

Optische Flüster-Galerie Resonatoren und deren Funktionalisierung für die Biosensorik

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTOR-INGENIEURS

an der Fakultät für
Elektrotechnik und Informationstechnik
des
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Dipl.-Ing. (FH) Uwe Rudolf Bog

Geboren in Rastatt

Tag der mündlichen Prüfung: 28.09.2015

Hauptreferent: Prof. Dr. rer. nat. Uli Lemmer
Korreferent: PD Dr.-Ing. Timo Mappes

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
Einleitung	5
1.1 Biosensoren basierend auf optischen Flüstergaleriemoden.....	6
1.2 Gliederung dieser Arbeit.....	7
Grundlagen zur Biosensorik	9
2.1 Optische Biosensorik.....	10
2.2 Oberflächenfunktionalisierung.....	12
Flüstergalerie-Mikrokelche aus PMMA	17
3.1 Optische Flüstergaleriemoden in PMMA-Mikrokelchen.....	18
3.2 Herstellung von PMMA-Mikrokelchen.....	25
3.3 Optische Charakterisierung passiver PMMA-Mikrokelche.....	26
3.4 Optische Charakterisierung aktiver PMMA-Mikrokelche.....	27
3.5 Biomolekulare Detektion mit aktiven PMMA-Mikrokelchen.....	29
Mikrokelche mit hochlokalisierter Oberflächenfunktionalisierung durch molekulare Tinten ...	35
4.1 Multifunktionale Biolaser mit erhöhter molekularer Sensitivität.....	36
4.1.1 Moleküldeposition per Dip-Pen Nanolithografie.....	37
4.1.2 Lasingeigenschaften.....	42
4.1.3 Biomolekulares Detektionsexperiment.....	43
4.2 Hochparallele Oberflächenfunktionalisierung mittels justiertem Mikrokontaktstempeln.....	47
4.2.1 Justiertes Mikrokontaktstempeln ($A\mu$ CS).....	48
4.2.2 $A\mu$ CS-funktionalisierte Mikrokelche als Biosensoren.....	59
4.2.3 $A\mu$ CS-funktionalisierte Mikrokelche zur pharmazeutischen Dosiseinstellung.....	61
4.3 Parallele Biosensorik und in-situ Rekonfigurierbarkeit.....	62
4.3.1 Filterung von Temperatur- und Brechzahlchwankungen.....	63
4.3.2 Störsignalkompensierte Biosensorik.....	67
4.3.3 Biosensorik in unverdünntem Blutserum.....	71
4.4 Zusammenfassung und Ausblick.....	73
Multifunktionale Oberflächenfunktionalisierung von Mikrokelchchips per CVD-Polymerisation	79
5.1 CVD-funktionalisierte Mikrokelche.....	80
5.1.1 Chemische Gasphasenabscheidung funktioneller Poly(<i>p</i> -Xylylene).....	82
5.1.2 Charakterisierung der beschichteten Mikrokelche.....	84
5.1.3 Charakterisierung der Oberflächenfunktionalisierung.....	88
5.1.4 Detektion von C-reaktivem Protein.....	93
5.1.5 Detektion von Exosomen für die Brustkrebsdiagnostik.....	95
5.2 Mikrofluidisch integrierte Mikrokelchchips.....	97
5.2.1 Lab-on-a-Chip Plattform.....	98
5.3 CVD-Funktionalisierung weiterer chipbasierter Strukturen.....	102
5.3.1 Markerbasiertes photonisches Lab-on-a-Chip System.....	102
5.3.2 Chipbasierte photonische Moleküle.....	105
5.4 Zusammenfassung und Ausblick.....	110
Inhärent funktionalisierbare Mikroresonatoren aus Copolymeren	115
6.1 Konzept.....	116
6.1 Mikroresonatoren aus PMMA-basierten Copolymeren.....	117
6.2.1 Herstellung und Oberflächenfunktionalisierung.....	117
6.2.2 Bauteilcharakterisierung.....	119

6.2.4	Copolymer-Mikroresonatoren als Biosensoren	121
6.3	Zusammenfassung und Ausblick.....	122
	Zusammenfassung und Bewertung der einzelnen Biosensor-Ansätze.....	125
	Literaturverzeichnis	133
	Abkürzungsverzeichnis.....	151
	Abbildungsverzeichnis	157
	Tabellenverzeichnis	163
	Danksagung.....	165
	Publikationen	169

Zusammenfassung

In den letzten Jahren avancierte die Biosensorik zu einem der gefragtesten und meistbehandeltsten Forschungsgebiete. Durch den immer schneller voranschreitenden technologischen Fortschritt werden Biosensoren immer kleiner und leistungsfähiger. In einem sogenannten *Lab-on-a-Chip* (zu Deutsch „Westentaschenlabor“) lassen sich heute komplette Sensorsysteme zur Analyse von Flüssigkeiten, beispielsweise für die Medizin-, Ernährungs- und Umweltechnik, äußerst kompakt auf Chipbasis realisieren. Die Oberflächen der integrierten Sensorelemente werden hierbei zumeist chemisch mit ausgesuchten Akzeptormolekülen belegt (*Oberflächenfunktionalisierung*), sodass ausschließlich das jeweils zu detektierende Molekül selektiv an den Sensor anbinden und somit zum Sensorsignal beitragen kann. Besonders chipbasierte mikrooptische Biosensoren bieten einzigartige Vorteile. Neben der Detektion kleinster molekularer Konzentrationen können die Sensorelemente mit sehr kleinen Abmessungen und hoher Bauteildichte realisiert werden. Zu den vielversprechendsten Vertretern ihrer Art zählen optische *Flüstergaleriemoden*-Resonatoren. Diese werden in der vorliegenden Doktorarbeit behandelt.

Die Doktorarbeit befasst sich mit der Entwicklung von Biosensoren auf der Basis von chipbasierten polymeren Flüstergaleriemoden-Mikroresonatoren. In mehreren Teilprojekten wurden unterschiedliche Sensorkonzepte verfolgt. Im Vordergrund stand hierbei das Ziel, das Design der Sensorelemente jeweils so auszulegen, dass neben der intendierten Bauteilfunktionalität als Biosensor gleichzeitig weitere Optimierungen vorgenommen wurden. So wurden letztendlich Verbesserungen sowohl hinsichtlich der Bauteilfunktionalität als auch der Chipintegrierbarkeit erzielt. Insgesamt untergliedert sich der Ergebnisteil der Arbeit in drei Kapitel:

Im ersten Teil wurde ein neuer Oberflächenfunktionalisierungsansatz für *Mikrokelchresonatoren* aus Polymethylmethacrylat auf Basis von molekularen Phospholipidtinten entwickelt. Der Vorteil dieses Ansatzes besteht darin, dass die Tinten aus unterschiedlichen Einzelkomponenten flexibel zusammengemischt werden können. Somit können molekular selektive Tinten auf einfache Weise für verschiedenste Sensoranwendungen konfiguriert werden. Die Tinten können hierbei neben den Akzeptormolekülen für die primär intendierte Oberflächenfunktionalisierung molekulare Komponenten mit weiteren chemischen oder physikalischen Eigenschaften aufweisen. So wurden durch Beimischung von Fluoreszenzfarbstoffen molekular selektive Tinten hergestellt, welche zeitgleich als Lasermedium dienen. Durch Beschichtung passiver Mikrokelche wurden diese in einem einzigen Prozessschritt zu aktiven Biosensoren (*Biolasern*) transformiert. Obwohl die Lasertinten per Dip-Pen Nanolithografie ausschließlich auf die lichtleitenden Resonatorränder appliziert wurden, wiesen die resultierenden Biolaser äußerst niedrige Laserschwellen auf. Durch die sehr hohe Lokalisierung der Tintendeposition zeichnete sich dieser Oberflächenfunktionalisierungsansatz als sehr ressourcenschonend aus. Gleichzeitig bieten Phospholipidtinten durch die Ausbildung von Multilagden den jeweils zu detektierenden Molekülen eine dreidimensionale Matrix molekularer Akzeptoren an. Da sich die Analytmoleküle folglich in die Phospholipidlagen einlagern können, konnte auf diese Weise eine starke Erhöhung der molekularen Sensitivität erzielt werden. Anhand der Mikrokelche wurde auch erstmals die Beschichtung einer dreidimensionalen Oberfläche durch Dip-Pen Nanolithografie demonstriert.

Im weiteren Verlauf des Projektes wurde ein Mikrokontakttransferprozess entwickelt (*justiertes Mikrokontaktstempeln*; engl.: *aligned microcontact stamping*), welcher erstmalig eine parallele Beschichtung von Mikrokelchen in einem Massenherstellungsverfahren erlaubt. Das justierte Mikrokontaktstempeln basiert auf der Verwendung von strukturierten molekularen Stempelkissen, welche zur lateral hochaufgelösten und beschädigungsfreien Beschichtung ganzer Felder von Mikrokelchen benutzt werden können. Über die gezielte Anordnung lateral limitierter Phospholipidfelder wird hierbei definiert, in welcher Konfiguration die einzelnen Kelche mit den unterschiedlichen Tinten belegt werden sollen. Ein einzelnes Stempelkissen kann zahlreiche Konfigurationen und Tintenarten beherbergen und somit als „Bibliothek“ zur flexiblen Realisierung unterschiedlicher biomolekularer Detektionsexperimente dienen. Beim justierten Mikrokontaktstempeln handelt es sich um die erste und bis dato einzige Funktionalisierungsmethode, die eine parallele und gleichzeitig selektive Oberflächenfunktionalisierung von Flüstergaleriemoden-Biosensoren erlaubt.

Die hohe laterale Auflösung des justierten Mikrokontaktstempels wurde genutzt, um die individuellen Kelchstrukturen einer *kreuzreferenzierenden Sensoranordnung* mit unterschiedlichen Phospholipidtinten zu funktionalisieren, ohne den jeweiligen Nachbarkelch zu kontaminieren. Die paarweise eng angeordneten Mikrokelchlasern (Abstand ca. 3 μm) wurden anschließend zeitgleich spektroskopisch ausgelesen und deren Sensorsignale zur wechselseitigen Kompensation von temperatur- und brechzahlinduzierten Signalstörungen eingesetzt. Auf diese Weise wurde eine störsignalkompensierte Detektion von mehreren Biomolekülen realisiert. Eine der beiden Tinten wies darüber hinaus molekulare Gruppen auf, die ein rein mikrofluidisches multiples An- und Abkoppeln verschiedener Akzeptormoleküle erlauben, sodass an einem einzigen Biosensor unterschiedliche molekulare Detektionsexperimente hintereinander durchführbar waren. So wurde erstmalig ein vollständig und in-situ rekonfigurierbarer Flüstergaleriemoden-basierter Biosensor realisiert. Bedingt durch die hohe laterale Auflösung des justierten Mikrokontaktstempels stellen die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Doppellaser die bis dato kompakteste Biosensoranordnung mit Brechzahlkompensation dar.

Im zweiten Projekt wurde ein *hybrider polymerer Biosensor* entwickelt. Hierbei wurden Mikrokelchlasern aus Polymethylmethacrylat per chemischer Gasphasenabscheidung mit funktionellen Poly(p-Xylylen) beschichtet. Die Poly(p-Xylylene) verfügen hierbei über funktionelle Gruppen, die eine effiziente kovalente Anbindung von Akzeptormolekülen erlauben. Neben der Oberflächenfunktionalisierung der Mikrolasern wurden die Poly(p-Xylylen)-Filme auf vielfältige Weise genutzt, um weitere Bauteiloptimierungen vorzunehmen. Da die Beschichtung des transparenten und hochbrechenden Poly(p-Xylylens) äußerst konform erfolgt, konnte über die Wahl der deponierten Schichtdicken sehr definiert Einfluss auf die im Resonator geführten Lichtmoden genommen werden. So wurde bei den Mikrokelchlasern der optische Überlapp der Flüstergaleriemoden mit dem Analyten, und somit die Sensitivität der Sensoren, mehr als verdoppelt. Aufgrund der homogenen Beschichtung der gesamten Probenoberfläche, wurde die umliegende Poly(p-Xylylen)-Schicht darüber hinaus zur äußerst stabilen Integration der Sensorsubstrate in eine chipbasierte mikrofluidische Infrastruktur verwendet werden. Dies führte zu einem um zwei Größenordnungen reduzierten Analytverbrauch im Vergleich zu unverkapselten Sensorstrukturen. Der chemische Integrationsprozess erfolgte hierbei komplett bei Raumtemperatur. Im Rahmen dieses Projektes wurden erstmals Flüstergaleriemoden-Biosensorelemente in Verbindung mit funktionellen CVD-Schichten realisiert.

Neben diesem markerfreien Lab-on-a-Chip-Ansatz wurde mit demselben chemischen Verkapselungsansatz ein markerbasierter Lab-on-a-Chip mit integrierten optischen Wellenleitern realisiert. Auf diese Weise wurde die Plattformunabhängigkeit des Ansatzes erfolgreich demonstriert.

Durch die hochkonforme Poly(p-Xylylen)-Beschichtung zweier sehr nahe beieinander strukturierter Mikroscheibenlasern konnte deren fabrikationslimitierter Spaltabstand signifikant verringert werden, sodass die vorher isolierten Scheibenresonatoren optisch koppelten. Durch den Vernier-Effekt ließ sich durch Variation des Spaltabstands die Anzahl der vom gekoppelten Resonatorsystem unterstützten Lasermoden bis hin zum monomodigen Lasingbetrieb einstellen. Als Sensoren betrieben führte die Erhöhung des im Kopplungsspalt lokalisierten Lichtfeldes zeitgleich zu einer Sensitivitätssteigerung um ca. 200 % im Vergleich zu einzelnen Scheibenresonatoren.

Im Rahmen des dritten Projektes wurde ein neuartiges Konzept zur Realisierung von polymeren *Flüstergalerie-Mikroresonatoren mit chemisch maßgeschneiderten Oberflächen* entwickelt. Als Resonatormaterial kommen hierbei Copolymere mit ausgesuchten funktionellen Gruppen zum Einsatz, welche eine gezielte Immobilisierung einer großen Bandbreite an Molekülen an das polymere Grundgerüst erlauben. In der vorliegenden Arbeit wurde als Demonstrator ein neuartiger Mikroresonator aus Poly(Methylmethacrylat-co-Methacrylsäure) (MMA:MAA) realisiert. MMA:MAA weist als PMMA-basiertes Copolymer weiterhin dieselben fabrikations- und anwendungstechnischen Vorzüge auf wie PMMA. Im Vergleich zum relativ reaktionsträgen PMMA erlauben die Carboxygruppen von MMA:MAA jedoch eine signifikant einfachere Immobilisierung von aminoterminierten Akzeptormolekülen über die in der Biotechnologie als Standardprozess bekannte EDC-Chemie (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid). Zur Herstellung der Mikroresonatoren wurde zudem ein neuartiger plattformunabhängiger Fabrikationsprozess angewendet, bei welchem auch der Resonatorsockel aus einem Polymer besteht. In dieser Arbeit wird die Realisierung sowohl aktiver als auch passiver MMA:MAA Resonatoren aufgezeigt.

Abstract

In recent decades *biosensing* has been established amongst the most highlighted research topics. Due to the vast technological progress, biosensor transducers have become gradually smaller and more efficient. Already today, whole sensor systems can be realized on-chip as very compact *lab-on-a-chips* for molecular fluid analysis, *e.g.*, for medical screening, food diagnostics and environmental monitoring. To achieve high sensitivity for the target substance of interest the sensor transducers are usually decorated with highly specific acceptor molecules with high binding coefficients (*surface functionalization*). Optimally, upon the selective coupling to these recognition elements, the target molecules solely contribute to the sensing signal, while all other molecules inside the liquid analyte do not interact with the sensor surfaces.

Chip-based optical microstructures are some of the most promising candidates for biosensing, as they offer distinct advantages. Besides the capability to detect the analyte of interest at lowest molecular concentrations, they can be realized with high device density and on large substrate areas. Amongst the most prominent optical biosensors are optical *whispering gallery mode* resonators, which are in the scope of this PhD thesis.

The PhD thesis encompasses the development of biosensors based on on-chip polymeric whispering gallery mode microresonators. Various approaches were addressed within different subprojects. These projects did not solely aim at the mere realization of the biosensors, but furthermore focused on the implementation of additional improvements arising from adequate device design. Diverse improvements have been achieved, spanning various aspects of device performance and integration. The work subdivides into three main projects:

Within the first project, a novel surface functionalization approach for goblet-shaped microresonators out of poly(methyl methacrylate) has been developed. This approach utilizes phospholipid inks, which can flexibly be composed of different molecular components. Besides a large variety of biorecognition elements for the intended molecular selectivity, the inks can furthermore contain additional molecules inducing entirely new chemical or physical functionalities to the sensing device. In the presented work, the additional admixture of laser dyes advanced passive microgoblets to molecular selective microlasers. The laser inks were deposited exclusively onto the light-guiding perimeters of the goblets via dip-pen nanolithography. While this highly localized approach resulted in very low material consumption, the so created *biolasers* still exhibit low lasing thresholds. At the same time, the gel-like multi-layer network of the phospholipid-based inks allowed the target molecules to permeate the ink volume, leading to greatly enhanced device sensitivity. In the framework of these experiments the dip-pen nanolithography technique has been applied on three-dimensional substrates for the very first time.

While dip-pen nanolithography allowed for serial inking, a microcontact printing-based deposition technique (*aligned microcontact stamping*) has subsequently been developed, enabling a highly parallel surface functionalization of whole microgoblet arrays. Here, pre-fabricated custom molecular stamp pads are utilized. The laterally highly defined ink patches on the pad allow for cross-contamination- and damage-free deposition of the phospholipid inks onto individual microgoblets within a goblet array. One stamp pad can exhibit a large variety of ink types and combinations and can therefore be utilized as a “library” to functionalize the goblet fields in flexible configurations.

The high lateral resolution of aligned microcontact stamping has been harnessed to selectively surface functionalize the individual sensing elements of a cross-referencing sensor arrangement with different phospholipid inks. The simultaneously acquired individual sensing signals of pairwise densely packed microgoblet lasers (lateral distance $\sim 3 \mu\text{m}$) were utilized for mutual compensation of highly localized temperature and refractive index perturbations inside the analyte. Eventually, the cross-referenced detection of two kinds of proteins has been demonstrated. In course of these experiments, the first complete reconfiguration of a whispering gallery mode biosensor has been demonstrated. The molecular composition of one of the functional inks enabled a purely microfluidic coupling and de-coupling of biorecognition elements, allowing for subsequent independent biomolecular detection experiments on the very same microlaser. Due to the high lateral resolution of the aligned microcontact stamping, the developed cross-referencing sensor arrangement represents the most compact biosensor design with built-in refractive index compensation to date.

In the second project, a *hybrid polymeric biosensor* has been developed by the conformal coating of PMMA microgoblet lasers with reactive poly(*p*-xylylenes). The poly(*p*-xylylenes) can flexibly be synthesized with different molecular side groups for facile application-tailored acceptor molecule attachment. Besides the application of the poly(*p*-xylylenes) in the context of surface functionalization, additional improvements were achieved. Firstly, the high refractive index of the poly(*p*-xylylenes) enabled a controlled tuning of the whispering gallery modes via the slab thickness of the deposited poly(*p*-xylylene) layers. This was employed to enhance the sensitivity of the microgoblet laser biosensors by more than 100 %, with negligible increase of the lasing threshold. Additionally, the adjacently coated chip areas were utilized for chemical chip bonding to integrate the hybrid biosensors into a mechanically robust microfluidic infrastructure. The chip bonding procedure was performed entirely at room temperature. Within this project microgoblet lasers have been demonstrated for the very first time as integrated biosensors in a lab-on-a-chip environment.

Alongside the marker-free microgoblet laser platform, a fluorescent marker-based lab-on-a-chip has been demonstrated in the framework of a side project. By utilization of the same chip bonding technique, optical waveguides were integrated into a microfluidic channel structure for fluorescence-based biomolecular studies.

In course of another side project, the highly conformal poly(*p*-xylylene) deposition has been utilized to significantly reduce the fabrication-limited lateral distance between two poly(methyl methacrylate) microdisk lasers to achieve optical coupling of the previously isolated laser cavities. Tuning of the coupling gap width enabled to define the number of lasing modes supported by the coupled microlaser system via the Vernier effect, down to stable and low-threshold monomodal lasing in water. Due to the enhanced light field in the coupling gap, the coupled microlasers furthermore exhibited a highly increased bulk refractive index sensitivity.

In the third project, a *novel type of whispering gallery mode microresonator* has been developed, comprising chemically tailored surfaces for facilitated surface functionalization. The resonator consists of a copolymer with one or more reactive molecular side groups. Adequate choice of these groups enables the facilitated immobilization of biorecognition elements to the cavity surface. As a proof-of-concept, microresonators out of poly(methyl methacrylate-*co*-methacrylic acid) have been developed. While poly(methyl methacrylate-*co*-methacrylic acid) has similar optical properties as the chemically relatively inert poly(methyl methacrylate), its carboxy side groups allow easy surface functionalization of the resonators with amino-terminated acceptor molecules via EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) chemistry. The microresonators were realized via a novel fabrication process. Here, the microcavities are located on polymeric pedestals, enabling a mass fabrication compatible and substrate independent device manufacturing. Within this work, the employment of passive as well as active devices has been demonstrated.

Kapitel 1

Einleitung

Zusammenfassung

In diesem Kapitel wird in einer grundlegenden Übersicht das Gebiet der Biosensorik mit Flüstergaleriemoden-Resonatoren beleuchtet und die sich daraus ableitende Motivation der vorliegenden Arbeit erörtert. Gleichzeitig bietet es dem Leser eine Orientierungshilfe zu einschlägigen Publikationen auf diesem Themengebiet. Anhand internationaler Arbeiten werden wissenschaftliche Meilensteine sowie der aktuelle Stand der Forschung dargelegt. Des Weiteren beinhaltet dieses Kapitel die Gliederung der vorliegenden Arbeit.

1.1 Biosensoren basierend auf optischen Flüstergaleriemoden

Durch den rasanten technologischen Fortschritt in den letzten Jahren auf dem Gebiet der Mikro- und Nanostrukturierung beschäftigen sich immer mehr Forschungsprojekte mit der Miniaturisierung und hochdichten Integration von Bauteilen. *Biosensoren* profitieren besonders von diesem Fortschritt.¹⁻⁶ Eines der Kernziele in der Entwicklung von Biosensoren ist es, möglichst sensitive Sensoren auf Chipbasis zu integrieren, um leistungsfähige und robuste *Lab-on-a-Chip*-Plattformen, beispielsweise für die Medizin-, Ernährungs- und Umwelttechnik, zu realisieren.⁷⁻⁹ Neben der enormen Einsparung von Analytvolumen und Analysezeit erlauben vor allem dicht gepackte Sensorelemente eine parallele und multimolekulare Charakterisierung eines Analyten. Inhärent eignen sich Mikrokelchresonatoren hierzu in besonderem Maße.^{10,11} Da diese im Gegensatz zu vielen anderen *Flüstergaleriemoden* (WGM, engl. *whispering gallery modes*) Strukturen über standardphotolithografische Fertigungsprozesse hochdicht und großflächig auf Waferskala hergestellt werden können, erscheint die Realisierung von chipbasierten Biosensorplattformen als naheliegend und vielversprechend. Hier setzt die vorliegende Doktorarbeit an.

Während (fluoreszenz-) markerbasierte Verfahren bereits seit Jahren die Detektion einzelner Biomoleküle (Proteine, DNA-Stränge etc.) erlauben,¹²⁻¹⁴ stellt dieses ultimative Detektionslimit markerfreie optische Sensoren immer noch vor Herausforderungen. Obwohl zahlreiche markerfreie Ansätze äußerst niedrige Detektionslimits aufweisen,^{1,15,16} waren es optische WGM-Mikroresonatoren, die diese Grenze erstmals erfolgreich durchbrachen.¹⁷ Bei optischen WGM-Mikroresonatoren handelt es sich um in sich geschlossene transparente Wellenleiterstrukturen, in denen Licht entlang ihres Umfangs geleitet wird. Als Konsequenz kommt es hierbei aufgrund von exakt definierten Interferenzbedingungen zur Ausbildung von spektral außerordentlich schmalbandigen Resonanzen.¹⁸⁻²² Bei entsprechend hohen Resonatorgütern umlaufen die resonanten Lichtmoden den Resonatorumfang bis zu einige 1.000.000-mal,^{18,20,23} was zu einer extrem hohen Interaktion mit der an den Resonator angrenzenden Umgebung führt. Hierdurch lassen sich Brechzahländerungen entlang des Resonatorumfangs, wie sie beispielsweise durch dort anlagernde Biomoleküle hervorgerufen werden, mit einer sehr hohen Sensitivität nachweisen.²⁴ Prominente Beispiele für optische WGM-Strukturen sind Mikrokugeln,²⁴⁻³⁰ Mikrotoroide,³¹⁻³⁵ Mikroringe,^{22,36-41} Mikrokapillaren⁴²⁻⁴⁵ sowie Mikrokelche.^{10,11}

Im Jahr 1878 war es J. W. Strutt (Lord Rayleigh), der erstmals Flüstergaleriemoden in akustischer Form in der St.-Pauls-Kathedrale in London beobachtete.⁴⁶ In den Jahren 1910 und 1914 formulierte Lord Rayleigh seine Beobachtungen^{47,48} und widerlegte damit die bis dato geläufige Annahme, dass in einem kreisrunden Raum aus einer beliebig positionierten punktförmigen Quelle emittierter Schall sich ausschließlich in einem anderen Punkt des Raums bündelt.^{49,50} In der kreisrunden Dachgalerie der Kathedrale stellte Rayleigh fest, dass sich der Schall während seiner Ausbreitung vielmehr an die Wand „klammert“. Die stark eingeschnürte und verlustarme Ausbreitung des Schalls entlang der Wand sprach er dabei dessen Wellennatur zu, was 1921 von Raman und Sutherland experimentell indirekt untermauert wurde.⁵¹ Da man tangential zur Wand erzeugte Geräusche an jedem anderen Punkt entlang der Wand wahrnehmen konnte, selbst ein leise geäußertes Flüstern, nannte Rayleigh dieses Phänomen *Flüstergaleriewellen*.

Bis heute wurden zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten optischer WGM-Strukturen publiziert.⁵² So sind Quarzglas-basierte Mikroresonatoren vielversprechende Kandidaten für Wellenlängenfilter im Telekommunikationsbereich. Des Weiteren sind WGM-Resonatoren im Allgemeinen sehr gute und miniaturisierbare Laserkavitäten.⁵³

Ein besonders vielversprechendes Anwendungsgebiet für optische WGM-Strukturen liegt im Bereich der Biosensorik.⁵⁴⁻⁵⁸ Während das Potential der Einzelmoleküldetektion bereits 1991 anhand eines markerbasierten Ansatzes demonstriert wurde,⁵⁹ wurden erstmals Anfang der 2000er Jahre WGM-Strukturen explizit als Biosensoren vorgeschlagen.^{24,27,60-62} Begründet durch die sehr hohen erzielbaren optischen Güten (Qualitätsfaktoren/*Q*-Faktoren) der WGM-Resonatoren (resultierend in spektral äußerst schmalbandigen Resonanzen) können je nach Ausleseverfahren selbst kleinste Verschiebungen der Resonanzfrequenzen, induziert durch Brechzahländerungen entlang der Resonatoroberfläche aufgrund der Anbindung der Analytmoleküle, detektiert werden. Mit einem *Q*-Faktor von ca. 6×10^{10}

wurden die bis dato höchsten Resonatorgüten für den sichtbaren Wellenlängenbereich 2006 von Grudinin und Kollegen an stabförmigen Resonatoren aus Calciumfluorid (CaF_2) gezeigt.²¹ In erster Linie wurden diese über einen extrem großen Resonator Durchmesser im Millimeterbereich erreicht. Die spektral schmalbandigsten Resonanzen bei chipbasierten Resonatorstrukturen wurden von Lee und Kollegen im Jahr 2012 erzielt ($Q \approx 9 \times 10^8$).²² Diese wurden ebenfalls über eine besonders groß dimensionierte Kavität sowie einen optimierten keilförmigen Resonatorumfang realisiert.

Mit zahlreichen WGM-Sensorstrukturen wurde bereits die Anbindung einzelner Zellen, synthetischer Nanopartikel und Viren erfolgreich nachgewiesen.^{32,45,63-67} Die Detektion einzelner Proteine wurde erstmals 2007 vorgestellt.¹⁷ Hier verursachte die Anbindung von Interleukin-2-Molekülen (IL-2) an toroidale Quarzglasresonatoren unerwartet große spektrale Modenverschiebungen. Der stufenförmige Signalverlauf wurde hierbei einer thermooptischen Verstärkung zugeschrieben, ausgelöst durch ein lokales Aufheizen der Resonatoroberfläche aufgrund einzelner dort andockender IL-2-Moleküle. In der Fachwelt wird dieser Mechanismus allerdings bis heute kontrovers diskutiert. So errechneten Arnold und Kollegen, dass die Sensorsignale nicht alleine aufgrund einer thermooptischen Verstärkung zustande gekommen sein können.⁶⁸ Ihrerseits präsentierten Arnold und Kollegen in einer Publikation von 2013 die Detektion einzelner Thyroglobulin- und Serumalbumin- (vom Rind) Moleküle und beanspruchten ihrerseits die erste WGM-basierte Einzelmoleküldetektion gezeigt zu haben.^{69,70} Die benötigte hohe Sensitivität wurde hierbei durch am Resonatorrand immobilisierte goldüberzogene Quarzglaspartikel erzielt, die lokal zu plasmonischen Feldüberhöhungen entlang der Resonatoroberfläche führten. 2014 wurde von Baaske und Kollegen zudem die Detektion einzelner Anbindungsereignisse von DNA-Strängen gezeigt, ebenfalls unter Zuhilfenahme plasmonischer Partikel.⁷¹

Während somit in vielfacher Art und Weise die Eignung von WGM-Strukturen für biosensorische Anwendungen erfolgreich demonstriert wurde, stellt deren Übertragung auf die Alltagstauglichkeit weiterhin eine große Herausforderung dar. Viele der hochsensitiven Ausleseverfahren sind nur unter streng kontrollierten Laborbedingungen möglich. Des Weiteren lassen sich zahlreiche WGM-Strukturen nur unter enormem Aufwand in eine robuste und somit auch außerhalb des Labors betreibbare chipbasierte Sensorplattform integrieren. Oftmals ist diese Integration dann auf ein einziges Sensorelement beschränkt, womit eine parallele Detektion mehrerer Moleküle, wie sie beispielsweise zur Blutanalyse benötigt wird, nicht möglich ist.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung polymerer WGM-Biosensoren. Sie wurde am Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) im Rahmen einer Doktorarbeit durchgeführt. Hauptziel der Arbeit war, die am IMT und dem Institut für Angewandte Physik (APH) kollaborativ entwickelten Polymethylmethacrylat- (PMMA) basierten Mikrokelchresonatoren^{72,73} als Biosensoren zu etablieren. Hierfür waren kompatible Methoden zur Oberflächenfunktionalisierung der Mikrokelchresonatoren zu entwickeln. Diese Aufgabenstellung war jedoch nicht auf die reine Immobilisierung von Akzeptormolekülen beschränkt. Zusätzlich sollte die Oberflächenfunktionalisierung gezielt zur Optimierung weiterer Bauteileigenschaften herangezogen werden, insbesondere jener, die die Chipintegration und Massenfertigung begünstigen. Dies konnte in unterschiedlichen Lösungsansätzen auf vielfältige Art und Weise bewerkstelligt werden. So wurde unter anderem die Sensitivität der realisierten Biosensoren signifikant gesteigert, eine mikrofluidische Chipintegration bei Raumtemperatur realisiert, eine massenfertigungs-kompatible Funktionalisierungsmethode entwickelt, ein monomodiger Laserbetrieb ermöglicht sowie ein neuartiger Biolaser entwickelt.

1.2 Gliederung dieser Arbeit

Kapitel 2 liefert einen grundlegenden Überblick über optische Biosensorstrategien und erläutert die wesentlichen Grundlagen der Oberflächenfunktionalisierung von Biosensoren.

In Kapitel 3 wird das theoretische Grundlagenwissen zur Funktionsweise von WGM-basierten Sensorstrukturen vermittelt. Zudem werden die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Methoden zur Herstellung und Charakterisierung der entwickelten Biosensoren dargelegt. Die Darstellung der Fabrikationsmethoden beschränkt sich an dieser Stelle auf die lithografische Fabrikation der als Ausgangsstruktur dienenden PMMA-Mikrokelche. Zusätzliche Fabrikationsmethoden, die

zielgerichtet im Rahmen der Realisierung der einzelnen Biosensoren eingesetzt bzw. neu entwickelt wurden, werden direkt in den betreffenden Kapiteln behandelt.

Die unterschiedlichen Biosensoren, welche im Rahmen dieser Arbeit in einzelnen Teilprojekten entwickelt wurden, werden in den Kapiteln 4, 5 und 6 vorgestellt. Jedes Kapitel beginnt hierbei mit einer dedizierten zusammenfassenden Darstellung des bis dato existenten Forschungsstandes sowie der Motivation des jeweils vorgestellten Sensoransatzes. Die Kapitel enden jeweils mit einer Zusammenfassung und einem zukunftsgerichteten Ausblick.

In Kapitel 4 wird dargelegt, wie phospholipidbasierte Tinten zur äußerst flexiblen Oberflächenfunktionalisierung von PMMA-Mikrokelchen eingesetzt werden können. Neben passiven Tinten zur Oberflächenfunktionalisierung für biosensorische Anwendungen werden des Weiteren farbstoffdotierte Tinten als Verstärkermaterial zur Realisierung von neuartigen phospholipidbasierten Biolasern eingesetzt. Darüber hinaus wird eine eigens entwickelte Depositionsmethode zur hochparallelen Oberflächenfunktionalisierung von Mikrokelchen mit Phospholipidtinten vorgestellt (justiertes Mikrokontaktstempeln, engl. aligned microcontact stamping (A μ CS)). Diese wird angewendet, um die individuellen Kelchstrukturen einer dicht gepackten kreuzreferenzierenden Sensoranordnung mit unterschiedlichen Tinten kontaminationsfrei zu funktionalisieren. Anhand der Sensoranordnung werden eine wechselseitige Filterung von temperatur- und brechzahlinduzierten Störungen sowie eine in-situ durchführbare Rekonfiguration der Oberflächenfunktionalisierung demonstriert.

Kapitel 5 behandelt die Realisierung von hybriden Biosensoren durch die Applizierung von funktionellen Poly(p-Xylylen)-Filmen auf PMMA-Mikrokelchresonatoren. Im Detail erörtert werden die Optimierung der Sensorempfindlichkeit über die Schichtdickeneinstellung der verwendeten funktionellen Polymere sowie die einhergehende Auswirkung auf die wichtigsten Bauteil- und Betriebsparameter. Darüber hinaus wird präsentiert, wie die funktionellen Polymerfilme zur mikrofluidischen Integration der Biosensoren über einen chemischen Verkapselungsprozess bei Raumtemperatur genutzt werden können.

In Kapitel 6 werden neuartige Flüstergaleriemodenresonatoren aus PMMA-basierten Copolymeren vorgestellt und deren Einsetzbarkeit als passive und aktive Biosensorelemente erörtert.

Im abschließenden Kapitel 7 werden die in dieser Arbeit realisierten Biosensorkonzepte in einem Vergleich einander gegenübergestellt sowie die Bedeutung der erzielten Ergebnisse im Hinblick auf andere Arbeiten eingeordnet.

Kapitel 2

Grundlagen zur Biosensorik

Zusammenfassung

Dieses Kapitel bietet einen grundlegenden Überblick zu den gängigen Detektionsstrategien in der optischen Biosensorik. Des Weiteren werden die gängigen Methoden zur Oberflächenfunktionalisierung von Sensortransduktoren erläutert, mit dem Fokus auf Flüstergaleriemoden-Biosensoren. Das Kapitel fokussiert sich hierbei auf die jeweils für diese Arbeit relevanten Ansätze und Methoden. Zur Gewährleistung eines vollständigeren Überblicks werden weitere Ansätze lediglich in Kürze erörtert.

2.1 Optische Biosensorik

Als Teildisziplin der Bioanalytik beschäftigt sich auch die Biosensorik die Interaktion biologischer relevanter Substanzen mit molekularen Testsubstraten.^{3,15,74} Diese Testsubstrate bieten hierbei der zu untersuchenden Substanz mehr oder weniger selektive Bindungsstellen an, sind bei den standardmäßigen bioanalytischen Verfahren ansonsten jedoch ausschließlich von passiver Natur. Folglich müssen die biomolekularen Bindungsereignisse zwischen Testsubstrat und der zu untersuchenden Substanz mit externen Verfahren erfasst und ausgelesen werden. Die angewendeten Methoden sind hierbei von vielfältiger Natur, setzen aber zumeist eine Markierung des Testsubstrates voraus (z. B. bei der Fluoreszenzmikroskopie). Demgegenüber stellen Biosensoren eigenständige Bauteile dar, welche die durch die biomolekularen Bindungsereignisse hervorgerufenen Stimuli direkt in eine physikalisch messbare Größe umwandeln (Abbildung 2.1). Das molekulare Testsubstrat (molekularer Detektor) ist hierbei innerhalb der optofluidischen Interaktionszone des Sensors (Transduktor) lokalisiert. Meist ist dies direkt die Sensoroberfläche. Infolgedessen unterscheiden sich Biosensoren signifikant von anderen bioanalytischen Verfahren, die auf den Einsatz von Transduktoren gänzlich verzichten. Zur Oberflächenfunktionalisierung der Transduktoren kommen in der Regel Biomoleküle wie z. B. Proteine, Antikörper und DNA-Stränge zum Einsatz. Die zu detektierenden Substanzen sind zumeist ebenfalls biologischer Natur oder weisen eine biologische Relevanz auf (z. B. Toxine, Allergene, Nährstoffe etc.). Ziel der Biosensorik ist es, Substanzen sowohl qualitativ als auch quantitativ nachzuweisen. So kommen in der Medizin- und Umwelttechnik Biosensoren zur Detektion von Antikörpern, Antibiotika, Krankheitsmarkern, Pestiziden, Fungiziden und Schwermetallen zum Einsatz.^{7,9,15} Zum anderen finden Biosensoren Verwendung in der Charakterisierung intermolekularer Wechselwirkungen.^{3,5,7,8} So werden beispielsweise Affinitäten zwischen Antigenen und Antikörpern charakterisiert, um neue Impfstoffe zu erproben.

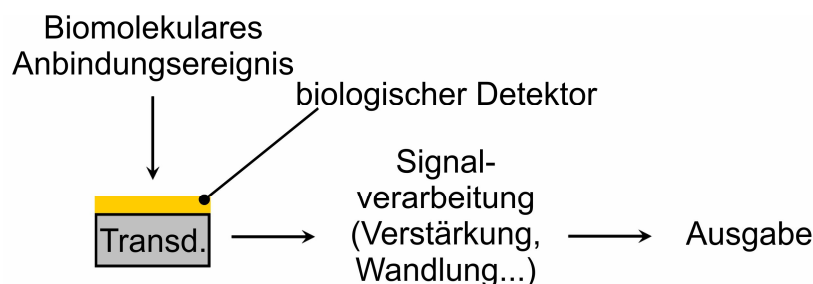


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines (markerfreien) Biosensors. Die zu detektierenden Biomoleküle (Proteine, Antikörper, DNA-Stränge etc.) binden selektiv an die Oberfläche des Sensortransduktors (Transd.) an. Dieser transformiert die molekularen Anbindungsereignisse in ein messbares physikalisches Sensorsignal. Um eine selektive Anbindung zu realisieren, wird die Oberfläche des Sensortransduktors mit biologischen Detektormolekülen oberflächenfunktionalisiert. Das generierte Sensorsignal durchläuft im Anschluss eine Signalverarbeitung und wird ausgegeben.

Optische Biosensorsysteme bieten je nach Art und Auslegung einzigartige Vorteile.^{15,75,76} Beispielsweise sind optische Sensorplattformen weitestgehend resistent gegenüber elektromagnetischen Störeinflüssen. Zahlreiche Plattformen lassen sich zudem äußerst miniaturisiert und kostengünstig in großen Mengen herstellen. Erfolgt die Herstellung auf Chipbasis können hohe Bauteildichten erzielt werden. Die in einem optischen Sensorsystem enthaltenen Sensorstrukturen bzw. optofluidischen Interaktionszonen lassen sich oftmals auf einfache Weise simultan adressieren und auslesen. Zu guter Letzt erlauben optische Detektionsverfahren eine nichtinvasive und fernsteuerbare Analytcharakterisierung.

Um biomolekulare Sensorik mit optischen Methoden zu bewerkstelligen, stehen zwei grundlegende Detektionsstrategien zur Auswahl (Abbildung 2.2).^{15,75-80} Bei markerbasierten Detektionsverfahren (Abbildung 2.2(a)) werden ausgesuchte Markermoleküle selektiv an die zu untersuchenden Moleküle oder an die komplementären Akzeptormoleküle gebunden. Bei den meisten markerbasierten Ansätzen, vor allem bei den in der medizinischen Analytik standardmäßigen Verfahren, werden die Substrate

jedoch oftmals mit separaten Instrumenten ausgewertet. Sie fallen per Definition somit nicht in die Kategorie „Biosensor“. Beispielsweise beim ELISA- (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) und Western Blotting Verfahren werden enzymgekoppelte Antikörper eingesetzt.⁸¹ Durch Reaktion der Enzyme mit einem Reagenz kommt es zur Bildung von Chromophoren oder Chemilumineszenzfarbstoffen, die einen visuell detektierbaren Farbumschlag im Analyten bewirken. Dieser wird im Anschluss an das biomolekulare Bindungsexperiment photometrisch ausgewertet. In der Fluoreszenzmikroskopie werden standardmäßig Fluoreszenzfarbstoffe, bzw. fluoreszenzfarbstoffmarkierte Antikörper, an die jeweils interessierenden Moleküle gebunden.^{12,14} Während die meisten klinischen Verfahren aufgrund der einfachen Handhabung und der leistungsstarken Instrumentalisierung keine Transduktoren benötigen, existieren dennoch auch zahlreiche markerbasierte Biosensoransätze.¹⁵ Diese zeichnen sich vor allem durch ihre hohe Integrierbarkeit und infolgedessen durch einen stark verringerten Analytverbrauch aus. Einzelne Detektionsansätze mit WGM-Transduktoren existieren ebenfalls.⁸²⁻⁸⁴ Während markerbasierte Verfahren extrem niedrige Detektionslimits bis hin zu weniger als einem einzelnen Molekül erlauben, ist eine genaue Quantifizierung der zu detektierenden Substanzen oft nur unter hohem Aufwand möglich. Limitierende Faktoren sind vor allem Signalausrauschen sowie dem Sensorsignal überlagerte Störintensitäten. Letztere werden durch nichtspezifische Hintergrundsignale oder eine Mehrfachbelegung eines Analytmoleküls mit Farbstoffmolekülen hervorgerufen. Darüber hinaus stellen die Markierungsprozeduren oftmals einen mitunter erheblichen Arbeitsaufwand dar. Je nach chemischer Komposition der Markermoleküle sowie deren chemischem Anbindungsprotokoll kann die Markierung die molekulare Integrität bzw. die biologische/chemische Funktionalität der zu detektierenden Moleküle beeinflussen, wodurch das Messergebnis verfälscht werden kann.

Bei markerfreien Detektionsansätzen verbleiben sowohl die zu detektierenden Moleküle als auch die Akzeptormoleküle ohne Markierung und somit in ihrer natürlichen Form, wodurch diese Ansätze oftmals zeit- und kostensparender ausfallen (Abbildung 2.2(b)).^{1,15,76} Während bei markerbasierten Verfahren die Charakterisierung des Analyten durch die benötigten Spülschritte zumeist auf Vergleichsmessungen vor und nach der Farbstoffanbindung limitiert ist, bieten markerfreie Sensoren eine Echtzeitanalyse über das gesamte molekulare Detektionsexperiment hinweg. Sie eignen sich somit neben der quantitativen Bestimmung von Biomolekülen vor allem auch zur Charakterisierung von molekularen Bindungskinetiken. Bei markerfreien Ansätzen erfolgt die Detektion durch Lokalisierung der nachzuweisenden Moleküle innerhalb einer optofluidischen Interaktionszone, wobei diese analog wie bei den markerbasierten Verfahren passiv oder als Transduktor ausgelegt sein kann. Bei optischen Detektionsverfahren basierend auf Absorption (z. B. in der UV- und IR-Spektroskopie)^{85,86} oder Raman-Streuung⁸⁷ besitzt die Interaktionszone neben der Analytlokalisierung/-leitung oftmals keine weitere Bauteilfunktion (im weitesten Sinne ist das zu detektierende Molekül somit gleichzeitig auch der Sensortransduktor). Bei anderen Messverfahren werden Sensorgeometrien in die Interaktionszone eingebettet, deren optische Bauteileigenschaften durch Präsenz der zu detektierenden Moleküle messbar verändert werden. Das mitunter gängigste Messprinzip basiert hierbei auf Änderungen des optischen Brechungsindex in unmittelbarer Nähe des Sensortransduktors. Die zu detektierenden Moleküle lagern hierbei selektiv an die Sensoroberfläche an und interagieren dort mit dem evaneszenten Feldanteil der in der optischen Struktur geführten Lichtmoden. Die Änderung der optischen Dichte entlang der Sensoroberfläche resultiert in einer Änderung der Phasengeschwindigkeit der Lichtmoden. Die Quantifizierung der Brechzahländerung kann auf unterschiedliche Weise erfolgen und ist im Wesentlichen abhängig von der Geometrie und der Materialkomposition des Sensortransduktors.⁷⁶ Beispielsweise wird bei optischen Interferometern die Phasengeschwindigkeitsänderung durch Überlagerung des Abtastlichtes mit einer vom Analyten isolierten Referenzlichtmode detektiert. Die Magnitude der sich ergebenden Phasenverschiebung wird anschließend zumeist optoelektronisch ausgewertet. Bei optischen Resonatoren wird das Abtastlicht mit sich selbst zur Interferenz gebracht, sodass es zur Ausbildung optischer Resonanzen kommt. Eine Veränderung der Phasengeschwindigkeit bewirkt hier eine spektrale Verschiebung dieser Resonanzen, die ebenfalls zumeist optoelektronisch erfasst wird. Zu den gängigsten optischen Resonatortypen zählen photonische Kristallstrukturen,^{88,89} plasmonische Strukturen^{9,90} sowie die im Rahmen dieser Arbeit behandelten WGM-Resonatoren.^{53,55-58}

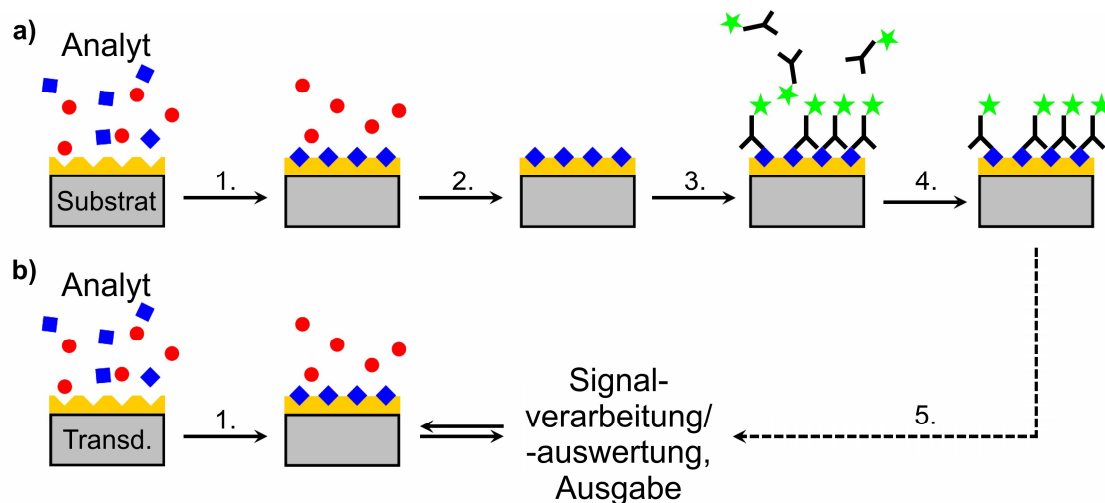


Abbildung 2.2: Funktionsweise der markerbasierten und markerfreien Detektion von Biomolekülen. (a) Schematische Darstellung der markerbasierten Detektion von Biomolekülen, am Beispiel einer Sandwichstrategie. Die zu detektierenden Biomoleküle (blaue Rauten) werden zumeist an eine funktionalisierte Substratoberfläche ohne Bauteilfunktionalität im Sinne eines Signaltransduktors angebonden (1.). Durch die Oberflächenfunktionalisierung binden alle übrigen Analytkomponenten (rote Kreise) nicht an die Oberfläche an. Nach einem Spülschritt (2.) werden anschließend markierte Moleküle (zumeist Antikörper) an die immobilisierten Biomoleküle angekoppelt (3.). Die Markierungen sind beispielsweise Fluorophore, Chromophore oder Chemilumineszenzfarbstoffe. Nach einem erneuten Spülschritt (4.) werden die Marker angeregt und deren Emission detektiert (5.). (b) Schematische Darstellung der markerfreien Detektion von Biomolekülen. Die selektiv an den funktionalisierten Sensortransduktor (Transd.) anbindenden Biomoleküle (blaue Rauten) (1.) bewirken eine direkt messbare Veränderung der Bauteileigenschaften des Sensortransduktors. Bei optischen Biosensoren ist dies beispielsweise eine Veränderung der Transmission oder der Phasengeschwindigkeit des im Transduktor propagierenden Abtastlichtes. Die Signalverarbeitung/-auswertung und Ausgabe erfolgt zumeist in Echtzeit. Spülschritte entfallen ggf. komplett.

Neben den optischen Biosensoren existieren zahlreiche weitere Detektionsansätze, basierend beispielsweise auf elektrischen/elektrochemischen, akustischen und mechanischen Transduktoren. Gute Zusammenfassungen bieten die Journalartikel von D’Orazio,⁷ Patolsky und Kollegen,⁹¹ Arlett und Kollegen⁹² sowie Waggoner und Craighead.⁹³

2.2 Oberflächenfunktionalisierung

Um eine möglichst hohe molekulare Selektivität einer Sensoroberfläche gegenüber einem bestimmten Analytinhaltsstoff zu erzielen, wird diese chemisch vorbehandelt. Dieser Vorgang wird gemeinhin als Oberflächenfunktionalisierung bezeichnet.⁷⁴ Ziel der Oberflächenfunktionalisierung ist es, die Sensoroberfläche mit einer möglichst dichten Lage von bindungsselektiven Akzeptormolekülen auszustatten. Neben der Erhöhung der Sensitivität gegenüber der zu detektierenden Substanz dient die Oberflächenfunktionalisierung darüber hinaus der Passivierung der Sensoroberfläche vor ungewollten Anbindungsereignissen. Im Optimalfall bindet nach der chemischen Oberflächenmodifikation ausschließlich die zu detektierende Molekülart an die Sensoroberfläche an, während alle übrigen im Analyten vorhandenen molekularen Bestandteile nicht am Sensor andocken und somit keinen Beitrag zum Sensorsignal liefern (Abbildung 2.3). Die individuellen chemischen Funktionalisierungsprotokolle sind hierbei abhängig vom Material und der Geometrie der jeweiligen Sensorstruktur und können sich stark voneinander unterscheiden. Daraus resultiert eine nahezu unüberschaubar große Auswahl an chemischen Prozeduren. Im vorliegenden Kapitel werden deshalb lediglich die Grundkriterien und Strategien einer Oberflächenfunktionalisierung diskutiert, um den Leser bezüglich der Auswahl eines geeigneten Oberflächenfunktionalisierungsprotokolls zu sensibilisieren. Eine explizite gegenüberstellende Betrachtung der einzelnen im Rahmen der vorliegenden Arbeit applizierten Funktionalisierungsansätze ist jeweils den einleitenden Paragraphen der Kapitel 4 bis 6 zu entnehmen. Die Diskussion orientiert sich an den Funktionalisierungsstrategien, die in dieser Arbeit zum Einsatz kommen. Im Detail erörtert werden die Strategien basierend auf Adsorption und kovalenter Immobilisierung von Akzeptormolekülen an eine Sensoroberfläche. Andere Strategien wie z. B. die Einbettung der Akzeptormoleküle in Sol-Gele, Trägermembranen oder Polymer-Gele werden nicht behandelt. Für einen breiten Einblick in diverse chemische

Oberflächenfunktionalisierungsmethoden sei der interessierte Leser an dieser Stelle auf die zusammenfassende Schrift von Collings und Caruso verwiesen.⁷⁴ Gute Zusammenfassungen über gängige molekulare Depositionsverfahren zur strukturierten Oberflächenfunktionalisierung wurden von Nie und Kumacheva,⁹⁴ Falconnet und Kollegen⁹⁵ und Nicu und Leichlé⁵ verfasst.

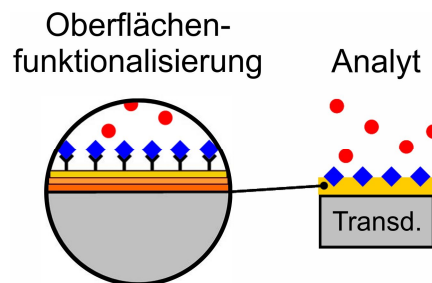


Abbildung 2.3: Schematische Funktionsweise einer Oberflächenfunktionalisierung. Im Rahmen der Oberflächenfunktionalisierung wird die Oberfläche des Sensortransduktors (Transd.) mit Molekülen dekoriert, die eine hochselektive Anbindung des zu detektierenden Analytmoleküls ermöglichen. Im Optimalfall binden ausschließlich die interessierenden Analytmoleküle (blaue Rauten) an die Sensoroberfläche an, während alle übrigen Analytmoleküle nicht zum Sensorsignal beitragen. Eine Oberflächenfunktionalisierung kann je nach Material und Oberflächenchemie der Sensoroberfläche mehrere Zwischenschritte beinhalten, resultierend in molekularen Zwischenlagen.

Neben der bauteilspezifischen Sensitivität des Sensortransduktors und dem Ausleseverfahren ist das Leistungsvermögen eines Biosensorsystems letztendlich vor allem auch an die Art und Qualität der Oberflächenfunktionalisierung geknüpft.⁷⁴ Ziel ist es, der zu detektierenden Moleküllart eine möglichst hohe Anzahl an Bindungsstellen auf dem Sensortransduktor anzubieten. Neben der bereits erwähnten hohen molekularen Selektivität und der Unterdrückung nichtspezifischer Adsorptionsereignisse sind hierbei weitere Kriterien an eine Oberflächenfunktionalisierung zu stellen. Diese werden in den folgenden Abschnitten erörtert.

Grundsätzlich lässt sich die Immobilisierung von Akzeptormolekülen auf eine feste Sensoroberfläche auf zwei Arten durchführen.⁷⁴ Zum einen können die Akzeptormoleküle durch Adsorption auf eine Oberfläche gebracht werden. Hierbei werden relativ schwache molekulare Wechselwirkungen zwischen den Akzeptormolekülen und den zu funktionalisierenden Oberflächen ausgenutzt, beispielsweise Van-der-Waals-, elektrostatische oder hydrophobe Anziehungskräfte. Diesbezügliche Ansätze zeichnen sich durch eine äußerst einfache Durchführung sowie milde Prozessabläufe aus, da sie nicht an den Ablauf einer spezifischen chemischen Reaktionskette gebunden sind. Die Ansätze können somit direkt und ohne signifikante Adaptionsmaßnahmen auf viele Sensorplattformen übertragen werden. Im Fall von proteinbasierten Akzeptormolekülen kann allerdings durch deren direkten Kontakt mit der Sensoroberfläche eine chemische Modifikation bis hin zur Denaturierung der Moleküle stattfinden, sodass diese ihre biologische Funktion verlieren. Adsorbierte Moleküllagen sind außerdem nur bedingt mechanisch stabil und neigen dazu sich mit zunehmenden Verweildauern im Analyten zu lösen. Sie sind zumeist statistisch orientiert, was sich negativ auf die Packungsdichte sowohl der Akzeptor- als auch der Analytmoleküle auswirken kann. Eine Ausnahme bilden beispielsweise alkanthiolterminierte Moleküle, die sich hochaffin an Edelmetalloberflächen anlagern können. Unter gewissen Voraussetzungen weisen die sich als selbstorganisierende Monoschichten immobilisierten Moleküle eine hohe innere Ordnung und somit hohe Packungsdichten auf. Die Thiollagen gehen hierbei, obgleich von nichtkovalenter Natur, eine vergleichsweise stabile Bindung mit dem Trägersubstrat ein. Jedoch sind Alkanthiole auf Edelmetallsubstrate limitiert und finden ihre hauptsächliche Anwendung bei plasmonischen Sensorstrukturen.^{9,96} Es sei anzumerken, dass auch die in Kapitel 4 eingesetzten Phospholipide eine ähnlich hohe innere Ordnung in Form von lamellaren Multilagen aufweisen. Hierbei passivieren die Lipide die Sensoroberfläche, sodass einer Denaturierung der Akzeptormoleküle vorgebeugt wird.

Kovalent an eine Sensoroberfläche gebundene Akzeptormoleküle weisen demgegenüber eine weitaus höhere Stabilität auf, was vor allem für einen Einsatz der Biosensoren innerhalb einer mikrofluidischen Infrastruktur von Vorteil ist und längere Verweildauern im Analyten ermöglicht. Unter gewissen Umständen sind jedoch auch diese Bindungen instabil und nicht für einen längeren

Sensorbetrieb geeignet. Dies kann sich vor allem auch während der Oberflächenfunktionalisierungsprozedur als störend erweisen, da die kovalente Immobilisierung der Akzeptormoleküle je nach Art der Bindung mit der Zersetzung ebendieser konkurrieren kann (in wässrigen Medien beispielsweise durch Hydrolyse⁹⁷). Abhängig vom Material der Sensoroberfläche kann ein chemisches Oberflächenfunktionalisierungsprotokoll mehrere Teilschritte umfassen, falls die Immobilisierung der Akzeptormoleküle über Mediatormoleküle stattfindet. In den Kapiteln 5 und 6 wird der Einsatz von Mediatormolekülen durch entsprechende funktionelle Materialien gezielt umgangen. Ein einmal entwickeltes Protokoll resultiert in der Regel in einer äußerst stabilen Oberflächenfunktionalisierung und einer guten Reproduzierbarkeit.

Trotz der operativen Nachteile basieren klinische Standardverfahren wie ELISA aufgrund der geringen Kosten und der einfachen Handhabbarkeit nach wie vor auf Adsorption.⁷⁴

Generell muss die letztendlich ausgewählte Immobilisierungsprozedur kompatibel mit den Akzeptormolekülen, den Analytmolekülen und auch mit der Sensoroberfläche sein. Dies betrifft sowohl die Auswahl der benötigten Reagenzien (im Besonderen der verwendeten Lösemittel) als auch die letztendlich gewählte Funktionalisierungsmethodik. Im Optimalfall lässt sich die Methodik mit guter Reproduzierbarkeit und auf verschiedene Sensorplattformen gleichermaßen durchführen, beispielsweise um verkapselte Lab-on-a-Chip-Systeme realisieren zu können.

Um eine chemische Kompatibilität mit den zumeist aminosäurebasierten Akzeptormolekülen zu gewährleisten, wird bei der Oberflächenfunktionalisierung oftmals auf wasserbasierte Reagenzien zurückgegriffen. Über die Beimischung von Salzen lässt sich eine physiologische Umgebung imitieren und das elektrochemische Potential bzw. der pH-Wert der Pufferlösung optimal auf die Bindungsreaktion der Akzeptormoleküle mit der Sensoroberfläche abstimmen. Sollte zur Immobilisierung der Einsatz von Mediatormolekülen vonnöten sein, gelten für deren Immobilisierungsprotokolle ähnliche Voraussetzungen. Bei der Verwendung nichtwässriger und somit potentiell nicht biokompatibler Reagenzien sind vor der finalen Immobilisierung der molekular selektiven Komponente ausreichende Reinigungs- bzw. Spülschritte durchzuführen. Da insbesondere proteinbasierte Akzeptormoleküle oftmals eine begrenzte Haltbarkeit aufweisen, sollten diese gegebenenfalls erst direkt vor dem Detektionsexperiment auf die Sensoroberfläche aufgebracht werden. Ultimativ sollte die Oberflächenfunktionalisierung in einer selektiven und stabilen Bindung der Akzeptormoleküle resultieren, sodass diese ihre biologische Funktionalität in vollem Umfang beibehalten und ohne die Bauteilfunktionalität der Sensorstruktur negativ zu beeinflussen. Die immobilisierten Akzeptormoleküle sollten über die gesamte Breite an möglichen physiologischen Bedingungen (betreffend pH-Wert, molekulare Zusammensetzung, Salzgehalt etc.) stabil und funktional sein. Im Optimalfall weisen die Akzeptormoleküle eine homogene Ausrichtung und Dichtheit auf. Hierbei spielt letztendlich auch die Sensoroberfläche eine signifikante Rolle. Durch das chemische Oberflächenfunktionalisierungsprotokoll dürfen keine störenden Seitenreaktionen mit der Sensoroberfläche stattfinden, die zum einen die Bauteilfunktionalität des Sensors an sich beeinträchtigen oder die für die Akzeptormolekülimmobilisierung benötigten Bindungsstellen kompetitiv verbrauchen. Umgekehrt darf die Chemie der Sensoroberfläche keine Beeinträchtigung der Akzeptormoleküle nach sich ziehen. So sollte das Sensormaterial, auch im Hinblick auf die finale Anwendung in physiologischen Medien, über eine gute Biokompatibilität verfügen. Zusätzlich sollte die Sensoroberfläche eine möglichst hohe Hydrophilie aufweisen, um nichtspezifische Proteinanlagerungen zu unterdrücken.⁹⁸ Zum einen wird auf diese Weise der diesbezügliche Störbeitrag zum Sensorsignal während einer biomolekularen Detektion verringert, zum anderen wird einer Denaturierung der Akzeptormoleküle entgegengewirkt. Da viele Materialien oftmals nicht ausreichend hydrophil sind, kommen im Rahmen der Oberflächenfunktionalisierung geeignete weitere Moleküle zur Passivierung der Sensoroberfläche zum Einsatz. Beispielsweise lassen sich mit BSA (Serumalbumin vom Rind; engl. bovine serum albumin) oder Polyethylenglycol (PEG) gute Passivierungsergebnisse erzielen.^{98,99} Ein weiterer bewährter Ansatz besteht darin, die Oberflächenfunktionalisierung als Proteinsandwich auszulegen, beispielsweise durch Immobilisierung von biotinylierten Akzeptormolekülen auf eine zuvor auf die Sensoroberfläche aufgebrachte Streptavidinschicht.¹⁰⁰ Generell ist es ratsam alle Bindungsstellen, die nicht für die Akzeptormolekülimmobilisierung verbraucht oder in diese involviert waren, anderweitig abreagieren zu lassen.

Eine kovalente Oberflächenfunktionalisierung der in dieser Arbeit behandelten PMMA-Mikrokelche kann potentiell über chemische Modifikation der Methacrylatgruppen vorgenommen werden. Problematisch hierbei ist jedoch, dass diese Gruppen vergleichsweise schwach reaktiv sind. Zur Aktivierung kommen in aller Regel hochreaktive Chemikalien wie beispielsweise *N*-lithioethylenediamin, Natriumhydroxid oder Natriumperodat zum Einsatz, sodass die Oberflächenfunktionalisierungsprozeduren unter erhöhten Sicherheitsmaßnahmen und ggf. an inerte Atmosphäre durchzuführen sind.¹⁰¹⁻¹⁰³ Alternative chemische Modifikationsprozeduren über UV-Bestrahlung oder Sauerstoffplasma eignen sich lediglich zur Funktionalisierung passiver PMMA-Resonatoren.¹⁰⁴⁻¹⁰⁸ Bei allen Prozeduren kommt es potentiell zu einer Beeinträchtigung der Oberflächengüte und somit zu einer Verschlechterung der *Q*-Faktoren der Resonatorstrukturen. Beispielsweise weisen PMMA-Oberflächen nach ihrer Belichtung im tiefen UV feine Mikrorisse, einen gewissen Materialschrumpf sowie eine erhöhte Löslichkeit bzw. Schwellverhalten in flüssigen Medien auf. Bei aktiven Resonatoren wären somit in der Summe signifikant höhere Laserschwellen sowie kürzere Lebensdauern und instabilere Sensorsignale zu erwarten. Durch die chemischen Limitationen ist die Auswahl der verfügbaren Akzeptormoleküle sowie der Immobilisierungsprotokolle für PMMA stark eingeschränkt.

In den Kapiteln 4 und 5 werden diese Einschränkungen durch eine gezielte postfabrikative Implementierung funktioneller Dünnschichten effektiv umgangen. Beide Ansätze erlauben die Anbindung eines sehr breiten Spektrums an Akzeptormolekülen ohne die Bauteilfunktionalität der Mikrokelchsensoren signifikant zu beeinträchtigen. In Kapitel 4 wird die Hydrophobie von PMMA zur Physisorption amphiphiler Phospholipid-Multilagenausgenutzt. In den Kapiteln 5 und 6 werden unterschiedliche kovalente Oberflächenfunktionalisierungsstrategien angewendet, die die Einschränkungen bezüglich der schwachen Reaktivität von PMMA durch eine gezielte Auswahl von alternativen Materialien wirksam umgehen.

Kapitel 3

Flüstergalerie-Mikrokelche aus PMMA

Zusammenfassung

Anhand der in dieser Arbeit behandelten Mikrokelche werden die physikalischen Grundlagen optischer Flüstergaleriemoden behandelt, sowie die Herstellung und messtechnische Charakterisierung passiver und aktiver Mikrokelche beschrieben.

3.1 Optische Flüstergaleriemoden in PMMA-Mikrokelchen

WGM-Mikroresonatoren sind vor allem aufgrund ihrer hohen erzielbaren optischen Güten (Q -Faktoren) für die Biosensorik interessant, da ihre enorm schmalbandigen WGM-Resonanzen bei entsprechendem Ausleseverfahren eine sehr hohe Auflösung und somit sehr kleine Detektionslimits bis hin zur Einzelmoleküldetektion erlauben.^{69,71} Die mitunter höchsten Q -Faktoren weisen WGM-Strukturen auf, bei denen über eine thermische Reduktion der Oberflächenrauheit Resonatoren mit optisch glatten Oberflächen hergestellt werden können. Bei den bisher mehrheitlich zum Einsatz kommenden Quarzglasresonatoren müssen hierzu jedoch Temperaturen jenseits von 1.000 °C (oftmals seriell auf einzelne Resonatoren) appliziert werden.^{18,109} Polymermaterialien wie PMMA bieten hier aufgrund ihrer vergleichsweise niedrigen Glasübergangstemperaturen signifikante fabrikationstechnische Vorteile.^{10,110,111} Zusätzlich lassen sich die in dieser Arbeit behandelten Mikrokelchresonatoren über eine standardlithographische Prozesskette herstellen, wodurch eine Massenfabrikation auf Waferbasis ermöglicht wird.¹⁰ Über die Beimischung von Laserfarbstoffen in das gelöste Ausgangsmaterial lassen sich zudem auf einfache Weise Mikrolaser herstellen.¹¹

Bei den in dieser Arbeit behandelten WGM-Strukturen handelt es sich um sogenannte Mikrokelche aus PMMA. Als Biosensoren kommen vor allem farbstoffdotierte Mikrokelchlaser zum Einsatz, da diese gegenüber passiven Mikrokelchen ohne Farbstoffdotierung sowohl operative als auch physikalische Vorteile aufweisen.⁵³ Der primäre Vorteil von aktiven WGM-Strukturen liegt darin, dass sie im Vergleich zu baugleichen passiven Mikroresonatoren mit verhältnismäßig geringem Aufwand per Freistrahloptik angeregt und ausgelesen werden können.^{11,28,34,83,112–116} Bei passiven Strukturen geschieht dies zum Hauptteil mittels Faserkopplung.^{17,55,57,64,117–119} Hierbei wird eine stark ausgedünnte optische Glasfaser in die Nähe eines Resonators gebracht, sodass das durch die Faser propagierende Analyselicht evaneszent in den Resonator einkoppelt. Im Transmissionsspektrum der Faser werden die Flüstergaleriemoden dann als scharfe spektrale Intensitätseinbrüche sichtbar. Aufgrund der hohen Übereinstimmung der Wellenvektoren der Flüstergalerie- und Wellenleitermoden werden hohe Kopplungskoeffizienzen erreicht.¹²⁰ Die stark ausgedünnten Glasfasern sind jedoch nur äußerst beschränkt haltbar und somit für einen längerfristigen und flexiblen Einsatz nicht geeignet.¹²¹ Des Weiteren sind an dieses Kopplungsprinzip sehr hohe Anforderungen bezüglich einer hochgenauen und mechanisch äußerst stabilen Positionierung der Faser über das gesamte Experiment hindurch geknüpft. Bei Lasern entfällt diese Anforderung gegebenenfalls komplett, da im Freistrahlmodes auf die Glasfaserkopplung verzichtet werden kann. Mikrolaser können des Weiteren im Vergleich zu baugleichen passiven Mikroresonatoren schmalere spektrale Resonanzen aufweisen, wodurch eine höhere Signalauflösung und ein geringeres molekulares Detektionslimit erzielt werden können.^{32,122,123}

In der vorliegenden Arbeit wird die Faserkopplung verwendet, um Q -Faktoren von passiven Mikroresonatoren zu studieren (Kapitel 3.1.3). Für die biomolekularen Detektionsexperimente werden aktive Mikrokelche per Freistrahloptik adressiert (Kapitel 3.1.4 und 3.1.5). In Kapitel 3.1.1 werden nun die physikalischen Grundlagen und die wichtigsten Bauteilparameter von WGM-Strukturen mathematisch beschrieben und erörtert. Kapitel 3.1.2 legt die Herstellung von PMMA-basierten Mikrokelchstrukturen dar. Die Kapitel 3.1.3 bis 3.1.5 befassen sich mit der optischen Charakterisierung der Mikrokelche.

Bei optischen WGM-Resonatoren handelt es sich um Strukturen, die eine in sich geschlossene Wellenleitergeometrie mit einer hinreichend hohen Transparenz im Arbeitswellenlängenbereich aufweisen. Durch die zirkuläre Propagation des im Wellenleiter eingeschlossenen Lichtfeldes kommt es nach einem vollständigen Resonatorumlauf zu Interferenzerscheinungen. Hierbei unterstützt die jeweilige Resonatorstruktur letztendlich nur die Lichtmoden, die aufgrund konstruktiver Interferenz bevorzugt im Resonator geführt werden – die sogenannten Flüstergaleriemoden (WGMs). Bei hinreichend geringen optischen Verlusten können bis zu mehreren Millionen Resonatorumläufe erreicht werden.^{18,20,23} Die Bandbreite an möglichen Resonatorgeometrien ist hierbei vielfältig und umfasst beispielsweise Mikrokugeln,^{24–28,30} Mikrotoroide,^{31–35} runde und gestreckte Dünnschichtwellenleiterringe,^{22,36–41} Dünnschichtscheiben,^{61,62,124,125} optische Faserschlaufen,^{126–128} Zylinder,^{21,129} Kapillaren,^{42–45,115,130} Flüssigkeitstropfen,^{59,131} Mikroblasen^{132,133} und Mikrokelche.^{10,11}

Spektrale Charakteristika

Abbildung 3.1(a) zeigt schematisch die Resonatorstruktur eines Mikrokelches. Tangential in die Resonatorstruktur eingekoppeltes Licht zirkuliert per Totalreflexion entlang des Resonatorumfangs (Abbildung 3.1(b)). Bei definierten Wellenlängen kommt es nach einem vollen Resonatorumfang durch Interferenzerscheinungen zur Ausbildung von WGMs. Die spektralen Positionen λ_{WGM} sind hierbei abhängig von der optischen Weglänge nach einem vollständigen Resonatorumfang L_{WGM} sowie vom effektiven Brechungsindex n_{eff} der jeweiligen WGM. Im zweidimensionalen Fall gilt für die Resonanzbedingung der WGMs in Ausbreitungsrichtung entlang des Resonatorumfangs.⁵⁶

$$L_{\text{WGM},N_t} = N_t \frac{\lambda_{\text{WGM},N_t}}{n_{\text{eff},N_t}}; \quad N_t \in \mathbb{N} \quad (1)$$

Hierbei beschreibt N_t die azimutale Quantenzahl der jeweiligen WGM. Bei den Mikrokelchen handelt es sich um rotationssymmetrische Resonatorstrukturen. Zur Realisierung von Resonatoren mit ausreichend hohen Güten wird in realen Anwendungen zudem der Resonatorradius R stets wesentlich größer als die Arbeitswellenlängen der WGMs gewählt. Infolgedessen lassen sich die Resonanzwellenlängen der WGMs gemäß Gleichung 1 näherungsweise wie folgt berechnen:

$$\lambda_{\text{WGM},N_j} \approx \frac{2\pi R n_{\text{Res}}}{N_j}; \quad N_j \in \mathbb{N} \quad (2)$$

Aus Gleichung 2 wird bereits das Sensorkonzept der WGM-Sensoren ersichtlich. Demnach wird eine Änderung der Resonanzwellenlänge entweder durch eine Veränderung des effektiven Brechungsindex erzielt, oder aber durch eine Veränderung des Resonatorradius.

Um den spektralen Abstand zweier benachbarter WGMs im gegebenen rotationssymmetrischen Resonatorsystem zu berechnen, werden zwei aufeinanderfolgende longitudinale WGMs mit den azimutalen Quantenzahlen N_0 und N_0+1 betrachtet (Abbildung 3.1(b)). Für den freien Spektralbereich $\Delta\lambda_{\text{FSR}}$ ergibt sich:

$$\begin{aligned} \Delta\lambda_{\text{FSR}} &= \lambda_{\text{WGM},N_j} - \lambda_{\text{WGM},N_j+1} = \frac{2\pi R n_{\text{Res}}}{N_j} - \frac{2\pi R n_{\text{Res}}}{N_j + 1} \\ &\approx \frac{\lambda_{\text{WGM},N_j}^2}{2\pi R n_{\text{Res}}} \end{aligned} \quad (3)$$

Für die im Rahmen dieser Arbeit standardmäßig verwendeten PMMA-Kelchresonatoren ($R \approx 20 \mu\text{m}$) ergeben sich für Arbeitswellenlängen zwischen 520 und 650 nm (entspricht dem Emissionsspektrum von Pyrromethen 597-dotiertem PMMA,¹³⁴ $n_{\text{PMMA},520\text{nm}} = 1,495$, $n_{\text{PMMA},650\text{nm}} = 1,489$; vollständige dielektrische Funktion s. Kapitel 5, Abbildung 5.3(a)) ein azimutaler Quantenzahlenbereich zwischen 288 und 348. Der freie Spektralbereich $\Delta\lambda_{\text{FSR}}$ der WGMs in diesem Wellenlängenintervall liegt zwischen 1,44 nm und 2,26 nm.

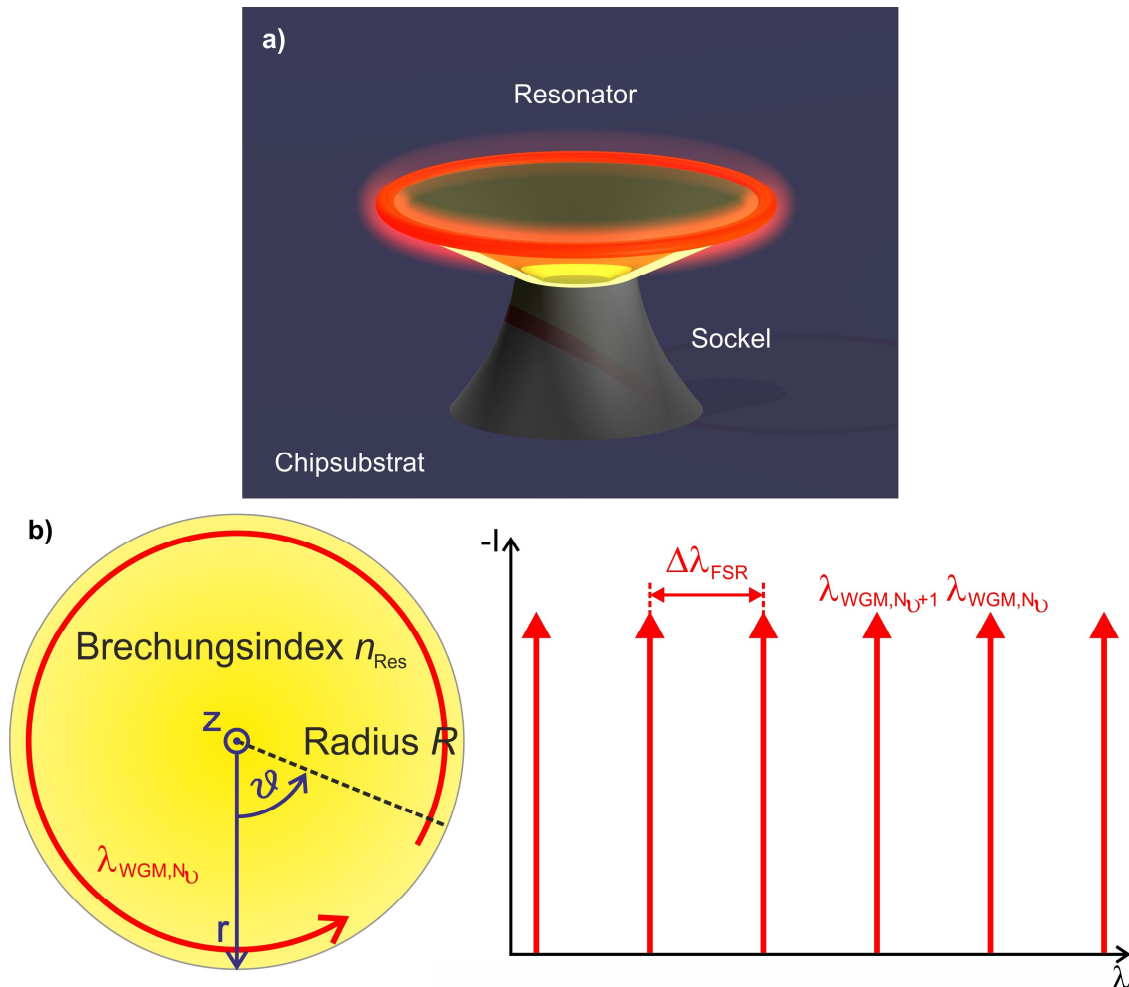


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung eines WGM-Mikrokolches. (a) Ein WGM-Mikrokolch in der seitlichen Ansicht. Die Resonatorstruktur ist auf einem Sockel lokalisiert, wodurch sich die kelchförmige Gestalt ergibt. Die Resonatorherstellung wird in Kapitel 3.2 erörtert. Die Flüstergaleriemoden propagieren per Totalreflexion entlang des Resonatorumfangs mit definierten Wellenlängen $\lambda_{\text{WGM}, M}$. (b) Sowohl die Wellenlängen $\lambda_{\text{WGM}, M}$ als auch der freie Spektralbereich $\Delta\lambda_{\text{FSR}}$, sind abhängig vom Resonatorradius R und dem Brechungsindex n_{Res} des Resonatormaterials.

In den Gleichungen 1 bis 3 gibt die azimutale Quantenzahl die Anzahl der Wellenzüge einer resonanten Lichtmode entlang des Resonatorumfangs an. Die Anwendung der Resonanzbedingung setzt hierbei physikalisch voraus, dass die interferierenden Wellenleitermoden dasselbe Modenprofil aufweisen. Dieser Umstand erfordert die formale Einführung zweier weiterer Quantenzahlen N_z und N_r ($N_z, N_r \in \mathbb{N}_0$; entspricht der Anzahl der Feldintensitätsmaxima minus 1), welche die Resonanzbedingung in orthogonaler und radialer Richtung beschreiben (vgl. Abbildung 3.1). Zur vollständigen Nomenklatur werden die WGMs darüber hinaus gemäß ihrer elektromagnetischen Polarisationsrichtung unterschieden. Hierbei weisen $TE_{N_r, N_z}^{N_j}$ (transversal elektrische) WGMs ihre elektrische Hauptfeldkomponente in radialer Richtung auf, bei $TM_{N_r, N_z}^{N_j}$ (transversal magnetische) WGMs zeigt der magnetische Feldvektor in r -Richtung. Die WGMs mit $N_z = N_r = 0$ werden als Grundmoden bezeichnet.

Resonatorgüte

Die Fähigkeit eines optischen WGM-Resonators eingekoppelte Lichtenergie in sich zu speichern ist im Wesentlichen abhängig von der Aufenthaltsdauer der in ihm zirkulierenden Photonen. Je länger Licht in einem WGM-Resonator zirkuliert, desto öfter kann es zur Interferenz beitragen. Mit steigender Aufenthaltsdauer wird infolgedessen die Resonanzbedingung der vom Resonator unterstützten Lichtmoden immer schärfer definiert, was sich in spektral schmalbandiger werdenden Resonanzen widerspiegelt. Um bei spektralen Ausleseverfahren eines WGM-Biosensors, wie sie auch

in der vorliegenden Arbeit an den Mikrokelchen stattfinden, eine möglichst hohe Signalauflösung zu erreichen, sind somit optische Bauteilverluste zu minimieren. Auf diese Weise können möglichst schmalbandige Resonanzen zu erzielt werden.

Die optischen Verluste eines WGM-Resonators lassen sich quantitativ in den Gütefaktor Q (Qualitätsfaktor, Q-Faktor) zusammenfassen. Dieser definiert sich im Allgemeinen aus der $1/e$ Lebensdauer der in den Resonator eingespeisten Photonen τ und der Kreisfrequenz ω_{WGM} der jeweiligen Lichtmode:⁷²

$$Q = \omega_{\text{WGM}} \tau \square \omega_{\text{WGM}} \frac{\text{im Resonator gespeicherte Energie}}{\text{Energieverluste pro } E\text{-Feld-Umlauf}} = \omega_{\text{WGM}} \frac{U}{-dU/dt} \quad (4)$$

Durch Lösen dieser linearen Differentialgleichung ergibt sich für den Zeitverlauf der im Resonator eingekoppelten Lichtenergie $U(t)$:

$$U(t) = U_0 e^{-t\omega_{\text{WGM}}/Q} \quad (5)$$

Für den zeitlichen Verlauf des elektrischen Feldes $E(t)$ folgt:

$$\sqrt{U(t)} \propto E(t) = E_0 e^{-\omega_{\text{WGM}}t/2Q} e^{-i\omega_{\text{WGM}}t} \quad (6)$$

Über eine Fouriertransformation von Gleichung 6 lässt sich die spektrale Form der Lichtmode errechnen.

$$|E(\omega)|^2 \propto \frac{1}{(\omega - \omega_{\text{WGM}})^2 + (\omega_{\text{WGM}}/Q)^2} \quad (7)$$

WGMs können demnach über lorentzförmige Resonanzen spektral beschrieben werden. Der Q -Faktor einer WGM ergibt sich aus der spektralen Halbwertsbreite $\Delta\omega_{\text{FWHM}}$.

$$Q = \frac{\omega_{\text{WGM}}}{\Delta\omega_{\text{FWHM}}} = \frac{\lambda_{\text{WGM}}}{\Delta\lambda_{\text{FWHM}}} \quad (8)$$

Mit Gleichung 4 folgt für die effektive Weglänge L_{eff} der in einem WGM-Resonator zirkulierenden WGMs:

$$L_{\text{eff}} = c_{\text{Res}} \tau = \frac{Q \lambda_{\text{WGM}}}{2\pi n_{\text{Res}}} \quad (9)$$

Hierbei ist c_{Res} die Lichtgeschwindigkeit im Resonatormedium. Aus Gleichung 9 wird der signifikante Vorteil der WGM-Resonatoren im Vergleich zu anderen optischen Wellenleitersystemen deutlich. Am Beispiel der PMMA-Kelchresonatoren ergibt sich bei einer hypothetischen Arbeitswellenlänge von

620 nm ($n_{\text{PMMA},620\text{nm}} = 1,490$) und einem Q -Faktor von 10^7 (Beck und Kollegen¹⁰⁸) eine effektive Interaktionsweglänge der WGMs mit dem angrenzenden Analyten von etwa 66 cm. Während die Mikrokelche einen vernachlässigbar kleinen Raum auf der Chipoberfläche einnehmen, müssen somit nichtresonante Wellenleiterstrukturen, wie sie z. B. bei Interferometern vorzufinden sind, etwa 5.000-mal länger ausgelegt sein, um dieselbe Wechselwirkungslänge zu realisieren.

Im optischen Experiment definiert sich die spektrale Halbwertsbreite $\Delta\lambda_{\text{FWHM}}$ einer WGM aus der Gesamtheit aller auftretenden Verlustkanäle. Es treten verschiedene Verlustmechanismen auf, die jeweils über einen dedizierten Q -Faktor ausgedrückt werden können. Die parallel geschalteten einzelnen Q -Faktoren ergeben den Gesamtqualitätsfaktor Q_{ges} .

$$\frac{1}{Q_{\text{ges}}} = \frac{1}{Q_{\text{Mat}}} + \frac{1}{Q_{\text{Str}}} + \frac{1}{Q_{\text{Rad}}} + \frac{1}{Q_{\text{Kopp}}} \quad (10)$$

Q_{Mat} beschreibt die Verluste aufgrund von Materialabsorption und Rayleigh-Streuung.¹³⁵ Involviert sind hierbei das jeweilige Resonatormaterial, das die Resonatorstruktur umgebende Medium sowie die an die Resonatorstrukturen anlagernden Molekularlagen. Zu letzteren gehören beispielsweise die Oberflächenfunktionalisierung, die zu detektierenden Biomoleküle sowie an den Resonator adsorbierende Moleküle. Q_{Mat} verhält sich hierbei umgekehrt proportional zum Gesamtabsorptionskoeffizienten α .¹³⁶

$$Q_{\text{Mat}} = K_{\text{TE,TM}} \frac{2\pi n_{\text{Res}}}{\alpha\lambda}; \quad \alpha = \sum_i \eta_i \alpha_i \quad (11)$$

Der Parameter η_i beschreibt den optischen Füllfaktor (optischen Überlapp) der jeweiligen WGM mit den einzelnen Materialien mit den Absorptionskoeffizienten α_i . $K_{\text{TE,TM}}$ beschreibt das Verhältnis zwischen der im Rahmen eines Streueignisses abgestrahlten Gesamtlichtleistung zu der Lichtleistung, die nach dem Streueignis aus dem Resonator ausgekoppelt wird. Anhand einer analytischen Untersuchung von Mikrokugeln durch Gorodetsky und Kollegen ergab sich für TE-Moden $K_{\text{TE}} = 2,8$ und für TM-Moden $K_{\text{TM}} = 9,6$.¹³⁶ Aufgrund der Rotationssymmetrie lassen sich diese Werte auch auf die Mikrokelche in guter Näherung anwenden.

