetic flow cytometry“. Patentanmeldung WO2013000853 A1, 2010.
- [144] M. Helou, M. Reisbeck, S.F. Tedde und O. Hayden, „Hintergrundfreie magnetische Durchflusszytometrie“. Patentanmeldung WO2012175374 A1, 2011.
- [145] M. Helou, M. Reisbeck, S.F. Tedde und O. Hayden, „Dynamische Zustandsbestimmung von Analyten mittels magnetischer Durchflussmessung“. Patentanmeldung WO2013023910 A1, 2011.
- [146] M. Helou, S.F. Tedde und O. Hayden, „Strömungsmechanische Zellführung für Durchflusszytometrie“. Patentanmeldung WO2013014146 A1, 2011.
- [147] M. Helou, M. Reisbeck, S.F. Tedde und O. Hayden, „Einzelanalyterfassung mittels magnetischer Durchflussmessung“. Patentanmeldung WO2013023909 A1, 2011.
- [148] M. Helou, L. Richter, und O. Hayden, „Verfahren und Anordnung zur partiellen Markierung und anschließenden Quantifizierung von Zellen einer Zellsuspension“. Patentanmeldung DE102012210457 A1, 2012.
- [149] M. Helou, L. Richter und O. Hayden, „Verfahren und Anordnung zur Detektion von Zellen in einer Zellsuspension“. Patentanmeldung, WO2013189722 A1, 2012.

- [150] M. Helou, L. Richter und O. Hayden, „Anordnung zur Quantifizierung von Zellen einer Zellsuspension“. Patentanmeldung WO2014005869 A1, 2012.
- [151] M. Helou, L. Richter und O. Hayden, „Verfahren zum Anreichern und Vereinzeln von Zellen mit Konzentrationen über mehrere logarithmische Stufen“. Patentanmeldung EP2014050642 A1, 2012.
- [152] M. Helou, D. Kühn, M. Reisbeck, T. Endner, L. Richter, und O. Hayden, „Multiplex-Verfahren für eine magnetische Durchflusszytometrie“. Erfindungsanmeldung 102013219114.6, 2013.
- [153] M. Helou, A. Wiemhöfer, B. Krafft, T. Endner, L. Richter, und O. Hayden, „Durchflussskammer für einen Durchflusszytometer sowie Durchflusszytometer“. Erfindungsanmeldung 102014205949.6, 2013.
- [154] M. Helou, M. Reisbeck, L. Richter, und O. Hayden, „Integrierter Workflow für eine Durchflusszytometrie im Vollblut mit hohem dynamischen Zellkonzentrationsbereich für patientennahe Diagnostik“. Erfindungsanmeldung, 2013.
- [155] M. Helou, T. Wladimir, M. Reisbeck, M. Kröll, A. Wiemhöfer, L. Richter, und O. Hayden, „Bindungstests mit magnetischer Durchflusszytometrie“. Erfindungsanmeldung, 2013.
- [156] M. Helou, M. Reisbeck, L. Richter, G. Warnat und O. Hayden, „Verfahren für die Molekulardiagnostik zum Anreichern einer Nukleinsäure aus einer biologischen Probe“. Erfindungsanmeldung 102014206441.4, 2014.
- [157] M. Helou, M. Reisbeck, T. Endner, L. Richter, und O. Hayden, „Zellfunktionstestung mit integrierter dielektrischer Hämatokritmessung“. Erfindungsanmeldung, 2014.

## **Danksagung**

Die vorliegende Dissertation wurde in den letzten dreieinhalb Jahren im Forschungszentrum ‚Erlangen Süd‘ der Siemens AG in der Abteilung CT RTC SET BSN-DE erstellt. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich auf meinem Weg begleitet und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr.-Ing. E. Quandt vom Institut für Materialwissenschaften-Anorganische Funktionsmaterialien an der Christian-Albrechts Universität zu Kiel, für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, trotz der Entfernung zwischen Kiel und Erlangen von 680 km. Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr.-Ing. J. McCord für die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Ein großer Dank gebührt Dr. habil. O. Hayden, der als Projektleiter und direkter Betreuer bei der Siemens AG meine tagtägliche Arbeit stark beeinflusst hat. Vielen Dank für das Vertrauen, die intensive fachliche Betreuung und ein Arbeitsklima, das besser hätte nicht sein können.

Ein spezieller Dank gilt meinem Büronachbarn Mathias Reisbeck, der mich in den letzten Jahren als Praktikant, Bachelorand, Masterand und schließlich Doktorand begleitet hat. Danke für die perfekte Zusammenarbeit, viele konstruktive Diskussionen, das Korrekturlesen der Arbeit und deine Gesellschaft auf dem Weg von Erlangen nach Regensburg und zurück.

Der gesamten „magnetischen“ Arbeitsgruppe möchte ich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre danken: Allen voran Dr. Lukas Richter, als Projektkoordinator, für die gute Zusammenarbeit, die Antworten auf eine Vielzahl an biologischer Fragestellungen und das gemeinsame Feierabendbier in Erlangens Biergärten; Dr. Manfred Rührig für sein unerschöpfliches Wissen über die GMR-Technologie und die Einführung in diverse magnetische Messmethoden; Tobias Endner, den Herrn über den Reinraum; Martin Joksch, der die Auswertesoftware programmiert hat, die in enger Zusammenarbeit iterativ optimiert wurde; Dr. Sandro Tedde, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand; Dr. Oliver Schmidt für viele fruchtbare Diskussionen; Dr. Maria Sramek für die gute Zusammenarbeit und allen Studenten (Evi, Phillip, Tibor, Benjamin, Andreas und Jongwhi), die geholfen haben das magnetische Durchflusszytometer weiterzuentwickeln. Vielen Dank auch an Regina, Gaia, Ion und Guido für die schönen Momente innerhalb und außerhalb der Arbeitszeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Jacobus Bosch vom Uniklinikum Erlangen bedanken, der sich als Mediziner und potentieller Anwender eines magnetischen Messgeräts zur Einzelzelldetektion offen für neue Technologien gezeigt hat und mit mir viele klinische Fragestellungen diskutiert hat. Vielen Dank auch an Barbara Bock für die wöchentliche Lieferung der spezifisch markierten Tumorzellen und die Möglichkeit Referenzmessungen am optischen Durchflusszytometer zu machen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihr Vertrauen und ihre uneingeschränkte Unterstützung während meines Studiums und der Promotion sowie meiner Freundin Katrin, die ein großer Rückhalt war, mich in den richtigen Momenten motiviert hat und vor allem gegen Ende der Arbeit viel Verständnis gezeigt hat.

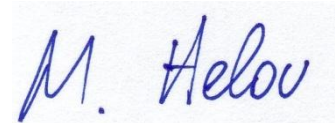
## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere an Eides Statt durch meine Unterschrift, dass die vorliegende Arbeit nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist.

Diese Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Alle Textpassagen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, ebenso Zeichnungen, Skizzen und andere bildliche Darstellungen, die nicht von mir stammen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere außerdem, dass ich keine andere Literatur, als die hier angegebene verwendet habe.

Diese Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch als Ganzes noch nicht veröffentlicht. Auszüge dieser Arbeit sind in wissenschaftlichen Zeitschriften erschienen, wie der Liste der Publikationen mit eigener Beteiligung entnommen werden kann.

Regensburg, 16.04.2014



---

Michael Helou