

Entwicklung von optischen Systemen für die kombinatorische Materialablagerung und die großflächige Detektion im Rahmen von Hochdurchsatzverfahren

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN (Dr.-Ing.)

bei der KIT-Fakultät für Maschinenbau des
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)
angenommene

DISSERTATION

von

M.Sc. Clemens von Bojničić-Kninski

Tag der mündlichen Prüfung 9. Februar 2018

Hauptreferent apl. Prof. Dr. Alexander Nesterov-Müller
Korreferent Prof. Dr. Martin Dienwiebel



Sofern nicht anders angegeben, ist dieses Werk unter einer Creative Commons Namensnennung – Nicht-kommerziell – Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0 International Lizenz (CC BY-NC-SA 4.0) lizenziert: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.de>



Except otherwise noted, this document is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License (CC BY-NC-SA 4.0): <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.en>

Entwicklung von optischen Systemen für die kombinatorische Materialablagerung und die großflächige Detektion im Rahmen von Hochdurchsatzverfahren

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN (Dr.-Ing.)

bei der KIT-Fakultät für Maschinenbau des
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)
angenommene

DISSERTATION

von

M.Sc. Clemens von Bojničić-Kninski

Tag der mündlichen Prüfung 9. Februar 2018

Hauptreferent apl. Prof. Dr. Alexander Nesterov-Müller
Korreferent Prof. Dr. Martin Dienwiebel

Kurzfassung

2,6 Milliarden €, so viel kostet heutzutage die Entwicklung eines erfolgreichen neuen Medikamentes durchschnittlich. Von der Entdeckung des Wirkstoffes bis zur Marktreife des Medikamentes können leicht 10 Jahre oder mehr vergehen. Arzneimittelhersteller haben deshalb ein großes Interesse, diese Kosten und den erforderlichen Zeitaufwand zu reduzieren. Neuartige Hochdurchsatzverfahren können dabei helfen, diese beiden Ziele zu erreichen.

Am Anfang einer Medikamentenentwicklung steht die Suche nach einem Wirkstoff, die Molekülauswahl. Hochdurchsatzverfahren ermöglichen, eine große Zahl von Experimenten in kurzer Zeit kostengünstig durchzuführen.

Bevor ein Hochdurchsatzverfahren überhaupt zum Einsatz kommen kann, stellen sich zunächst zwei Fragen: Wie kann eine große Zahl an Experimenten in möglichst kurzer Zeit durchgeführt werden und wie können die Ergebnisse dieser Experimente zeitnah ausgewertet werden?

Die Antwort auf die erste Frage liefert das in dieser Arbeit vorgestellte Verfahren des Selective Particle Transfer zur Erzeugung von ultra-hochdichten Molekülmustern. Hierbei werden Mikropartikel mit eingebetteten Molekülen aus ausgewählten Vertiefungen eines mikrostrukturierten Glas-Ausgangsträgers in die darunterliegenden Vertiefungen eines geeignet mikrostrukturierten Zielträgers transferiert. In einem laserinduzierten Vorwärtstransferprozess werden diese Partikel durch Ablation einer Goldschicht in den Vertiefungen des Ausgangsträgers thermisch in Richtung des Zielträgers ausgetrieben. Durch den Einsatz von mikrostrukturierten Substraten konnte eine Spotdichte erreicht werden, die deutlich über dem gegenwärtigen Stand der Technik vergleichbarer Methoden liegt. Die höchste in dieser Arbeit durch Selective Particle Transfer erreichte Spotdichte beträgt $1\,000\,000\text{ cm}^{-2}$.

Zur Beantwortung der zweiten Frage bietet sich die Auslese auf Basis der Fluoreszenz an. Zur großflächigen Detektion von fluoreszierenden Proben wurde ein optisches System entwickelt, das auf Erkenntnissen der erweiterten Makrofotografie beruht. Durch Vergrößerung des Abstandes zwischen Objektiv und Kamerakörper konnte eine deutlich höhere Auflösung im Vergleich zur konventionellen Fotografie erzielt werden. Als Modellprobe dienten fluoreszenzmarkierte Mikropartikel in den Vertiefungen eines mikrostrukturierten Glassubstrats. Partikel mit unterschiedlichen Monomeren wurden zu ihrer Unterscheidung mit verschiedenen Quantum Dots markiert. Zur Anregung von Quantum Dots wird im Gegensatz zu Fluorophoren nur eine einzige LED-Lichtquelle benötigt. Um die emittierte Fluoreszenz detektieren zu können, wurden Filter eingesetzt, die die Anregungswellenlängen blockieren. In dieser speziellen Konfiguration sind keine spezifischen Fluoreszenzfilter erforderlich. Es kann folglich ein großer spektraler Bereich von 475 nm bis 600 nm simultan detektiert werden. Durch Austausch der LED-Lichtquelle gegen eine UV-Lampe können Fluorophore sogar im Deep-UV Bereich angeregt werden. Das entwickelte System ist in der Lage, bei einer Auflösung von $5\text{ }\mu\text{m}$ eine Fläche von $9,2\text{ mm} \times 6,1\text{ mm}$ in einer einzigen Aufnahme zu erfassen und übertrifft damit herkömmliche Mikroskope um den Faktor 14.