Q_{Str} beschreibt Streuverluste aufgrund von Oberflächen- und Volumendefekten. Diese sind in der Regel fabrikationsbedingt und somit abhängig von der jeweiligen Herstellungsmethode. Hierzu zählen Oberflächenrauheiten, Luft- bzw. Feststoffstreuungszentren im Resonatorvolumen sowie an der Resonatoroberfläche adsorbierte Partikel. Von Gorodetsky und Kollegen wurde der Einfluss von Obeflächendefekten auf Mikrokugeln analytisch untersucht.¹³⁶ Hierbei wurden die Defekte zu einer Lage mit einer RMS-Rauheit $\sigma_{\text{R}} = [\langle f(x,y)^2 \rangle]^{1/2}$ (RMS: root mean square) und einer Korrelationslänge B zusammengefasst. Das Ergebnis lässt sich grundsätzlich auch auf andere rotationssymmetrische WGM-Strukturen übertragen. Für TE-Moden ergibt sich:

$$Q_{\text{Str}} = \frac{K_{\text{TE}}}{K_{\text{TE}} + 1} \frac{3\lambda_{\text{WGM}}^3 R_{\text{Res}}}{8n_{\text{Res}} \pi^2 B^2 \sigma_{\text{R}}^2} \quad (12)$$

Q_{Str} ist demnach abhängig sowohl von der lateralen Ausdehnung der Streuzentren (deren geometrischem Beitrag zur Oberflächenrauheit) als auch von der Größe des Resonators.

Q_{Rad} repräsentiert Wellenleiterverluste. Aus der Tatsache, dass die Totalreflexion der Lichtstrahlen an einer gekrümmten Grenzfläche zwischen Resonator und angrenzendem Medium stattfindet, resultiert

eine endliche Wahrscheinlichkeit, dass einzelne Photonen die Grenzbedingung für Totalreflexion verletzen und die Grenzschicht überwinden.⁷²

$$Q_{\text{Rad}} \propto e^{\frac{4\pi n_{\text{Res}} R J}{\lambda_{\text{WGM}}}} = e^{2N_J J}; \quad J = \tanh\left(\sqrt{1 - \frac{1}{n_{\text{eff}}^2}}\right) - \sqrt{1 - \frac{1}{n_{\text{eff}}^2}} \quad (13)$$

Aus Gleichung 13 geht hervor, dass mit steigender azimuthaler Quantenzahl die Wellenleitungsverluste abnehmen. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass für eine fixe WGM-Wellenlänge mit wachsender Resonatorgröße der Auftreffwinkel unter dem die WGM totalreflektiert wird, größer wird und infolgedessen die Austrittswahrscheinlichkeit aus dem Resonator abnimmt.

Während die übrigen Q -Faktoren im Wesentlichen direkt vom Resonatorbauteil abhängen (intrinsische Q -Faktoren), stellt Q_{Kopp} mit den Kopplungsverlusten in externe Lichtmoden einen extrinsischen Parameter dar. In der Regel stellt das apparative Anregungs-/Ausleseverfahren hier den Hauptbeitrag. Die Resonatorverluste entstehen hierbei durch die Rückkopplung der angeregten WGMs in das zur Einkopplung verwendete Wellenleitersystem. In einem Journalbeitrag von Oraevsky wurde Q_{Kopp} im Zweidimensionalen für einen planaren Wellenleiter und einen scheibenförmigen Resonator analytisch abgeschätzt:¹³⁷

$$Q_{\text{Kopp}} \propto \frac{w_{\text{WL}}^3}{\lambda_{\text{WGM}}^4} e^{\left(\frac{2\pi d}{\lambda_{\text{WGM}}} \sqrt{(n_{\text{Res}}^2 - 1)}\right)} \quad (14)$$

Das Ergebnis macht deutlich, dass Q_{Kopp} primär von der Distanz d zwischen Wellenleiter und Scheibenresonator abhängt. Darüber hinaus zeigt sich eine Abhängigkeit zur Weite des Wellenleiters w_{WL} . Bei den in dieser Arbeit eingesetzten Mikrolasern können aufgrund deren Freistrahlanregung Kopplungsverluste vernachlässigt werden.

Während sich die übrigen Verlustkanäle im Rahmen der Bauteilherstellung und des experimentellen WGM-Ausleseverfahrens auf ein vernachlässigbares Maß minimieren lassen, ist die maximal erreichbare Resonatorgüte letztendlich abhängig vom gewählten Resonatormaterial. Mit PMMA als Resonatormaterial lassen sich an Luft bei einer Arbeitswellenlänge zwischen 520 nm und 650 nm theoretisch gemäß Gleichung 11 materiallimitierte Q -Faktoren von bis zu ca. 10^9 (TM-Moden) realisieren (PMMA-Absorptionskurve¹³⁸).

Brechzahlsensitivität und molekulare Sensitivität

Eine zentrale Fragestellung bei der Bauteilentwicklung eines Biosensors ist die molekulare Sensitivität, die mit dem jeweils gewählten Transduktordesign erzielt werden kann. Eine experimentelle Ermittlung erweist sich hierbei generell als schwierig, da beispielsweise der Bedeckungsgrad und die Affinität mit der Sensoroberfläche vom jeweils zu detektierenden Molekül und von der Art der Oberflächenfunktionalisierung abhängen. Über die Applizierung von Testflüssigkeiten mit definierten Brechzahlen und den daraus resultierenden spektralen Verschiebungen der Lasermoden kann hingegen auf einfache Weise die brechzahlinduzierte Sensitivität (BRIS) experimentell ermittelt werden. Da die an die Kelchresonatoren ankoppelnden Biomoleküle ebenfalls eine Brechzahländerung (nahe der Sensoroberfläche) hervorrufen, kann aus der BRIS mit guter Näherung die molekulare Sensitivität analytisch abgeleitet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die molekulare Sensitivität der Mikrokelchstrukturen analytisch abgeschätzt. Die Entwicklung des mathematischen Formalismus orientiert sich hierbei an dem von Zhu und Kollegen veröffentlichten Ansatz für Mikrokapillaren.¹³⁹

Ausgehend von Gleichung 2 lässt sich die azimuthale Resonanzbedingung unter Berücksichtigung der optischen Füllfaktoren η und der Brechzahlen n von Analyt und Resonator wie folgt aufstellen:

$$N_J \lambda_{\text{WGM}, N_J} = 2\pi R (\eta_{\text{Res}} n_{\text{Res}} + \eta_{\text{Ana}} n_{\text{Ana}}) \quad (15)$$

Durch Ableitung nach n_{Ana} ergibt sich die BRIS.

$$BRIS = \frac{d\lambda_{\text{WGM}}}{dn_{\text{Ana}}} = \frac{2\pi R \eta_{\text{Ana}}}{N_J} \approx \frac{\lambda \eta_{\text{Ana}}}{n_{\text{Res}}} \quad (16)$$

Der optische Füllfaktor einer WGM mit dem Analyt ergibt sich aus dem relativen Verhältnis der im Analyten lokalisierten Lichtenergie zur WGM-Gesamtenergie. Zur Vereinfachung der formalen Herleitung wurde hierbei in Gleichung 17 eine scheibenförmige Resonatorgeometrie mit der Höhe h angenommen.

$$\eta_{\text{Ana}} = \frac{2\pi h \times \int_0^{\infty} \epsilon_0 \epsilon_{\text{Ana}} |E_0|^2 e^{-r/L} r dr}{\int_0^{\infty} \epsilon_0 \epsilon(r) |E(r)|^2 dV} \approx \frac{2\pi R h \epsilon_0 n_{\text{Ana}}^2 |E_0|^2 L}{\int_0^{\infty} \epsilon_0 \epsilon(r) |E(r)|^2 dV} \quad (17)$$

E_0 repräsentiert das elektrische Feld an der Resonatoroberfläche, ϵ_0 die Vakuumpermittivität. Die Eindringtiefe L des elektrischen Feldes in den Analyten kann hierbei wie folgt approximiert werden:¹³⁹

$$L \approx \frac{\lambda_{\text{WGM}}}{4\pi \sqrt{n_{\text{Res}}^2 - n_{\text{Ana}}^2}} \quad (18)$$

Zur Abschätzung der spektralen Resonanzverschiebung, die durch die Anlagerung von Molekülen an eine Resonatoroberfläche hervorgerufen wird, wurde von Arnold und Kollegen ein analytischer Formalismus entwickelt.²⁷ In diesem werden die Dipolmomente der einzelnen Moleküle, welche durch ihre Anbindung eine Änderung der Polarisierbarkeit an der Resonatoroberfläche bewirken, über die gesamte Resonatoroberfläche aufsummiert. Unter der Annahme, dass die Moleküle statistisch verteilt sind, ergibt sich mit der sogenannten Überschusspolarisierbarkeit α_{ex} (engl.: excess polarizability) und der Oberflächendichte $\sigma_p = N/4\pi R^2$ (N : Anzahl der Moleküle):

$$\frac{\delta\lambda_{\text{WGM}}}{\lambda_{\text{WGM}}} = - \frac{\alpha_{\text{ex}} \sigma_p \int |E_0(r)|^2 dA}{2 \int_0^{\infty} \epsilon_0 \epsilon(r) |E(r)|^2 dV} \quad (19)$$

Durch Einbezug der Gleichungen 16, 17 und 18 resultiert der Formalismus zur Berechnung der durch eine molekulare Lage mit der Dichte der σ_p hervorgerufenen WGM-Verschiebung $\delta\lambda_{\text{WGM}}$:

$$\delta\lambda_{\text{WGM}} = BRIS \frac{2\pi \sigma_p \alpha_{\text{ex}} n_{\text{Ana}} \sqrt{n_{\text{Res}}^2 - n_{\text{Ana}}^2}}{\epsilon_0 n_{\text{Res}}^2 \lambda_{\text{WGM}}} \quad (20)$$

Die molekulare Sensitivität eines Kelchresonators weist somit erwartungsgemäß eine lineare Proportionalität zur BRIS auf. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in den jeweiligen Paragraphen die BRIS experimentell ermittelt, sodass dieser auf einer Scheibengeometrie basierende Approximationsansatz mit hinreichender Genauigkeit auf die Mikrokelche übertragen werden kann. Experimentelle Details zur Ermittlung der BRIS können aus Kapitel 4.3.1 entnommen werden.

3.2 Herstellung von PMMA-Mikrokelchen

Die im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten passiven und aktiven Mikrokelche werden nach einem standardisierten und an dieser Stelle dargelegten Fabrikationsverfahren hergestellt.^{10,11} Am Ende der Fabrikationskette befinden sich die PMMA-Kelchresonatoren auf Siliziumsockeln. Im zeitlichen Verlauf dieser Arbeit wurde in Kollaboration mit T. Wienhold und S. Wondimu (IMT, KIT) ein neuartiger Fabrikationsprozess entwickelt, bei dem nunmehr auch der Resonatorsockel aus einem Polymer besteht.^{140,141} Dieser Fabrikationsansatz kommt in der vorliegenden Arbeit vereinzelt zum Einsatz und wird in den betreffenden Kapiteln 5 und 6 an den gegebenen Stellen kurz erörtert. Eine detaillierte Darstellung wird in den dato laufenden Doktorarbeiten der beiden bei der Prozessentwicklung federführenden Kollegen zu finden sein.

Beim standardmäßigen Herstellungsprozess der Mikrokelchlasern (Abbildung 3.2) wird ein mit Pyrromethen 597 (PM 597, Radiant Dyes Laser & Accessoires GmbH) gemischter PMMA-Fotolack (PMMA 950k A6, MicroChem Corp.) (Feststoff-Massenverhältnis 1:100) auf einen 4-Zoll Siliziumwafer (vorbehandelt mit Hexamethyldisilazan (HMDS)) mit einer Zielschichtdicke von $1,2\ \mu\text{m}$ aufgeschleudert. Nach einer thermischen Behandlung bei $110\ \text{°C}$ werden per Elektronenstrahlolithografie (Vistec VB6) Scheiben mit $25\ \mu\text{m}$ Radius in den PMMA-Lack strukturiert. Nach einer nasschemischen Sprühentwicklung (1:1 Gemisch aus Methylisobutylketon und Isopropanol, MIBK:IPA) dienen die freientwickelten PMMA-Scheiben im anschließenden anisotropen Trockenätzprozess mit Xenondifluorid (XeF_2) als Ätzmasken, um das darunter befindliche Silizium partiell zu entfernen. Nach diesem Schritt sind die PMMA-Scheiben nun mit freistehenden Rändern auf Siliziumsockeln lokalisiert. Zur Reduktion fabrikationsbedingter Oberflächenrauheiten wird der strukturierte Siliziumwafer auf 125 bis $135\ \text{°C}$, geringfügig oberhalb der Glasübergangstemperatur des PMMA, aufgeheizt. Im Zuge der Minimierung der Oberflächenenergie verformen sich die PMMA-Scheiben und erhalten ihre charakteristische kelchförmige Resonatorgeometrie. Am Ende wird der Wafer in Chips vereinzelt. Die Herstellung passiver PMMA-Mikrokelche erfolgt analog, unter Verwendung von reinem PMMA-Fotolack, ohne beigemischte Farbstoffmoleküle. Abbildung 3.3 zeigt einen Mikrokelch nach seiner Herstellung.

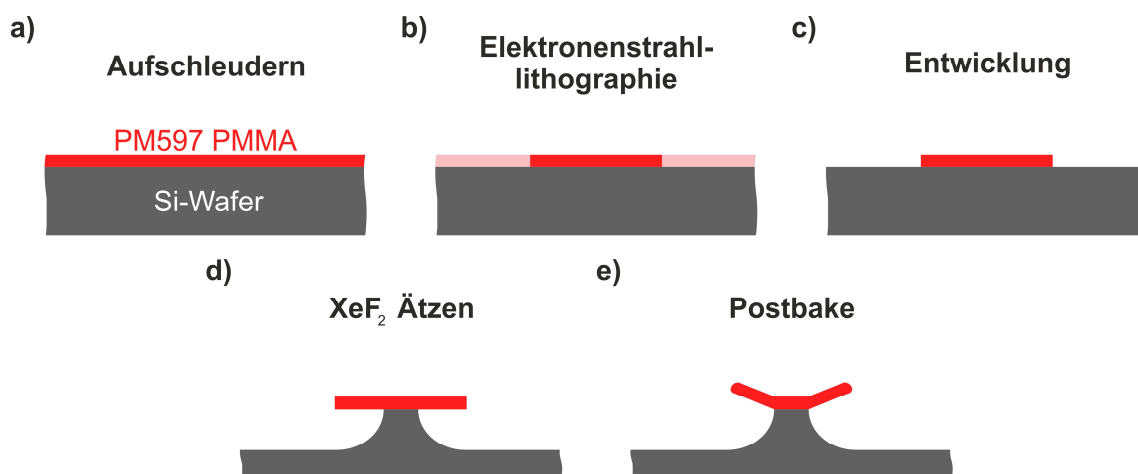


Abbildung 3.2: Prozesskette zur Herstellung von PMMA-Mikrokelchlasern. (a) Aufschleudern des PM 597-dotierten PMMA-Photolacks auf einen Siliziumwafer. (b) Definition von Kreisen per Elektronenstrahlolithographie. (c) Nasschemische Entwicklung zu PMMA-Scheiben mit MIBK:IPA. (d) Trockenchemisches isotropes Unterätzen der PMMA-Scheiben mit XeF_2 . (e) Thermisches Aufschmelzen der PMMA-Scheiben, resultierend in Mikrolasern mit kelchförmiger Geometrie. Die Herstellung passiver Mikrokelchresonatoren erfolgt analog mit undotiertem PMMA-Photolack.

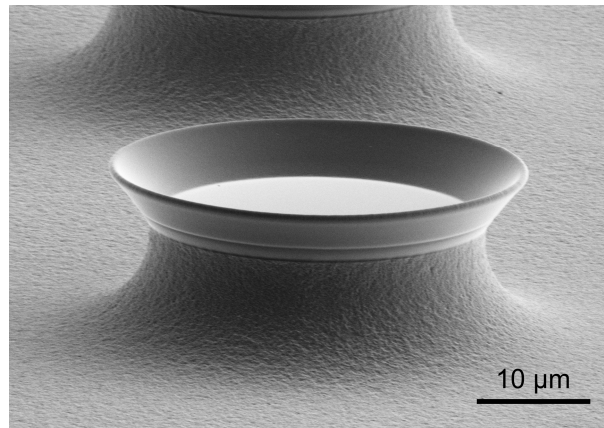


Abbildung 3.3: REM-Aufnahme eines PMMA-Mikrokelchlasers.

3.3 Optische Charakterisierung passiver PMMA-Mikrokelche

Zur Charakterisierung der Q -Faktoren passiver Mikroresonatoren wurde ein am APH befindlicher optischer Messaufbau verwendet (Abbildung 3.4(a)). Als Anregungslichtquelle dient ein fasergekoppelter durchstimmbarer Diodenlaser im roten Spektralbereich (TLB 6304 Velocity, New Focus, $\lambda = 632,5$ bis 637 nm, Linienbreite < 300 kHz). Zur evaneszenten Anregung der WGMs wird ein Chipsubstrat mit Mikrokelchresonatoren auf einem fünfsichtigen Probenstisch befestigt und der zu untersuchende Resonator an eine ausgedünnte das Laserlicht leitende monomodige optische Glasfaser angenähert. Die Ausdünnung der Glasfaser wurde gemäß Brambilla und Kollegen über lokales Erhitzen und Strecken eines entmantelten Abschnittes der Faser durchgeführt.¹⁴² Die Ausrichtung des Resonatorrandes entlang des ausgedünnten, in seiner Taille etwa $1 \mu\text{m}$ im Durchmesser messenden, mantellosen Faserabschnitts erfolgt visuell von oben und von der Seite über CCD-Kameras (Abbildungen 3.4(b) bis (e)). Das wellenlängenaufgelöste Transmissionsspektrum der Glasfaser wird mit einem Photodetektor am Faserausgang aufgenommen. Infolge der evaneszenten Anregung der WGMs werden diese als lorentzförmige Intensitätseinbrüche im Fasertransmissionsspektrum sichtbar. Der Abstand zwischen Resonator und Glasfaser wird stets hinreichend groß gewählt, sodass die evaneszente Lichteinkopplung im schwach gekoppelten Regime stattfindet.¹⁴³ Darüber hinaus wird die Laserleistung sowie die Scangeschwindigkeit des Anregelasers so gewählt, dass keine Verzerrung der Lorentzform aufgrund thermischer Effekte stattfindet.¹⁴⁴

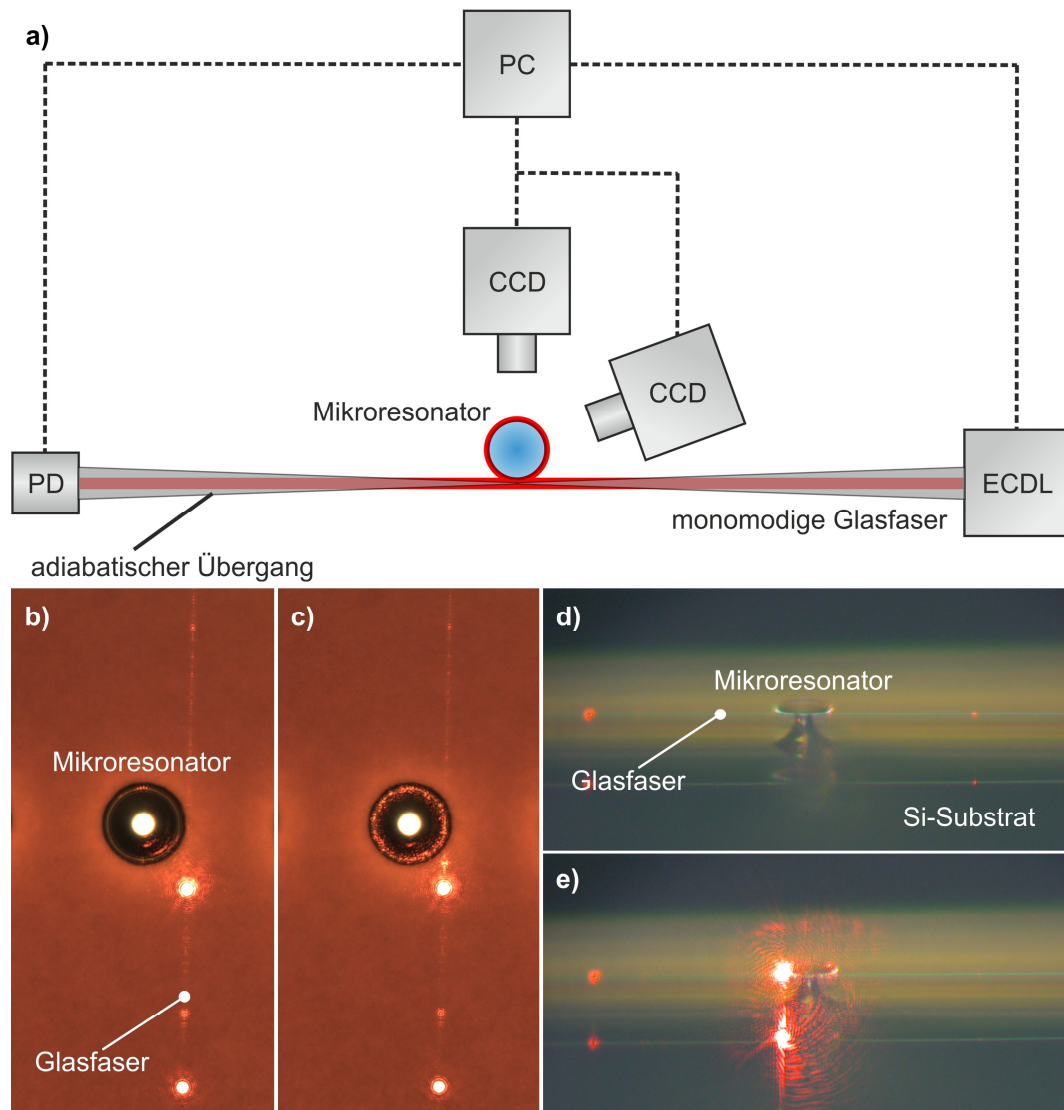


Abbildung 3.4: Optische Charakterisierung passiver Mikrokelchresonatoren. (a) Schematische Darstellung der Charakterisierung passiver WGM-Resonatoren. Das Analyselicht wird mit einem durchstimmbaren Diodenlaser mit externer Kavität (ECDL) erzeugt und über eine ausgedünnte monomodige Glasfaser zum Resonator geleitet. Die Positionierung der Faser wird mithilfe zweier CCD-Kameras von oben und von der Seite visualisiert. Über einen dreiachsigen Translationstisch wird der zu untersuchende Mikroresonator zur adiabatisch ausgedünnten Taille der Glasfaser gefahren, wo das Analyselicht evaneszent in den Resonator bei dessen Resonanzwellenlängen einkoppelt. Die Feinpositionierung erfolgt mittels Piezomotoren. Die im Resonator angeregten WGMs werden als Minima im Transmissionsspektrum der Glasfaser sichtbar. Am Faserausgang wird das Transmissionsspektrum mit einem Photodetektor (PD) detektiert. Sowohl die Steuerung des Lasers als auch das Auslesen des PDs erfolgt über einen Labor-PC (PC). (b) In-situ Draufsicht der Resonatorcharakterisierung kurz vor der Einkopplung des Analyselichtes in den Resonator. (c) In-situ Draufsicht während der Einkopplung des Analyselichtes. (d) In-situ Seitenansicht der Resonatorcharakterisierung kurz vor der Einkopplung des Analyselichtes in den Resonator. (e) In-situ Seitenansicht während der Einkopplung des Analyselichtes.

3.4 Optische Charakterisierung aktiver PMMA-Mikrokelche

Zur Charakterisierung der Laserschwellen und der Sensorsignale der Mikrokelchlaser wurde primär ein am APH vorhandener Messaufbau verwendet (Abbildung 3.5).¹¹ Die Kelchlaserchips sind hierbei in eine mikrofluidische Kammer mit einem Fassungsvermögen von 100 μl eingebaut. Die Mikrokelchlaser werden einzeln unter einem Einstrahlwinkel von 45° mit einem frequenzverdoppelten Nd:YVO₄-Laser ($\lambda = 532 \text{ nm}$, Pulsdauer 10 ns, Repetitionsrate 20 Hz; InnoLas GmbH) durch die Quarzglas-Frontscheibe der Kammer optisch gepumpt. Das Emissionsspektrum des jeweils untersuchten Mikrokelchlaser wird mit einem 50 \times -Mikroskopobjektiv mit großem Arbeitsabstand (NA 0,42, Arbeitsabstand 13 mm) eingesammelt und zum Eingangspalt eines Spektrographen geleitet. Die Pumplaserwellenlänge wird hierbei über einen optischen Langpassfilter herausgefiltert. Der Spektrograph besteht aus einem Monochromator in Czerny-Turner-Konfiguration

(Acton SpectraPro 500, Princeton Instruments), ausgestattet mit einer Peltier-gekühlten CCD-Flächenkamera (Idus DU420A-BU, Andor). Während zur Aufnahme einzelner Spektren die Pixelintensitäten zur Signalmaximierung spaltenweise aufsummiert werden (full vertical binning, FVB), erlaubt die Flächenkamera durch den zweidimensionalen Pixelaufbau des CCD-Chips eine orts aufgelöste Spektralanalyse entlang des Eingangsspalt. Über eine rotierbare Halterung kann zwischen drei verschiedenen Gittern (150, 1.200 und 2.400 l/mm) gewählt und somit die spektrale Auflösung (480, 60, 30 pm) und der zu untersuchende Wellenlängenbereich eingestellt werden. Über einen optischen Strahlteiler wird die Chipoberfläche über eine zweite CCD-Flächenkamera visualisiert. Der Messaufbau wird in einem klimatisierten Labor betrieben ($\sim 20^\circ\text{C}$).

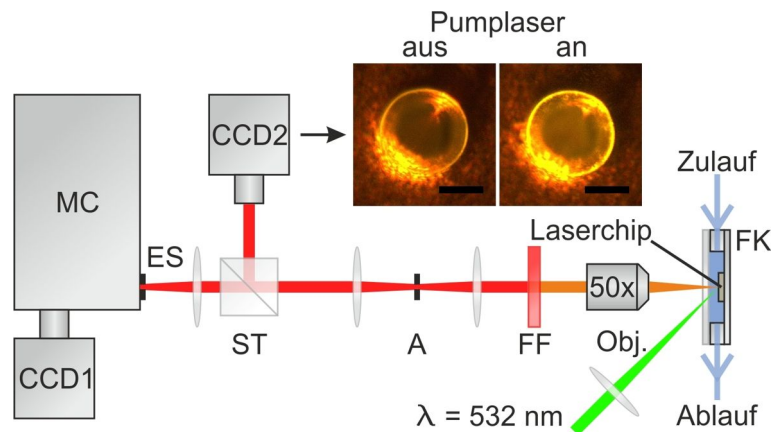


Abbildung 3.5: Versuchsaufbau zur optischen Charakterisierung von Mikrokelchlasern. Der Chip mit den Mikrokelchlasern befindet sich in einer mikrofluidischen Kammer (FK), in welche manuell per Spritzeninjektion die zu untersuchenden Analytflüssigkeiten eingeleitet werden. Zur Anregung der Lasingsaktivität eines Mikrolasers wird das Pumplicht eines frequenzverdoppelten Nd:YVO₄-Lasers ($\lambda = 532\text{ nm}$) unter 45° auf diesen fokussiert. Mit einem Mikroskopobjektiv (Obj.) und einer Linse wird der Mikrolaser auf eine Apertur (A) abgebildet. Diese Zwischenabbildung wird dann zum einen zur spektralen Analyse auf den Eingangsspalt (ES) eines Monochromators (MC) und des Weiteren über einen Strahlteiler (ST) zu Visualisierungszwecken auf eine CCD-Kamera (CCD2) abgebildet. Das vom Mikrolaser emittierte Laserlicht wird hierbei über einen Farbfilter (FF) von der Pumplichtwellenlänge getrennt. Die beiden Realbilder stellen einen Mikrokelchlaser vor und während des Pumpvorganges dar. Die Maßstabsbalken entsprechen $20\ \mu\text{m}$.

Zur Aufnahme der Laserschwelle wird die Pumplaserleistung über eine dem Pumplaser nachgeschaltete Anordnung aus einem linearen Polarisationsfilter und einer Pockelszelle schrittweise erhöht und das Emissionsspektrum des jeweils untersuchten Lasers mit dem Spektrographen aufgezeichnet. Wahlweise wird hier entweder das 150 l/mm oder das 1.200 l/mm Gitter verwendet. Im Anschluss werden die Intensitäten der Lasermoden ausgewertet. Abbildung 3.6(a) zeigt das Emissionsspektrum eines PMMA-Mikrokelchlasers bei verschiedenen Pumpleistungen unter- und oberhalb der Laserschwelle. In Abbildung 3.6(b) ist die daraus abgeleitete Laserkennlinie für die Lasermode mit der niedrigsten Laserschwelle dargestellt. Abhängig von der Resonatorgüte weisen die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Mikrokelchlaser Laserschwellen zwischen 250 und 1.500 pJ pro Anregungspuls auf.

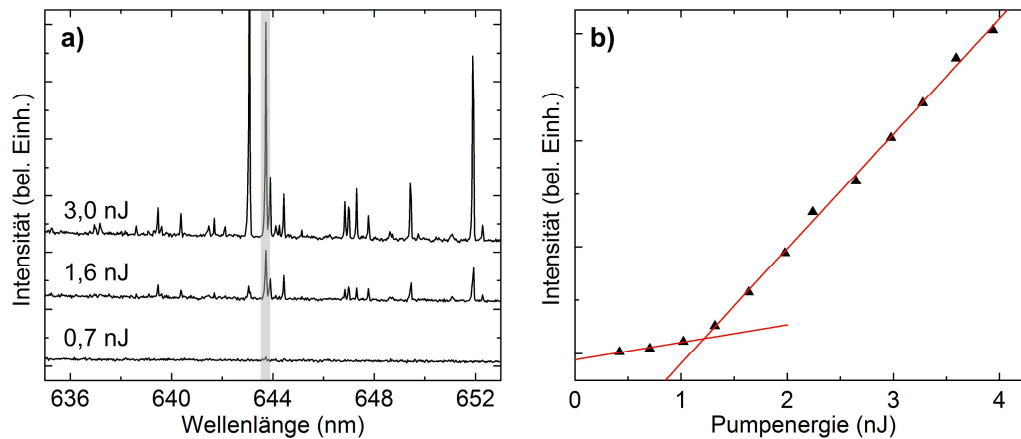


Abbildung 3.6: Charakterisierung der Laserschwelle aktiver Mikroresonatoren. (a) Emissionsspektrum eines PMMA-Mikrokolchlasers für drei verschiedene Pumpenergien. Bei einer Pumpleistung von 0,7 nJ pro Anregungspuls wird der Mikrolaser unterhalb seiner Laserschwelle betrieben, sodass keine Lasermoden im Spektrum zu verzeichnen sind. (b) Laserkennlinie für die in (a) visuell hervorgehobene Lasermode mit der niedrigsten Laserschwelle. Die Laserschwelle liegt bei ungefähr 1,2 nJ pro Anregungspuls.

Für die Untersuchungen in flüssigen Medien werden diese über Polyethylenschläuche manuell via Spritzeninjektion in die mikrofluidische Kammer gepumpt. Während die Laserswellen in flüssigen Medien weiterhin mit dem breitbandigen 150 l/mm oder dem 1.200 l/mm Gitter aufgenommen werden, wird zur spektralen Analyse von induzierten Lasermodenverschiebungen das hochauflösende 2.400 l/mm Gitter verwendet (beispielsweise im Rahmen der biomolekularen Detektionsexperimente, der Charakterisierung der Brechzahl sensitivitäten etc.). Zur Analyse des temporalen Modenverlaufes wird das Emissionsspektrum eines Mikrokolchlasers in definierten Zeitintervallen aufgezeichnet und im Anschluss die spektrale Position der einzelnen Lasermoden mit einem Matlab-Programm per Lorentz-Kurvenanpassung ausgewertet.

In einzelnen Experimenten kam darüber hinaus ein am IMT aufgebauter ähnlicher Messaufbau zum Einsatz.¹⁴⁵ Im Unterschied zum APH-Aufbau wird dort ein Czerny-Turner Monochromator Shamrock 500i mit einer Peltier-gekühlten CCD-Flächenkamera Andor iDus 420 verwendet. Als Pump laser dient ein frequenzverdoppelter Nd:YLF-Laser ($\lambda = 523$ nm, CryLaS GmbH). Der Pumpvorgang findet hierbei durch das Mikroskopobjektiv hindurch statt.

3.5 Biomolekulare Detektion mit aktiven PMMA-Mikrokolchen

Um Brechzahlunterschiede bzw. die Anbindung von Molekülen entlang des Mikrokolchumfangs zu detektieren, werden im Rahmen dieser Arbeit die resultierenden spektralen Lasermodenverschiebungen analysiert. Diese Methode ist im Vergleich zu anderen sehr intuitiv und mit geringem Aufwand durchführbar. Alternative Analyseverfahren (für zumeist passive Resonatoren) wie beispielsweise die Cavity-Ring-Down-Spektroskopie,¹⁴⁶ die Cavity-Ring-Up-Spektroskopie,¹⁴⁷ oder die Charakterisierung der Resonanzverbreiterung⁶⁵ erfordern demgegenüber allesamt hochauflösende und komplexe Messaufbauten. Des Weiteren sind diese Verfahren oftmals auf das serielle Auslesen von einzelnen Sensorelementen beschränkt. Spektrale Resonanzverschiebungen hingegen lassen sich mit vergleichsweise geringem apparativem Aufwand parallelisiert prozessieren.^{40,125,148–150}

In Abbildung 3.7 ist die spektrale Verteilung der Lasermoden eines mit Biotin funktionalisierten PMMA-Mikrokolchlasers zu zwei Zeitpunkten während der Inkubation in 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptavidin (gelöst in phosphatgepufferter Salzlösung, PBS) dargestellt. Zur Oberflächenfunktionalisierung wurde der Mikrokolch laser für eine Stunde in eine wässrige Lösung mit 5 mikromolarem Amino-dPEG₁₁-Biotin inkubiert und anschließend mit deionisiertem Wasser abgespült. Das an den (chemisch inerten) Mikrokolch laser adsorbierte Amino-dPEG₁₁-Biotin diente anschließend als Akzeptor zur Anlagerung des Proteins Streptavidin an die Sensoroberfläche. Aufgrund der hochaffinen und robusten Bindung von Streptavidin an Biotin findet dieses molekulare Bindungsmodell eine breite Anwendung zur Demonstration von Biosensoren sowie zur Immobilisierung und Aufreinigung von biotinterminierten

Partikeln und Molekülen.¹⁵¹ Durch die Anbindung der Streptavidinmoleküle kommt es entlang der Sensoroberfläche zu einer Erhöhung des effektiven Brechungsindex der in der Laserkavität geführten Lasermoden und infolgedessen zu deren Rotverschiebung. Während die Oberflächenfunktionalisierung im vorliegenden Fall rein auf Physisorption beruht, wird in den Kapiteln 5 und 6 das Amino-dPEG₁₁-Biotin über seinen Amino-Terminus kovalent an die Mikroresonatoroberfläche angebunden.

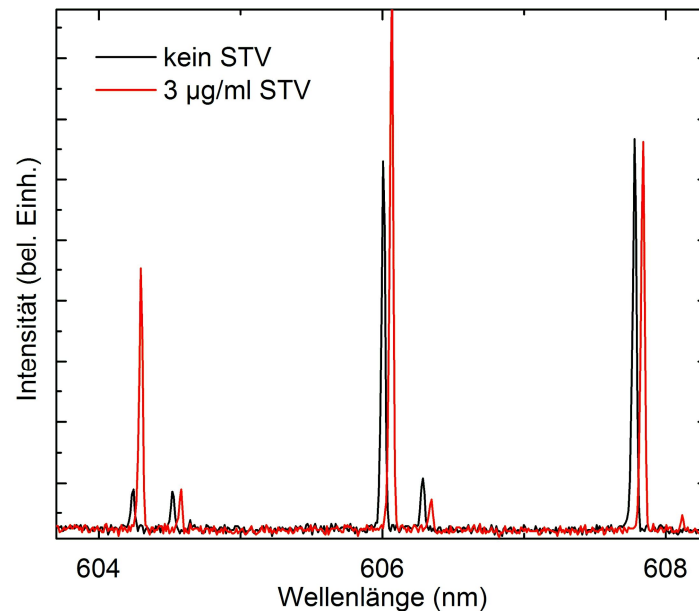


Abbildung 3.7: Emissionsspektrum eines via Physisorption biotinylierten PMMA-Mikrokelchlasers vor (schwarz) und nach (rot) der Anbindung von 3 µg/ml Streptavidin (STV). Durch die Erhöhung des Brechungsindex entlang des Resonatorumfangs resultiert die Streptavidinanlagerung in einer Rotverschiebung der Lasermoden.

Zur Analyse der spektralen Lasermodenverschiebungen während eines Detektionsexperimentes werden im Rahmen dieser Arbeit die jeweils betrachteten Lasermoden an Lorentz-Funktionen mit Matlab angenähert und die daraus ermittelte zentrale Wellenlänge ermittelt. Die numerische Kurvenanpassung erfolgt iterativ über Minimierung der Fehlerquadratsumme der einzelnen FVB-Spaltenintensitäten.¹⁵² Die Genauigkeit der Bestimmung der zentralen Wellenlänge ist hierbei unter anderem abhängig von der Anzahl der Datenpunkte, mit welcher die Lasermoden aufgezeichnet werden sowie vom Rauschen der gemessenen Intensitätswerte.¹⁵³ Anhand willkürlich ausgewählter Lasermoden (aus willkürlich ausgewählten Experimenten) wurde unter Verwendung des hochauflösenden 2.400 l/mm Gitters und der 1.024 horizontale Pixel beinhaltenden Flächenkamera die Standardabweichung σ der Wellenlängenbestimmung ermittelt. Aus Abbildung 3.8(a) wird deutlich, dass die Intensität der Lasermoden eine signifikante Rolle bei der Datenanalyse spielt. Da die Lasermoden mit steigender Intensität durch eine wachsende Anzahl an Datenpunkten dargestellt werden, sinkt infolgedessen die Ungenauigkeit der Wellenlängenbestimmung, weil für eine Kurvenanpassung mehr Stützstellen zur Verfügung stehen. Während eines biomolekularen Detektionsexperimentes sind demnach ausreichend hohe Pumpenergien sicherzustellen. Für Modenintensitäten jenseits von 150 Zählimpulsen beträgt die mittlere Standardabweichung etwa 0,3 pm. Die zentrale Wellenlänge der Lasermoden kann ab diesem Schwellwert anhand der mit dem APH-Versuchsaufbau generierten Datensätze in einem mittleren 99,7 %-Konfidenzintervall ($\pm 3\sigma$) von ± 1 pm ermittelt werden. Dieser Wert wird in der vorliegenden Arbeit an den gegebenen Stellen zur Bestimmung der Detektionslimits DL der verschiedenen Sensoransätze herangezogen.

Anhand von σ und der BRIS lässt sich das theoretische Detektionslimit für Brechzahländerungen des Analyten DL_{RI} wie folgt berechnen:¹⁵³

$$DL_{RI} = \frac{3\sigma}{BRIS} \quad (21)$$

Für einen unbehandelten PMMA-Mikrokelchlasers ($BRIS \approx 26 \text{ nm/RIU}$, RIU: refractive index unit) ergibt sich somit beispielsweise $DL_{RI} \approx 3,85 \times 10^{-5} \text{ RIU}$ (Abbildung 3.8(b)). Demnach werden Brechzahlsprünge von $3,85 \times 10^{-5} \text{ RIU}$ noch mit einer 99,7 %-igen Sicherheit von einem derart konfigurierten Sensorsystem detektiert.

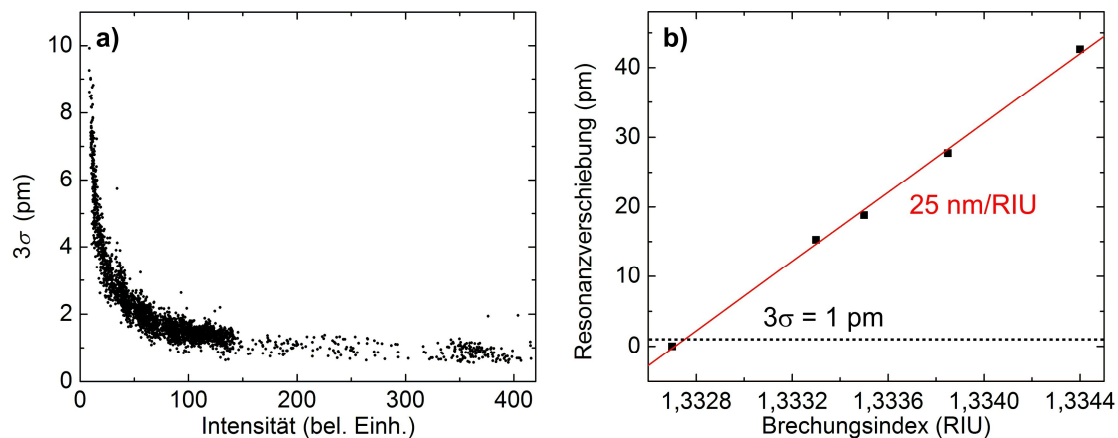


Abbildung 3.8: Ermittlung des Detektionslimits. (a) Experimentell ermitteltes 3σ -Konfidenzintervall der spektralen Positionsbestimmung von Lasermoden via Lorentz-Annäherung in Abhängigkeit von der Lasermodenintensität. Der gezeigte Datensatz beinhaltet Datenpunkte (jeder Datenpunkt entspricht einer Lorentz-Annäherung) aus mehreren, willkürlich ausgewählten, Detektionsexperimenten. Ab einer Lasermodenintensität von etwa 150 Zählimpulsen werden die Lasermoden mit einer 99,7 %-igen Sicherheit innerhalb von $\pm 1 \text{ pm}$ ermittelt. Für zunehmende Intensitätswerte reduziert sich das Konfidenzintervall weiterhin, jedoch in unsignifikantem Maße. (b) Charakterisierung der BRIS eines PMMA-Mikrokelchlasers. Nimmt man das 3σ -Konfidenzintervall als kleinste auflösbare Lasermodenverschiebung an, kann mit diesem Mikrolaser eine minimale Brechzahldifferenz von $3,85 \times 10^{-5} \text{ RIU}$ detektiert werden.

Abbildung 3.9(a) zeigt nun die gesamte temporale Lasermodenverschiebung des PMMA-Mikrokelchlasers aus Abbildung 3.7 sowie zweier weiterer auf gleiche Weise biotinylierte Mikrokelchlasers bei Streptavidinkonzentrationen von $30 \mu\text{g/ml}$ und $0,3 \mu\text{g/ml}$. Hier wird deutlich, dass das molekulare Detektionslimit DL_{Mol} von der Messdauer des Detektionsexperimentes abhängig ist. Während die spektralen Lasermodenverschiebungen bei $30 \mu\text{g/ml}$ und $3 \mu\text{g/ml}$ nach der Streptavidinjektion nahezu instantan jenseits der minimalen 1 pm liegen, stellt sich diese Mindestverschiebung bei $0,3 \mu\text{g/ml}$ erst nach etwa 1,5 Minuten ein. Zum Zeitpunkt der finalen Spülung mit PBS beträgt das Sensorsignal $4,6 \text{ pm}$.

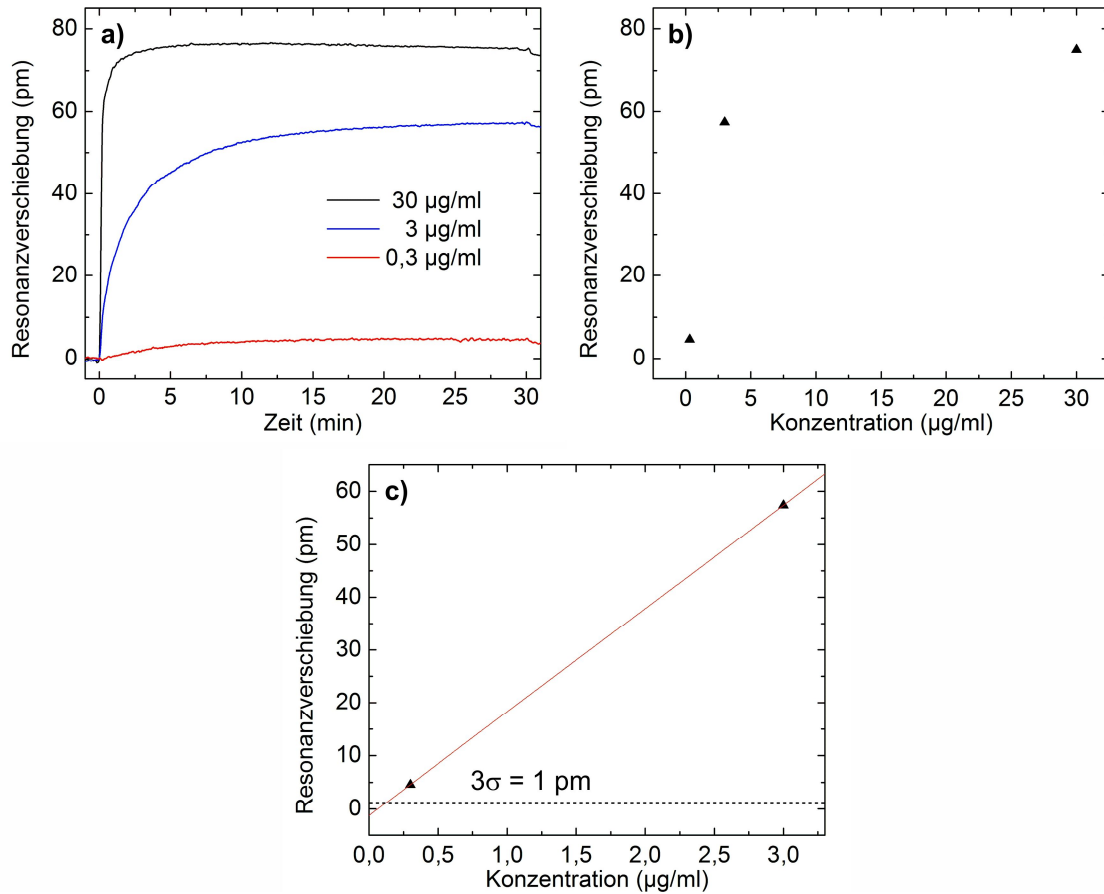


Abbildung 3.9: Detektion von Streptavidin mit via Adsorption biotinylierten Mikrokelchlasern. (a) Temporale Lasermodenverschiebung von via Physisorption biotinylierten PMMA-Mikrokelchlasern für verschiedene Streptavidinkonzentrationen. Die Anfangssteigungen verhalten sich proportional zur Proteinkonzentration. (b) Lasermodenverschiebung nach Beendigung des Experimentes aus (a) in Abhängigkeit der Streptavidinkonzentration. Bei 30 $\mu\text{g/ml}$ ist die Konzentration derart hoch, dass die Sensoroberfläche und somit das Sensorsignal sättigt. (c) Vergrößerte Darstellung der beiden niedrigeren Konzentrationen aus (b). Wird die Konzentrationskurve linear extrapoliert, ergibt sich aus dem 3 σ -Konfidenzintervall ein Detektionslimit von 0,12 $\mu\text{g/ml}$.

Unter der Annahme, dass die Anbindung der Biomoleküle an die Sensoroberfläche nicht ratenlimitiert stattfindet, verhalten sich bei biomolekularen Detektionsexperimenten die Anfangssteigungen der temporalen Sensorsignale direkt proportional zur applizierten Analytmolekülkonzentration.¹⁵⁴ Angesetzt werden kann hierbei ein exponentieller Approximationsansatz des temporalen Sensorsignals $R(t)$ nach O'Shannessy und Kollegen:¹⁵⁵

$$R(t) = \frac{Ck_a R_m (1 - e^{-(Ck_a + k_d)t})}{Ck_a + k_d} + R_0 \quad (22)$$

Hierbei ist C die Konzentration des zu detektierenden Analytmoleküls, t die Zeit, k_a die Assoziations-, k_d die Dissoziationskonstante des an das Sensorelement anlagernden Moleküls, R_0 das anfängliche Sensorsignal zum Zeitpunkt $t = 0$ und R_m das maximale Sensorsignal bei vollständiger Bedeckung des Transduktors. Durch zeitliche Ableitung folgt:

$$\frac{\partial R(t)}{\partial t} = Ck_a R_m e^{-(Ck_a + k_d)t} \quad (23)$$

Mit $t = 0$ ergibt sich die lineare Proportionalität der Anfangssignaländerung zur molekularen Konzentration:

$$\frac{\partial R(t)}{\partial t} = Ck_a R_m \square konst \cdot C \quad (24)$$

Unter der Annahme, dass der temporale Sensorsignalverlauf für sehr geringe Konzentrationen linear angenähert werden kann, ergibt sich im vorliegenden Fall für das messdauerabhängige Detektionslimit DL_{Mol} für Streptavidin der in Abbildung 3.9(b) dargestellte Verlauf. Bei einer Messdauer von 30 Minuten beträgt $DL_{Mol} = 0,12 \mu\text{g/ml}$.

Kapitel 4

Mikrokelche mit hochlokalisierter Oberflächenfunktionalisierung durch molekulare Tinten

Zusammenfassung[†]

Eine effektive Immobilisierung von Akzeptormolekülen ist in erster Linie abhängig vom Material der Sensoroberfläche. Je nach Art der für die Oberflächenfunktionalisierung herangezogenen funktionellen Gruppen können die benötigten chemischen Prozessschritte komplex ausfallen. Molekulare Tinten, die rein adhäsiv statt kovalent auf einer Oberfläche immobilisiert werden, bieten mehr Freiheitsgrade und können äußerst effektiv und nahezu plattformunabhängig zur Oberflächenfunktionalisierung von Sensorstrukturen genutzt werden.

Das folgende Kapitel beschreibt die Realisierung von Biosensoren durch die multifunktionale Beschichtung von Mikrokelchen mit Phospholipidtinten. Diese werden zum einen per Dip-Pen Nanolithografie und zum anderen mit einem eigens entwickelten Mikrokontakt-Transferverfahren (aligned microcontact stamping (AuCS), dt.: Justiertes Mikrokontaktstempeln) auf die Kelche aufgebracht. Mit beiden Verfahren werden die Tinten hochlokalisiert und ressourcenschonend – die benötigte Tintenmenge pro Kelch liegt im Pikogrammbereich – auf die Resonatorränder deponiert. Insbesondere das justierte Mikrokontaktstempeln eignet sich zur hochparallelen Beschichtung großer Resonatorfelder im Rahmen eines Massenherstellungsverfahrens. Durch die sehr hohe laterale Auflösung der Stempelkissen können sehr eng zueinander strukturierte Resonatoren ohne wechselseitige Kontamination beschichtet werden, wodurch neue Möglichkeiten zur Sensorsignalreferenzierung hinsichtlich lokaler Temperatur- und Brechzahlchwankungen im Analyten eröffnet werden. Über die Lipidkomposition können neben der intendierten molekularen Selektivität gezielt weitere chemische und auch physikalische Funktionalitäten induziert werden („Multifunktionalisierung“). So werden zum Beispiel passive Mikrokelche durch Beigabe von Laserfarbstoffen zu aktiven Biosensoren mit niedrigen Laserswellen. Des Weiteren lässt sich über speziell ausgewählte Lipide eine in-situ molekulare Rekonfigurierbarkeit erzielen, sodass ein einziger Kelch sequenziell für multiple Detektionsaufgaben verwendet werden kann. Die Mobilität der deponierten Tinten begünstigt hierbei eine dreidimensionale Anlagerung des zu detektierenden Moleküls, resultierend in einer signifikant erhöhten molekularen Sensitivität der Kelche.

[†] Teile dieses Kapitels wurden in folgenden Publikationsschriften veröffentlicht:

Bog, U., Laue, T., Grossmann, T., Beck, T., Wienhold, T., Richter, B., Hirtz, M., Fuchs, H., Kalt, H. und Mappes T. *Lab Chip* **13**, 2701–2707 (2013).

Bog, U., Brinkmann, F., Kalt, H., Koos, C., Mappes, T., Hirtz, M., Fuchs H. und Köber, S. *Small* **10**, 3863–3868 (2014).

Bog, U., Brinkmann, F., Wondimu, S. F., Wienhold, T., Kraemmer, S., Koos, C., Kalt, H., Hirtz, M., Fuchs, H., Köber, S. und Mappes T. *Adv. Sci.* **2**, 1500066-1-6 (2015).

4.1 Multifunktionale Biolaser mit erhöhter molekularer Sensitivität

In vielfältiger Art und Weise wurde bereits gezeigt, dass mit photonischen WGM-Strukturen biomolekulare Sensorik äußerst kompakt und mit sehr hoher Sensitivität durchgeführt werden kann.^{32,45,56,63–67,69,71} Wie bereits in Kapitel 3 erörtert bieten hierbei Laser gegenüber passiven Resonatoren signifikante physikalische und operative Vorteile. Um aktive WGM-Laser zu realisieren, werden die optisch aktiven Materialien zumeist nach der Herstellung der passiven Resonatorstrukturen appliziert, was mit einem erhöhten Fabrikationsaufwand verbunden ist. Eine Applizierung vor dem Fabrikationsprozess, beispielsweise durch Beimischung der Farbstoffe in eine polymere Resistmatrix, hat den Vorteil, dass neben der Anmischung keinerlei zusätzliche Prozessschritte benötigt werden und sämtliche Fabrikationsparameter identisch bleiben.¹¹ In anderen Ansätzen werden beispielsweise passive Quarzglasresonatoren im Anschluss an deren Fabrikation mit seltenen Erden mittels eines Solgel-Diffusionsprozesses dotiert.^{32,156,157} Dieser Prozess ist zum einen zeitintensiv und erfordert sehr hohe Temperaturen (ca. 1.000 °C), zum anderen muss die benötigte Solgel-Schichtdicke über mehrmaliges Aufschleudern generiert werden. Mittels Schleuderbelackung lassen sich Quantenpunkte¹⁵⁸ oder konjugierte Polymere¹⁵⁹ direkt auf die Resonatoroberflächen aufbringen. Alternativ kann die aktive Beschichtung auch durch thermisches Aufdampfen von kurzen organischen Molekülen realisiert werden,¹⁶⁰ allerdings erhöht sich hier, bedingt durch den benötigten Hochvakuumprozess, die Fabrikationsdauer signifikant. Ein interessanter Ansatz wurde von Fan und Kollegen gezeigt, bei dem der Laserfarbstoff dem flüssigen Analyten beigemischt wurde.^{43,82,161} Dieser Ansatz lässt sich jedoch nicht beliebig auf andere Geometrien übertragen.

Im Hinblick auf eine parallele Analyse multipler Inhaltsstoffe ist es interessant, optische Sensorelemente mit verschiedenen Arbeitswellenlängen auf einem Chip zu integrieren. Generell erweist sich die Implementierung unterschiedlicher Laserwellenlängen gerade bei chipbasierten WGM-Strukturen jedoch als schwierig. Da die Applizierung des Laserfarbstoffes in der Regel homogen über die gesamte Chipfläche erfolgt, kann lediglich über die Geometrie der Resonatoren Einfluss auf die spektrale Position der unterstützten Laserwellenlängen genommen werden. Bedingt durch das finite Emissionsspektrum des jeweils gewählten Farbstoffes ist diese Einflussnahme allerdings nur in engen Grenzen möglich. Durch die homogene Farbstoffdistribution wird darüber hinaus eine signifikante Menge an Farbstoffmolekülen verbraucht, wobei der größte Teil ungenutzt auf den nichtfunktionalen Flächen des Chips verbleibt. Eine Kombination von aktiven und passiven Bauteilen auf einem einzigen Chip lässt sich ebenfalls nur sehr schwer realisieren.

Im Rahmen dieses Kapitels wird eine Funktionalisierungsstrategie aufgezeigt, welche neben der intendierten molekularen Oberflächenfunktionalisierung im Rahmen einer „Multifunktionalisierung“ zeitgleich eine flexible Realisierung von Mikrolasern ermöglicht.¹⁶² Verwendet wird hierbei eine molekulare Tinte aus Phospholipiden, welche neben einem Trägerlipid zwei weitere Phospholipidtypen mit unterschiedlich funktionellen Kopfgruppen beinhaltet: Zum einen molekulare Akzeptoren und zum anderen einen Laserfarbstoff. Die Tinte wird mittels Dip-Pen-Nanolithografie hochlokal auf passive PMMA-Mikrokelche aufgebracht, wodurch diese in einem einzigen Prozessschritt zu molekular selektiven Biolasern transformiert werden und direkt für eine molekulare Detektionsaufgabe verwendet werden können. Der Prozess ist hierbei sehr ressourcenschonend, da der Übertrag direkt und ausschließlich auf die relevanten Stellen, nämlich die lichtführenden Ränder der Mikrokelche erfolgt. Weitere Prozessschritte, wie beispielsweise die bei Oberflächenfunktionalisierungen zumeist benötigten nasschemischen, oftmals bei erhöhter Temperatur durchzuführenden Inkubations- und Spülschritte, entfallen komplett.

Neben einer grundlegenden Diskussion der erzielbaren Depositionsergebnisse, werden im Folgenden die Lasingeigenschaften der Biolaser in Luft und in Wasser aufgezeigt. Anhand von biotinylierten Biolasern wird in einem molekularen Demonstrationsexperiment durch die selektive Anbindung von Streptavidin die Tauglichkeit als Biosensor aufgezeigt. Die Biolaser weisen aufgrund der Dreidimensionalität der Lipidbeschichtung eine erhöhte Sensitivität im Vergleich zu einer Monolagen-Bedeckung auf.

4.1.1 Moleküldeposition per Dip-Pen Nanolithografie

Bei der Dip-Pen Nanolithografie (DPN) handelt es sich um eine direkte molekulare Depositionstechnik, bei welcher eine AFM-Spitze in Manier eines Füllfederhalters (engl.: dip pen) genutzt wird, um Molekülmixturen („molekulare Tinten“) definiert und hochlokalisiert auf eine feste Probenoberfläche zu schreiben.¹⁶³ Ursprünglich entwickelt zur strukturierten Deposition von Alkanthiolen auf planare Goldsubstrate¹⁶⁴ findet die DPN heute Anwendung in zahlreichen Applikationen, insbesondere zur strukturierten Immobilisierung von Biomolekülen.^{165–170} Die AFM-Spitze wird hierbei in ein Molekülreservoir getaucht und anschließend kontrolliert über die Probenoberfläche geführt. Der Molekültransfer wird über einen Diffusionsprozess durch einen Wassermeniskus eingestellt, welcher bei sehr kleinem Abstand zwischen Spitze und Probe durch Luftfeuchte Kondensation ausgebildet wird – ein Effekt der bis dato als limitierend bei konventionellen AFM-Oberflächencharakterisierungen bekannt war.¹⁶⁴ Die Depositionsrate wird unter anderem über die Geschwindigkeit, mit welcher die AFM-Spitze über die Probe geführt wird, und die Umgebungsluftfeuchte, d.h. über die Beeinflussung des Wassermeniskus, definiert. Obwohl es sich bei der DPN um einen seriellen Depositionsprozess handelt, eignet sich diese Technik auch zur Herstellung sehr großer molekularer Strukturarrays mit hohem Durchsatz, durch den Einsatz von AFM-Federbalken-Anordnungen mit entsprechend vielen Einzelbalken.¹⁷¹

Bei einer weiterentwickelten Form der DPN werden Phospholipide als Trägermaterial für die zu deponierenden Moleküle eingesetzt (Lipid-DPN, L-DPN).¹⁷¹ In der vorliegenden Arbeit wurden Phospholipide als molekulare Tinten ausgewählt, da diese eine Vielzahl an Vorteilen aufweisen. Als wesentlicher Hauptbestandteil von Zellmembranen zeichnen sich Phospholipide durch ihre hohe Biokompatibilität aus.¹⁷² Mit ihnen lassen sich auf festen Substraten Zelloberflächen nachahmen. Angewendet auf Sensorstrukturen können somit gezielt Wechselwirkungsmechanismen zwischen Zellmembranen und Biomolekülen direkt anhand des Sensorsignals erforscht werden. Die Lipidtinten können aus beliebigen Einzelkomponenten flexibel zusammengemischt werden, was im Rahmen dieser Arbeit für eine „Multifunktionalisierung“ passiver Mikrokelche ausgenutzt wird. Da heute eine große Anzahl an Lipiden kommerziell verfügbar ist, lässt sich eine große Bandbreite von biologischen und auch molekularsensorischen Applikationen realisieren.^{173–176} In dieser Arbeit werden neben den molekularen Akzeptoren gezielt auch farbstoffmarkierte Phospholipide beigemischt, um molekular selektive Biolaser herzustellen. Im Verlauf der folgenden Experimente wird zudem gezeigt werden, dass bedingt durch die mobile Multilagenbildung der Lipide eine größere Gesamtmasse an den zu detektierenden Biomolekülen an die Kelchoberfläche angekoppelt werden kann, was letztendlich zu erhöhten Sensorsignalen führt. Zudem weist die Lipidfunktionalisierung sehr gute Passivierungseigenschaften zur Unterdrückung nichtspezifischer molekularer Anbindungsereignisse auf. Die Deposition der Lipide erfolgt direkt und lösemittelfrei, wodurch im Fall der Mikrokelche eine hohe fabrikationstechnische Kompatibilität mit dem durch viele organische Lösemittel angreifbaren PMMA gegeben ist.

DPN-Funktionalisierungsprozess

Die Deposition der Lipidtinten ist in Abbildung 4.1(a) schematisch skizziert. Verwendet wurde ein kommerzielles DPN-System (DPN 5000, NanoInk Inc.). Das AFM-Modul befindet sich in einer geschlossenen Klimakammer. Die Luftfeuchte wird über ein kombiniertes definiertes Einsprühen von Wasserdampf und gasförmigem Stickstoff eingestellt. Über eine integrierte Heizung kann zudem die Kammer temperiert werden. Die Regelung beider Parameter erfolgt nach Einstellung der gewünschten Werte per Software-Benutzeroberfläche durch externe PID-Kontrollen. Der Resonator-Chip befindet sich unter dem AFM-Modul auf einem horizontal angeordneten Probentisch, welcher manuell um seine lotrechte Achse gedreht werden kann. Während die Positionierung des/der AFM-Spitzen über Schrittmotoren in fünf Achsen vorgenommen wird, erfolgt der Depositionsprozess über Piezoaktuatoren. Nach dem Einbau des jeweiligen Kelchchips wird über ein in die Software-Benutzeroberfläche integriertes CAD-Modul die zu realisierende Kreisstruktur gemäß den Durchmessern der zu beschichtenden Mikrokelche definiert. Der Kreisdurchmesser wird zu etwa 5 % größer definiert als der der Kelche, sodass die AFM-Spitze entlang der Außenseiten der Kelchränder geführt wird. Hierdurch wird zum einen statistischen Abweichungen im Rahmen der manuellen Spitzenpositionierung entgegengewirkt, zum anderen wird auf diese Weise auch die Unterseite des jeweiligen Resonatorrandes mit Tinte benetzt. Die Funktionalisierung der Kelche erfolgt seriell mit

einem einzelnen Federbalken, wobei die AFM-Spitze über die Benutzeroberfläche manuell zum jeweils nächsten Kelch gesteuert wird. Die Positionierung wird währenddessen visuell mittels einer integrierten CCD-Kamera überwacht. Die hohe laterale Auflösung des DPN-Systems stellt die exklusive Beschichtung der Kelchränder sicher. Um die Mikrokelche durch den Depositionsprozess nicht zu beschädigen, wird ein Federbalken mit einer sehr kleinen Federkonstanten ($0,041 \text{ N/m}$) (DPN-Pen Typ A, NanoInk Inc.) verwendet.

Zur Beschichtung der Kelche wird für alle Tinten, soweit nicht anders erwähnt, das folgende Standardprotokoll durchgeführt: Gemeinsam mit dem Kelchchip wird ein zweiter Chip mit Mikrokanälen (Inkwell-Chip M-6MW, NanoInk Inc.), welche die Lipidintinen enthalten, eingebaut. Die AFM-Spitze wird dann bei einer Umgebungstemperatur von $23 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchte von 50% für 15 Minuten in die ausgewählte Tinte getaucht (Abbildung 4.1(b)). Im Anschluss wird die AFM-Spitze zum ersten Mikrokelch gefahren und manuell über die Benutzeroberfläche am Kelchrand ausgerichtet (Abbildung 4.1(c)). Physikalischer Kontakt mit dem Kelch äußert sich durch eine Farbveränderung des Federbalkens (Abbildung 4.1(d)). Danach wird automatisiert die per CAD-Modul definierte Kreisstruktur mit einer Geschwindigkeit von $10 \text{ } \mu\text{m/s}$ abgefahren (Abbildung 4.1(e)). Anschließend wird die AFM-Spitze zum nächsten Mikrokelch bewegt und der Vorgang wiederholt. Das gesamte Depositions-prozedere erfolgt ebenfalls bei einer Temperatur von $23 \text{ }^\circ\text{C}$ und 50% relativer Luftfeuchte. Nach fünf bis zehn Beschichtungen wird die AFM-Spitze mit neuer Tinte beladen.

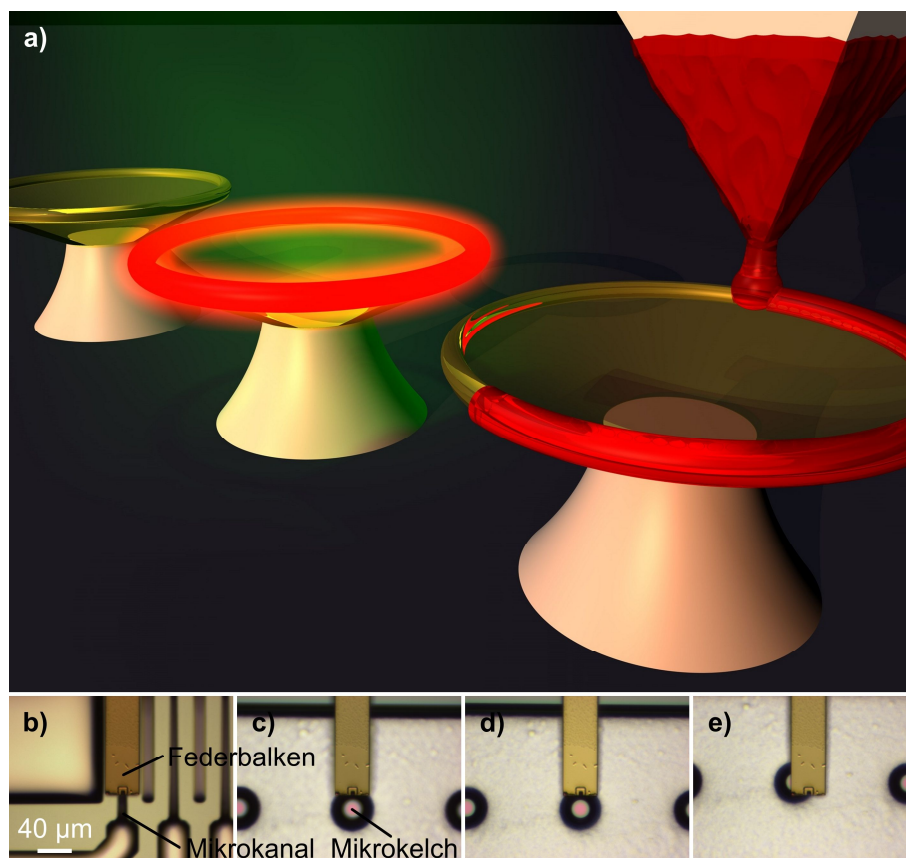


Abbildung 4.1: Oberflächenfunktionalisierung von Mikrokelchen mit molekularen Tinten mittels Dip-Pen Nanolithografie. (a) Schematische Darstellung des Beschichtungsprozesses. Die mit einer molekularen Tinte beladene AFM-Spitze wird mit dem Rand des zu beschriftenden Mikrokelches in Kontakt gebracht und anschließend entlang Kreisumfangs gefahren. (b) In-situ Mikroskopbild der Beladung einer AFM-Spitze. Die Spitze wird in die Tinte getaucht, die sich in einem Mikrokanal befindet. (c) Nach der Beladung wird die Spitze zu dem zu beschichtenden Mikrokelch ausgerichtet und anschließend der Abstand zwischen Spitze und Kelch schrittweise verringert. (d) Der physikalische Kontakt zwischen Mikrokelch und Spitze äußert sich durch eine Farbveränderung des Federbalkens. (e) Der Depositionsprozess erfolgt durch Abfahren des Kreisumfangs des Mikrokelches.

Tintenpräparation

Die Präparation der einzelnen Phospholipidtinten erfolgt ebenfalls nach einem standardisierten Protokoll.¹⁷⁵ Hierbei werden die einzelnen in Chloroform gelöst vorliegenden Lipidkomponenten vor deren Vermischung für eine Minute mit einem Vortexmischer homogenisiert. Im Anschluss werden die einzelnen Lipidkomponenten mit einer Eppendorf-Pipette in dem gewünschten Konzentrationsverhältnis dosiert und vermischt. Um eine vollständig homogene Mixtur zu gewährleisten, wird das Lipidgemisch für 15 Minuten in einem Ultraschallbad agitiert. Danach werden etwa 1,5 µl des Gemisches in eines der Mikroreservoirs des Inkwell-Chips pipettiert, welches dann über Kapillarkräfte einen Mikrokanal befüllt. Über eine Zeitdauer von 30 Minuten wird dann mittels eines Exsikkators bei 200 mbar das Chloroform vollständig ausgegast, sodass nun die fertige Phospholipidtinte einsatzbereit vorliegt.

Für die molekular selektiven Biolaser wurde als Lasertinte ein Phospholipidgemisch entwickelt – bestehend aus 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(cap biotiny) (Biotin Cap PE), und 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine phoethanolamine-*N*-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (Liss Rhod PE), im molaren Verhältnis 95:4:1. Die Hauptkomponente DOPC fungiert als neutrales Trägerlipid für die beiden funktionellen Komponenten Biotin Cap PE (Phospholipid mit Biotin-Kopfgruppe; bioaktive Komponente) und Liss Rhod PE (Phospholipid mit dem Laserfarbstoff Rhodamin B als Kopfgruppe; Laserkomponente, rote Fluoreszenz). In der fertigen Tinte liegt der Laserfarbstoff zu 1,62 Gew.-% vor.

Neben der Lasertinte kommen in einzelnen Experimenten dieser Doktorarbeit weitere Tinten zum Einsatz. Diese werden jeweils in den betreffenden Kapiteln genauer beschrieben. Die Lipide wurden allesamt von Avanti Polar Lipids bezogen. Die molekularen Strukturen der verwendeten Lipide können Abbildung 4.2 entnommen werden.

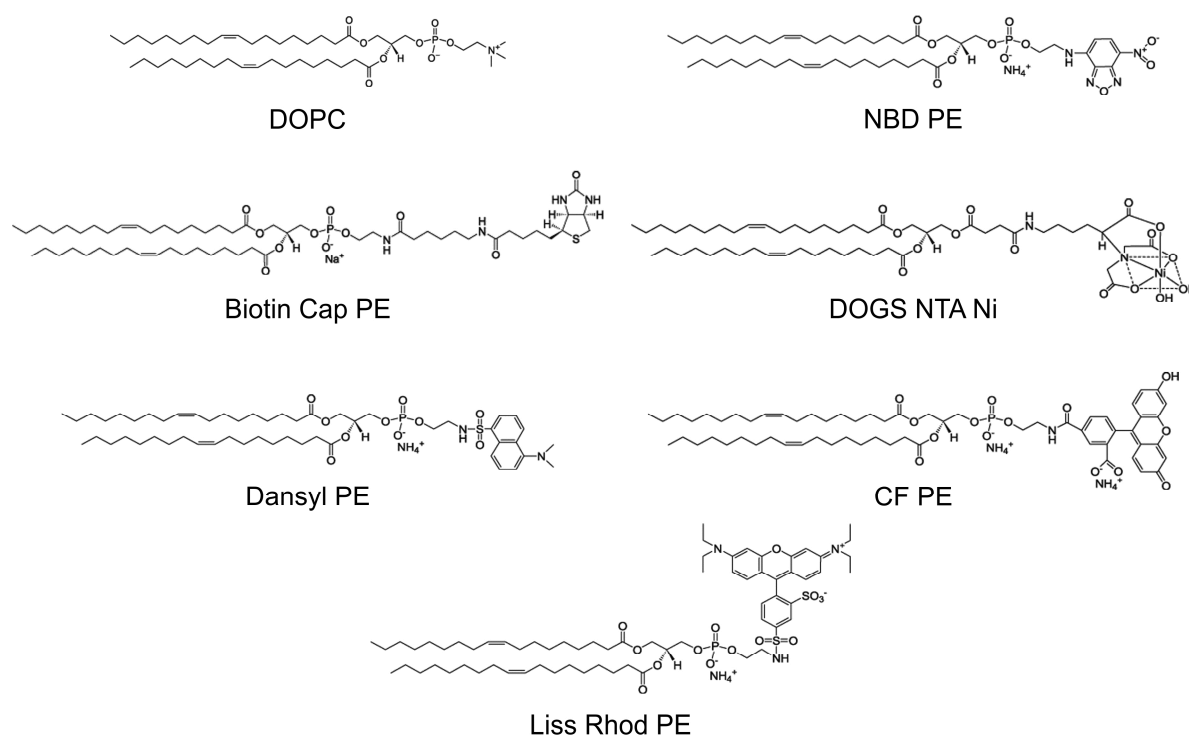


Abbildung 4.2: Molekulare Strukturen der in dieser Arbeit verwendeten Phospholipide. Während die Molekularstruktur des hydrophoben Endes jeweils gleich geartet ist, verfügen die Phospholipide über funktionelle Kopfgruppen. Durch Vermischung der verschiedenen Phospholipide lässt sich die spätere Funktionalität der Tinte einstellen. Die Funktionalität der einzelnen Phospholipide ist: DOPC (Trägerlipid), NBD PE (grüne Fluoreszenz), Biotin Cap PE (selektive Anbindung des Proteins Streptavidin), DOGS NTA Ni (selektive Anbindung von Histidin-terminierten Molekülen), Dansyl PE (blaue Fluoreszenz), CF PE (grüne Fluoreszenz), Liss Rhod PE (rote Fluoreszenz).

Abbildung 4.3 zeigt typische Resultate der DPN-Depositionsprozeder. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop Nikon TE2000 in Auflicht-Konfiguration aufgenommen. Direkt nach der Tintenbeladung trägt die AFM-Spitze so viele Phospholipide, dass die Oberflächen der ersten beiden Mikrokelche zumeist komplett bedeckt werden. Ab dem dritten Kelch wird lediglich der Resonatorrand beschichtet, wobei sich die Menge der deponierten Tinte nahezu stabilisiert und mit zunehmender Anzahl der beschichteten Mikrokelche nur noch minimal abnimmt. Im vorliegenden Experiment beträgt die durchschnittliche Standardabweichung des Depositionsprozesses nach dreimaliger Wiederbeladung der AFM-Spitze 4,78 % (erster Kelch nach Wiederbeladung: 4,6 %, zweiter Kelch: 11,55 %; dritter Kelch: 2,00 %; vierter Kelch: 2,45 %; fünfter Kelch: 3,3 %). Erwähnenswert ist, dass die gewählte Beschichtungs- und Wiederbeladungsprozedur zu einer visuell nahezu konstanten Tintendeposition ab Kelch Nummer 3 führt. Die Standardabweichung beträgt unter Einbeziehung aller Kelche Nummer 3 bis Nummer 5 4,56 %. Durch Anwendung des obig definierten standardisierten Beschichtungsprotokolls konnte somit für die in Abbildung 4.3 dargestellten Laser eine reproduzierbare Tintenbeladung realisiert werden. Weitere Sitzungen ergaben ähnlich gute Reproduzierbarkeiten. Abbildung 4.4 zeigt weitere Biolaser, welche mit dem gleichen Protokoll hergestellt wurden, bei höherer Vergrößerung.

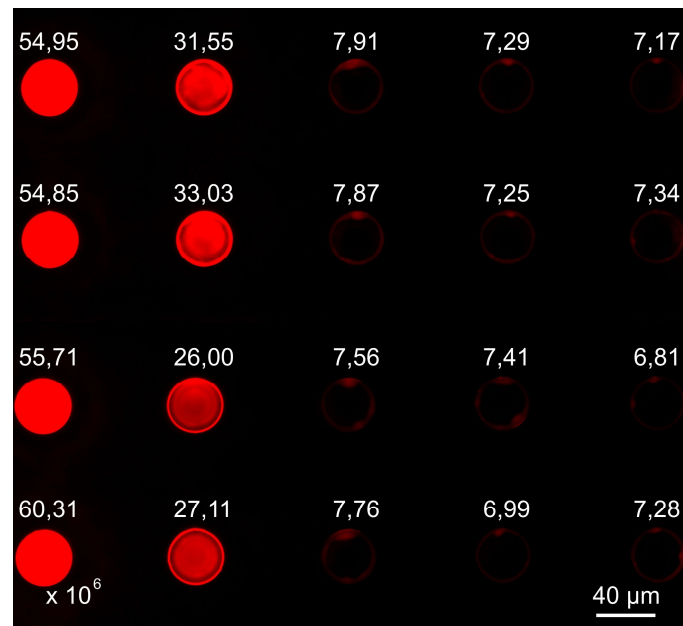


Abbildung 4.3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von sequentiell von links nach rechts mit Lasertinte beschichteten passiven Mikrokelchen und die zugehörigen Fluoreszenzgesamtwerte. Nach der Neubeladung der DPN-Spitzen stellt sich jeweils ab dem dritten Mikrokelch eine nahezu konstante Tintendeposition ein. Jede Tintenbeladung weist eine gute Reproduzierbarkeit auf.

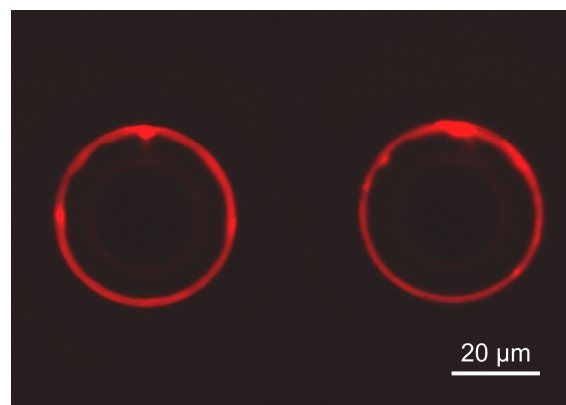


Abbildung 4.4: Vergrößerte Detailansicht zweier Biolaser. Die Tinte ist ausschließlich entlang der Resonatorränder lokalisiert.

Durch die Anwendung auf die Mikrokelche wurde erstmals demonstriert, dass neben den sonst üblichen planaren Oberflächen auch komplexe dreidimensionale Substrate per DPN beschichtet werden können. Bei korrekter Durchführung des Prozesses erfolgt auch hier die Beschichtung hochlokal auf die Ränder der Mikrokelchstrukturen. Dieser Sachverhalt wird durch Inspektion mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss LSM 510 META) belegt (Abbildung 4.5). Durch Ausnutzung der Eigenfluoreszenz des PMMA wird hierbei neben der Lasertinte zusätzlich auch die Kelchgeometrie visualisiert. Um die für die Aufnahmen notwendige Auflösung zu erreichen, kam ein Immersionsöl (Moviol) zum Einsatz, was jedoch auch zu einer Vesikelbildung der Lipide führte. Während somit die ausschließliche Randlokalisierung erfolgreich nachgewiesen wird, konnte per LSM lediglich eingeschränkt eine Aussage über die exakte Distribution der Lasertinte auf der Mikrokelchoberfläche getroffen werden, da diese durch das Moviol beeinflusst wird. Messungen mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM) (Veeco Dimension Icon) an Lipidkreisen auf planaren PMMA-Substraten ergaben Strukturhöhen zwischen 130 und 290 nm und Strukturbreiten von 2,7 bis 6,6 μm .

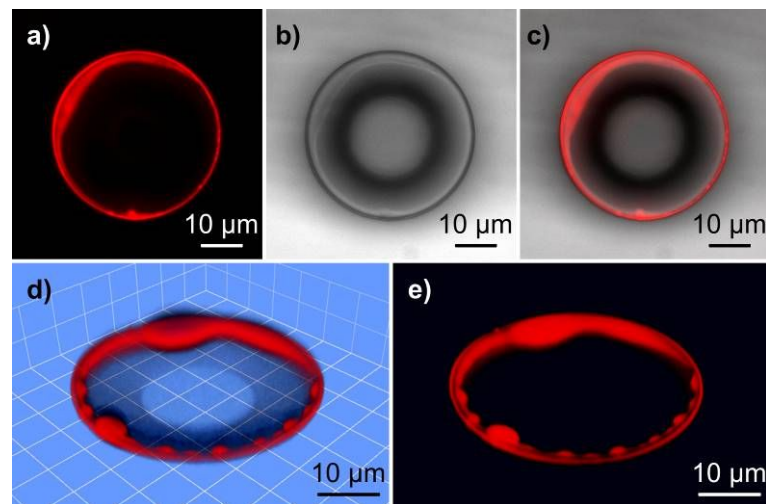


Abbildung 4.5: Fluoreszenzmikroskopische Analyse eines Biolasers. (a) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme im roten Fluoreszenzkanal, (b) im Hellfeld und (c) als 2-Kanal-Bild aus (a) und (b). (d) LSM-Aufnahme desselben Kelches als 2-Kanal-Bild. Das Fluoreszenzsignal der Tinte ist im roten Kanal, die Autofluoreszenz des PMMA-Kelches im blauen Kanal dargestellt. (e) Fluoreszenzsignal der Tinte, als separate 1-Kanal-Aufnahme. Die LSM-Aufnahmen belegen die ausschließliche Lokalisierung der Lipidfarbe entlang des Resonatorrandes.

Aufgrund ihrer sehr kleinen Federkonstanten und der damit einhergehenden niedrigen Resonanzfrequenz kann mit den für den Depositionsprozess verwendeten Federbalken keine in-situ Quantifizierung der transferierten Tintenmenge vorgenommen werden.¹⁷⁷ Deshalb wurde in einem separaten Beschichtungsexperiment ein härterer Federbalkentypus eingesetzt. Ausgewählt wurde hierfür ein selbstgebaute Federbalkentypus (7,4 N/m; Resonanzfrequenz: 149,81 kHz), welcher von Röhrig und Kollegen freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde.¹⁷⁸ Dieser weist anstelle einer AFM-Spitze eine Glaskugel auf, welche mittels eines UV-aushärtbaren Klebers auf einem unstrukturierten kommerziellen Federbalken fixiert ist. Die Glaskugel wurde für 30 Minuten zur Beladung in das Lipidreservoir getaucht. Obwohl der Depositionsvorgang visuell andere Beschichtungsergebnisse liefert, kann dennoch eine Aussage über die Größenordnung der deponierten Lipidmenge getroffen werden. Hierzu wird ein von Biswas und Kollegen veröffentlichter Formalismus verwendet,¹⁷⁷ welcher über die Veränderung der Federbalken-Resonanzfrequenz eine mathematische Berechnung der Massenänderung des Federbalkens und somit der Masse der deponierten Tintenmenge erlaubt. Die anfängliche Masse des unbeladenen Federbalkens M_{cant} ergibt sich über dessen Resonanzfrequenz f_{res} und seiner Federkonstanten k_{F} zu:

$$f_{\text{res}} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k_{\text{F}}}{M_{\text{cant}}}} \quad (25)$$

Über die Charakterisierung der Resonanzfrequenz vor und nach jedem Depositions- bzw. Beladungsvorgang kann über die Frequenzänderung Δf die Massenänderung ΔM berechnet werden.

$$\Delta M = -2 \frac{M_{\text{cant}}}{f_{\text{res}}} \Delta f_{\text{res}} \quad (26)$$

Abbildung 4.6 zeigt die Ergebnisse des Experimentes. Nach der Immersion im Tintenreservoir ist der Federbalken mit 2,3 ng Tinte beladen ($\Delta f_{\text{res}} = -20,71$ kHz). Durch den Einsatz der weitaus größeren kugelförmigen Spitze ist die Tinte zwar weiterhin entlang der Kelchränder lokalisiert, allerdings lateral ausgedehnter. Die übertragene Tintenmenge pro Kelch beträgt im Mittel 154 pg. Aufgrund der stärkeren Fluoreszenzsignale im Vergleich zu den Beschichtungsergebnissen der Typ A-Spitze ist jedoch davon auszugehen, dass die bei den Biolasern applizierte Tintenmenge unterhalb dieses Wertes liegt.

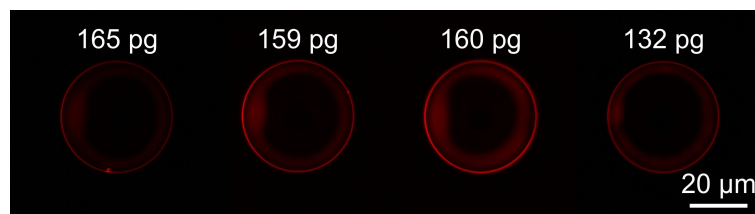


Abbildung 4.6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von vier mit der kugelförmigen AFM-Spitze beschichteten passiven Mikrokelchen. Die Anhand der Änderung der Resonanzfrequenz des Federbalkens ermittelte typische übertragene Tintenmenge liegt hier bei durchschnittlichen 154 pg. Anstelle einer Typ A DPN-Schreibspitze wurde ein Federbalken mit einer kugelförmigen Schreibspitze verwendet, um aufgrund der höheren Federkonstanten eine genauere Massenbestimmung zu erzielen.

4.1.2 Lasingeigenschaften

Die mit dem DPN-Federbalken Typ A beschichteten Biolaser weisen, obgleich das Lasingmedium hier lediglich im evaneszenten Feldanteil der im Kelch geführten WGMs lokalisiert ist, niedrige Laserschwellen auf. Abbildung 4.7 zeigt die Lasingcharakteristik von Biolasern mit unterschiedlichem Tintenbenetzungsgrad an Luft und in Wasser. An Luft weisen sowohl die komplett als auch die lediglich am Rand beschichteten Kelche Laserschwellen zwischen 8 und 10 nJ pro Anregungspuls auf (Abbildungen 4.7(a) bis (d)). Dieser Wert liegt etwa um einen Faktor 3 über den von Grossmann und Kollegen publizierten Schwellen von Rhodamin-volumendotierten Kelchen,¹¹ wodurch ein guter Benetzungsgrad der Tintendeposition per DPN belegt wird. Des Weiteren kann durch diese lediglich geringfügig höher ausfallenden Schwellen eine Beschädigung der Kelchresonatoren durch den Depositionsprozess neben der obigen visuellen Untersuchung nunmehr auch messtechnisch ausgeschlossen werden. Der Grund für die Ähnlichkeit der Laserschwellen trotz der stark unterschiedlichen Benetzungsgrade könnte die hohe Schichtdicke der Tinte am Randbereich der Kelche sein, die unabhängig von der deponierten Lipidgesamtmenge ausreicht, um einen Großteil des evaneszenten Feldes der WGMs zu adressieren. Die Abbildungen 4.7(e) und (f) zeigen die Laserschwellen der Biolaser unter Wasser. Während die Laserschwelle der komplett mit Tinte belegten Biolaser hier im Mittel um einen Faktor 2 zunimmt, weisen die an den Randbereichen beschichteten Laser im Schnitt eine etwa vierfach höhere Schwelle auf als an Luft. Dies deutet auf einen geringfügigen Abtrag der Tinte durch die Wasserimmersion hin, welcher für die dicker belegten Randbereiche der komplett beschichteten Kelche weniger Auswirkungen hat. Zusätzlich könnte auch die geringere Lasingeffizienz von Rhodamin in Wasser zur Erhöhung der Laserschwellen beitragen.¹⁷⁹ Für beide Benetzungsgrade fällt die Erhöhung der Laserschwelle durch die Immersion in Wasser jedoch derart moderat aus, dass sich die Biolaser problemlos für einen Betrieb in flüssigen Medien als Biosensor eignen.

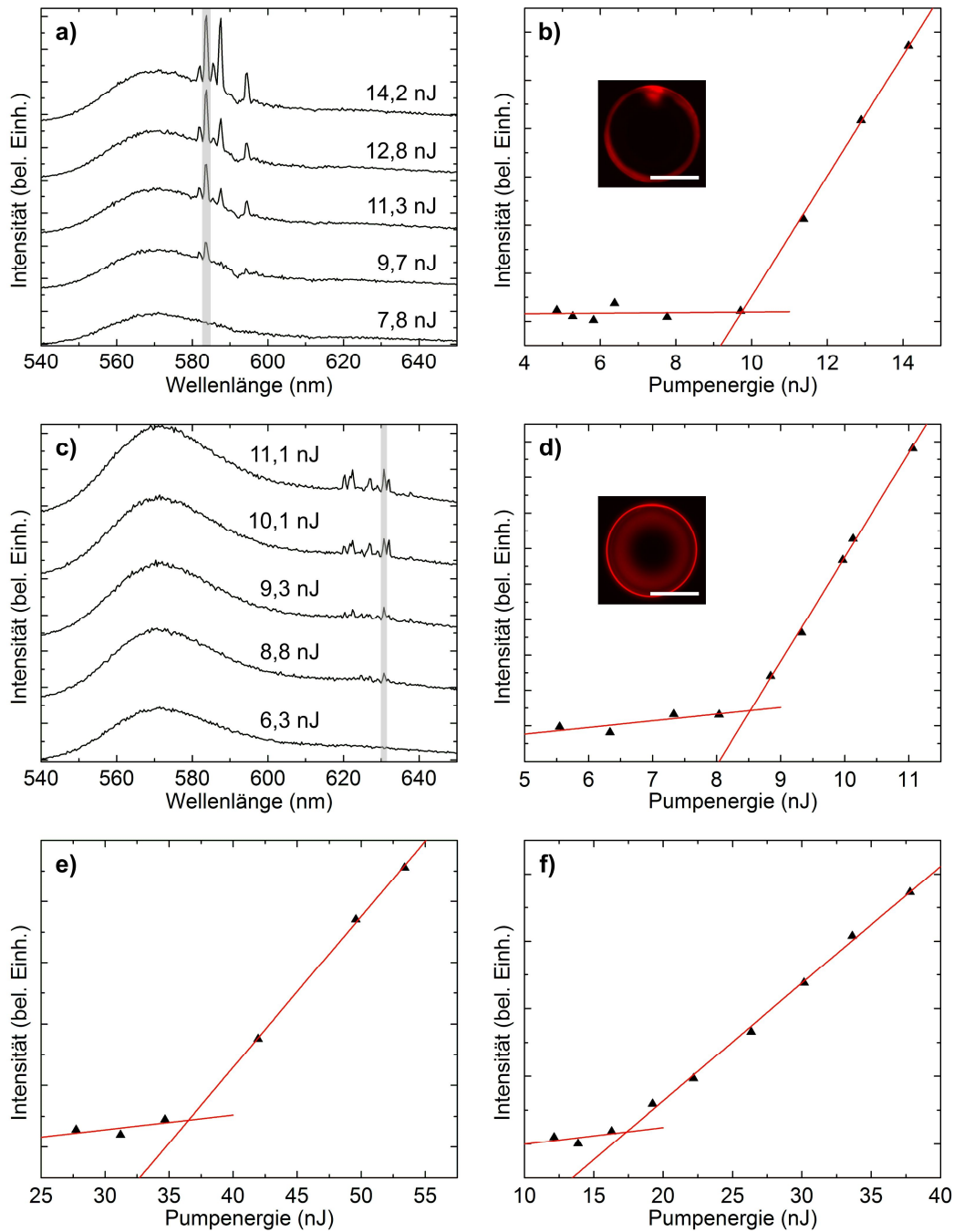


Abbildung 4.7: Lasingeigenschaften der mit biotinylierter Lasertinte beschichteten Biolaser. (a) Emissionsspektrum eines entlang seines Kreisdurchmessers mit Lasertinte beschichteten Biolasers an Luft bei unterschiedlichen Pumpenergien. (b) Laserkennlinie der in (a) hervorgehobenen Lasermode mit der niedrigsten Laserschwelle. Der untersuchte Biolaser ist jeweils in der eingefügten Fluoreszenzmikroskopaufnahme abgebildet (der jeweils eingezeichnete Maßstab entspricht 20 µm). (c) Emissionsspektrum eines komplett mit Lasertinte beschichteten Biolasers an Luft bei unterschiedlichen Pumpenergien. (d) Laserkennlinie der in (c) hervorgehobenen Lasermode mit der niedrigsten Laserschwelle. (e) und (f) zeigt die Laserkennlinie des in (a) und (b) bzw. (c) und (d) jeweils untersuchten Biolasers in Wasser.

4.1.3 Biomolekulares Detektionsexperiment

Die mit der Lasertinte hergestellten Biolaser können im Anschluss an die Funktionalisierung direkt und ohne weitere Behandlungsschritte für eine biosensorische Detektionsaufgabe verwendet werden. Abbildung 4.8 zeigt zunächst das Resultat eines rein visuellen molekularen Bindungsexperiments, durchgeführt an passiven PMMA-Mikrokelchen. Verwendet wurde hier eine biotinylierte Tinte bestehend aus DOPC, gemischt mit 4 mol-% Biotin Cap PE und 1 mol-% 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) (NBD PE; grüne Fluoreszenz). Die NBD-Kopfgruppe dient hierbei lediglich zur Visualisierung der Tinte und nicht zur Generation von Lasing.

Nach 15-minütigem Blocken aller nicht durch die Tinte beschichteten Stellen mittels einer 0,5 %-igen BSA-Lösung (Lösemittel PBS), wurde im Zuge eines daran anschließenden Inkubationsschrittes Cyanin3-gelabeltes Streptavidin (Cy3-Streptavidin; orangerote Fluoreszenz), zu 500 nmol/L (30 µg/ml) gelöst in PBS, an die mit der biotinylierten Tinte funktionalisierten Kelchbereiche angekoppelt (Inkubationszeit 15 Minuten). In Abbildung 4.8 ist zu erkennen, dass auch mit dieser Tinte lediglich die Randbereiche der Kelche mit Tinte adressiert wurden, an welche wiederum exklusiv die Anbindung des Cy3-Streptavidins erfolgt. Hier wird deutlich, dass weder die Inkubation der Kelchresonatoren in PBS noch die diversen Spülschritte oder der Anbindungsprozess des Cy3-Streptavidin die laterale Distribution der Tinte beeinflussen. Obwohl die Haftung der Tinten an den Kelchen lediglich auf Physisorption beruht, ist deren mechanische Stabilität ausreichend, sodass die Funktionalität der Biolaser als Biosensoren gegeben ist. Nach Abschluss des Experiments sind die Tinten weiterhin ausschließlich an den Resonatorrändern lokalisiert, was eine stabile Betreibbarkeit der Kelche als Biosensor in flüssigen Medien visuell belegt.

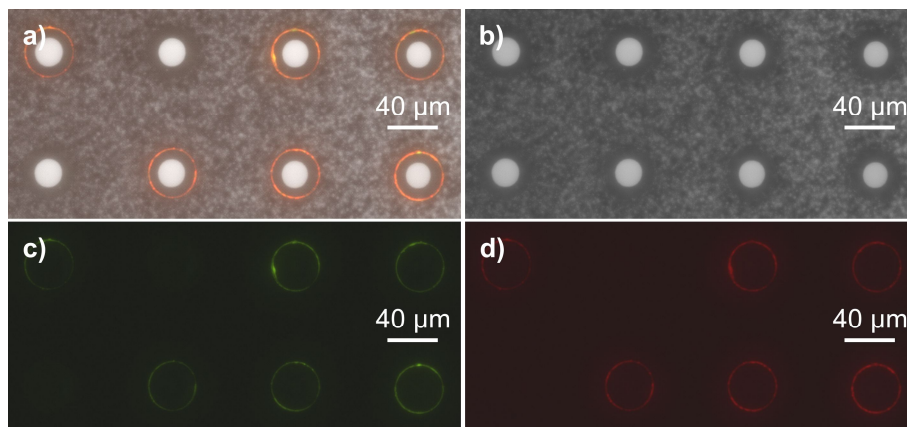


Abbildung 4.8: Fluoreszenzexperiment an passiven Mikrokelchen zur visuellen Verifizierung der Stabilität der Phospholipidfunktionalisierung. (a) 3-Kanal-Fluoreszenzmikroskopaufnahme von DPN-funktionalisierten passiven Mikrokelchen nach der Anbindung von Cy3-markiertem Streptavidin an eine NBD-markierte biotinylierte Tinte. Zwei der acht Mikrokelche wurden als Negativkontrolle nicht mit Tinte belegt, sodass an diesen keine Streptavidinanlagerung stattfand. Diese weisen somit keinerlei Fluoreszenzsignal auf. (b), (c) und (d) zeigen jeweils den Hellfeld-, den grünen Fluoreszenz- und den roten Fluoreszenzkanal aus (a), zur separaten Visualisierung respektive der Kelche, der Lipid-tinte und des Streptavidins.

Abbildung 4.9 zeigt die erfolgreiche messtechnische Anwendung der Biolaser unter Applizierung der in Kapitel 4.1.1 erörterten biotinylierten Lasertinte. In Abbildung 4.9(a) sind die Laserspektren eines Biolasers zu ausgewählten Zeitpunkten während des molekularen Detektionsexperiments dargestellt. Vor Beginn der Detektion von diesmal unmarkiertem Streptavidin wurde auch hier der Laser zunächst mit BSA geblockt. Nach der BSA-Inkubation sind die Lasermoden des Biolasers um 14 pm rotverschoben. Dies deutet entweder auf eine nichtspezifische Absorption an die modenführenden Bereiche des Laserkelches hin, oder aber auch auf einen Temperaturdrift aufgrund von Temperaturschwankungen des Analyten (Details s. Kapitel 4.3). Ungeachtet der Ursache belegt diese minimale Modenverschiebung, dass die lichtführenden Randbereiche des Lasers nahezu vollständig mit Tinte bedeckt wurden, wodurch eine nichtspezifische Molekülabsorption fast komplett unterbunden wird. Durch Anbindung von 50 nanomolarem (3 µg/ml) Streptavidin weisen die Lasermoden eine deutliche Rotverschiebung auf. Nach 270 Sekunden beträgt die Rotverschiebung bereits 126 pm. Der komplette zeitliche spektrale Verlauf der Lasermoden ist in Abbildung 4.9(c) zu sehen. Zudem ist der Signalverlauf eines weiteren Biolasers bei einer Streptavidinkonzentration von 30 µg/ml dargestellt. Aus der Kurvendynamik kann geschlossen werden, dass beide Laser reproduzierbar mit der Lasertinte funktionalisiert wurden: Die Anfangssteigungen der Kurven sind direkt proportional zur Streptavidinkonzentration (vgl. Kapitel 3.1.5).

Abbildung 4.9(b) zeigt an ausgewählten Laserspektren den Signalverlauf eines Biolasers, bei welchem die Biotinkomponente der Lasertinte nicht beigemischt ist (1 mol-% Liss Rhod PE in DOPC). Der Laser war hierbei auf demselben Chip lokalisiert wie der zur Detektion des 500 nanomolaren

Streptavidins herangezogene biotinylierte Biolaser und wurde demnach zeitgleich inkubiert. Während durch die BSA-Inkubation eine vergleichbare Rotverschiebung der Lasermoden um 20 pm erfolgt, wandern die Moden bei einer Konzentration von 500 nmol/L Streptavidin lediglich um weitere 10 pm. Ohne die Biotinylierung wird somit die Anbindung des Streptavidins unterbunden. Derartige Biolaser, bei denen die molekular selektiven Akzeptoren fehlen, können somit effektiv als Referenzstrukturen neben den Sensorstrukturen integriert werden, z. B. um Signalbeiträge durch nichtspezifische Molekülanlagerung oder Temperaturveränderungen zu ermitteln. In Kapitel 4.3 wird an einer speziellen Sensoranordnung demonstriert werden, wie diese Referenzsignale gezielt zur Herausfilterung dieser Störsignale eingesetzt werden können.

Die Tatsache, dass die Phospholipidntinten auf den Kelchen Multilagen ausbilden,¹⁷¹ erlaubt die Anbindung einer erhöhten Masse an Streptavidinmolekülen. Durch die Mobilität der Lipidlagen kann das Streptavidin in das Tintenvolumen eindringen (Interkalationseffekt)¹⁷³ und somit auch an das dortige Biotin ankoppeln (Abbildung 4.9(d)). Die Anwendung des in Kapitel 3.1.5 aufgeführten mathematischen Formalismus lässt den Rückschluss zu, dass im vorliegenden Experiment das Sensorsignal (die spektrale Verschiebung $\delta\lambda$) des Biolasers das theoretisch zu erwartende Signal übersteigt. Unter Annahme einer vollständigen Monolagen-Bedeckung von unbeschichteten Kelchen mit Streptavidin (Oberflächenbelegung: $\sigma_p = 3,7 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2}$)¹⁸⁰ ergibt sich für die maximal zu erwartende Wellenlängenverschiebung:

$$\delta\lambda = \frac{\sigma_p \alpha_{\text{ex}} 2\pi \sqrt{n_{\text{Res}}^2 - n_{\text{Ana}}^2}}{\varepsilon_0 \lambda} \frac{n_{\text{Res}}}{n_{\text{Ana}}^2} BRIS = 185 \text{ pm} \quad (27)$$

Hierbei ist $\alpha_{\text{ex}} = 13,2\pi\varepsilon_0 \times 10^{-21} \text{ cm}^3$ (überschüssige Polarisierbarkeit aufgrund der Verdrängung des flüssigen Analyten (hier: Wasser)^{181,182} durch die Streptavidinmoleküle), $n_{\text{Res}} = n_{\text{PMMA},600\text{nm}} = 1,491$, $n_{\text{Ana}} = n_{\text{H}_2\text{O}} = 1,33$ und $BRIS = 21 \text{ nm/RIU}$. Die BRIS wurde an unbeschichteten PMMA-Mikrokelchlasern mithilfe von Testlösungen experimentell ermittelt; ε_0 ist die Vakuumpermittivität.

Die Modenverschiebung von 240 pm des biotinylierten Biolasers übersteigt demnach den theoretisch erwarteten Wert um etwa 30 %, unter der Annahme, dass bei 500 nmol/L die Sensorbelegung eine Sättigung erfährt. Es ist davon auszugehen, dass die angekoppelte Masse an Streptavidinmolekülen die einer Monolage um mehr als die hier gemessenen 30 % übersteigt, da aufgrund der höheren Brechzahl der Phospholipide im Vergleich zu Wasser der Brechzahlkontrast zu Streptavidin geringer ist.¹⁸³ Unter Berücksichtigung der in Kapitel 3.1.5 ermittelten minimalen auflösbaren Resonanzverschiebung für den verwendeten optischen Versuchsaufbau von 1 pm kann mit diesem Biosensor nach einer Messdauer von 4,5 Minuten für Streptavidin ein Detektionslimit von 24 ng/ml (400 pmol/L) erzielt werden. Durch eine Verlängerung der Messdauer kann das Detektionslimit weiter reduziert werden.

In Abbildung 4.10 ist das Ergebnis einer weiteren Messreihe dargestellt, in welcher die Sensorsignale der ersten drei Mikrokelchlasers weiterer Chips unter Anwendung der in Abbildung 4.3 dargestellten DPN-Beschichtungssequenz messtechnisch charakterisiert wurden. Die Magnitude des Sensorsignals ist abhängig von der jeweiligen Menge der auf dem Kelch immobilisierten Lipidntinte. Für Kelchlasers Nummer 1 ergibt sich durch die Anbindung von 500 nanomolarem Streptavidin eine spektrale Verschiebung der Lasermoden von bis zu 400 pm. Dies stellt eine Signalsteigerung von 116 % im Vergleich zu unbeschichteten Mikrolasern dar. Es ist anzumerken, dass im Rahmen des Detektionsexperiments in Abbildung 4.9 stets der zweite Mikrokelchlasers aus einer DPN-Beschichtungssequenz charakterisiert wurde. Die dort ermittelte Resonanzverschiebung von 240 pm ist mit dem in Abbildung 4.10 ermittelten mittleren Sensorsignal vereinbar. Die in Abbildung 4.3 visuell abgeleitete gute Reproduzierbarkeit der DPN-Funktionalisierung wird somit nunmehr auch messtechnisch belegt.

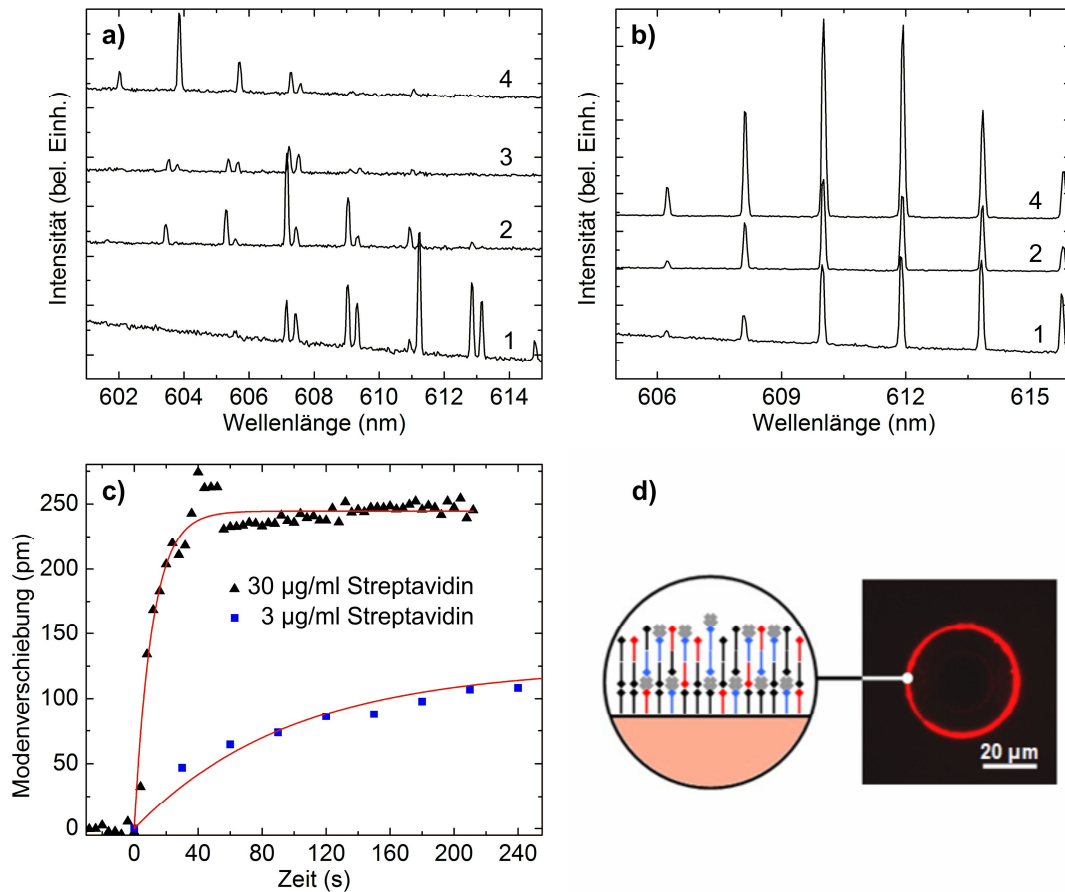


Abbildung 4.9: Demonstration phospholipidfunktionalisierter Biolaser als molekulare Biosensoren. (a) Spektraler Verlauf der Biolaseremission während der Inkubation von 3 µg/ml Streptavidin. Der Biolaser wurde im Vorfeld der Streptavidinexposition mit BSA geblockt. Die Spektren stellen die Situation vor (1) und nach (2) dem BSA-Blocken sowie 90 s (3) und 270 s (4) nach der Streptavidininjektion dar. (b) Spektraler Signalverlauf eines Biolasers, bei welchem die Biotinkomponente fehlt (Streptavidinkonzentration 30 µg/ml). Hier findet keine Streptavidinanbindung statt. Die Zeitpunkte (1), (2) und (4) entsprechen denen aus (a). (c) Temporales Signalverlauf von zwei Biolasern bei 30 µg/ml und 3 µg/ml Streptavidin. Das theoretisch erzielbare Detektionslimit nach einer 4,5-minütigen Detektion beträgt 24 ng/ml. (d) Schematische Darstellung der Einlagerung des Streptavidins in die dreidimensionale mobile Matrix der biotinylierten Lipidfarbe.

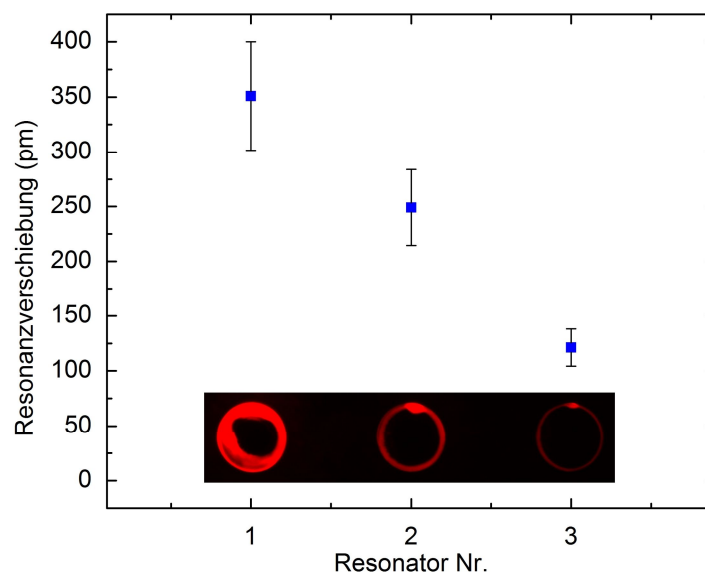


Abbildung 4.10: Sensorsignal von sequentiell mit biotinylierter Lasertinte funktionalisierten Biolasern, beschichtet nach der Prozedur aus Abbildung 4.3.

4.2 Hochparallele Oberflächenfunktionalisierung mittels justiertem Mikrokontaktstempeln

Die in Kapitel 4.1 präsentierten Ergebnisse belegen, dass der Einsatz von Phospholipidtinten diverse Vorteile im Vergleich zu anderen Oberflächenfunktionalisierungsmethoden mit sich bringt. Die Tinten wurden hierbei hochlokal, und somit äußerst ressourcenschonend, per DPN auf die Ränder der Mikrokelche deponiert. Hinsichtlich einer kommerziellen Anwendbarkeit ist die DPN jedoch nicht die bevorzugte Depositionsmethode, da die Beschichtung der Mikrokelche im Fall der Verwendung von einem einzigen Federbalken zum einen seriell erfolgt und zum anderen für jeden Kelch erneut hochgenau justiert werden muss. Der zeitgleiche Einsatz mehrerer Federbalken¹⁷¹ erlaubt eine parallele Beschichtung vieler Kelche, allerdings hat auch hier die Positionierung dieser Federbalken-Anordnungen einen signifikanten Einfluss auf das Funktionalisierungsergebnis. Demnach wäre eine Beschichtungsmethode wünschenswert, welche die Vorzüge der DPN hinsichtlich der hohen lateralen Auflösung und der Ressourcenschonung beinhaltet, zeitgleich allerdings eine parallele Beschichtung der Kelchresonatoren mit möglichst geringem Positionierungsaufwand erlaubt. Des Weiteren sollen auch einzelne Resonatoren gezielt und selektiv mit unterschiedlichen Akzeptoren belegt werden können.

Tatsächlich wurden bereits zahlreiche unterschiedliche Funktionalisierungsansätze an chipbasierten WGM-Strukturen gezeigt.^{28,43,58,108,118,119,130,150,184–186} Je nach Ansatz und Geometrie der Sensoren wurden unterschiedliche Methoden zur Oberflächenfunktionalisierung angewendet. Die Herausforderung besteht hierbei zumeist in einer sinnvollen Integration in den Gesamtherstellungsprozess der Sensorelemente. Oft ist die Funktionalisierung vom eigentlichen Fabrikationsprozess entkoppelt und erfolgt direkt vor dem durchzuführenden molekularen Detektionsexperiment. Die Flexibilität der Funktionalisierung ist somit häufig durch die Herstellung und das Material der Sensorelemente limitiert. Die einfachste Methode besteht darin, die gesamte Chipoberfläche in einer Lösung von Akzeptormolekülen zu inkubieren. Für chipbasierte toroidale Mikrostrukturen ist dieses Vorgehen oft die erste Wahl, da sich bedingt durch deren Geometrie (die eigentlichen Resonatorstrukturen befinden sich nach ihrer Herstellung letztendlich auf Siliziumsockeln und sind umgeben von rauem Silizium) nur sehr schwer eine mikrofluidische Infrastruktur direkt auf dem Chip integrieren lässt.^{17,32,184} Die Chips sind in der Regel dann in eine fluidische Kammer eingebaut, welche Bestandteil des optischen Charakterisierungsaufbaus ist. Durch die Inkubation des Chips können beliebig viele Sensorstrukturen zeitgleich funktionalisiert werden, jedoch werden alle Strukturen mit demselben Akzeptormolekül belegt. Für Mikrokelche gelten aufgrund ihrer ähnlichen Geometrie dieselben Einschränkungen. Eine gezielte Funktionalisierung einzelner Sensoren kann jedoch vorgenommen werden, wie bereits am Beispiel von passiven Kelchresonatoren demonstriert.¹⁰⁸ Jedoch ist dieser Ansatz, vor allem durch die mit wachsender Anzahl an unterschiedlichen Akzeptormolekülen ebenfalls einhergehende wachsende Zahl an Inkubations- und Spülschritten sowie der Justage des Lasers für die Photoaktivierung, sowohl aus zeitlicher als auch ressourcentechnischer Sicht unwirtschaftlich. Von Huckabay und Kollegen wird die Funktionalisierung beliebig vieler Sensorelemente (Mikrokugeln) ebenfalls per Inkubation vorgenommen.^{28,187} Diese erfolgt allerdings entkoppelt von der Chipplattform. Die funktionalisierten Mikrokugeln werden erst im Anschluss auf einem Trägersubstrat immobilisiert. Nachteilig ist hierbei, dass diese Positionierung statistisch und somit nicht reproduzierbar erfolgt. Die Deposition einer genau definierten Anzahl an Sensorelementen an exakt vordefinierten Positionen ist somit nicht möglich. Des Weiteren kann ein physikalischer Kontakt zwischen einzelnen Sensorelementen nicht ausgeschlossen werden. Dieser ist jedoch zu vermeiden, wenn eine optimale Sensorfunktion erzielt werden soll. Eine vielversprechende Funktionalisierungsmethode chipbasierter Strukturen besteht in der Implementierung einer mikrofluidischen Infrastruktur.^{40,58,118,119,130,150,188} Dieser Ansatz basiert nach wie vor auf Immersion, allerdings findet diese nun lateral eingeschränkt statt, sodass gezielt einzelne Sensorelemente zur individuellen Funktionalisierung adressiert werden können. Nachteilig ist hier allerdings, dass mit zunehmender Anzahl an individuell zu funktionalisierenden Sensorstrukturen die Komplexität der Chiparchitektur und auch der benötigten Fluidikperipherie stark zunehmen. Trotz der hohen Flexibilität dieses Ansatzes, besonders bei photolithographisch definierten chipbasierten Strukturen wie z. B. Ringresonatoren ist dieser Ansatz in erster Linie für Chips mit einer kleinen Anzahl an Transduktoren sinnvoll.^{40,58,150,188} Nicht chipbasierte Strukturen sind oft nur unter erhöhtem Aufwand

und mit sehr kleiner Bauteildichte in eine mikrofluidische Chipplattform integrierbar, wie z. B. Glaskugeln.^{118,189} Im Fall von Kapillaren bildet der Transduktor zeitgleich auch die Mikrofluidik,^{119,130} dennoch sind auch derartige Strukturen aufgrund ihrer Größe und Fragilität nur sehr schwer und in kleiner Stückzahl auf Chipbasis integrierbar und sehr schwer handhabbar.¹⁹⁰

Um die Bauteildichte der Sensorelemente möglichst hoch und gleichzeitig die Komplexität der Chiparchitektur gering zu halten, sind lokalisierte Funktionalisierungsmethoden erforderlich, z. B. durch ein punktuell Aufbringen der Akzeptormoleküllösungen auf einzelne Sensorelemente. Der Durchsatz, welcher beispielsweise durch Aufpipettierung per Hand oder unter Zuhilfenahme von mechanischen Positionierungshilfen erzielt werden kann,^{58,185} ist jedoch äußerst gering und erfordert zudem ein häufiges Austauschen der Pipetten sowie einen erhöhten Positionierungsaufwand. Ein vielversprechender Ansatz stellt das Aufbringen der Akzeptormoleküle per Tintenstrahldruckverfahren dar. Kirk und Kollegen beschreiben ein derartiges Verfahren, bei dem mit unterschiedlichen chemischen Gruppen konjugierte BSA-Moleküle mit einer piezoelektrischen Pipettiereinheit auf Silizium-Ringresonatoren aufgebracht werden.¹⁸⁶ Die hochgenaue Positionierung der Fluidtropfen erfordert allerdings weiterhin eine weitestgehend manuelle Kalibrierung. In Rahmen dieser müssen die Chips zur visuellen Inspektion mit einem Mikroskop aus dem Drucker aus- und anschließend hochgenau an derselben Position wieder eingebaut werden. Da die Pipettiereinheit lediglich über eine Dosiereinheit verfügt, ist dieses Prozedere für jeden neuen Akzeptormolekültypus erneut durchzuführen. Nach erfolgreicher Kalibrierung konnte ein Durchsatz von etwa einem Resonator pro Sekunde demonstriert werden. Der in Kapitel 4.1 erörterte DPN-Ansatz erlaubt ebenfalls eine hochlokale Funktionalisierung einzelner Sensorelemente, allerdings sind die erforderlichen Positionierungsmaßnahmen ähnlich komplex, wie bei den übrigen punktuellen Verfahren. Alle bis dato demonstrierten punktuellen Depositionsverfahren sind zudem von serieller Natur und liefern somit weitestgehend limitierte Durchsätze. Auch sind die in der Summe benötigten Volumina der Akzeptormoleküllösungen abhängig von den verwendeten Kartuschengrößen und somit vergleichsweise hoch. Ein Ansatz zur parallelen Oberflächenfunktionalisierung von WGM-Strukturen wurde bislang nicht gezeigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb eine Depositionsmethode entwickelt, welche erstmals eine hochparallele und großformatige Multiplex-Beschichtung von chipbasierten WGM-Strukturen ermöglicht. Aufbauend auf den Ergebnissen aus Kapitel 4.1 werden für die Beschichtungen hier ebenfalls Phospholipidtinten eingesetzt. Mit dieser Technik, eingeführt unter der Bezeichnung *Aligned Microcontact Stamping* (μ CS; zu dt. *justiertes Mikrokontaktstempeln*),¹⁹¹ können dicht gepackte ein- (1D) und zweidimensionale (2D) Felder von Mikrokelchen beschichtet werden. Durch eine passende Einstellung der Transferparameter werden weiterhin auch mit diesem Ansatz lediglich die Kelchränder mit Akzeptormolekülen belegt. Zum Einsatz kommen hierbei spezielle großflächig strukturierte Stempelkissen, mit welchen die Konfiguration der Tinten auf den Mikrokelchfeldern eingestellt wird. Auf diese Weise werden dann entweder alle Kelche innerhalb eines Feldes mit der gleichen Tinte belegt oder individuelle Kelche innerhalb eines Mikrokelchfeldes mit unterschiedlichen Tinten funktionalisiert.

In diesem Kapitel wird das μ CS-Verfahren im Detail erörtert und sowohl die geometrischen Transferergebnisse als auch der Einfluss auf die Qualität der Mikrokelche erörtert. Die Eignung der bestempelten Kelche als Biosensoren wird visuell und messtechnisch in molekularen Detektionsexperimenten demonstriert.

In Kapitel 4.3 wird das μ CS-Verfahren angewendet, um sehr eng zueinander strukturierte Mikrokelche ohne wechselseitige Kontaminierung mit unterschiedlichen Tinten zu funktionalisieren und diese im Anschluss im Rahmen eines Biosensorikexperiments mit integrierter wechselseitiger Signalreferenzierung zeitgleich auszulesen.¹⁹²

4.2.1 Justiertes Mikrokontaktstempeln (μ CS)

μ CS ermöglicht ein hochparalleles Beschichten von Mikrokelchen. Diese können in beliebiger Anordnung als 1D- oder 2D- Felder vorliegen. In welcher Konfiguration die Mikrokelche beschichtet werden wird flexibel über die laterale Distribution der Phospholipidtinten auf dem Stempelkissen definiert. Dieses besteht im Wesentlichen aus einem Standard-Mikroskopobjektträger, welcher mit den

auf die Kelche zu transferierenden Phospholipidtinten beschichtet ist. Diese werden dann über einen Stempeltransfer auf die Mikrokelche übertragen.

In diesem Kapitel werden zwei Strategien zur Bestempelung von Mikrokelchfeldern demonstriert. Die erste Strategie ermöglicht durch eine großflächige homogene Beschichtung des Glasobjektträgers mit einer einzigen Tintensorte eine Oberflächenfunktionalisierung aller involvierten Kelche mit derselben Tinte (Transferstrategie A). Die Tinte wird hierbei entweder durch manuelles Aufpipettieren oder durch Schleuderbelackung aufgebracht. In der zweiten Strategie werden durch den Einsatz von strukturierten Stempelkissen, bei denen die Tinten lateral begrenzt aufgebracht werden, gezielt einzelne Kelche innerhalb eines Feldes mit unterschiedlichen Tinten beschichtet (Transferstrategie B).

Die in Transferstrategie B eingesetzten Multiplex-Stempelkissen werden per Polymer-Pen Lithografie (PPL) hergestellt,¹⁹³ nach der von Brinkmann und Kollegen eingeführten Methodik.¹⁹⁴ Die PPL wurde erstmals 2008 demonstriert,¹⁹⁵ als eine fortgeschrittene molekulare Depositionstechnik, welche die Vorteile der DPN und des Mikrokontaktdruckens (engl.: Microcontact printing (μ CP))¹⁹⁶ in sich vereint. Zum Einsatz kommt hierbei wie beim μ CP ein strukturierter Stempel. Dessen Oberfläche ist in der Regel großflächig mit einem dichten Feld aus pyramidalen Schreibspitzen versehen, sodass molekulare Tinten in einem Massenherstellungsverfahren lokalisiert auf eine planare Oberfläche gebracht werden können. Der Stempel besteht zumeist aus Polydimethylsiloxan (PDMS),^{193,195,197} vereinzelt werden jedoch auch andere Materialien eingesetzt.^{198–200} Die Schreibspitzen werden analog zur DPN in molekulare Tintenreservoirs getaucht und anschließend mittels einer piezoelektrischen Aktorik über eine feste Substratoberfläche geführt. Die Anordnung befindet sich hierbei ebenfalls in einer Klimakammer. Anders als bei der DPN findet der Molekültransfer jedoch nicht kontaktlos rein über einen Wassermeniskus statt, sondern es werden die Schreibspitzen auf das Substrat gepresst. Durch Kontrolle des Anpressdruckes und der Haltezeit können hierbei nahezu beliebige Strukturen mit definierten Strukturbreiten und mit hoher lateraler Auflösung realisiert werden.²⁰¹

Herstellung der μ CS-Stempelkissen

Zur Herstellung der Stempelkissen sowohl für Transfermethode A als auch B werden die in von Brinkmann und Kollegen beschriebenen Methodiken angewendet.¹⁹⁴ In beiden Fällen dient als Basis ein mit Chloroform, Isopropanol und deionisiertem Wasser gereinigter Objektträger aus Glas, auf welchen die Tinten als dünne Filme aufgebracht werden. In Rahmen der Experimente kamen diverse Phospholipidtinten zum Einsatz. Die Präparation erfolgt analog zu dem in Kapitel 4.1.1 erörterten Verfahren, indem die einzelnen Lipidkomponenten in den geforderten Mengenverhältnissen in ihrer gelösten Form vermischt werden. Die nähere Beschreibung der im jeweiligen Experiment verwendeten Tinten befindet sich in den jeweiligen Paragraphen.

Zur Herstellung des Stempelkissens für Transferstrategie A werden die involvierten Tinten auf einen Glasträger in ihrer in chloroformgelösten Form entweder aufgeschleudert oder mit einer Pipette großflächig aufgetropft und mit der Pipettenspitze gleichmäßig verteilt, sodass sich homogene Bereiche von einigen mm^2 ergeben. Danach wird das Stempelkissen in einem Exsikkator bei 200 mbar einige Minuten ausgegast und ist anschließend einsatzbereit. Da die Deposition der Tinten großflächig und homogen erfolgt, können die zu beschichtenden Mikrokelche auf ihrem Trägerchip in beliebiger geometrischer Konfiguration vorliegen. Derartig hergestellte Stempelkissen dienen darüber hinaus als Tintenreservoirs für die PDMS-Stempel zur PPL-Herstellung eines Stempelkissens nach Transfermethode B.

Die Herstellung des Stempelkissens für Transferstrategie B erfolgt über PPL mit einem photolithografisch hergestellten PDMS-Stempel mit pyramidalen Schreibspitzen. Hierbei definiert die geometrische Anordnung der Spitzen das auf dem Multiplex-Stempelkissen realisierte Tintennmuster. Das Design des Stempelkissens wird durch entsprechende Auslegung des PDMS-Stempels auf das Design der jeweils zu funktionalisierenden Mikrokelchchips abgestimmt. In den Abbildungen 4.11(a) bis (f) ist das Herstellungsverfahren exemplarisch für einen Tintentypus dargestellt. Der Schreibprozess sowie der anschließende Stempelprozess auf die Mikrokelche erfolgt unter Einsatz eines kommerziellen DPN-Systems NLP 2000 (Nanoink Inc.) und wird über eine eingebaute CCD Kamera visuell gesteuert. Der PDMS-Stempel ist hierbei kopfüber an einem selbstgebauten unbeweglichen Halter fixiert und verfügt im vorliegenden Fall über eine quadratische Matrix an äquidistanten Schreibspitzen. Das Substrat mit den Tintenreservoirs und der als Stempelkissen

intendierte Objektträger befinden sich darunter auf der Plattform eines fünfsichtigen motorisierten Probenstisches, der über eine Computersoftware bedient wird. Die Anordnung ist, wie beim DPN 5000-System aus Kapitel 4.1, innerhalb einer geschlossenen Klimakammer lokalisiert. Die Luftfeuchte wird über ein beheizbares Wasserbad mit integriertem Stickstoffgebläse eingestellt, über eine integrierte Heizung kann zudem die Kammer temperiert werden. Die Realisierung der Tintenreservoirs erfolgt analog zum Herstellungsverfahren eines Stempelkissens für Transfermethode A, indem ein Glasträger großflächig mit den benötigten Phospholipidtinten beschichtet wird. Der PDMS-Stempel wird quadrantenweise nacheinander bei Raumtemperatur und 70 % relativer Feuchte in die jeweilige Tinte eingetaucht. Mit dieser Vorgehensweise können bis zu vier unterschiedliche Tinten auf einen Stempel gebracht werden. Über Austarieren des Probenstisches wird sichergestellt, dass alle Schreibspitzen gleichermaßen in die Tinte eingetaucht werden. Nach einer Haltezeit von etwa einer Minute werden die Spitzen von der Tinte separiert. Anschließend wird das Zentrum des Objektträgers angefahren. Durch Austarieren des Probenstisches wird erneut ein homogener Kontakt zwischen Objektträger und Schreibspitzen hergestellt. Der Probenstisch wird nun bei Raumtemperatur und 50 bis 60 % relativer Feuchte mäanderförmig zum Stempel bewegt, sodass auf dem Glasträger quadratische Phospholipidfelder in periodischer Anordnung entstehen. Durch mehrmaliges Ausrichten der verschiedenen Stempelquadranten werden auf diese Weise ineinander verschachtelte Netzwerke aus gleichförmigen Tintenfeldern geschrieben. Das in Abbildung 4.11(g) schematisierte fertig gestellte Multiplex-Stempelkissen weist drei unterschiedliche Tintensorten auf, repräsentativ für die in den späteren Fluoreszenzexperimenten verwendeten Kissen. Die Periodizität der Tintenfelder beträgt hierbei die Hälfte der der Schreibspitzen des PDMS-Stempels. In Abbildung 4.12 ist der gesamte Prozess in in-situ Bildern dargestellt. Die Periodizität der auf dem Stempel lokalisierten Schreibspitzen beträgt 200 μm , sodass die finale dicht gepackte verschachtelte Matrix aus Tintenflächen eine Periodik von 100 μm aufweist. Dies entspricht dem Mitte-zu-Mitte-Abstand der Mikrokelche in den späteren Experimenten.

Die molekularen Zusammensetzungen der in den einzelnen Experimenten verwendeten Tinten werden in den betreffenden Textpassagen im Detail beschrieben.

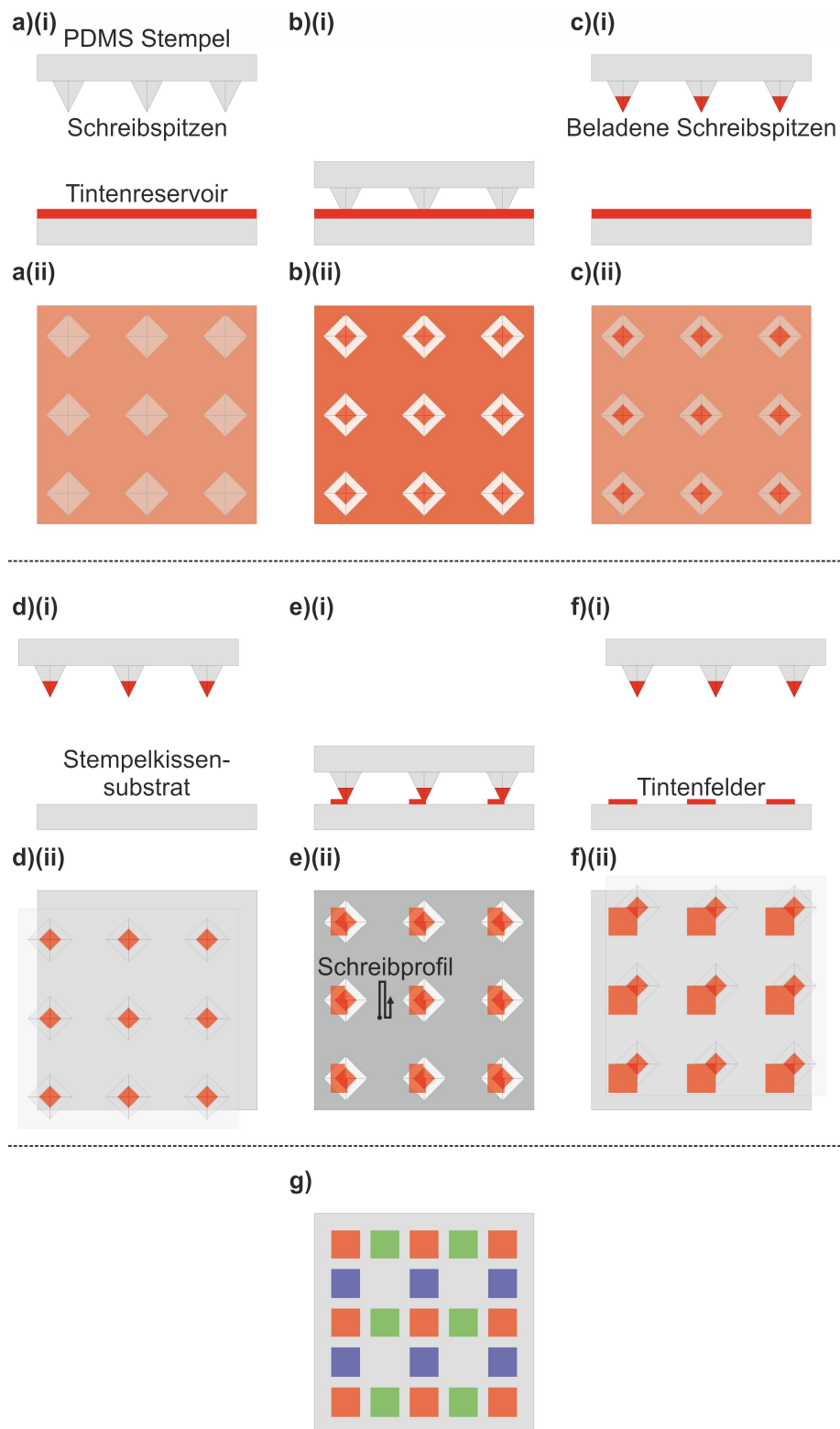


Abbildung 4.11: Schematische Darstellung der Herstellung des AuCS-Multiplex-Stempelkissens mittels PPL, exemplarisch für einen Phospholipidtypus. Die Elemente (i) und (ii) zeigen respektive die seitliche Ansicht sowie die Draufsicht durch den PDMS-Stempel – entsprechend der in-situ Visualisierung mit der CCD-Kamera der NLP-Maschine (vgl. Abbildung 4.12). (a), (b) und (c) Beladung der PDMS-Schreibspitzen. Die Spitzen eines Stempelquadranten werden hierbei in die ausgewählte Tinte, welche sich als Reservoir auf einem Glassubstrat befindet, getaucht und nach einer definierten Haltezeit wieder von der Tinte separiert. (d), (e) und (f) Herstellung der Lipidfelder auf dem als Stempelkissen intendierten Glassubstrat. (g) Fertiges Stempelkissen, beschichtet mit drei unterschiedlichen Lipidfarbstoffen in verschachtelter Konfiguration.

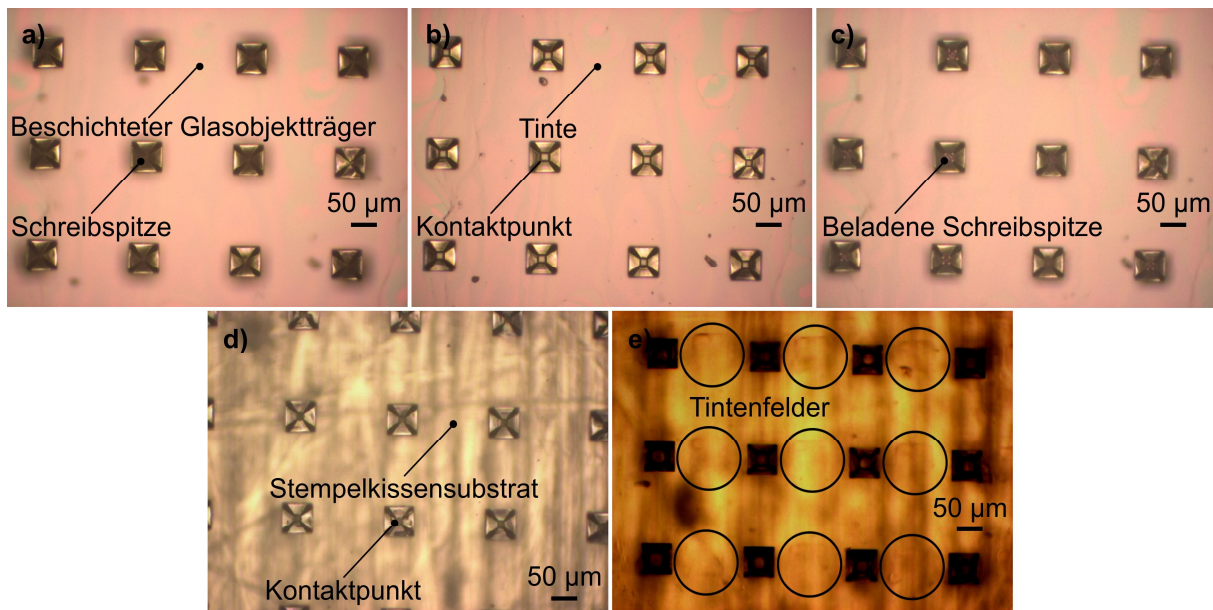


Abbildung 4.12: Beladung des PDMS-Stempels und PPL-Schreibvorgang in der in-situ Visualisierung. Die Beobachtung des gesamten Prozesses erfolgt hierbei von oben durch den PDMS-Stempel hindurch. (a) Situation direkt vor der Tintenbeladung. Der PDMS-Stempel befindet sich in unmittelbarer Nähe zum Tintenreservoir. Die Schreibspitzen befinden sich nicht in Kontakt mit der Substratoberfläche und erscheinen deshalb dunkel. (b) Die Schreibspitzen des PDMS-Stempels sind in die Lipidintinte eingetaucht, was sich durch eine Farbveränderung äußert (Schreibspitzen erscheinen heller. Kontaktpunkte an den Spitzeneenden werden sichtbar). (c) Situation nach der Beladung. Die Spitzen sind nun sichtbar mit Tinte benetzt. (d) Anschließend werden die beladenen Schreibspitzen mit dem als μ CS-Stempelkissen intendierten Glassubstrat in Kontakt gebracht. Durch eine mäanderförmige Schreibbewegung entstehen periodisch angeordnete Tintenfelder. Das Schreibresultat ist in (e) dargestellt. Die Tintenfelder sind als dünne quadratische Filme erkennbar (innerhalb der kreisförmigen Markierungen).

Justiertes Mikrokontaktstempeln

Beim μ CS befindet sich anstelle des PDMS-Stempels das jeweilige Stempelkissen kopfüber eingebaut im DPN-System. Vor der eigentlichen Beschichtung wird anhand eines Testchips mit einem großflächigen Feld von Mikrokelchen die Probenoberfläche planparallel zum Stempelkissen ausgerichtet. Durch wiederholtes In-Kontakt-Fahren der Kelche mit den Tintebereichen und anschließender Feinjustage des Probenstückes wird ein großflächig homogener physikalischer Kontakt hergestellt. Die Justage erfolgt hierbei manuell über die Bedienoberfläche der Computersoftware und wird rein visuell gesteuert. Homogener Kontakt äußert sich durch eine gleichförmige Farbveränderung aller Kelchränder beim Eintauchen in die Tinten. Nach der Justage wird der Chip mit den zu beschichtenden Mikrokelchen auf dem Probenstück positioniert.

Bei Transferstrategie A (Abbildung 4.13) entfällt, bedingt durch die Homogenität der Lipidschicht, die laterale Probenpositionierung. Zur homogenen Beschichtung aller Mikrokelche wird der Probenstück schrittweise mit abnehmenden Streckenintervallen dem Stempelkissen angenähert, bis sich alle Kelche in Kontakt mit der Tinte befinden. Ein homogener Kontakt äußert sich abermals durch eine gleichmäßige Farbveränderung aller Kelche entlang ihres Umfangs. Der Prozess findet bei Raumtemperatur und 50 bis 60 % relativer Feuchte statt. Für einen zerstörungsfreien Beschichtungsvorgang ist darauf zu achten, dass die Kelche lediglich in die multilagige Phospholipidschicht eintauchen, hierbei jedoch nicht das darunter liegende Glassubstrat berühren. Nach einer Haltezeit von zehn bis 20 Sekunden werden die Kelche vom Stempelkissen getrennt. Strategie A wird in dieser Arbeit zur Charakterisierung der Lasingeigenschaften beschichteter Kelchlasers verwendet. Abbildung 4.14 zeigt in-situ Bilder während der Beschichtung.

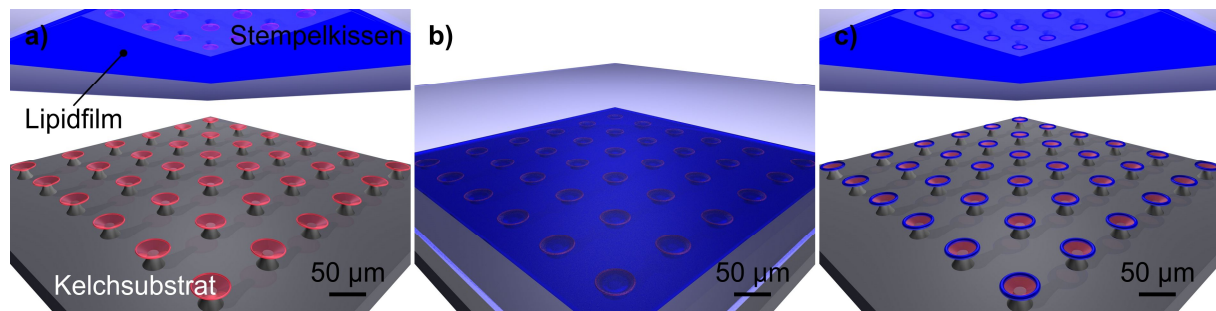


Abbildung 4.13: Illustration des justierten Mikrokontaktstempels nach Transfermethode A. Durch den Einsatz eines Stempelkissens mit homogener Lipidlage lassen sich mit dieser Methode großflächig Mikroresonatoren mit demselben Tintentypus funktionalisieren. (a) Situation vor der Beschichtung. Das Stempelkissen wird zu den zu beschichtenden Mikrokelchen ausgerichtet. (b) Das Stempelkissen wird schrittweise an die Mikrokelche angenähert. Kontakt mit den Kelchen entsteht hierbei ausschließlich mit der Lipidlage des Stempelkissens, nicht jedoch mit dem Glassubstrat. Der Kontakt mit der Lipidlage äußert sich als Farbveränderung entlang der Resonatorränder. (c) Situation nach der Beschichtung. Die Ränder der Mikrokelche sind mit der Lipidtinte funktionalisiert. Die in-situ Beobachtung des gesamten Prozesses erfolgt hierbei von oben durch das transparente Stempelkissen hindurch.

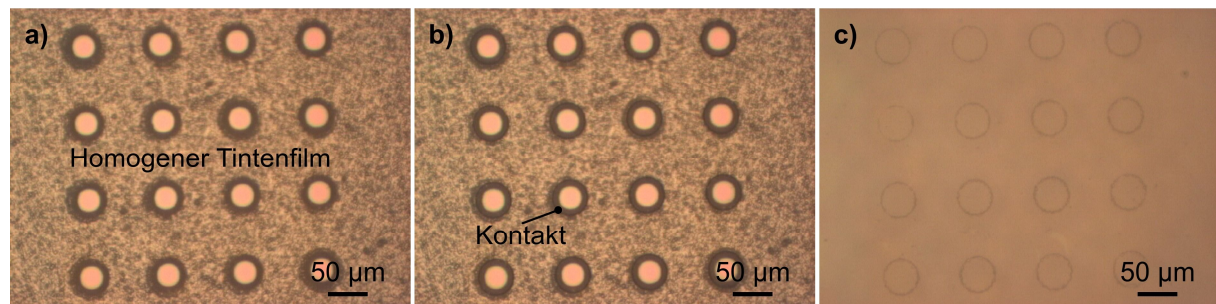


Abbildung 4.14: In-situ Visualisierung des justierten Mikrokontaktstempels an einem 4x4-Mikrokelchfeld nach Transfermethode A. (a) Situation vor der Beschichtung. Das homogen mit Lipidtinte beschichtete Stempelkissen befindet sich in unmittelbarer Nähe zu den Mikrokelchen. Die Resonatorsockel sind als helle Kreise zu erkennen. (b) Durch den Kontakt mit der Lipidtinte heben sich die in die Tinte immernierten Resonatorränder dunkel hervor. (c) Nach der Funktionalisierung der Mikrokelche sind die Kontaktstellen als kreisförmige Strukturen in der Lipidlage zu erkennen. Diese können durch kurzzeitige Erhöhung der Luftfeuchte in der Klimakammer ausgeheilt werden, sodass dasselbe Stempelkissenareal mehrfach wiederverwendet werden kann.

Da das Stempelkissen im Rahmen von Transferstrategie B (Abbildungen 4.15(a) bis (c)) lateral begrenzte Tintenbereiche aufweist, erfolgt die Probenjustage hier in alle drei Raumrichtungen, um die Mikrokelche und Tintenflächen deckungsgleich zueinander auszurichten. Nach Planparallelisierung des Probenstückes analog wie in Strategie A erfolgt auch hier die Beschichtung der Kelche durch schrittweises Annähern des Kelchchips an das Stempelkissen bei Raumtemperatur und einer relativen Feuchte von 50 bis 60 %. Transfermethode B kann alternativ auch unter Einsatz eines Stempelkissens stattfinden, bei welchem die einzelnen Tinten nicht ineinander verschachtelt vorliegen, sondern auf separaten Flächen lokalisiert sind (Transferstrategie BII) (Abbildungen 4.16(a) bis (e)). Während sich hierdurch die Anzahl der Annäherungen zum Beschichten der jeweiligen Kelche proportional zu den verwendeten Tinten erhöht, ist die Herstellung derartiger Stempelkissen jedoch ohne größeren Justageaufwand möglich. Des Weiteren ist mit getrennten Tintenarrays eine höhere Flexibilität gegeben. So können mit dem auf einem einzigen Stempelkissen vorhandenen Tintensammelsorium flexibel Beschichtungen in unterschiedlichen Konfigurationen und Mustern realisiert werden, ohne hierfür jeweils ein neues Kissen herstellen zu müssen. Ist eine rapide Oberflächenfunktionalisierung im Rahmen eines Massenherstellungsverfahrens intendiert, so ist potentiell der Ansatz über das verschachtelte Stempelkissen vorzuziehen. In beiden Fällen beträgt die Haltezeit pro Tintentransfer zehn bis 20 Sekunden.

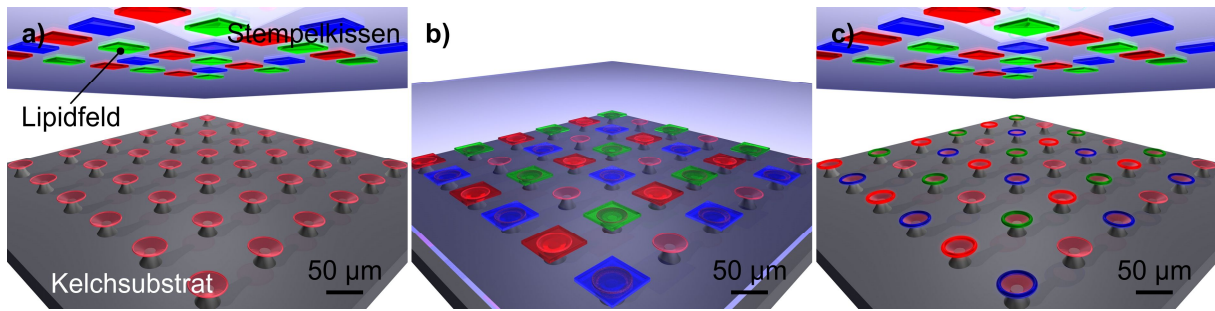


Abbildung 4.15: Illustration des justierten Mikrokontaktstempels nach Transfermethode B. Im angeführten Ansatz kommt ein Multiplex-Stempelkissen mit verschachtelter Anordnung der Lipidtintenfelder zum Einsatz, wodurch mit einem einzigen Inkontaktfahren alle beteiligten Mikrokelche in der durch das Stempelkissen fix vorgegebenen Konfiguration mit den unterschiedlichen Lipidmixturen versehen werden. (a) Situation vor der Beschichtung. Die Lipidfelder des Stempelkissens werden zu den Mikrokelchen ausgerichtet. (b) Anschließend wird das Kissen durch schrittweise Verringerung des Abstandes mit den Kelchen in Kontakt gebracht. Der Kontakt ausschließlich mit den Lipidfeldern äußert sich erneut als Farbveränderung entlang der Resonatorränder. (c) Situation nach der Beschichtung. Die Ränder der Mikrokelche sind nun in periodischer Wiederholung mit drei unterschiedlichen Lipidtinten funktionalisiert. Pro 2x2-Einheit zelle ist jeweils ein Kelch nicht mit Tinte funktionalisiert. Dieser kann im Rahmen von biomolekularen Detektionsexperimenten als Referenzensorelement dienen. Die in-situ Beobachtung des gesamten Prozesses erfolgt von oben durch das transparente Stempelkissen hindurch.

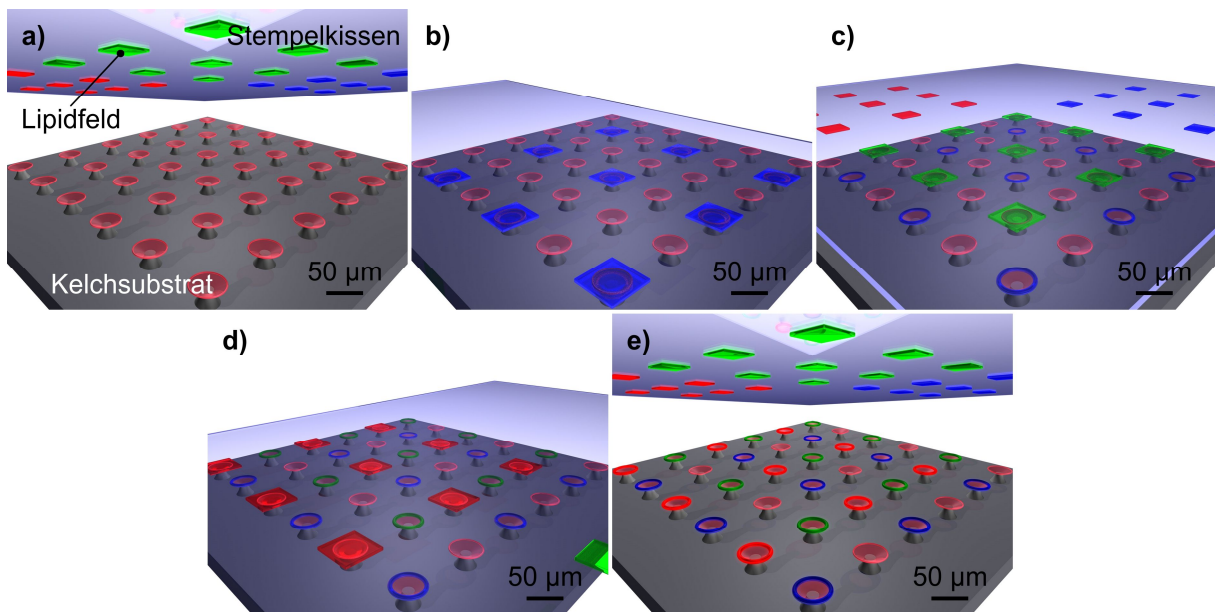


Abbildung 4.16: Illustration des justierten Mikrokontaktstempels nach Transfermethode BII. In diesem Ansatz kommt ein Multiplex-Stempelkissen mit räumlich voneinander separierten Lipidtintenfeldern zum Einsatz. Durch mehrmaliges Inkontaktfahren werden die jeweilig adressierten Mikrokelche hintereinander mit den unterschiedlichen Lipidmixturen versehen. Bedingt durch die sequentielle Natur des Prozesses lassen sich die Mikrokelche flexibel in unterschiedlichen Konfigurationen funktionalisieren. (a) Situation vor der Beschichtung. (b), (c) und (d) Nachdem die jeweiligen Lipidfelder einer Tintensorte des Stempelkissens zu den Mikrokelchen ausgerichtet wurden wird das Kissen durch schrittweise Verringerung des Abstandes mit den Kelchen in Kontakt gebracht. Der ausschließliche Kontakt mit den jeweiligen Lipidfeldern äußert sich erneut als Farbveränderung entlang der Resonatorränder. (e) Situation nach der Beschichtung. Die Ränder der Mikrokelche sind nun in periodischer Wiederholung mit drei unterschiedlichen Lipidtinten funktionalisiert. Die realisierte Tintenkonfiguration entspricht hier der aus Abbildung 4.15. Die in-situ Beobachtung des gesamten Prozesses erfolgt von oben durch das transparente Stempelkissen hindurch.

Die parallele Beschichtung von Mikrokelchen mit verschiedenen Phospholipidtinten unter Anwendung von Transfermethode B/BII wird im Folgenden anhand von Fluoreszenzexperimenten an passiven Mikrokelchen demonstriert. Hierzu wurden Stempelkissen gemäß Abbildung 4.11 hergestellt, mit drei fluoreszenten Tinten entweder in verschachtelter oder räumlich separierter Anordnung. Neben dem bereits bekannten Trägerlipid DOPC und dem rot fluoreszierenden Liss Rhod PE kommen des Weiteren 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(carboxyfluorescein) (CF PE) und 1,2-

dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(5-dimethylamino-1-naphthalenesulfonyl) (Dansyl PE) zum Einsatz (molekulare Struktur vgl. Abbildung 4.2). Das Liss Rhod PE, CF PE und Dansyl PE liegen in DOPC in den jeweiligen molaren Verhältnissen 6:9.994, 75:9.925 und 85:9.915 gemischt vor, um respektive eine rote, grüne und blaue Fluoreszenztinte zu erhalten. Fertig gestellte Multiplex-Stempelkissen in beiden Variationen sind in Abbildung 4.17 zu sehen. Die Periodizität zweier gleichfarbiger Tintenflächen ist in beiden Fällen 200 μm .

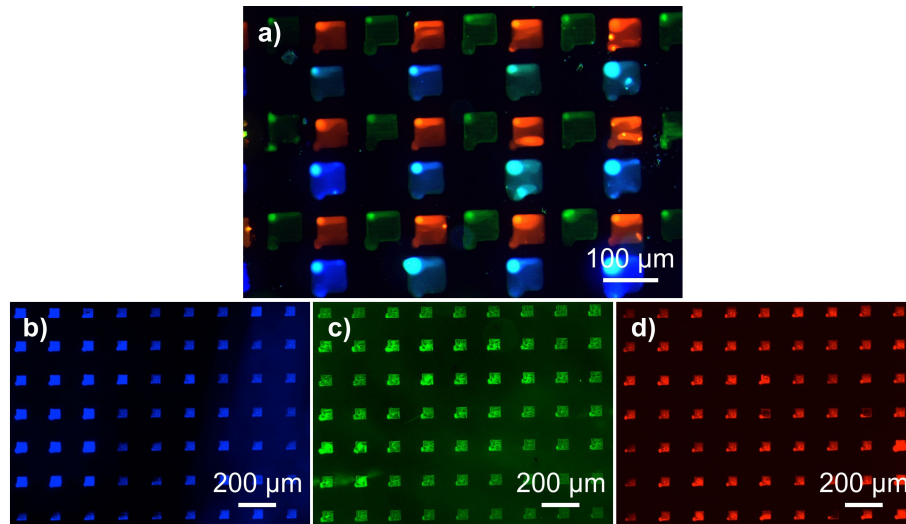


Abbildung 4.17: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von hergestellten Stempelkissen für das Mikrokontaktstempeln nach Transfermethode B. (a) 3-Kanal-Bild eines Multiplex-Stempelkissens mit Lipidfeldern in verschachtelter Anordnung, gemäß des Beschichtungsansatzes B aus Abbildung 4.15. (b), (c) und (d) Fluoreszenzaufnahmen eines Stempelkissens gemäß Beschichtungsansatz BII aus Abbildung 4.16. Hier sind die einzelnen Lipidfelder auf räumlich getrennten Arealen des Kissens lokalisiert. Für beide Stempeltypen kamen dieselben Lipidintinten mit denselben fluoreszenten Kopfgruppen zum Einsatz: Dansyl für blaue, Fluorescein für grüne und Rhodamin B für rote Fluoreszenz.

In-situ Aufnahmen der Multiplex-Bestempelung von Mikrokelchen sind in Abbildung 4.18 dargestellt. Im Rahmen der Demonstration des Stempelverfahrens wurden sowohl 1D- als auch 2D-Mikrokelchfelder nach Transfermethode B/BII beschichtet. Die beschichteten Felder weisen hierbei eine Periode von 100 μm auf, sodass jeweils jeder zweite Kelch mit demselben Tintentypus beschichtet wird, unabhängig davon welche Stempelkissenart eingesetzt wird.

Abbildung 4.19 zeigt das typische Beschichtungsergebnis von 1D- und 2D-Mikrokelchfeldern mit dem verschachtelten Stempelkissen nach Abbildung 4.18(a). Das 1D-Feld wurde durch Anwendung dieses Stempelkissens in alternierender Reihenfolge mit der roten und der blauen Tinte beschichtet. Weitere mögliche Konfigurationen mit diesem Kissen wären rot/grün, grün/unbeschichtet sowie blau/unbeschichtet. Die einzig mögliche Tintenkonfiguration mit diesem Stempelkissen auf dem 2D-Feld lässt sich in 2x2 Einheitszellen unterteilen. Während drei Kelche mit den jeweils unterschiedlichen Tinten belegt sind, weist der vierte Kelch der Einheitszelle gewollt keinerlei Funktionalisierung auf. Dieser Kelch kann in einem molekularen Detektionsexperiment gezielt als Referenzelement eingesetzt werden, beispielsweise um Sensorsignale aufgrund von nichtspezifischer Molekülabsorption oder Temperaturveränderungen zu ermitteln. Die klar voneinander getrennten Fluoreszenzsignale belegen, dass keine wechselseitige Kontamination der verschiedenen Funktionalisierungen stattgefunden hat. Eine versehentliche Fusion der verschiedenen Tinten sowohl während der Beschichtung als auch der Stempelkissenfabrikation kann somit ausgeschlossen werden. Aus den hochauflösenden Aufnahmen in den Abbildungen 4.19(b) und (d) geht zudem hervor, dass auch mit AuCS analog zum DPN-Verfahren aus Kapitel 4.1 lediglich die lichtführenden Ränder der Kelche mit Lipidintinten bedeckt werden – die Stellen, an denen eine molekulare Interaktion in einem biosensorischen Detektionsexperiment in einem messbaren Sensorsignal resultiert. Solange der Kontakt der Mikrokelche während des Stempeltransfers auf die Tintenlagen beschränkt bleibt und ein Anfahren des Glasträgers vermieden wird, werden die

Mikrokelche nicht beschädigt. Beide Aussagen werden durch Inspektion mit dem Rasterelektronenmikroskop visuell belegt (Abbildung 4.20).

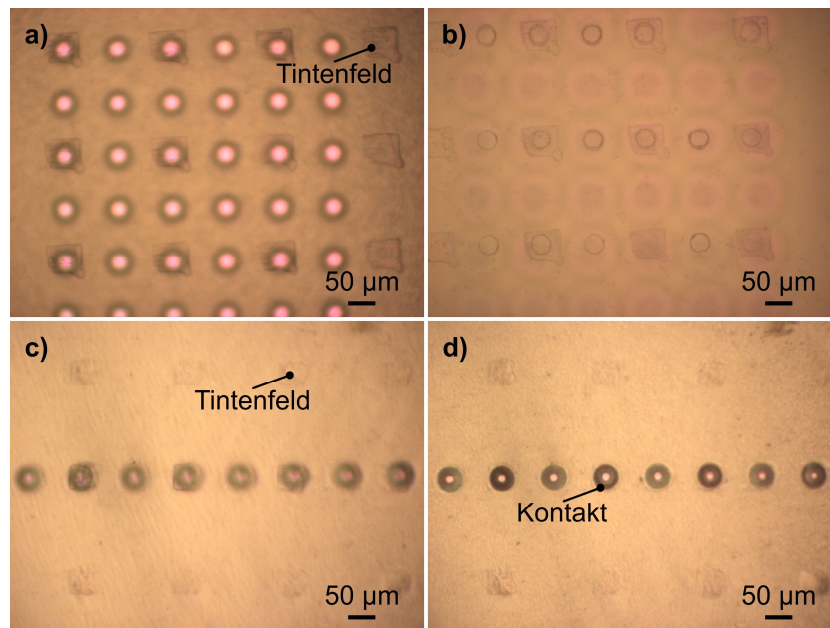


Abbildung 4.18: In-situ Ansicht des justierten Mikrokontaktstempels nach Transfermethode BII. (a) und (b) Beschichtung eines 6x6-Mikrokelchfeldes. (a) Situation während der Beschichtung. Stempelkissen und Kelche befinden sich in Kontakt. (b) Situation nach der Stempelkissen- und Kelchseparation. Neben den ringförmigen Kontaktmalen innerhalb der genutzten Lipidfelder sind weitere Male auf den unbeschichteten Stellen des Stempelkissens zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass die an den jeweiligen Stellen lokalisierten Kelche bereits durch einen vorangegangenen Transfer mit Tinte beschichtet wurden. Die Mikrokelche sind noch als unscharfe Kreise im Hintergrund zu erkennen. (c) und (d) Beschichtung einer Zeile von Mikrokelchen. (c) Situation unmittelbar vor dem Kontakt zwischen Stempelkissen und Kelchen. (d) Stempelkissen und Kelche befinden sich in Kontakt.

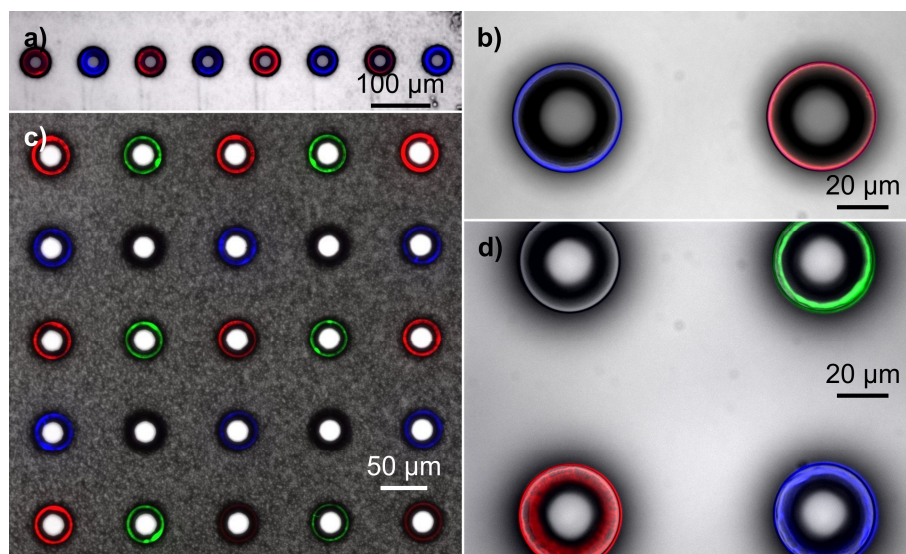


Abbildung 4.19: Mehrkanal-Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von AuCS-funktionalisierten Mikrokelchen, beschichtet nach Transfermethode B/BII. (a,b) Zeile von Mikrokelchen, beschichtet mit der blau und der rot fluoreszierenden Lipidfarbe. (c,d) 5x5-Mikrokelchfeld, beschichtet mit drei unterschiedlichen Lipidfarben. Exemplarisch ist pro 2x2-Einheitszelle jeweils ein Kelch nicht mit Tinte funktionalisiert, sodass dieser in einem biomolekularen Detektionsexperiment als Referenzsensorelement dienen kann.

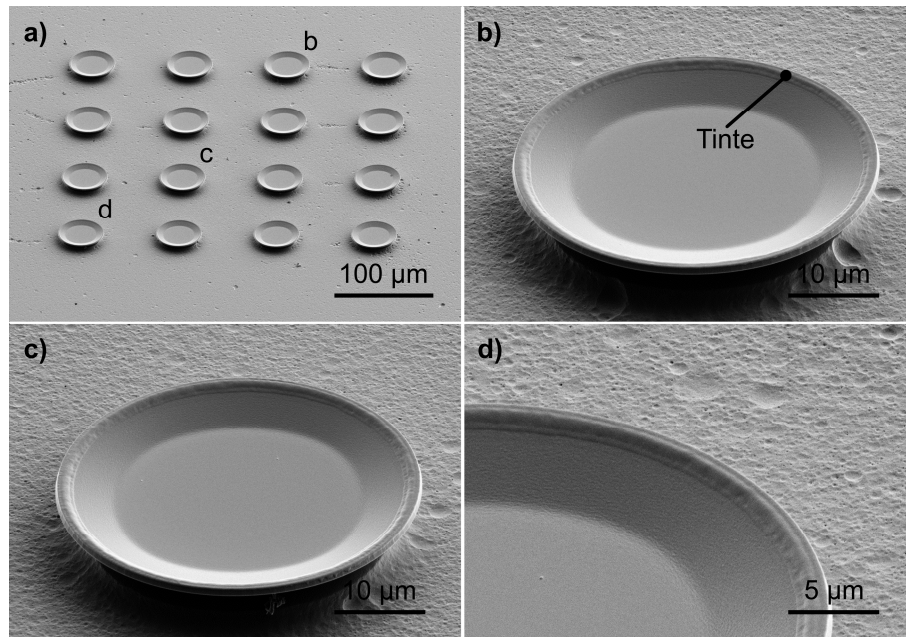


Abbildung 4.20: REM-Aufnahme eines nach Transfermethode A funktionalisierten 4x4-Mikrokelchfeldes. (a) Übersichtsbild. (b) und (c) Hochauflösende Nahaufnahmen zweier willkürlich aus (a) ausgewählter Mikrokelche. (d) Hochauflösende Nahaufnahme des Resonatorrandes eines dritten aus (a) ausgewählten Mikrokelches. Das Beschichtungsergebnis ist auf allen Kelchen visuell nahezu identisch. Die Lipidintinten sind jeweils entlang des Resonatorumfangs lokalisiert. Die Geometrie der Kelche wurde durch den Stempeltransfer nicht messbar beeinträchtigt.

Während mit dem verschachtelten Stempel nach Transfermethode B eine definierte Tintenkonfiguration sehr schnell in einem einzigen Arbeitsschritt repliziert werden kann, können Stempelkissen mit räumlich getrennten Phospholipidfeldern nach Methode BII flexibel zur Realisierung unterschiedlicher Funktionalisierungsmuster verwendet werden. Abbildung 4.21 zeigt zwei unterschiedliche Funktionalisierungskonfigurationen realisiert auf 6x6 Mikrokelchfeldern. Unter Verwendung der grünen und roten Tintenarrays wurden beispielhaft ein Schachbrett- und ein Zeilenmuster realisiert, jeweils durch viermaliges Inkontaktfahren des Stempelkissens.

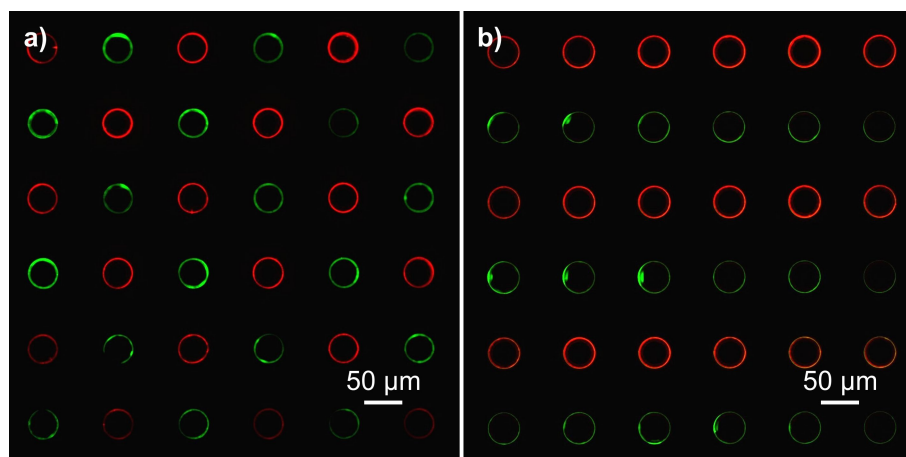


Abbildung 4.21: Zwei nach Transfermethode BII funktionalisierte Mikrokelchfelder unter Einsatz eines Stempelkissens mit räumlich getrennten Lipidintinenfeldern. Durch die räumliche Trennung der Lipidfelder lassen sich Sensorelemente in unterschiedlichen Konfigurationen funktionalisieren. (a) Schachbrettmuster. (b) Zeilenmuster.

Um einen messtechnischen Rückschluss auf den Einfluss des Stempeltransfers auf die Kelchstrukturen zu gewinnen, wurden PM 597-dotierte Mikrokelchlasers, angeordnet in einem 4x4-Feld, homogen mit einer Phospholipidtinte nach Transfermethode A beschichtet und die Laserswellen vor und nach

dem μ CS-Depositionsprozess charakterisiert (Abbildung 4.22). Für die Beschichtung wurde die Dansyl-markierte Tinte gewählt, da diese eine Visualisierung der Tintendistribution erlaubt ohne negativen Einfluss auf die Laserswellenmessung aufgrund parasitärer Absorption des Pump lasers zu nehmen. Die Laserschwelle der unbeschichteten Mikrokelchlasers ist im Mittel $0,48 \pm 0,08$ nJ pro Pump laserpuls. Die 16 %-ige Abweichung ergibt sich zum einen aus Schwankungen in der Pump laserleistung während der Charakterisierungssitzung und zum anderen aus statistischen Ungenauigkeiten der manuellen Pump spotpositionierung. Nach der Bestempelung steigt die Laserschwelle im Durchschnitt um 136 % auf einen Wert zwischen 0,87 und 1,63 nJ/Puls an (Abbildung 4.22(a)), da die in den Kelchstrukturen umlaufenden Lasermoden durch den im Vergleich zu Luft nun erhöhten angrenzenden Brechungsindex aus dem aktiven Resonatorvolumen gezogen werden. Die statistische Schwankung der Laserswellen ist einmal mehr auf die obig erläuterten Gründe zurückzuführen und des Weiteren auch der Tatsache geschuldet, dass die Lipidlagen auf den Mikrokelchen bei Luftfeuchteschwankungen zu einem gewissen Grad Vesikel ausbilden können, die als statistische Streuzentren für die WGMs fungieren. Eine Beschädigung bzw. Deformierung der Mikrokelche durch den Stempelvorgang kann aufgrund der moderaten Erhöhung der Laserswellen ausgeschlossen werden. Eine versehentliche Berührung mit dem Glassubstrat resultiert zumeist in einer sichtbaren Beschädigung der Kelche, wodurch deren Bauteilfunktionalität nicht mehr gegeben ist (Abbildung 4.23).

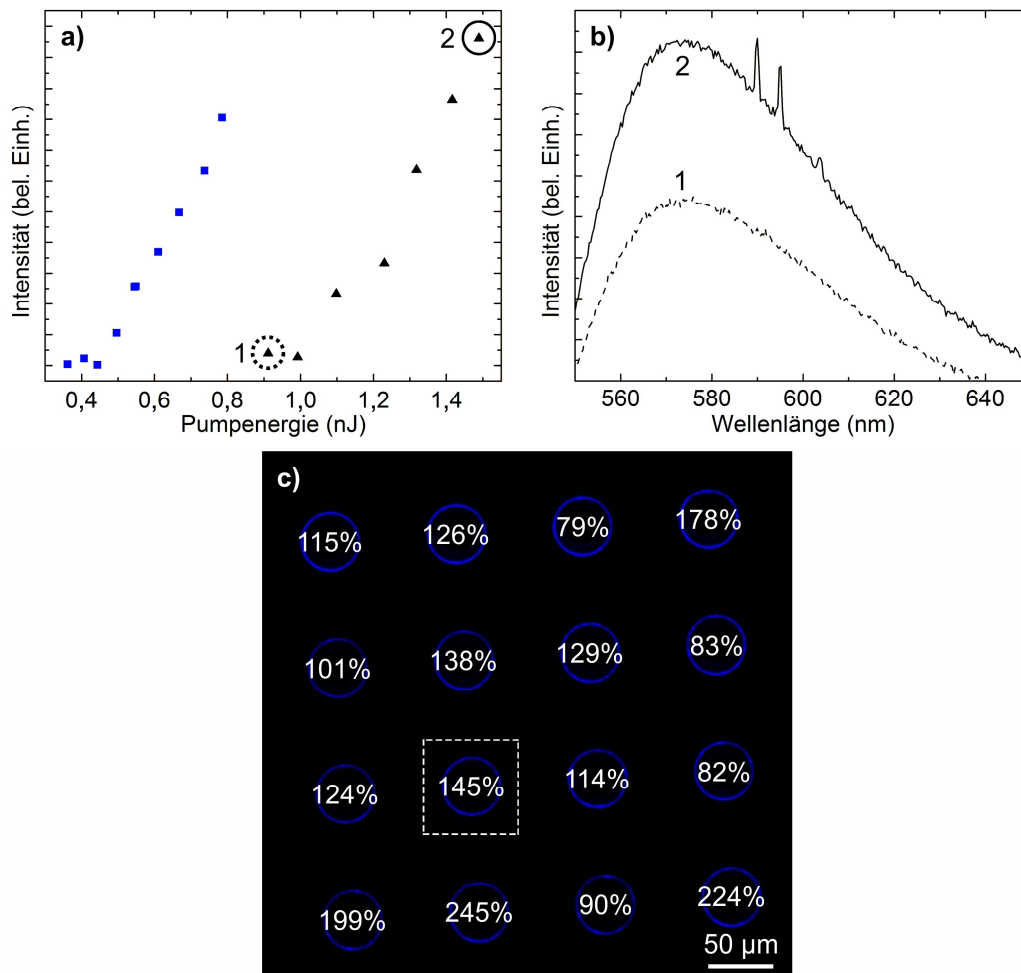


Abbildung 4.22: Lasingeigenschaften per μ CS funktionalisierter Mikrokelchlasers. (a) Laserkennlinie eines Mikrokelchlasers vor (blaue Quadrate) und nach (schwarze Dreiecke) der Funktionalisierung. Exemplarisch betrachtet wird hier der in (c) hervorgehobene Laser. Durch die Lipidtintenbeschichtung kommt es aufgrund eines geringeren Überlapps der umlaufenden Lasermoden mit dem farbstoffdotierten Resonatormaterial zu einer geringfügigen Erhöhung der Laserschwelle. (b) Emissionsspektrum des in (a) dargestellten Mikrolasers bei den dort hervorgehobenen Pumpenergien. (c) Fluoreszenzmikroskopaufnahme eines per Transfermethode A funktionalisierten 4x4-Mikrokelchlasersfeldes und die jeweils zugehörigen prozentualen Erhöhungen der Laserswellen der einzelnen Laser nach dem μ CS im Vergleich zur Schwelle davor. Die Laserkennlinien des hier markierten Kelchs sind in (a) dargestellt. Die Aufnahme der Lipidtinte erfolgte im blauen Fluoreszenzkanal.