Abstract

€2.6 billion, that's the average cost today of developing a successful new drug. From the discovery of the active ingredient to the marketability of the drug can easily pass 10 years or more. Therefore, pharmaceutical manufacturers have a great interest in reducing these costs and the time required. Novel high throughput techniques can help achieve these two goals.

At the beginning of a drug development is the search for an active ingredient, the molecule selection. High throughput screenings make it possible to cost-effectively carry out a large number of experiments in a short time.

Before a high-throughput screening can be used at all, two questions arise first: How can a large number of experiments be carried out in as short a time as possible, and how can the results of these experiments be evaluated in a timely manner?

The answer to the first question is provided by the method of the Selective Particle Transfer presented in this work for the generation of ultra-high-density molecular patterns. In this process microparticles with embedded molecules are transferred from selected wells of a microstructured glass donor slide into the underlying wells of a suitably microstructured target slide. In a laser-induced forward transfer process, these particles are driven off in the direction of the target slide by ablation of a gold layer in the wells of the donor slide. Through the use of microstructured substrates, a spot density could be achieved that is significantly above the current state of the art of comparable methods. The highest spot density achieved in this work by the Selective Particle Transfer is $1\,000\,000\text{ cm}^{-2}$.

To answer the second question, the selection on the basis of fluorescence offers. For the large-area detection of fluorescent samples, an optical system based on the findings of advanced macro-photography has been developed. By increasing the distance between the lens and the camera body, a significantly higher resolution compared to conventional photography could be achieved. As a model sample fluorescently labeled microparticles were used in the wells of a microstructured glass substrate. Particles with different monomers were labeled with different quantum dots to distinguish them. To stimulate quantum dots, in contrast to fluorophores, only a single LED light source is needed. In order to detect the emitted fluorescence, filters were used which block the excitation wavelengths. In this particular configuration, no specific fluorescence filters are required. Consequently, a large spectral range from 475 nm to 600 nm can be detected simultaneously. By replacing the LED light source with a UV lamp, fluorophores can be excited even in the deep UV range. The developed system is capable of capturing $9,2\text{ mm} \times 6,1\text{ mm}$ in a single shot at a resolution of $5\text{ }\mu\text{m}$, outperforming conventional microscopes by a factor of 14.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	xi
Tabellenverzeichnis	xiii
Nomenklatur	xv
1. Einleitung	1
1.1. Materialablagerung	1
1.1.1. Stand der Technik	2
1.1.2. Zielsetzung Materialablagerung	5
1.1.3. Schema Materialablagerung	5
1.2. Optische Auslese	7
1.2.1. Stand der Technik	7
1.2.2. Zielsetzung optisches System	9
1.2.3. Schema optisches System	10
1.3. Gliederung dieser Arbeit	13
2. Grundlagen	15
2.1. Selective Particle Transfer	15
2.1.1. Optik von Gauß-Strahlen	15
2.1.2. Laserinduzierte Ablation	17
2.1.3. Partikelbasierte Kupplung von Monomeren	18
2.2. Optisches System	19
2.2.1. Erweiterte Makrofotografie	19
2.2.2. Abbildungsfehler	21
2.2.3. Fluoreszenz	27
2.2.4. Aufnahmefehler	31
3. Materialien und Methoden	35
3.1. Glasstrukturen	35
3.2. Funktionalisierung	36
3.3. Funktionale Partikel	38
3.3.1. Polydisperse Partikel	38
3.3.2. Monodisperse Partikel	39
4. Systeme	41
4.1. Lasersystem	41
4.1.1. Aufbau	41
4.1.2. Software	46
4.1.3. Prozessentwicklung – Selective Particle Transfer	47
4.2. Optisches System	57
4.2.1. Aufbau	57