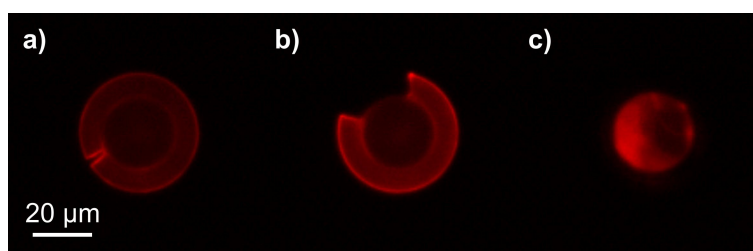


Abbildung 4.23: Typische Beschädigungen an den Mikroresonatoren durch physikalischen Kontakt mit der Glasoberfläche des Stempelkissens. (a) Sprung im Resonatorrand, (b) Teilweises Ablösen des Resonatorrandes, (c) Komplettes Ablösen des Resonators.

4.2.2 μ CS-funktionalisierte Mikrokelche als Biosensoren

Die Funktionalität der per μ CS funktionalisierten Mikrokelche als Biosensoren wird nun zum einen messtechnisch im optischen Charakterisierungsaufbau und zum anderen visuell am Fluoreszenzmikroskop demonstriert. Während das messtechnische Experiment einen genauen Einblick in die Sensorsignalverläufe bietet, kann mit der visuellen Untersuchung zudem eine selektive Molekülanbindung an die unterschiedlich funktionalisierten Mikrokelche sowie ein parallelisierter Detektionsansatz demonstriert werden.

Im Rahmen des visuellen Fluoreszenzexperimentes kommt eine Biotin-Tinte bestehend aus 4 mol-% Biotin Cap PE in DOPC sowie eine weitere Tinte bestehend aus 25 mol-% 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3- $\{[N(5\text{-amino-1-carboxypentyl})\text{iminodiacetic acid}]\text{succinyl}\}$ (DOGS NTA Ni) in DOPC (Ni-Chelat-Tinte) zum Einsatz. Die beiden Tinten wurden mit Transfermethode BII in alternierender Reihenfolge auf eine 1D-Zeile aus passiven Mikrokelchen gebracht. Bei DOGS NTA Ni handelt es sich um ein Lipid, welches Ni-Chelat als Kopfgruppe aufweist, zur selektiven Anbindung von Histidin- (His) markierten Molekülen. Diese Bindung ist reversibel. Die His-markierten Moleküle können auf fluidischem Weg kontrolliert wieder vom Ni-Chelat abgelöst werden. In Kapitel 4.3 wird dieser Effekt gezielt genutzt, um derartig funktionalisierte Mikrokelche nach erfolgter molekularer Detektionsaufgabe chemisch zu rekonfigurieren und sie so für weitere Detektionsaufgaben verfügbar zu machen. Nach 20-minütigem Blocken der Kelche in einer 1 %-igen BSA-Lösung wurden die Kelche sequentiell für jeweils zehn Minuten zuerst in Cy3-markiertem Streptavidin und anschließend in His-markiertem GFP (grün fluoreszierendes Protein) inkubiert. Aus dem in Abbildung 4.24 dargestellten Ergebnis geht hervor, dass das His-GFP und das Cy3-Streptavidin selektiv an ihre respektiven Mikrokelche ankoppeln. Beide Proteine sind bedingt durch die lokalisierte Tintenbeschichtung erneut ausschließlich entlang der Resonatorränder lokalisiert. Neben den bereits in den Abbildungen 4.19 bis 4.21 gezeigten Beschichtungsergebnissen macht das in Abbildung 4.24 dargestellte Detektionsexperiment nochmals den parallelen Ansatz von μ CS deutlich: Mit diesem Verfahren lassen sich die auf einem Chipsubstrat vorhandenen Sensorstrukturen in wenigen Prozessschritten gezielt und selektiv gemeinsam funktionalisieren, um sie im Anschluss zur parallelen Detektion unterschiedlicher Moleküle einzusetzen.

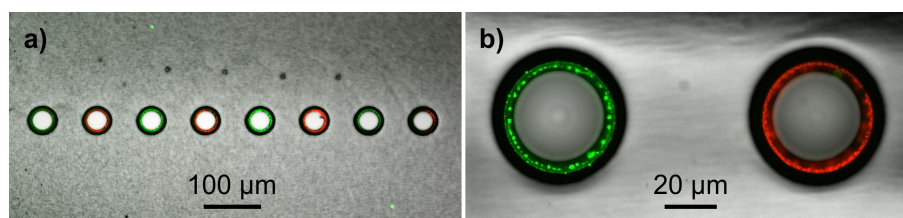


Abbildung 4.24: Fluoreszenzexperiment an passiven Mikrokelchen zur visuellen Verifizierung der selektiven molekularen Detektionseigenschaften. Die Mikrokelche wurden nach Transfermethode BII funktionalisiert. Die Abbildungen zeigen die Situation nach der Anbindung von His-GFP (grüne Fluoreszenz) und Cy3-Streptavidin (rote Fluoreszenz). Die spektral deutlich voneinander separierten Fluoreszenzsignale belegen, dass die beiden Moleküle ausschließlich an die jeweils auf sie funktional ausgerichteten Mikrokelche angebonden haben. Das Ergebnis macht zudem deutlich, dass die auf demselben Chipsubstrat lokalisierten Sensorelemente zum einen nicht nur gemeinsam funktionalisiert sondern darüber hinaus auch parallel zur Detektion unterschiedlicher Moleküle verwendet werden können. Deutlich ist hierbei die bereits in Kapitel 4.1.3 erörterte Vesikelbildung zu erkennen, welche durch die Anlagerung der zu detektierenden Moleküle entsteht.

Wie bei den DPN-Experimenten in Kapitel 4.1.3 kommt auch bei der messtechnischen Demonstration der $A\mu$ CS-funktionalisierten Mikrokelchlasers die Biotin-Tinte bestehend aus 4 mol-% Biotin Cap PE in DOPC (diesmal ohne Lasingkomponente) zum Einsatz. Diese wird mit Transfermethode A auf aktive Mikrokelchlasers aufgebracht. Das Versuchsziel lag hier in der messtechnischen Detektion eines Antikörpers, der gegen ein auf den Lasern immobilisiertes Antigen gerichtet ist. Als Antigen dient 2,4-Dinitrophenol (DNP), welches in einem mehrstufigen Inkubationsexperiment mittels eines Biotinankers über Streptavidin als Mediator an die biotinylierten Kelche angebunden wird. Das auf Zellen toxisch wirkende DNP findet breite Anwendung beispielsweise bei der Herstellung von Farbstoffen, photographischen Entwicklerlösungen und Insektiziden.²⁰² Abbildung 4.25(a) zeigt die temporale spektrale Verschiebung der Lasermoden eines Kelchlasers während des gesamten Detektionsexperimentes. Auffällig ist, dass lediglich bei Vorhandensein von DNP die Antikörperexposition zu einem bindungsspezifischen Sensorsignal führt (Abbildung 4.25(b)). Die Funktionalität der per Stempelbeschichtung realisierten Oberflächenfunktionalisierung ist somit eindeutig belegt. Aus einem anderen Blickwinkel betrachtet demonstriert dieses Experiment gleichzeitig, dass auch Zweischritt-Bindungsassays mit Hilfe der Funktionalisierung per $A\mu$ CS realisiert werden können. Hierbei stellt der Antikörper nicht das zu detektierende Molekül dar, sondern wird vielmehr als sekundäres Detektionselement herangezogen. Durch Anbindung des vergleichsweise schweren Anti-DNP Antikörpers (Typus IgG, ca. 150.000 Da)²⁰³ an das in diesem Fall eigentlich zu detektierende DNP (ca. 185 Da)²⁰² kann sehr effektiv das Sensorsignal verstärkt und somit das Detektionslimit des Sensors herabgesetzt werden: Während im vorliegenden Experiment die durch die Anbindung an den Kelchlasers hervorgerufene spektrale Verschiebung der Lasermoden bei der DNP-Inkubation nach 12 pm saturiert, schiebt das Antikörper-Signal um mindestens einen Faktor 1,5 mehr, wobei nach Beendigung der Messung sichtbar noch keine Signalsättigung erreicht wurde. Das Detektionslimit für die Antikörper lässt sich bei einer 10-minütigen Messdauer auf ungefähr 800 ng/ml beziffern.

Das Experiment macht zudem die exzellenten Passivierungseigenschaften der Phospholipidintinten gegenüber nichtspezifischer molekularer Adsorption deutlich. Vor der DNP-Injektion wurde der untersuchte Kelchlasers einer 1 %-igen BSA-Lösung ausgesetzt und hierbei das Sensorsignal aufgezeichnet. Da alle lichtführenden Bereiche des untersuchten Kelches durch das $A\mu$ CS komplett mit Tinte adressiert wurden, kommt es selbst bei dieser vergleichsweise hohen Proteinkonzentration (10.000 μ g/ml) zu keinerlei Rotverschiebung der Lasermoden (Abbildung 4.25(c)). In Kapitel 4.3 werden diese sehr guten Passivierungseigenschaften ausgenutzt, um unterschiedliche Biomoleküle mit mehreren Mikrokelchen zeitgleich zu detektieren. Darüber hinaus werden die Sensorsignale der einzelnen Mikrokelchlasers zum wechselseitigen Herausfiltern von bindungsunspezifischen Störsignalen herangezogen und auf diese Weise das Messergebnis signifikant verbessert. Bedingt durch diese Faktoren erlaubt die $A\mu$ CS-Funktionalisierung letztendlich den Sensorbetrieb der Mikrokelchlasers selbst in hochkomplexen Analyten. In Kapitel 4.3.3 wird ein diesbezügliches Detektionsexperiment in unverdünntem Serum vom Kalb aufgezeigt.

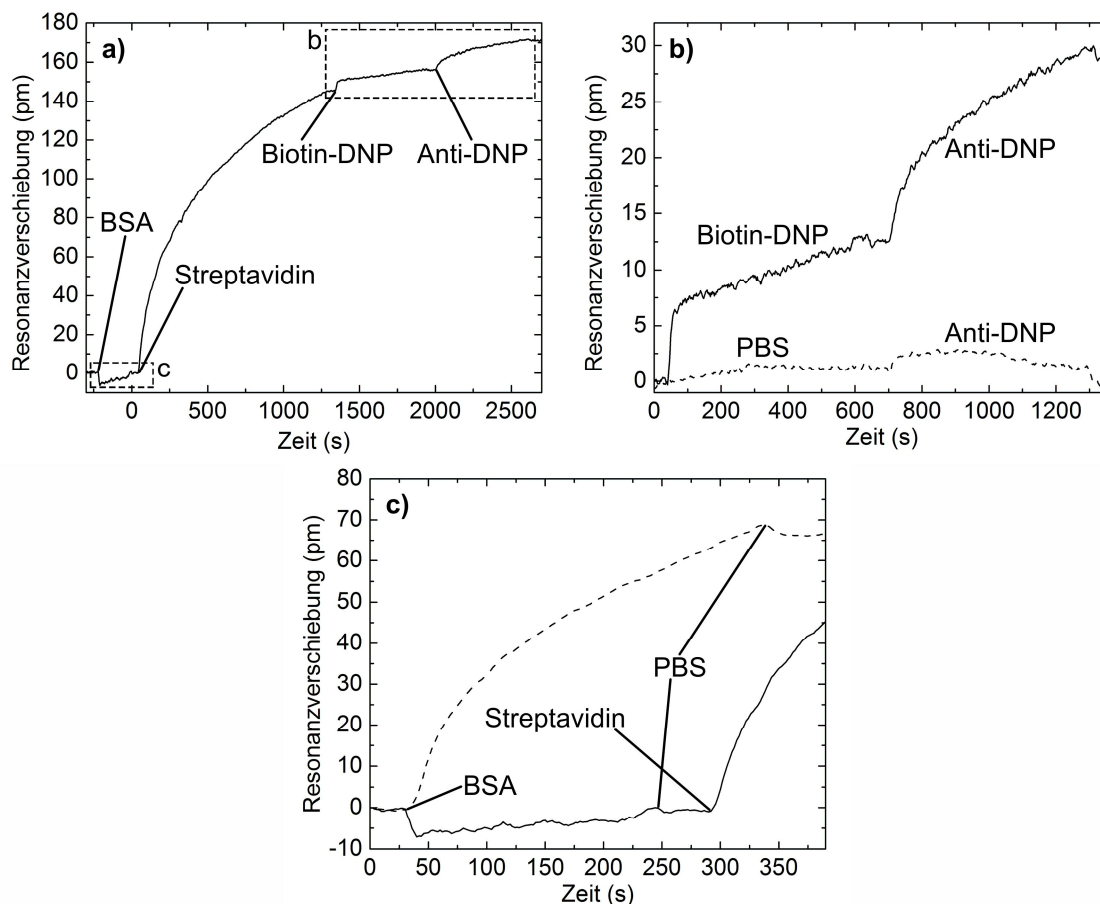


Abbildung 4.25: Demonstration mittels AuCS realisierter biomolekularer Sensoren anhand der Detektion von 2,4-Dinitrophenol (DNP). (a) Die Immobilisierung des DNP (15 $\mu\text{g/ml}$, Inkubationszeitraum: 1.340 s bis 1.940 s) erfolgt über BiotinTermini an Streptavidin, welches in einem vorausgehenden Inkubationsschritt auf den biotinylierten Mikrokelchlasern immobilisiert wird (30 $\mu\text{g/ml}$, 40 s bis 1280 s). Anschließend erfolgt der DNP-Nachweis über die Anbindung eines Anti-DNP Antikörpers (15 $\mu\text{g/ml}$, 2.000 s bis 2.600 s). Zuvor wird der biotinylierte Mikrokelchlaser in BSA geblockt (10 mg/ml, -220 s bis 0 s). Die eingerahmten Bereiche der temporalen Bindungskurve sind in (b) und (c) vergrößert dargestellt. (b) Sensorsignale zweier Biosensoren bei vorhandenem (übernommen aus (a)) und fehlendem DNP (separates Bindungsexperiment). Lediglich bei dem Mikrolaser auf welchem zuvor DNP immobilisiert wurde, erfolgt eine anschließende Anbindung des Antikörpers, wodurch die korrekte Arbeitsweise der Oberflächenfunktionalisierung belegt wird. (c) Bindungsverhalten von BSA an einen mit Lipidtinte funktionalisierten Mikrokelch (übernommen aus (a)) und einen Mikrokelch ohne Lipidfunktionalisierung (gestrichelte Linie, separates Experiment). Bei vollständiger Funktionalisierung des Resonatorrandes resultieren die sehr guten Passivierungseigenschaften der Phospholipidtinten in der Unterdrückung von nichtspezifischen molekularen Anbindungen, während sich bei komplett fehlender Tinte BSA in beachtlichem Maße an den Kelchlaser anlagern kann.

4.2.3 AuCS-funktionalisierte Mikrokelche zur pharmazeutischen Doseinstellung

Dass sich mit Ni-Chelat oberflächenfunktionalisierte Mikrokelchlaser bestens als universelle Plattform eignen, um eine Vielzahl von klinisch relevanten Anwendungen zu realisieren, zeigen die Demonstrationsexperimente in Abbildung 4.26. Ausgewählt wurden zwei im menschlichen Organismus prominent vorkommende Proteine. Zum einen Interleukin-6 (Il-6), ein bei Entzündungs- und Infektionserkrankungen die Immunantwort regulierender Botenstoff.^{204,205} Zum anderen Tumornekrosefaktor (TNF), ein multifunktionales Signalprotein, welches unter anderem Immunantworten, Zellproliferation und Zelltod reguliert und den Fettstoffwechsel beeinflusst.²⁰⁶ In beiden Fällen wird das jeweilige Protein über His-Gruppen an die Mikrokelche angebunden, um anschließend einen dagegen gerichteten Antikörper zu detektieren. Über diese Methodik kann beispielsweise eine medikamentöse Einstellung von TNF- oder Il-6-überproduzierenden Patienten messtechnisch unterstützt werden. Oft weisen z. B. an Morbus Crohn oder rheumatischen Erkrankungen leidende Patienten einen stark erhöhten Spiegel an einem der beiden oder gar an beiden Proteinen auf. Durch Verabreichung von monoklonalen Antikörpern kann diese Überhöhung medikamentös behandelt werden.^{207,208} Im Fall von Il-6 liegt die üblicherweise verabreichte Dosis bei

8 bis 12 mg pro kg Körpergewicht,²⁰⁷ wodurch die mittlere Antikörperkonzentration im Blut auf etwa 100 bis 171 $\mu\text{g/ml}$ eingestellt wird (unter Annahme einer mittleren Blutkonzentration von 7 % und einem durchschnittlichen Körpergewicht eines Erwachsenen von 70 kg)²⁰⁹. Für TNF gelten ähnliche medikamentöse Dosiswerte.²⁰⁸ Da TNF-Blocker mit ca. 800 Euro pro Injektionsdosis (z. B. Humira/Adalimumab, AbbVie Ltd.)²¹⁰ zu den teuersten in Deutschland verfügbaren Medikamenten gehören macht eine medikamentöse Einstellung auch aus wirtschaftlicher Hinsicht Sinn.

Die im vorliegenden Experiment exemplarisch gewählte Anti-IL-6 Antikörperkonzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ liegt bereits um einen Faktor 4 unterhalb des mittleren therapeutischen Wertes, wobei weder das bindungsspezifische Sensorsignal von Anti-IL-6 noch das von IL-6 eine Sättigung erfahren (Abbildung 4.26(a)). Das theoretische Detektionslimit (Details s. Kapitel 3.1.5) bei diesem Experiment beträgt nach Inkubation der Antikörper für 4 Minuten 550 ng/ml. Eine Steigerung des Signals kann zum einen über eine längere Inkubationszeit der Antikörper erreicht werden und zum anderen über eine vollständige Ausnutzung aller Ni-Chelat Bindungsstellen durch das Interleukin. Unter Beibehaltung aller übrigen experimentellen Parameter würde eine reine Verdoppelung der Antikörperinkubationszeit in einem Detektionslimit von 370 ng/ml resultieren (ermittelt durch Extrapolation der Anti-IL-6-Messkurve gemäß Gleichung 23, Kapitel 3.1.5). Gleiches gilt für die Anti-TNF-Detektion (Abbildung 4.26(b)). Durch eine 5-minütige Antikörperinkubation lässt sich ein Detektionslimit von 750 ng/ml realisieren. Eine Verlängerung auf 10 Minuten würde das Detektionslimit auf 550 ng/ml verbessern. Die Detektionslimits sowohl für Anti-TNF als auch Anti-IL-6 liegen weit unterhalb der üblichen medikamentösen Werte. Somit erweisen sich die Mikrolaser als sehr vielversprechend, um eine DosisEinstellung im Rahmen einer medikamentösen Behandlung messtechnisch zu unterstützen.

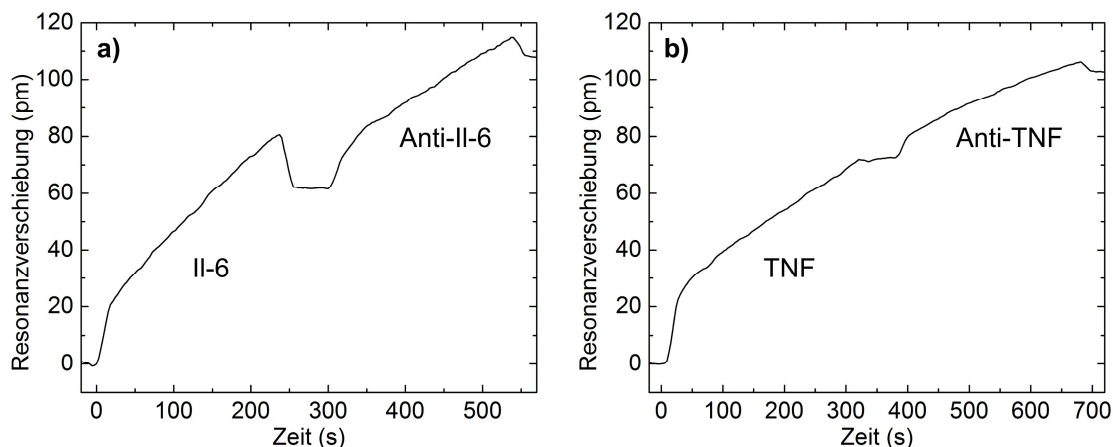


Abbildung 4.26: Konzeptionelle Demonstration der Einstellung von medikamentösen Antikörpern am Beispiel von (a) Interleukin-6 (IL-6) hemmenden Antikörpern und von (b) Tumornekrosefaktor (TNF) hemmenden Antikörpern. Die jeweiligen Antigen- und Antikörperinkubationen wurden jeweils durch Spülung mit PBS beendet.

4.3 Parallele Biosensorik und in-situ Rekonfigurierbarkeit

Neben der effizienten parallelen Oberflächenfunktionalisierung von WGM-Strukturen stellt vor allem auch deren zeitgleiches Auslesen eine große Herausforderung dar. Beides ist erforderlich, um eine simultane Detektion verschiedener Inhaltsstoffe zu bewerkstelligen. Chipbasierte Ringresonatoren^{40,58,149,188} und Mikrokugeln^{28,187,211,212} beispielsweise lassen sich parallel funktionalisieren und auslesen, mit den aus Kapitel 4.2 bekannten einhergehenden Limitierungen. Bei Toroidresonatoren und Mikrokelchen lässt sich die standardmäßige Glasfaserkopplung zeitgleich an mehrere Resonatoren faktisch nur unter enormem Justageaufwand bewerkstelligen. Bislang wurden diesbezüglich noch keine praktischen Ausführungen publiziert.

Generell ist es von Vorteil, wenn bei der multimolekularen Detektion die einzelnen Sensorstrukturen möglichst nahe zueinander lokalisiert sind, da hierdurch eventuell auftretende Störeinflüsse wie Temperaturschwankungen und nichtspezifische molekulare Adsorptionsereignisse nahezu zeitgleich an den einzelnen Transduktoren auftreten. Durch den gezielten Einsatz von unfunktionalisierten oder

passivierten Sensorelementen kann so effektiv eine Referenzierung der einzelnen Sensorsignale vorgenommen werden. Bedingt durch die sehr hohe Prozessierungsgenauigkeit erweisen sich insbesondere photolithographisch hergestellte chipbasierte Strukturen diesbezüglich als vielversprechend, da diese mit hoher lateraler Auflösung und somit sehr nahe zueinander strukturiert werden können. So wurden beispielsweise von Grossmann und Kollegen scheibenbasierte WGM-Strukturen mit Abständen auf Nanometerskala hergestellt (vgl. Kapitel 6.3.2).¹²⁵ Des Weiteren erlaubt eine photolithographische Strukturierung eine definierte und reproduzierbare Einstellung der optischen Eigenschaften der Sensorelemente über Anpassung derer Geometrie. Zur Unterscheidung der Sensorsignale der einzelnen Transduktoren ist dies eine wesentliche Voraussetzung.

Mit kleiner werdenden Abständen zwischen den Sensoren zueinander steigen jedoch die Anforderungen an die Durchführung einer selektiven Oberflächenfunktionalisierung individueller Transduktoren ohne hierbei die umliegenden Sensorelemente zu kontaminieren enorm. Wieder erweist sich hier eine Funktionalisierung per μ CS als vorteilhaft, da die Phospholipidintinten in einem einzigen Prozessschritt hochlokal aufgebracht werden können. Dieses Kapitel beschreibt die Anwendung von μ CS auf sehr dicht gepackte Mikrokelchlaserverpaare.¹⁹² Die mit unterschiedlichen Lipidintinten funktionalisierten Kelchlaserverpaare werden im Anschluss, erstmalig für chipbasierte WGM-Sensorstrukturen mit Sockelgeometrie, zeitgleich spektrometrisch in einem biosensorischen Detektionsexperiment ausgelesen und deren Sensorsignale zur wechselseitigen Referenzierung verwendet. Durch Auswahl der in Kapitel 4.2 eingeführten Ni-Chelat-Tinte wird zudem, erstmalig für WGM-Sensorstrukturen überhaupt, eine vollständige Rekonfiguration der Oberflächenfunktionalisierung demonstriert. Auf diese Weise wurden an einem einzigen Mikrokelchlaserverpaar multiple molekulare Bindungsexperimente durchgeführt. Die Rekonfiguration wird hierbei rein mikrofluidisch in-situ vorgenommen.

Die im Folgenden untersuchten Mikrokelchlaserverpaare wurden in ihrer scheibenförmigen Vorstufe mit einem Abstand von 500 nm per Elektronenstrahlschreiber lithographisch aus PM 597-dotiertem PMMA definiert. Damit die Mikrokelcher unterschiedliche Lasermoden unterstützen, wurden die beiden Scheiben mit unterschiedlichen Radien realisiert ($R_G = 25 \mu\text{m}$ und $R_K = 20 \mu\text{m}$). Nach dem finalen thermischen Aufschmelzen weisen die resultierenden Mikrokelcher einen Abstand von etwa 3 μm auf.

4.3.1 Filterung von Temperatur- und Brechzahlschwankungen

In aller Regel sind die Sensorsignale in biomolekularen Detektionsexperimenten durch einen mitunter beträchtlichen Störanteil überlagert. Dieser resultiert zum einen aus Temperatur- zum anderen aus Brechzahlschwankungen. Bei portablen Sensorsystemen können Temperaturunterschiede beispielsweise durch Sonneneinstrahlung oder der Körpertemperatur des zu untersuchenden Patienten auftreten. Brechzahlstörungen stellen ein generelles Problem bei biomolekularen Detektionsaufgaben dar. Sie werden beispielsweise hervorgerufen durch nichtspezifische molekulare Anlagerungen an das Sensorelement oder durch Brechzahländerungen im Analyten bzw. Brechzahlunterschieden zwischen den einzelnen während einer Messreihe applizierten Flüssigkeiten. Erstgenannter Effekt lässt sich über eine gut eingestellte Oberflächenfunktionalisierung zwar minimieren, Brechzahl- und Temperaturstörungen im Analytvolumen lassen sich jedoch nur über geeignete Referenzmessungen in brauchbarem Maße aus dem störbehafteten Sensorsignal herausfiltern. Im Fall der hier diskutierten Mikrokelchlaserverpaare bietet es sich an die mit verschiedenen Lipidintinten funktionalisierten Mikrokelcher nicht ausschließlich zur reinen Detektion von zwei unterschiedlichen Molekülen zu verwenden, sondern darüber hinaus den jeweils nicht an der Detektion eines Moleküls beteiligten Mikrokelcher als Referenzsensor heranzuziehen. Dessen nichtspezifisches Sensorsignal kann dann vom Signal des jeweils funktionalen Mikrokelchers subtrahiert werden. Da die beiden Laser hierbei aufgrund ihrer unterschiedlichen Resonatorradien unterschiedliche Temperatur- und Brechzahl sensitivitäten aufweisen, sind diese durch eine passende Gewichtung der einzelnen Sensorsignale zu berücksichtigen. Dies lässt sich erfolgreich bewerkstelligen, indem in Vorversuchen die BRIS und die Temperatursensitivität (TS) der einzelnen Kelchstrukturen ermittelt werden. Diese werden dann im Anschluss zur Herausrechnung der Störanteile einbezogen.

Um beide Mikrolaser zeitgleich mit dem optischen Versuchsaufbau aus Kapitel 3.1.3 auszulesen, wird ein Mikrolaserpaar so auf der Probenhalterung fixiert, dass seine Symmetrieachse auf den Eingangsspalt des Spektrographen abgebildet wird (Abbildung 4.27(a)). In Kombination mit der im Spektrographen verwendeten CCD-Flächenkamera kann softwareseitig so entweder das ortsaufgelöste Emissionsspektrum des Laserpaares aufgezeichnet werden oder aber das durch FVB aufsummierte Gesamtemissionsspektrum. Um Lasing in beiden Mikrolasern zu erzielen, wurde der Pumplaserspot entlang der Symmetrieachse auf eine Intensitätshalbwertsbreite von etwa 100 μm eingestellt.

Eine Zuordnung der Lasermoden zu ihren zugehörigen Resonatoren erfolgt durch die Untersuchung der spektralen Positionen und die Analyse der freien Spektralbereiche $\Delta\lambda_{\text{FSR}}$. Diese weisen gemäß Gleichung 3 (Kapitel 3.1.1) eine reziproke Proportionalität zum Resonatorradius auf. Hilfreich besonders mit steigender Anzahl von Resonatoren ist hierbei das Verhältnis der freien Spektralbereiche zweier Resonatoren, da auf diese Weise die Analyse auf einen einzigen Zahlenwert reduziert werden kann. Dieser ist dann nur noch abhängig von den Radien der involvierten Resonatoren:

$$\frac{\Delta\lambda_{\text{FSR,K}}}{\Delta\lambda_{\text{FSR,G}}} = \frac{R_G}{R_K} \quad (28)$$

Abbildung 4.27(b) zeigt sowohl das Gesamtemissionsspektrum als auch die Einzelspektren eines Mikrokelchlaserspaars. Mit den beiden Radien $R_G = 25 \mu\text{m}$ und $R_K = 20 \mu\text{m}$ wird für $\Delta\lambda_{\text{FSR,K}}/\Delta\lambda_{\text{FSR,G}}$ ein theoretischer Wert von 1,25 erwartet. Durch visuellen Abgleich mit dem Emissionsspektrum ergibt sich für $\Delta\lambda_{\text{FSR,G}} = 1,71 \text{ nm}$ und $\Delta\lambda_{\text{FSR,K}} = 2,17 \text{ nm}$ ein Verhältnis von 1,27 und somit eine gute Übereinstimmung mit dem theoretischen Wert.

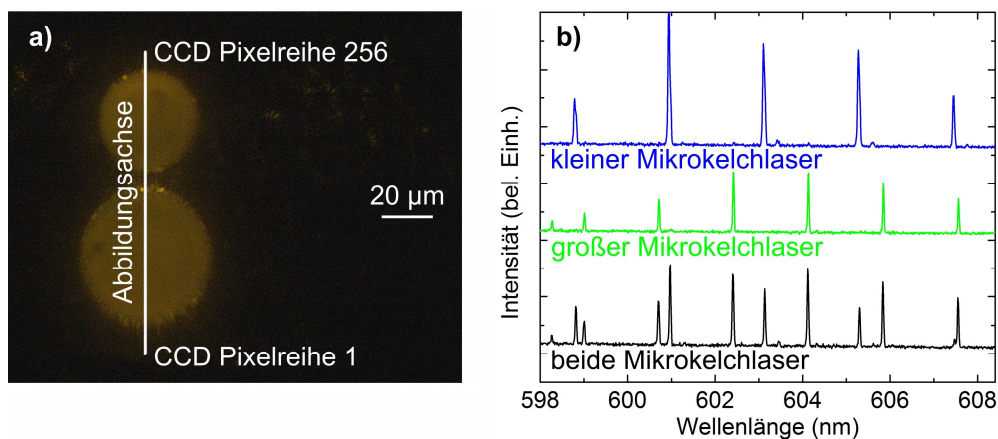


Abbildung 4.27: Spektrale Charakterisierung von Mikrokelchlaserspaaren. (a) Mikrokelchlaserspaar im Messaufbau während des optischen Pumpvorganges. Zum zeitgleichen Auslesen beider Kelchemissionsspektren wird das Paar so orientiert, dass seine Symmetrieachse auf den Eingangsspalt des Spektrometers abgebildet wird. (b) Emissionsspektrum eines in Wasser eingelegten Laserpaares. Zur isolierten Aufnahme Einzelspektren der Mikrolaser wurde der jeweils zweite Laser mit einer Aperturblende im Strahlengang des optischen Versuchsaufbaus ausgeblendet.

Zur experimentellen Charakterisierung der TS der einzelnen Mikrolaser (Abbildung 4.28) wurde ein unfunktionalisiertes Laserpaar in Wasser immigriert und der Metallrahmen der fluidischen Kammer mit einem Peltierelement konnektiert. Über den Auslass wurde ein Typ K Thermoelement in die Kammer eingeführt und in unmittelbarer Nähe zum Laserpaar positioniert. Anschließend wurde die Temperatur der Kammer in diskreten Schritten erhöht und zeitgleich das FVB-Spektrum des Mikrolaserpaares als kinetische Sequenz aufgezeichnet. Danach wurden die spektralen Verschiebungen der individuellen Lasermoden ausgewertet. Bedingt durch den negativen thermooptischen Koeffizienten von PMMA²¹³ weisen die Lasermoden beider

Mikrokelchlaser mit zunehmender Temperatur eine Blauverschiebung auf. Als durchschnittliche TS ergibt sich für die Lasermoden des Mikrokelches mit dem kleineren Radius $-14,18 \text{ pm/K}$ (Standardabweichung: $0,25 \text{ pm/K}$), für die der des großen Lasers $-14,99 \text{ pm/K}$ (Standardabweichung: $0,27 \text{ pm/K}$).

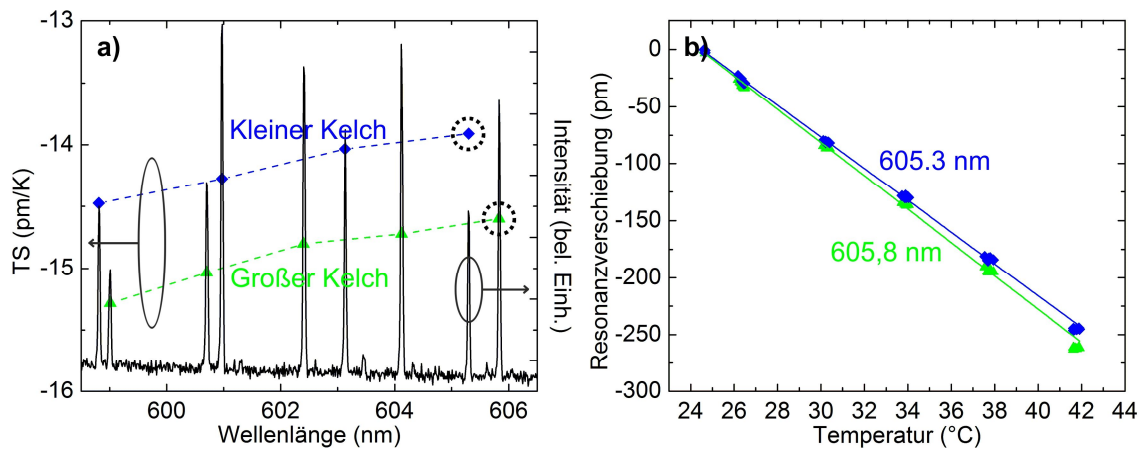


Abbildung 4.28: Abhängigkeit des unfunktionalisierten Mikrokelchlasers von der Temperatur des flüssigen Analyten. (a) Emissionsspektrum in Wasser und Temperatursensitivitäten (TS) der einzelnen Lasermoden. (b) Spektrale Verschiebung abhängig von der Temperatur, exemplarisch für jeweils eine Lasermode des großen und kleinen Kelchlasers.

Die experimentelle Ermittlung der BRIS der einzelnen Mikrolaser (Abbildung 4.29) erfolgt durch Applizierung einer Reihe von Glycerol-Wasser-Gemischen mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen bei Raumtemperatur. Die unterschiedlichen Brechzahlen wurden durch Beimischung von Glycerin in deionisiertes Wasser zu unterschiedlichen Konzentrationen realisiert ($n_{\text{Ana}} = 1,3325$ bis $1,3375$, gemessen mit einem Handrefraktometer, Atago PAL-RI Pocket; entspricht 0 bis 1,5 Vol.-% Glycerol). Anschließend wurden die einzelnen Flüssigkeiten sequentiell mit steigender Glycerinkonzentration (beginnend mit purem Wasser) durch die mikrofluidische Kammer des optischen Versuchsaufbaus geleitet. Da mit abnehmendem Resonatorradius der evaneszente Feldanteil der WGMs ansteigt, weist der Mikrokelch mit dem größeren Resonatorradius die kleinere BRIS auf.¹⁵³ Die BRIS der Lasermoden des kleinen Mikrolasers beträgt im Durchschnitt $20,07 \text{ nm/RIU}$ (Standardabweichung $0,523 \text{ nm/RIU}$). Für die Lasermoden des großen Lasers ist die mittlere BRIS $14,80 \text{ nm/RIU}$ (Standardabweichung: $0,201 \text{ nm/RIU}$).

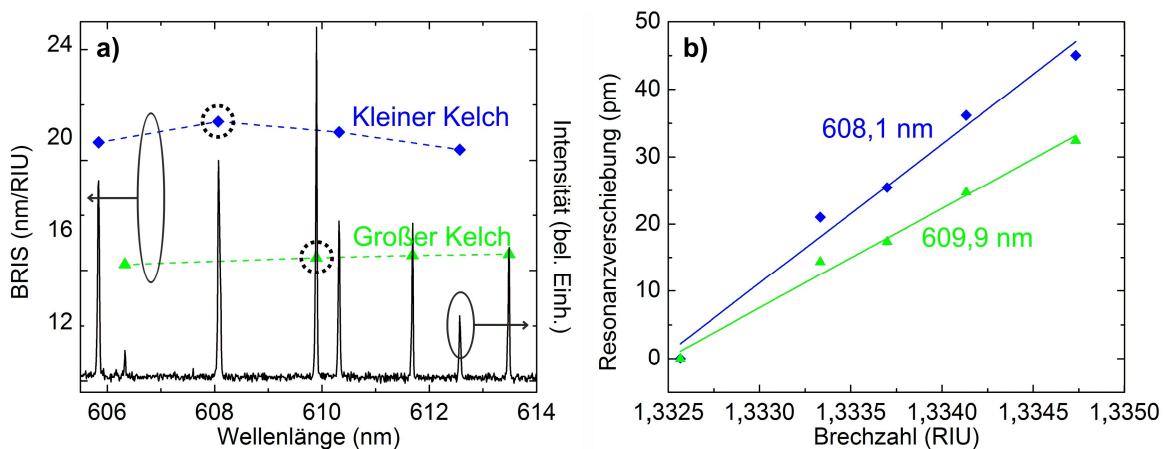


Abbildung 4.29: Abhängigkeit der Modenpositionen eines unfunktionalisierten Mikrokelchlasers von der Brechzahl des flüssigen Analyten. (a) Emissionsspektrum in Wasser und Brechzahlsensitivitäten (BRIS) der einzelnen Lasermoden. (b) Brechzahlabhängige spektrale Verschiebung, exemplarisch für jeweils eine Lasermode des großen und kleinen Kelchlasers.

Sind die TS und BRIS der beiden Mikrolaser bekannt, können sie zur wechselseitigen Filterung von temperatur- und brechzahlinduzierten Störsignalen herangezogen werden. Maßgebend ist hierbei, dass einer der beiden Laser (Referenzlaser) nicht selbst an der Detektion eines Moleküls beteiligt ist und somit alle auftretenden Sensorsignale ausschließlich nichtspezifischer Natur sind. Um die Referenzierung vorzunehmen, wird das aufgezeichnete Rohsignal des Referenzlasers $\Delta\lambda_{\text{ref,raw}}$ gemäß des TS- bzw. BRIS-Verhältnisses der beiden Laser gewichtet und vom Rohsignal des Sensorlasers $\Delta\lambda_{\text{sens,raw}}$ abgezogen. Hieraus ergibt sich das störsignalbereinigte Signal des Sensorlasers $\Delta\lambda_{\text{sens,corr,t}}$ zu:

$$\Delta\lambda_{\text{sens,corr,t}} = \sum_{t=\Delta t}^{n\Delta t} \left(\frac{d(\Delta\lambda_{\text{sens,raw,t}})}{dt} - \frac{S_{\text{sens,t}}}{S_{\text{ref,t}}} \frac{d(\Delta\lambda_{\text{ref,raw,t}})}{dt} \right) \Delta t + \Delta\lambda_{\text{sens,corr,t=0}} \quad (29)$$

$$\Delta\lambda_{\text{sens,corr,t=0}} = \Delta\lambda_0$$

Hierbei ist S_{sens} und S_{ref} die TS bzw. BRIS des Sensor- und des Referenzlasers. Δt repräsentiert die Abtastzeit des Spektrometers und $\Delta\lambda_0$ den zuerst aufgenommenen Messwert einer Messreihe zur Offsetkorrektur.

Die erfolgreiche Anwendung dieses Referenzierungsansatzes wird im Folgenden im Rahmen eines Streptavidin-Bindungsexperiments demonstriert (Abbildung 4.30), in dessen Verlauf zu definierten Zeiten definierte Temperatur- und Brechzahlstörungen induziert werden. Während hierzu der kleine Mikrokelch mit der bekannten nichtfluoreszierenden Biotin-Tinte funktionalisiert war, war der große Laser mit purem DOPC beschichtet. Dieser weist somit keinerlei molekulare Bindungsstellen auf und kann als rein passives Sensorelement zur Aufzeichnung des Referenzsignals für den kleinen Laser dienen. Die Funktionalisierung des Laserpaars wurde per μCS vorgenommen und wird in Kapitel 4.3.2 im Detail erläutert. Vor dem Experiment wurde das Paar für 30 Minuten in einer 0,5 %-igen BSA-Lösung geblockt. Zu Beginn der Messsequenz befinden sich die Mikrolaser bei Raumtemperatur in purem Wasser. Nach 50 Sekunden erfolgt die Injektion von Streptavidin. Das Streptavidin ist hierbei zu 12 $\mu\text{g/ml}$ in PBS gelöst, um einen willkürlichen Brechzahlspung durch den Analyten, wie er in der Praxis auftreten kann, zu simulieren. Dieses Experiment spiegelt die Anwendungsrealität wider, da die in praxisnahen Messungen eingesetzten Pufferlösungen (hier repräsentiert durch Wasser), in welchem die Sensoren vor dem eigentlichen Einsatz eingelegt sind, in aller Regel einen anderen Brechungsindex aufweisen als der Analyt (z. B. Blutserum). Da PBS einen höheren Brechungsindex besitzt als Wasser ($\Delta RIU = +0,0017$) ist zum Zeitpunkt des Flüssigkeitsaustauschs infolgedessen das Sensorsignal des biotinylierten Kelches durch einen stufenförmigen Störanteil korrumpiert. Während der Inkubation mit Streptavidin wurde dann die Temperatur des Analyten über das Peltierelement zuerst um +0,1 K (Zeitpunkt 730 Sekunden) und anschließend um weitere +1 K (bei 880 Sekunden) erhöht, um auf diese Weise eine Änderung der Gerätetemperatur zu simulieren, hervorgerufen insbesondere bei portablen Messsystemen beispielsweise durch Körperwärme oder klimatische Veränderungen, z. B. Sonneneinstrahlung. Nach 1.000 Sekunden wurde das Peltierelement abgeschaltet, sodass der Analyt auf Labortemperatur zurückkühlte. Das Experiment wurde durch Spülung mit purem Wasser beendet. Sowohl das Rohsignal des biotinylierten Mikrokelchlasers als auch das des passivierten Referenzkelches sind durch die induzierten Störungen in signifikantem Maße beeinflusst. Der über die gesamte Messdauer auftretende Rotdrift des Referenzlasersignals lässt zudem auf eine generelle Abkühlung des Analyten schließen.

Unter Anwendung der ermittelten Werte für die TS und BRIS der einzelnen Laser lassen sich sämtliche Störungen aus der Bindungskurve des biotinylierten Kelches über eine entsprechend gewichtete punktweise Subtraktion herausrechnen, sodass das referenzierte Sensorsignal die Signalstörungen nicht mehr aufweist. Sowohl der zeitliche Kurvenverlauf als auch die Gesamtverschiebung der Lasermoden fällt signifikant anders aus als zunächst ohne Signalreferenzierung angenommen. Sowohl die Temperaturstörungen als auch der parasitäre Brechzahlspung sind nun nicht mehr im Sensorsignal des biotinylierten Mikrolasers vorhanden.

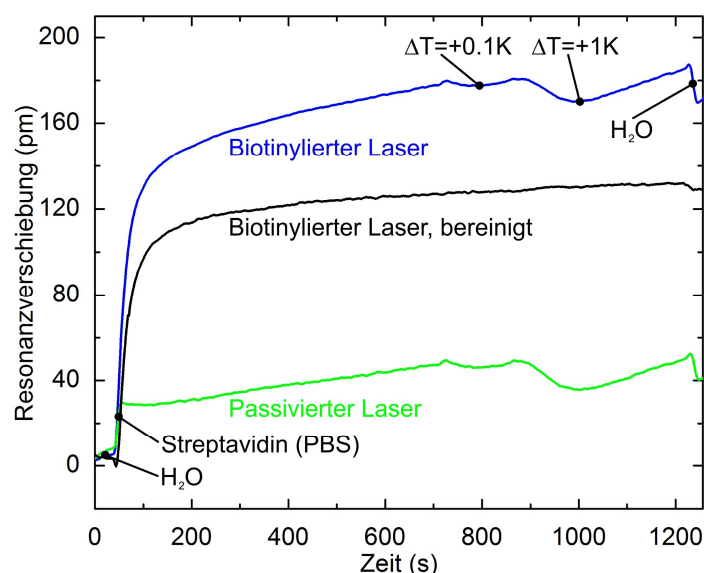


Abbildung 4.30: Demonstration der Signalreferenzierung am Beispiel einer störungsbehafteten Streptavidindetektion. Während des Experiments wird das Sensorsignal des biotinylierten Mikrokelchlasers zu definierten Zeitpunkten gezielt durch induzierte Temperatur- und Brechzahländerungen gestört, sodass die Streptavidindetektion signifikant beeinflusst wird. Das parallel aufgenommene Signal des passivierten, unfunktionalen Kelches kann jedoch dazu verwendet werden, um diese Störeinflüsse aus dem Signalverlauf des biotinylierten Lasers vollständig herauszufiltern.

4.3.2 Störsignalkompensierte Biosensorik

Zur Beschichtung der Mikrokelchlaserpaare kommt ein Hybrid aus Transfermethode A und B zum Einsatz (Abbildung 4.31). Hierzu wird ein Stempelkissen gemäß Methode A eingesetzt, welches zwei unterschiedliche Phospholipidtintenflächen aufweist. Die Tintenflächen messen einige mm^2 und werden per Aufpipettieren auf den Glasträger hergestellt. Für das nun folgende biomolekulare Detektionsexperiment wurden die Biotin- und die Ni-Chelat-Tinte ausgewählt, in derselben molekularen Konfiguration wie in Kapitel 4.2 beschrieben. Wie bereits in Kapitel 4.2.2 erläutert, können an die Ni-Chelat-Termini selektiv und reversibel His-markierte Moleküle an- und abgekoppelt werden. Dies wird im vorliegenden Experiment ausgenutzt, um die Oberflächenfunktionalisierung des Ni-chelatierten Mikrokelches in-situ zu rekonfigurieren. Zur individuellen Oberflächenfunktionalisierung der einzelnen Mikrolaser werden die Laserpaare so zu dem Stempelkissen ausgerichtet, dass die Symmetrieachse des Paares orthogonal zur Grenzfläche des jeweilig intendierten Tintenfilms verläuft. Der zu bestempelnde Laser wird hierbei auf der Tintenseite orientiert, während der nicht zu beschichtende Kelch auf der unbeschichteten Glasseite lokalisiert ist (Abbildungen 4.31(b) und (d)). Durch schrittweises Annähern wird dann der jeweilige Kelch bei Raumtemperatur und einer relativen Feuchte von 50 bis 60 % in Kontakt mit seiner Tinte gebracht. Die Haltezeit pro Kelch beträgt zehn bis 20 Sekunden. Auch mit dieser Stempeltransfertechnik kann eine ausschließliche Randbeschichtung der Kelche realisiert werden. Das REM-Bild in Abbildung 4.32 zeigt ein auf diese Weise bestempeltes Mikrolaserpaar.

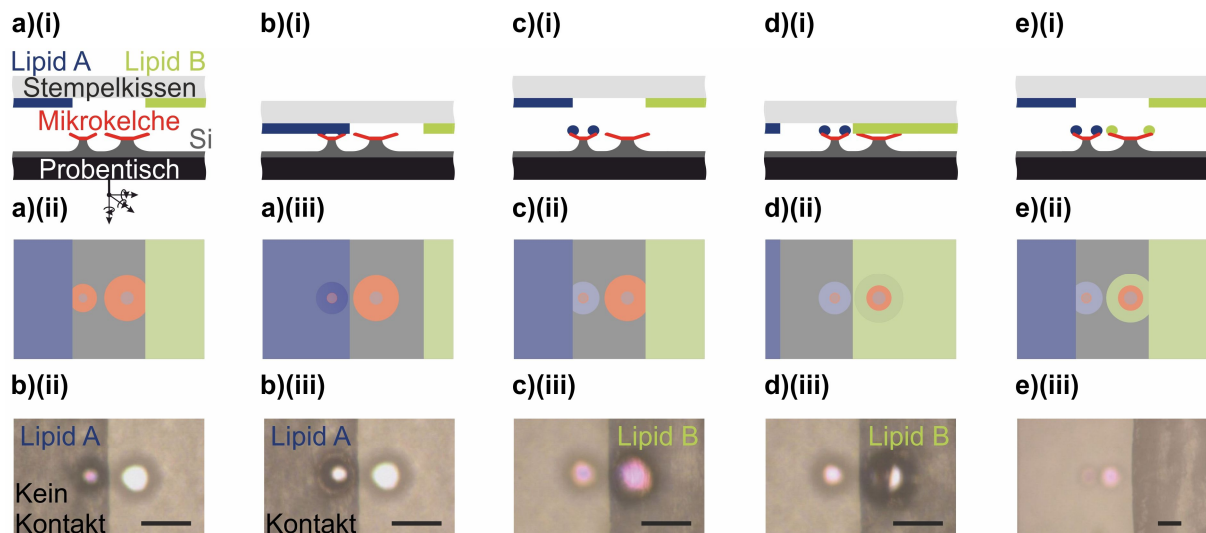


Abbildung 4.31: Illustration der Oberflächenfunktionalisierung von Mikrokelchlaserpaaren mittels A μ CS. In (i) und (ii) ist schematisch respektive die seitliche Ansicht sowie die Draufsicht durch das transparente Stempelkissen entsprechend der in-situ Visualisierung mit der CCD-Kamera der NLP-Maschine dargestellt. (iii) zeigt die in-situ Visualisierung als Realbild (die eingezeichneten Maßstäbe entsprechen jeweils 40 μ m). (a) Das Stempelkissen wird in die unmittelbare Nähe zum Laserpaar gefahren. (b) Das Laserpaar wird mit seiner Symmetrieachse orthogonal zu der Grenzfläche der intendierten Tinte ausgerichtet, sodass der zu beschichtende Mikrokelch unterhalb der Tinte lokalisiert ist. Anschließend wird der zu beschichtende Kelch mit der intendierten Tinte in Kontakt gebracht. (c) Nach einer definierten Haltezeit werden Stempelkissen und Kelch wieder voneinander getrennt. (d) und (e) Wiederholung der Prozedur für den zweiten Mikrokelch.

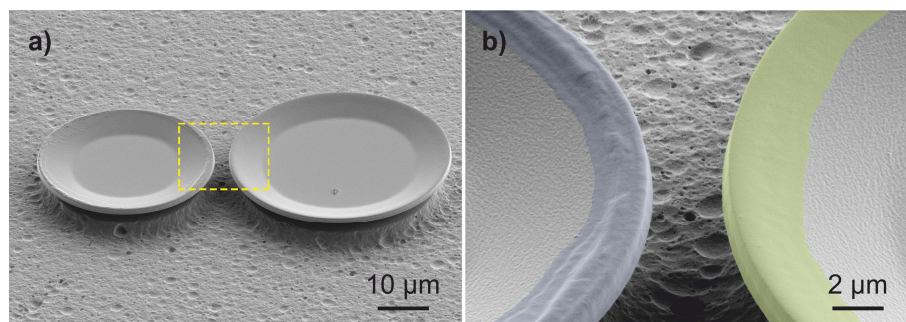


Abbildung 4.32: REM-Aufnahmen eines beschichteten Mikrokelchlaserpaars. (a) Übersichtsbild. (b) Hochauflösende Nahaufnahme des in (a) eingerahmten Bereichs. Die Lipidantennen sind jeweils entlang des Resonatorumfangs lokalisiert und farblich hervorgehoben.

Abbildung 4.33(a) zeigt das mit FVB aufgezeichnete Gesamtemissionsspektrum eines funktionalisierten Laserpaars, eingelegt in PBS und angeregt mit 200 nJ pro Puls. Der größere der beiden Mikrolaser ist hierbei mit der Biotin-Tinte funktionalisiert, während der kleinere die Ni-Chelat-Tinte trägt. Das Spektrum wurde im Vorfeld an das im folgenden Paragraphen eingehend dargelegte biosensorische Detektionsexperiment aufgezeichnet. Durch Tabellieren der einzelnen spektralen Positionen der Lasermoden und Berücksichtigung der resonatorgeometrieabhängigen freien Spektralbereiche, können auch hier die einzelnen Lasermoden ihren Lasern zugeordnet werden. Im vorliegenden Fall weist der kleine Resonator einen freien Spektralbereich von etwa $\delta_{\text{FSR,K}} = 2,14$ nm auf, die Lasermoden des großen Lasers einen freien Spektralbereich von $\delta_{\text{FSR,G}} = 1,67$ nm. Bei hohen Pumpleistungen, wie der hier gewählten, wird eine Zuordnung der Lasermoden über das reine FVB-Spektrum allerdings erschwert, da hierbei unter Umständen auch Lasermoden höherer Ordnung generiert werden, die sich mit der spektralen Anordnung der Grundmoden überlagern. Sehr wirkungsvoll erweist sich in diesem Zusammenhang das ortsabhängige Emissionsspektrum des Mikrokelchlaserpaars (Abbildung 4.33(b)). Aus diesem können den beiden Lasern direkt ihre zugehörigen Lasermoden zugeordnet werden. Das ortsaufgelöste Emissionsspektrum bestätigt die in Abbildung 4.33(a) dargestellten Zuordnungsergebnisse resultierend aus der FVB-Analyse der freien Spektralbereiche.

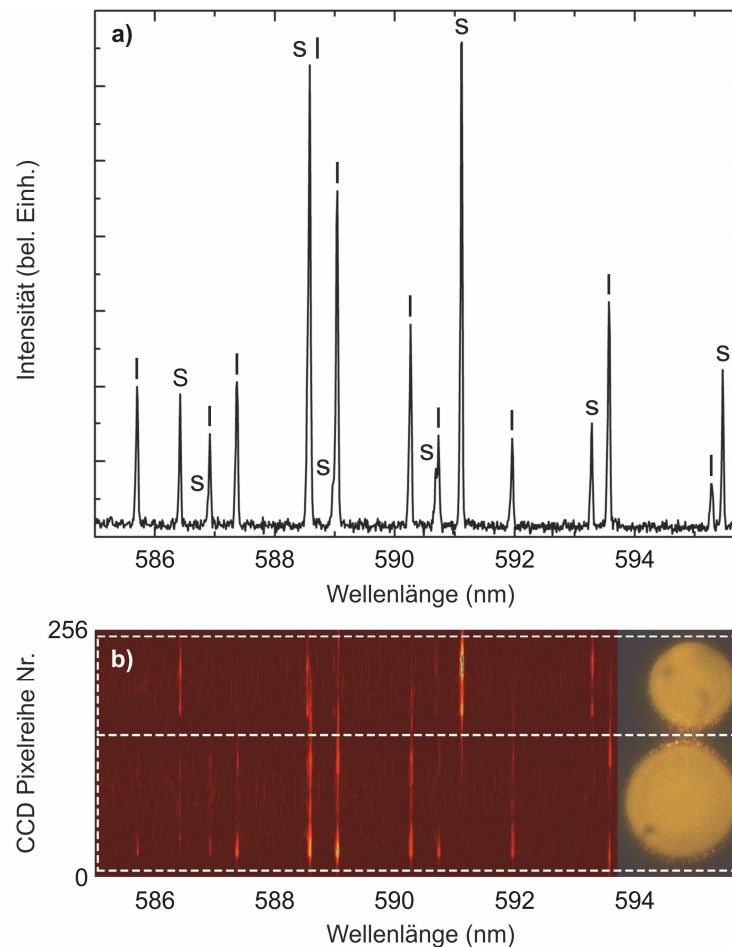


Abbildung 4.33: Emission eines funktionalisierten Mikrokelchlaserpaars, eingelegt in PBS. Das hier gezeigte Spektrum markiert den Ausgangspunkt für das anschließende in Abbildung 4.34 erörterte biomolekulare Detektionsexperiment. (a) Gesamtemissionsspektrum des Laserpaars. Über die spektralen Abstände der Lasermoden lassen sich diese ihren Lasern zuordnen (s: Lasermode des Lasers mit dem kleineren Radius, l: Lasermode des größeren Lasers). (b) Das räumlich aufgelöste Spektrum bestätigt die Zuordnung der Lasermoden anhand der spektralen Abstände. Die gestrichelten Rahmen markieren die einzelnen Laser und deren zugehörige Lasermoden.

Das Emissionsspektrum des Mikrolaserpaars wird im anschließenden biosensorischen Detektionsexperiment im FVB-Modus bei einer Pumpenergie von 150 nJ pro Puls aufgezeichnet. Im Rahmen des Experimentes wird neben der Detektion zweier Proteine die Rekonfiguration des Ni-Chelat Mikrolasers demonstriert. Abbildung 4.34(a) zeigt das Emissionsspektrum zu ausgewählten Zeitpunkten während des Experimentes, während Abbildung 4.34(b) die zeitliche spektrale Verschiebung einer ausgewählten Lasermode von jeweils einem Mikrolaser darstellt. Das Laserpaar wird sequentiell zuerst zweimal in His-GFP (10 µg/ml in PBS) und anschließend, nach den jeweiligen Spülungen mit PBS, in Streptavidin (6 µg/ml in PBS) inkubiert. Nach der ersten His-GFP-Inkubation erfolgt die Rekonfiguration, indem mit einer Imidazol-Lösung (125 mmol/L Imidazol in PBS) die angebundenen His-GFP-Moleküle wieder von den Ni-Chelat-Gruppen der Tinte abgelöst werden, sodass diese anschließend für eine zweite Anbindungsrunde wieder zur Verfügung stehen.

Das Experiment belegt zum einen die erzielbare sehr hohe laterale Auflösung des Mikrokontaktstempels. Obwohl die Mikrolaser nur einen sehr geringen Abstand im unteren einstelligen Mikrometerbereich zueinander aufweisen, kann aus dem orthogonalen Ansprechverhalten der beiden Laser abgelesen werden, dass durch die Funktionalisierung per AuCS keine wechselseitige Kontamination der Mikrokelche stattfand.

Aufgrund der sehr guten Passivierungseigenschaften der Lipidintinten gegenüber nichtspezifischen molekularen Adsorptionseignissen können die beiden zeitgleich erfassten Emissionsspektren der einzelnen Mikrolaser wirkungsvoll zur gegenseitigen Signalreferenzierung herangezogen werden.

Aus Abbildung 4.34(b) geht hervor, dass die dort dargestellten Sensorsignale durch eine Reihe von nichtbindungsspezifischen Signalbeiträgen signifikant überlagert werden. Diese können im Wesentlichen temperatur- und brechzahlinduzierten Störungen im Analyten zugeordnet werden, welche aus den diversen Flüssigkeitsinjektionen resultieren. Deutlich wird dies beispielsweise im Rahmen der beiden His-GFP-Anbindungsreihen an den mit Ni-Chelat funktionalisierten Mikrokelch (Abbildung 4.34(b)), blaue Messkurve, Zeitpunkt 0 bis 900 Sekunden). Der biotinylierte Mikrokelch verhält sich, bedingt durch seine Oberflächenfunktionalisierung, in diesem Zeitraum passiv gegenüber den His-GFP-Molekülen. Durch die zeitgleiche Betrachtung des Sensorsignalverlaufes des biotinylierten Kelches (Abbildung 4.34(b)), grüne Messkurve) können somit die auftretenden Signalstörungen adäquat interpretiert werden. Mittels Spülung mit der Imidazol-Lösung (Zeitpunkt 450 bis 455 Sekunden) wird das in der ersten Inkubationsrunde angebundene His-GFP (90 bis 390 Sekunden) wieder von den Ni-Chelat-Gruppen der Tinte abgelöst. Durch diese Maßnahme werden verschiedene Signalstörungen am Ni-Chelat-Mikrolaser hervorgerufen. Erstens ist die aus der Ablösung der His-GFP-Moleküle resultierende Blauverschiebung der Lasermoden durch eine Stufenfunktion überlagert. Insbesondere bei Experimenten in denen die Dissoziationskonstante der Analytmoleküle durch eine kontrollierte Loslösung vom Sensorelement messtechnisch ermittelt werden soll, kann diese rein durch den Brechungsindex der Flüssigkeit hervorgerufene Störung das Sensorsignal bis zur Unbrauchbarkeit verfälschen. Die Signalstörung ist auch im Sensorsignal des biotinylierten Mikrolasers beobachtbar. Die sprunghafte Rotverschiebung lässt sich hier eindeutig dem höheren Brechungsindex der Imidazol-Lösung gegenüber purem PBS ($\Delta n = +0,0016$) zuordnen. Nach der Imidazol-Spülung ist das Sensorsignal des biotinylierten Mikrolasers des Weiteren um 4,8 pm rotverschoben, was auf eine leichte nichtspezifische Anlagerung von Imidazolmolekülen an beide Mikrolaser hindeutet. Diese kann im Hinblick auf die Signalreferenzierung als eine dauerhaft auftretende Brechzahlstörung gesehen werden. Während der beiden His-GFP-Inkubationen sind zudem leichte (exponentiell abnehmende) Blauverschiebungen im Signal des biotinylierten Mikrokelches zu verzeichnen, welche auf Temperaturdrifts, induziert durch die jeweilige Flüssigkeitsinjektion hindeuten. Die unterschiedlichen Magnituden, mit denen sich das Signal in den Inkubationsrunden 1 und 2 blauverschiebt, lässt darauf schließen, dass die Temperatur der His-GFP-Lösung, obwohl aus demselben Behälter entnommen, zum Zeitpunkt von Inkubationsrunde 1 höher war. Die Temperaturdrifts sind im Ni-chelatierten Laser lediglich nach den PBS-Spülungen (390 bis 450 Sekunden und 855 bis 915 Sekunden) beobachtbar, sie gehen allerdings während den His-GFP-Inkubationen im Sensorsignal unter. Das vorliegende Experiment demonstriert die allgemeine Problematik von störenden Temperatureinflüssen. Diese sind generell der Tatsache geschuldet, dass die diversen während eines molekularen Detektionsexperimentes eingesetzten Flüssigkeiten nie exakt dieselbe Temperatur aufweisen können. Während im Labormaßstab eine Temperaturregelung in der Regel brauchbare Verbesserungen in der Sensorperformance nach sich zieht, erweist sich diese Problematik vor allem bei tragbaren Anwendungen als sehr kritisch.

Als Resultat all dieser Störungen unterscheiden sich die beiden His-GFP-Bindungskurven des Ni-chelatierten Mikrokelchlasers in signifikantem Maße voneinander, obwohl dieselbe Konzentration verwendet wurde. Neben dem aus der Rekonfiguration resultierenden Signaloffset saturieren die beiden Bindungskurven zu unterschiedlichen Endwerten (erste GFP-Inkubation bei 71,86 pm, zweite Inkubation bei 83,61 pm). Über den in Gleichung 29 eingeführten mathematischen Formalismus lässt sich das Signal des biotinylierten Mikrolasers zur Herausfilterung aller Signalstörungen aus dem Ni-chelatierten Mikrolasers heranziehen. Umgekehrtes gilt für die während der Streptavidininkubation (915 s bis 1.335 s) induzierten Signalstörungen am biotinylierten Mikrokelch. Hierbei wird im vorliegenden Experiment zu jedem Injektionszeitpunkt neu entschieden, ob entweder eine Temperatur- oder eine Brechzahlstörung vorliegt. Die referenzierten Sensorsignale der beiden Mikrokelchlasers sind als schwarze Signalkurven in Abbildung 4.34(b) eingezeichnet. Eine instantan ersichtliche Verbesserung der Sensorsignale ist anhand der nun konstanten Signalverläufe vor und nach den jeweiligen Proteininkubationen ersichtlich, was auf eine erfolgreiche Filterung der Temperaturdrifts hindeutet. Darüber hinaus wurde die im Rahmen der Rekonfiguration auftretende Stufenfunktion erfolgreich aus dem Signal des Ni-Chelat-Mikrolasers eliminiert. Die Abweichung der Sättigungswerte der beiden His-GFP-Bindungskurven wird durch die Signalreferenzierung von anfänglichen 16,4 % auf 3,2 % reduziert

(erste GFP-Inkubation sättigt nun bei 73,46 pm, zweite Inkubation bei 75,79 pm). Somit wurde die Reproduzierbarkeit der beiden Bindungsexperimente um einen Faktor 5 verbessert. Unter Berücksichtigung des in Kapitel 3.1.5 ermittelten 3σ -Konfidenzintervalls lässt sich das Detektionslimit für His-GFP vor der Signalreferenzierung auf $159,9 \pm 14,6$ ng/ml beziffern. Nach der Referenzierung beträgt es $159,1 \pm 5,0$ ng/ml. Während der Absolutwert identisch bleibt, verringert sich das Konfidenzintervall um einen Faktor 3 von 9,1 % auf 3,1 %. Das Detektionslimit von Streptavidin lässt sich nach der Referenzierung auf $133,9 \pm 4,2$ ng/ml abschätzen.

Die Klassifizierung der jeweiligen Störung erfolgte im Rahmen dieses Experiments durch visuelle Inspektion der Sensorsignale der beiden Mikrokelchlasers. Während die meisten Störungen auf diese Weise explizit ihrer Ursache zugeordnet werden konnten, lassen sich einzelne Störungen verschieden interpretieren. Beispielsweise lässt sich der während der Streptavidininkubation im Signal des (nun als Referenz fungierenden) Ni-Chelat-Lasers auftretende Rotdrift um etwa 3,5 pm sowohl einer Temperaturänderung als auch einer Brechzahländerung (in Form einer nichtspezifischen Proteinadsorption) zuordnen.

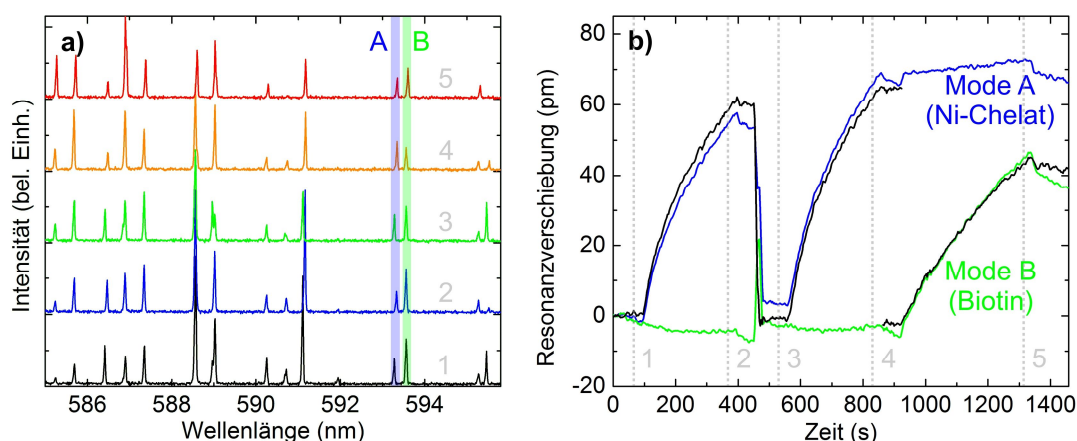


Abbildung 4.34: Demonstration des parallelen Auslesens und der wechselseitigen Referenzierung der einzelnen Mikrolasersignale im Rahmen eines biomolekularen Detektionsexperiments. Der kleine Kelch des Mikrolaserpaars wurde mit der Ni-Chelat-Tinte und der große mit der Biotintinte funktionalisiert, zur selektiven Anbindung respektive von His-GFP und Streptavidin. Die Injektionssequenz der einzelnen Flüssigkeiten lautet: 90 s: His-GFP (10 $\mu\text{g/ml}$ in PBS); 390 s: PBS; 450 s: Imidazol (125 mmol/L in PBS); 465 s: PBS; 555 s: His-GFP (10 $\mu\text{g/ml}$ in PBS); 855 s: PBS; 915 s: Streptavidin (6 $\mu\text{g/ml}$ in PBS); 1.335 s.: PBS. (a) Gesamtemissionsspektrum des Laserpaars zu den in (b) markierten Zeitpunkten 1 bis 5. (b) Zeitlicher Rohsignalverlauf der in (a) hervorgehobenen exemplarischen Lasermoden ohne Referenzierung. Die jeweils unterbrochenen Plots repräsentieren die wechselseitig referenzierten Signale. Um das aufbereitete Signal von Mode A zu erhalten, wird das Rohsignal von Mode B unter Berücksichtigung der Temperatur- und Brechzahl sensitivitäten der einzelnen Mikrokelche in gewichteter Form vom Rohsignal von A subtrahiert, und umgekehrt. Nach erfolgter Referenzierung sind sämtliche temperatur- und brechzahlinduzierten Störungen aus den jeweiligen Signalverläufen verschwunden.

4.3.3 Biosensorik in unverdünntem Blutserum

Im zentralen Fokus der Bauteilcharakterisierung eines jeden Biosensors steht letztendlich dessen Signalverhalten in hochkomplexen multimolekularen Analyten, beispielsweise Blutserum oder Blutplasma, da letztendlich diese die Anwendbarkeit des Biosensors in einer realen Endanwendung markieren.^{7,214} Hierbei spielt die Oberflächenfunktionalisierung eine integrale Rolle, da über sie die Oberflächenspezifität eines Sensors eingestellt wird. Ziel dieser ist es eine hochselektive und –affine Anbindung des zu detektierenden Moleküls über ein geeignetes Akzeptormolekül zu ermöglichen. Gleichzeitig sollen nichtspezifische Anlagerungsmomente aller ebenfalls im Analyten vorhandenen Moleküle bestenfalls komplett unterbunden werden. In Kapitel 4.2.2 wurde bereits anhand eines nicht kompetitiven Ansatzes (im flüssigen Analyten ist lediglich eine Molekülart gelöst) unter Verwendung von BSA in PBS demonstriert, dass sich Phospholipidintinten für diese Aufgabenstellung potentiell sehr gut eignen. Im Folgenden wird nunmehr ein kompetitives molekulares Detektionsexperiment in unverdünntem Blutserum demonstriert.

Abbildung 4.35 zeigt das Ergebnis einer Streptavidindetektion unter Verwendung eines funktionalisierten Mikrokelchlaserspaars, analog zu dem in Abbildung 4.30 behandelten. Hierzu wurde der kleinere der beiden Kelche mit der nichtfluoreszenten Biotintinte beschichtet. Der große Kelch wurde mit reinem DOPC passiviert, sodass dieser vollständig unfunktional als Signalreferenz für den biotinylierten Kelch zur Verfügung steht. Anschließend wurde das Laserpaar in unverdünntes Kalbserum eingelegt und die kinetische Messreihe gestartet. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung kommt es bereits vor der Streptavidininjektion (Zeit < 0 Sekunden) zu einer geringen Rotverschiebung der Lasermoden beider Kelchlaser. Diese fällt allerdings trotz der hohen Serumkonzentration aufgrund der guten Passivierung durch die verwendeten Lipidfunktionalisierungen moderat aus. Zum Zeitpunkt 0 Sekunden wird das Streptavidin injiziert, welches zu 30 µg/ml in unverdünntem Kalbserum vorlag. Durch die Injektion werden kurzzeitig Serumbestandteile derart an die Oberflächen beider Kelche gedrängt, dass eine nichtspezifische Anlagerung der enthaltenen Serumbestandteile forciert wird. Diese Anlagerung erfolgt jedoch für beide Kelche gleichermaßen stark und beschränkt sich auf den Zeitpunkt der Injektion, sodass über eine Referenzierung die stufenförmige Störung aus dem Sensorsignal des biotinylierten Mikrokelches herausgefiltert werden kann. Erneut zeigt sich in diesem Experiment der Vorteil der Signalreferenzierung. Mithilfe des parallel aufgezeichneten Signals des passivierten Kelches lassen sich die durch das Serum ausgelösten nichtspezifischen Störsignalanteile aus dem Sensorsignal des biotinylierten Lasers herausfiltern. Um eine brauchbare Passivierung der Mikrokelche zu erzielen, wurde für dieses Detektionsexperiment die Haltezeit der AµCS-Funktionalisierung für jeden der Kelche auf eine Minute erhöht. Dies schlägt sich positiv auf die Sensorantwort des biotinylierten Mikrokelches nieder. Aufgrund der erhöhten Menge an deponierter Biotin-Tinte kann hier für 30 µg/ml Streptavidin nach erfolgter Signalreferenzierung eine Gesamtmodenverschiebung von etwa 1.100 pm gemessen werden. Dies entspricht einer etwa 6-fachen Signalverstärkung gegenüber dem in Kapitel 4.1.3 ermittelten Wert für eine komplette Monolagenbedeckung der Sensoroberfläche.

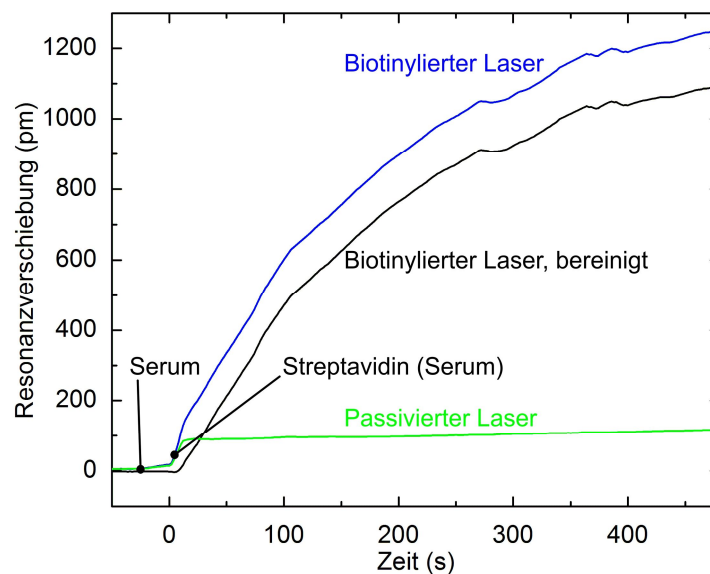


Abbildung 4.35: Detektion von Biomolekülen in unverdünntem Blutserum. Im vorliegenden Experiment wurde hierzu Streptavidin zu 30 µg/ml in Kalbserum gemischt. Während der kleine Kelch über Biotin-Gruppen verfügt, wurde der große Kelch mit reinem DOPC bestempelt, sodass dieser vollständig passiviert als Signalreferenz für den biotinylierten Kelch dient. Bereits vor dem Injektionszeitpunkt des mit Streptavidin gemischten Serums (0 s) befindet sich das Laserpaar in unverdünntem Serum. Durch die sehr guten passivierenden Eigenschaften der Phospholipidintinten tritt an beiden Mikrokelchen nur in äußerst geringem Maße eine unspezifische Anlagerung von Serumbestandteilen auf. Durch die verstärkte Anlagerung ist jedoch auf das Zeitfenster der Injektion begrenzt, während der Analyt eine Strömung aufweist. Durch Referenzierung des Signals des biotinylierten mit dem des unfunktionalen Lasers lassen sich die daraus resultierende Sprungfunktion sowie die übrigen Signaldrifts erfolgreich herausfiltern. Die unspezifische Anlagerung der Serumbestandteile wurde hierbei wie eine Brechzahlstörung behandelt. Der flache Kurvenverlauf des bereinigten Sensorsignals vor der Streptavidininjektion belegt die Legitimität dieser Annahme.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

In Kapitel 4 wurden neuartige Ansätze zur Oberflächenfunktionalisierung von Mikrokelchen mittels Phospholipidtinten aufgezeigt. Die Tinten können flexibel aus verschiedenen Lipidkomponenten zusammengesetzt werden. Dies kann genutzt werden, um neben der reinen molekularen Selektivität zur Bewältigung von biomolekularen Detektionsaufgaben im Rahmen einer „Multifunktionalisierung“ gezielt weitere nützliche Funktionen zu implementieren.

Durch den Einsatz einer Phospholipidtinte, die neben molekularen Akzeptoren einen Laserfarbstoff beinhaltet, konnte per DPN durch hochlokales Beschichten ausschließlich der lichtführende Randbereich von passiven Mikrokelchen diese in einem einzigen Prozessschritt zu molekular selektiven Biolasern transformiert werden. Die Biolaser wiesen sowohl in Luft als auch in Wasser sehr niedrige Laserschwellen im unteren zweistelligen Nanojoulebereich auf. In molekularen Detektionsexperimenten mit Streptavidin wurde an diesen Lasern ein mehr als doppelt so hohes Messsignal im Vergleich zu Mikrokelchen mit einer Monolage Streptavidin detektiert. Bedingt durch die Mobilität der Phospholipide werden die Streptavidinmoleküle in das Tintenvolumen eingelagert wodurch eine höhere Gesamtmasse an die Mikrolaser anhaften kann, als es im Monolagenfall möglich wäre. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DPN erstmals auf ein komplex dreidimensional vorstrukturiertes Substrat angewendet.

Während für die Biolaser-Experimente die Lipidtinten seriell per DPN auf die Mikrokelche aufgebracht wurden, wurde des Weiteren ein Depositionsverfahren entwickelt, welches großflächig eine hochparallele Beschichtung von Mikrokelchen erlaubt (*Aligned Microcontact Stamping / A μ CS, dt.: Justiertes Mikrokontaktstempeln*). Hierzu wurden spezielle Phospholipid-Stempelkissen entworfen, welche hochgenau mit ein- und zweidimensionalen Feldern von Mikrokelchen in Kontakt gebracht wurden. An aktiven Mikrokelchen wurde gezeigt, dass durch A μ CS keine negativen Auswirkungen auf die Bauteileigenschaften der Kelche entstehen. Aktuell ist dieses Verfahren hauptsächlich durch die rein manuell durchgeführte Stempelkissenpositionierung limitiert. Es konnten so Felder mit einer maximalen Größe von 10x10 Mikrokelchen zerstörungsfrei funktionalisiert werden. Bei hinreichend guter Ausrichtung des Stempelkissens blieben im Rahmen der durchgeführten Experimente an den 4x4- und 6x6-Kelchresonatorfeldern nach dem Stempelvorgang stets mehr als 95 % aller Bauteile intakt.

Bedingt durch die sehr gute Lokalisierung der Phospholipidtinten auf den Stempelkissen konnten auch sehr eng beieinander strukturierte Mikrokelchlaserelemente (Abstand ca. 3 μ m) ohne wechselseitige Kontamination mittels A μ CS selektiv mit unterschiedlichen Tinten funktionalisiert werden. Im Anschluss wurden die Laser in multimolekularen Detektionsexperimenten zeitgleich spektroskopisch ausgelesen und deren Sensorsignale zur wechselseitigen Referenzierung ausgenutzt, um effizient temperatur- und brechzahlinduzierte Signalstörungen zu minimieren. Auf diese Weise konnte das Konfidenzintervall der gezeigten biomolekularen Detektionsmessung um einen Faktor 5 verbessert werden. Durch geeignete Wahl der verwendeten Akzeptoren wurde darüber hinaus eine komplett in-situ durchführbare Rekonfigurierbarkeit der Mikrokelche gezeigt. An einem einzigen Kelch konnten so mehrere molekulare Anbindungen in direkter Abfolge durchgeführt werden.

Die Ergebnisse dieses Kapitels belegen, dass eine Oberflächenfunktionalisierung von Mikrokelchen mittels Phospholipidtinten diverse Vorteile hat. Zum einen werden die Tinten, unabhängig von ihrer Zusammensetzung, allesamt in einem einzigen Prozessschritt auf die Kelche aufgebracht. Sämtliche der standardmäßig notwendigen Inkubations- und Spülschritte entfallen komplett, wodurch diese Art der Funktionalisierung sehr zeit- und ressourcenschonend ist. Des Weiteren ist der Tintentransfer lösemittelfrei, was vor allem bei chemisch relativ instabilen Substratmaterialien wie dem hier für die Mikrokelche verwendeten PMMA von großem Vorteil ist. Die Beschichtung erfolgt stets unter Anwendung desselben standardisierten Funktionalisierungsprotokolls und muss nicht für jedes neue Akzeptormolekül neu entwickelt werden. Die Tinten können sehr flexibel aus verschiedenen molekularen Komponenten zusammengemischt werden, wodurch eine große Bandbreite von biosensorischen Anwendungen direkt ermöglicht wird. Hierbei beschränkt sich die Auswahl der in Frage kommenden Moleküle nicht auf die sehr große Auswahl an kommerziell erhältlichen kopfgruppenmodifizierten Phospholipide. Neben weiteren Akzeptormolekülen können auch andersartige Moleküle, welche komplett neue Bauteilfunktionen induzieren, den Tinten beigemischt

werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden z. B. Laserfarbstoffe verwendet, um passive Mikrokelche zu molekular selektiven Lasern zu transformieren, welche im Anschluss direkt auf eine biosensorische Detektionsaufgabe angewendet werden konnten. DOPC als neutrale Trägerkomponente weist zudem sehr gute molekulare Passivierungseigenschaften auf. Hierdurch wurde in der vorliegenden Arbeit eine wechselseitige Signalreferenzierung ermöglicht. Durch Beimischung funktionaler Komponenten entstehen somit hochbindungsspezifische Tinten mit vernachlässigbarer Anlagerungscharakteristik bindungsunspezifischer Proteine. Speziell Biotin- und Ni-Chelat-Tintenkomponenten stellen hierbei sehr interessante Realisierungsbeispiele dar, da diese beiden Bindungsmotive als universelle Anker zur Anbindung einer sehr großen Vielfalt von biotinylierten und His-markierten Akzeptormolekülen verwendet werden können.

In Kombination mit μ CS eröffnet diese Funktionalisierungsmethode in hohem Maße neue anwendungs- und herstellungstechnische Möglichkeiten. μ CS erlaubt erstmals eine hochparallele, hochdichte und selektive Oberflächenfunktionalisierung von WGM-Strukturen und ist somit kompatibel für die Massenherstellung. Die verwendeten Stempelkissen können hierbei zahlreiche unterschiedliche Tinten beherbergen und als „molekulare Bibliotheken“ fungieren. Mit dem verfügbaren Tintensammelsurium können so mit einem einzigen Stempelkissen Beschichtungen in unterschiedlichen Konfigurationen und Mustern flexibel und schnell realisiert werden, ohne die Notwendigkeit jeweils ein neues Stempelkissen herstellen zu müssen. Eine Adressierung einzelner Sensorstrukturen z. B. über komplexe Mikrokanalinfrastrukturen oder Mikropipetten entfällt komplett. Durch die große Vielfalt an möglichen Tintenkonfigurationen können des Weiteren passive und aktive Sensorelemente mit unterschiedlichen Akzeptoren flexibel auf einem einzigen Chip kombiniert werden. Die aktiven Elemente können hierbei unterschiedliche Arbeitswellenlängen aufweisen. Die Stempelkissen können mehrfach wiederverwendet werden. Im Fall der Mikrokelche erfolgt sowohl über μ CS als auch DPN die Tintenbeschichtung hochlokalisiert und somit sehr ressourcenschonend, was mit keiner der bisher bekannten Funktionalisierungen von WGM-Sensorstrukturen erreicht werden konnte. Die Funktionalisierung per μ CS kann in hochparallelem Maßstab erfolgen, zugunsten einer signifikant verkürzten Prozesszeit. Der Tintentransfer wird hierbei in-situ über die Farbveränderung der Tinten beobachtet und gesteuert werden, was interessante Möglichkeiten für eine Prozessautomatisierung eröffnet. Über photolithographische Umgestaltung der Stempelkissen lässt sich μ CS auch auf andere Sensorgeometrien anwenden. Während die modernen photolithografischen Prozesse sowohl eine sehr hoch aufgelöste als auch großflächige Herstellung der Stempelkissen ermöglichen, ist die Oberflächenfunktionalisierung großer Sensorbauteilfelder vor allem durch die räumliche Auflösung hinsichtlich der Stempeljustage vorgegeben.

Am Beispiel von Anti-Il-6 und Anti-TNF Antikörpern wurde die Detektion zweier klinisch relevanter Antikörper erfolgreich demonstriert, mit Detektionslimits jenseits der therapeutisch anzutreffenden Dosiswerte. Per μ CS funktionalisierte Mikrokelche können demnach wirkungsvoll zur medikamentösen Dosiseinstellung von TNF- und Il-6-überproduzierenden Patienten eingesetzt werden. Besonders aufgrund der Kompatibilität zur Massenherstellung erweisen sich derart funktionalisierte Kelche auch aus wirtschaftlicher Sicht als besonders interessant.

Das hier gezeigte parallele Auslesen zweier Mikrokelche eröffnet die Möglichkeit einer optimierten Durchführung von molekularen Detektionsexperimenten. Hierdurch ist es zum einen möglich mehrere Moleküle in einem Analyten zeitgleich zu detektieren. Durch die wechselseitige Referenzierung der einzelnen Sensorsignale kann zusätzlich Störeinflüssen wie z. B. Temperatur- und Brechzahlsschwankungen im Analyten sowie bindungsunspezifischen molekularen Anlagerungen begegnet werden und somit potentiell das Detektionslimit verbessert werden. Derartige Störungen treten vor allem in portablen Messsystemen und bei komplexen multimolekularen Analyten auf, wodurch sich durch die gezeigte Signalreferenzierung hier interessante Lösungsansätze bieten. Vor allem die kurze Distanz der Mikrokelche könnte sich als besonders wirkungsvoll erweisen, da lokal auftretende Störeffekte nahezu zeitgleich an beiden Sensorelementen auftreten würden. Mit μ CS steht hier ein effektives Mittel zur selektiven Oberflächenfunktionalisierung der einzelnen Kelche zur Verfügung. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte referenzierende Detektionsschema ermöglichte, bedingt durch die sehr guten Passivierungseigenschaften der Phospholipidintinten, eine Detektion von Streptavidin in unverdünntem Kalbserum.

Auch die erstmals an WGM-Sensoren gezeigte in-situ durchführbare komplette Rekonfigurierbarkeit stellt einen großen Fortschritt zu gängigen Methoden dar, die entweder einen Ausbau aus dem optischen Versuchsaufbau voraussetzen oder in deren Rahmen lediglich die detektierten Proteine wieder von der Oberflächenfunktionalisierung gelöst werden.^{36,215} Das hier präsentierte Verfahren über die Ni-Chelat-Gruppen kann schnell und direkt während eines molekularen Experimentes durchgeführt werden, ohne hierbei die Sensoren bzw. das Sensorsignal negativ zu beeinträchtigen oder den Sensor aus dem Versuchsaufbau entnehmen zu müssen.

Abbildung 4.36 schildert zusammenfassend die Funktionalitäten welche im Rahmen dieser Arbeit mit Phospholipidtinten erzielt wurden.

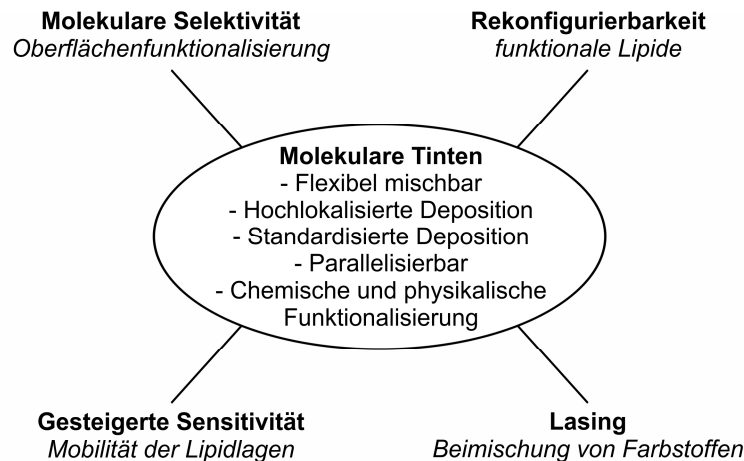


Abbildung 4.36: Zusammenfassende Darlegung der positiven Aspekte einer Oberflächenfunktionalisierung mittels Phospholipidtinten sowie der in dieser Arbeit erzielten chemischen und physikalischen Zusatzeffekte. Neben der (grundsätzlich intendierten) molekularen Selektivität lässt sich des Weiteren eine gesteigerte molekulare Sensitivität erzielen sowie, über eine geeignete Auswahl der Tintenzusammensetzung, Lasing generieren und eine vollständige Rekonfigurierbarkeit der Oberflächenfunktionalisierung realisieren.

In der vorliegenden Arbeit kam für die Realisierung der Biolaser aus Kapitel 4.1 hauptsächlich der Laserfarbstoff Rhodamin B als Lipidkopfgruppe zum Einsatz. In künftigen Experimenten könnten weitere Laserfarbstoffe angewendet werden, um neue Spektralbereiche und somit Arbeitswellenlängen zu erschließen. Diese könnten per A μ CS auf die einzelnen Mikrokelche eines einzigen Chips gebracht werden. Besonders interessant wäre hierbei die Integration unterschiedlicher Farbstoffe auf einem einzigen Chip, möglichst über den gesamten VIS-Bereich. In ersten Vorversuchen wurden in dieser Arbeit bereits einige Farbstoffe erfolgreich als Farbstoffe für Lasertinten getestet, z. B. PM 597 und 4-dicyanomethylene-2-methyl-6-(p-dimethylaminostyryl)-4H-pyran (DCM) (Abbildung 4.37). Die jeweiligen Tinten wurden mit einer Pipette manuell auf passive Mikrokelche appliziert. Die Ergebnisse belegen, dass die Farbstoffmoleküle nicht zwingend als Kopfgruppe an ein Lipid gebunden sein müssen, sondern auch direkt in das Trägerlipid DOPC eingebettet werden können. Mit den beiden Laserfarbstoffen lässt sich die Arbeitswellenlänge der generierten Biolaser bereits über einen Wellenlängenbereich von 84,5 nm einstellen.

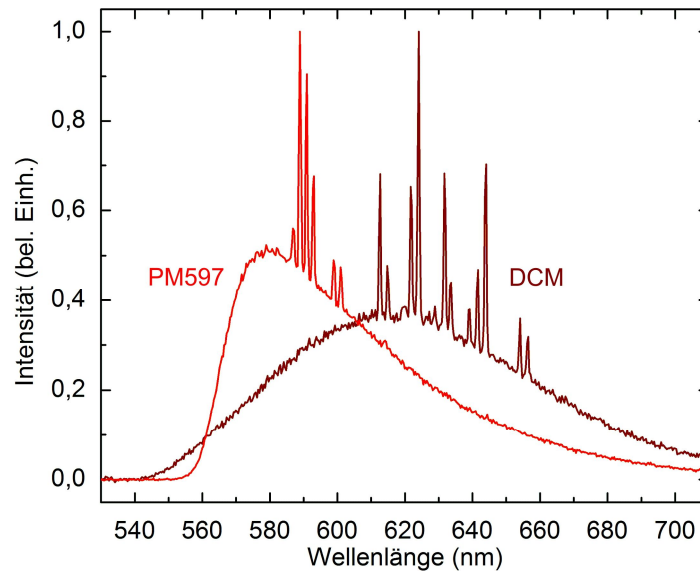


Abbildung 4.37: Breitbandige Einstellung der Arbeitswellenlänge von Biolasern durch Implementierung unterschiedlicher Laserfarbstoffe. Neben dem im Rahmen dieser Arbeit standardmäßig eingesetzten Rhodamin B kann des Weiteren beispielsweise PM 597 und DCM als Laserkomponente in Lipidtinten verwendet werden, um den Arbeitswellenlängenbereich über einen etwa 85 nm weiten Bereich zu definieren.

Durch die Imitation von Zelloberflächen könnten die mit Phospholipidtinten belegten Mikrokelche zur Erforschung von Zell-Zell-Interaktionen herangezogen werden. Hierbei kann der zeitliche Sensorsignalverlauf der Kelche hochaufgelöst Rückschlüsse auf Adhäsionsdynamiken der untersuchten Zellen an die Lipidlagen der Mikrokelche geben.

Während sich die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse auf die technologische Demonstration der vielseitigen Einsetzbarkeit der Phospholipidtinten auf die Mikrokelche fokussiert, könnten im Folgenden die Kelche in einer gezielten Endanwendung zum Einsatz kommen.

Während die Justierung und das Inkontaktfahren der im Rahmen der vorliegenden Experimente verwendeten μ CS-Stempelkissen gänzlich manuell gesteuert wurden, würde ein automatisiertes Stempelverfahren eine Reihe von Verbesserungen mit sich bringen. Durch hochgenaue sensorische Minimierung der Winkelfehler zwischen der zu beschichtenden Probe und dem Stempelkissen würden sich zum einen sehr große Sensorfelder zerstörungsfrei beschichten lassen. Zum anderen wäre durch die genauere Einstellung des Abstandes zwischen den Kelchen und dem Stempelkissen eine homogenere und reproduzierbarere Beschichtung aller Kelche zu erwarten. Während die manuelle Stempelkissenausrichtung einen gewissen zeitlichen Aufwand darstellt, könnte durch eine automatisierte Beschichtung wesentlich Prozesszeit eingespart werden.

Besonders interessant wäre es auch, ganze Mikrokelcharrays parallel auszulesen, um auf diese Weise komplexere Analyten wie Blut multimolekular charakterisieren zu können. Für eine signalreferenzierte Detektion müsste dann mindestens ein vollständig passivierter Mikrolaser vorhanden sein. Während die Oberflächenfunktionalisierung hier ebenfalls per μ CS vorgenommen werden könnte, müsste besonders für längere Resonatorzeilen der Pumpspot adäquat geformt werden, sodass eine effiziente Anregung aller Mikrolaser ermöglicht wird. Mit den technischen Möglichkeiten des aktuell am APH verfügbaren Messaufbaus lassen sich mit dem im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ausleseverfahren maximal vier Kelche zeitgleich mit dem Spektrometer auslesen (Abbildung 4.38). Mithilfe eines weniger stark vergrößernden Mikroskopobjektivs ließe sich die maximale Anzahl der Kelche auf etwa zehn erhöhen. Ein sequentielles Auslesen vieler Kelche, z. B. durch Adressierung mithilfe eines elektrischen Mikrospiegels, würde eine Verbesserung des aktuellen Signal-Rausch-Verhältnisses erfordern, zur Minimierung der Signalintegrationszeit.

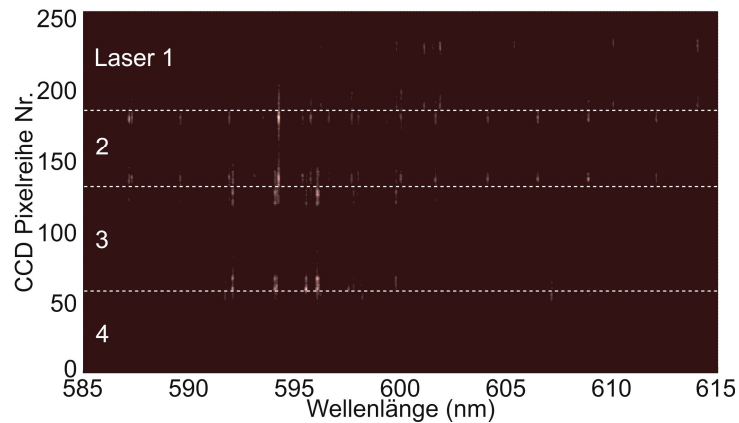


Abbildung 4.38: Paralleles spektrales Auslesen von vier Mikrokelchlasern. Im Rahmen der in Kapitel 4 diskutierten Resultate wurden die verschiedenen Aspekte einer parallelen Signalauswertung unter Einbeziehung von zwei Mikrokelchlasern dargelegt. Mit dem aktuellen optischen Versuchsaufbau am APH lassen sich maximal vier Laser parallel adressieren. Die hier betrachteten Mikrokelche besaßen vor dem finalen thermischen Aufschmelzprozess im Rahmen ihrer Fabrikation Resonatordurchmesser von 30, 35, 40 und 45 μm (Laser 1 bis Laser 4).

In der in Kapitel 4.3 behandelten Signalreferenzierung wurden stets die Injektionszeitpunkte als Hauptquelle für Störsignale angenommen. Zu jedem Injektionszeitpunkt wurde anhand der visuellen Auswertung der Sensorsignale von Referenz- und Sensorelement neu über die Art der Störung entschieden und diese dann über den jeweiligen Korrekturparameter rechnerisch herausgefiltert, was für die gezeigten Experimente zu brauchbaren Ergebnissen führte. Störeinflüsse können jedoch über das gesamte Detektionsexperiment hinweg stattfinden. Oft kann hierbei die Natur der Störung nicht explizit zugeordnet werden. Im Rahmen einer automatisierten Signalreferenzierung könnte man eine kontinuierliche softwaregestützte Signalreferenzierung vornehmen. Hierbei würde man zu jedem Zeitpunkt die temporale Signalprogressionen der involvierten Sensorstrukturen mit den theoretisch zu erwartenden Signalverläufen vergleichen (exponentiell sättigende Signalkurve für den Detektions- und eine Nulllinie für den Referenzkelch). Durch Applizierung aller möglichen TS/BRIS-Kombinationen könnte dann das Sensorsignal mit der minimalen Abweichung in-situ rekonstruiert werden.

Kapitel 5

Multifunktionale Oberflächenfunktionalisierung von Mikrokelchchips per CVD-Polymerisation

Zusammenfassung[†]

Von integraler Bedeutung für die Verwendung von miniaturisierten Biosensoren ist deren Integration in eine mikrofluidische Infrastruktur. Mit dieser wird nicht nur das benötigte Analytvolumen signifikant minimiert, sondern auch ein portabler Einsatz im Sinne eines Lab-on-a-Chip-Systems ermöglicht.

In diesem Kapitel wird präsentiert, wie die Oberflächenfunktionalisierung von Sensorelementen gleichzeitig auch zu deren Verkapselung herangezogen werden kann. Verwendet werden hierzu funktionalisierte Oberflächenpolymere, die per chemischer Gasphasenabscheidung (CVD) auf die Chipsubstrate aufgebracht werden. Zum Einsatz kommen hierbei verschiedene Poly(p-Xylylene), welche vielseitig mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen substituiert sind. Die Gruppen werden in dieser Arbeit zum einen, gemäß ihrem ursprünglichen Anwendungszweck, zur kovalenten Immobilisierung von Akzeptormolekülen an die Mikrokelche verwendet. Darüber hinaus werden die umliegenden Chipbereiche, die nicht zur Oberflächenfunktionalisierung beitragen, zur Verschließung der Kelche mit chipbasierten mikrofluidischen Kanalstrukturen herangezogen. Durch Auswahl geeigneter funktioneller Gruppen geschieht die Versiegelung der Chips bei Raumtemperatur. Über Schichtdickenvariation der Poly(p-Xylylene) lässt sich des Weiteren der optische Überlapp mit dem Analytvolumen gezielt einstellen und auf diese Weise die Sensitivität der Mikrokelche optimieren. Der Einsatz als Biosensor der so hergestellten Lab-on-a-Chips wird anhand von Detektionsexperimenten mit klinisch relevanten Proteinen gezeigt.

Neben den verkapselten Mikrokelchen werden weitere Anwendungen erörtert. So wird der obige Funktionalisierungs- und Verkapselungsansatz zum einen dazu verwendet markerbasierte Lab-on-a-Chips zu realisieren. Bei sehr nahe beieinander strukturierten Scheibenlasern aus PMMA wird zum anderen, unter Ausnutzung der äußerst konformen Abscheidungseigenschaften, deren lateraler Abstand derart verjüngt, dass eine photonische Interaktion der Scheiben realisiert wird. Über die Definition der Kopplungsspaltweite wird auf diese Weise über den Vernier-Effekt die Anzahl der vom gekoppelten Resonatorsystem unterstützten Lasermoden bis hin zum monomodigen Lasing eingestellt.

[†] Teile dieses Kapitels wurden bereits in folgenden Publikationsschriften veröffentlicht:

Grossmann, T., Wienhold, T., **Bog, U.**, Beck, T., Friedmann, C., Kalt, H. und Mappes, T. *Light Sci. Appl.*, **2**, e82–1–4 (2013).

Bally-Le Gall, F., **Bog, U.**, Cheng, K., Köber, S., Mappes, T., Koos C. und Lahann, J. *eingereicht*.

Bog, U., Bally-Le Gall, F., Hussal, C., Siegle, T., Kraemmer, S., Wienhold, T., Bräse, S., Kalt, H., Lahann, J., Mappes T. und Koos, C. *Manuskript in Erstellung*.

5.1 CVD-funktionalisierte Mikrokelche

Eine Oberflächenfunktionalisierung von WGM-Sensorstrukturen lässt sich auf vielfältige Art und Weise bewerkstelligen (s. Kapitel 2.2). Die jeweils benötigte chemische Prozedur allerdings ist hierbei in hohem Maße abhängig vom Material der Sensoroberfläche und kann je nach Oberflächenchemie diverse, mitunter zeit- und ressourcenintensive, Teilprozessschritte umfassen. Für die große Mehrzahl der etablierten WGM-Sensoren kommen Quarzglas sowie Silizium zum Einsatz.^{57,58,216} Die (kovalente) Immobilisierung von Akzeptormolekülen erfolgt hier in der Regel über mehrere Prozessschritte. Der erste Schritt beinhaltet die Behandlung der Sensoroberflächen mit Sauerstoffplasma (im Fall von Quarzglas) bzw. mit Piranha- oder RCA-Ätzlösungen (Silizium), da ansonsten nicht genügend Hydroxygruppen für eine ausreichend dicht gepackte Oberflächenfunktionalisierung vorhanden wären.^{36,215,216} Während erstgenannte Prozedur lediglich eine gewisse Zeit- und somit Kostenerhöhung darstellt, kommt es bei der Präparation von Silizium zusätzlich zum Einsatz kritischer Gefahrstoffe, welche eine komplexe Handhabung erfordern. An die generierten Hydroxygruppen wird anschließend per Silanisierung eine molekulare Zwischenlage angebracht, an welche dann die eigentliche Immobilisierung der Akzeptormoleküle erfolgt. Alternative Ansätze umfassen eine direkte Immobilisierung von Molekülen bzw. Mediatorschichten per Physisorption, an welche darauffolgend die Akzeptormoleküle angebunden werden. Diese Schichten können von biologischer oder nichtbiologischer Art sein. Demonstriert wurden beispielsweise Biotin, Protein A und G sowie chemisch modifiziertes BSA und Hydrogel.^{17,84,186,212} Diese Ansätze erlauben eine relativ unkomplizierte Immobilisierung von Akzeptormolekülen, allerdings erweisen sich kovalente Anbindungsmethoden mitunter als homogener und mechanisch stabiler. Letzterer Punkt spielt vor allem dann eine Rolle, falls die Sensorstrukturen in einer mikrofluidischen Infrastruktur im Sinne eines Lab-on-a-Chip betrieben werden sollen. Darüber hinaus ist die Auswahl von kompatiblen Akzeptormolekülen eingeschränkt.

Eine vielversprechende Option zur Oberflächenfunktionalisierung von WGM-Sensoren bietet die Verwendung von funktionellen CVD-Polymeren.^{217,218} Diese werden über einen chemischen Gasphasenabscheidungsprozess (CVD; engl.: chemical vapor deposition) auf die jeweilige Substratoberfläche als Dünnschicht polymerisiert, auf welcher sie als reaktive Schicht für eine Akzeptormolekülimmobilisierung fungieren. Über die funktionellen Gruppen des jeweils verwendeten Monomers lassen sich gezielt funktionelle Polymere mit hochdefinierten chemischen Eigenschaften realisieren.

Die CVD-Polymerisation wurde als Alternative zu lösemittelbasierten Verfahren (z. B. Schleuder- und Sprühbeschichtung) zur Substratbeschichtung mit funktionalen Polymeren entwickelt,²¹⁹ ebenfalls mit dem primären Ziel molekulare Akzeptoren für analytische Anwendungen kovalent an eine Substratoberfläche zu binden. Jedoch besitzt die CVD gegenüber den lösemittelbasierten Depositionstechniken einzigartige Vorteile. Da die Beschichtung aus der Gasphase erfolgt, werden keinerlei Lösemittel bzw. zusätzliche Chemikalien benötigt. Dies führt zu verbesserten Beschichtungsergebnissen, einer erhöhten Biokompatibilität und chemisch reineren Oberflächen. Die Beschichtungen sind defektfrei und äußerst konform, wodurch eine homogene Bedeckung selbst von dreidimensionalen Substraten ermöglicht wird. Des Weiteren ist die Beschichtung weitestgehend unabhängig vom Substratmaterial. Dies ermöglicht zum einen sehr breite Anwendungsmöglichkeiten auf unterschiedliche Sensor-plattformen.²²⁰ Zum anderen ist die anschließende chemische Prozedur zur Akzeptormolekülimmobilisierung nun vom Sensormaterial entkoppelt und kann somit sehr leicht standardisiert durchgeführt werden. Bis dato existieren zahlreiche Beschichtungstechniken, wie z. B. die Initiated Chemical Vapor Deposition (iCVD; zu dt. etwa initiierte CVD), die Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition (PECVD; zu dt. etwa plasmaunterstützte CVD) und die Oxidative Chemical Vapor Deposition (oCVD; zu dt. etwa oxidative CVD). Einen guten Überblick über die verschiedenen CVD-Ansätze bieten die Artikel von Alf und Kollegen,²¹⁷ Ozaydin-Ince und Kollegen²¹⁸ sowie Tenhaeff und Gleason.²²¹

Während zahlreiche Materialien und Beschichtungsmethoden existieren, stellt vor allem die chemische Gasphasenpolymerisation von Poly(*p*-Xylylen) (PPX) nach Gorham das mitunter am weitesten verbreitete und elaborierte Verfahren dar.²²² Hierbei wird die monomere Vorstufe [2.2]Paracyclophan ([2.2]PCP) mittels Pyrolyse bei niedrigen Drücken auf ein gekühltes

Zielsubstrat aufpolymerisiert. Da die Polymerisation entlang der gesamten temperierten Substratoberfläche stattfindet, erfolgt die Dünnschichtbildung hochkonform, wodurch selbst komplexe dreidimensionale Strukturen homogen beschichtet werden können.²²³ Die funktionellen Gruppen von [2.2]PCP sind flexibel chemisch substituierbar, wodurch ein sehr breites Anwendungsspektrum ermöglicht wird.^{219,224} Beispielsweise ist unmodifiziertes PPX unter den Markennamen Parylen N und mit Chlor terminiertes PPX als Parylen C bzw. D etabliert. Aufgrund ihrer hohen chemischen Reaktionsträgheit finden diese Materialien breite Anwendung z. B. in der Verkapselung organischer und anorganischer elektrischer Bauteile,^{225–227} der biokompatiblen Beschichtung von Blutbeuteln und medizinischen Prothesen sowie zahlreichen weiteren biologischen Anwendungen.^{224,228–231}

Seit den späten 1990er Jahren konzentrierten sich viele wissenschaftliche Arbeiten vermehrt auf die Anwendung von maßgeschneiderten PPXen zur Realisierung von definierten funktionellen Oberflächen für biomolekulare Studien sowie Zellimmobilisierungsexperimenten.^{219,224,232} Ständig werden neue PPX-Substituenten entwickelt, welche auf vielfältige Art und Weise als Startschicht für gezielte chemische Immobilisierungsprotokolle fungieren. Die dato verfügbare Auswahl schließt beispielsweise PPXe ein, deren funktionelle Gruppen die Anbindung von Molekülen per EDC-Chemie (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid),²³³ Photochemie^{223,234} und Klick-Chemie^{235,236} erlauben. Die Beschichtung kann auf unterschiedliche Substratmaterialien erfolgen, wodurch eine breite plattformunabhängige Anwendung ermöglicht wird.²²⁰ Der Hauptteil der bisher realisierten Applikationen konzentriert sich auf die Beschichtung von passiven Trägersubstraten, wie z. B. flachen Chipsubstraten, Membranen, Mikrokanälen, aber auch medizinischen Implantaten.^{224,228,231} Seit etwa 2008 werden funktionelle PPXe vereinzelt auch auf funktionale Substrate angewendet. Zum einen wurden sie beispielsweise als funktionelles Material für Gassensoren,²³⁷ zum anderen als Startschicht zur Oberflächenfunktionalisierung von plasmonischen Sensorsubstraten und Substraten für die oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie eingesetzt.^{238,239} Durch den Einsatz anderer CVD-Polymere wurden bereits WGM-Gassensoren realisiert.²⁴⁰ Die verwendeten CVD-Lagen wurden hierbei zur unselektiven Absorption unterschiedlicher organischer Lösemittel und Wassermoleküle verwendet. Eine Anwendung von CVD-Polymeren auf WGM-basierte Strukturen zur Realisierung eines Biosensors wurde bis dato nicht gezeigt.

Neben der Oberflächenfunktionalisierung eröffnet die Beschichtung mit funktionellen PPX-Substituenten zudem interessante Möglichkeiten, die Oberflächen von Chipsubstraten miteinander zu verbinden.²⁴¹ Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies gezielt genutzt, um Mikrokelchlasern als Biosensoren in eine chipbasierte mikrofluidische Kanalstruktur zu integrieren. Details hierzu finden sich in Kapitel 5.2.

Kapitel 5.1 behandelt die Applizierung von funktionellen PPXen als Startschicht zur Oberflächenfunktionalisierung von Mikrokelchen.²⁴² Zum Einsatz kommen hierbei primär zwei Materialien: Zum einen Poly(4-Carboxysäurepentafluorphenolester-*p*-Xylylen-*co-p*-Xylylen) (PPX-PFP), welches Aktivestergruppen zur Anbindung von aminoterminalisierten Molekülen aufweist.²⁴³ Zum anderen Poly(4-Formyl-*p*-Xylylen-*co-p*-Xylylen) (PPX-CHO), welches über Aldehydgruppen zur selektiven Anbindung von hydrazidterminierten Akzeptormolekülen verfügt.²⁴¹ Die CVD-Polymerisation der Materialien resultiert in einer hochkonformen allseitigen Beschichtung der Mikrokelchstrukturen. Der schichtdickenabhängige Einfluss auf die Bauteilfunktionalität der Mikrokelchlasern wird im Detail diskutiert. Die Einführung der PPX-Schichten führt, bedingt durch den höheren Brechungsindex im Vergleich zu PMMA, zu einer Erhöhung der BRIS über einen weiten Schichtdickenbereich. Über eine geeignete Auslegung der Schichtdicke kann hierbei die BRIS der Mikrokelchlasern maximiert werden, während deren Laserschwelle lediglich eine vernachlässigbare Erhöhung erfahren. In einem biomolekularen Detektionsexperiment wird das chemische Anbindungsverhalten beider CVD-Materialien im Detail untersucht. Anschließend wird die Einsetzbarkeit der CVD-beschichteten Mikrokelche als Biosensoren in klinisch relevanten Anwendungen demonstriert. Mit PPX-PFP wurden im Rahmen dieser Arbeit darüber hinaus Mikrokelchlasern in eine stabile chipbasierte mikrofluidische Kanalstruktur integriert (Kapitel 5.2). Die Verkapselung fand hierbei bei Raumtemperatur statt.

5.1.1 Chemische Gasphasenabscheidung funktioneller Poly(*p*-Xylylene)

In dieser Arbeit kommt die chemische Gasphasenabscheidung von [2.2]PCP nach dem Gorham-Verfahren zum Einsatz.²²² Diese ist besonders geeignet, um PMMA-Mikrokelche zu funktionalisieren. Da die Beschichtung lösemittelfrei und unterhalb der Raumtemperatur durchgeführt wird, findet keinerlei negative Beeinträchtigung des PMMA sowie der darin eingebetteten Laserfarbstoffe statt. Des Weiteren findet die Beschichtung, wie später im Detail dargestellt, hochkonform statt, sodass auch die Unterseiten der Kelche homogen mit funktionellen Gruppen belegt werden. Über die geeignete Auswahl der funktionellen Gruppen ist eine sehr hohe Flexibilität in der Immobilisierung unterschiedlicher Akzeptormoleküle gegeben, wodurch sich leicht ein breites Applikationsspektrum realisieren lässt. Beim Gorham-Verfahren wird das Ausgangsmaterial [2.2]PCP in einem Pyrolyseofen in reaktive Monomere gespalten, welche im Anschluss mit Hilfe eines angelegten Argonstromes auf eine gekühlte Substratoberfläche geleitet werden, um dort spontan zu polymerisieren. Der Prozess ist in Abbildung 5.1 dargestellt. Das [2.2]PCP weist hierbei die auf die jeweilig intendierte Anwendung abgestimmten funktionellen Gruppen R_1 bis R_4 auf.

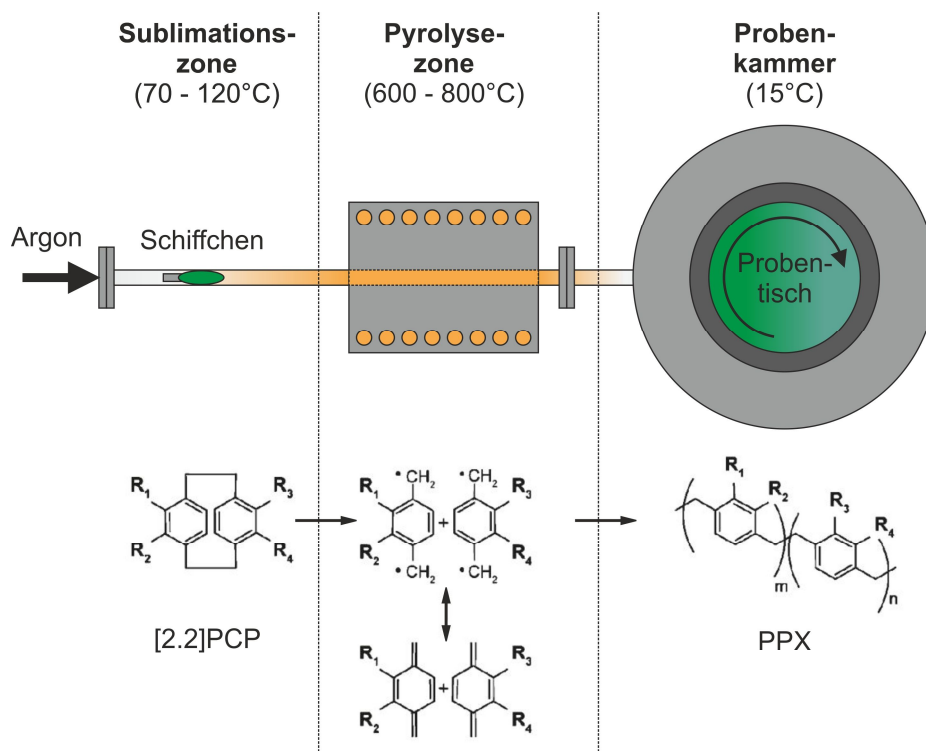


Abbildung 5.1: Allgemeine schematische Darstellung der CVD-Polymerisation von funktionellem Poly(*p*-Xylylen) (PPX) nach dem Gorham-Verfahren. Der Prozess unterteilt sich in drei Teilschritte. Die jeweilige molekulare Form der Vorstufe [2.2]Paracyclophan ([2.2]PCP) ist unterhalb der Schemadarstellung abgebildet. Je nach intendierter Anwendung weist dieses bis zu vier ausgewählte funktionelle Gruppen R_1 bis R_4 auf. Das in ein Quarzglasschiffchen eingefüllte [2.2]PCP wird bei niedrigen Temperaturen bis zu 120 °C sublimiert und passiert per Argonstrom einen Pyrolyseofen. Dort erfolgt bei Temperaturen zwischen 600 und 800 °C eine Aufspaltung in reaktive Monomereinheiten. Diese werden durch den Argonstrom in die Probenkammer weitergeleitet, wo durch die gekühlte Probenhalteroberfläche die PPX-Polymerisation initiiert wird.

Besonders aussichtsreiche Kandidaten zur Oberflächenfunktionalisierung der Mikrokelche sind die Materialien PPX-PFP und PPX-CHO. Mit PPX-CHO erfolgt die Immobilisierung von hydrazidterminierten Akzeptormolekülen hoher Selektivität und Ausbeute.²⁴¹ Bei PPX-PFP erlauben die Pentafluorphenolestergruppen eine kovalente Anbindung von aminoterminierten Akzeptormolekülen, wodurch potentiell selbst unmodifizierte Proteine und Antikörper direkt angebunden werden können.²⁴³ Aus selbigem Grund ist bei diesem Material jedoch stets eine vollständige Belegung der Pentafluorphenolestergruppen anzustreben, da sich in einem molekularen Detektionsexperiment ansonsten die Proteine des Analyten ungewollt an die verbleibenden freien

Estergruppen der CVD-Lage anlagern könnten. PPX-PFP ist besonders vielversprechend für eine Endanwendung in einem Lab-on-a-Chip, da mit diesem eine Verkapselung bei Raumtemperatur stattfinden kann (Kapitel 5.2). Des Weiteren sind die beschichteten Substrate ohne Weiteres auch über einen längeren Zeitraum unter Raumbedingungen stabil, während PPX-CHO-beschichtete Strukturen aufgrund der Aldehydaktivität bevorzugterweise in inerte Atmosphäre gelagert werden sollten. Beide CVD-Materialien weisen im spektralen Absorptions- und Emissionsbereich von PM 597 eine hohe Transparenz auf. Die Vor- und Nachteile der einzelnen Materialien sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Charakteristika von PPX-CHO und PPX-PFP in der Übersicht.

	PPX-CHO	PPX-PFP
Funktionelle Gruppe	R-CHO (Aldehyd)	R-COO-C ₆ F ₅ (Pentafluorphenolester)
Ankoppelbare molekulare Gruppen	R-N ₂ H ₃ (Hydrazid) R-NH ₂ (Amino)	R-NH ₂ (Amino)
Vorteile	Vorstufe chemisch stabil an Raumtemperatur Anbindung von hydrazidterminierten Moleküle bei Raumtemperatur und ohne Katalysator Anbindung von aminotermiintierten Molekülen nur bei erhöhten Temperaturen → Geringe nichtspezifische Anlagerung von Proteinen während eines molekularen Detektionsexperimentes	Beschichtete Chips chemisch stabil an Raumtemperatur Proteine und Antikörper können direkt über ihre Amino-Termini immobilisiert werden Anbindung von aminotermiintierten Moleküle bei Raumtemperatur ermöglicht Verkapselung der Mikrokelche bei Raumtemperatur
Nachteile	Beschichtete Chips sollten bei Bedarf an inerte Atmosphäre gelagert werden	Gefahr der Anlagerung von Proteinen während eines molekularen Detektionsexperimentes bei unvollständiger Oberflächenfunktionalisierung

Im weiteren Verlauf von Kapitel 5.1 kommen sowohl PPX-PFP und PPX-CHO zum Einsatz. Es wird der Einfluss der beiden Materialien auf die optischen Bauteileigenschaften der Kelche (Kapitel 5.1.2) sowie das chemische Anbindungsverhalten von Akzeptormolekülen (Kapitel 5.1.3) eingehend untersucht. Mit PPX-PFP werden letztendlich an Raumtemperatur verkapselte mikrofluidische Lab-on-a-Chips realisiert (Kapitel 5.2). Anschließend wird die klinische Anwendbarkeit von CVD-funktionalisierten Mikrokelchen demonstriert.

Sowohl PPX-PFP als auch PPX-CHO werden nach ähnlichen Prozeduren wie von Chen und Kollegen²⁴¹ und Waterkotte und Kollegen²⁴³ beschichtet. Die jeweilige [2.2]PCP-Vorstufe ([2.2]Paracyclophan-4-Formyl (Prec1) für PPX-CHO, [2.2]Paracyclophan-4-Carboxysäure-pentafluorphenolester (Prec2) für PPX-PFP) wird hierzu in einen Glastiegel gefüllt, in der Vorkammer bei ca. 0,2 mbar sublimiert und anschließend über einen Argonstrom (20 sccm) in den Pyrolyseofen geleitet. Die Prozesstemperatur im Ofen beträgt 560 °C für Prec2 und 660 °C für Prec1. Der drehbare Probenhalter, auf welchem die zu beschichtenden Proben platziert werden, ist auf 15 °C temperiert. Anhand von parallel zu den Mikrokelchen beschichteten Referenzproben aus Silizium wird die Schichtdicke der jeweiligen Beschichtung per Ellipsometer (J. A. Wollam M-44, LOT-Quantum-Design GmbH) gemessen.

5.1.2 Charakterisierung der beschichteten Mikrokelche

Die REM-Aufnahme in Abbildung 5.2(a) zeigt zwei PPX-CHO-beschichtete Mikrokelche. Während der rechte Kelch vollständig intakt ist, wurde aus dem linken ein Teil des Randbereiches mit einem fokussierten Helium-Ionenstrahl herausgeschnitten, um auf diese Weise Einblick in die Materialdistribution im Querschnitt zu erhalten. Die vergrößerte Aufnahme dieses Bereiches verdeutlicht, dass sowohl die Ober- als auch die Unterseite des Resonators homogen und defektfrei mit PPX-CHO belegt werden, obwohl die Unterseite während der Beschichtung stark vom [2.2]PCP-Materialstrom abgewandt ist (Abbildung 5.2(b)). Somit steht die gesamte Sensoroberfläche für die Immobilisierung von Akzeptormolekülen zur Verfügung. Durch die Abschattung der Unterseite vor der Materialwolke ist die resultierende Schichtdicke dort etwa 30 % niedriger als auf der Oberseite (im vorliegenden Fall: 100 nm im Vergleich zu 140 nm). Um die PPX-Lage visuell besser vom PMMA abzuheben, wurde der untersuchte Kelchchip vor und nach der CVD-Deposition unter flachem Winkel allseitig per Sputterbeschichtung mit Gold beschichtet.

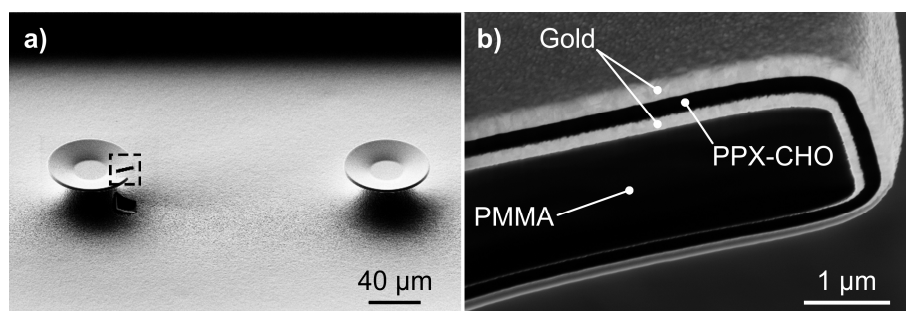


Abbildung 5.2: Charakterisierung des Abscheidungsprofils der CVD-Polymerisation anhand von PPX-CHO. (a). REM-Aufnahme zweier Mikrokelche. Der Randbereich des linken Mikrokelchs wurde mit einem fokussierten Ionenstrahl angeschnitten, um Einblick in die Materialdistribution im Querschnitt zu bekommen. (b) Vergrößerte Ansicht des markierten Bereiches aus (a). Obwohl der untere Randbereich stark vom [2.2]PCP-Materialstrom abgewandt ist, findet dennoch auch hier die PPX-Polymerisation statt. Die resultierende PPX-Beschichtung weist über das gesamte Bauteil hinweg eine gute Homogenität auf. Zur Kontrastverbesserung wurden die Mikrokelche vor und nach der PPX-Beschichtung mit Gold besputtert.

Durch die Polymerbeschichtung wird der an den Kelchstrukturen angrenzende Brechungsindex verändert.²⁴⁴ Die messtechnisch ermittelte Brechzahlfunktion (Ellipsometer Woollam VASE, LOT-QuantumDesign GmbH) beispielsweise von PPX-PFP liegt hierbei signifikant höher als die von PMMA (Abbildung 5.3(a)), wodurch die im Kelchresonator geführten WGMs bereits bei dünnen Schichtdicken merklich beeinflusst werden. Abbildung 5.3(b) zeigt die per FEM-Simulation (JCMsuite, JCMwave GmbH) ermittelten schichtdickenabhängigen optischen Füllfaktoren für PMMA-Kelch, PPX-PFP-Schicht und Analyt für eine TE-Grundmode bei einer spektralen Position von 603 nm. Durch die Einführung der CVD-Lage wird der optische Überlapp mit dem an den Kelchresonator angrenzenden Analyten erhöht. Dies kann gezielt genutzt werden, um die Interaktion der WGMs mit den Analyten und somit die Sensitivität der Sensorstruktur zu erhöhen. Das Sensitivitätsmaximum bei Anwendung von PPX-PFP ist bei einer Schichtdicke von 150 nm zu erwarten. Jenseits von 150 nm nimmt die Sensitivität mit zunehmender Schichtdicke ab. Schichtdicken größer als 320 nm machen aufgrund des stark verringerten Überlapps mit dem Analyten aus anwendungstechnischer Sicht keinen Sinn mehr. Für Schichtdicken jenseits 150 nm werden die WGMs sukzessive in den PPX-Film eingeschnürt, da dieser nun die Rolle des Wellenleiterkerns zu übernehmen beginnt. Bis zu einer Schichtdicke von 200 nm wird das Wellenleitergesamtsystem weiterhin vom PMMA als Kernmaterial dominiert, während das PPX als hochbrechender Wellenleitermantel fungiert. Für dickere Schichten werden das PMMA und das den Kelch umgebende Medium dann zu den Mantelmaterialien. Mit zunehmender Schichtdicke ist generell eine Erhöhung der Laserschwelle zu erwarten, da der optische Überlapp mit dem farbstoffdotierten PMMA und somit die optische Verstärkung sukzessive verringert wird. In Abbildung 5.3(c) bis (f) ist die elektromagnetische Feldverteilung für unterschiedliche PPX-PFP-Schichtdicken dargestellt.

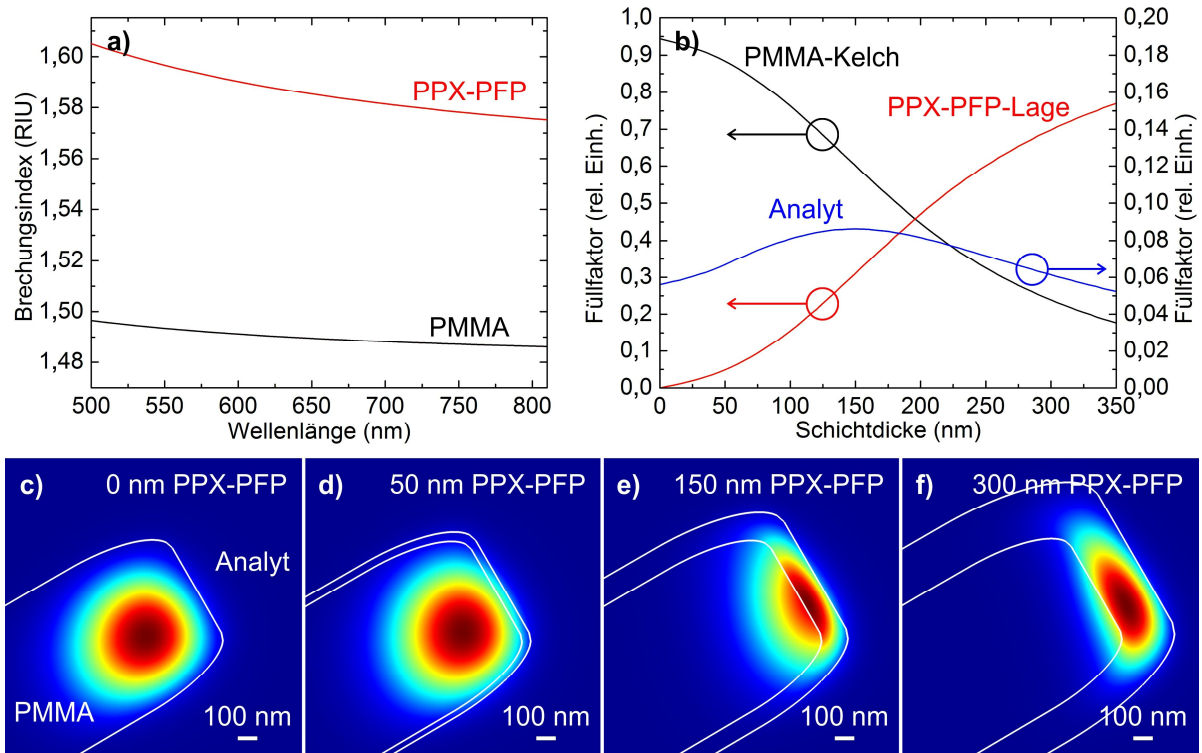


Abbildung 5.3: Einfluss der PPX-Beschichtung auf die im Kelchresonator geführten WGMs. (a) Mit dem Ellipsometer ermittelte Brechzahlfunktionen von PPX-PFP (rote Linie) und PMMA (schwarze Linie). (b) Per FEM-Simulation berechnete optische Füllfaktoren von Mikrokelchlasern in einem wässrigen Analyten in Abhängigkeit von der aufgetragenen PPX-PFP-Schichtdicke und unter Implementierung der in (a) dargestellten Brechzahlfunktionen. Für den Analyten wurde Wasser mit einer Brechzahl von $n_{\text{Ana}} = 1,333$ angenommen. Bei 150 nm ist der Füllfaktor mit dem Analyten maximal, wodurch bei dieser Schichtdicke die maximale Sensitivität gegenüber Brechzahländerungen im Analyten zu erwarten ist. (c)-(f) Per FEM simulierte TE-Grundmode bei einer Wellenlänge von 603 nm bei verschiedenen PPX-PFP-Schichtdicken. Während bei einer Schichtdicke zwischen 0 und 50 nm der Hauptteil der Energie der Lichtmode im PMMA geführt wird, ist bei 300 nm die Lichtmode nun im hochbrechenden PPX-PFP lokalisiert. Bei 150 nm besitzt die Lichtmode den größten Überlapp mit dem Analyten. In allen Simulationen wurde die in Abbildung 5.2 ermittelte Bauteilgeometrie angewendet.

Da letztendlich die ankoppelnden Biomoleküle (z. B. Proteine) in erster Linie eine Brechzahländerung an der Sensoroberfläche hervorrufen, kann über den Austausch von Testflüssigkeiten mit unterschiedlichen Brechzahlen und den daraus resultierenden spektralen Verschiebungen der Lasermoden ein brauchbarer Rückschluss auf die Sensitivität der CVD-beschichteten Mikrokelchlasers geschlossen werden (vgl. Kapitel 3.1.1). In Abbildung 5.4(a) ist die experimentell ermittelte schichtdickenabhängige BRIS von PPX-PFP-beschichteten Mikrokelchlasern dargestellt. Abbildung 5.4(b) zeigt zudem die brechzahlabhängige Lasermodenverschiebung eines unbeschichteten und eines mit 150 nm PPX-PFP-beschichteten Mikrokelchlasers sowie die hieraus ermittelten Werte für die jeweilige BRIS. Im kompletten betrachteten Schichtdickenbereich liegt die Sensitivität der beschichteten Kelchlasers oberhalb dem an unbeschichteten Kelchen gemessenen Wert ($24,45 \pm 0,80$ nm/RIU). Das Sensitivitätsmaximum ($37,64 \pm 3,09$ nm/RIU) tritt bei einer Schichtdicke von 150 nm auf. Der Sensitivitätszuwachs verglichen mit unbeschichteten Kelchen liegt hier bei etwa 54 %.

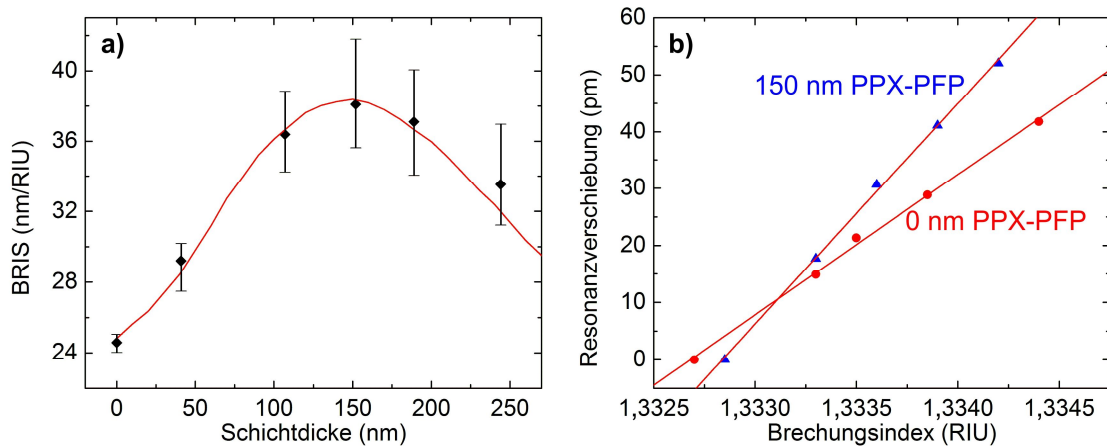


Abbildung 5.4: Für PPX-PFP experimentell ermittelte BRIS in Abhängigkeit von der Schichtdicke. (a) Die Einführung der CVD-Lage bewirkt über den gesamten betrachteten Schichtdickenbereich eine generelle Erhöhung der BRIS. Maximal erzielbar sind $37,64 \pm 3,09$ nm/RIU bei einer Schichtdicke von etwa 150 nm. Aufgrund der wellenleitenden Eigenschaften der im Vergleich zu PMMA höherbrechenden CVD-Lage nimmt für dickere Schichten die BRIS sukzessive ab. Die Messergebnisse weisen eine gute Übereinstimmung mit der per FEM-Simulation theoretisch ermittelten BRIS auf (durchgezogene Linie). (b) Brechzahlabhängige Modenverschiebung eines unbeschichteten (rote Punkte) und eines mit 150 nm beschichteten (blaue Dreiecke) Mikrokelchlasers, inklusive der aus der jeweiligen Signalsteigung ermittelten BRIS.

Abbildung 5.5(a) zeigt den experimentell ermittelten schichtdickenabhängigen Einfluss der PPX-PFP-Lage auf die Laserschwelle der Mikrokelchlasers, gemessen an Luft. Bedingt durch den abnehmenden optischen Überlapp mit dem Verstärkermedium nimmt die Laserschwelle mit steigender Schichtdicke zu. Die Zunahme verhält sich hierbei umgekehrt proportional zum Füllfaktor der Lichtmoden mit dem farbstoffdotierten PMMA (vgl. Abbildung 5.3(b)). Im Punkt der optimalen Sensitivität (Schichtdicke 150 nm; vgl. Abbildung 5.4(a)) liegt die Laserschwelle mit durchschnittlich gemessenen 1,25 nJ pro Anregungspuls moderate 28 % über dem an unbeschichteten Kelchlasern ermittelten Wert (0,98 nJ pro Anregungspuls). Abbildung 5.5(b) zeigt die für ein und denselben Mikrokelchlasers gemessene Laserkennlinie vor und nach der PPX-PFP-Beschichtung. Da sich mit zunehmender Schichtdicke die Laserschwelle weiter erhöht, bringt somit eine Deposition von mehr als 150 nm PPX-PFP sowohl aus ökonomischer als auch anwendungstechnischer Sicht keine Vorteile. Bei ca. 245 nm ist die Laserschwelle um etwa einen Faktor 2,5 erhöht.

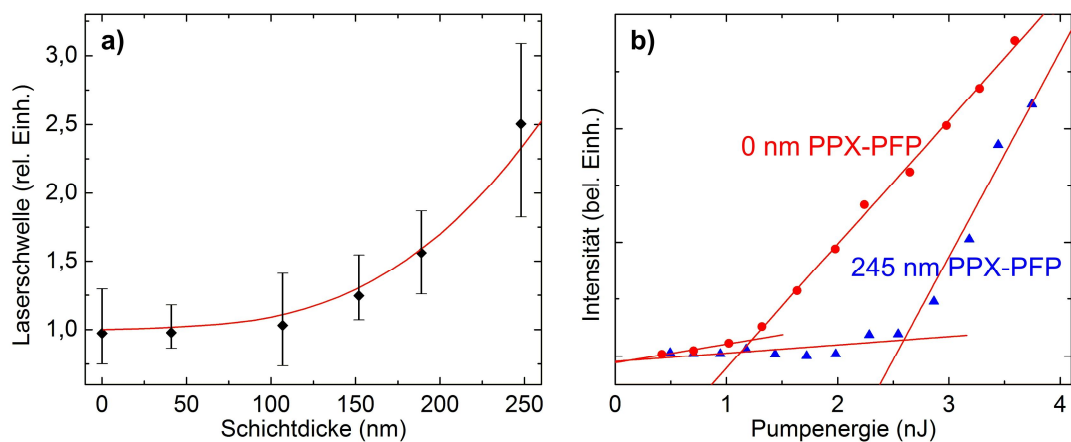


Abbildung 5.5: Für PPX-PFP experimentell ermittelte schichtdickenabhängige Laserschwelle. (a) Die mit zunehmender Schichtdicke ansteigende Laserschwelle ist umgekehrt proportional zum optischen Überlapp der Lasermoden mit dem Verstärkermaterial (durchgezogene Linie). Bei der optimalen Schichtdicke für die BRIS von 150 nm ist die Laserschwelle um 28 % erhöht. (b) Laserkennlinie eines Mikrokelchlasers vor (rote Punkte) und nach der Beschichtung mit 245 nm (blaue Dreiecke) PPX-PFP. Die Laserschwelle wird durch die Beschichtung um 150 % erhöht.

Eine erste Untersuchung der optischen Güte ergab, dass sich durch die Einführung der höherbrechenden PPX-PFP-Beschichtung potentiell eine bessere Modenföhrung einstellt. An Luft wiesen unbeschichtete PMMA-Mikrokelche Q -Faktoren zwischen $4,2$ und $7,5 \times 10^5$ auf. In Wasser wurden Werte zwischen $3,0$ und $5,4 \times 10^4$ ermittelt. Demgegenüber wiesen mit 150 nm PPX-PFP beschichtete Mikrokelche an Luft Gütefaktoren zwischen $9,1 \times 10^4$ und $1,6 \times 10^5$ auf, in Wasser ergaben sich Qualitätsfaktoren zwischen $1,9$ und $3,0 \times 10^4$. Während somit bei den unbeschichteten Mikrokelchen die Immersion in Wasser in einer Verringerung des Q -Faktors um etwa einen Faktor 14 resultiert, stellt sich bei den beschichteten Kelchen eine Verbreiterung der WGMs um lediglich einen Faktor 5 ein. Die generelle Verringerung der Q -Faktoren durch die CVD-Beschichtung ist vor allem auf fabrikationsbedingte Restrauhheiten zurückzuführen. So ergab eine visuelle Inspektion mit dem REM, dass die vermessenen Mikrokelche durch den Elektronenstrahl-schreibprozess riefenförmige Restrauhheiten aufwiesen. Durch die Einführung der CVD-Lage nimmt der optische Füllfaktor der WGMs mit der Oberflächenrauheit zu, wodurch sich mehr Streuverluste ergeben als im unbeschichteten Fall. Eine Verbesserung der optischen Güte durch die Einführung des PPX-PFP ist deshalb an optisch glatten Resonatoren zu verifizieren. Abbildung 5.6 zeigt Fasertransmissionsspektren eines unbeschichteten und beschichteten Mikrokelches in Wasser.

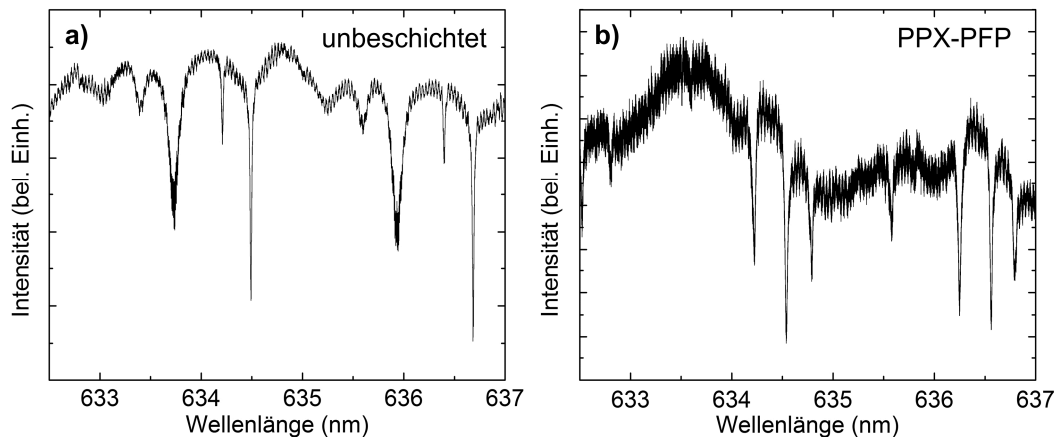


Abbildung 5.6: Experimentelle Analyse der Q -Faktoren. (a) Fasertransmissionsspektrum von (a) unbeschichteten und (b) mit 150 nm PPX-PFP beschichteten passiven Mikroresonatoren in Wasser.

Im Gegensatz zu PPX-PFP weist PPX-CHO eine starke uniaxial negative Doppelbrechung auf (Abbildung 5.7(a)). Die BRIS der PPX-CHO-beschichteten Mikrokelche kann sich demnach zwischen zwei Grenzen bewegen (Abbildung 5.7(b)). Während bei moderaten Pumpleistungen aufgrund des höheren Überlapps mit dem farbstoffdotierten PMMA hauptsächlich die WGMs mit den niedrigeren effektiven Brechungsindexen angeregt werden, wurden anhand von Mikrokelchen mit 150 nm PPX-CHO bei höheren Pumpleistungen auch die weitaus sensitiveren Moden beobachtet. Bedingt durch die Doppelbrechung von PPX-CHO ist der maximale optische Überlapp mit dem Analyten bei einer Schichtdicke zwischen 100 nm und 160 nm zu erwarten. Für weitergehende Aussagen sind jedoch ergänzende Messungen unter Einbezug verschiedener Schichtdicken vonnöten.

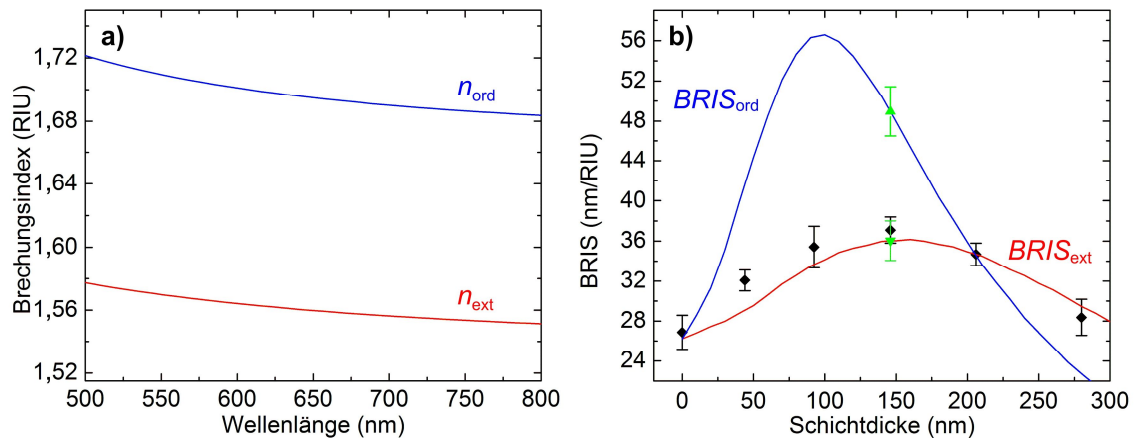


Abbildung 5.7: BRIS von PPX-CHO. (a) Mit dem Ellipsometer ermittelte ordentliche n_{ord} (blaue Linie) und außerordentliche n_{ext} (rote Linie) und Brechzahlfunktion. (b) Experimentell ermittelte schichtdickenabhängige BRIS. Während bei niedrigen Pumpleistungen (schwarze Rauten) lediglich die Lichtmoden mit der niedrigeren Laserschwelle (E-Feldkomponente entlang von n_{ext}) beobachtet wurden, waren bei ausreichend hohen Pumpleistungen (grüne Dreiecke) auch die höher sensitiven Moden (E-Feldkomponente entlang von n_{ord}) im Emissionsspektrum der Mikrokelchlaser beobachtbar. Die durchgezogenen Linien stellen die per FEM-Simulation ermittelten BRIS dar. Hierbei wurde die PPX-CHO-Lage jeweils als nicht doppelbrechend mit n_{ord} und mit n_{ext} separat simuliert.

5.1.3 Charakterisierung der Oberflächenfunktionalisierung

Bei einer kovalenten Oberflächenfunktionalisierung von Sensorstrukturen ist stets darauf zu achten, dass alle verfügbaren Bindungsstellen zur Belegung mit den Akzeptormolekülen ausgenutzt werden. Zum einen wird auf diese Weise sichergestellt, dass eine maximale Oberflächendichte an Akzeptormolekülen die höchsten bindungsspezifischen Sensorsignale liefert. Zum anderen wird gleichzeitig die nicht von den Akzeptormolekülen belegte Sensorfläche, und somit die Gefahr der nichtspezifischen Absorption von Analytmolekülen, minimiert. Die maximal erzielbare Effizienz der Funktionalisierung wird hierbei im Wesentlichen durch das gewählte Materialsystem und die sich hieraus ergebenden molekularen Bindungsstellen auf der Sensoroberfläche vorgegeben. Je mehr Bindungsstellen vorliegen und je reaktiver diese sind, desto bessere Ergebnisse bezüglich der Signalstärke und des Detektionslimits sind zu erwarten. Ist das Materialsystem (bzw. sind die funktionellen Gruppen der Sensoroberfläche) einmal festgelegt, sollte die Oberflächenfunktionalisierung aus zeitlichen und wirtschaftlichen Aspekten optimal eingestellt werden. Dies geschieht in der Regel durch Anpassung der zentralen Prozessparameter wie Temperatur, Inkubationsdauer und der verwendeten Akzeptormolekülkonzentration. Je nach Auslegung der Parameter kann so beispielsweise entschieden werden, ob eine Oberflächenfunktionalisierung möglichst schnell oder möglichst ressourcenschonend durchgeführt werden soll. Die Implementierung von funktionellen PPXen eröffnet zahlreiche Vorteile. Während für ein festes Sensormaterial die Auswahl der kompatiblen chemischen Funktionalisierungsprotokolle eingeschränkt ist, bietet sich bei PPX über die breite Auswahl der funktionellen Gruppen mehr Flexibilität. Die Funktionalisierungsprotokolle sind darüber hinaus komplett unabhängig von der Sensorplattform, sodass diese im Sinne einer Massenfertigung leichter standardisierbar sind und auch auf andere Sensorplattformen angewendet werden können.

Eine Charakterisierung der Oberflächenfunktionalisierung kann auf vielen Wegen erfolgen. Aus materialwissenschaftlicher Sicht sind die Fluoreszenzmikroskopie, die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) und die ATR-Infrarotspektroskopie (ATR: attenuated total reflection, dt.: abgeschwächte Totalreflexion) besonders interessant, um die chemische Modifikation von Oberflächen zu studieren.^{12,14,245,246} Während bei der XPS und ATR jedoch bevorzugt ebene Substratoberflächen untersucht werden, basiert die visuelle Analyse mittels Fluoreszenzmikroskop auf einem intuitiven Einsatz von farbstoffmarkierten Molekülen, welcher auch auf dreidimensionale Strukturen angewendet werden kann. Einen direkten Aufschluss über die Menge der vorhandenen Akzeptormoleküle liefert die direkte Applizierung der Oberflächenfunktionalisierung auf die intendierten Sensortransduktoren. Anhand der generierten Sensorsignale kann so eine Einstellung und Optimierung des Oberflächenfunktionalisierungsprotokolls direkt am Bauteil durchgeführt werden. WGM-Strukturen, wie die hier untersuchten Mikrokelche, sind bedingt durch

ihre spektral sehr scharfen Resonanzen und die damit einhergehende Signalauflösung hierfür besonders geeignet. Im Rahmen dieser Arbeiten kamen zwei experimentelle Ansätze zum Einsatz, um die Oberflächenfunktionalisierung zu charakterisieren: Zum einen die Fluoreszenzmikroskopie und zum anderen die direkte Analyse der Sensorsignale der Mikrokelchchips.

Die Oberflächenfunktionalisierungsprotokolle von PPX-CHO und PPX-PFP beinhalten unterschiedliche chemische Ankoppelreaktionen (Abbildung 5.8). PPX-CHO erlaubt eine selektive Anbindung von hydrazidterminierten Molekülen.²⁴¹ Die Hydrazidgruppen binden unter Abspaltung von Wasser an die Aldehydgruppen des CVD-Materials an, wodurch die zu immobilisierenden Moleküle über Hydrasonbindungen kovalent an das Polymergerüst des CVD-Films gebunden werden. Während diese Bindungsreaktion bereits bei Raumtemperatur mit hoher Reaktivität stattfindet, können bei erhöhten Temperaturen auch aminoterminierte Moleküle über die Ausbildung von Imidbindungen an die Aldehydgruppen angebinden werden. Dieser Prozess findet jedoch lediglich bei stark erhöhten Temperaturen statt (die im Rahmen dieser Arbeiten applizierte Prozessstemperatur betrug minimal 70 °C, s. Kapitel 5.3.1) und ist somit zur direkten Anbindung von temperatursensitiven Biomolekülen, wie sie z. B. Proteine und Antikörper darstellen, ungeeignet. Eine intuitivere selektive Bindung von aminoterminierten Molekülen erfolgt an PPX-PFP.²⁴³ Im Verlauf der Bindungsreaktion wird die Pentafluorphenyl-esterschutzgruppe von der Aminogruppe des anbindenden Moleküls durch eine nukleophile Additionsreaktion verdrängt, wodurch die freiwerdende Acylgruppe für die Ausbildung einer Amidbindung zur Verfügung steht. Da diese Reaktion bei Raumtemperatur und ohne zusätzliche Chemikalien durchführbar ist, ist sie interessant zum direkten Ankoppeln beispielsweise von Proteinen und Antikörpern, welche naturgemäß zahlreiche nach außen gerichtete Aminogruppen aufweisen.²⁴⁷

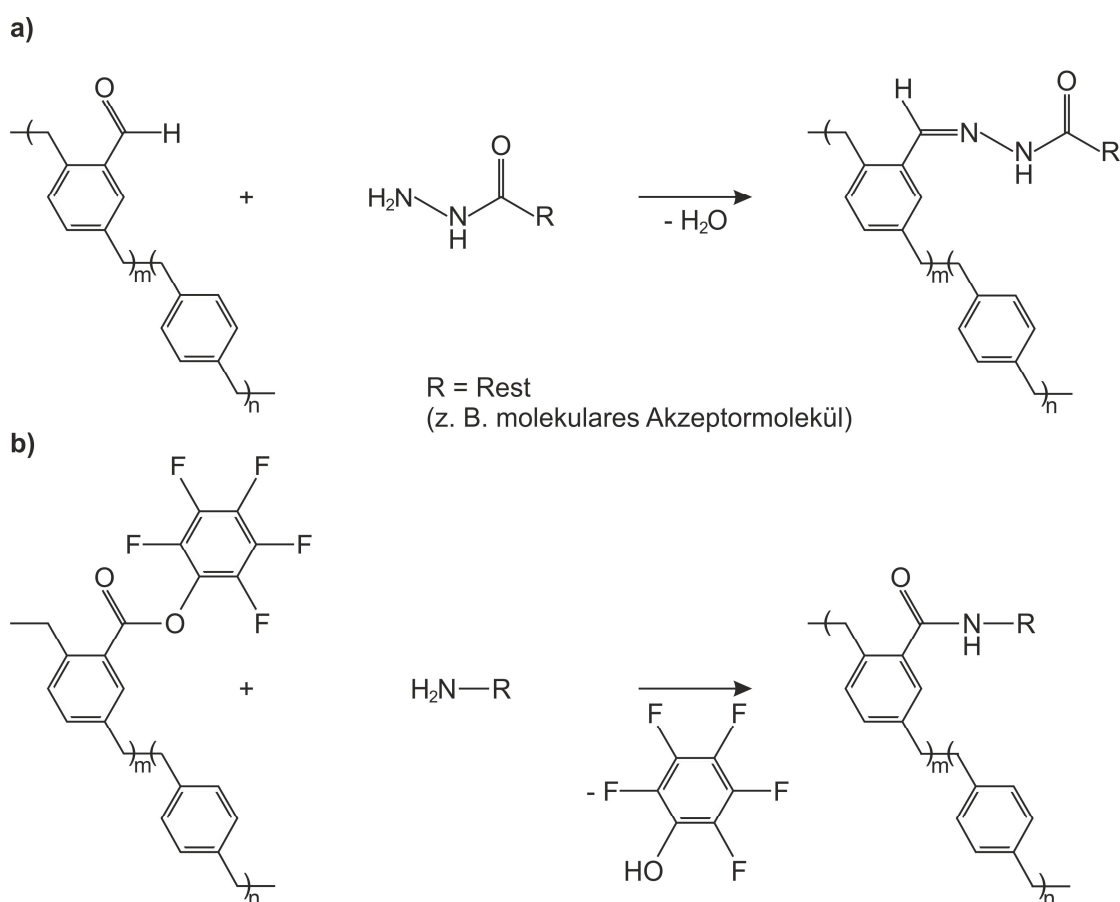


Abbildung 5.8: Chemische Reaktionsschemata von (a) der Immobilisierung von amino- (NH_2) terminierten Molekülen an PPX-PFP und (b) hydrazid- (N_2H_3) terminierten Molekülen am PPX-CHO.

Aufgrund seiner hochaffinen und robusten Anbindung an Biotin eignet sich Streptavidin in hohem Maße, um die Oberflächenfunktionalisierungsprotokolle der beiden CVD-Materialien grundlegend zu

untersuchen und zu optimieren. Als Akzeptormolekül fungiert jeweils Biotin mit unterschiedlichem molekularem Terminus. Im Fall von PPX-CHO kommt Hydrazid-dPEG₄-Biotin und für PPX-PFP kommt Amino-dPEG₁₁-Biotin zum Einsatz (beide von Quanta Biodesign Ltd.). Beide werden bei Raumtemperatur für definierte Zeitdauern auf die jeweiligen CVD-Lagen inkubiert. Die jeweils in den Experimenten verwendeten Protokolle finden sich in den betreffenden Textpassagen.

In einem einleitenden Plausibilitätsexperiment wurde die Anbindung von Cy3-markiertem Streptavidin visuell mit einem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Hierzu wurden planare PMMA-beschichtete Siliziumchips hergestellt, welche im Anschluss mit PPX-CHO bzw. PPX-PFP lateral strukturiert beschichtet wurden. Für die Strukturierung der Proben wurden PDMS-Membranen mit quadratischen Öffnungen als Masken zur Passivierung auf den Substratoberflächen fixiert. Die nicht zu beschichtenden Bereiche des Chips wurden hierdurch durch das PDMS abgedeckt, sodass das jeweilige CVD-Material in einer zweidimensionalen periodischen Anordnung aus quadratischen Feldern realisiert wurde. Anschließend wurden die Chips in die jeweilige Biotinlösung (10 µmol/L in PBS) für 60 bis 90 Minuten inkubiert. Nach einem Blockschritt mit 1 Gew.-% BSA wurde 10 µg/ml Cy3-Streptavidin für eine Stunde auf die Chips gegeben. Abbildung 5.9 zeigt Fluoreszenzbilder der jeweiligen Chips im Anschluss an diese Prozedur. Sowohl für PPX-PFP als auch PPX-CHO ist anhand des Fluoreszenzsignals des immobilisierten Cy3-Streptavidins zu erkennen, dass das jeweilige Biotin mit hoher Selektivität ausschließlich an die verfügbaren CVD-Felder gebunden hat, wodurch die Reaktivität der funktionellen Gruppen der CVD-Lagen eindeutig belegt wird.

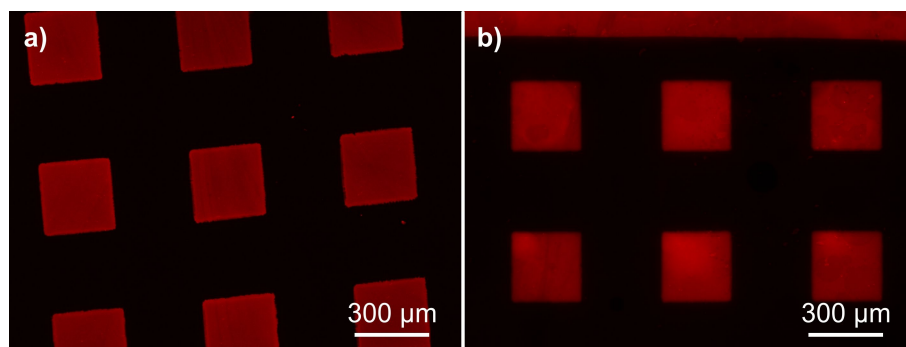


Abbildung 5.9: Visuelle Untersuchung der Funktionalisierungsprotokolle von PPX-CHO und PPX-PFP. Fluoreszenzaufnahme von (a) biotinyliertem PPX-CHO und (b) biotinyliertem PPX-PFP. Die beiden CVD-Materialien wurden mittels einer PDMS-Maskierung strukturiert auf passives PMMA aufpolymerisiert. Die ausschließliche Anbindung der Cy3-Streptavidin an die CVD-Felder belegt die selektive Biotinylierung dieser Bereiche.

Da beide Funktionalisierungsprotokolle bereits bei Raumtemperatur mit ausreichend hoher Reaktivität stattfinden, stellen im vorliegenden Fall sowohl die Inkubationsdauer als auch die applizierte Konzentration der jeweiligen Akzeptormoleküle die Schlüsselparameter dar, mit welchen die Oberflächenfunktionalisierung eingestellt wird. Die Konzentration beeinflusst hierbei in der Regel die zu applizierende Mindestinkubationsdauer: Mit steigender Konzentration ergibt sich aufgrund der steigenden Ankoppelrate eine kürzere Inkubation und umgekehrt, um eine vollständige Belegung auf den CVD-Lagen befindlichen Bindungsstellen zu erzielen. Je nach Art der chemischen Reaktion und den hierbei entstehenden Nebenprodukten kann es ab einer gewissen Molekülkonzentration aufgrund mangelnden Austauschs zu einer gegenseitigen sterischen Behinderung der involvierten Moleküle kommen.²⁴⁸ Dieser Effekt wurde im Rahmen dieser Arbeiten jedoch nicht näher untersucht.

Obwohl durch die CVD-Schichten eine Plattformunabhängigkeit gegeben ist, ist es dennoch generell von Vorteil die Einstellung der Oberflächenfunktionalisierung direkt am Sensor durchzuführen. Im vorliegenden Fall wurden die beschichteten Mikrokelchchips dazu verwendet, um das chemische Akzeptormolekülanbindungsverhalten der CVD-Lagen im Detail zu studieren.

In Abbildung 5.10(a) ist die experimentell ermittelte bindungsspezifische Verschiebung der Lasermoden der PPX-CHO-beschichteten Mikrokelche in Abhängigkeit von der applizierten Biotinkonzentration dargestellt. Die Schichtdicke der CVD-Lage beträgt 150 nm. Das Hydrazid-dPEG₄-Biotin lag gelöst in PBS vor und wurde 60 Minuten unter mechanischer Agitation mit einem

Laborschüttler (100–200 U/min) auf die Kelchlasern appliziert. Die Biotinylierung wurde anschließend durch Spülung der Chips mit deionisiertem Wasser gestoppt. Danach wurden die einzelnen Chips in der fluidischen Kammer des optischen Messaufbaus jeweils für 12 Minuten 15 µg/ml Streptavidin (PBS) ausgesetzt. Parallel wurde das Emissionsspektrum der jeweils untersuchten Mikrokelchlasern in 2 s-Schritten mit dem Laborspektrografen aufgezeichnet. Ebenfalls in Abbildung 5.10(a) dargestellt ist das Signalverhalten von unbeschichteten Mikrokelchlasern, welche nach demselben Funktionalisierungsprotokoll behandelt wurden. Während die Lasermoden der unbeschichteten Mikrokelche lediglich minimal schieben, resultieren bereits kleinste Biotinmengen bei den PPX-CHO-beschichteten Kelchlasern in signifikant stärkeren Sensorantworten. Darüber hinaus weist die mit wachsender Biotinkonzentration rasant ansteigende Signalkurve auf eine starke Reaktivität der aldehydterminierten CVD-Lage mit den Hydrazidgruppen des Biotins hin. Bereits bei 5 µmol/L übertrifft die Modenverschiebung der PPX-CHO-beschichteten Mikrokelchlasern die der mit einer 250-fach höheren Biotinkonzentration (1.250 µmol/L) behandelten unbeschichteten PMMA-Kelche. Unter Anwendung von 10 µmol/L sind über 50 % der insgesamt verfügbaren Aldehydgruppen mit Biotin adressiert. Während bei den CVD-belegten Kelchen ab etwa 250 µmol/L eine Sättigung der Sensorsignalmagnitude eintritt, ist das bei den unbeschichteten Kelchen auftretende Signal durch das sich hier lediglich adhäsiv an das PMMA anlagernde Biotin weiterhin verschwindend gering. Bei Applizierung einer sehr hohen Biotin-Konzentration von 5.000 µmol/L beträgt die Modenverschiebung bei den unbeschichteten Mikrokelchen 75 pm (nicht in der Grafik gezeigt, temporale Bindungskurve s. Kapitel 3.1.5). Dieser Wert wird von den PPX-CHO beschichteten Kelchen bereits bei der Anwendung von 10 µmol/L Biotin deutlich überschritten. Obwohl es sich bei PPX-CHO um ein Material mit einer hohen Hydrophobie handelt (gemessener Kontaktwinkel: 95°), fällt die Sensorantwort mit 13 pm, und somit die nichtspezifische Proteinadsorption bei unbiotinylierten PPX-CHO-beschichteten Mikrokelchen, sehr moderat aus. Die Einführung des PPX-CHO resultiert somit in einer äußerst effektiven Oberflächenfunktionalisierung der ansonsten chemisch inerten PMMA-Mikrokelchlasern. Abbildung 5.10(b) zeigt ausgewählte zeitliche Signalverläufe der Mikrokelche bei verschiedenen Biotinkonzentrationen. Eine experimentelle Verifizierung dieser Erkenntnisse zeigt sich durch Wiederholung des Experiments mit passiven Mikrokelchen anhand Fluoreszenzmikroskopie. In diesem Fall wurde erneut Cy3-Streptavidin angebunden und die resultierenden Fluoreszenzintensitäten der Mikrokelche ausgewertet. Die Abbildungen 5.10(c) und (d) zeigen die Ergebnisse dieses Referenzexperiments, welches sich mit den Ergebnissen der optischen Charakterisierung deckt. Vergleicht man die Resonanzverschiebungen aus Abbildung 5.10(a) mit denen aus Abbildung 5.11(a), handelt es sich bei den in der vorliegenden Analyse betrachteten Lasermoden um die entlang n_{ext} polarisierten WGMs.

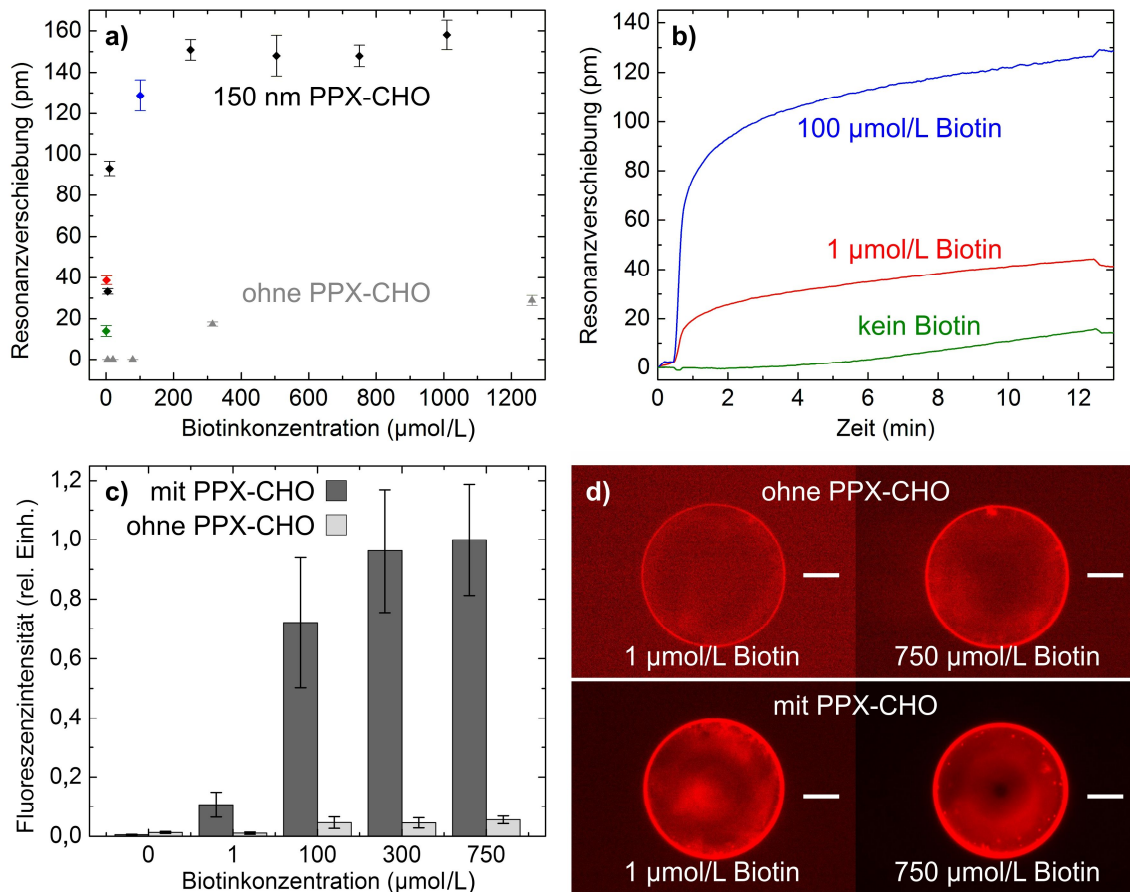


Abbildung 5.10: Anbindungsverhalten von PPX-CHO-beschichteten Mikrokelchen gegenüber Hydrizid-dPEG₄-Biotin. (a) Experimentell ermittelte bindungsspezifische Lasermodenverschiebung von mit 150 nm PPX-CHO beschichteten (farbige Rauten) und unbeschichteten (graue Kreuze) Mikrokelchlasern nach der Inkubation in Streptavidin (15 $\mu\text{g/ml}$, 12 min) in Abhängigkeit von der applizierten Biotinkonzentration. Während die lediglich gering ausfallenden Sensorsignale der unbeschichteten Mikrokelche auf die Präsenz von adhäsiv angelagertem Biotin zurückzuführen sind, weisen die bereits bei sehr kleinen Biotinmengen resultierenden hohen Signale auf die starke Reaktivität des PPX-CHO mit dem hydrizidterminierten Biotin hin. (b) Zeitliche spektrale Modenverschiebung für ausgewählte Biotinkonzentrationen aus (a). (c) Referenz-Fluoreszenzexperiment an passiven PPX-CHO-beschichteten (dunkle Balken) und unbeschichteten (helle Balken) Mikrokelchen unter Applizierung desselben Funktionalisierungsprotokolls wie in (a). Die Fluoreszenzintensitäten des angebondenen Cy3-Streptavidins weisen eine gute Übereinstimmung zu dem in (a) dargestellten Sensorsignalverlauf auf. (d) Fluoreszenzbilder ausgewählter Mikrokelche aus (c). Zur Verbesserung der Sichtbarkeit wurden die Bilder jeweils auf ihre minimalen und maximalen Intensitätswerte als dynamische Breite skaliert. Während der mit 1 $\mu\text{mol/L}$ behandelte unbeschichtete Kelch sich kaum von seinem Hintergrund abhebt, weist der auf gleiche Art biotinylierte CVD-beschichtete Kelch bereits eine geringfügig höhere Fluoreszenz auf als der mit 750 $\mu\text{mol/L}$ behandelte unbeschichtete Kelch. Die Skalen entsprechen 10 μm .

Für die konzentrationsabhängige Anlagerung von Amino-dPEG₁₁-Biotin an PPX-PFP (Schichtdicke 150 nm) ergibt sich ein ähnliches Verhalten (Abbildung 5.11(a)). Zu Vergleichszwecken wurde das Amino-dPEG₁₁-Biotin auch hier für 60 Minuten bei gleichzeitiger Agitation mit einem Laborschüttler inkubiert. Das stark mit der Biotinkonzentration ansteigende Sensorsignal belegt auch hier die Funktionalität der eingesetzten CVD-Lage. Auffällig ist jedoch, dass bereits bei einer direkten Applizierung von Streptavidin (12 Minuten, 15 $\mu\text{g/ml}$ in PBS) ohne vorhergehende Biotinylierung Modenverschiebungen jenseits von 50 pm generiert werden. Da PPX-PFP ähnlich hydrophob ist wie PPX-CHO (Kontaktwinkel ebenfalls 95°) resultiert die Anlagerung des Streptavidins somit höchstwahrscheinlich aus einer kovalenten Anbindung über die Amino-Termini des Proteins an die Estergruppen der CVD-Lage. Das Sensorsignal sättigt mit zunehmender Biotinkonzentration bei ähnlichen Werten wie für die in Abbildung 5.11(a) gezeigten PPX-CHO-Mikrolaser. Die unbeschichteten PMMA-Kelchlasern erweisen sich erneut als unreaktiv für die Amino-Termini des Biotins, sodass sich die auftretenden Sensorsignale lediglich aufgrund der Physisorption von Biotin ergeben. Abbildung 5.11(b) zeigt zudem die Sensorsignale von zwei mit 20 nm und 150 nm PPX-PFP beschichteten Mikrokelchlasern. Die beschichteten Mikrokelchlasern wurden hierbei über Nacht mit

580 $\mu\text{mol/L}$ Amino-dPEG₁₁-Biotin biotinyliert. Auch bei der Detektion von Streptavidin (15 $\mu\text{g/ml}$ in PBS) wird die bereits in Abbildung 5.5 anhand der BRIS ermittelte höhere Sensitivität der dickeren PPX-PFP-Lage erneut deutlich. Das Sensorsignal des mit 150 nm beschichteten Mikrolasers fällt über den gesamten Messzeitraum im Mittel rund 45 % höher aus als das des mit 20 nm belegten Mikrokelches (Abbildung 5.11(c)). Dieser Sensitivitätszuwachs entspricht dem bereits in Abbildung 5.4 ermittelten, wodurch die in der Gleichung 20 (s. Kapitel 3.1.1) errechnete lineare Proportionalität zwischen der molekularen Sensitivität der BRIS nunmehr messtechnisch belegt ist.