4.2.2.	Systementwicklung – Multispectral Widefield Fluorescent Microscope	58
4.2.3.	Software	66
5.	Ergebnisse	69
5.1.	Selective Particle Transfer	69
5.1.1.	Proof-of-principle Experimente	69
5.1.2.	Systemparameter	73
5.1.3.	Der Selective Particle Transfer bei Multilagenexperimenten	77
5.1.4.	Optische Markierungen	80
5.2.	Multispectral Widefield Fluorescence Microscope	82
5.2.1.	Proof-of-principle Experiment – 2 QDs	82
5.2.2.	Proof-of-principle Experiment – 4 QDs	86
5.2.3.	Proof-of-principle Experiment – Deep-UV	87
5.2.4.	Systemparameter	88
5.2.5.	Abbildungsfehler	94
5.2.6.	Nachträgliche Bildbearbeitung	96
5.2.7.	Vergleich mit Fluoreszenzscanner	99
6.	Diskussion	101
6.1.	Zusammenfassung	101
6.1.1.	Materialablagerung	101
6.1.2.	Optische Auslese	103
6.2.	Ausblick	105
6.2.1.	Selective Particle Transfer	105
6.2.2.	Optisches System	106
	Literaturverzeichnis	109
A.	Anhang	115
A.1.	Abschätzung der Schärfentiefe eines Mikroskopobjektivs	115
A.2.	Schlüsselkomponenten des Lasersystems	115
A.3.	Schlüsselkomponenten des optischen Systems	116
A.4.	Bremsweg von Mikropartikeln	117
A.5.	Syntheseprotokolle	118
A.5.1.	Suspension	119
A.5.2.	Proof-of-principle Experiment	120
A.5.3.	Einfluss der Laserstrahlung auf die Syntheseoberfläche – HA/FLAG-Synthese	121
A.5.4.	Einfluss der Laserstrahlung auf die Syntheseoberfläche – Direkte Beleuchtung	122
	Publikationsliste	123
	Danksagung	125

Abbildungsverzeichnis

1.1. Schematische Darstellung eines Peptidarrays	2
1.2. LIFT-DRL	3
1.3. Schema des für die Materialablagerung entwickelten Selective Laser Transfer	6
1.4. Maßstäblicher Vergleich zweier Bildgebungssensoren	10
1.5. Schema der für das optische System genutzten erweiterten Makrofotografie	11
2.1. Gauß-Strahlen mit $M^2 = 1$ und $M^2 > 1$	16
2.2. Fehlerfunktion $\text{erf}(x)$ und deren Ableitung $\frac{d}{dx} \text{erf}(x)$	17
2.3. Verwendete Monomere	18
2.4. Partikelbasierte Kupplung von Monomeren	19
2.5. Abbildungsmaßstäbe in der Fotografie	20
2.6. Chromatische Aberrationen	22
2.7. Sphärische Aberration	23
2.8. Koma	24
2.9. Astigmatismus	25
2.10. Bildfeldwölbung	25
2.11. Verzeichnung	26
2.12. Jabłoński-Schema	27
2.13. Zusammenhang zwischen Bänderbreite und Emissionsspektrum	29
2.14. Anregungs- und Emissionsspektren von Fluorophoren und Quantum Dots	30
2.15. Rauschen in der digitalen Bildgebung	32
2.16. Vignettierung	33
2.17. Nachträgliche Bildbearbeitung	34
3.1. Glasstrukturen	36
3.2. Funktionalisierung	37
3.3. Funktionale Partikel	38
3.4. Polydisperse Partikel	39
3.5. Monodisperse Partikel	39
3.6. Herstellung der stochastischen Peptidarrays	40
4.1. Lasersystem	42
4.2. Laser und Filterrad	43
4.3. Einkopplung der Beleuchtung	43
4.4. Fokuskontrolle und Fokussiereinheit	44
4.5. Probenhalterung	45
4.6. Zu übertragendes Muster	46
4.7. Einflussfaktoren einer erfolgreichen Synthese von Peptiden	47
4.8. Transfermethoden	48
4.9. Vergleich tiefer (Aspektverhältnis $A > 1$) mit flachen ($A < 1$) Zielstrukturen	49
4.10. Befüllung der Ausgangsstrukturen	50
4.11. Suspension	51