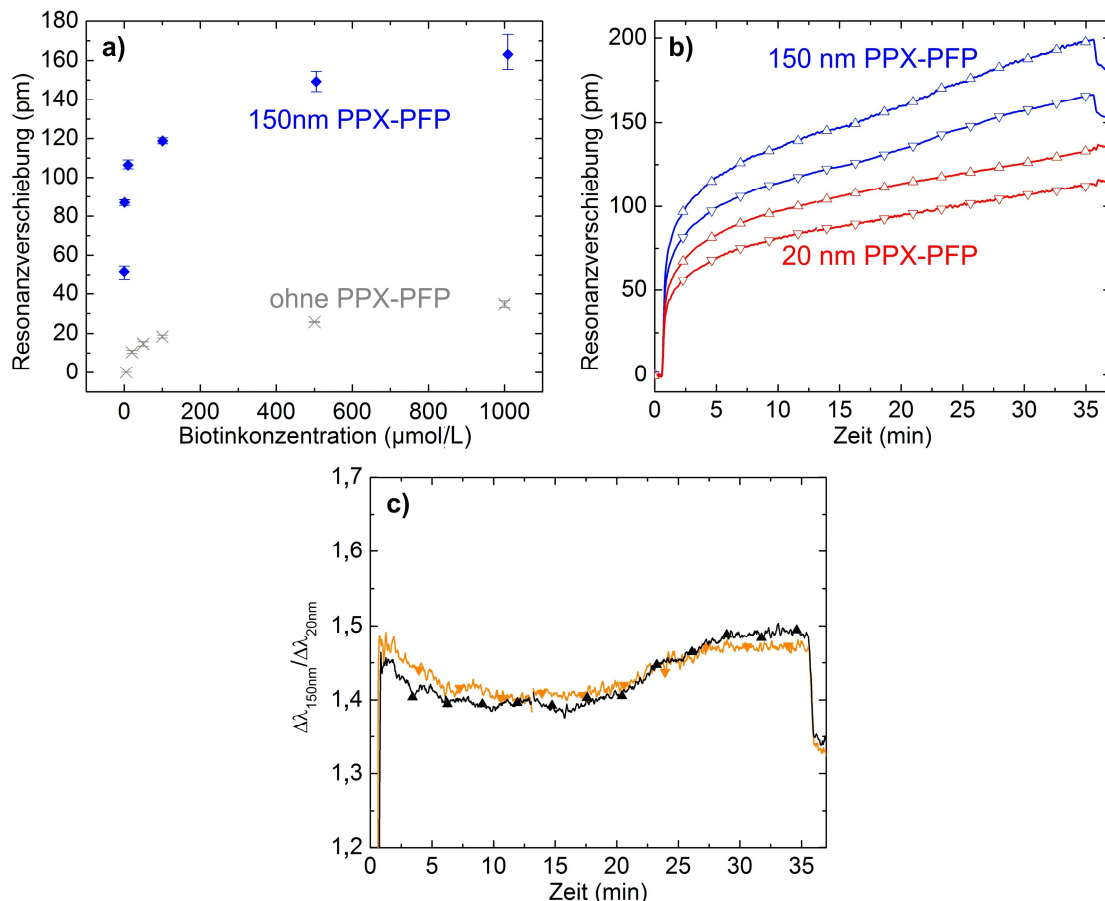


Abbildung 5.11: Anbindungsverhalten von PPX-PFP-beschichteten Mikrokelchen gegenüber Amino-dPEG₁₁-Biotin. (a) Experimentell ermittelte bindungsspezifische Lasermodenverschiebung von mit 150 nm PPX-PFP beschichteten (blaue Rauten) und unbeschichteten (graue Kreuze) Mikrokelchlasern nach der Inkubation in Streptavidin (15 $\mu\text{g/ml}$, 12 min) in Abhängigkeit von der im Funktionalisierungsprotokoll applizierten Biotinkonzentration. Erneut sind die lediglich gering ausfallenden Sensorsignale der unbeschichteten Mikrokelche auf die Präsenz von adhäsiv angelagerten Biotinmolekülen zurückzuführen. Die mit PPX-PFP beschichteten Mikrolaser hingegen weisen schon bei sehr kleinen Biotinmengen hohe Sensorsignale auf, die jedoch zum Teil durch eine Anbindung des Streptavidins an die Estergruppen des PPX bedingt sind. (b) Zeitliche spektrale Modenverschiebung für einen mit 150 nm und einen mit 20 nm beschichteten Mikrokelchlaser (biotinyliert mit 580 $\mu\text{mol/L}$ Amino-dPEG₁₁-Biotin) bei Applizierung von 15 $\mu\text{g/ml}$ Streptavidin. Die auf- und abwärts zeigenden Dreiecke kennzeichnen hierbei die maximale und minimale Lasermodenverschiebung des jeweiligen Mikrokelchlasers. (c) Quotient der minimalen (orange Linie) und maximalen (schwarze Linie) Lasermodenverschiebung der beiden Mikrokelchlasers aus (b). Das Sensorsignal des mit 150 nm PPX-PFP belegten Mikrokelchlasers fällt im Mittel 45 % höher aus als das des 20 nm beschichteten Lasers. Dieser Sensitivitätszuwachs entspricht dem in Abbildung 5.4 anhand der BRIS ermittelten Wert. Die Welligkeit ist vermutlich auf die Temperaturregelung der Klimaanlage im Versuchslabor zurückzuführen.

5.1.4 Detektion von C-reaktivem Protein

Die Demonstration der Anwendbarkeit der CVD-beschichteten Mikrokelchlasers auf eine klinisch relevante Detektionsaufgabe wird repräsentativ anhand von C-reaktivem Protein (CRP) aufgezeigt. CRP zählt zu den Akute-Phase-Proteinen und wird im menschlichen Organismus im Rahmen von unspezifischen Immunantworten von der Leber gebildet und ins Blut abgegeben.^{249,250} Während das Protein im Normalfall zu Konzentrationen im einstelligen Mikrogrammbereich pro ml Blutplasma

vorkommt, steigt die Konzentration beispielsweise bei entzündlichen Vorfällen sowie Gewebeschäden je nach Art und Schweregrad drastisch an. Zu den betroffenen Krankheiten zählen chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie z. B. Morbus-Crohn, Perikarditis sowie rheumatische Arthritis, neben vielen weiteren. Der bei gesunden Menschen im Mittel vorkommende Konzentrationswert liegt bei $0,8 \mu\text{g/ml}$ Blutplasma, er ist jedoch stark von der individuellen Physiologie abhängig.^{214,250} Hierbei können Werte bis $5 \mu\text{g/ml}$ vorkommen, weshalb dieser als klinisch anerkannter Grenzwert im gesunden Menschen definiert wurde.²⁴⁹ Beispielsweise bei einer Perikarditis kann die CRP-Konzentration $20 \mu\text{g/ml}$ annehmen (persönlicher Erfahrungswert des Autors).

Im Rahmen der Demonstration kommen mit 150 nm PPX-CHO beschichtete Mikrolaser zum Einsatz, deren Oberflächenfunktionalisierung in zwei Teilschritten durchgeführt wurde. Zuerst wurden die Kelche mit dem in Kapitel 5.1.3 definierten Funktionalisierungsprotokoll unter Applizierung von $500 \mu\text{mol/L}$ Hydrazid-dPEG₄-Biotin biotinyliert. In der mikrofluidischen Kammer des optischen Versuchsaufbaus erfolgte anschließend die Immobilisierung von biotinterminierten Anti-CRP Antikörpern ($15 \mu\text{g/ml}$ in PBS, Inkubationszeit 14 Minuten) an das zuvor an die biotinylierten Kelche angebundene Streptavidin ($30 \mu\text{g/ml}$ in PBS, Inkubationszeit 20 Minuten). Die Inkubationen der beiden Proteine wurden jeweils durch Spülung mit PBS beendet. In Abbildung 5.12(a) sind die kompletten zeitlichen Sensorsignalverläufe zweier Mikrokelche unter Applizierung von $10 \mu\text{g/ml}$ CRP abgebildet. Bei einem der beiden Kelche wurde hierbei das CRP direkt im Anschluss an das Streptavidin injiziert, wodurch dieser keine Bindungsstellen in Form der Anti-CRP Antikörper aufweist. Erwartungsgemäß stellt sich bei diesem Kelchlaser keine bindungsspezifische Lasermodenverschiebung ein, womit die Funktionalität der Antikörper als molekulare Akzeptoren für das CRP belegt ist. Abbildung 5.12(b) zeigt die isolierten Sensorsignale während den CRP-Inkubationen.

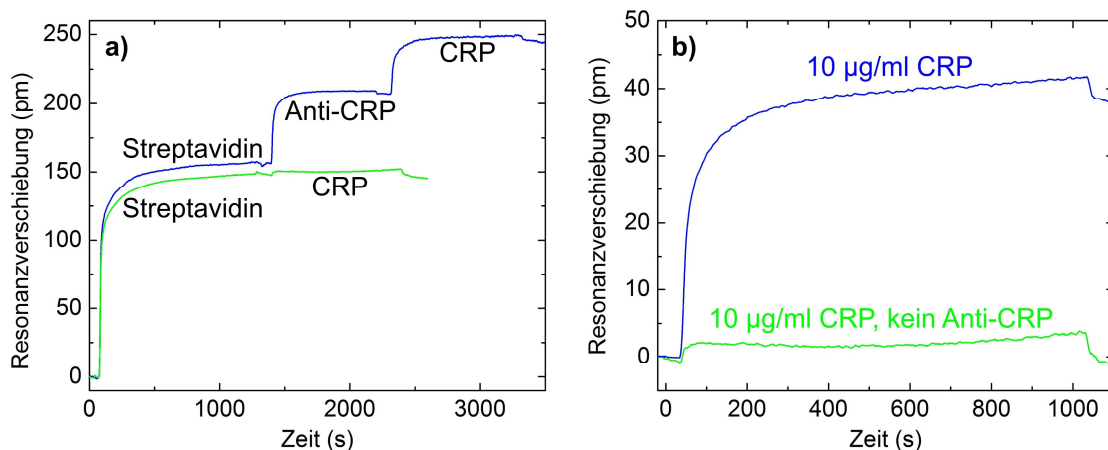


Abbildung 5.12: Demonstration der biomolekularen Detektion von CRP. (a) Zeitlicher Signalverlauf zweier Mikrokelchlaser im Rahmen eines Positiv- und Negativversuchs. Beim Negativtest wurde nach der Streptavidininkubation ($30 \mu\text{g/ml}$) keine Anti-CRP Antikörperlösung injiziert, wodurch der betroffene Mikrokelchlaser keine Bindungsstellen für das im Anschluss eingeleitete CRP besitzt. Dementsprechend löst die CRP-Injektion ($10 \mu\text{g/ml}$) ausschließlich bei dem mit Antikörpern ($15 \mu\text{g/ml}$) belegten Mikrokelch ein bindungsspezifisches Sensorsignal aus. (b) Vergrößerte Darstellung der Sensorsignale aus (a) während der CRP-Inkubation.

In Abbildung 5.13 ist die Anfangssteigung der WGM-Verschiebungen in Abhängigkeit von der CRP-Konzentration dargestellt. Die minimal mit dem vorhandenen optischen Versuchsaufbau nachgewiesene Konzentration (vgl. Kapitel 3.1.5) beträgt 500 ng/ml , 60 % unterhalb des Medianwertes und 10-fach unterhalb der klinisch definierten Obergrenze für den gesunden Menschen. Bis zur maximal im Experiment applizierten Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ weist die Sensorkennlinie eine gute Linearität auf. Unter Berücksichtigung der Aufzeichnungsrate (ein Spektrum pro 2 Sekunden) und der Annahme einer absoluten Modenverschiebung von 45 pm (vgl. Abbildung 5.12(b)) lässt sich die maximal detektierbare Konzentration auf $160 \mu\text{g/ml}$ extrapolieren. Somit wird ein breiter klinisch relevanter Konzentrationsbereich abgedeckt.²⁴⁹ Da die Messungen in PBS durchgeführt wurden, stellen die hier präsentierten Zahlenwerte die erzielbaren Signale dar, wie

sie ohne das Auftreten von nichtspezifischen molekularen Adsorptionsvorgängen zu erwarten sind. Bei der Applizierung von hochkomplexen physiologischen Medien wie z. B. Blutplasma würden diese Werte lediglich bei optimalen Passivierungseigenschaften der Oberflächenfunktionalisierung erreicht werden. Eine diesbezügliche Untersuchung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen, jedoch weisen die gesammelten Messdaten in Abbildung 5.10 und Abbildung 5.12 auf potentiell gute Passivierungseigenschaften der applizierten Oberflächenfunktionalisierung hin.

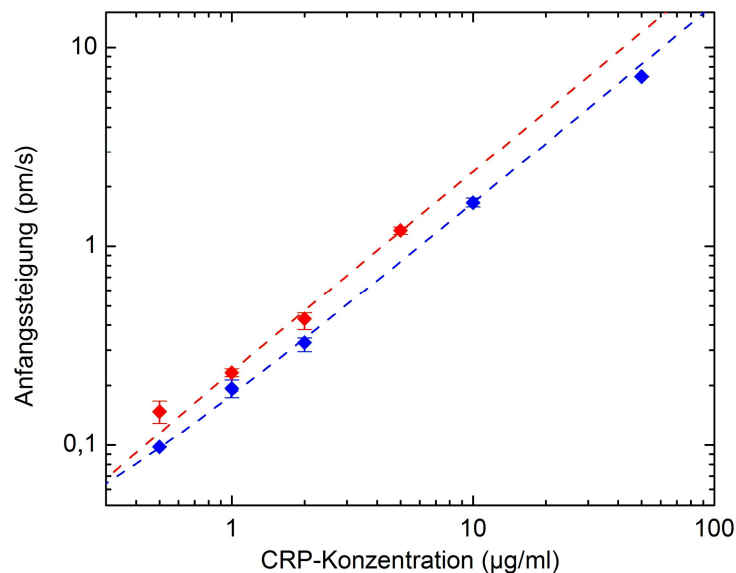


Abbildung 5.13: Initiale Steigung der Modenverschiebung in Abhängigkeit von der CRP-Konzentration. Die Grafik zeigt sowohl die entlang n_{ext} (blaue Rauten) als auch n_{ord} (rote Rauten) polarisierten WGMs. Der jeweilige Signalverlauf weist eine gute Linearität auf (unterbrochene Linien).

5.1.5 Detektion von Exosomen für die Brustkrebsdiagnostik

In den letzten Jahren rückten extrazelluläre Vesikel verstärkt in den Fokus der medizinischen Forschung.^{251,252} Während die Existenz dieser Vesikel bereits vor Jahrzehnten in Schafen nachgewiesen wurde,²⁵³ wird erst seit kurzer Zeit deren biologische Relevanz im menschlichen Organismus untersucht. Die Außenhülle extrazellulärer Vesikel besteht, analog zu der von Zellen, aus einer Lipidbilage und ist mit unterschiedlichen Proteinen dekoriert. Diese Hüllenproteine lassen hierbei nicht nur Rückschlüsse auf die biologische Funktionalität der Vesikel zu. Des Weiteren lässt sich an ihnen die Art und Funktionalität der Herkunftszelle bestimmen. So lässt sich beispielsweise die Funktion von immunspezifischen Zellen untersuchen oder Krebszellen klassifizieren.²⁵⁴ Vesikel einer gewissen Größenordnung (50 bis 100 nm) werden als Exosomen bezeichnet.^{254,255} Sie befinden sich beispielsweise in Blut, Fruchtwasser und Urin und eignen sich demnach in vielfältiger Art und Weise zur medizinischen Investigation. Anhand von Exosomen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Anwendbarkeit der PPX-PFP-beschichteten Mikrokelchlasers auf eine zweite klinisch relevante Detektionsaufgabe demonstriert. Hierzu wurden Exosomen mit Brustkrebs-spezifischen Markerproteinen detektiert. Neben PBS-gelösten Exosomen wurden auch in Blutserum gelöste Exosomen nachgewiesen. Die Exosomen wurden von der Arbeitsgruppe Nazarenko vom Uniklinikum Freiburg zur Verfügung gestellt.

Im Rahmen von Vorversuchen wurde das Sensor-konzept auf Plausibilität geprüft. Hierzu dienten zu diesem Zeitpunkt unbeschichtete PMMA-Mikrokelche mit per Physisorption angelagertem Amino-dPEG₁₁-Biotin (5.000 µmol/L, Inkubationszeit 2 h). Diese wurden über eine Zwischenlage Streptavidin zum einen mit biotinylierten Anti-CD63 Antikörpern und zum anderen mit Isotypkontroll-Antikörpern belegt. Während Anti-CD63 zur spezifischen Anbindung des Proteins CD63 dient, handelt es sich bei Isotypkontroll-Antikörpern um Immunglobuline, die aus demselben Tier wie die der Positivkontrolle stammen, jedoch keine Spezifität gegenüber dem nachzuweisenden Protein besitzen.²⁵⁶ Sie dienen somit als Negativkontrolle. Bei CD63 handelt es sich um ein zu der Familie der Tetraspanine gehörendes Protein, welches häufig auf Zellmembranen und somit auch auf

Exosomen anzufinden ist.²⁵⁷ Dort wird es unter anderem mit Wechselwirkungsvorgängen zwischen Zellen bzw. des Bindegewebes und Zellen in Verbindung gebracht. Da es ein auf Exosomen sehr prominent auftretendes Protein ist, wird es oft zu deren Immobilisierung bzw. Aufreinigung verwendet. In Abbildung 5.14 ist das Ergebnis des Experiments dargestellt. Als Analyt dienen in PBS gelöste Exosomen aus der Darmkrebs-Zelllinie COLO-205.²⁵⁸ Abbildung 5.14(a) zeigt die komplette Inkubationssequenz des Positivtests. Während sowohl die Anti-CD63 als auch die nichtspezifischen Isotypkontroll-Antikörper Lasermodenverschiebungen ähnlicher Magnitude erzeugen, verbleiben nach der Spülung mit PBS lediglich am Anti-CD63-belegten Mikrokelchchips die stabil angebondenen Exosomen (Abbildung 5.14(b)). Die Isotypkontrolle belegt hiermit die Spezifität der Exosomendetektion über die CD63-Hüllenproteine.

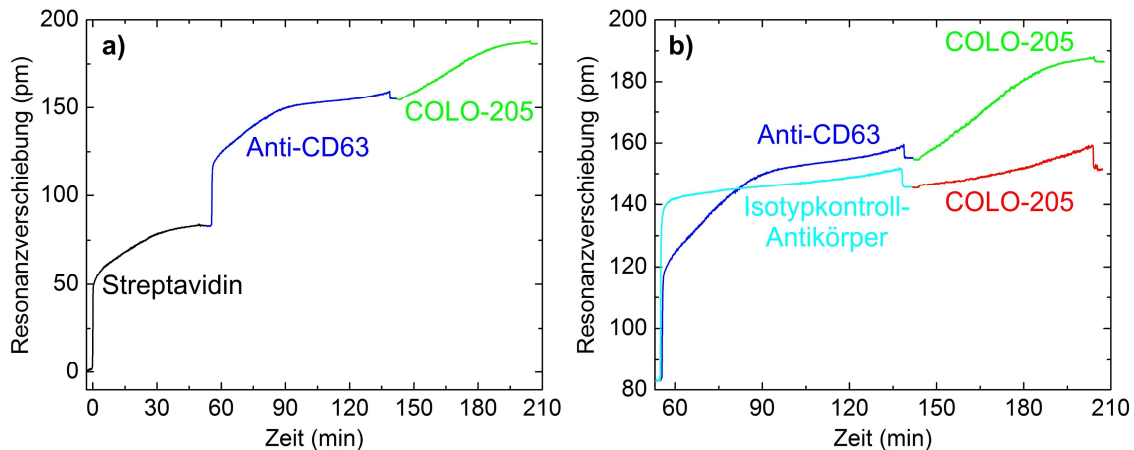


Abbildung 5.14: Plausibilitätstest zur Detektion von Exosomen über ausgewählte Hüllenproteine. (a) Positivtest der Detektion über das Protein CD63. An die per Physisorption biotinylierten PMMA-Mikrokelche wird zuerst Streptavidin (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS) und anschließend biotinylierte Anti-CD63-Antikörper (14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS) angebunden. Die zu detektierenden Exosomen aus der Zelllinie COLO-205 lagen in PBS zu einer Konzentration von 14,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vor. (b) Vergleichende Darstellung des Positivtests aus (a) mit einem Negativtest unter Verwendung von Isotypkontroll-Antikörpern (14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS). Nach der Spülung mit PBS werden die beim Negativtest adsorbierten Exosomen (14,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wieder vom Mikrokelchchips abgespült. Beim Positivtest hingegen resultieren die an die Anti-CD63-Antikörper anlagernden Exosomen in einer signifikanten Lasermodenverschiebung.

Zur exemplarischen Detektion brustkrebspezifischer Markerproteine wurde in der vorliegenden Arbeit das Protein HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) ausgesucht.²⁵⁹ Bei HER2 handelt es sich um ein Rezeptormolekül für epidermale Wachstumsfaktoren. Es ist an der Zell- und Gewebevermehrung beteiligt und liegt bei etwa 20 bis 30 % aller Brustkrebsfälle in stark erhöhten Konzentrationen vor. In diesem Fall wird es mit einer aggressiveren Form von Brustkrebs in Verbindung gebracht, da sich infolge der Überexpression auch die Mammakarzinome schneller vergrößern. Abbildung 5.15(a) zeigt eine Verdünnungsreihe von aus einer Zellkultur stammenden HER2-positiven Exosomen in PBS. Die verwendeten Mikrokelchchips wurden in diesem Fall mit Anti-HER2-Antikörpern funktionalisiert. In Abbildung 5.15(b) ist eine REM-Aufnahme eines Mikrokelchchips nach erfolgter Exosomendetektion dargestellt. Wie zu erwarten sind die Exosomen als ca. 50 bis 100 nm große Partikel zu erkennen. Abbildung 5.15(c) zeigt die erfolgreiche Klassifikation von HER2-positiven und negativen Patientenserum. Die Blutseren wurden vor der Detektion im Volumenverhältnis 1:2.500 in PBS gelöst. Während es bei der HER2-positiven Probe zu einer deutlichen Modenverschiebung der Mikrokelchchips kommt, bleibt das Sensorsignal nach der Injektion der HER2-negativen Lösung näherungsweise konstant. Sowohl in PBS als auch in verdünntem Blutserum konnten die HER2-positiven Exosomen somit erfolgreich detektiert werden. Es ist jedoch anzumerken, dass die hier gezeigten experimentellen Resultate von vorläufiger Natur sind. Es sind weitere Experimente vonnöten, um eine reproduzierbare Funktionalität der Mikrokelchchips zu belegen.

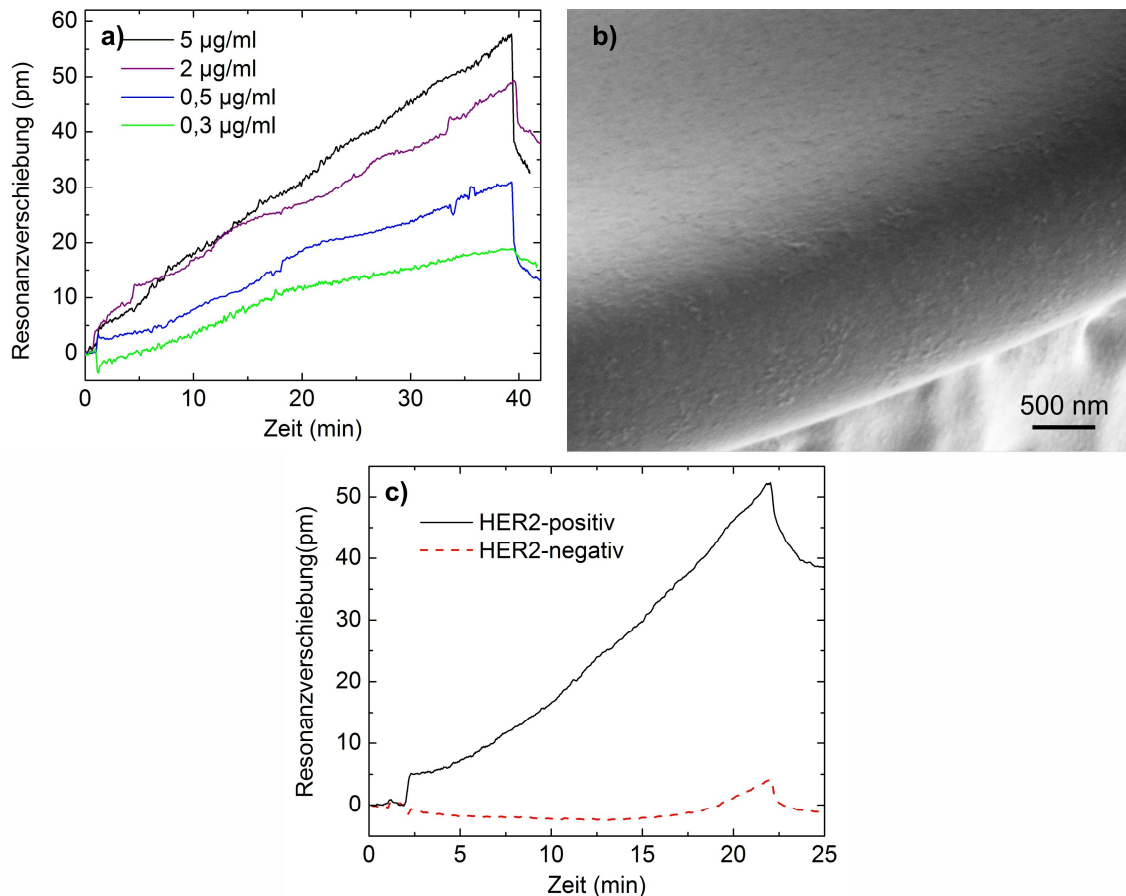


Abbildung 5.15: Demonstration der Erkennung von Brustkrebs anhand brustkrebspezifischer Exosomen. (a) Lasermodenverschiebung für verschiedene Konzentrationen HER2-positiver aus Zelllinien stammender Exosomen in PBS. (b) REM-Aufnahme eines Randabschnittes eines Mikrokelchlaser nach der Detektion von HER2-positiven Exosomen. Die Exosomen sind als 50 bis 100 nm große Partikel zu erkennen. (c) Zeitlicher Signalverlauf zweier Mikrokelchlaser bei Applizierung von verdünnten Patientenserum (1:2.500 in PBS) im Rahmen eines Positiv- und eines Negativversuchs. Während es bei der HER2-positiven Probe zu einer Modenverschiebung kommt, ist bei der HER2-negativen Lösung keine signifikante Verschiebung zu verzeichnen.

5.2 Mikrofluidisch integrierte Mikrokelchlaser

Zur Realisierung von effizienten biomolekularen Analysesystemen ist neben der Miniaturisierung der Sensorelemente vor allem auch deren Integration in eine miniaturisierte fluidische Infrastruktur von zentraler Bedeutung.^{260,261} Hierdurch werden zum einen die für die Herstellung benötigten Ressourcen sowie die im laufenden Betrieb anfallenden Verbrauchsmaterialien verringert. Während die Einsparung von Prozesschemikalien, z. B. zur Oberflächenfunktionalisierung, ein Kostenfaktor darstellt, ermöglicht vor allem die Minimierung des benötigten Analytvolumen einen Einsatz der Sensorplattform als, ggf. sogar portablen, Lab-on-a-Chip.²⁶² Geringere Analytmengen resultieren zudem oft in einer deutlichen Reduzierung der Analysezeit.

Die fluidische Adressierung von WGM-basierten Sensorstrukturen geschieht in aller Regel mikrofluidisch. Oft sind jedoch sowohl die Geometrie als auch das Ausleseverfahren der Sensorelemente die limitierenden Faktoren, sodass das jeweilige Sensorelement nur mit erhöhtem Aufwand in eine chipbasierte fluidische Infrastruktur integriert werden kann. Bei glasfasergekoppelten Sensoren beschränkt man sich zumeist auf den Einbau des gesamten Sensorchips bzw. des Sensorelements in eine mikrofluidische Kammer, um die ohnehin komplexe Adressierung mit der Glasfaser nicht zusätzlich zu erschweren.^{17,24,64,67,108,263} In einigen Ansätzen wurden sowohl das Sensorelement als auch die Glasfaser auf einen Chip integriert. So integrierten beispielsweise Dantham und Kollegen und Wilson und Kollegen ihre sphärischen Sensorelemente indem sie diese und die zur Adressierung benötigte Glasfaser zwischen einen Träger- und einen Fluidikchip klemmten.^{118,189} Bei Kapillaren ist die Sensorstruktur zeitgleich auch der fluidische Kanal.^{42,43,130} Dennoch wurden auch hier Versuche unternommen diese auf Chipebene zu integrieren, der

Fabrikationsprozess ist jedoch weiterhin komplex. Alle Ansätze erfordern einen hohen Integrationsaufwand, da vor allem die Integration die Glasfaseradressierung eine sehr hohe Akkuratheit und Robustheit voraussetzt. Chipbasierte Sensorstrukturen wie z. B. Mikroringresonatoren lassen sich hingegen mit vergleichsweise geringem Aufwand in eine mikrofluidische Infrastruktur integrieren.^{149,150,264}

Mikrokelle eignen sich in besonderem Maße für eine Integration in eine chipbasierte mikrofluidische Infrastruktur, da ihre Fabrikation photolithographisch und auf Waferskala erfolgt. Darüber hinaus können aktive Mikrokelle per Freistrahloptik auf einfache Art und Weise angeregt und ausgelesen werden. Die hergestellten Sensorelemente bieten somit eine gute Basis zur kostengünstigen Realisierung von integrierten Sensorplattformen. Das folgende Kapitel befasst sich mit der Integration von CVD-funktionalisierten Mikrokellchlasern in eine chipbasierte mikrofluidische Infrastruktur.

5.2.1 Lab-on-a-Chip Plattform

In Abbildung 5.16 ist der im Rahmen dieser Arbeit realisierte Lab-on-a-Chip als Prinzipskizze dargestellt. Zur Verkapselung des Lab-on-a-Chip werden die Chips mit den Mikrolasern mit PPX-PFP und die die Mikrokanäle beinhaltende Deckel mit Poly(4-Aminomethyl-*p*-Xylylen-*co-p*-Xylylen) (PPX-CH₂NH₂) beschichtet. Das PPX-CH₂NH₂ verfügt über Aminogruppen, welche analog zur in Kapitel 5.1.2 aufgezeigten Oberflächenfunktionalisierung kovalent als Amid an das PPX-PFP angebunden werden. Nach der Beschichtung werden die beiden Chips zueinander ausgerichtet und miteinander in Kontakt gebracht. Nach einer gewissen Haltezeit ist der Verkapselungsvorgang abgeschlossen. Die anschließende Oberflächenfunktionalisierung der Mikrokelle erfolgt durch Exposition der aminoterminierten Moleküle über die Mikrofluidikkanäle.

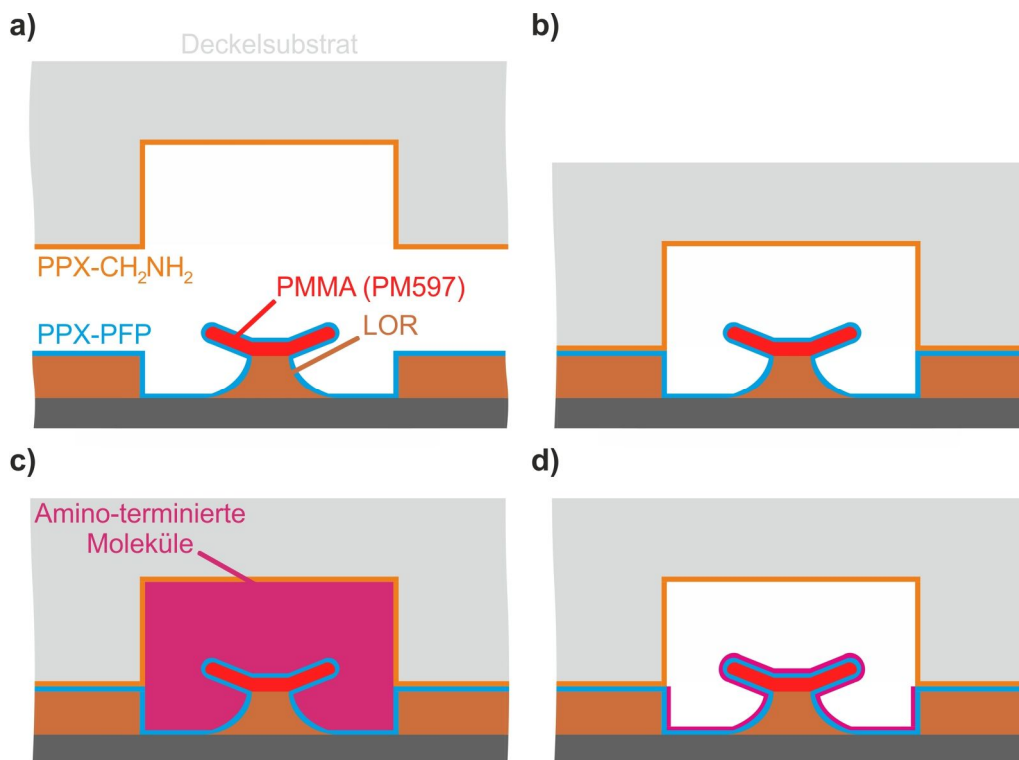


Abbildung 5.16: Prinzipskizze des Lab-on-a-Chip. (a) Zur Verkapselung wird der Chip mit den Mikrolasern mit PPX-PFP (blau) und der die Mikrokanäle beinhaltende Deckel mit PPX-CH₂NH₂ (orange) beschichtet. (b) Anschließend werden die beschichteten Oberflächen der Chips miteinander in Kontakt gebracht. Der Kontakt wird über eine gewisse Haltezeit aufrechterhalten. (c) Nach der kovalenten Verkapselung erfolgt die Oberflächenfunktionalisierung der Mikrokellchlasern mit aminoterminierten Molekülen (pink). (d) Verkapselter Lab-on-a-Chip nach der Oberflächenfunktionalisierung.

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit realisierte Lab-on-a-Chip umfasst Mikrokellchlasern, die entlang zweier paralleler Zeilen orientiert sind (26 Laser pro Zeile). Abbildung 5.17(a) zeigt einen

kompletten 4-Zoll-Wafer mit Mikrokelchlaserchips vor dessen Vereinzelung. Der Chip mit den Mikrokelchlasern ist hierbei nicht nach dem Standardherstellungsverfahren gemäß Grossmann und Kollegen hergestellt (s. Kapitel 3.1.2), sondern nach einem erweiterten Herstellungsverfahren nach Wienhold und Kollegen.^{140,141} Im Rahmen dieses Verfahrens kommt zwischen dem Silizium-Trägersubstrat und der PMMA-Lage eine weitere polymere Lage zum Einsatz (Lift-Off-Lack LOR, MicroChem GmbH), aus welcher nunmehr der Resonatorsockel über einen nasschemischen Ätzprozess gefertigt wird. Zum einen entfällt hierdurch der bisher benötigte zeitaufwändige und giftige XeF_2 -Prozess zur Unterätzung des Siliziumwafers. Zum anderen kann der Lift-Off-Lack auf nahezu jedes Trägersubstrat aufgebracht werden, was den Anwendungsbereich der Mikrokelche signifikant erweitert. Die photolithografische Strukturierung erfolgt hierbei weiterhin nach dem in Kapitel 3.1.2 erläuterten Standardverfahren. Die in Kapitel 6 realisierten Copolymer-Mikroresonatoren basieren auf demselben Herstellungskonzept. Die photolithographische Definition der Resonatorstrukturen erfolgt dort allerdings via DUV-Lithographie.

Das Deckelsubstrat enthält zwei auf das Chipdesign der Mikrolaserchips abgestimmte mikrofluidische Kanäle. In Abbildung 5.17(b) ist ein 4-Zoll-Wafer mit Mikrofluidikchips vor deren Vereinzelung dargestellt. Die Herstellung erfolgt durch Heißprägen in kommerzielle Acrylglasscheiben (Hesa HT, Notz Plastics AG) mit einer am IMT befindlichen Heißpräganlage HEX 03 (Jenoptik), die vor dem Prägen in 4-Zoll-Wafer unterteilt wurden. Zur thermischen Abformung wurde ein siliziumbasiertes Abformwerkzeug hergestellt (Abbildung 5.17(c)). Dieses beinhaltet per UV-Lithografie hergestellte hochtemperaturstabile Lackstrukturen (MRX50 XP, MicroChem GmbH), welche den späteren Mikrokanälen entsprechen. Hierzu wurde per Laserdirektschreiben (DWL 66, Heidelberg Instruments) eine entsprechende Schattenmaske realisiert (Abbildung 5.17(d)). Zur Erleichterung der Trennung vom heißgeprägten Substrat wurde das Abformwerkzeug nach seiner Herstellung mit einer Antihafschicht per metallorganische Gasphasenabscheidung (MOVPE, MVD100E System, Applied MicroStructures Inc.) beschichtet. Die Abformung der Mikrokanalstrukturen erfolgt bei einer Temperatur von 120 °C und einer Anpresskraft von 15 kN bei einer Haltezeit von zehn bis 15 Minuten. Die auf diese Weise hergestellten Mikrokanäle sind 30 µm tief und 500 µm weit. Die Länge der Mikrokanäle ist 8 mm. Nach der Vereinzelung der heißgeprägten Wafer in einzelne Chips werden die fluidischen Ein- und Auslässe mit einem Mikrobohrer eingebohrt (Lochdurchmesser 300 µm) und anschließend entgratet (Abbildung 5.18).

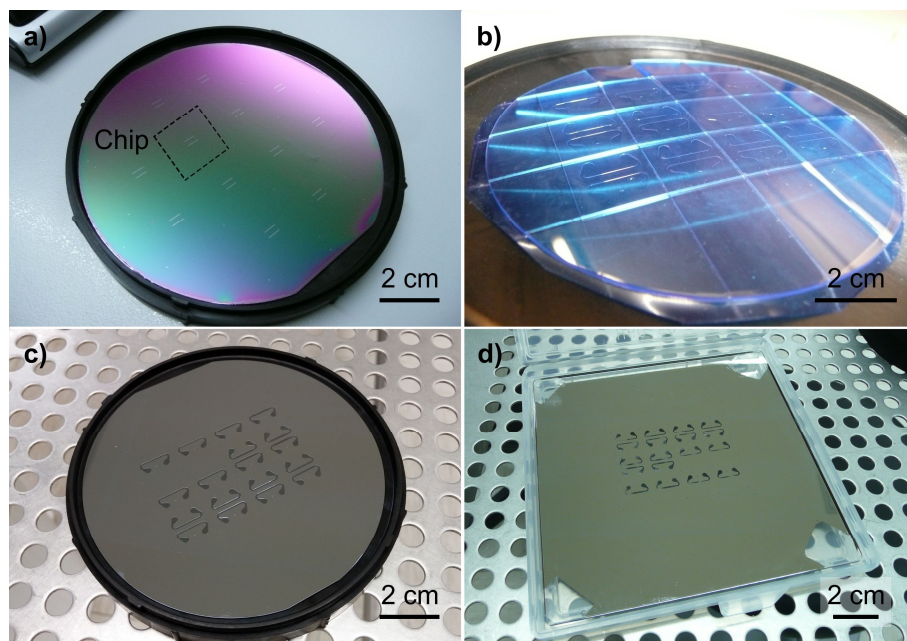


Abbildung 5.17: Herstellung der Mikrokelchlaser- und der Mikrofluidikchips. (a) Siliziumwafer mit Mikrokelchlaserstrukturen vor der Vereinzelung in Chips. Die finalen Chips enthalten jeweils zwei Zeilen mit Mikrokelchlasern. (b) PMMA-Wafer mit heißgeprägten Mikrokanalstrukturen nach seiner Vereinzelung in einzelne Chips. Im finalen Lab-on-a-Chip adressiert jeder Mikrofluidikkanal eine Mikrokelchlaserzeile. (c) Abformwerkzeug zur Herstellung der Mikrokanäle via Heißprägen. (d) Schattenmaske zur photolithografischen Herstellung des Abformwerkzeugs aus (c).

Nach ihrer Vereinzelung werden die Chips mit den Mikrolasern mit 150 nm PPX-PFP und die mikrofluidischen Deckel mit 20 bis 30 nm PPX-CH₂NH₂ beschichtet. Um eine möglichst homogene und stabile Verbindung der Chips miteinander zu gewährleisten, werden diese nach dem Zusammenfügen der beschichteten Frontflächen zwischen zwei Mikroskopglasträgern fixiert und die Anordnung mit Maulklemmen fixiert (Abbildung 5.18(a) und (b)). Die Verkapselung erfolgt bei Raumtemperatur. Es wird eine Haltezeit von drei Tagen gewählt, um eine ausreichende Reaktionsdauer zwischen den funktionellen Gruppen sicherzustellen. Die Abbildungen 5.18(c) und (d) zeigen die einzelnen Chipkomponenten eines Lab-on-a-Chips vor und nach ihrer Vereinigung. Die lateralen Maße des Kelchchips betragen 20 x 20mm, die des mikrofluidischen Deckels 15 x 15 mm. Abbildung 5.18(e) zeigt die verkapselten Mikrolaser als Mikroskopaufnahme.

Im finalen Herstellungsschritt werden flexible Polyethylenschläuche an die mikrofluidischen Zu- und Abläufe geklebt und die jeweiligen Enden der Schläuche mit Luer-Anschlüssen versehen. Abbildung 5.19(a) zeigt einen fertigen Lab-on-a-Chip eingebaut im optischen Versuchsaufbau vor der Charakterisierung seiner BRIS. Aus Abbildung 5.19(b) geht hervor, dass die Mikrokanäle ohne Lufteinschlüsse befüllt werden können, was sowohl die Dichtheit der mikrofluidischen Anschlüsse als auch die der Verkapselung belegt. Eine tiefgehende Charakterisierung der mechanischen Stabilität der CVD-Verkapselung erfolgt an dem dort vorgestellten markerbasierten Lab-on-a-Chip in Kapitel 5.3.1.

In ersten Experimenten wurde an den verkapselten Mikrolasern eine BRIS zwischen 26,5 und 29,5 nm/RIU gemessen. Im Vergleich zu unbeschichteten Mikrolasern (17,5 bis 21,5 nm/RIU) ist auch hier eine Erhöhung der BRIS durch die Einführung der CVD-Lage zu verzeichnen. Während für den Flüssigkeitsaustausch bei den unverkapselten Mikrolasern bedingt durch das Design der verwendeten Fluidikkammer ein Flüssigkeitsvolumen von mindestens 500 µl verwendet wurde, konnte das benötigte Volumen bei den verkapselten Lab-on-a-Chips um mehr als zwei Größenordnungen auf ca. 1,5 µl kontrolliert reduziert werden.

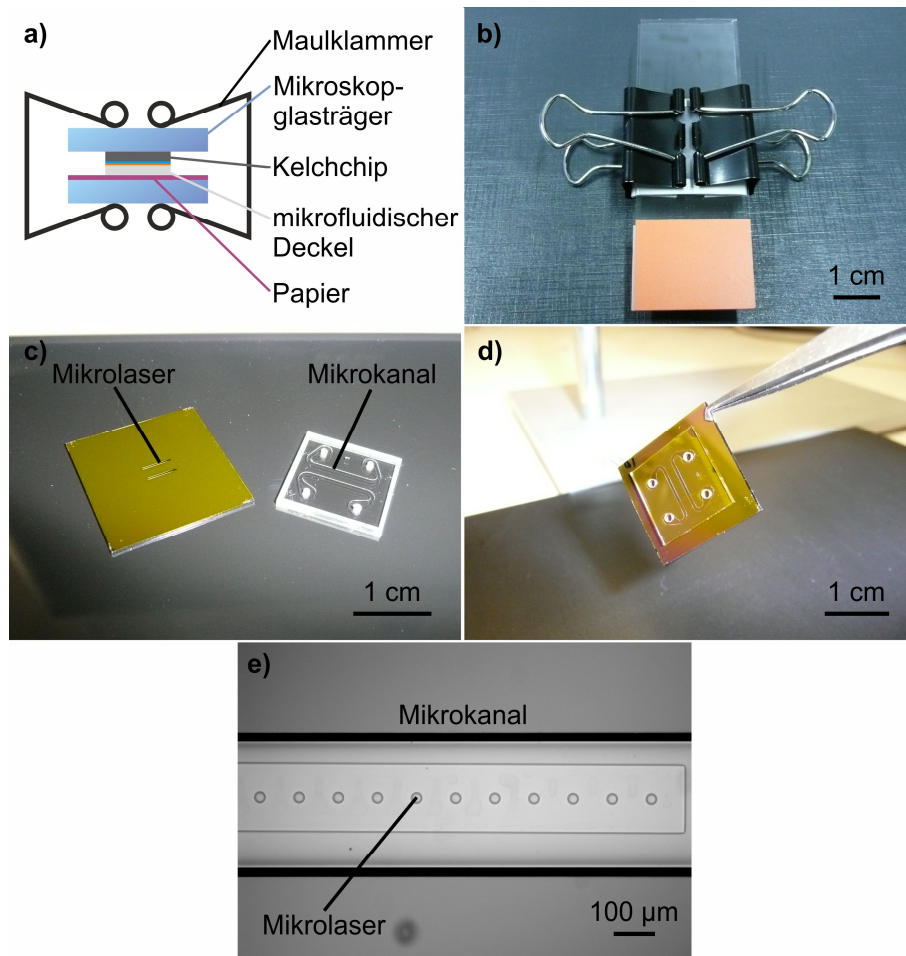


Abbildung 5.18: VerkapSELUNG der Mikrokelchlaser zu einem mikrofluidischen Lab-on-a-Chip. (a) Schematische Darstellung der Konfiguration zur VerkapSELUNG eines Lab-on-a-Chip. Nachdem der mikrofluidische Deckel und der Mikrolaserchip mit ihren CVD-beschichteten Oberflächen aufeinander gelegt wurden, wird diese Anordnung zwischen zwei Mikroskopglasträgern fixiert und mit Maulklammern zusammengepresst. Zur Homogenisierung des Anpressdrucks dient ein zusammengefaltetes Papier zwischen dem Mikrofluidikdeckel und einem der Mikroskopglasträger. (b) Nach einer Haltezeit von drei Tagen und Lagerung bei Raumtemperatur werden die Klammern wieder entfernt. (b) Anordnung aus (a) als Realbild. (c) Ein Mikrokelchlaserchip und ein mikrofluidischer Deckel vor deren VerkapSELUNG. Die lateralen Abmessungen des Mikrokelchlaserchips betragen 20 x 20mm, die des Mikrofluidikdeckels 15 x 15 mm. (d) VerkapSELter Lab-on-a-Chip. (e) Mikroskopaufnahme der verkapSELten Mikrolaser.

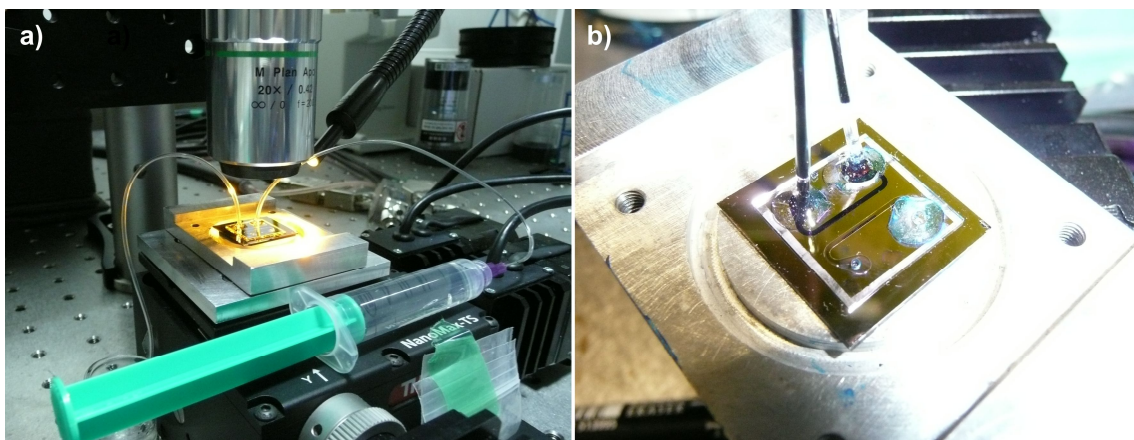


Abbildung 5.19: Fertiger Lab-on-a-Chip eingebaut im optischen Charakterisierungsaufbau. (a) Übersichtsaufnahme, (b) Nahaufnahme eines Lab-on-a-Chips. Ein Kanal wurde mit einer wässrigen dunkelblauen Tinte luftblasenfrei befüllt.

5.3 CVD-Funktionalisierung weiterer chipbasierter Strukturen

Im Verlauf der in den Kapiteln 5.1 und 5.2 dargestellten Arbeiten entstanden weitere Ideen zur Anwendung von funktionellen PPX-Lagen. Diese werden im folgenden Kapitel 5.3 in Kürze erörtert.

Kapitel 5.3.1 befasst sich mit der Realisierung eines markerbasierten Lab-on-a-Chip.²⁴⁸ Hierbei kommt zur Funktionalisierung und zur Verkapselung der Chips dieselbe PPX-Schichtenkombination wie in Kapitel 5.2 zum Einsatz. In Kapitel 5.3.2 wird die hochkonforme Abscheidung von PPX ausgenutzt, um den fabrikationslimitierten Abstand zweier eng zueinander strukturierter Scheibenlaser unter Aufrechterhaltung der vertikalen Seitenwände signifikant zu verringern.¹²⁵ Auf diese Weise wird eine optische Kopplung der beiden Mikrolaser erreicht, sodass über den Vernier-Effekt Einfluss auf das Emissionsspektrum der gekoppelten Scheibenlasersystems genommen werden kann.

5.3.1 Markerbasiertes photonisches Lab-on-a-Chip System

Das in Kapitel 5.2 eingeführte Verfahren zur chemischen Verkapselung von chipbasierten Substraten wurde in einem weiteren Projekt eingesetzt, um eine markerbasierte biomolekulare Analyseplattform zu realisieren. Diese besteht aus einem polymeren Chipsubstrat, welches parallel zueinander angeordnete optische Wellenleiter beinhaltet, und einem ebenfalls polymeren Deckelsubstrat mit der mikrofluidischen Infrastruktur. In der Plattform sind die Wellenleiter so orientiert, dass sie den mäanderförmigen mikrofluidischen Kanal des Deckels orthogonal kreuzen und auf diese Weise optofluidische Interaktionszonen bilden (Abbildung 5.20(a)). Das in den Wellenleitern geführte Analyselicht wird zu den mikrofluidischen Kanälen geleitet, wo es über den evaneszenten Lichtanteil zu einer Interaktion mit dem im Kanal lokalisierten Analyten kommt. Über die verschiedenen Wellenleiter können unterschiedliche Areale des Kanals adressiert werden. Durch die mäanderförmige Geometrie des Kanals werden hierbei pro Kanal mehrere Areale zeitgleich mit Analyselicht abgetastet. Im vorliegenden Beispiel docken farbstoffmarkierte Moleküle an oberflächenfunktionalisierte Wellenleiter an. Über die Oberflächenfunktionalisierung wird eingestellt, welche Art von Analytmolekül untersucht werden soll. Alternativ können unter Verzicht der Oberflächenfunktionalisierung auch im Analyten gelöste Moleküle direkt untersucht werden. Beide Optionen setzen die Vorbehandlung der zu untersuchenden Moleküle mit einem Farbstoff voraus.

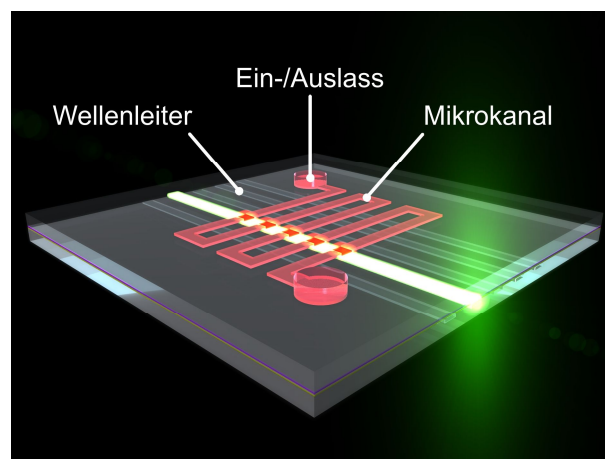


Abbildung 5.20: Prinzipskizze des markerbasierten Lab-on-a-Chip. Der Lab-on-a-Chip besteht aus einem mikrofluidischen Deckel mit einem mäanderförmigen Mikrokanal und einem Wellenleitersubstrat, dessen Wellenleiter den Kanal orthogonal kreuzen. Zur Verkapselung der beiden Chips werden deren Oberflächen mit PPX-PFP (gelb) und PPX-CH₂NH₂ (violett) beschichtet und die beschichteten Flächen anschließend miteinander in Kontakt gebracht. Auf der Wellenleiterchipseite immobilisierte fluoreszenzmarkierte Biomoleküle werden über das evaneszente Licht des im Wellenleiter geführten Analyselichtes an den Kreuzungspunkten angeregt.

Sowohl die Wellenleiter als auch die Mikrofluidik sind auf direktem Wege in das jeweilige Chipsubstrat durch lokale Kontaktbelichtung im tiefen UV realisiert (Abbildung 5.21(a)). Hierzu werden Fabrikationsprozesse gemäß Henzi und Kollegen²⁶⁵ und Mandisloh²⁶⁶ verwendet. Als Substratmaterial dient das kommerziell erhältliche Acrylglas HESA HT (Notz Plastics AG). Für die

Bestrahlung wurde ein Maskaligner EVG 620 (EVGroup GmbH) bei einer Arbeitswellenlänge von 240 bis 250 nm eingesetzt. Zuerst werden die Acrylglasscheiben in 15x15 mm große Chips gesägt und diese anschließend mit Isopropanol und deionisiertem Wasser gereinigt. Nach der Belichtung weisen die bestrahlten Bereiche des Acrylglases bedingt durch die chemische Modifikation des Polymers sowohl einen erhöhten Brechungsindex als auch eine erhöhte Löslichkeit in organischen Lösemitteln auf. Somit kann im Rahmen der Fabrikation entschieden werden, ob diese Bereiche beispielsweise direkt als optische Wellenleiter oder die nach einem nasschemischen Herauslösen des UV-modifizierten Materials resultierenden Vertiefungen als Mikrokanäle fungieren sollen. Für die Herstellung der mikrofluidischen Kanäle wird eine Belichtungs-dosis von 10 J/cm^2 appliziert. Die belichteten Chips werden anschließend für 90 Minuten in das Entwicklersystem GG (60 Vol.-% Diethylglykolmonobutylether, 20 Vol.-% Morpholin, 5 Vol.-% Aethanolamin, 15 Vol.-% deionisiertes Wasser)²⁶⁷ getaucht. Im Anschluss wird die Entwicklung durch eine zehnmünütige Immersion in das Stoppersystem BDG (80 Vol.-% Diethylglykolmonobutylether, 20 Vol.-% deionisiertes Wasser) beendet. Danach werden die Chips für zehn Minuten mit deionisiertem Wasser gespült. Die auf diesem Wege realisierten Mikrokanäle sind ca. $5 \mu\text{m}$ tief. Nach diesem Prozess werden die fluidischen Ein- und Auslässe in die jeweiligen Kanalenden gebohrt. Zur Herstellung der Wellenleiterchips wird eine Belichtungs-dosis von 500 mJ/cm^2 verwendet, ohne anschließende nasschemische Entwicklung. Die fabrizierten Wellenleiter- und Kanalchips werden auf die in Kapitel 5.2 erörterte Methode miteinander verbunden. Das PPX-PFP wird hierfür auf die Wellenleitersubstrate aufpolymerisiert und dient im Anschluss an die Verkapselung weiterhin auch zur Oberflächenfunktionalisierung der Wellenleiter. Das PPX- CH_2NH_2 wird auf die Kanalchips aufgebracht. Anschließend wurden die beschichteten Chips bei Raumtemperatur für drei Tage miteinander verbunden. Ein fertiger markerbasierter Lab-on-a-Chip ist in Abbildung 5.21b dargestellt.

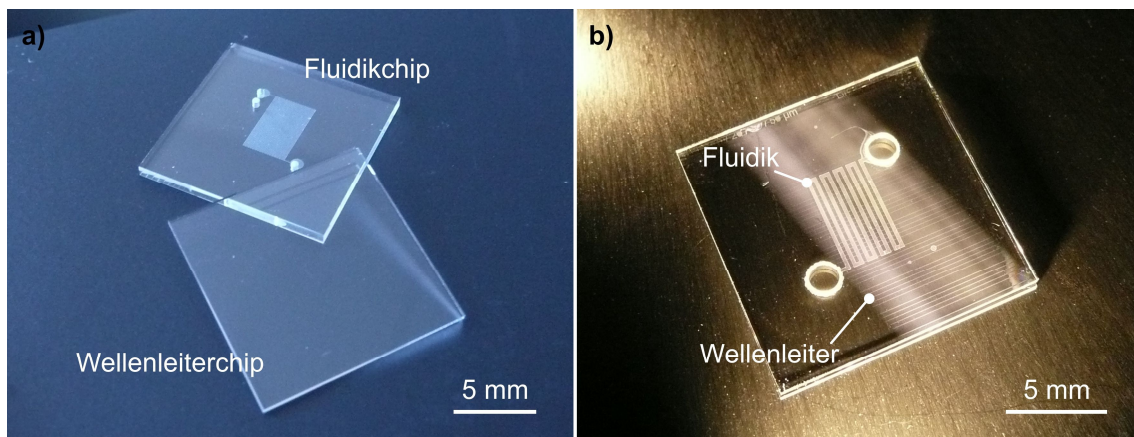


Abbildung 5.21: Markerbasierter Lab-on-a-Chip. (a) Mikrofluidischer Deckel und Wellenleiterchip nach deren Herstellung. (b) Verkapselter Lab-on-a-Chip.

An einer Reihe von Testchips wurde die mechanische Stabilität der Verkapselung untersucht. Hierzu wurde an die fluidischen Einlässe einzelner Analyseplattformen ein dickwandiger Polyethylenschlauch aufgeklebt. Die Gegenseite des Schlauches wurde mit einem männlichen Luer-Anschluss versehen. Der fluidische Auslass wurde mit einem Klebstoff versiegelt, sodass das über den Einlass eingepumpte Wasser (Druckpumpe Sika 350.1) im Chip einen statischen Druck aufbaute. Dauerhaft konnten die Chips bei 15 bar gehalten werden, ohne dass einzelne Komponenten des Aufbaus zerstört wurden. Bei statischen Drücken jenseits von 15 bar kam es zu einer schleichenden Verformung des Schlauches. Der maximal applizierte Druck betrug ca. 35 bar, bevor entweder der Schlauch oder der angeklebte Luer-Anschluss zerstört wurden. Die Verkapselung war zu diesem Zeitpunkt nach wie vor visuell komplett intakt. Zugscherversuche an unstrukturierten per PPX-PFP und PPX- CH_2NH_2 verbundenen Chipsubstraten ergaben eine maximale Schubspannung vom $0,26 \pm 0,2 \text{ MPa}$ (Zug-Tester 100Q, TestResources). Die Trennung der Substrate resultierte hierbei auf einer Delaminierung der CVD-Lagen von ihren Trägersubstraten. Die kovalente Verbindung der beiden CVD-Lagen blieb intakt. Die zu Vergleichszwecken nach Chen und Kollegen hergestellten Chips derselben Geometrie ergaben eine vergleichbare maximale Schubspannung vom $0,29 \pm 0,4 \text{ MPa}$.²⁴¹ Hierbei wurde anstelle von PPX-PFP

PPX-CHO verwendet. Die Verkapselung fand bei 70 °C über drei Tage statt (anstelle wie bei Chen und Kollegen bei 140 °C). Obwohl bei beiden Verkapselungen starre Substrate zum Einsatz kamen, konnten diese somit mit hoher Stabilität miteinander verbunden werden. Obwohl bei Chen und Kollegen mindestens eine der beiden Chipsubstrate aus PDMS bestand ließen sich dort aufgrund der dadurch homogenen Substratkontaktierung lediglich etwa 4-fach höhere Schubspannungen realisieren. Sowohl die statischen Druckversuche als auch die Zugscherexperimente implizieren eine ausreichende Stabilität der hier betrachteten Analyseplattform für den Betrieb in einer mikrofluidischen Anwendung.

Die Demonstration der Analyseplattform im Rahmen eines markerbasierten molekularen Detektionsansatzes wurde mit dem Nikon TE 2000 Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Hierbei diente erneut Cy3-Streptavidin als Modell-Analytmolekül. Zur wellenleiterchipseitigen Funktionalisierung der einzelnen Chips wurde 10 µmol/L Amino-dPEG₁₁-Biotin (PBS) durch den Mikrokanal geleitet. Nach einer Stunde wurde die Biotinylierung mit einer Lösung aus 0,1 Gew.-% BSA und 0,05 Gew.-% Tween 20 in PBS beendet. Anschließend wurden die nicht mit Biotin belegten Kanalbereiche für 30 Minuten mit BSA geblockt. Die Cy3-Streptavidin-Inkubation (160 nmol/L in PBS) erfolgte über eine Zeitdauer von einer Stunde und wurde durch sukzessives Spülen mit BSA/Tween 20/PBS und Tween 20/PBS für jeweils fünf Minuten beendet. Die einzelnen Flüssigkeiten wurden mittels einer elektrischen Spritzenpumpe mit einer Flussrate von 200 nl/min kontinuierlich durch den Mikrofluidikkanal der Analyseplattform geleitet. Die Abbildungen 5.22(a) und (b) zeigen das Ergebnis der Prozedur. Aus den im Standardmodus mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgezeichneten Bildern (Anregung der Fluoreszenz mittels Halogenlampe durch Flutbelichtung über das Mikroskopobjektiv) geht hervor, dass die Immobilisierung des Cy3-Streptavidins homogen über den wellenleiterseitigen Bereich des Chips stattgefunden hat. Zur Demonstration des markerbasierten Ansatzes wurde die Gasentladungslampe des Mikroskops deaktiviert und lediglich die verschiedenen Filtersätze zur Visualisierung der einzelnen Farbkanäle verwendet. Als Anregelichtquelle für das Cy3-Streptavidin fungiert nun ein grüner Festkörperlaser mit einer Arbeitswellenlänge von 532 nm (MGL III532, Changchun New Industries Optoelectronics Tech. Co., Ltd.). Das Laserlicht wird hierbei über eine Glasfaser mit linsenförmiger Endfacette (Nanonics Imaging, Ltd.) in die einzelnen Wellenleiter eingekoppelt. Die Positionierung der Glasfaser erfolgt mit einem dreiachsigen Translationstisch. Aus Abbildung 5.22(c) geht hervor, dass die fluoreszente Anregung des Cy3-Streptavidins ausschließlich entlang der optofluidischen Interaktionszonen stattfindet. Das Analyselicht kann hierbei zur sequentiellen Anregung hintereinander geschalteter Mikrokanäle verwendet werden (Abbildung 5.22(d) und (e)). So konnten mit dem vorliegenden Chipdesign alle neun Wellenleiterteilstücke zeitgleich adressiert werden.

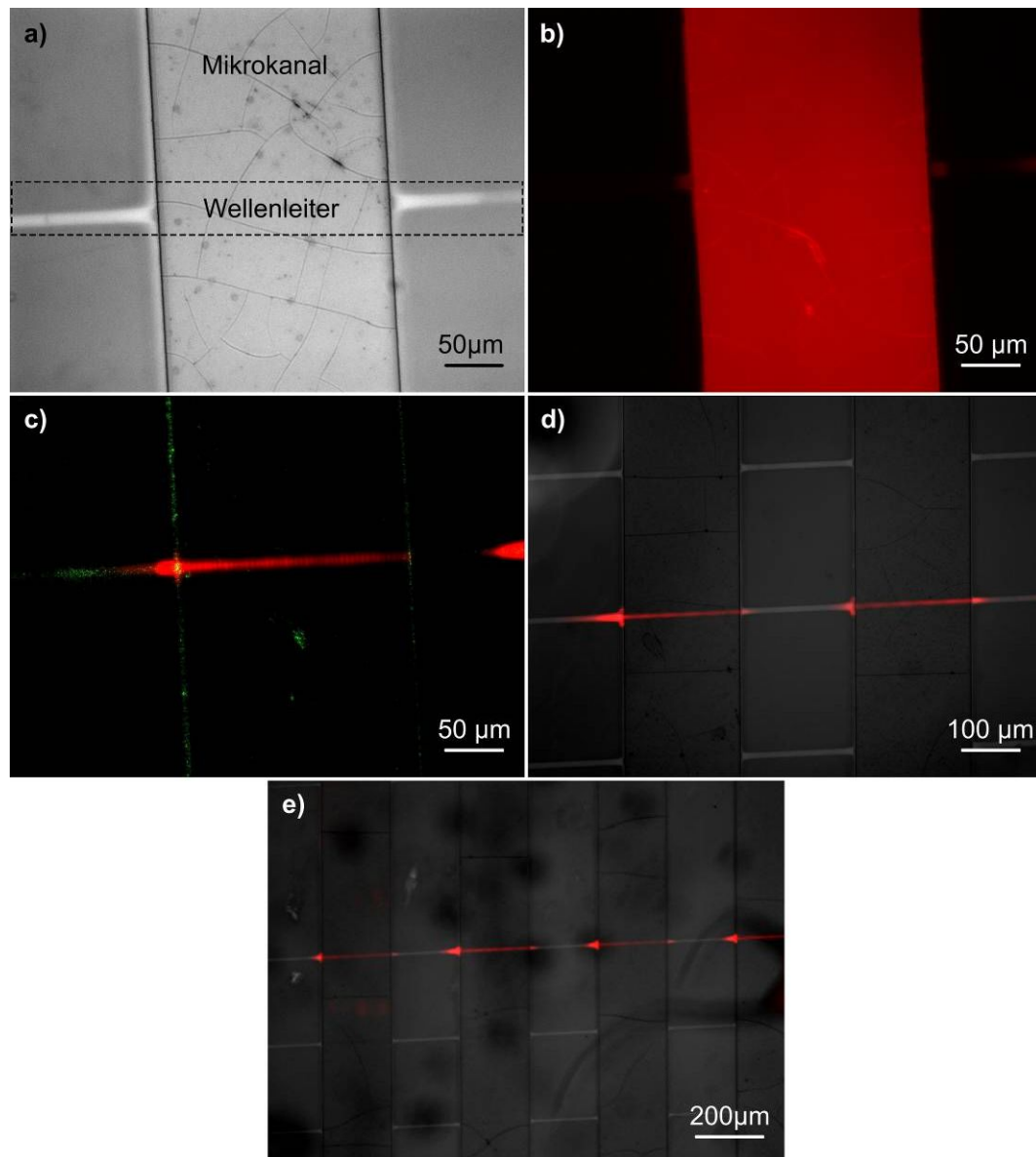


Abbildung 5.22: Markerbasierte Detektion von Streptavidin. (a) Hellfeldmikroskopaufnahme einer optofluidischen Interaktionszone. (b) Fluoreszenzbild der Interaktionszone. Bei Flutbelichtung über das Mikroskopobjektiv wird das komplette auf der Wellenleiterchipseite immobilisierte Cy3-Streptavidin angeregt. (c) Wird das Licht eines Pumplasers über die Endfacette des Lab-on-a-Chips in den Wellenleiter eingekoppelt, erfolgt die Anregung der Fluoreszenz strikt entlang des Wellenleiters. (d) und (e) Bei ausreichender Pumplaserintensität werden mehrere hintereinander liegende Interaktionszonen adressiert.

Die Ergebnisse dieses Kapitels belegen, dass der in Kapitel 5.2 anhand der Mikrokelche eingeführte Verkapselungsansatz flexibel zur mikrofluidischen Verschließung diverser chipbasierter biomolekularer Analysensysteme eingesetzt werden kann. Aufgrund der Plattformunabhängigkeit des Ansatzes können die Systeme sowohl aus unterschiedlichen Materialien bestehen als auch unterschiedliche Sensorgeometrien und Detektionsansätze beinhalten.

5.3.2 Chipbasierte photonische Moleküle

Aufgrund ihres höheren Brechungsindex im Vergleich zu PMMA können PPXe zur gezielten Beeinflussung der Wellenleitereigenschaften der PMMA-Resonatoren genutzt werden (vgl. Kapitel 5.1.2). In den Kapiteln 5.1 und 5.2 wurde auf diese Weise der optische Überlapp der WGMs mit dem umgebenden Analyten und somit die BRIS der beschichteten Mikrokelche verbessert. In diesem Kapitel wird das PPX nun verwendet, um die Interaktion zweier benachbarter Mikroresonatoren einzustellen.

Die diskreten elektromagnetischen Zustände in einem optischen WGM-Resonator weisen eine große Analogie zu den Wellenfunktionen von Elektronen im quantenmechanischen Atommodell auf.^{268–270} So werden die Lichtmoden über Eigenfunktionen mathematisch beschrieben und anhand von Quantenzahlen klassifiziert (Kapitel 3.1.1).²⁷⁰ Während infolgedessen einzelne Resonatoren auch als photonische Atome bezeichnet werden, fallen gekoppelte Resonatorsysteme, bestehend aus zwei oder mehr Resonatoren, in die Kategorie der photonischen Moleküle (PMs).^{268,271} Aufgrund des sehr geringen lateralen Abstandes der Resonatoren zueinander kommt es bei PMs zur optischen Kopplung, wodurch je nach Geometrie und Konfiguration der Resonatoren unterschiedliche Effekte resultieren. Beispielsweise kommt es bei der Interaktion von Resonatoren mit exakt derselben Geometrie zu einer spektralen Aufspaltung der von den (ungekoppelten) Einzelresonatoren unterstützten identischen Moden in „bindende“ und „antibindende“ Moden, deren spektraler Abstand abhängig vom lateralen Abstand der Resonatoren ist.^{73,272} Diese Moden sind dann über alle an der Kopplung beteiligten Resonatoren delokalisiert und werden als Supermoden bezeichnet.^{271,272} Bei PMs bestehend aus unterschiedlichen Resonatoren lässt sich über die Auswahl der Resonatorgeometrien und der Kopplungsabstände gezielt sowohl die Anzahl als auch die spektrale Position der vom Gesamtresonatorsystem unterstützten Supermoden einstellen (Vernier-Effekt^{148,273}). Hierdurch lassen sich beispielsweise optische Frequenzfilter für die Nachrichtentechnik, monomodige Laserlichtquellen^{273,274} und auch Biosensoren herstellen.^{148,275,276} Bedingt durch die sehr geringen Resonatorabstände kann bei photonischen Molekülen eine Verstärkung des optischen Feldes im Kopplungsspalt erzielt werden, was bei einer Anwendung als Biosensor zu einer Erhöhung der Sensitivität führt.^{272,277,278} PMs wurden bereits mit unterschiedlichen Resonatorsystemen demonstriert.^{268,279–281}

Dieses Kapitel befasst sich mit der Realisierung von PMs für den sichtbaren Wellenlängenbereich, wobei der Schwerpunkt auf der Anwendung als Biosensor liegt. Die PMs bestehen aus zwei PM 597-dotierten PMMA-Scheibenresonatoren mit unterschiedlichen Kreisradien. Über optische Kopplung der beiden Scheibenlaser wird eine Modenselektion bis hin zum monomodigen Betrieb basierend auf dem Vernier-Effekt erzielt.¹²⁵ Des Weiteren wird die BRIS der PMs charakterisiert. Die dargelegten Ergebnisse entstanden in Zusammenarbeit mit T. Grossmann, in dessen Dissertationsschrift detaillierte theoretische Aspekte sowie weitere Ergebnisse in voller Tiefe erörtert werden.⁷³ Numerische Analysen können in der Diplomarbeit von D. Floess nachgelesen werden.²⁷⁸

Das Funktionsprinzip der PMs ist in Abbildung 5.23 dargestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Kreisradien unterstützen die beiden PMMA-Scheibenlaser Lasermoden mit unterschiedlichen Wellenlängen und freien Spektralbereichen. In periodischer Abfolge befinden sich hierbei einzelne Moden erneut an exakt derselben spektralen Position und werden folglich von beiden Resonatoren unterstützt. Die optische Kopplung der beiden Scheiben resultiert demnach in der Ausbildung von Supermoden. Für alle übrigen Lasermoden, die lediglich von einem der beiden Resonatoren unterstützt werden, stellt die Kopplung mit dem jeweils anderen Resonator ein zusätzlicher Verlustkanal dar. Während somit die Supermoden weiterhin verlustarm über beide Scheiben delokalisiert propagieren, erfahren alle übrigen Moden im gekoppelten Resonatorsystem eine erhöhte Dämpfung und damit einhergehend eine Erhöhung ihrer Laserschwelle. Die Stärke der Dämpfung ist hierbei abhängig von der Kopplungsstärke der beiden Scheiben.²⁷⁸ Über die individuellen Kreisradien R_1 und R_2 der Scheiben kann sowohl die spektrale Position als auch der spektrale Abstand $\delta\lambda_{\text{FSR,PM}}$ der Supermoden eingestellt werden.^{273,274}

$$\delta\lambda_{\text{FSR,PM}} = \frac{\lambda_{\text{PM}}^2}{2\pi n_{\text{eff}}(R_2 - R_1)} \quad (30)$$

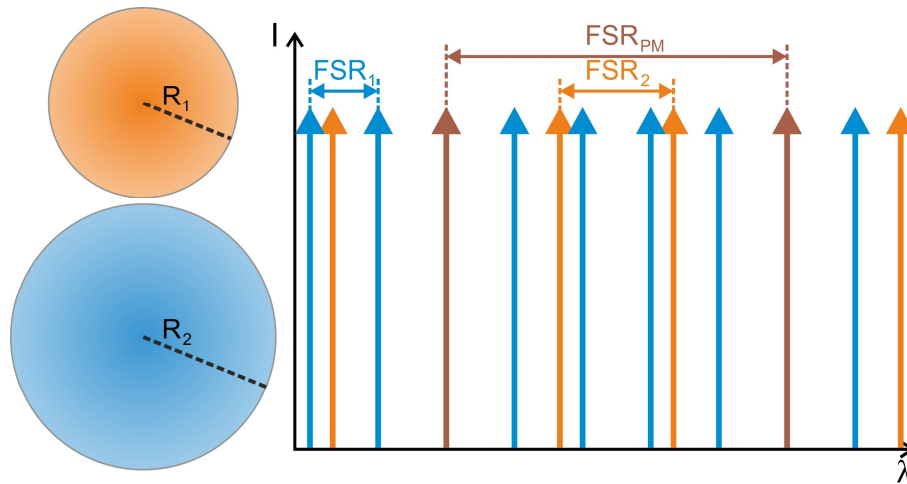


Abbildung 5.23: Funktionsweise eines PM bestehend aus zwei WGM-Resonatoren kreisförmiger Geometrie. Bei unterschiedlichen Resonatorradien R_1 und R_2 unterstützen die beiden Resonatoren WGMs mit unterschiedlichen freien Spektralbereichen FSR_1 und FSR_2 . Bei ausreichend starker optischer Kopplung werden die von lediglich einem einzigen Resonator unterstützten WGMs (orange, blau) vom jeweils anderen Resonator gedämpft. Die von beiden Resonatoren unterstützten WGMs (braun) hingegen propagieren verlustarm delokalisiert über beide Resonatoren. Deren FSR_{PM} ist hierbei abhängig von den Resonatorradien, und somit den FSRs, der beiden Einzelresonatoren.

Zur Herstellung der PMs kommt derselbe Fabrikationsprozess zum Einsatz wie für die Mikrokelche (Kapitel 3.1.2), jedoch ohne den finalen thermischen Ausbackschritt. Allerdings können die benötigten Kopplungsspaltweiten (kleiner als die halbe Wellenlänge der unterstützten WGMs) nicht mit konventionellen fotolithografischen Methoden hergestellt werden, da für eine effiziente Kopplung bevorzugt parallele Seitenwände realisiert werden müssen. Die per Elektronenstrahlolithographie realisierbaren Strukturen mit ausreichender Parallelität sind auf ein maximales Aspektverhältnis von weniger als 4:1 beschränkt (ca. 340 nm Spaltweite bei einer Scheibendicke von 1,2 μm) (Abbildung 5.24(a)). Durch die konforme Beschichtung der hergestellten Scheiben mit einem funktionellen PPX-Derivat können Kopplungsspalte mit Aspektverhältnissen bis jenseits von 10:1 (120 nm Spaltweite bei einer Scheibendicke von 1,34 μm) erzielt werden. Zum Einsatz kommt in den vorliegenden Experimenten hierbei Poly(4-Ethynyl-*p*-Xylylen-*co-p*-Xylylen) (PPX-CCH), welches eine kovalente Anbindung von azidterminierten Molekülen über Klick-Chemie ermöglicht.²³⁵ Abbildung 5.24(b) zeigt den Kopplungsspalt eines mit PPX-CCH-beschichteten PM.

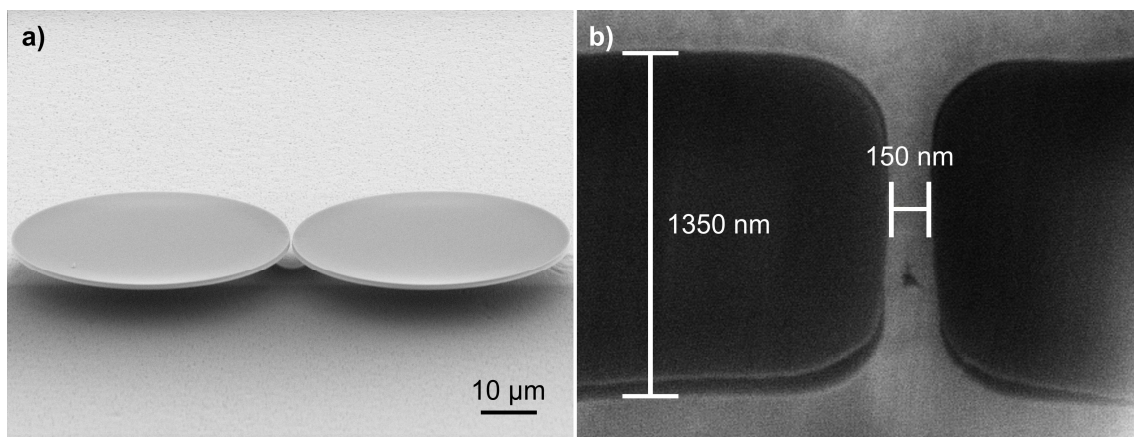


Abbildung 5.24: PM bestehend aus zwei identischen PMMA-Scheibenlasern. (a) Übersichtsaufnahme, (b) vergrößerte Aufnahme des Kopplungsspaltes eines mit 100 nm PPX-CCH beschichteten PMs im Querschnitt. Durch die PPX-Beschichtung wurde der Kopplungsspalt auf 150 nm verringert. Das PM wurde vor der Aufnahme galvanisch in Gold eingebettet und der Kopplungsspalt mit einem fokussierten Ionenstrahl angeschnitten.

Zur Untersuchung des Vernier-Effekts wurden PMs mit den Kreisradien $R_1 = 20 \mu\text{m}$ und $R_2 = 25 \mu\text{m}$ und verschiedenen Kopplungsabständen hergestellt. In Abbildung 5.25(b) ist das ortsaufgelöste Emissionsspektrum eines PM an Luft mit einem Kopplungsspalt von 200 nm (Abbildung 5.25(a)) dargestellt. Beide Scheibenlaser unterstützen geometriebedingt WGMs mit unterschiedlichen spektralen Positionen. Aufgrund des vergleichsweise großen Abstandes der beiden Scheiben tritt hier lediglich eine sehr schwache optische Kopplung auf, sodass alle Lasermoden jeweils in ihrem zugehörigen Scheibenresonator lokalisiert und keine Supermoden erkennbar sind. Durch Verringerung des Abstandes wird die Kopplung erhöht, was sich in einer zunehmenden wechselseitigen Unterdrückung der nicht vom jeweiligen Resonator unterstützten Lasermoden äußert. Abbildung 5.25(d) verdeutlicht, dass die Anzahl der im gekoppelten Resonatorsystem verbleibenden Lasermoden ab Spaltweiten kleiner als 150 nm signifikant verringert wird. Die Modenunterdrückung weist somit ein schwellenartiges Verhalten. Die Kopplungsverluste werden für Spaltweiten kleiner als 150 nm zum Hauptverlustkanal für alle nicht von beiden Laserresonatoren unterstützten Moden. Bei einem Abstand der Scheiben von 0 nm (Scheibenlaser in Kontakt) hat die Gesamtanzahl der vorhandenen Lasermoden signifikant abgenommen (Abbildung 5.25(c)). Darüber hinaus sind einzelne Lasermoden nun über beide Scheiben delokalisiert und weisen an beiden Enden des PM in etwa die gleiche Abstrahlintensität auf. Bei physikalischem Kontakt der beiden Scheiben ist die Anzahl der verbleibenden Moden verglichen mit dem Ausgangszustand um etwa einen Faktor 5 verringert. Aufgrund der starken optischen Kopplung sind alle verbleibenden Moden über beide Resonatoren delokalisiert.

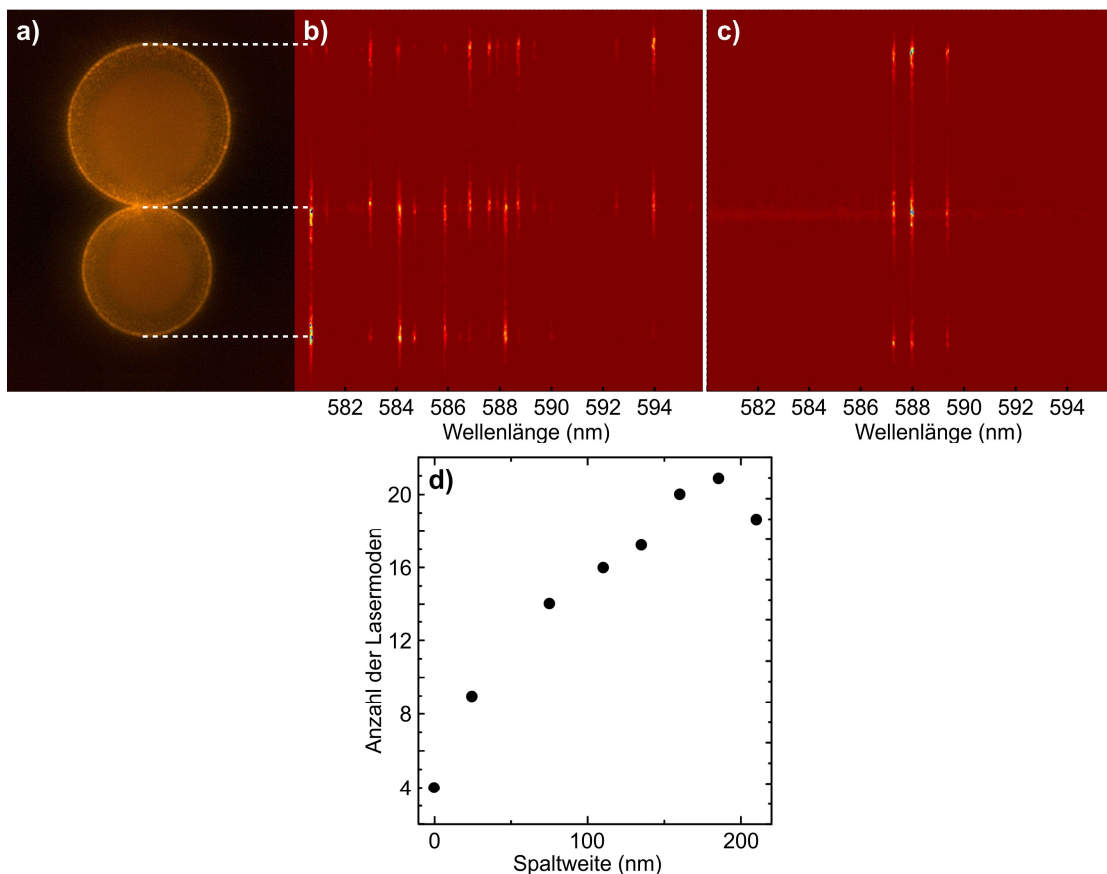


Abbildung 5.25: Charakterisierung der Modenverteilung eines PMs bestehend aus zwei PMMA-Scheibenlasern. (a) PM bestehend aus Scheibenlasern mit 20 und 25 μm Resonatorradius. (b) Ortsaufgelöstes Emissionsspektrum eines PMs an Luft mit einer Spaltweite von 200 nm. Bedingt durch deren großen Abstand ist die optische Kopplung der beiden Scheibenlaser schwach, sodass sie ihre individuellen Lasermoden ungedämpft emittieren. (c) Ortsaufgelöstes Emissionsspektrum eines PM an Luft mit einer Spaltweite von 0 nm. Die von beiden Scheibenlasern unterstützten Lasermoden propagieren delokalisiert über das gesamte PM, während alle übrigen Moden stark gedämpft werden. (d) Gesamtanzahl der Lasermoden als Funktion der Spaltweite. Ab einer Spaltweite von 150 nm nimmt die Anzahl der Lasermoden bedingt durch die einsetzende optische Kopplung ab.

Durch Immersion der PMs in Wasser kommt es aufgrund des niedrigeren Brechzahlkontrastes im Vergleich zu Luft zu einer Erhöhung des optischen Überlapps der WGMs mit dem umgebenden Medium. Hierdurch wird auch die optische Kopplung der beiden Scheibenresonatoren verstärkt. Experimentell kann hierbei die Unterdrückung einzelner Lasermoden schon ab einer Spaltweite von 300 nm beobachtet werden. Durch die Erhöhung der optischen Kopplung kann bei einer Spaltweite von 250 nm ein monomodiger Laserbetrieb der PMs realisiert werden (Abbildung 5.26). Während bei niedrigen Pumpenergien alle weiteren Moden komplett unterdrückt wurden, liegt bei stark erhöhten Pumpenergien die Intensität der Hauptlasermode weiterhin um mehr als einen Faktor 6 höher, was auf eine gute Kopplungseffizienz hindeutet.

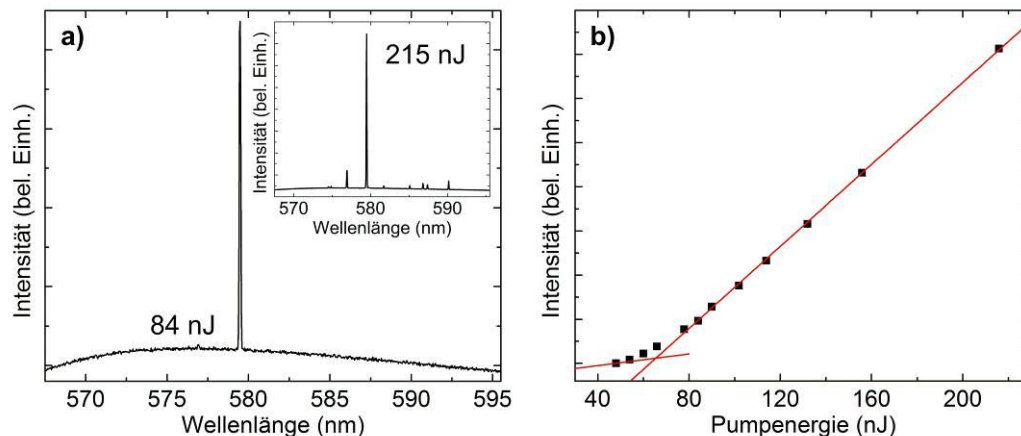


Abbildung 5.26: Monomodiges Lasing eines PMs in Wasser. (a) Emissionsspektrum eines PM mit einer Spaltweite von 250 nm. Bei einer Pumpleistung von 84 nJ pro Anregungspuls konnte stark ausgeprägtes monomodiges Lasing mit einer Arbeitswellenlänge von 579 nm erzeugt werden. Bei hohen Pumpleistungen (das eingefasste Bild zeigt das Emissionsspektrum bei 215 nJ pro Puls) werden die Laserschwellen der nicht von beiden Laserresonatoren unterstützten Lasermoden überschritten, sodass nun auch diese im Emissionsspektrum schwach ausgeprägt zu erkennen sind. (b) Laserkennlinie der 579 nm Lasermode. Die Laserschwelle liegt bei 65 nJ pro Puls.