4.12. Gefüllte Ausgangsstrukturen	51
4.13. Einfluss der Beschichtung auf den Transfer	52
4.14. Fokusvarianten	54
4.15. Auswirkungen des Sinterns der Partikel auf den Transfer	55
4.16. Vorbereitung der Ausgangsträger	56
4.17. Goldschicht während der Vorbereitung der Ausgangsträger	56
4.18. Optisches System	57
4.19. Spektrum der Beleuchtung	59
4.20. Auswirkungen der Beleuchtungsintensität auf die Qualität der Aufnahmen .	60
4.21. Winkel der Beleuchtung	61
4.22. Objektivauswahl	62
4.23. Objektivhalterung und Spektrum der Beleuchtung nach dem Langpassfilter	64
4.24. Spektren der Fluoreszenzfilter	65
4.25. Kamerahalterung	66
5.1. Proof-of-principle Experimente zum Selective Particle Transfer	70
5.2. Reproduzierbarkeit und Streuung	71
5.3. Auswertung der Fluoreszenz	73
5.4. Strahlradius $w(z)$ entlang der optischen Achse	73
5.5. Substratneigung	75
5.6. Prozesszeiten des Selective Particle Transfer	76
5.7. Multilagenexperiment	77
5.8. Einfluss der Laserstrahlung auf die Syntheseoberfläche	78
5.9. Gold auf Zielträger	79
5.10. Optische Markierungen – Spots	80
5.11. Optische Markierungen – Kreise	81
5.12. Optische Markierungen – Kodierte Daten	82
5.13. Proof-of-principle Experiment des optischen Systems mit zwei QDs	83
5.14. Prozessschritte zur Ermittlung des Ablagerungsmusters	84
5.15. Auswertung Belegung von zwei QDs	86
5.16. Proof-of-principle Experiment des optischen Systems mit vier QDs	87
5.17. Proof-of-principle Experiment des optischen Systems mit Deep-UV Anregung	87
5.18. Anregungs- und Emissionsspektrum des fluoreszierenden Chromophors. . .	88
5.19. Laterale Auflösung des optischen Systems	89
5.20. Punktpreiszfunktion des optischen Systems	90
5.21. Axiale Auflösung des optischen Systems	90
5.22. Abtastrate des optischen Systems	91
5.23. Gesichtsfeld des optischen Systems	91
5.24. Prozesszeiten des optischen Systems	92
5.25. Crosstalk Kompensation	94
5.26. Fokusebenen des optischen Systems	95
5.27. Verzeichnung des optischen Systems	96
5.28. Nachträgliche Bildbearbeitung – Korrektur der ungleichmäßigen Beleuchtung	97
5.29. Vignettierung des optischen Systems	98
5.30. Nachträgliche Bildbearbeitung – Rauschreduzierung	98
5.31. Vergleich des optischen Systems mit einem Fluoreszenzscanner	99
6.1. Ortsaufgelöste Spektrometrie mit dem optischen System	106

Tabellenverzeichnis

1.1. Vergleich der Methoden zur Materialablagerung	5
1.2. Vergleich der Methoden zur optischen Auslese	9
2.1. Abhängigkeiten der optischen Parameter bei der erweiterten Makrofotografie	21
4.1. Erfüllte Anforderungen an das Lasersystem	45
4.2. Gewählte Strukturkombinationen	49
4.3. Erfüllte Anforderungen an das optische System	67
5.1. Reproduzierbarkeit	71
5.2. Streuung	71
5.3. Ergebnisse der Strahlvermessung	74
5.4. Laserfluenzen bei unterschiedlichen Spotdichten	74
5.5. Substratneigung	75
5.6. Dekodierung von zwei Partikelsorten	85
5.7. Schnittweiten des optischen Systems zur Ermittlung des Farblängsfehlers . .	95
5.8. Vergleich des optischen Systems mit einem Fluoreszenzscanner	100
6.1. Evaluierung des Selective Particle Transfer	101
6.2. Der Selective Particle Transfer im Vergleich zum Stand der Technik	102
6.3. Evaluierung des optischen System	103
6.4. Vergleich der Methoden zur optischen Auslese	105
A.1. Parameter zur Abschätzung der Schärfentiefe T_{vis}	115
A.2. Schlüsselkomponenten des Lasersystems	115
A.3. Schlüsselkomponenten des optischen Systems	116
A.4. Parameter zur Bestimmung des Bremswegs	118
A.5. Berechneter Bremsweg für unterschiedliche Partikeldurchmesser	118
A.6. Genutzte Chemikalien	118