Um die BRIS der PMs zu untersuchen, wurden diese mit Glycerin-Wasser-Gemischen mit sequentiell ansteigender Brechzahl in Kontakt gebracht (vgl. hierzu auch Kapitel 4.3.1). Erste Charakterisierungsmessungen anhand eines PM mit 0 nm Spaltabstand (starke Kopplung) ergaben hierbei eine BRIS von 58,8 nm/RIU. Dieser Wert ist etwa dreimal höher als der bei unbeschichteten einzelnen Scheibenlasern (18,4 nm/RIU). Die Erhöhung kann zum einen auf die räumliche Nähe der beiden Scheibenlaser und einer daraus zu resultierenden elektromagnetischen Feldüberhöhung im Kopplungsspalt zurückgeführt werden.^{73,272} Durch die Einführung des erhöhten Brechungsindex durch die PPX-Lage ist zum anderen eine Erhöhung des optischen Überlapps der Supermoden mit dem angrenzenden Analyten zu erwarten. Weitere Messungen an PPX-beschichteten Scheibenlasern sind deshalb nötig, um die Erhöhung der BRIS der Feldüberhöhung im Kopplungsspalt eindeutig zuzuordnen bzw. deren anteilmäßigen Beitrag bestimmen zu können.

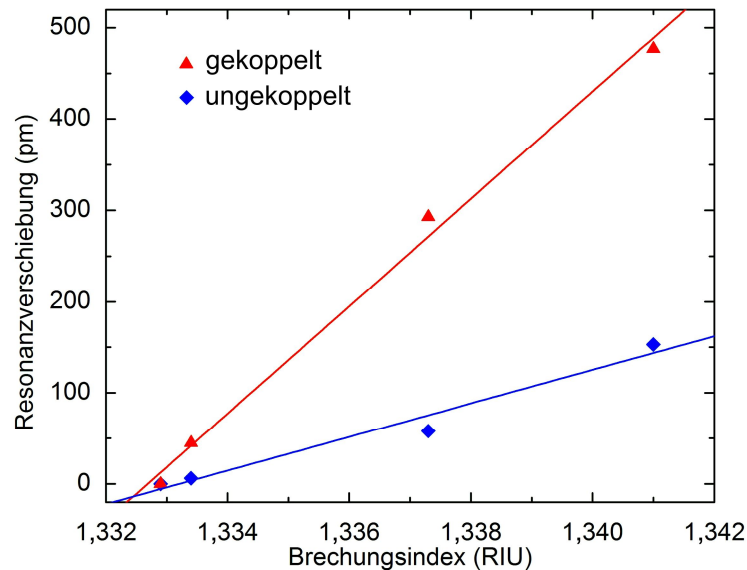


Abbildung 5.27: Erhöhung der BRIS durch Intensitätserhöhung des Lichtfeldes im Kopplungsspalt. BRIS eines einzelnen Scheibenlasers (blaue Rauten) und eines PM, dessen Scheibenlaser sich gerade berühren (rote Dreiecke). Bedingt durch die Intensitätserhöhung im Kopplungsspalt ist die BRIS des PM mit 58,8 nm/RIU etwa dreimal höher als die des einzelnen Lasers (18,4 nm/RIU).

5.4 Zusammenfassung und Ausblick

In Kapitel 5 wurde die Entwicklung eines hybriden polymeren Biosensors aufgezeigt. Hierzu wurden PMMA-Mikrokelchlaser per chemische Gasphasenabscheidung (CVD) mit gezielt ausgewählten funktionellen Poly(*p*-Xylylen) (PPXen) beschichtet. Die PPXe können flexibel mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen ausgestattet sein und fungieren als flexibel einstellbare und effiziente Startschicht für die Oberflächenfunktionalisierung der Mikrokelche. Darüber hinaus lässt sich die hohe Brechzahl der PPXe über eine direkte Beeinflussung der optischen Weglänge der WGMs gezielt zur Bauteiloptimierung einsetzen. Bei den hier realisierten Biosensoren konnte durch Wahl der geeigneten Schichtdicke der optische Überlapp mit dem Analyten optimiert werden. Dies resultierte in einer Steigerung der Sensitivität um mehr als 100 % ohne die Laserschwelle der Mikrokelchlaser signifikant zu beeinflussen. Die Beschichtung der Mikrokelche erfolgte trotz ihrer komplexen dreidimensionalen Geometrie mit hoher Konformität. Um die Flexibilität dieses Biosensoransatzes zu demonstrieren, kamen im Rahmen dieser Arbeit zwei unterschiedlich substituierte PPXe zum Einsatz. Zum einen Poly(4-Carboxysäurepentafluorphenolester-*p*-Xylylen-*co-p*-Xylylen) (PPX-PFP), zur selektiven Immobilisierung von aminoterminierten Akzeptormolekülen. Zum anderen Poly(4-Formyl-*p*-Xylylen-*co-p*-Xylylen) (PPX-CHO), welches eine selektive Immobilisierung von hydrazidterminierten Akzeptormolekülen erlaubt. Die Tauglichkeit der mit diesen beiden Materialien jeweils realisierten Biosensoren wurde anhand der Detektion von klinisch relevanten Molekülen demonstriert. Es handelt sich hierbei um die erstmalige Demonstration der Mikrokelche in einer klinischen Anwendung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden darüber hinaus erstmals funktionelle CVD-Polymere auf WGM-Strukturen zur Realisierung von Biosensoren appliziert.

Die Beschichtung mit PPX wurde stets homogen auf die gesamte Chipoberfläche durchgeführt, um neben der Oberflächenfunktionalisierung der Mikrolaser deren Integration in eine mikrofluidische Infrastruktur zu ermöglichen. Hierzu wurden die den Sensorelementen umliegenden Chipbereiche genutzt, um (ebenfalls PPX-beschichtete) mikrofluidische Deckel über einen chemischen Verkapselungsprozess kovalent mit den Sensorchips zu verbinden. Die Verkapselung erfolgte hierbei bei Raumtemperatur. Auf diese Weise wurden vollständig integrierte Lab-on-a-Chips realisiert und der Analytverbrauch um mehr als zwei Größenordnungen reduziert. Neben diesem markerfreien Ansatz wurde mit demselben Verkapselungskonzept ein markerbasierter Lab-on-a-Chip mit integrierten optischen Wellenleitern realisiert.

Die hochkonformen Beschichtungseigenschaften der PPXe wurde des Weiteren ausgenutzt, um den fabrikationslimitierten Spaltabstand (Aspektverhältnis 4:1) zweier PMMA-Mikroscheibenlaser signifikant zu verringern (Aspektverhältnis > 10:1). Dies resultierte in einer optischen Kopplung der

vorher räumlich separierten Scheibenlaser und somit der Realisierung von photonischen Molekülen. Durch eine gezielte Variation des Spaltabstandes wurde dann über den Vernier-Effekt die Anzahl der vom Gesamtresonatorsystem unterstützten Lasermoden eingestellt. In Wasser wurde auf diese Weise ein monomodiger Lasingbetrieb realisiert. In ersten sensorischen Charakterisierungsexperimenten zeigten die photonischen Moleküle im Vergleich zu einzelnen Scheibenlasern eine 3-fach höhere BRIS. Dies kann zum einen auf die höhere Brechzahl von PPX und zum anderen auf eine Lichtfelderhöhung innerhalb des Kopplungspaltes zurückgeführt werden.

Der Einsatz von funktionellen PPXen zur Oberflächenfunktionalisierung von Mikrokelchen bringt diverse Vorteile mit sich. Während die chemischen Prozeduren zur Oberflächenfunktionalisierung von Biosensoren generell vom Material der Sensoroberfläche abhängen, erlauben funktionelle PPXe eine plattformunabhängige Funktionalisierung. Die Reaktivität der eingesetzten PPX-Lage kann je nach Bedarf und biosensorischer Anwendung durch passende funktionelle Gruppen flexibel eingestellt werden. Somit entfallen der Einsatz von Mediatormolekülen bzw. eine signifikante Anpassung des chemischen Funktionalisierungsprotokolls und es wird eine direkte Applizierung eines sehr breiten Spektrums unterschiedlicher Akzeptormoleküle ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit PPX-PFP, PPX-CHO und PPX-CCH drei der zahlreichen Materialoptionen demonstriert. Letztere erlaubt eine Immobilisierung vor Akzeptormolekülen per Klick-Chemie. Weitere PPXe ermöglichen chemische Oberflächenfunktionalisierungsstrategien beispielsweise per EDC-Chemie oder Photovernetzung. Ist die Reaktivität der PPX-Lage über die Auswahl der funktionellen Gruppen einmal festgelegt, kann das restliche chemische Funktionalisierungsprotokoll standardisiert für verschiedene Akzeptormoleküle angewendet werden. Dies begünstigt die Oberflächenfunktionalisierung von Sensorelementen im Sinne einer Massenherstellung. Durch die Plattformunabhängigkeit können des Weiteren unterschiedlichste Sensorplattformen mit demselben standardisierten Oberflächenfunktionalisierungsprotokoll behandelt werden.^{224,233} Die Geometrie der Sensorelemente ist hierbei durch die hochkonformen Beschichtungseigenschaften von untergeordneter Rolle. Wird die PPX-Beschichtung ganzflächig auf die gesamte Sensorplattform aufgebracht, können die nicht an der Oberflächenfunktionalisierung der Sensorelemente beteiligten Areale für andere chemische Reaktionen genutzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auf diese Weise Mikrokelche mit einem chemischen Verkapselungsprozess in mikrofluidische Kanäle integriert. Da die Verkapselung an Raumtemperatur und ohne zusätzliche Chemikalien und Lösemittel durchgeführt wird eignet sie sich in hohem Maße zur Integration von sowohl thermisch als auch chemisch instabilen Substraten. So wurden in dieser Arbeit Mikrostrukturen aus PMMA mit seiner niedrigen Glasübergangstemperatur und seiner Instabilität in nahezu allen organischen Lösemitteln erfolgreich demonstriert. Durch die einfache Verkapselungsprozedur ist darüber hinaus eine hohe Kompatibilität zur Massenfabrikation gegeben. Die hohe optische Transparenz von PPX ermöglicht eine gezielte Beeinflussung der optischen Eigenschaften optischer Biosensoren. Dieser Sachverhalt wurde in der vorliegenden Arbeit besonders anhand der photonischen Moleküle dargelegt.

Neben der primär intendierten Oberflächenfunktionalisierung der Mikrokelche wurden somit zeitgleich weitere vorteilhafte Effekte erzielt. Diese sind in Abbildung 5.28 zusammengefasst.

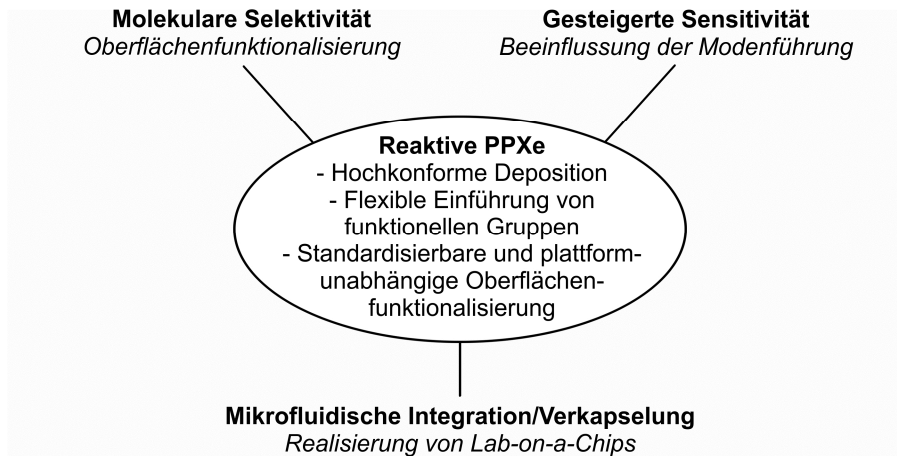


Abbildung 5.28: Zusammenfassende Darlegung der positiven Aspekte einer Oberflächenfunktionalisierung von Mikrokelchen mittels funktionellen PPXen sowie der in dieser Arbeit erzielten Zusatzeffekte. Neben der primär intendierten Oberflächenfunktionalisierung lässt sich des Weiteren durch die erhöhte Brechzahl von PPX im Vergleich zu PMMA der Modenverlauf der WGMs beeinflussen. Die nicht an der Oberflächenfunktionalisierung beteiligten PPX-Areale können für weitere chemische Reaktionen herangezogen werden, beispielsweise zur chemischen Verkapselung der Sensorstrukturen.

Während in der vorliegenden Arbeit die Biosensortauglichkeit der PPX-beschichteten Mikrokelche überwiegend an unverkapselten Strukturen gezeigt wurde, könnte der nächste Schritt eine messtechnische Demonstration der integrierten Lab-on-a-Chips beinhalten. Die in dieser Arbeit durchgeführten biosensorischen Messungen der markerbasierten Lab-on-a-Chips weisen bereits auf eine diesbezügliche Tauglichkeit hin.

Ein interessanter Ansatz für die Lab-on-a-Chips wäre der Einsatz von photovernetzbaren PPXen. Während die in dieser Arbeit demonstrierte Verkapselung noch eine vergleichsweise lange Haltezeit der beiden Chips voraussetzt, könnte diese mit den photovernetzbaren PPXen auf wenige Minuten herabgesetzt werden. Die Vernetzung wäre mithilfe eines UV-Maskaligners im Kontaktmodus durchführbar und somit leicht in eine Massenfabrikationskette integrierbar. Mit Schattenmasken bzw. einer strukturierten Lichtquelle könnten darüber hinaus einzelne Sensorstrukturen gezielt mit unterschiedlichen molekularen Akzeptoren funktionalisiert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit festgestellte Doppelbrechung von PPX-CHO könnte in ergänzenden Experimenten vollständig charakterisiert werden. Anschließend könnte die Doppelbrechung gezielt dazu genutzt werden, um die Orientierung der an die Mikrokelchlasern anlagernden Partikel/Moleküle zu studieren.²⁸²

Von Chen und Kollegen wurde die Immobilisierung von Goldpartikeln auf PPX-CCH durchgeführt.²³⁶ Analog hierzu könnten Gold- bzw. Silberpartikel auf den Mikrokelchlasern immobilisiert werden und eine potentielle Sensitivitätssteigerung der daraus resultierenden Sensorstrukturen durch plasmonische Feldüberhöhungen untersucht werden. Die Metallpartikel wären gezielt per Thiolchemie für eine biomolekulare Detektionsaufgabe funktionalisierbar.

Aminosäurebasierte Akzeptormoleküle wie Proteine und Antikörper verfügen über eine Vielzahl an molekularen Seitengruppen, z. B. Amino-, Carboxy-, Thiolgruppen etc. Über die Auswahl des jeweils komplementär funktionellen PPX könnten somit die Akzeptormoleküle direkt an die Sensoroberfläche kovalent angebunden werden.

Ein Einsatz von PPX-beschichteten Mikrokelchen als Gassensoren wäre ebenfalls denkbar. Hier könnte die Reaktivität verschiedener PPXe ausgenutzt werden, um ausgesuchte gasförmig vorliegende Moleküle oder Partikel selektiv an die Sensoroberfläche zu binden, beispielsweise Viren, Allergene oder Pilzsporen.

Die optische Kopplung einzelner PMMA-Scheibenlaser zu photonischen Molekülen (PMs) führt theoretisch zu einer starken Sensitivitätssteigerung gegenüber Brechzahländerungen nahe der Strukturoberfläche, besonders innerhalb des Kopplungsspalts. In einer ersten Charakterisierung konnte diese bereits experimentell beobachtet werden. Weitere Messungen sind jedoch nötig, um die

Sensitivitätssteigerung eindeutig der optischen Kopplung zuordnen zu können. Besonders interessant wäre es hierbei den Einfluss der Kopplungsspaltweite näher zu untersuchen.

Eine noch höhere Sensitivitätssteigerung könnte über den Vernier-Effekt erzielt werden. Durch adäquate Größenauslegung der Einzelresonatoren könnte die Einhüllende der sich ergebenden Filterkurve eine um bis zu zwei Größenordnungen höhere Brechzahlsensitivität ergeben.²⁷⁵

Im darauffolgenden Schritt wären die PMs in einer biomolekularen Detektionsaufgabe zu demonstrieren und deren potentiell höher ausfallende Sensitivität im Vergleich zu einzelnen Resonatorstrukturen zu evaluieren. Mit dem in Rahmen dieser Arbeit eingesetzten PPX-CCH ist eine Immobilisierung von Akzeptormolekülen per Klick-Chemie möglich.

Der Kopplungsspalt der PMs könnte gezielt als optische Falle für einzelne Nanopartikel eingesetzt werden. Zum einen könnte dies explizit genutzt werden, um die Partikel selbst optisch zu untersuchen. Zum anderen könnten die Partikel gezielt mit Akzeptormolekülen funktionalisiert werden. Durch den Einsatz von Gold- oder Silberpartikeln könnte hierdurch potentiell eine weitere Sensitivitätssteigerung erzielt werden. Ein Einsatz der PM als Partikelzähler wäre ebenfalls denkbar.

Kapitel 6

Inhärent funktionalisierbare Mikroresonatoren aus Copolymeren

Zusammenfassung[†]

PMMA ist aufgrund seiner schwachen chemischen Reaktivität nur bedingt zur direkten kovalenten Immobilisierung von Akzeptormolekülen geeignet. Durch diesen Umstand ist die Auswahl der verfügbaren Akzeptormoleküle sowie der chemischen Immobilisierungsprotokolle stark eingeschränkt. In der Regel wird das PMMA in einer zusätzlichen Prozessabfolge chemisch modifiziert, um die passenden funktionellen Gruppen durch den Einsatz von Mediatormolekülen zur Verfügung zu stellen. Existierende Protokolle zur chemischen Modifikation der Methacrylatgruppen sind jedoch zumeist aufwändig und es kommt zum Einsatz gefährlicher Chemikalien. Die Verwendung von alternativen Polymeren ist somit naheliegend.

Dieses Kapitel behandelt die Realisierung von neuartigen Mikroresonatoren aus maßgeschneiderten Copolymeren. Das verwendete Copolymer weist funktionelle Gruppen auf, die eine vereinfachte Anbindung von Akzeptormolekülen erlauben. Als Demonstrator wird Poly(Methylmethacrylat-co-Methacrylsäure) (MMA:MAA) verwendet, welches als PMMA-basiertes Copolymer weiterhin dieselben fabrikations- und anwendungstechnischen Vorzüge aufweist wie PMMA. Die Carboxygruppen von MMA:MAA erlauben eine Anbindung von aminoterminierten Akzeptormolekülen über die in der Biotechnologie als Standardprozess bekannte EDC-Chemie (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid). Das chemische Funktionalisierungsprotokoll ist biokompatibel, was eine direkte Immobilisierung auch von komplexen Biomolekülen ermöglicht. Zur Herstellung der Mikroresonatoren wurde ein neuartiger plattformunabhängiger Fabrikationsprozess entwickelt, bei welchem nun auch der Kelchsockel aus einem Polymer realisiert wird. Hierdurch können die Mikroresonatoren auf nahezu beliebigem Untergrund hergestellt werden.

[†] Teile dieses Kapitels bereits in folgenden Publikationsschriften veröffentlicht:

Bog, U., Wienhold, T., Mappes, T., Abdel-Aliem, M. S. & Köber, S. Optisches Element und optisches Sensorsystem (Deutsches Patent DE102012110126B3, Europäische Patentanmeldung 13783481.8) (2012).

Wienhold, T., **Bog, U.**, Köber, S., Wondimu, S. F. & Koos, C. Vollpolymere Kelchresonatoren (Deutsches Patent DE102014012981) (2014).

Wienhold, T., Krämmer, S., Wondimu, S. F., Siegle, T., **Bog, U.**, Weinzierl, U., Schmitt, S., Becker, H., Kalt, H., Mappes, T., Köber, S., Koos, C. All-Polymer Photonic Lab-on-a-Chip Based on Whispering-Gallery Mode Microgoblet Lasers. *Lab Chip* (2015), DOI: 10.1039/C5LC00670H.

6.1 Konzept

Aufgrund ihrer schwachen chemischen Reaktivität sind die Methacrylatgruppen von PMMA nur sehr eingeschränkt zur Oberflächenfunktionalisierung nutzbar. Die direkte Anbindung von Akzeptormolekülen erweist sich als schwierig und setzt oftmals eine Anwendung gesundheitsschädigender Reagenzien voraus. Häufig kommen hochreaktive Chemikalien basierend beispielsweise auf seltenen Erden oder Halogenen zum Einsatz.^{101–104} Weitere Ansätze beinhalten die Aktivierung der Methacrylatgruppen mit UV-Strahlung oder mit Sauerstoffplasma.^{105–108} Durch die Gefahr der Farbstoffausbleichung sind diese allerdings zur Oberflächenfunktionalisierung farbstoffdotierter Mikroresonatoren nicht geeignet. Jede der genannten Prozeduren setzt eine raue chemische Behandlung des PMMA voraus. Hierdurch kann es zu einer Verringerung der Oberflächenqualität und infolgedessen zu einer Verschlechterung der Resonatorgüte kommen. Bei aktiven Resonatorstrukturen können sich hierdurch die Laserschwelle und die Lebensdauer der Mikrolaser signifikant verschlechtern. Des Weiteren ist die Auswahl der chemischen Immobilisierungsprotokolle und somit die der verfügbaren Akzeptormoleküle stark eingeschränkt.

In den Kapiteln 4 und 5 wurden PMMA-basierte Mikroresonatoren als Biosensoren verwendet. Allerdings wurde die Oberflächenfunktionalisierung dort durch eine Post-Implementierung funktioneller Materialien erreicht, sodass die diesbezüglichen Nachteile von PMMA umgangen wurden. Ein alternativer Ansatz besteht darin für die Resonatorstrukturen selbst anstelle von PMMA ein reaktiveres Material einzusetzen. So wurden von Becker und Kollegen WGM-Resonatoren aus SU-8 entwickelt.²⁸³ Dieser Fotolack ist mit seinen Glycidylgruppen einfach funktionalisierbar, allerdings sind aus SU-8 hergestellte Resonatorstrukturen aufgrund der thermischen Materialeigenschaften nur mit moderaten Q-Faktoren realisierbar. Die Glycidylgruppen werden des Weiteren hauptsächlich zur Fotovernetzung der SU-8-Strukturen verbraucht, sodass die tatsächliche Dichte der an der Oberfläche verfügbaren unmodifizierten funktionellen Gruppen undefiniert ist.

Anstelle eines komplett neuen Resonatormaterials mit den gewünschten chemischen und physikalischen Eigenschaften zu suchen und mit diesem einen neuen Fabrikationsprozess zu entwickeln, ist es von Vorteil ein einmal etabliertes Resonatormaterial chemisch zu modifizieren. Bei der Mehrzahl der WGM-Biosensoransätze geschieht dies nach der Resonatorfabrikation im Rahmen der Oberflächenfunktionalisierung.^{16,216} Je nach sensorischer Anwendung kommen hierbei Mediatormoleküle zum Einsatz, an welche anschließend die Immobilisierung der Akzeptormoleküle erfolgt. Um diese an die Resonatoren anzubinden, sind meist mehrere Arbeitsschritte zu vollziehen. Die Ansätze sind hinsichtlich der Verfügbarkeit von passenden Mediatormolekülen limitiert. Des Weiteren steht die Sensoroberfläche nur für eine einzige chemische Modifikation zur Verfügung. Die reproduzierbare Immobilisierung unterschiedlicher Moleküle auf demselben Sensorelement ist nur sehr schwer realisierbar. Eine Implementierung der Moleküle gar in dessen Volumen ist nicht möglich.

Bei Polymeren bietet es sich an, einzelne Seitengruppen vor der Resonatorfabrikation chemisch zu modifizieren und auf diese Weise ein auf demselben Material basierendes Copolymer zu kreieren. Das vorliegende Kapitel beschreibt ein neuartiges Konzept, in welchem Copolymere zur Realisierung von chipbasierten WGM-Mikroresonatoren mit maßgeschneiderter chemischer Reaktivität eingesetzt werden.²⁸⁴ Das Konzept ist in (Abbildung 6.1) schematisch dargestellt. Die neuartigen Resonatoren bestehen aus Copolymeren, deren funktionelle Gruppen eine vereinfachte Immobilisierung von Akzeptormolekülen für biosensorische Anwendungen erlauben. Durch einen zusätzlichen Einbau weiterer unterschiedlicher funktioneller Gruppen stehen diese für weitere orthogonale chemische Reaktionen zur Verfügung, beispielsweise, um chemische oder physikalische Funktionalitäten im Bauteil zu integrieren. Da die funktionellen Gruppen im gesamten Materialvolumen vorhanden sind, können die funktionalen Moleküle sowohl an die Sensoroberfläche als auch in das Sensorvolumen stabil angebunden werden. Je nach Art und molarer Konzentration der implementierten Gruppen weist das Material weiterhin ähnliche fabrikationstechnische und funktionale Eigenschaften auf wie das unmodifizierte Grundmaterial.

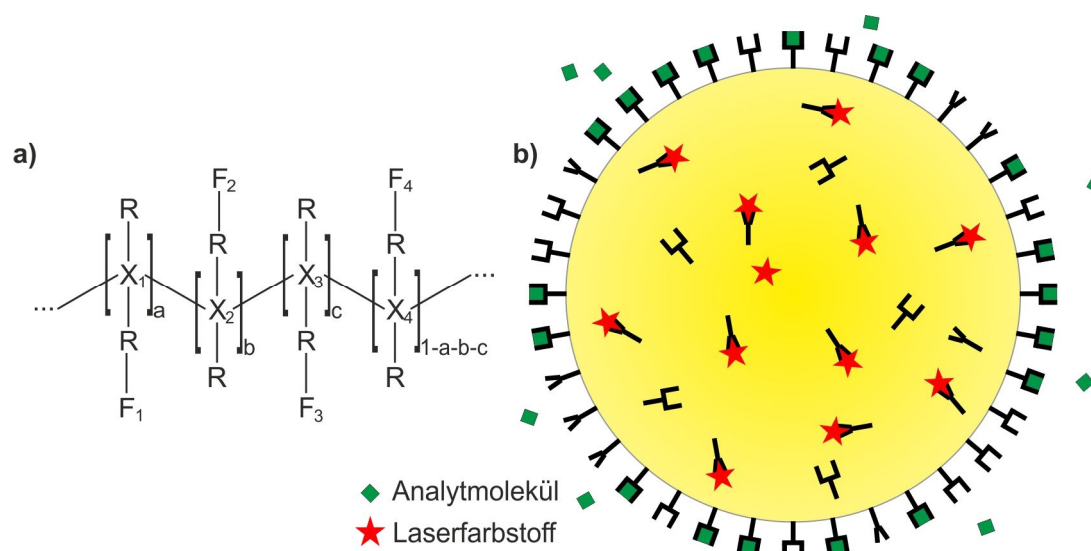


Abbildung 6.1: Konzept des neuartigen Mikroresonators. (a) Als Resonatormaterial dient ein Copolymer mit beliebig vielen unterschiedlichen funktionellen Gruppen (F_1 – F_4). Diese dienen neben der standardmäßig intendierten Akzeptormolekülimmobilisierung zur Anbindung weiterer funktionaler Moleküle, zur Implementierung diverser chemischer und physikalischer Zusatzfunktionalitäten. (b) Schematisches Beispiel eines neuartigen Mikroresonators aus einem Copolymer mit zwei funktionellen Gruppen. Während die erste Gruppe zur Immobilisierung von Akzeptormolekülen an die Sensoroberfläche genutzt wird, dient die zweite Gruppe zur kovalenten Verankerung eines Laserfarbstoffes an die Copolymermatrix.

6.1 Mikroresonatoren aus PMMA-basierten Copolymeren

In der vorliegenden Arbeit wird das Konzept anhand von Mikroresonatoren aus Poly(Methylmethacrylat-*co*-Methacrylsäure) (MMA:MAA) demonstriert. Die Reaktivität zur Immobilisierung von Akzeptormolekülen wird bei MMA:MAA über dessen Carboxygruppen bereitgestellt. Als PMMA-basiertes Copolymer weist MMA:MAA wie PMMA eine hohe Transparenz im sichtbaren Wellenlängenbereich auf und lässt sich zudem mit denselben lithografischen Methoden strukturieren. Die Akzeptormolekülimmobilisierung wird per EDC-Chemie (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) vorgenommen, einem in der Biochemie angewendeten einfach zu handhabenden und reproduzierbaren Standardprozess.²⁸⁵ Die Herstellung der Resonatoren erfolgt mit einem neuartigen Fabrikationsprozess resultierend in Mikrostrukturen auf Polymersockeln.¹⁴⁰ Diese können infolgedessen auf beliebigen Trägersubstraten hergestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit werden sowohl passive als auch aktive Resonatoren behandelt, um die Bauteilfunktionalität beider Ansätze mit einer schwerpunktmäßigen Anwendung als Biosensoren aufzuzeigen.

6.2.1 Herstellung und Oberflächenfunktionalisierung

Zur Herstellung der MMA:MAA-basierten Resonatorstrukturen kommt ein neuartiger Fabrikationsprozess zum Einsatz. Dieser wurde in Zusammenarbeit mit T. Wienhold, S. Wondimu und Kollegen erarbeitet und beruht im Wesentlichen auf der Einführung einer polymeren Zwischenschicht für die Sockelherstellung. Während die Standardfabrikation der PMMA-Mikrokelche strikt an die Verwendung von Siliziumsubstraten gebunden ist, ist beim neuartigen Prozess die Realisierung der Resonatorstrukturen somit weitestgehend vom Trägersubstrat entkoppelt. Hierdurch wird eine Herstellung auf unterschiedliche Substratmaterialien und Geometrien ermöglicht.

In Abbildung 6.2 ist der Fabrikationsprozess schematisch dargelegt. Als Sockelmaterial dient der Opferschichtlack LOR 30B (Microchem Corp.). Dieser wird zu etwa 5 μm auf einen 4-Zoll Siliziumwafer aufgeschleudert. Nach einem Ausheizzschritt bei 200 $^\circ\text{C}$ wird die ausgebackene LOR-Schicht mit einer 1,2 μm dicken Lage MMA:MAA (Microchem Corp.) schleuderbelackt. Diese wird bei 110 $^\circ\text{C}$ thermisch behandelt. Im Anschluss erfolgt die Strukturierung des MMA:MAA-Resists zu Kreisen mittels maskenbasierter DUV-Lithografie (Maskaligner EVG 620, EVGroup GmbH). Die anschließende nasschemische Sprühentwicklung des MMA:MAA mit 1:1 MIBK:IPA resultiert in Scheiben. Die sich daran anschließende Tauchentwicklung des LOR-Lackes (101A Developer, Microchem Corp.) führt zu einer nasschemischen isotropen Unterätzung der Scheiben. Mittels einer

finalen thermischen Behandlung werden die nun partiell freistehenden MMA:MMA-Scheiben bei 140 °C aufgeschmolzen. Danach erfolgt die Vereinzelung des strukturierten Wafers in Chips. Zur Herstellung von Mikrolasern wird dem MMA:MAA-Fotolack vor der Fabrikation PM 597 oder Rhodamin 6G (R6G) (beide Radiant Dyes Laser & Accessoires GmbH) zu einem Feststoff-Massenverhältnis von 100:1 beigemischt. Abbildung 6.3 zeigt fertige MMA:MAA-Mikroresonatoren als REM-Aufnahmen.

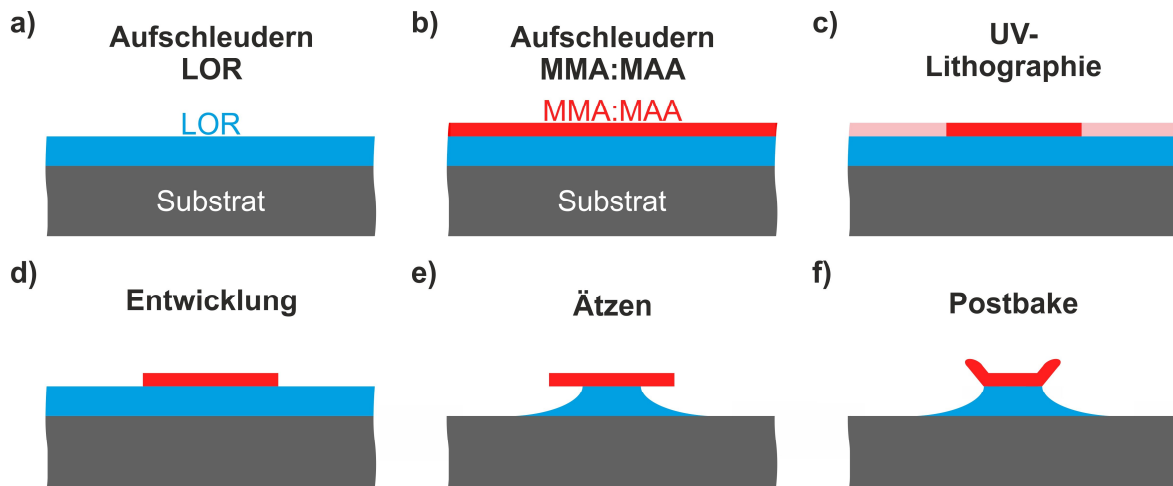


Abbildung 6.2: Fertigungsprozesskette zur Herstellung von MMA:MAA-Mikroresonatoren. (a) Aufschiebendern des Opferschichtlackes LOR 30B. (b) Aufschiebendern des MMA:MAA-Photolacks. (c) Definition von Kreisen per UV-Lithografie. (d) Nasschemische Entwicklung des MMA:MAA zu Scheiben. (e) Nasschemisches Ätzen des LOR-Lackes zur isotropen Unterätzung der MMA:MAA-Scheiben. (f) Thermisches Aufschmelzen der MMA:MAA-Scheiben.

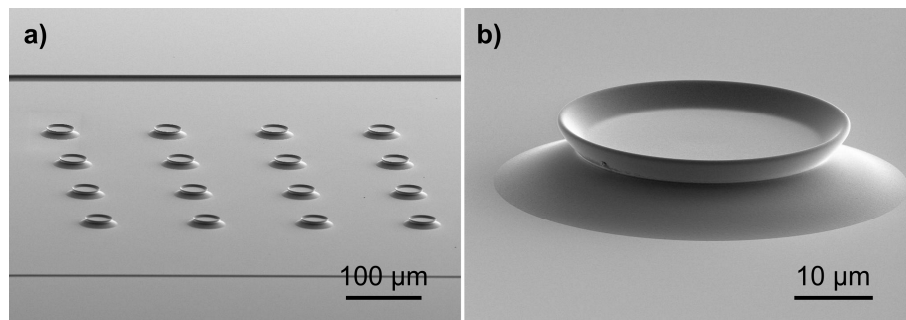


Abbildung 6.3: Fertige MMA:MAA-Mikroresonatoren. (a) REM-Aufnahme eines 4x4 Feldes von MMA:MAA-Mikroresonatoren, (b) Nahaufnahme eines MMA:MAA-Resonators.

Nach ihrer Fertigstellung werden die MMA:MAA-Strukturen per EDC-Chemie oberflächenfunktionalisiert. Dieser Ansatz bietet mehrere Vorteile. EDC wird standardmäßig zur Vernetzung von Amino- und Carboxygruppen verwendet, beispielsweise zur Verlinkung von Proteinen, zur Herstellung von Peptidsequenzen und letztendlich auch zur Oberflächenimmobilisierung von Proteinen.^{285,286} Da sowohl EDC als auch sulfo-NHS (*N*-Hydroxysulfosuccinimid) im Rahmen der Vernetzungsreaktion vollständig vom aminoterminierten Akzeptormolekül verdrängt werden, erfolgt dessen Immobilisierung stets in unmittelbarer Nähe zur Sensoroberfläche. Beide Moleküle sowie die während der Oberflächenfunktionalisierung entstehenden Nebenprodukte sind des Weiteren wasserlöslich, was kontrollierte und saubere Reaktionen bei physiologischen Bedingungen und somit eine gute Biokompatibilität gewährleistet. Abbildung 6.4 zeigt die chemische Oberflächenfunktionalisierungsprozedur im Detail. In einem ersten Reaktionsschritt werden die Resonatorstrukturen in eine wässrige EDC-Lösung inkubiert. Hierdurch kommt es im Verlauf einer nukleophilen Additionsreaktion zur kovalenten Anlagerung des EDC an die Carboxygruppen des MMA:MAA unter Ausbildung eines harnstoffbasierten Zwischenprodukts (O-Aktivester). Diese Verbindung ist zunächst instabil, da es durch Reaktion mit Wassermolekülen

nach kurzer Zeit zur Rückreaktion der Carboxygruppen durch Hydrolyse kommt. Die aktivierten Carboxygruppen sind bereits reaktiv gegenüber primären Aminogruppen, aufgrund der mit dieser Reaktion konkurrierenden Hydrolysereaktion sind die zu erwartenden Ausbeuten allerdings relativ gering. Um die Effizienz der Akzeptormolekülimmobilisierung zu erhöhen, wird in einem zweiten Aktivierungsschritt das O-Aktivester-basierte Zwischenprodukt mit sulfo-NHS stabil substituiert und die Aktivität gegenüber Nukleophilen (z. B. Aminen) erhöht. Der finale Schritt beinhaltet den Angriff des aminoterminierten Akzeptormoleküls zur Bildung eines Carbonsäureamids.

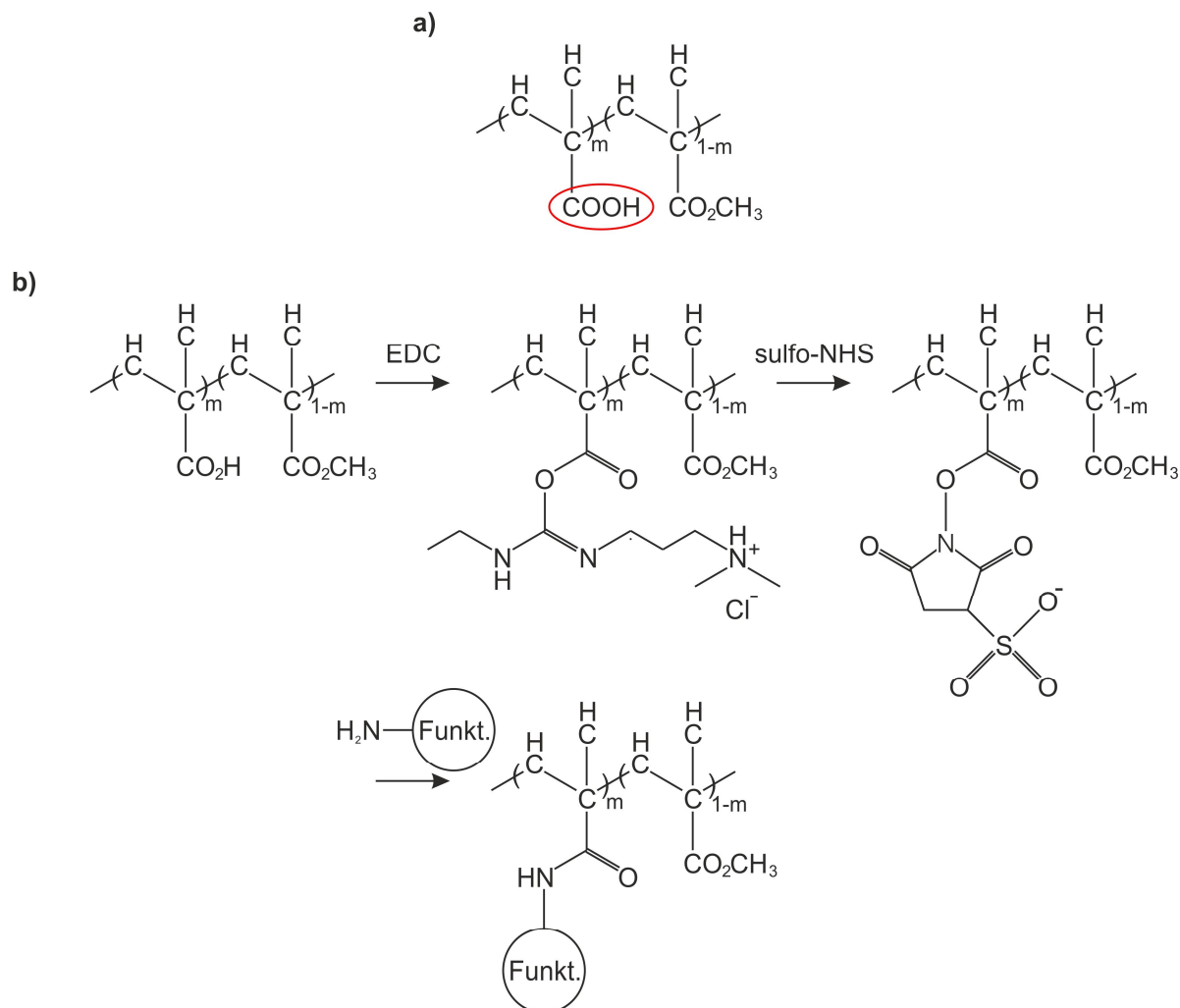


Abbildung 6.4: Oberflächenfunktionalisierung von MMA:MAA via EDC-Chemie. (a) Molekulare Struktur von MMA:MAA. Neben den auch bei PMMA vorkommenden reaktionsträgen Methacrylatgruppen (CO_2CH_3) verfügt MMA:MAA des Weiteren über Carboxygruppen (COOH), welche für eine einfache Oberflächenmodifikation per EDC-Chemie zur Verfügung stehen. (b) Oberflächenfunktionalisierung von MMA:MAA per EDC-Chemie. In einem ersten Inkubationsschritt reagieren die Carboxygruppen mit den EDC-Molekülen zu instabilen reaktiven Carboxyesterkomplexen. Das EDC wird im Anschluss von sulfo-NHS verdrängt, wodurch die Aktivität gegenüber Nukleophilen (z. B. Aminen) erhöht wird. Im letzten Reaktionsschritt wird das aminoterminierte Akzeptormolekül unter Ausbildung eines Carbonsäureamids angebunden.

6.2.2 Bauteilcharakterisierung

Zur Evaluierung der erzielbaren optischen Güten wurden passive MMA:MAA-Resonatoren hergestellt. Die messtechnische Charakterisierung der optischen Resonatorgüte ergab Q -Faktoren zwischen 6×10^5 und 9×10^5 (Abbildung 6.5). Diese Werte sind vergleichbar sowohl mit den von Grossmann und Kollegen publizierten Werten für PMMA-Mikrokelche auf Siliziumsockeln (2×10^6)¹⁰ als auch mit denen für PMMA-Mikroresonatoren auf LOR-Sockeln ($1 - 3 \times 10^5$).¹⁴¹ Der Austausch von PMMA durch MMA:MAA bietet somit aus bauteiltechnischer Sicht keinerlei operative Nachteile.

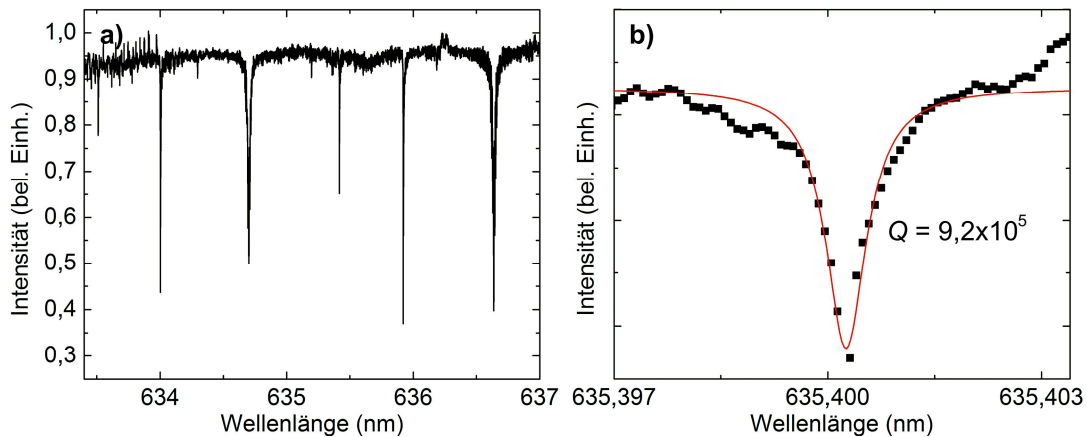


Abbildung 6.5: Q-Faktoren von MMA:MAA-Resonatoren. (a) Modenspektrum eines MMA:MAA-Resonators. (b) Die WGMs weisen Q -Faktoren bis ca. 10^6 auf.

Um die Eignung der MMA:MAA-Resonatorstrukturen zur Realisierung aktiver Bauelemente zu untersuchen, wurden R6G-dotierte Bauelemente hergestellt. Die Laserschwel­len in Luft fallen mit durchschnittlichen 1,7 nJ pro Anregungspuls ähnlich niedrig aus wie für R6G-dotierte PMMA-Mikrokelch­laser auf Siliziumsockeln¹¹ (Abbildung 6.6). In Wasser liegt die durchschnittliche Laserschwelle bei 6,0 nJ pro Puls. Somit weisen die R6G-dotierten Laser bereits hinreichend niedrige Schwellen für einen problemlosen Betrieb in flüssigen Medien auf.

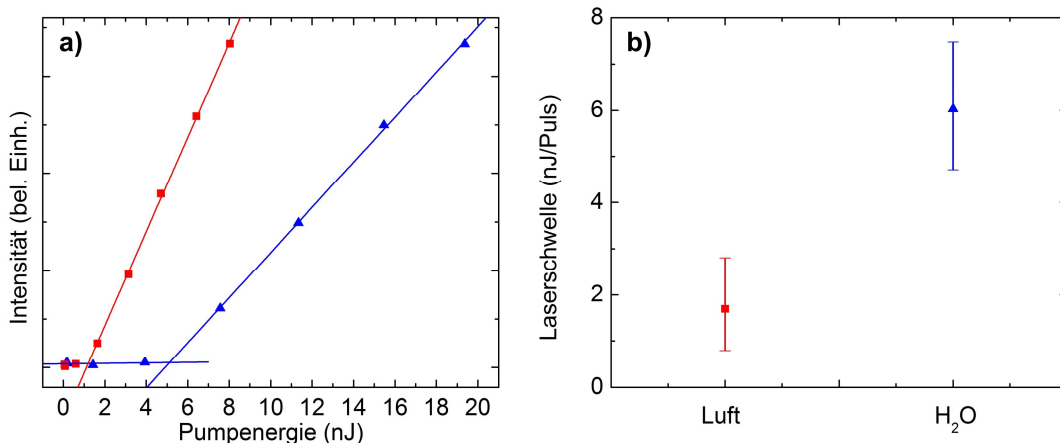


Abbildung 6.6: Lasingcharakteristik von R6G-dotierten MMA:MAA-Mikrolasern. (a) Laserkennlinie eines MMA:MAA-Mikrolasers an Luft (rote Quadrate) und in Wasser (blaue Dreiecke). (b) Im Durchschnitt ermittelte Laserschwel­len in Luft und in Wasser.

Zur Ermittlung der Lebensdauer der MMA:MAA-Mikrolaser wurden diese weit oberhalb ihrer Laserschwelle bei 390 nJ pro Anregungspuls betrieben und der temporale Intensitätsverlauf der Emissionsspektren ausgewertet (Abbildung 6.7(a)). Der Abfall der Lasermoden auf 36,8 % ($1/e$) ihrer initialen Intensitäten wurde als Lebensdauer definiert. In PBS ergibt sich so eine Lebensdauer von bis zu $2,5 \times 10^5$ Pulsen (Abbildung 6.7(b)). Bei einem Standardbetrieb mit 20 Hz Repetitionsrate (Kapitel 3.1.4) ergibt sich hieraus eine Mindestmessdauer von 3,5 Stunden pro Lasermode. Diese Zeitdauer überschreitet die für die meisten biomolekularen Messaufgaben benötigte Zeit deutlich. Eine Dotierung der Resonatoren mit PM 597 sollte in einer weiteren Verbesserung der Lebensdauer resultieren, aufgrund der höheren Photostabilität von PM 597. Durch eine Erniedrigung der Pumpleistung sowie eine Verfolgung mehrerer Moden sollte sich die Messdauer bei Bedarf weiter verlängern lassen.

Eine Charakterisierung der Brechzahl­sensitivität ergab eine durchschnittliche BRIS von $42,31 \pm 1,40$ nm/RIU (Abbildung 6.7(c)), welche vermutlich aufgrund geometrischer Unterschiede der

Resonatorstrukturen höher ausfällt als die der PMMA-Mikrokelche sowohl auf Silizium- als auch LOR-Sockeln.¹⁴¹

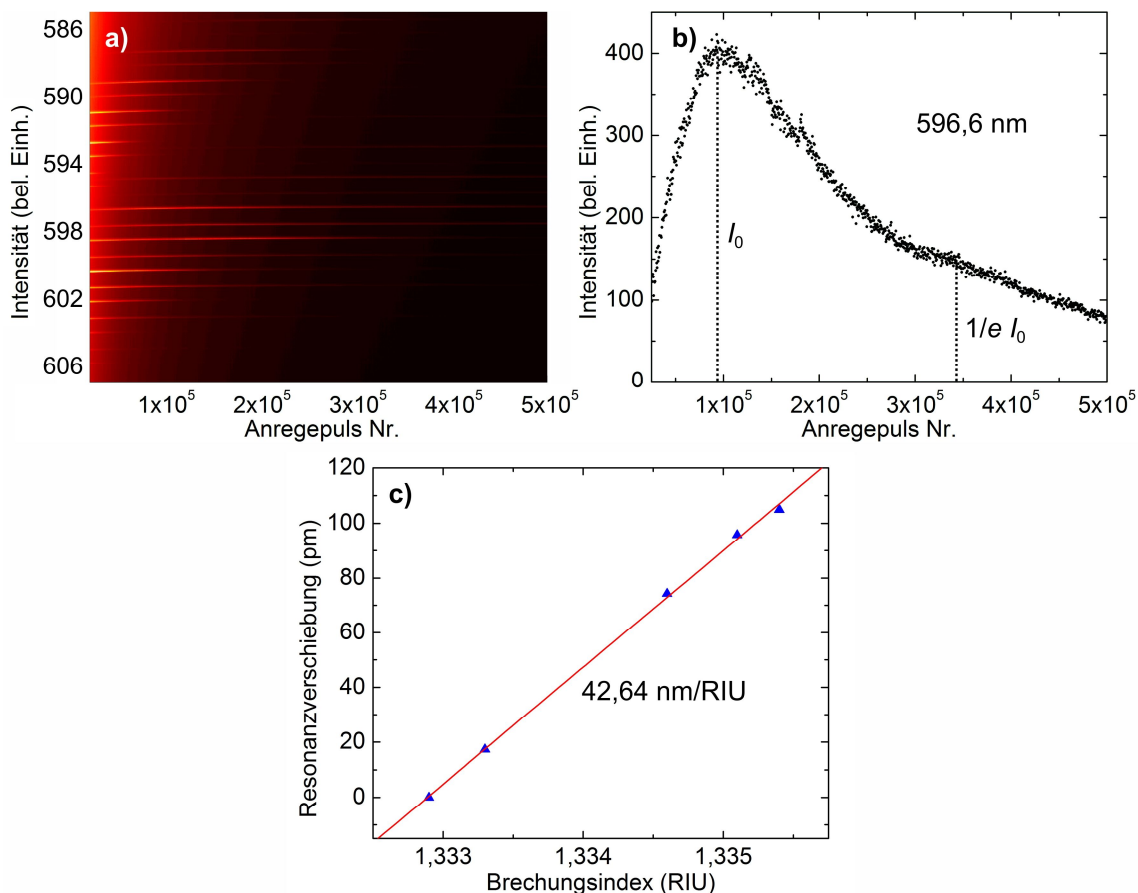


Abbildung 6.7: Lebensdauer und BRIS von R6G-dotierten MMA:MAA-Mikrolasern. (a) Lebensdauerermessung an einem R6G-dotierten MMA:MAA-Mikrolaser. Temporales Lasermodenverlauf über die Anzahl der Anregungspulse (Repetitionsrate des Pumplasers 100 Hz) als Falschfarbenplot. Durch das graduelle Ausbleichen des Laserfarbstoffes verschiebt sich die Laseraktivität während des Betriebes mit zunehmender Zeitdauer ins Blaue.¹¹ (b) Temporales Intensitätsverlauf der Lasermode bei 596,6 nm. Nach $2,5 \times 10^5$ Pulsen ist die maximale Intensität I_0 auf 36,8 % ($1/e$) abgefallen. (c) BRIS einer Lasermode.

6.2.4 Copolymer-Mikroresonatoren als Biosensoren

Um die Funktionalität der Oberflächenfunktionalisierung der MMA:MAA-Resonatoren per EDC-Chemie zu belegen, wurde ein Fluoreszenzmarker-basiertes Plausibilitätsexperiment durchgeführt. Als Analytmolekül fungiert hierbei erneut Cy3-markiertes Streptavidin. Zur Biotinylierung des MMA:MAA diente Amino-dPEG₁₁-Biotin (Quanta Biodesign Ltd.). Das Experiment wurde an unterschiedlich behandelten passiven MMA:MAA-Scheiben auf LOR-Sockeln durchgeführt. Für eine Charge erfolgte die Biotinylierung durch Aktivierung der Carboxy-Termini mit EDC und sulfo-NHS. Hierzu wurden die Scheiben in eine 40 millimolare EDC-Lösung (Lösungsmittel di H₂O) eingelegt. Nach einer Inkubationsdauer von zehn Minuten wurde 10 millimolares sulfo-NHS (in di H₂O) im Volumenverhältnis 1:1 beigemischt und die resultierende Lösung für weitere 30 Minuten auf den Scheiben belassen. Nach einer Spülung der Proben mit deionisiertem Wasser erfolgte dann die Biotinylierung durch Einlegen in Amino-dPEG₁₁-Biotin (300 μ mol/L in PBS). Nach einer Inkubationsdauer von 60 Minuten wurde abermals mit PBS gespült. Während der gesamten Funktionalisierungsprozedur wurde die Flüssigkeit in 5-Minuten-Intervallen mit einer Pipette umgewälzt. Für eine zweite Charge erfolgte die Biotininkubation ohne vorherige EDC/sulfo-NHS-Aktivierung. Nach ihrer jeweiligen Behandlung wurden alle Scheiben für 60 Minuten mit 1 Gew.-% BSA in PBS geblockt. Anschließend wurde das Cy3-markierte Streptavidin (10 μ g/ml in PBS, Inkubationsdauer 30 Minuten) appliziert. Nach einem abschließenden Spülschritt mit deionisiertem Wasser wurde die Streptavidinbelegung der Scheiben mit dem Fluoreszenzmikroskop evaluiert.

Abbildung 6.8 zeigt das Ergebnis dieses Experiments. Lediglich bei den mit EDC und sulfo-NHS aktivierten Scheiben tritt eine starke Belegung mit Cy3-Streptavidin auf. Im Vergleich hierzu weisen die nicht aktivierten Scheiben ein weitaus geringeres Fluoreszenzsignal auf. An komplett unbiotinylierten Scheiben wird ein vergleichbares Fluoreszenzsignal verzeichnet, was auf eine geringfügige Physisorption des Cy3-Streptavidin hindeutet. Die Ergebnisse belegen, dass die Immobilisierung des Amino-dPEG₁₁-Biotin über dessen Amino-Termini an das MMA:MAA ausschließlich über die Aktivierung der Carboxygruppen stattfindet. Somit ist die korrekte Funktionsweise des Oberflächenfunktionalisierungsansatzes belegt.

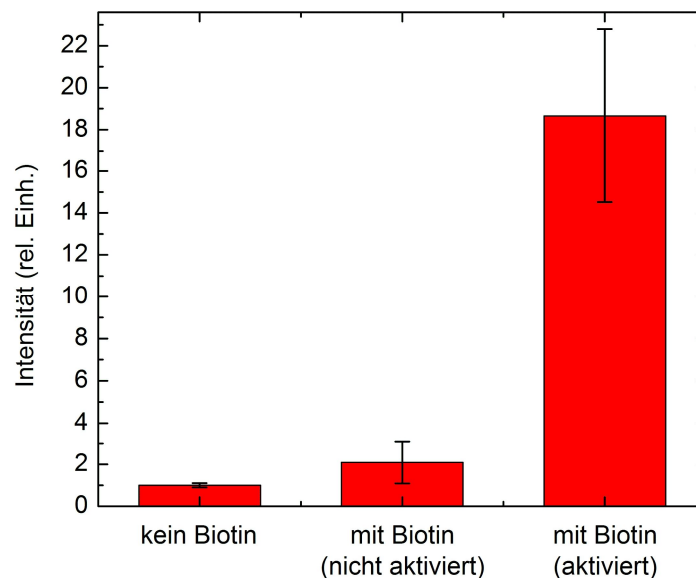


Abbildung 6.8: Plausibilitätsexperiment zur Erprobung der Oberflächenfunktionalisierung von MMA:MAA-Scheiben auf LOR-Sockeln per EDC-Chemie. Die Scheiben bei denen vor der Biotinylierung eine Aktivierung der Carboxygruppen durchgeführt wurde weisen nach der Anbindung von Cy3-Streptavidin eine hohe Fluoreszenz auf. Bei den nicht aktivierten Scheiben bleibt das Fluoreszenzsignal gering und ist vergleichbar mit dem von komplett unbiotinylierten Scheiben.

6.3 Zusammenfassung und Ausblick

In Kapitel 6 wurde die Entwicklung von neuartigen Mikroresonatoren aus funktionellen Copolymeren aufgezeigt. Diese weisen funktionelle Gruppen auf, die eine Oberflächenfunktionalisierung der Resonatorstrukturen vereinfachen. Je nach Reaktivität der Gruppen lassen sich auf diese Weise WGM-Biosensoren auf bestimmte molekulare Termini bzw. molekulare Detektionsanwendungen hin maßschneidern. Weist das jeweils verwendete Copolymer mehrere unterschiedliche funktionelle Gruppen auf, können über die reine Anbindung von Akzeptoren hinaus potentiell weitere funktionale Moleküle implementiert werden. Diese können dann ebenfalls an die Resonatoroberfläche oder sogar in das Resonatorvolumen integriert werden. Dies ermöglicht beispielsweise eine kovalente Implementierung von Laserfarbstoffen, um die Lebensdauer der auf diese Weise realisierten Mikrolaser zu verlängern. Der Einsatz von kreuzvernetzenden Molekülen könnte die chemische Stabilität der Resonatorstrukturen verbessern.

Als explizites Beispiel wurden im Rahmen dieser Arbeit Resonatoren aus Poly(Methylmethacrylat-*co*-Methacrylsäure) (MMA:MAA) realisiert. Während PMMA chemisch relativ inert und somit schwer funktionalisierbar ist, weist MMA:MAA Carboxygruppen auf, die eine einfach durchzuführende kovalente Immobilisierung von aminoterminierten Akzeptormolekülen erlauben. Die Herstellung der Resonatorstrukturen erfolgte mit einem neuartigen Fabrikationsprozess, bei welchem die Kelchsockel aus einem Polymer bestehen. Hierdurch können die Mikroresonatoren auf beliebigen Substraten realisiert werden. Aufgezeigt wurde die Realisierung sowohl passiver als auch aktiver MMA:MAA-Resonatoren.

Die Oberflächenfunktionalisierung der MMA:MAA-Strukturen erfolgte per EDC-Chemie. Bei dieser Prozedur handelt es sich um einen in der Biotechnologie standardmäßigen Prozess, welcher aufgrund

seiner einfachen Handhabung und seiner Biokompatibilität auch eine Immobilisierung komplexer proteinbasierter Moleküle erlaubt. Neben der im Vergleich zu PMMA signifikanten Vereinfachung der Oberflächenfunktionalisierung weist MMA:MAA ähnlich gute fabrikations- und anwendungstechnische Vorteile auf wie PMMA.

Während im Rahmen dieser Arbeit die Sensortätigkeit der MMA:MAA-Resonatoren anhand von Glycerol-Wasser-Gemischen demonstriert wurde, wäre in einem nächsten Schritt eine biomolekulare Detektionsaufgabe zu realisieren. Hierbei könnten die Carboxygruppen gezielt zur direkten Immobilisierung von Proteinen oder Antikörpern über deren native Amino-Termini²⁴⁷ genutzt werden.

Über die Auswahl des jeweils passenden komplementären Copolymers könnten darüber hinaus aminosäurebasierte Akzeptormoleküle über weitere ihrer nativ verfügbaren Seitengruppen (z. B. Carboxy-, Glutamat- oder Thiolgruppen) direkt an die Mikroresonatoren angekoppelt werden.

Darüber hinaus könnte das MMA:MAA chemisch so modifiziert werden, dass es zwei oder mehr unterschiedliche funktionelle Gruppen aufweist, um weitere chemische oder physikalische Funktionalitäten zu realisieren.

Neben MMA:MAA könnten weitere Copolymere erprobt werden, beispielsweise Poly(Methylmetacrylat-co-Acrylamid) oder Polyglycidylmethacrylat (PGMA).

Interessant wäre auch die Realisierung von copolymeren Resonatorstrukturen, die eine Akzeptormolekülimmobilisierung per Klick-Chemie oder Photovernetzung ermöglichen. Letzteres könnte zu einer selektiven Oberflächenfunktionalisierung individueller Resonatorstrukturen innerhalb einer Bauteilanordnung genutzt werden.

Die den Resonatoren umliegenden Oberflächenareale könnten dazu verwendet werden, um die Sensorelemente in mikrofluidische Kanäle zu integrieren und gemäß den CVD-funktionalisierten Strukturen aus Kapitel 5 verkapselte Lab-on-a-Chip zu realisieren.

Kapitel 7

Zusammenfassung und Bewertung der einzelnen Biosensor-Ansätze

Zusammenfassung

Im folgenden Kapitel werden die im Rahmen dieser Doktorarbeit realisierten Biosensorkonzepte in einer zusammenfassenden Darstellung einander gegenübergestellt und bewertet. Darüber hinaus werden die erzielten Resultate in das Gesamtforschungsgebiet eingeordnet. Detaillierte Zusammenfassungen und Ausblicke der einzelnen Konzepte finden sich in den betreffenden Kapiteln.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden unterschiedliche optische Biosensorkonzepte basierend auf kelchförmigen Flüstergaleriemoden- (WGM) Mikroresonatoren entwickelt. Die verschiedenen Ansätze fokussierten sich hierbei nicht nur auf eine reine Oberflächenfunktionalisierung der PMMA-Mikrokelche. Durch eine passende Auslegung der Oberflächenfunktionalisierung wurden weitere Bauteilfunktionalitäten realisiert, die einen Einsatz der Mikrokelche als Biosensoren begünstigten bzw. verbesserten. So entstanden im Rahmen dieser Doktorarbeit drei neue Bauteilkonzepte: Phospholipid-funktionalisierte Biosensoren, hybride Biosensoren mit einer funktionellen CVD-Lage als Startschicht für die Oberflächenfunktionalisierung und Copolymer-basierte Biosensorelemente. Mit den unterschiedlichen Konzepten wurden unter anderem molekular selektive Biolaser, mikrofluidische Lab-on-a-Chip-Plattformen, monomodige Mikrolaser und ein neuartiger copolymerer Resonator verwirklicht. Zur Realisierung dieser Bauteile wurde unter anderem ein Depositionsprozess entwickelt, der eine simultane Oberflächenfunktionalisierung chipbasierter Sensorfelder ermöglicht (*justiertes Mikrokontaktstempeln*; engl.: *aligned microcontact stamping*, $A\mu CS$) sowie ein chemischer Verkapselungsprozess, welcher komplett bei Raumtemperatur und ohne den Einsatz zusätzlicher Chemikalien durchgeführt wird.

Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Sensorkonzepte einander gegenübergestellt und bewertet sowie deren Relevanz in einen größeren Kontext eingeordnet. Detaillierte Zusammenfassungen und Ausblicke zu den einzelnen Arbeiten sind am Ende der jeweiligen Kapitel 4 bis 6 zu finden.

Das erste Biosensorkonzept beinhaltet die Deposition von phospholipidbasierten molekularen Tinten auf die PMMA-Mikrokelche. Die Tinten sind flexibel aus unterschiedlichen molekularen Komponenten herstellbar, was eine direkte Realisierung einer großen Bandbreite an biosensorischen Applikationen ermöglicht. Hier unterscheidet sich dieser Ansatz von den beiden anderen im Rahmen dieser Doktorarbeit realisierten Konzepten, bei denen zwar ebenfalls ein großes Anwendungsspektrum ermöglicht wird, die Auswahl dort jedoch prinzipiell über die Materialien der Sensorelemente stattfindet. Die Deposition der Lipidtinten setzt hingegen keinerlei Veränderung des Sensorelements voraus, wodurch der größte Grad an Flexibilität gegeben ist. Über das in dieser Doktorarbeit entwickelte $A\mu CS$ -Verfahren lassen sich die Tinten zudem erstmals parallel auf ganze WGM-Resonatorfelder deponieren, wodurch die Bedingungen für eine Biosensor-Massenherstellung stark begünstigt werden. In bisher publizierten Arbeiten zu WGM-Biosensoren erfolgt die Oberflächenfunktionalisierung meist auf einzelne Sensorelemente sowie in serieller Abfolge.^{58,185,188,287} Im Vergleich zu den gängigen Funktionalisierungsansätzen kommt das $A\mu CS$ -Verfahren mit einem weitaus geringeren Zeit- und Materialverbrauch aus. Durch die von keinem anderen Ansatz erreichte laterale Auflösung wird eine Umgebungskontamination vermieden, wie sie beispielsweise bei mikrokanal- oder pipettenbasierten Verfahren auftritt. Hierdurch können auch sehr dicht zueinander strukturierte Sensorstrukturen effizient und individuell funktionalisiert werden. Für die Anfertigung der Stempelkissen werden lediglich Tintenvolumina von etwa einem Mikroliter benötigt, gegenüber den vergleichsweise großen Volumina der Akzeptormoleküllösungen im ml-Bereich der anderen Ansätze (Befüllung von Kanälen, Fluidikkammern, Kartuschen etc.). Sämtliche der normalerweise üblichen Prozessschritte, wie Inkubations- und Spülschritte, entfallen komplett. Ein serielles Funktionalisierungsverfahren, welches sich bedingt für eine Massenerstellung eignet, wurde von Kirk und Kollegen anhand eines Inkjet-Verfahrens demonstriert.¹⁸⁶ Durch seine parallele Deposition, der Flexibilität in der Stempelkissenherstellung sowie der weitaus geringeren Kontamination benachbarter Sensorstrukturen sollte das $A\mu CS$ diesem Verfahren überlegen sein. Allerdings erfolgt beim Inkjet-Verfahren die Moleküldeposition berührungslos, wodurch dort die Gefahr der Bauteilbeschädigung geringer ausfällt. Alternative, pipettenlose Verfahren basieren beispielsweise auf einer Integration einzelner Sensorstrukturen in Mikrofluidikkanäle.^{40,58,150} Mit steigender Anzahl der zu funktionalisierenden Sensorelemente wächst allerdings die Komplexität sowohl der Chipgeometrie als auch der benötigten Fluidikperipherie enorm. $A\mu CS$ könnte neben den Mikrokelchen auch für weitere chipbasierte Sensorstrukturen interessant sein, wie z. B. für Ringresonatoren und toroidale Resonatoren als weitere Vertreter von WGM-Strukturen, aber auch für andere Sensortechnologien wie plasmonische Dünnschichtstrukturen und photonische Kristalle. Durch die Mobilität der Lipidlagen können die zu detektierenden Biomoleküle in die Lagen eindiffundieren, was im Vergleich zu den CVD-beschichteten Biosensoren zu einer noch stärkeren Erhöhung der Sensitivität führt (maximal um etwa einen Faktor 6 im Vergleich zu unbehandelten PMMA-Mikrokelchen). Gleichzeitig begrenzt

diese Mobilität jedoch die Stabilität der Lipidlagen in flüssigen Medien, sodass bei mikrofluidisch integrierten Sensorstrukturen hohe Durchflussraten zu vermeiden sind. Da als Hauptkomponente der Tinten standardmäßig DOPC als Trägerlipid zum Einsatz kommt, ist das Beschichtungsergebnis bei konstanten Depositionsbedingungen weitestgehend gut reproduzierbar. Je nach Art und Konzentration der beigemischten funktionalen Komponenten waren jedoch voneinander abweichende Beschichtungsergebnisse zu beobachten, sodass die Depositionsparameter für die betroffenen Tinten gegebenenfalls angepasst werden müssen. Eine herausragende Eigenschaft der Phospholipidtinten ist die flexible Beimischung der funktionalen Komponenten. Hierbei können neben den Akzeptormolekülen zur Generation der molekularen Selektivität weitere funktionale Moleküle beigemischt werden, die komplett neue Bauteilfunktionalitäten implementieren und daraus resultierend quasi eine „Multifunktionalisierung“ der beschichteten Bauteile bewirken. Durch eine additive Beimischung von Fluoreszenzfarbstoffen wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit Mikrolaser mit niedrigen Laserschwellen realisiert, die zeitgleich eine molekulare Selektivität zur Erledigung von biomolekularen Detektionsaufgaben aufwiesen (*Biolaser*). Eine derartige Ausnutzung der Oberflächenfunktionalisierung wurde bis dato in keiner anderen Publikation demonstriert. Durch die direkte Deposition des Laserfarbstoffes auf einzelne Resonatorstrukturen lassen sich potentiell Mikrolaser mit verschiedenen Arbeitswellenlängen/Farben auf demselben Chipsubstrat realisieren, was mit anderen, großflächigen Depositionsansätzen nicht möglich ist.^{32,156–159} Der Verzicht auf erhöhte Temperaturen^{156,157} und den Einsatz von Lösemitteln^{158,159} ermöglicht eine hohe Kompatibilität mit diesbezüglich empfindlichen Bauteilen, wie den PMMA-Resonatoren.

Mit einer weiteren Lipidtinte wurde erstmalig eine in-situ durchführbare vollständige Rekonfiguration der Oberflächenfunktionalisierung realisiert, was für einen Betrieb von WGM-Sensoren in einer verkapselten mikrofluidischen Infrastruktur äußerst interessant ist. Die bis dato einzige weitere bekannte Rekonfigurationsmethode erfordert einen kompletten Ausbau des WGM-Sensors aus dem Messaufbau.²¹⁵ Die Entfernung der Akzeptormoleküle wird dann per Sauerstoffplasmaveraschung betrieben, was einen erheblichen apparativen Aufwand bedeutet und des Weiteren nicht auf alle Resonatormaterialien angewendet werden kann. In einem anderen Ansatz werden im Rahmen der Rekonfiguration lediglich die Analytmoleküle von den Akzeptormolekülen losgelöst, sodass mit denselben Akzeptoren lediglich ein bestimmtes Bindungsexperiment mehrfach durchgeführt werden kann.³⁶

Auch die im Rahmen des ersten Sensorkonzeptes gezeigte Doppellaserstruktur stellt eine signifikante Verbesserung zu anderweitig publizierten Forschungsarbeiten dar. Generell erfolgt bei der deutlichen Mehrheit der passiven, aber auch der aktiven WGM-Biosensoren aufgrund der hohen Koppeffizienz die Ein- und Auskopplung des Analyselichtes mit einer ausgedünnten Glasfaser.^{16,17,64,67,114,115,117} Diese Verfahren sind zumeist strikt auf das serielle Auslesen einzelner Sensorelemente beschränkt, wodurch infolgedessen kein Referenzsensorelement zur Verfügung steht, um häufig auftretende Störsignale resultierend aus Brechzahl- und Temperaturschwankungen im Analyten zu kompensieren. Bisherig publizierte Referenzierungsansätze bleiben aufgrund der komplexen Ausleseproblematik der Sensorstrukturen oftmals auf eine reine Temperaturreferenzierung beschränkt.^{67,288,289} Zusätzlich setzten diese Ansätze eine verhältnismäßig komplexe Probenvorbereitung sowie ein hochauflösendes Ausleseverfahren voraus, wodurch deren Einsatz lediglich im Labormaßstab sinnvoll erscheint. Die von Guo und Kollegen demonstrierten Strukturen eröffnen durch nahe zu den Sensorelementen strukturierte und gekapselte Referenzresonatoren ebenfalls lediglich eine reine Temperaturkompensation.⁴¹ Bedingt durch den geringen Bauteilabstand erscheint eine individuelle Oberflächenfunktionalisierung der Strukturen, um auch eine Brechzahlkompensation zu ermöglichen, als schwierig. Durch Boriskina und Kollegen wurde eine Doppelresonatorstruktur mit der Intention der Brechzahlkompensation theoretisch demonstriert.²⁷⁶ Mutmaßlich ließ hier der geringe Bauteilabstand keine individuelle Oberflächenfunktionalisierung zu, sodass dieser Ansatz bisher nicht experimentell belegt wurde. Eine weniger lokalisierte Brechzahlkompensation wurde von Vollmer und Kollegen im Ansatz gezeigt,²¹² die Durchführung ist jedoch messtechnisch aufwändiger und die Positionierung der dort eingesetzten WGM-Strukturen entlang der optischen Glasfaser nicht reproduzierbar. Durch die lateral sehr hohe Auflösung des $A\mu$ CS-Verfahrens können die individuell zu funktionalisierenden Mikrokelchlaser hingegen äußerst geringe Abstände zueinander aufweisen, was insbesondere für eine effektive Herausfilterung lokalisierter Signalstörungen sehr interessant ist.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten AuCS -funktionalisierten Doppellaser stellen die bis dato kompakteste Biosensoranordnung mit Brechzahlkompensation dar.

Neben Ringresonatoren (mit signifikant geringeren Q -Faktoren) wurde bisher noch keine weitere chipbasierte WGM-Sensorstruktur demonstriert, welche ein simultanes Auslesen mehrerer Sensorbauteile in definierter und reproduzierbarer Weise ermöglicht.^{40,41,149,150} Bei Washburn und Kollegen werden die Ringe allerdings isoliert in verschiedene Mikrofluidikkanäle integriert, was sich nachteilig in der Signalreferenzierung erweisen kann.¹⁴⁹ Die von Huckabay und Kollegen,^{28,187} und Lutti und Kollegen²⁹⁰ per Immersion funktionalisierte Mikrokugeln werden im Anschluss statistisch auf einem Trägersubstrat immobilisiert. Eine definierte Anordnung der Mikrokugeln z. B. nach Art der Oberflächenfunktionalisierung, Bauteilgröße, Anzahl der Sensorelemente etc. ist nicht möglich. Eine gezielte Signalreferenzierung erscheint somit recht schwer durchführbar. Von White und Kollegen wurde eine Glaskapillare zur Ankopplung an die WGMs auf einen Chip mit Dünnschichtwellenleitern gelegt.¹⁹⁰ Dieser Ansatz birgt allerdings nur sehr begrenzte Referenzierungskapazitäten, da pro Kapillare lediglich eine Art von Oberflächenfunktionalisierung appliziert werden kann. Zur Herausfilterung von Störsignalen müssten demnach verschiedene Kapillaren verwendet werden. Nachteilig ist des Weiteren die mechanisch instabile Sensoranordnung.

Der gezeigte Referenzierungsansatz über die Lipid-funktionalisierten Mikrokelche könnte letztendlich besonders zur Analyse molekular hochkomplexer Medien wie beispielsweise Blutserum interessant sein, da hier sowohl hochlokalisierte Brechzahl- und Temperaturschwankungen als auch nichtspezifisch anlagernde Inhaltsstoffe in besonders hohem Maße vorkommen können. Während andere Detektionsansätze zum Teil mit stark verdünnten Seren arbeiten,¹⁸⁸ konnte über das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte referenzierte Detektionsschema bedingt durch die sehr guten Passivierungseigenschaften der Phospholipidtinten in einer ersten Messreihe Streptavidin in unverdünntem Serum vom Kalb detektiert werden. Jedoch sind weitere Experimente nötig, um die Brauchbarkeit des Ansatzes zu untermauern. Von zentraler Fragestellung wird hierbei das Passivierungspotential der Lipidtinten sein, da in physiologischen Medien vor allem lipidbasierte Inhaltsstoffe mit der Oberflächenfunktionalisierung interagieren könnten. Diesbezüglich vielversprechende Ergebnisse wurden jedoch bereits von Lenhart und Kollegen anhand von biosensorischen Lipidgittern präsentiert.¹⁷³

Im Rahmen des zweiten Sensorkonzeptes wurden PMMA-Mikrokelche mit funktionellen Poly(*p*-Xylylenen) (PPXen) beschichtet und auf diese Weise hybride Biosensoren realisiert. Auch hier konnten neben der primär intendierten Oberflächenfunktionalisierung weitere herausragende Vorteile erzielt werden. Durch die hohe Brechzahl von PPX konnte der optische Überlapp mit dem angrenzenden Analyten und somit die Sensitivität des Sensoren um mehr als 100 % im Vergleich zu den bis dato hergestellten PMMA-Mikrokelchen verbessert werden. Da die zu detektierenden Biomoleküle an die Oberfläche der PPX-Lagen anbinden, bleibt die Sensitivität allerdings hinter der der phospholipidbeschichteten Strukturen zurück. PPXe können mit diversen funktionellen Gruppen substituiert sein und ohne Vorbehandlung oder Veränderung der Sensoroberfläche direkt auf diese appliziert werden. Über eine passende Auswahl der funktionellen Gruppen kann die Sensoroberfläche für eine sehr große Bandbreite an biomolekularen Detektionsaufgaben maßgeschneidert werden. Im Gegensatz zu den phospholipidbeschichteten Mikrokelchen werden die Akzeptormoleküle kovalent an die Sensoroberfläche angebonden, was eine stabilere Anwendung in mikrofluidischen Systemen auch bei höheren Scherkräften ermöglicht. Da die PPX-Beschichtung hochkonform erfolgt, ist dieses Sensorkonzept nahezu unabhängig von der Sensorgeometrie und kann direkt auf eine Vielzahl von Sensortechnologien übertragen werden. So konnte neben der Oberflächenfunktionalisierung der Mikrokelche ein optisches Koppeln nahe zueinander strukturierter PMMA-Scheibenlaser durch Verringerung deren Spaltabstandes realisiert werden. Besonders von Vorteil ist die nach der Beschichtung von der Sensorplattform unabhängige und somit standardisiert anwendbare Oberflächenfunktionalisierungsprozedur. Im Rahmen dieser Arbeit wurden darüber hinaus erstmals funktionelle CVD-Polymere auf WGM-Strukturen zur Realisierung von Biosensoren appliziert. Durch die Demonstration der Biosensortauglichkeit anhand brustkrebspezifischer Exosomen wurde zudem eine vielversprechende klinische Anwendung demonstriert.

Von besonderem Vorteil ist, dass die nicht an der Oberflächenfunktionalisierung beteiligten Areale für weitere chemische Reaktionen zur Verfügung stehen. So wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit die

umliegenden Chipareale der Mikrokelche zur (ebenfalls plattformunabhängigen) chemischen Verkapselung dieser verwendet und auf diese Weise erstmalig hochintegrierte und mechanisch äußerst stabile Lab-on-a-Chips hergestellt. Dies stellt eine klare Verbesserung zu unbeschichteten PMMA-Mikrokelchen dar, deren Verkapselung beispielsweise durch Verkleben, thermisches Heißprägen oder durch Aufbringen eines PDMS-Chips vorgenommen werden muss. Während diese Prozesse auf diverse Sensorplattformen angewendet werden können sind sie bedingt durch den Einsatz von hohen Temperaturen und Lösemitteln nicht bedenkenlos auf diesbezüglich empfindliche Bauteile wie die PMMA-Mikrokelche anwendbar. Hier bietet die lösemittelfreie und bei Raumtemperatur stattfindende Verkapselung mit den PPX-Lagen klare Vorteile. Der Aspekt der Plattformunabhängigkeit des CVD-Verkapselungsprozesses wurde zudem explizit an dem ebenfalls in dieser Doktorarbeit realisierten markerbasierten Lab-on-a-Chip gezeigt. Da die PPX-Beschichtung in der Regel homogen auf die gesamte Chipfläche angewendet wird setzt die Oberflächenfunktionalisierung individueller Sensorelemente eine Adressierung durch eine Mikrofluidik oder Pipettierverfahren voraus. Eine Anwendung des μ CS-Verfahrens wäre ebenfalls denkbar, jedoch wären hierzu die zu transferierenden Moleküle auf Kompatibilität hin zu testen.

Viele WGM-Geometrien eignen sich technologisch/geometrisch bedingt nur in sehr beschränktem Maße für eine mikrofluidische Integration im Sinne eines portablen Lab-on-a-Chip, weshalb sich die bisher veröffentlichten Ansätze nur schwer mit der hier realisierten Verkapselung vergleichen lassen. Die meisten Ansätze beschäftigen sich mit der Integration der involvierten Bauteile in die mikrofluidische Kammer des stationären optischen Versuchsaufbaus. Besonders bei fasergekoppelten Messverfahren stellt sich hierbei die Herausforderung, neben den Sensorelementen vor allem auch die Glasfaser stabil in die Kammer zu integrieren.^{17,32,118} Aktive Mikrokelche erweisen sich vor allem durch deren chipbasierte Ausführung als generell besonders vorteilhaft sowie durch die Tatsache, dass sie über Freistrahloptik angeregt und ausgelesen werden können. Die Integration in eine mikrofluidische Infrastruktur unter Anwendung des hier gezeigten Verkapselungsansatzes erweist sich somit in der Ausführung inhärent als vergleichsweise einfach, womit dieser einer der wenigen publizierten Ansätze überhaupt darstellt. Als eines der wenigen weiteren Beispiele wurden anorganische Dünnschichtresonatoren in eine chipbasierte Infrastruktur integriert. Bei Carlborg und Kollegen geschah dies über eine mehrlagige Anordnung verschiedener Chipkomponenten und Mediatorlagen.¹⁵⁰ Die komplexe Justage der einzelnen Lagen wird über einen Justagechip bewerkstelligt, allerdings wird wegen der hohen Anzahl an Lagen eine hinreichend gute Fabrikationsgenauigkeit aller involvierten Komponenten benötigt. Beim CVD-gestützten Verkapselungsprozess hingegen reduziert sich die Justage auf zwei Komponenten. In einem anderen Ansatz wurden Ringresonatoren durch einen ihrer Fabrikation nachgeschalteten photolithografischen Prozess in eine mikrofluidische Infrastruktur aus SU-8 integriert.²⁶⁴ Durch die anfallenden nasschemischen Prozesse besteht hier jedoch die Gefahr der Bauteilkontamination bzw. -verblockung, beispielsweise durch zurückbleibende Lackreste. Es sei erwähnt, dass aufgrund der Instabilität in vielen Lösemitteln sowie UV-Strahlung ein derartiges Integrationsverfahren generell nicht an den PMMA-Mikrokelchen durchgeführt werden kann. Bei den bisher publizierten Methoden zur Chipintegration von WGM-Kapillarresonatoren stellt erneut vor allem die Implementierung der Glasfaser die größte Herausforderung dar, sodass pro Chip nur sehr wenige Sensorstrukturen implementiert werden können.²⁹¹ Vorteilhaft an der Kapillargeometrie jedoch ist, dass sie neben ihrer Funktion als WGM-Resonator gleichzeitig auch als Mikrokanal genutzt werden kann. Bei Suter und Kollegen wurden WGM-Kapillaren mitsamt Glasfaser in einen PDMS-Block eingebettet.²⁹² Neben der nur sehr schwer reproduzierbaren Faserjustage fällt diese Verkapselungsmethode für anders geartete WGM-Sensorstrukturen komplett aus.

Im dritten Sensorkonzept wurden neuartige copolymer-basierte WGM-Mikroresonatoren entwickelt, um Biosensoren mit maßgeschneiderter chemischer Reaktivität zu realisieren. Das jeweils verwendete Copolymer weist hierbei beliebig viele unterschiedliche funktionelle Gruppen auf, sodass neben den Akzeptormolekülen weitere funktionale Moleküle an das polymere Gerüst angebunden werden können. Hierdurch ergibt sich analog wie bei den PPX-beschichteten Mikrokelchen eine große Bandbreite an realisierbaren biomolekularen Detektionsaufgaben. Da es sich bei der CVD-Beschichtung um einen post-fabrikativen Prozess handelt weist diese allerdings eine höhere Flexibilität auf. Demgegenüber kommt die Herstellung der copolymer-basierten Mikroresonatoren ohne Vakuumprozess aus. Darüber hinaus können weitere funktionale Moleküle entweder auf der Oberfläche oder sogar im

Resonatorvolumen stabil implementiert werden, wodurch Optimierungen physikalischer oder chemischer Natur am Bauteil selbst vorgenommen werden könnten. Beispielsweise könnten anders als bei den PMMA-Kelchresonatoren Laserfarbstoffe kovalent an das Copolymer angebunden und somit die Lebensdauer der daraus resultierenden Mikrolaser verbessert werden. Über den Einsatz von kreuzvernetzenden Molekülen könnte des Weiteren die chemische Stabilität der Bauteile signifikant erhöht werden – ein Nachteil der sich bei den PMMA-Kelchen vor allem bei der Oberflächenfunktionalisierung als einschränkend erweisen kann. Da das molekulare Grundgerüst des Copolymers bestenfalls stets identisch bleibt ist lediglich eine marginale Anpassung der Fabrikationsparameter zu erwarten. Diese Erwartung trifft streng genommen allerdings nur auf ähnliche Molekulargewichte zu und ist durch weitere Experimente zu belegen.

Um den Aspekt der Oberflächenfunktionalisierung aufzugreifen, wurden in der vorliegenden Arbeit Mikroresonatoren aus Poly(Methylmethacrylat-*co*-Methacrylsäure) (MMA:MAA) hergestellt, welches als PMMA-basiertes Copolymer ähnlich gute optische und fabrikationstechnische Vorteile wie PMMA besitzt. Durch seine Carboxygruppen weist MMA:MAA eine weitaus bessere Reaktivität als PMMA auf. Dies wurde ausgenutzt, um den in der Biotechnologie als Standardprozess bekannten biokompatiblen Anbindungsprozess von aminoterminierten Molekülen über EDC-Chemie (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) zu implementieren. Die Resonatoren wurden zudem mit einem neuartigen Fabrikationsprozess hergestellt, bei dem auch der Sockel aus einem Polymer besteht und die Resonatoren somit auf beliebiges Trägermaterial realisiert werden können. Die erzielbaren optischen Resonatorgütern sind mit denen der standardmäßigen PMMA-Resonatoren auf den Siliziumsockeln vergleichbar.

Potentiell können auch bei diesem Bauteilkonzept die dem Sensorelement umliegenden Areale für weitere chemische Reaktionen herangezogen werden, beispielsweise, um die Sensoren in mikrofluidische Kanäle zu integrieren. Dieser Ansatz wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht näher verfolgt.

Alle drei der im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelten Bauteilkonzepte stellen somit einen signifikanten Fortschritt sowohl in Bezug auf die bis dato realisierten Arbeiten an den PMMA-Mikrokelchen an sich, als auch auf dem Forschungsgebiet allgemein dar. So konnten mit allen drei Ansätzen die Limitierungen in der Oberflächenfunktionalisierung vom relativ reaktionsträgen PMMA erfolgreich überwunden werden. Insbesondere der Ansatz, über die Oberflächenfunktionalisierung der Sensorelemente neben der biomolekularen Selektivität weitere nützliche Funktionalitäten und Verbesserungen am Bauteil vorzunehmen, wurde erstmals im Rahmen dieser Arbeit aufgegriffen. Während bei vielen anderen Sensorplattformen, z. B. bei Silizium- und SiO₂-basierten Sensorelementen die Oberflächenfunktionalisierung fix über das Material vorgegeben ist, wurden über die hier gezeigten Konzepte neue Freiheitsgrade aufgezeigt. Tabelle 2 fasst die wichtigsten Aspekte der einzelnen Bauteilkonzepte zusammen.

Tabelle 2: Vergleich der einzelnen im Rahmen dieser Doktorarbeit realisierten Bauteilkonzepte.

	PMMA-Mikrokelche	Phospholipid-funktionalisierte Biosensoren	PPX-beschichtete Biosensoren	Copolymere Biosensoren
Sensitivität	Niedrig	Sehr hoch	Mittel/hoch	Niedrig
Integrierbarkeit	Mittel	Niedrig	Hoch	Hoch
Flexibilität in der Oberflächen-funktionalisierung	Sehr niedrig	Sehr hoch	Hoch	Hoch
Standardisierbarkeit der Oberflächen-funktionalisierung	Sehr niedrig	Sehr hoch	Sehr hoch	Niedrig
Übertragbarkeit der Oberflächen-funktionalisierung auf andere Sensorplattformen	Niedrig	Sehr hoch	Sehr hoch	Niedrig
Vorteile		<p>Oberflächen-funktionalisierung sehr flexibel</p> <p>Chemische und physikalische Funktionalitäten implementierbar</p> <p>Hochparallele und selektive Deposition individueller Sensoren</p> <p>Funktionalisierung sehr zeit- und ressourcenschonend</p>	<p>Flexible Auswahl der funktionellen Gruppen</p> <p>Funktionale Nutzung der umliegenden Chip-areale möglich</p> <p>Beschichtung weitestgehend geometrie-unabhängig</p> <p>Kovalente Bindung der Akzeptoren</p>	<p>Flexible Auswahl der funktionellen Gruppen</p> <p>Funktionale Nutzung der umliegenden Areale möglich</p> <p>Sämtliche Moleküle werden kovalent angebunden</p> <p>Chemisch und physikalisch funktionale Moleküle im Material kovalent einbettbar</p>
Nachteile	Methacrylatgruppen reaktionsträge	<p>Beschränkte mikrofluidische Stabilität</p> <p>Sensoren nur bei moderaten Temperaturen betreibbar</p>	Vakuumprozess nötig	<p>Das jeweils verwendete Material muss lithographisch strukturierbar sein.</p> <p>Abhängigkeit von Materialverfügbarkeit</p>

Literaturverzeichnis

1. Cooper, M. A. *Label-Free Biosensors: Techniques and Applications*. (Cambridge University Press, 2009).
2. Kemling, J. W., Qavi, A. J., Bailey, R. C. & Suslick, K. S. Nanostructured Substrates for Optical Sensing. *J. Phys. Chem. Lett.* **2**, 2934–2944 (2011).
3. Erickson, D., Mandal, S., Yang, A. H. J. & Cordovez, B. Nanobiosensors: optofluidic, electrical and mechanical approaches to biomolecular detection at the nanoscale. *Microfluid. Nanofluidics* **4**, 33–52 (2008).
4. Chi, Y. S., Lee, J. K., Lee, K.-B., Kim, D. J. & Choi, I. S. Account Biosurface Organic Chemistry : Interfacial Chemical Reactions for Applications to Nanobiotechnology and Biomedical Sciences. *Bull. Korean Chem. Soc.* **26**, 361–370 (2005).
5. Nicu, L. & Leichlé, T. Biosensors and tools for surface functionalization from the macro- to the nanoscale: The way forward. *J. Appl. Phys.* **104**, 111101–1–15 (2008).
6. Walt, D. R. Chemistry. Miniature analytical methods for medical diagnostics. *Science* **308**, 217–219 (2005).
7. D’Orazio, P. Biosensors in clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta* **334**, 41–69 (2003).
8. Turner, A. P. F. Biosensors: sense and sensibility. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 3184–3196 (2013).
9. Homola, J. Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species. *Chem. Rev.* **108**, 462–493 (2008).
10. Grossmann, T. *et al.* High-Q conical polymeric microcavities. *Appl. Phys. Lett.* **96**, 013303–1–3 (2010).
11. Grossmann, T. *et al.* Low-threshold conical microcavity dye lasers. *Appl. Phys. Lett.* **97**, 063304–1–3 (2010).
12. Walter, N. G. Single Molecule Detection, Analysis, and Manipulation. *Encycl. Anal. Chem.* **1**, 1–10 (2008).
13. Moerner, W. E. New directions in single-molecule imaging and analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 12596–12602 (2007).
14. Kumbhakar, M., Nath, S., Mukherjee, T., Mittal, J. P. & Pal, H. Single-molecule detection in exploring nanoenvironments: an overview. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **5**, 113–137 (2004).
15. Borisov, S. M. & Wolfbeis, O. S. Optical biosensors. *Chem. Rev.* **108**, 423–461 (2008).
16. Vollmer, F. & Schwefel, H. G. L. Taking detection to the limit with optical microcavities: Recent advances presented at the 560. WE Heraeus Seminar. *Eur. Phys. J. Spec. Top.* **223**, 1907–1916 (2014).
17. Armani, A. M., Kulkarni, R. P., Fraser, S. E., Flagan, R. C. & Vahala, K. J. Label-free, single-molecule detection with optical microcavities. *Science* **317**, 783–787 (2007).

18. Gorodetsky, M. L., Savchenkov, A. A. & Ilchenko, V. S. Ultimate Q of optical microsphere resonators. *Opt. Lett.* **21**, 453–455 (1996).
19. Zhang, X., Choi, H. S. & Armani, A. M. Ultimate quality factor of silica microtoroid resonant cavities. *Appl. Phys. Lett.* **96**, 153304–1–3 (2010).
20. Savchenkov, A. A., Matsko, A. B. & Ilchenko, V. S. Optical resonators with ten million finesse. *Opt. Express* **15**, 300–305 (2007).
21. Grudinin, I. S., Ilchenko, V. S. & Maleki, L. Ultrahigh optical Q factors of crystalline resonators in the linear regime. *Phys. Rev. A* **74**, 063806–1–9 (2006).
22. Lee, H. *et al.* Chemically etched ultrahigh-Q wedge-resonator on a silicon chip. *Nat. Photonics* **6**, 369–373 (2012).
23. Rasoloniaina, A. *et al.* Controlling the coupling properties of active ultrahigh-Q WGM microcavities from undercoupling to selective amplification. *Sci. Rep.* **4**, 4023–1–7 (2014).
24. Vollmer, F. *et al.* Protein detection by optical shift of a resonant microcavity. *Appl. Phys. Lett.* **80**, 4057–4059 (2002).
25. Garrett, C. G. B., Kaiser, W. & Bond, W. L. Stimulated Emission into Optical Whispering Modes of Spheres. *Phys. Rev.* **124**, 1807–1809 (1961).
26. Ashkin, A. & Dziedzic, J. M. No Title. *Phys. Rev. Lett.* **38**, 1351–1354 (1977).
27. Arnold, S., Khoshshima, M. & Teraoka, I. Shift of whispering-gallery modes in microspheres by protein adsorption. *Opt. Lett.* **28**, 272–274 (2003).
28. Huckabay, H. A. & Dunn, R. C. Whispering gallery mode imaging for the multiplexed detection of biomarkers. *Sensors Actuators B Chem.* **160**, 1262–1267 (2011).
29. Hanumegowda, N. M., Stica, C. J., Patel, B. C., White, I. M. & Fan, X. Refractometric sensors based on microsphere resonators. *Appl. Phys. Lett.* **87**, 201107–1–3 (2005).
30. Soteropoulos, C. E., Hunt, H. K. & Armani, A. M. Determination of binding kinetics using whispering gallery mode microcavities. *Appl. Phys. Lett.* **99**, 103703–1–3 (2011).
31. Armani, D. K., Kippenberg, T. J., Spillane, S. M. & Vahala, K. J. Ultra-high-Q toroid microcavity on a chip. *Nature* **421**, 925–928 (2003).
32. He, L., Özdemir, Ş. K., Zhu, J., Kim, W. & Yang, L. Detecting single viruses and nanoparticles using whispering gallery microlasers. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 428–32 (2011).
33. Ilchenko, V. S. & Gorodetsky, M. L. Microtorus: a high-finesse microcavity with whispering-gallery modes. *Opt. Lett.* **26**, 256–258 (2001).
34. Jiang, X.-F. *et al.* Highly unidirectional emission and ultralow-threshold lasing from on-chip ultrahigh-Q microcavities. *Adv. Mater.* **24**, OP260–264 (2012).
35. Savchenkov, A. A., Ilchenko, V. S., Matsko, A. B. & Maleki, L. Kilohertz optical resonances in dielectric crystal cavities. *Phys. Rev. A* **70**, 051804–1–4 (2004).

36. Washburn, A. L., Gunn, L. C. & Bailey, R. C. Label-Free Quantitation of a Cancer Biomarker in Complex Media Using Silicon Photonic Microring Resonators. *Anal. Chem.* **81**, 9499–9506 (2009).
37. De Vos, K., Bartolozzi, I., Schacht, E., Bienstman, P. & Baets, R. Silicon-on-Insulator microring resonator for sensitive and label-free biosensing. **15**, 7610–7615 (2007).
38. Barrios, C. A. *et al.* Slot-waveguide biochemical sensor. *Opt. Lett.* **32**, 3080–3082 (2007).
39. Chao, C.-Y. & Guo, L. J. Biochemical sensors based on polymer microrings with sharp asymmetrical resonance. *Appl. Phys. Lett.* **83**, 1527–1529 (2003).
40. Ramachandran, A. *et al.* A universal biosensing platform based on optical micro-ring resonators. *Biosens. Bioelectron.* **23**, 939–944 (2008).
41. Guo, J. *et al.* High-Q microring resonator for biochemical sensors. *Proc. SPIE* **5728**, 83–92 (2005).
42. White, I. M., Oveys, H. & Fan, X. Liquid-core optical ring-resonator sensors. *Opt. Lett.* **31**, 1319–1321 (2006).
43. Shopova, S. I., Zhou, H., Fan, X. & Zhang, P. Optofluidic ring resonator based dye laser. *Appl. Phys. Lett.* **90**, 221101–1–3 (2007).
44. Sun, Y., Shopova, S. I., Wu, C.-S., Arnold, S. & Fan, X. Bioinspired optofluidic FRET lasers via DNA scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 16039–16042 (2010).
45. Smith, E. J. *et al.* Lab-in-a-Tube : Detection of Individual Mouse Cells for Analysis in Flexible Split-Wall Microtube Resonator Sensors. *Nano Lett.* **11**, 4037–4042 (2011).
46. Strutt, J. W. *The Theory of Sound.* (Dover, 1945).
47. Lord Rayleigh. The Problem of the Whispering Gallery. *Phil. Mag.* **20**, 1001–1004 (1910).
48. Lord Rayleigh. Further Applications of Bessel's Functions of High Order to the Whispering Gallery and Allied Problems. *Phil. Mag.* **27**, 100–109 (1914).
49. Tyndall, J. *The Science of Sound.* 20 (Philosophical Library, 1867).
50. Airy, G. B. *On Sound and Atmospheric Vibrations, with the Mathematical Elements of Music.* 141 (MacMillan, 1871).
51. Raman, C. V. & Sutherland, G. A. Whispering-Gallery Phenomena at St. Paul's Cathedral. *Nature* **108**, 42 (1921).
52. Matsko, A. B., Savchenkov, A. A., Strekalov, D., Ilchenko, V. S. & Maleki, L. *IPN Progress Report: Review of Applications of Whispering-Gallery Mode Resonators in Photonics and Nonlinear Optics.* 1–51 (2005).
53. He, L., Özdemir, Ş. K. & Yang, L. Whispering gallery microcavity lasers. *Laser Photon. Rev.* **7**, 60–82 (2013).
54. Ward, J. & Benson, O. WGM microresonators: sensing, lasing and fundamental optics with microspheres. *Laser Photon. Rev.* **5**, 553–570 (2011).

55. Vollmer, F. & Arnold, S. Whispering-gallery-mode biosensing: label-free detection down to single molecules. *Nat. Methods* **5**, 591–596 (2008).
56. Sun, Y. & Fan, X. Optical ring resonators for biochemical and chemical sensing. *Anal. Bioanal. Chem.* **399**, 205–211 (2011).
57. Vollmer, F. & Yang, L. Label-free detection with high-Q microcavities: a review of biosensing mechanisms for integrated devices. *Nanophotonics* **1**, 267–291 (2012).
58. Luchansky, M. S. & Bailey, R. C. High-Q Optical Sensors for Chemical and Biological Analysis. *Anal. Chem.* **84**, 793–821 (2012).
59. Whitten, W. B., Ramsey, J. M. & Arnold, S. Single-Molecule Detection Limits in Levitated Microdroplets II. *Anal. Chem.* **63**, 1027–1031 (1991).
60. Blair, S. & Chen, Y. fluorescence biosensing with cylindrical optical cavities. *Appl. Opt.* **40**, 570–582 (2001).
61. Boyd, R. W. & Heebner, J. E. Sensitive disk resonator photonic biosensor. *Appl. Opt.* **40**, 5742–5747 (2001).
62. Krioukov, E. Sensor based on an integrated optical microcavity. *Opt. Lett.* **27**, 512–514 (2002).
63. Zhu, J. *et al.* On-chip single nanoparticle detection and sizing by mode splitting in an ultrahigh-Q microresonator. *Nat. Photonics* **4**, 46–49 (2009).
64. Lu, T. *et al.* High sensitivity nanoparticle detection using optical microcavities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 5976–5979 (2011).
65. Shao, L. *et al.* Detection of Single Nanoparticles and Lentiviruses Using Microcavity Resonance Broadening. *Adv. Mater.* **25**, 5616–5620 (2013).
66. Vollmer, F., Arnold, S. & Keng, D. Single virus detection from the reactive shift of a whispering-gallery mode. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 20701–20704 (2008).
67. Özdemir, Ş. K. *et al.* Highly sensitive detection of nanoparticles with a self-referenced and self-heterodyned whispering-gallery Raman microlaser. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E3836–E3844 (2014).
68. Arnold, S., Shopova, S. I. & Holler, S. Whispering gallery mode bio-sensor for label-free detection of single molecules: thermo-optic vs . reactive mechanism. *Opt. Express* **18**, 281–287 (2010).
69. Dantham, V. R. *et al.* Label-Free Detection of Single Protein Using a Nanoplasmonic-Photonic Hybrid Microcavity. *Nano Lett.* **13**, 3347–3351 (2013).
70. [Http://engineering.nyu.edu/press-release/2013/07/24/nyu-poly-nano-scientists-reach-holy-grail-label-free-cancer-marker-detectio](http://engineering.nyu.edu/press-release/2013/07/24/nyu-poly-nano-scientists-reach-holy-grail-label-free-cancer-marker-detectio). *Zugriff am 20.07.2015*
71. Baaske, M. D., Foreman, M. R. & Vollmer, F. Single-molecule nucleic acid interactions monitored on a label-free microcavity biosensor platform. *Nat. Nanotechnol.* **9**, 933–939 (2014).

72. Hauser, M. Mikroresonatoren aus Glas und Polymeren als optische Flüstergalerien. (Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2011).
73. Grossmann, T. Whispering-Gallery-Mode Lasing in Polymeric Microcavities. (Phd Thesis, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), 2012).
74. Collings, A. F. & Caruso, F. Biosensors: Recent advances. *Rep. Prog. Phys.* **60**, 1397–1445 (1997).
75. Fan, X. *et al.* Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: a review. *Anal. Chim. Acta* **620**, 8–26 (2008).
76. Lambeck, P. V. Integrated optical sensors for the chemical domain. *Meas. Sci. Technol.* **17**, R93–R116 (2006).
77. Kuswandi, B., Nuriman, Huskens, J. & Verboom, W. Optical sensing systems for microfluidic devices: a review. *Anal. Chim. Acta* **601**, 141–55 (2007).
78. Brecht, A. & Gauglitz, G. Optical probes and transducers. *Biosens. Bioelectron.* **10**, 923–936 (1995).
79. Velasco-Garcia, M. N. Optical biosensors for probing at the cellular level: a review of recent progress and future prospects. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 27–33 (2009).
80. Fan, X. & White, I. M. Optofluidic Microsystems for Chemical and Biological Analysis. *Nat. Photonics* **5**, 591–597 (2011).
81. Yang, Y. & Ma, H. Western Blotting and ELISA Techniques. *Researcher* **1**, 67–86 (2009).
82. Chen, Q. *et al.* Highly sensitive fluorescent protein FRET detection using optofluidic lasers. *Lab Chip* **13**, 2679–2681 (2013).
83. Sun, Y. & Fan, X. Distinguishing DNA by analog-to-digital-like conversion by using optofluidic lasers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**, 1236–1239 (2012).
84. Freeman, L. M. *et al.* Excitation of Cy5 in self-assembled lipid bilayers using optical microresonators. *Appl. Phys. Lett.* **98**, 143703–1–3 (2011).
85. Brown, J. Q., Vishwanath, K., Palmer, G. M. & Ramanujam, N. Advances in Quantitative UV-Visible Spectroscopy for Clinical and Pre-clinical Application in Cancer. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**, 119–131 (2009).
86. Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1767**, 1073–1101 (2007).
87. Downes, A. & Elfick, A. Raman spectroscopy and related techniques in biomedicine. *Sensors (Basel)*. **10**, 1871–1889 (2010).
88. Fenzl, C., Hirsch, T. & Wolfbeis, O. S. Photonic crystals for chemical sensing and biosensing. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**, 3318–3335 (2014).
89. Noda, S., Fujita, M. & Asano, T. Spontaneous-emission control by photonic crystals and nanocavities. *Nature* **1**, 449–458 (2007).
90. Anker, J. N. *et al.* Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nature* **7**, 8–10 (2008).

91. Patolsky, F., Zheng, G. & Lieber, C. M. Nanowire-Based Biosensors. *Anal. Chem.* **78**, 4261–4269 (2006).
92. Arlett, J. L., Myers, E. B. & Roukes, M. L. Comparative advantages of mechanical biosensors. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 203–215 (2011).
93. Waggoner, P. S. & Craighead, H. G. Micro- and nanomechanical sensors for environmental, chemical, and biological detection. *Lab Chip* **7**, 1238–1255 (2007).
94. Nie, Z. & Kumacheva, E. Patterning surfaces with functional polymers. *Nature* **7**, 277–290 (2008).
95. Falconnet, D., Csucs, G., Grandin, H. M. & Textor, M. Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials* **27**, 3044–3063 (2006).
96. Shi, C., Seok Choi, H. & Armani, A. M. Optical microcavities with a thiol-functionalized gold nanoparticle polymer thin film coating. *Appl. Phys. Lett.* **100**, 013305–1–3 (2012).
97. Mabey, W. & Mill, T. Critical Review of Hydrolysis of Organic Compounds in Water Under Environmental Conditions. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **7**, 383–415 (1978).
98. Gibbs, J. Effective Blocking Procedures. *ELISA Technical Bulletin (Corning Inc.)* 1–6 (2001).
99. Wisniewski, N. & Reichert, M. Methods for reducing biosensor membrane biofouling. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **18**, 197–219 (2000).
100. Butler, J. E. *et al.* The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene i. *J. Immunol. Methods* **150**, 77–90 (1992).
101. Henry, A. C. *et al.* Surface Modification of Poly (methyl methacrylate) Used in the Fabrication of Microanalytical Devices. *Anal. Chem.* **72**, 5331–5337 (2000).
102. Fixe, F., Dufva, M., Telleman, P. & Christensen, C. B. V. Functionalization of poly(methyl methacrylate) (PMMA) as a substrate for DNA microarrays. *Nucleic Acids Res.* **32**, e9 (2004).
103. Lagunas, A., Comelles, J., Martínez, E. & Samitier, J. Universal chemical gradient platforms using poly(methyl methacrylate) based on the biotin-streptavidin interaction for biological applications. *Langmuir* **26**, 14154–14161 (2010).
104. Soper, S. A. *et al.* Surface modification of polymer-based microfluidic devices. *Anal. Chim. Acta* **470**, 87–99 (2002).
105. Situma, C., Moehring, A. J., Noor, M. A. F. & Soper, S. A. Immobilized Molecular Beacons: A New Strategy using UV-Activated PMMA Surfaces to Provide Large Fluorescence Sensitivities for Reporting on Molecular Association Events. *Anal. Biochem.* **393**, 35–45 (2010).
106. Vesel, A., Elersic, K. & Mozetic, M. Immobilization of protein streptavidin to the surface of PMMA polymer. *Vacuum* **86**, 773–775 (2012).
107. Toh, A. G. G., Wang, Z. F. & Ng, S. H. Fabrication of Embedded Microvalve on PMMA Microfluidic Devices through Surface Functionalization. in *DTIP of MEMS & MOEMS* 1–6 (2008).

108. Beck, T. *et al.* High-Q polymer resonators with spatially controlled photo-functionalization for biosensing applications. *Appl. Phys. Lett.* **102**, 121108–1–3 (2013).
109. Kippenberg, T. J., Spillane, S. M. & Vahala, K. J. Demonstration of ultra-high-Q small mode volume toroid microcavities on a chip. *Appl. Phys. Lett.* **85**, 6113–6115 (2004).
110. Chao, C., Fung, W. & Guo, L. J. Polymer Microring Resonators for Biochemical Sensing Applications. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **12**, 134–142 (2006).
111. Martin, A. L., Armani, D. K., Yang, L. & Vahala, K. J. Replica-molded high-Q polymer microresonators. *Opt. Lett.* **29**, 533–535 (2004).
112. Klinkhammer, S. *et al.* Diode-Pumped Organic Semiconductor Microcone Laser. *IEEE Photonics Technol. Lett.* **23**, 489–491 (2011).
113. Lane, S., Chan, J., Thiessen, T. & Meldrum, a. Whispering gallery mode structure and refractometric sensitivity of fluorescent capillary-type sensors. *Sensors Actuators B Chem.* **190**, 752–759 (2014).
114. Zhang, X., Lee, W. & Fan, X. Bio-switchable optofluidic lasers based on DNA Holliday junctions. *Lab Chip* **12**, 3673–3675 (2012).
115. Rowland, K. J., Franc, A., Hoffmann, P. & Monro, T. M. Fluorescent polymer coated capillaries as optofluidic refractometric sensors. *Opt. Express* **21**, 11492–11505 (2013).
116. Francois, A. & Himmelhaus, M. Optical sensors based on whispering gallery modes in fluorescent microbeads: size dependence and influence of substrate. *Sensors (Basel)*. **9**, 6836–6852 (2009).
117. Lin, N., Jiang, L., Wang, S., Chen, Q. & Li, D. Chemical Vapor Sensors Based on Whispering Gallery Modes in an Optical Fiber Micro-Resonator Coated with a Polymer Layer. *Fiber Integr. Opt.* **31**, 263–276 (2012).
118. Dantham, V. R., Holler, S., Kolchenko, V., Wan, Z. & Arnold, S. Taking whispering gallery-mode single virus detection and sizing to the limit. *Appl. Phys. Lett.* **101**, 043704–1–4 (2012).
119. Scholten, K., Fan, X. & Zellers, E. T. Microfabricated optofluidic ring resonator structures. *Appl. Phys. Lett.* **99**, 141108–1–3 (2011).
120. Spillane, S. M., Kippenberg, T. J., Painter, O. J. & Vahala, K. J. Ideality in a Fiber-Taper-Coupled Microresonator System for Application to Cavity Quantum Electrodynamics. *Phys. Rev. Lett.* **91**, 043902–1–4 (2003).
121. Fujiwara, M., Toubaru, K. & Takeuchi, S. Optical transmittance degradation in tapered fibers. *Opt. Express* **19**, 1980–1982 (2011).
122. He, L., Özdemir, Ş. K., Zhu, J. & Yang, L. Ultrasensitive detection of mode splitting in active optical microcavities. *Phys. Rev. A* **82**, 053810–1–4 (2010).
123. Yang, J. & Guo, L. J. Optical Sensors Based on Active Microcavities. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **12**, 143–147 (2006).
124. Kippenberg, T. J., Spillane, S. M., Armani, D. K. & Vahala, K. J. Fabrication and coupling to planar high-Q silica disk microcavities. *Appl. Phys. Lett.* **83**, 797–799 (2003).

125. Grossmann, T. *et al.* Polymeric photonic molecule super-mode lasers on silicon. *Light Sci. Appl.* **2**, e82–1–4 (2013).
126. Sumetsky, M. Optical fiber microcoil resonator. *Opt. Express* **12**, 2303–2316 (2004).
127. Wang, P. *et al.* Macrobending single-mode fiber-based refractometer. *Appl. Opt.* 1–6 (2009).
128. Sumetsky, M., Dulashko, Y. & Hale, A. Fabrication and study of bent and coiled free silica nanowires: Self-coupling microloop optical interferometer. *Opt. Express* **12**, 3521–3531 (2004).
129. Boleininger, A., Lake, T., Hami, S. & Vallance, C. Whispering gallery modes in standard optical fibres for fibre profiling measurements and sensing of unlabelled chemical species. *Sensors (Basel)*. **10**, 1765–1781 (2010).
130. Bernardi, A. *et al.* On-chip Si/SiO_x microtube refractometer. *Appl. Phys. Lett.* **93**, 094106–1–3 (2008).
131. Kolwas, M., Jakubczyk, D., Derkachov, G. & Kolwas, K. Interaction of optical Whispering Gallery Modes with the surface layer of evaporating droplet of suspension. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* **131**, 138–145 (2013).
132. Berneschi, S. *et al.* in *Sensors (Basel, Switzerland)* (eds. Baldini, F. *et al.*) (Springer, 2012).
133. Yang, Y., Ward, J. & Chormaic, N. Quasi-droplet microbubbles for high resolution sensing applications. *Opt. Express* **22**, 4536–4538 (2014).
134. Costela, A. & Garc, I. Laser performance of pyrromethene 567 dye in solid matrices of methyl methacrylate with different comonomers. *Appl. Phys. B* **373**, 367–373 (2000).
135. Palik, E. D. *Handbook of Optical Constants of Solids*. (Academic, 1998).
136. Gorodetsky, M. L., Pryamikov, A. D. & Ilchenko, V. S. Rayleigh scattering in high-Q microspheres. *J. Opt. Soc. Am. B* **17**, 1051–1057 (2000).
137. Oraevsky, A. N. Whispering-gallery waves. *Quantum Electron.* **32**, 377–400 (2002).
138. Dupuis, A. *et al.* Guiding in the visible with “colorful” solid-core Bragg fibers. *Opt. Lett.* **32**, 2882–2884 (2007).
139. Zhu, H., White, I. M., Suter, J. D., Dale, P. S. & Fan, X. Analysis of biomolecule detection with optofluidic ring resonator sensors. *Opt. Express* **15**, 9139–9146 (2007).
140. Wienhold, T., Bog, U., Köber, S., Wondimu, S. F. & Koos, C. Vollpolymere Kelchresonatoren (Deutsches Patent DE102014012981) (2014).
141. Wienhold, T. *et al.* All-Polymer Photonic Lab-on-a-Chip Based on Whispering-Gallery Mode Microgoblet Lasers. *Lab Chip* (2015). doi:10.1039/C5LC00670H
142. Brambilla, G., Xu, F. & Feng, X. Fabrication of optical fibre nanowires and their optical and mechanical characterisation ELECTRONICS LETTERS 27th April 2006 ELECTRONICS LETTERS 27th April 2006. *Electron. Lett.* **42**, 9–10 (2006).
143. Ferrari, M. *et al.* Whispering gallery mode microresonators: Fundamentals and applications. *Riv. Del Nuovo Cim.* **34**, 435–488 (2011).

144. Carmon, T., Yang, L. & Vahala, K. J. Dynamical thermal behavior and thermal self-stability of microcavities. *Opt. Express* **12**, 654–656 (2004).
145. Wienhold, T. *et al.* Efficient free-space read-out of WGM lasers using circular micromirrors. *Opt. Express* **23**, 11451–11456 (2015).
146. Thorpe, M. J., Moll, K. D., Jones, R. J., Safdi, B. & Ye, J. Broadband Cavity Ringdown Spectroscopy for Sensitive and Rapid Molecular Detection. *Science* **311**, 1595–1599 (2006).
147. Rosenblum, S., Lovsky, Y., Arazi, L., Vollmer, F. & Dayan, B. Cavity ring-up spectroscopy for ultrafast sensing with optical microresonators. *Nat. Commun.* **6**, 6788–1–5 (2015).
148. Claes, T., Bogaerts, W. & Bienstman, P. Vernier-cascade label-free biosensor with integrated arrayed waveguide grating for wavelength interrogation with low-cost broadband source. *Opt. Lett.* **36**, 3320–3322 (2011).
149. Washburn, A. L., Luchansky, M. S., Bowman, A. L. & Bailey, R. C. Quantitative, Label-Free Detection of Five Protein Biomarkers Using Multiplexed Arrays of Silicon Photonic Microring Resonators. *Anal. Chem.* **82**, 69–72 (2010).
150. Carlborg, C. F. *et al.* A packaged optical slot-waveguide ring resonator sensor array for multiplex label-free assays in labs-on-chips. *Lab Chip* **10**, 281–290 (2010).
151. Wilchek, M. & Bayer, E. A. The Avidin-Biotin Complex in Bioanalytical Applications. *Anal. Biochem.* **32**, 1–32 (1988).
152. <http://de.mathworks.com/help/stats/nlinfit.html>. Zugriff am 20.07.2015
153. White, I. M. & Fan, X. On the performance quantification of resonant refractive index sensors. *Opt. Express* **16**, 1020–1028 (2008).
154. Haake, H.-M., Schütz, A. & Gauglitz, G. Label-free detection of biomolecular interaction by optical sensors. *Fresenius J. Anal. Chem.* **366**, 576–585 (2000).
155. O’Shannessy, D. J., Brigham-Burke, M., Soneson, K. K., Hensley, P. & Brooks, I. Determination of Rate and Equilibrium Binding Constants for Macromolecular Interactions Using Surface Plasmon Resonance: Use of Nonlinear Least Squares Analysis Methods. *Anal. Biochem.* **212**, 457–468 (1993).
156. Yang, L., Carmon, T., Min, B., Spillane, S. M. & Vahala, K. J. Erbium-doped and Raman microlasers on a silicon chip fabricated by the sol-gel process. *Appl. Phys. Lett.* **86**, 091114–1–3 (2005).
157. Ostby, E. P. & Vahala, K. J. Yb-doped glass microcavity laser operation in water. *Opt. Lett.* **34**, 1153–1155 (2009).
158. Min, B. *et al.* Ultralow threshold on-chip microcavity nanocrystal quantum dot lasers. *Appl. Phys. Lett.* **89**, 191124–1–3 (2006).
159. Tulek, A., Akbulut, D. & Bayindir, M. Ultralow threshold laser action from toroidal polymer microcavity. *Appl. Phys. Lett.* **94**, 203302–1–3 (2009).
160. Grossmann, T. *et al.* Strongly confined, low-threshold laser modes in organic semiconductor microgoblets. *Opt. Express* **19**, 10009–10016 (2011).

161. Chen, Q., Ritt, M., Sivaramakrishnan, S., Sun, Y. & Fan, X. Optofluidic lasers with a single molecular layer of gain. *Lab Chip* **14**, 4590–4595 (2014).
162. Bog, U. *et al.* On-chip microlasers for biomolecular detection via highly localized deposition of a multifunctional phospholipid ink. *Lab Chip* **13**, 2701–2707 (2013).
163. Braunschweig, A. B., Huo, F. & Mirkin, C. A. Molecular printing. *Nat. Chem.* **1**, 353–8 (2009).
164. Piner, R. D., Zhu, J., Xu, F., Hong, S. & Mirkin, C. A. “Dip-Pen” Nanolithography. *Science (80-.)*. **283**, 661–663 (1999).
165. Salaita, K., Wang, Y. & Mirkin, C. A. Applications of dip-pen nanolithography. 145–155
166. Wu, C.-C., Reinhoudt, D. N., Otto, C., Subramaniam, V. & Velders, A. H. Strategies for patterning biomolecules with dip-pen nanolithography. *Small* **7**, 989–1002 (2011).
167. Su, M., Aslam, M., Fu, L., Wu, N. & Dravid, V. P. Dip-pen nanopatterning of photosensitive conducting polymer using a monomer ink. *Appl. Phys. Lett.* **84**, 4200 (2004).
168. Tang, Q. & Shi, S.-Q. Preparation of gas sensors via dip-pen nanolithography. *Sensors Actuators B Chem.* **131**, 379–383 (2008).
169. Chai, J. *et al.* Scanning probe block copolymer lithography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 20202–20206 (2010).
170. Jang, J.-W. *et al.* Generation of metal photomasks by dip-pen nanolithography. *Small* **5**, 1850–1853 (2009).
171. Lenhart, S., Sun, P., Wang, Y., Fuchs, H. & Mirkin, C. a. Massively parallel dip-pen nanolithography of heterogeneous supported phospholipid multilayer patterns. *Small* **3**, 71–75 (2007).
172. Yeagle, P. L. *The Structure of Biological Membranes.* (CRC Press, 2011).
173. Lenhart, S. *et al.* Lipid multilayer gratings. *Nat. Nanotechnol.* **5**, 275–9 (2010).
174. Hirtz, M. Comparative Height Measurements of Dip-Pen Nanolithography- Produced Lipid Membrane Stacks with Atomic Force , Fluorescence , and Surface-Enhanced Ellipsometric Contrast Microscopy. *Langmuir* **27**, 11605–11608 (2011).
175. Sekula, S. *et al.* Multiplexed lipid dip-pen nanolithography on subcellular scales for the templating of functional proteins and cell culture. *Small* **4**, 1785–1793 (2008).
176. Sekula-Neuner, S. *et al.* Allergen arrays for antibody screening and immune cell activation profiling generated by parallel lipid dip-pen nanolithography. *Small* **8**, 585–591 (2012).
177. Biswas, S., Hirtz, M. & Fuchs, H. Measurement of Mass Transfer during Dip-Pen Nanolithography with Phospholipids. *Small* **7**, 2081–2086 (2011).
178. Röhrig, M., Thiel, M., Worgull, M. & Hölscher, H. 3D direct laser writing of nano- and microstructured hierarchical gecko-mimicking surfaces. *Small* **8**, 3009–3015 (2012).
179. Akimov, A. I. *et al.* Dependence of lasing efficiency of water-ethanol solutions of Rh6G on solvent composition. *Zhurnal Prikl. Spektroskopii* **36**, 169–173 (1982).

180. Carter, D. C. *et al.* Three-Dimensional Structure of Human Serum Albumin. *Science* **244**, 1195–1198 (1989).
181. Vollmer, F. & Roy, S. Optical Resonator Based Biomolecular Sensors and Logic Devices. *J. Indian Inst. Sci.* **92**, 233–251 (2012).
182. Daimon, M. & Masumura, A. Measurement of the refractive index of distilled water from the near-infrared region to the ultraviolet region. *Appl. Opt.* **46**, 3811–3820 (2007).
183. Mashaghi, A., Swann, M., Popplewell, J., Textor, M. & Reimhult, E. Optical Anisotropy of Supported Lipid Structures Probed by Waveguide Spectroscopy and Its Application to Study of Supported Lipid Bilayer Formation Kinetics. *Anal. Chem.* **80**, 3666–3676 (2008).
184. Hunt, H. K., Soteropoulos, C. & Armani, A. M. Bioconjugation strategies for microtoroidal optical resonators. *Sensors (Basel)*. **10**, 9317–9336 (2010).
185. Washburn, A. L., Gomez, J. & Bailey, R. C. DNA-Encoding to Improve Performance and Allow Parallel in a Surface-Bound Immunoassay Format. *Anal. Chem.* **83**, 3572–3580 (2011).
186. Kirk, J. T. *et al.* Multiplexed inkjet functionalization of silicon photonic biosensors. *Lab Chip* **11**, 1372–1377 (2011).
187. Huckabay, H. A., Wildgen, S. M. & Dunn, R. C. Label-free detection of ovarian cancer biomarkers using whispering gallery mode imaging. *Biosens. Bioelectron.* **45**, 223–229 (2013).
188. Luchansky, M. S., Washburn, A. L., McClellan, M. S. & Bailey, R. C. Sensitive on-chip detection of a protein biomarker in human serum and plasma over an extended dynamic range using silicon photonic microring resonators and sub-micron beads. *Lab Chip* **11**, 2042–2044 (2011).
189. Wilson, K. A., Finch, C. A., Anderson, P., Vollmer, F. & Hickman, J. J. Whispering gallery mode biosensor quantification of fibronectin adsorption kinetics onto alkylsilane monolayers and interpretation of resultant cellular response. *Biomaterials* **33**, 225–236 (2012).
190. White, I. M., Oveys, H., Fan, X., Smith, T. L. & Zhang, J. Integrated multiplexed biosensors based on liquid core optical ring resonators and antiresonant reflecting optical waveguides. *Appl. Phys. Lett.* **89**, 191106–1–3 (2006).
191. Bog, U. *et al.* Large-Scale Parallel Surface Functionalization of Goblet-type Whispering Gallery Mode Microcavity Arrays for Biosensing Applications. *Small* **10**, 3863–3868 (2014).
192. Bog, U. *et al.* Densely Packed Microgoblet Laser Pairs for Cross-Referenced Biomolecular Detection. *Adv. Sci.* (2015). doi:10.1002/advs.201500066
193. Eichelsdoerfer, D. J. *et al.* Large-area molecular patterning with polymer pen lithography. *Nat. Protoc.* **8**, 2548–2560 (2013).
194. Brinkmann, F. *et al.* Interdigitated multicolored bioink micropatterns by multiplexed polymer pen lithography. *Small* **9**, 3266–3275 (2013).
195. Huo, F. *et al.* Polymer pen lithography. *Science* **321**, 1658–1660 (2008).

196. Kumar, A. & Whitesides, G. M. Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol “ink” followed by chemical etching. *Appl. Phys. Lett.* **63**, 2002–2004 (1993).
197. Zheng, Z. *et al.* Multiplexed protein arrays enabled by polymer pen lithography: addressing the inking challenge. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**, 7626–7629 (2009).
198. Xie, Z. *et al.* Polymer pen lithography using dual-elastomer tip arrays. *Small* **8**, 2664–2669 (2012).
199. Shim, W. *et al.* Hard-tip, soft-spring lithography. *Nature* **469**, 516–520 (2011).
200. Zhong, X. *et al.* Materials for the preparation of polymer pen lithography tip arrays and a comparison of their printing properties. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **51**, 1533–1539 (2013).
201. Liao, X., Braunschweig, A. B., Zheng, Z. & Mirkin, C. A. Force- and time-dependent feature size and shape control in molecular printing via polymer-pen lithography. *Small* **6**, 1082–1086 (2010).
202. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=729&tid=132>. Zugriff am 20.07.2015 (1995).
203. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/antibody-basics.html>. Zugriff am 20.07.2015
204. Robak, T., Gladalska, C. A. A. & Stepie, H. Serum levels of interleukin-6 type cytokines and soluble interleukin-6 receptor in patients with rheumatoid arthritis. *Mediat. Inflammation* **353**, 347–353 (1998).
205. Blay, J.-Y. *et al.* Serum Level of Interleukin 6 as a Prognosis Factor in Metastatic Renal Cell Carcinoma Serum Level of Interleukin 6 as a Prognosis Factor in Metastatic Renal Cell. *Cancer Res.* **52**, 3317–3322 (1992).
206. Nakai, Y., Hamagaki, S. & Takagi, R. Plasma concentrations of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and soluble TNF receptors in patients with bulimia nervosa. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **53**, 383–388 (2000).
207. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000955/human_med_001042.jsp&murl=menus/medicines/medicines.jsp&mid=WC0b01ac058001d124&jsenabled=true. Zugriff am 20.07.2015
208. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000481/human_med_000822.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. Zugriff am 20.07.2015
209. Alberts, B. *et al.* *Molecular Biology of the Cell*. (Garland Science, 2002).
210. <http://www.spiegel.de/gesundheit/diagnose/arzneiverordnungsreport-2013-deutsche-pillen-sind-zu-teuer-a-921506.html>. Zugriff am 20.07.2015
211. Spillane, S. M., Kippenberg, T. J. & Vahala, K. J. Ultralow-threshold Raman laser using a spherical dielectric microcavity. *Nature* **415**, 621–623 (2002).

212. Vollmer, F., Arnold, S., Braun, D., Teraoka, I. & Libchaber, A. Multiplexed DNA Quantification by Spectroscopic Shift of Two Microsphere Cavities. *Biophys. J.* **85**, 1974–1979 (2003).
213. Zhang, Z., Zhao, P., Lin, P. & Sun, F. Thermo-optic coefficients of polymers for optical waveguide applications. *Polymer (Guildf)*. **47**, 4893–4896 (2006).
214. Anderson, N. L. The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 845–867 (2002).
215. Hunt, H. K. & Armani, A. M. Recycling microcavity optical biosensors. *Opt. Lett.* **36**, 1092–1094 (2011).
216. Hunt, H. K. & Armani, A. M. Bioconjugation Strategies for Label-free Optical Microcavity Sensors. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **20**, 1–13 (2014).
217. Alf, M. E. *et al.* Chemical vapor deposition of conformal, functional, and responsive polymer films. *Adv. Mater.* **22**, 1993–2027 (2010).
218. Ozaydin-Ince, G., Coclite, A. M. & Gleason, K. K. CVD of polymeric thin films: applications in sensors, biotechnology, microelectronics/organic electronics, microfluidics, MEMS, composites and membranes. *Rep. Prog. Phys.* **75**, 016501–1–40 (2012).
219. Chen, H.-Y. & Lahann, J. Designable biointerfaces using vapor-based reactive polymers. *Langmuir* **27**, 34–48 (2011).
220. Lahann, J. *et al.* Reactive Polymer Coatings : A Platform for Patterning Proteins and Mammalian Cells onto a Broad Range of Materials. *Langmuir* 3632–3638 (2002).
221. Tenhaeff, W. E. & Gleason, K. K. Initiated and Oxidative Chemical Vapor Deposition of Polymeric Thin Films: iCVD and oCVD. *Adv. Funct. Mater.* **18**, 979–992 (2008).
222. Gorham, W. F. A New, General Synthetic Method for the Preparation of Linear Poly-p-xylylenes. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **4**, 3027–3039 (1966).
223. Richter, B. *et al.* Three-dimensional microscaffolds exhibiting spatially resolved surface chemistry. *Adv. Mater.* **25**, 6117–6122 (2013).
224. Tan, C. P. & Craighead, H. G. Surface Engineering and Patterning Using Parylene for Biological Applications. *Materials (Basel)*. **3**, 1803–1832 (2010).
225. Rodger, D. *et al.* Flexible parylene-based multielectrode array technology for high-density neural stimulation and recording. *Sensors Actuators B Chem.* **132**, 449–460 (2008).
226. Lee, T., Lee, J. & Park, C. Characterization of Parylene Deposition Process for the Passivation of Organic Light Emitting Diodes. *Korean J. Chem. Eng.* **19**, 722–727 (2002).
227. Tsukagoshi, K. *et al.* Pentacene transistor encapsulated by poly-para-xylylene behaving as gate dielectric insulator and passivation film. *Appl. Phys. Lett.* **87**, 183502–1–3 (2005).
228. Langer, R. & Tirrell, D. A. Designing materials for biology and medicine. *Nature* **428**, 487–492 (2004).

229. Ragheb, A. O., Bates, B. L., Fearnot, N. E., Kozma, T. G. & Voorhees, W. D. Gershlick, A. H. Coated Implantable Medical Device (US-Patent US6299604). (2004).
230. Salvatore, G. A. *et al.* Wafer-scale design of lightweight and transparent electronics that wraps around hairs. *Nat. Commun.* **5**, 2982–1–8 (2014).
231. Modjarrad, K. & Ebnesajjad, S. *Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices*. (Elsevier, 2013).
232. Lahann, J. Reactive Polymer Coatings for Biomimetic Surface Engineering. *Chem. Eng. Commun.* **193**, 1457–1468 (2006).
233. Elkasabi, Y. M., Lahann, J. & Krebsbach, P. H. Cellular transduction gradients via vapor-deposited polymer coatings. *Biomaterials* **32**, 1809–1815 (2011).
234. Suh, K. Y., Langer, R. & Lahann, J. A Novel Photodefinable Reactive Polymer Coating and its Use for Microfabrication of Hydrogel Elements. *Adv. Mater.* **16**, 1401–1405 (2004).
235. Nandivada, H., Chen, H.-Y., Bondarenko, L. & Lahann, J. Reactive polymer coatings that “Click”. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**, 3360–3363 (2006).
236. Chen, H.-Y., Hirtz, M., Deng, X., Laue, T. & Fuchs, H. Substrate-Independent Dip-Pen Nanolithography Based on Reactive Coatings. *J. Am. Chem. Soc.* 18023–18025 (2010).
237. Li, R. W. C., Ventura, L., Gruber, J., Kawano, Y. & Carvalho, L. R. F. A selective conductive polymer-based sensor for volatile halogenated organic compounds (VHOC). *Sensors Actuators B Chem.* **131**, 646–651 (2008).
238. Ross, A. M., Zhang, D., Deng, X., Cheng, S. L. & Lahann, J. CVD-based Polymer Substrates for Spatially-resolved Analysis of Protein Binding by Imaging Ellipsometry. *Anal. Chem.* **83**, 874–880 (2012).
239. Wang, H. *et al.* Quantitative analysis of creatinine in urine by metalized nanostructured parylene. *J. Biomed. Opt.* **15**, 027004–1–5 (2015).
240. Mehrabani, S., Maker, A. J. & Armani, A. M. Hybrid integrated label-free chemical and biological sensors. *Sensors (Basel)*. **14**, 5890–928 (2014).
241. Chen, H.-Y., McClelland, A. A., Chen, Z. & Lahann, J. Solventless Adhesive Bonding Using Reactive Polymer Coatings. *Anal. Chem.* **80**, 4119–4124 (2008).
242. Bog, U. *et al.* Surface functionalization of goblet-type microlasers with reactive poly(p-xylylenes) for biomolecular sensing applications. *eingereicht*.
243. Waterkotte, B. *et al.* Biofunctional Micropatterning of Thermoformed 3D Substrates. *Adv. Funct. Mater.* **24**, 442–450 (2014).
244. Teraoka, I. & Arnold, S. Whispering-gallery modes in a microsphere coated with a high-refractive index layer: polarization-dependent sensitivity enhancement of resonance matching. *J. Opt. Soc. Am. B* **24**, 653–659 (2007).
245. Kawai, J. Total reflection X-ray photoelectron spectroscopy: A review. *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena* **178-179**, 268–272 (2010).

246. Fahrenport, J. Attenuated total reflection. *Spectrochim. Acta* **17**, 698–709 (1961).
247. Overview, A. & Production, A. *Pierce Antibody*. (Pierce Biotechnology, Inc., 2006).
248. Bally-Le Gall, F. *et al.* Solventless Adhesive Bonding at Room Temperature for Facile Fabrication of Microfluidic Lab-on-a-Chips. *eingereicht*.
249. Clyne, B. The C-Reactive Protein. *J. Emerg. Med.* **17**, 1019–1025 (1999).
250. Pepys, M. B. & Hirschfield, G. M. C-reactive protein : a critical update. *J. Clin. Invest.* **111**, 1805–1812 (2003).
251. Johnstone, R. M. Exosomes biological significance: A concise review. *Blood Cells, Mol. Dis.* **36**, 315–321 (2006).
252. Keller, S., Sanderson, M. P., Stoeck, A. & Altevogt, P. Exosomes : From biogenesis and secretion to biological function. *Immunol. Lett.* **107**, 102–108 (2006).
253. Pan, B. & Johnstone, R. M. Fate of the Transferrin Receptor during Maturation of Sheep Reticulocytes In Vitro : Selective Externalization of the Receptor. *Cell* **33**, 967–977 (1983).
254. Théry, C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 581–593 (2009).
255. Théry, C., Zitvogel, L. & Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 569–579 (2002).
256. <http://www.pierce-antibodies.com/targets/t/IsotypeControls.cfm>. *Zugriff am 20.07.2015*
257. Levy, S. & Shoham, T. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 136–148 (2005).
258. Semple, T. U., Quinn, L. A., Woods, L. K. & Moore, G. E. Tumor and Lymphoid Cell Lines from a Patient with Carcinoma of the Colon for a Cytotoxicity Model. *Cancer Res.* **36**, 1345–1355 (1978).
259. Mitri, Z., Constantine, T. & O'Regan, R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemother. Res. Pract.* **2012**, 743193–1–7 (2012).
260. Reyes, D. R., Iossifidis, D., Auroux, P.-A. & Manz, A. Micro Total Analysis Systems . 1 . Introduction , Theory , and Technology. *Anal. Chem.* **74**, 2623–2636 (2002).
261. Mark, D., Haeberle, S., Roth, G., von Stetten, F. & Zengerle, R. From microfluidic application to nanofluidic phenomena issue. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 1153–1182 (2010).
262. Chin, C. D., Linder, V. & Sia, S. K. Commercialization of microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab Chip* **12**, 2118–2134 (2012).
263. Li, H. & Fan, X. Characterization of sensing capability of optofluidic ring resonator biosensors. *Appl. Phys. Lett.* **97**, 011105–1–3 (2010).
264. Xu, D. *et al.* Label-free biosensor array based on silicon-on-insulator ring resonators addressed using a WDM approach. *Opt. Lett.* **35**, 2771–2773 (2010).

265. Henzi, P., Rabus, D. G., Wallrabe, U. & Mohr, J. Fabrication of photonic Integrated Circuits by DUV-induced Modification of Polymers. *Proc. SPIE* **5451**, 24–31 (2004).
266. Mandisloh, K. Polymere, mikrofluidische Systeme mit integrierten Wellenleitern. (Dissertation, Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, 2008).
267. Glashauser, W. & Ghica, G.-V. Verfahren für die spannungsfreie Entwicklung von bestrahlten Polymethylmethacrylatschichten (Europäisches Patent EP0051166 B1). (1980).
268. Rakovich, Y. P. & Donegan, J. F. Photonic atoms and molecules. *Laser Photon. Rev.* **4**, 179–191 (2009).
269. Lidorikis, E., Sigalas, M. M., Economou, E. N. & Soukoulis, C. M. Tight-Binding Parametrization for Photonic Band Gap Materials. *Phys. Rev. Lett.* **81**, 1405–1408 (1998).
270. Rakovich, Y. P. *et al.* Fine structure of coupled optical modes in photonic molecules. *Phys. Rev. A* **70**, 051801–1–4 (2004).
271. Chremmos, I., Schwelb, O. & Uzunoglu, N. in *Photonic Microresonator Research and Applications* (ed. S. V. Boriskina) (Springer Series in Optical Sciences, 2010).
272. Boriskina, S. V. Spectrally engineered photonic molecules as optical sensors with enhanced sensitivity: a proposal and numerical analysis. *J. Opt. Soc. Am. B* **23**, 1565–1573 (2006).
273. Lee, W. *et al.* Tunable single mode lasing from an on-chip optofluidic ring resonator laser. *Appl. Phys. Lett.* **98**, 061103–1–3 (2011).
274. Shang, L., Liu, L. & Xu, L. Single-frequency coupled asymmetric microcavity laser. *Opt. Lett.* **33**, 1150–1152 (2008).
275. Claes, T., Bogaerts, W. & Bienstman, P. Experimental characterization of a silicon photonic biosensor consisting of two cascaded ring resonators based on the Vernier-effect and introduction of a curve fitting method for an improved detection limit. *Opt. Express* **18**, 22747 (2010).
276. Boriskina, S. V. & Negro, L. D. Self-referenced photonic molecule bio (chemical) sensor. *Opt. Lett.* **35**, 2496–2498 (2010).
277. Hiremath, K. R., Niegemann, J. & Busch, K. Analysis of light propagation in slotted resonator based systems via coupled-mode theory. *Opt. Express* **19**, 8641–8655 (2011).
278. Flöss, D. Numerische Analyse optischer Flüstergalerieresonatoren zur Biodetektion. (Diplomarbeit, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), 2011).
279. Morichetti, F., Ferrari, C., Canciamilla, a. & Melloni, a. The first decade of coupled resonator optical waveguides: bringing slow light to applications. *Laser Photon. Rev.* **6**, 74–96 (2012).
280. Bayer, M., Gutbrod, T., Reithmaier, J. P. & Forchel, A. Optical Modes in Photonic Molecules. *Phys. Rev. Lett.* **81**, 2582–2585 (1998).
281. Mukaiyama, T., Takeda, K., Miyazaki, H. & Jimba, Y. Tight-Binding Photonic Molecule Modes of Resonant Bispheres. *Phys. Rev. Lett.* **82**, 4623–4626 (1999).

282. Noto, M., Keng, D., Teraoka, I. & Arnold, S. Detection of protein orientation on the silica microsphere surface using transverse electric/transverse magnetic whispering gallery modes. *Biophys. J.* **92**, 4466–4472 (2007).
283. Becker, S. Funktionalisierung polymerer Mikroresonatoren hoher Güte zur markerfreien Biodetektion. (Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2011).
284. Bog, U., Wienhold, T., Mappes, T., Abdel-Aliem, M. S. & Köber, S. Optisches Element und optisches Sensorsystem (Deutsches Patent DE102012110126 B3). (2012).
285. *Thermo Scientific Pierce Crosslinking Technical Handbook*. (Thermo Fisher Scientific Inc., 2009).
286. https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/MAN0011256_EDC_UG.pdf. *User Guide EDC*, Zugriff am 20.07.2015
287. Qavi, A. J. & Bailey, R. C. Multiplexed detection and label-free quantitation of microRNAs using arrays of silicon photonic microring resonators. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49**, 4608–4611 (2010).
288. Li, M., Wu, X., Liu, L., Fan, X. & Xu, L. Self-Referencing Optofluidic Ring Resonator Sensor for Highly Sensitive Biomolecular Detection. *Anal. Chem.* **85**, 9328–9332 (2013).
289. He, L., Özdemir, Ş. K., Zhu, J. & Yang, L. Scatterer induced mode splitting in poly(dimethylsiloxane) coated microresonators. *Appl. Phys. Lett.* **96**, 221101–1–3 (2010).
290. Lutti, J., Langbein, W. & Borri, P. A monolithic optical sensor based on whispering-gallery modes in polystyrene microspheres. *Appl. Phys. Lett.* **93**, 151103–1–3 (2008).
291. Scholten, K., Fan, X. & Zellers, E. T. Microfabricated optofluidic ring resonator structures. *Appl. Phys. Lett.* **99**, 141108–1–3 (2011).
292. Suter, J. D., Sun, Y., Howard, D. J., Viator, J. A. & Fan, X. PDMS embedded opto-fluidic microring resonator lasers. *Opt. Express* **16**, 10248–10253 (2008).

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

[2.2]PCP	[2.2]Paracyclophan
AFM	atomic force microscope, dt.: Rasterkraftmikroskop
A μ CS	aligned microcontact stamping, dt.: Justiertes Mikrokontaktstempeln
ATR	attenuated total reflection, dt.: abgeschwächte Totalreflexion
Biotin-cap PE	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine- <i>N</i> -(cap biotinyl)
BRIS	Brechzahlinduzierte Sensitivität
BSA	bovine serum albumin, dt.: Serumalbumin vom Rind
CaF ₂	Calciumfluorid
CCD	charge-coupled device
CF PE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine- <i>N</i> -(carboxyfluorescein)
CRP	C-reaktives Protein
CVD	chemical vapor deposition, dt.: Chemische Gasphasenabscheidung
Cy3	Cyanin3
Dansyl PE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine- <i>N</i> -(5-dimethylamino-1-naphthalenesulfonyl)
DCM	4-dicyanomethylene-2-methyl-6-(<i>p</i> -dimethylaminostyryl)-4H-pyran
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	2,4-Dinitrophenol
DOGS NTA Ni	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3- $\{[N(5\text{-amino-1-carboxypentyl})\text{iminodiacetic acid}]\text{succinyl}\}$
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DPN	Dip-pen nanolithography
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FEM	Finite-Elemente-Methode
FIB	focused ion beam, dt.: fokussierter Ionenstrahl
FSR	free spectral range, dt.: freier Spektralbereich
FVB	Full vertical binning
GFP	green fluorescent protein, dt. Grün fluoreszierendes Protein
H ₂ O	Wasser
HER2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
His	Histidin
iCVD	initiated chemical vapor deposition
IgG	Immunoglobulin G
Il-2	Interleukin-2
Il-6	Interleukin-6
IPA	isopropyl alcohol, dt.: Isopropanol
L-DPN	lipid dip-pen nanolithography
Liss Rhod PE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine- <i>N</i> -(lissamine rhodamine B sulfonyl)
LSM	laser scanning microscope, dt.: Konfokalmikroskop

μ CP	microcontact printing
MIBK	Methylisobuthylketon
MMA:MAA	Poly(Methylmethacrylat- <i>co</i> -Methacrylsäure)
MOVPE	metal organic chemical vapor phase epitaxy, dt.: Metallorganische Gasphasenepitaxie
μ TAS	micro-total-analysis system
NA	Numerische Apertur
Ni	Nickel
NBD PE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine- <i>N</i> -(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)
Nd:YLF	Neodym-dotiertes Yttriumlithiumfluorid
Nd:YVO ₄	Neodym-dotiertes Yttriumorthovanadat
oCVD	oxidative chemical vapor deposition
PBS	phosphate buffered saline, dt.: phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Phosphocholin
PDMS	Polydimethylsiloxan
PE	Phosphoethanolamin
PECVD	plasma enhanced chemical vapor deposition
PMMA	Polymethylmethacrylat
PPL	polymer-pen lithography
PPX	Poly(<i>p</i> -Xylylen)
PPX-CCH	Poly(4-Ethynyl- <i>p</i> -Xylylen- <i>co</i> - <i>p</i> -Xylylen)
PPX-CHO	Poly(4-Formyl- <i>p</i> -Xylylen- <i>co</i> - <i>p</i> -Xylylen)
PPX-CH ₂ NH ₂	Poly(4-Aminomethyl- <i>p</i> -Xylylen- <i>co</i> - <i>p</i> -Xylylen)
PPX-PFP	Poly(4-Carboxysäurepentafluorphenolester- <i>p</i> -Xylylen- <i>co</i> - <i>p</i> -Xylylen)
R6G	Rhodamin 6G
Q-Faktor	Qualitätsfaktor (Gütefaktor)
REM	Rasterelektronenmikroskop
RIU	refractive index unit, dt.: Brechzahleinheit
Si	Silizium
Sulfo-NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
TE	transversal elektrisch
TM	transversal magnetisch
TNF	Tumornekrosefaktor
TS	Temperatursensitivität
UV	Ultraviolett
WGM	whispering gallery mode, dt.: Flüstergaleriemode
XeF ₂	Xenondifluorid
XPS	x-ray photoelectron spectroscopy dt.: Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Symbole

α	Absorptionskoeffizient
α_{ex}	Überschusspolarisierbarkeit
B	Korrelationslänge
$BRIS$	Brechzahlsensitivität
C	Konzentration
c	Lichtgeschwindigkeit
c_0	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum
d	Distanz Wellenleiter-Resonator
$\Delta\lambda_{FSR}$	Spektrale Halbwertsbreite
DL	Detektionslimit
E	elektrische Feldstärke
ε	Permittivitätszahl
ε_0	Vakuum-Permittivität
f_{res}	Federbalken-Resonanzfrequenz
h	Resonatorhöhe
k_a	Assoziationskonstante
k_d	Dissoziationskonstante
k_f	Federbalken-Federkonstante
L	Eindringtiefe
λ	Lichtwellenlänge
L_{eff}	effektive Weglänge
L_{WGM}	Resonatorumfang
M_{cant}	Masse Cantilever
N	Teilchenanzahl
η	Optischer Füllfaktor/Überlapp
n_{Ana}	Brechungsindex Analyt
n_{eff}	effektiver Brechungsindex
N_r	radiale Quantenzahl
n_{Res}	Brechungsindex Resonatormaterial
N_f	azimutale Quantenzahl
N_g	azimutale Quantenzahl, rotationssymmetrischer Resonator
N_z	orthogonale Quantenzahl
ω	Lichtfrequenz
Q	Qualitätsfaktor
R	Resonatorradius
R_0/R_m	Sensorsignal
σ	Standardabweichung
σ_p	Oberflächendichte
σ_R	RMS-Oberflächenrauheit
τ	Lebensdauer

t	Zeit
U	Lichtenergie
w	Wellenleiterweite

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1	Schematische Darstellung der Funktionsweise eines (markerfreien) Biosensors.	10
Abbildung 2.2	Funktionsweise der markerbasierten und markerfreien Detektion von Biomolekülen.	12
Abbildung 2.3	Schematische Funktionsweise einer Oberflächenfunktionalisierung.	13
Abbildung 3.1	Schematische Darstellung eines WGM-Mikrokelches.	20
Abbildung 3.2	Prozesskette zur Herstellung von PMMA-Mikrokelchlasern.	25
Abbildung 3.3	REM-Aufnahme eines PMMA-Mikrokelchlasers.	26
Abbildung 3.4	Optische Charakterisierung passiver Mikrokelchresonatoren.	27
Abbildung 3.5	Versuchsaufbau zur optischen Charakterisierung von Mikrokelchlasern.	28
Abbildung 3.6	Charakterisierung der Laserschwelle aktiver Mikroresonatoren.	29
Abbildung 3.7	Emissionsspektrum eines via Physisorption biotinylierten PMMA-Mikrokelchlasers.	30
Abbildung 3.8	Ermittlung des Detektionslimits.	31
Abbildung 3.9	Detektion von Streptavidin mit via Adsorption biotinylierten Mikrokelchlasern.	32
Abbildung 4.1	Oberflächenfunktionalisierung von Mikrokelchen mit molekularen Tinten mittels Dip-Pen Nanolithografie.	38
Abbildung 4.2	Molekulare Strukturen der in dieser Arbeit verwendeten Phospholipide.	39
Abbildung 4.3	Fluoreszenzmikroskopaufnahme von sequentiell von links nach rechts mit Lasertinte beschichteten passiven Mikrokelchen und die zugehörigen Fluoreszenzgesamintensitäten	40
Abbildung 4.4	Vergrößerte Detailansicht zweier Biolaser.	40
Abbildung 4.5	Fluoreszenzmikroskopanalyse eines Biolasers.	41
Abbildung 4.6	Fluoreszenzmikroskopaufnahmen von vier mit der kugelförmigen AFM-Spitze beschichteten passiven Mikrokelchen.	42
Abbildung 4.7	Lasingeigenschaften der mit biotinylierter Lasertinte beschichteten Biolaser.	43
Abbildung 4.8	Fluoreszenzexperiment an passiven Mikrokelchen zur visuellen Verifizierung der Stabilität der Phospholipidfunktionalisierung.	44
Abbildung 4.9	Demonstration phospholipidfunktionalisierter Biolaser als molekulare Biosensoren.	46
Abbildung 4.10	Sensorsignal von sequentiell mit biotinylierter Lasertinte funktionalisierten Biolasern.	46
Abbildung 4.11	Schematische Darstellung der Herstellung des $A\mu$ CS-Multiplex-Stempelkissens mittels PPL, exemplarisch für einen Phospholipidtentypus.	51
Abbildung 4.12	Beladung des PDMS-Stempels und PPL-Schreibvorgang in der in-situ Visualisierung.	52
Abbildung 4.13	Illustration des justierten Mikrokontaktstempels nach Transfermethode A.	53
Abbildung 4.14	In-situ Visualisierung des justierten Mikrokontaktstempels an einem 4x4-Mikrokelchfeld nach Transfermethode A.	53
Abbildung 4.15	Illustration des justierten Mikrokontaktstempels nach Transfermethode B.	54

Abbildung 4.16	Illustration des justierten Mikrokontaktstempels nach Transfermethode BII.	54
Abbildung 4.17	Fluoreszenzmikroskopaufnahmen von hergestellten Stempelkissen für das Mikrokontaktstempeln nach Transfermethode B.	55
Abbildung 4.18	In-situ Ansicht des justierten Mikrokontaktstempels nach Transfermethode BII.	56
Abbildung 4.19	Mehrkanal-Fluoreszenzmikroskopaufnahmen von A μ CS-funktionalisierten Mikrokelchen, beschichtet nach Transfermethode B/BII.	56
Abbildung 4.20	REM-Aufnahme eines nach Transfermethode A funktionalisierten 4x4-Mikrokelchfeldes.	57
Abbildung 4.21	Zwei nach Transfermethode BII funktionalisierte Mikrokelchfelder unter Einsatz eines Stempelkissens mit räumlich getrennten Lipidintinfeldern.	57
Abbildung 4.22	Lasingeigenschaften per A μ CS funktionalisierter Mikrokelchlasers.	58
Abbildung 4.23	Typische Beschädigungen an den Mikroresonatoren durch physikalischen Kontakt mit der Glasoberfläche des Stempelkissens.	59
Abbildung 4.24	Fluoreszenzexperiment an passiven Mikrokelchen zur visuellen Verifizierung der selektiven molekularen Detektionseigenschaften.	59
Abbildung 4.25	Demonstration mittels A μ CS realisierter biomolekularer Sensoren anhand der Detektion von 2,4-Dinitrophenol (DNP).	61
Abbildung 4.26	Konzeptionelle Demonstration der Einstellung von medikamentösen Antikörpern.	62
Abbildung 4.27	Spektrale Charakterisierung von Mikrokelchlaserspaaren.	64
Abbildung 4.28	Abhängigkeit des unfunktionalisierten Mikrokelchlaserspaars von der Temperatur des flüssigen Analyten.	65
Abbildung 4.29	Abhängigkeit der Modenpositionen eines unfunktionalisierten Mikrokelchlaserspaars von der Brechzahl des flüssigen Analyten.	65
Abbildung 4.30	Demonstration der Signalreferenzierung am Beispiel einer störungsbehafteten Streptavidindetektion.	67
Abbildung 4.31	Illustration der Oberflächenfunktionalisierung von Mikrokelchlaserspaaren mittels A μ CS.	68
Abbildung 4.32	REM-Aufnahmen eines beschichteten Mikrokelchlaserspaars.	68
Abbildung 4.33	Emission eines funktionalisierten Mikrokelchlaserspaars, eingelegt in PBS.	69
Abbildung 4.34	Demonstration des parallelen Auslesens und der wechselseitigen Referenzierung der einzelnen Mikrolasersignale im Rahmen eines biomolekularen Detektionsexperiments.	71
Abbildung 4.35	Detektion von Biomolekülen in unverdünntem Blutserum.	72
Abbildung 4.36	Zusammenfassende Darlegung der positiven Aspekte einer Oberflächenfunktionalisierung mittels Phospholipidintinten sowie der in dieser Arbeit erzielten chemischen und physikalischen Zusatzeffekte.	75
Abbildung 4.37	Breitbandige Einstellung der Arbeitswellenlänge von Biolasern durch Implementierung unterschiedlicher Laserfarbstoffe.	76
Abbildung 4.38	Paralleles spektrales Auslesen von vier Mikrokelchlasern.	77

Abbildung 5.1	Allgemeine schematische Darstellung der CVD-Polymerisation von funktionellem Poly(<i>p</i> -Xylylen) (PPX) nach dem Gorham-Verfahren.	82
Abbildung 5.2	Charakterisierung des Abscheidungsprofils der CVD-Polymerisation anhand von PPX-CHO.	84
Abbildung 5.3	Einfluss der PPX-Beschichtung auf die im Kelchresonator geführten WGMs.	85
Abbildung 5.4	Für PPX-PFP experimentell ermittelte BRIS in Abhängigkeit von der Schichtdicke.	86
Abbildung 5.5	Für PPX-PFP experimentell ermittelte schichtdickenabhängige Laserschwelle.	86
Abbildung 5.6	Experimentelle Analyse der Q -Faktoren.	87
Abbildung 5.7	BRIS von PPX-CHO.	88
Abbildung 5.8	Chemische Reaktionsschemata.	89
Abbildung 5.9	Visuelle Untersuchung der Funktionalisierungsprotokolle von PPX-CHO und PPX-PFP.	90
Abbildung 5.10	Anbindungsverhalten von PPX-CHO-beschichteten Mikrokelchen gegenüber Hydrazid-dPEG ₄ -Biotin.	92
Abbildung 5.11	Anbindungsverhalten von PPX-PFP-beschichteten Mikrokelchen gegenüber Amino-dPEG ₁₁ -Biotin.	93
Abbildung 5.12	Demonstration der biomolekularen Detektion von CRP.	94
Abbildung 5.13	Initiale Steigung der Modenverschiebung in Abhängigkeit von der CRP-Konzentration.	95
Abbildung 5.14	Plausibilitätstest zur Detektion von Exosomen über ausgewählte Hüllenproteine.	96
Abbildung 5.15	Demonstration der Erkennung von Brustkrebs anhand brustkrebspezifischer Exosomen.	97
Abbildung 5.16	Prinzipskizze des Lab-on-a-Chip.	98
Abbildung 5.17	Herstellung der Mikrokelchlaser- und der Mikrofluidikchips.	99
Abbildung 5.18	Verkapselung der Mikrokelchlaser zu einem mikrofluidischen Lab-on-a-Chip.	101
Abbildung 5.19	Fertiger Lab-on-a-Chip eingebaut im optischen Charakterisierungsaufbau.	101
Abbildung 5.20	Prinzipskizze des markerbasierten Lab-on-a-Chip.	102
Abbildung 5.21	Markerbasierter Lab-on-a-Chip.	103
Abbildung 5.22	Markerbasierte Detektion von Streptavidin.	105
Abbildung 5.23	Funktionsweise eines PM bestehend aus zwei WGM-Resonatoren kreisförmiger Geometrie.	107
Abbildung 5.24	PM bestehend aus zwei identischen PMMA-Scheibenlasern.	107
Abbildung 5.25	Charakterisierung der Modenverteilung eines PMs bestehend aus zwei PMMA-Scheibenlasern.	108
Abbildung 5.26	Monomodiges Lasing eines PMs in Wasser.	109
Abbildung 5.27	Erhöhung der BRIS durch Intensitätserhöhung des Lichtfeldes im Kopplungsspalt.	110

Abbildung 5.28	Zusammenfassende Darlegung der positiven Aspekte einer Oberflächenfunktionalisierung von Mikrokelchen mittels funktionellen PPXen sowie der in dieser Arbeit erzielten Zusatzeffekte.	112
Abbildung 6.1	Konzept des neuartigen Mikroresonators.	117
Abbildung 6.2	Fabrikationsprozesskette zur Herstellung von MMA:MAA-Mikroresonatoren.	118
Abbildung 6.3	Fertige MMA:MAA-Mikroresonatoren.	118
Abbildung 6.4	Oberflächenfunktionalisierung von MMA:MAA via EDC-Chemie.	119
Abbildung 6.5	Q-Faktoren von MMA:MAA-Resonatoren.	120
Abbildung 6.6	Lasingcharakteristik von R6G-dotierten MMA:MAA-Mikrolasern.	120
Abbildung 6.7	Lebensdauer und BRIS von R6G-dotierten MMA:MAA-Mikrolasern.	121
Abbildung 6.8	Plausibilitätsexperiment zur Erprobung der Oberflächenfunktionalisierung von MMA:MAA- Scheiben auf LOR-Sockeln per EDC-Chemie.	122

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Charakteristika von PPX-CHO und PPX-PFP in der Übersicht	83
Tabelle 2	Vergleich der einzelnen im Rahmen dieser Doktorarbeit realisierten Bauteilkonzepte	131

Danksagung

Die Biosensorik ist ein sehr interessantes, aber auch multidisziplinäres Forschungsgebiet. Mein Dank gilt deshalb den vielen Kollegen und Menschen, deren tatkräftige Unterstützung zum Erfolg dieser Doktorarbeit beigetragen hat.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Timo Mappes und Prof. Dr. Uli Lemmer für die sehr interessante Aufgabenstellung und die exzellente Betreuung. Vielen Dank für die Übernahme des Korreferats und Hauptreferats. Bei Timo möchte ich mich für die exzellente technische Betreuung, für das stets mir entgegengebrachte Vertrauen, seine Geduld und seine große Unterstützung zu allen Zeitpunkten meiner Doktorarbeit sehr herzlich bedanken. Bei Prof. Dr. Christian Koos und Dr. Sebastian Köber möchte ich mich herzlich für die Übernahme der Arbeitsgruppe nach Timos Weggang und die sehr gute Betreuung bedanken.

Ich bedanke mich bei dem Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT), der Karlsruhe School of Optics and Photonics (KSOP), dem Institut für Photonik und Quantenelektronik (IPQ) und dem Lichttechnischen Institut (LTI, KIT) für die finanzielle Unterstützung. Sehr herzlich bedanken möchte ich mich in diesem Zusammenhang bei Christian, Sebastian, Timo und Uli, die diese Finanzierungen ermöglicht hatten.

Für den Beisitz meiner mündlichen Prüfung möchte ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Olaf Dössel, Prof. Dr. Wilhelm Stork und Prof. Dr. Thomas Zwick bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich des Weiteren bei Prof. Dr. Harald Fuchs und Dr. Dr. Michael Hirtz für das mir entgegengebrachte große Verständnis in der finalen Phase meiner Promotion und während meiner längeren krankheitsbedingten Abwesenheit.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Heinz Kalt, der mich mit sehr großen Freiheiten ausgestattet in seinen Laboreinrichtungen arbeiten ließ.

Im Zuge der diversen Projekte dieser Doktorarbeit hatte ich das große Privileg mit Wissenschaftlern vieler verschiedener Forschungseinrichtungen eng zusammenzuarbeiten. Für die sehr produktive und kollegiale Zusammenarbeit möchte ich mich sehr herzlich bei ihnen bedanken. Im Einzelnen sind dies:

Dr. Falko Brinkmann, Prof. Dr. Harald Fuchs, Dr. Dr. Michael Hirtz, Dr. Thomas Laue und Dr. Sylwia Sekula-Neuner vom Institut für Nanotechnologie (INT, KIT), bzw. der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster, für die sehr erfolgreiche und freundschaftliche Begleitung der Projekte zu den phospholipidfunktionalisierten Sensorstrukturen.

Prof. Dr. Florence Bally, Dr. Xiaopei Deng, Dr. Christian Friedmann, Christoph Hussal und Prof. Dr. Jörg Lahann vom Institut für funktionale Grenzflächen (IFG, KIT), sowie von der Universität Michigan, für die sehr angenehme und freundliche Zusammenarbeit auf den Projekten zu den CVD-funktionalisierten Sensorstrukturen.

Jan Fischer, Dr. Tobias Grossmann, Prof. Dr. Heinz Kalt, Sarah Krämer und Tobias Siegle vom Institut für Angewandte Physik (APH, KIT) für die erfolgreiche und freundliche Zusammenarbeit in nahezu allen Projekten dieser Doktorarbeit.

Benjamin Richter, Prof. Dr. Martin Bastmeyer und Dr. Franco Weth vom Zoologischen Institut (Zoo, KIT) für ihre bereitwillige und freundliche Unterstützung bei den Konfokalmikroskopuntersuchungen.

PD Dr. Irina Nazarenko vom Universitätsklinikum Freiburg, bzw. vormals vom Institut für Toxikologie und Genetik (ITG, KIT), für die freundschaftliche und spannende Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Exosomenforschung.

Klaus Huska, Prof. Dr. Uli Lemmer, Dr. Yousef Nazirizadeh und Dr. Ziyao Wang vom Lichttechnischen Institut (LTI, KIT) für die interessante Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Biosensorik mit plasmonischen Gitterstrukturen und photonischen Kristallen.

PD Dr. Timo Mappes, PD Dr. Alexander Nesterov-Müller, Tobias Wienhold und Sentayehu Wondimu vom Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT, KIT) für die gute Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Biosensorik mit Mikrokelchen und plasmonischen Resonatorstrukturen.

Dr. Christoph Vannahme von Dänemarks Technischer Universität (DTU) für die MOVPE-Beschichtung meiner Abformwerkzeuge.

Dr. Sebastian Köber und Prof. Dr. Christian Koos vom Institut für Photonik und Quantenelektronik (IPQ, KIT), bzw. vom Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT, KIT), für die Betreuung verschiedener Projekte dieser Doktorarbeit.

Bei allen übrigen, nicht namentlich genannten Mitarbeitern und Koautoren, mit denen ich indirekt zusammengearbeitet habe.

Bei folgenden Kollegen möchte ich mich außerdem explizit für deren Unterstützung bedanken: Bei Andreas Bacher für seine stets große Hilfsbereitschaft und seinen nimmermüden Einsatz am Elektronenstrahlschreiber. Bei Giuseppe Papagno für seine gute Arbeit an der Wafersäge und dafür, dass er bei besonders dringenden Jobs stets zur Stelle war. Bei Stefan Hengsbach für seine vielen Hilfen im IMT-Reinraum. Bei Mario Süttsch und der gesamten LTI-Werkstatt für die stets sehr schnellen und guten Arbeiten. Bei Klaus Huska für seine stete Hilfsbereitschaft am LTI. Bei Heike Fornasier für ihre diversen Hilfen im IMT-Reinraum. Bei Marc Schneider und Alexander Kolew für die diversen großen und kleinen Hilfen in Sachen Heißprägen. Beim gesamten IMT-Reinraumteam für die vielen Unterstützungen.

Vielen Dank an meine Studenten Claudia Hößbacher, Shivakumar Hunagund, Thomas Istok, Johannes Kern, Jaehan Lee, Lin Lin, Mohamed Sabry Mohamed, Aashish Sharma, Faisal Ur Rehman und Paul Sonntag und für die kompetente Bearbeitung der diversen großen und kleinen Projekte im Rahmen meiner Doktorarbeit.

Bei meinen Mentoren Dr. Regine Frank, PD Dr. Timo Mappes und Dr. Franco Weth möchte ich mich für deren Betreuung im Rahmen des Doktorandenprogramms der KSOP bedanken.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen Lektoren Dr. Falko Brinkmann, Tobias Förtsch, Dr. Dr. Michael Hirtz, Christoph Hussal, Carolin Klusmann, Daria Kohler und Sarah Krämer, für das Gegenlesen meiner Dissertation und für die vielen hilfreichen Kommentare und Verbesserungsvorschläge. Vielen Dank an Jordyn Atwater, Dr. Sahar Rahmani und Sentayehu Wondimu für das Gegenlesen des englischsprachigen Teils der Dissertation.

Für das stets herzliche Arbeitsumfeld möchte ich mich bei meinen Bürokollegen Tobias Förtsch, Daria Kohler, Norbert Löffler, Dieter Rimpf, Mauno Schelb, Christoph Vannahme und Sentayehu Wondimu bedanken.

Mein Dank gilt außerdem allen nicht namentlich genannten Kollegen von APH, IFG, IMT, INT, IPQ und LTI für das sehr angenehme und fachlich kompetente Arbeitsumfeld und für die stets freundlichen Gesichter auf den Fluren.

A special thanks goes to Adrian, Bruce, Dave, Janick, Nicko, and Steve for their constant me(n)tal support. It is always great to listen to you guys.

Helmut, dir danke ich dafür, dass du in unser Leben getreten bist und für die „Nachtwache“ :-)) Vielen Dank auch an meine Tante Hilda Frank, die ihr Auto für die „Nachtwache“ zur Verfügung gestellt hatte.

Mutter, dir danke ich für deine kompromisslose Liebe und Unterstützung in all den Jahren.

Publikationen

Referierte Artikel in internationalen Zeitschriften

Bog, U., Bally-Le Gall, F., Hussal, C., Siegle, T., Kraemmer, S., Wienhold, T., Bräse, S., Kalt, H., Lahann, J., Mappes, T. & Koos, C. Surface functionalization of goblet-type microlasers with reactive poly(p-xylylenes) for biomolecular sensing applications. *Manuskript in Erstellung.*

Bally-Le Gall, F., **Bog, U.**, Cheng, K., Köber, S., Mappes, T., Koos, C. & Lahann, J. Solventless Adhesive Bonding at Room Temperature for facile Fabrication of Microfluidic Lab-on-a-Chips. *eingereicht.*

Wienhold, T., Kraemmer, S., Wondimu, S. F., Siegle, T., **Bog, U.**, Weinzierl, U., Schmidt, S., Becker, H., Kalt, H., Mappes, T., Köber, S. & Koos, C. All-Polymer Photonic Lab-on-a-Chip Based on Whispering-Gallery Mode Microgoblet Lasers. *Lab Chip* (2015). DOI:10.1039/C5LC00670H

Bog, U., Brinkmann, F., Wondimu, S. F., Wienhold, T., Kraemmer, S., Koos, C., Kalt, H., Hirtz, M., Fuchs, H., Köber, S. & Mappes, T. Densely Packed Microgoblet Laser Pairs for Cross-Referenced Biomolecular Detection. *Adv. Sci.* (2015), DOI: 10.1002/advs.201500066.

Bog, U., Brinkmann, F., Kalt, H., Koos, C., Mappes, T., Hirtz, M., Fuchs, H. & Köber, S. Large-Scale Parallel Surface Functionalization of Goblet-type Whispering Gallery Mode Microcavity Arrays for Biosensing Applications. *Small* **10**, 3863–3868 (2014).

Bog, U., Laue, T., Grossmann, T., Beck, T., Wienhold, T., Richter, B., Hirtz, M., Fuchs, H., Kalt, H. & Mappes, T. On-chip microlasers for biomolecular detection via highly localized deposition of a multifunctional phospholipid ink. *Lab Chip* **13**, 2701–2707 (2013).

Grossmann, T., Wienhold, T., **Bog, U.**, Beck, T., Friedmann, C., Kalt, H. & Mappes, T. Polymeric photonic molecule super-mode lasers on silicon. *Light Sci. Appl.*, **2**, e82–1–4 (2013).

Bog, U., Huska, K., Märkle, F., Nesterov-Müller, A., Lemmer, U. & Mappes, T. Design of plasmonic grating structures towards optimum signal discrimination for biosensing applications. *Opt. Express* **20**, 11357–11369 (2012). (Ausgewählte Publikation in: *Virt. J. Biomed. Opt.* **7**(7) (2012)).

Wang, Z., Hauss, J., Vannahme, C., **Bog, U.**, Klinkhammer, S., Zhao, D., Gerken, M., Mappes, T. & Lemmer, U. Nanograting transfer for light extraction in organic light-emitting devices. *Appl. Phys. Lett.* **98**, 143105–1–3 (2011).

Nazirizadeh, Y., **Bog, U.**, Sekula, S., Mappes, T., Lemmer, U. & Gerken, M. Low-cost label-free biosensors using photonic crystals embedded between crossed polarizers. *Optics Express* **18**, 19120–19128 (2010). (Ausgewählte Publikation in: *Virt. J. Biomed. Opt.*, **5**(13) (2010)).

Patente

Bog, U., Wienhold, T., Mappes, T., Abdel-Aliem, M. S. & Köber, S. Optisches Element und optisches Sensorsystem (Deutsches Patent DE102012110126 B3). (2012).

Wienhold, T., Bog, U., Köber, S., Wondimu, S. F. & Koos, C. Vollpolymere Kelchresonatoren (Deutsches Patent DE102014012981) (2014).

Artikel in SPIE-Konferenzbänden

Mappes, T., Vannahme, C., Klinkhammer, S., **Bog, U.**, Schelb, M., Grossmann, T., Hauser, M., Kalt, H. & Lemmer, U. Integrated photonic lab-on-chip systems for biomedical applications. Micro-Optics 2010, eingeladener Vortrag, Brüssel (Belgien), *Proc. SPIE 7716*, 77160R (2010).

Konferenzbeiträge

Bog, U., Brinkmann, F., Wondimu, S. F., Wienhold, T., Kraemmer, S., Koeber, S., Koos, C., Kalt, H., Mappes, T., Hirtz, M. & Fuchs H. Phospholipid-functionalized microgoblet lasers for biomolecular detection. *CLEO 2015*, San Jose (USA), (2015).

Grossmann, T., Wienhold, T., **Bog, U.**, Friedmann, C., Beck, T., Flatae, A. M., Wiegele, S., Mappes, T. & Kalt, H. Polymeric photonic-molecule lasers. *14th Conference on Physics of Light-Matter Coupling in Nanostructures*, Hersonissos (Griechenland) (2014).

Wiegele, S., Beck, T., Grossmann, T., Schmager, R., Fischer, J., Mai, M., Wienhold, T., **Bog, U.**, Friedmann, C., Mappes, T. & Kalt, H. Polymeric Whispering Gallery Mode Resonators for Biosensing Applications. *CLEO 2014*, San Jose (USA) (2014).

Köber, S., **Bog, U.**, Wienhold, T., Wondimu, S. F., Mappes, T., Brinkmann, F., Hirtz, M., Wiegele, S., Kalt, H. & Koos, C. Lasing goblet resonators – active microstructures for integrated biosensors. *DGAO 2014*, Karlsruhe (Deutschland), (2014).

Bally, F., Giselsbrecht, S., **Bog, U.**, Waterkotte, B., Nikolov, P. & Lahann, J. Design of bioactive surfaces via reactive CVD coatings: Multiple applications in bioanalytics and for new cell culture substrates. *European Polymer Congress – EPF 2013*, Pisa (Italien) (2013).

Mappes, T., Vannahme, C., Grossmann, T., Klinkhammer, S., Hauser, M., Beck, T., **Bog, U.**, Wienhold, T., Christiansen, M. B., Kristensen, A., Lemmer, U. & Kalt, H. On-Chip Lasers for Biophotonic Lab-on-a-Chip Applications. *III. International Symposium TOPICAL PROBLEMS OF BIOPHOTONICS*, St.-Petersburg – Nizhny Novgorod (Russland) (2011).

Mappes, T., Wienhold, T., **Bog, U.**, Vannahme, C., Christiansen, M. B., Kristensen, A., Liu, X., Klinkhammer, S., Lemmer, U., Grossmann, T., Beck, T. & Kalt, H. On-chip integrated lasers for biophotonic applications. *ISOT 2012*, Invited Talk, Paris (Frankreich), 2012, DOI 10.1109/ISOT.2012.6403224.

Mappes, T., Großmann, T., Wienhold, T., **Bog, U.**, Breithaupt, F., Brammer, M., Liu, X., Klinkhammer, S., Beck, T., Hirtz, M., Vannahme, C., Christiansen, M. B., Kristensen, A., Lemmer, U. & Kalt, H. Integrated Lasers for Polymer Based Lab-on-a-chip Systems. *CLEO 2012*, eingeladener Vortrag, San Jose (USA), 2012.

Vannahme, C., Klinkhammer, S., Schelb, M., **Bog, U.** & Mappes, T. Microfluidic Lab-on-chip Made of PMMA with Integrated Organic Lasers and Waveguides for Biophotonic Applications. *COMS*, Kopenhagen, Dänemark, 2009.