Nomenklatur

Lateinische Formelzeichen

A	m^2	Fläche
A_N	–	numerische Apertur
b	m	Bildweite
\mathbf{b}	–	Vektor des globalen Hintergrunds
B	m	Bildgröße
c_k	–	Korrelationsfaktor
C	–	Color-Spread Matrix
d	m	Durchmesser
d_{ax}	m	axiale Auflösung
d_{lat}	m	laterale Auflösung
$\text{erf}(x)$	–	Fehlerfunktion (engl. error function)
E	J	Energie
\mathbb{E}	–	Diagonalmatrix der Belichtungszeiten
f	m	Brennweite
F	N	Kraft
g	m	Gegenstandsweite
G	m	Gegenstandsgröße
I	W m^{-2}	Intensität
m	kg	Masse
M^2	–	Beugungsmaßzahl
$M_{\text{tot vis}}$	–	visuelle Gesamtvergrößerung
n	–	Brechungsindex
p	N m^{-2}	Druck
$\% (\text{m/m})$	–	Gewichtsprozent
$\% (\text{n/n})$	–	Molprozent
$\% (\text{v/v})$	–	Volumenprozent
S	m	Bremsweg (engl. stopping distance)
T	K	Temperatur
T_{vis}	m	visuell empfundene Schärfentiefe
v	–	Variationskoeffizient
v_0	m s^{-1}	Anfangsgeschwindigkeit
w	m	Strahlradius
x	m	laterale Position
\bar{x}_{arithm}	–	arithmetischer Mittelwert
\mathbf{x}	–	Vektor der wahren Intensitäten
\mathbf{X}	–	Liste der Mittelwerte
y	m	laterale Position
\mathbf{y}	–	Vektor der gemessenen Intensitäten
\mathbf{Y}	–	Liste der Mediane
z	m	Ausbreitungsrichtung

z_R	m	Rayleighlänge
Z	–	Liste der Intensitäten leerer Vertiefungen

Griechische Formelzeichen

β	–	Abbildungsmaßstab
η_F	$\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$	dynamische Viskosität
Θ	grad	Divergenz
λ	m	Wellenlänge
π	–	Kreiszahl
ρ	g cm^{-3}	Dichte
σ	–	Standardabweichung
τ	s	Zeit
Φ	J cm^{-2}	Fluenz
ω_0	m	Strahltaile

Besondere Zeichen

... ¹	Fußnote
... ^[1]	Eintrag im Literaturverzeichnis

Abkürzungen

a.u.	beliebige Einheit (engl. arbitrary unit)
A	Absorption
AFM	Rasterkraftmikroskopie (engl. atomic force microscope)
cLIFT	kombinatorischer laserinduzierter Vorwärtstransfer (engl. combinatorial laser-induced-forward-transfer)
DBSCAN	dichtebasierte räumliche Clusteranalyse mit Rauschen (engl. Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise)
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMD	digitales Mikrospiegelarray (engl. digital micromirror device)
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DPN	Dip-Pen Nanolithografie
D-RIE	reaktives Ionentiefenätzen (engl. deep reactive ion etching)
DRL	dynamische Trennschicht (engl. dynamic release layer)
ESA	Essigsäureanhydrid
F	Fluoreszenz
FAU	Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
Gly	Glycin
HA	Hämagglutinin
HTS	Hochdurchsatzverfahren (engl. High-Throughput Screening)
IC	Internal Conversion
IMT	Institut für Mikrostrukturtechnik
ISC	Intersystem Crossing
KIT	Karlsruher Institut für Technologie

KNMF	Karlsruhe Nano Micro Facility
KOH	Kalilauge
LED	Leuchtdiode
LIFT	laserinduzierter Vorwärtstransfer (engl. laser-induced-forward-transfer)
LM	Lichtmikroskop
LP	Langpassfilter
MeOH	Methanol
μ CP	Microcontact printing
MMA	Methylmethacrylat
Nd:YAG	Neodym-dotiertes Yttrium-Aluminium-Granat
NH ₂ -Gruppe	Aminogruppe
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
OD	optische Dichte
OH-Gruppe	Hydroxygruppe
OPfp	Pentafluorphenylester
P	Phosphoreszenz
PBS-T	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit TWEEN 20 0,05 % (v/v)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylenglycol
PEGMA	Poly(ethylenglycol)methacrylat
PMMA	Polymethylmethacrylat
PSF	Punktspreizfunktion (engl. point spread function)
QD	Quantum Dot
REM	Rasterelektronenmikroskop
S _{x,x}	Singulett-Zustand
SAM	selbstorganisierende Monoschicht (engl. self-assembled monolayer)
SBR	Signal-Hintergrund Verhältnis (engl. signal-to-background ratio)
SNR	Signal-Rausch Verhältnis (engl. signal-to-noise ratio)
SPT	Selective Particle Transfer
STED	Stimulated Emission Depletion
T _{x,x}	Triplet-Zustand
TFA	Trifluoressigsäure
TIBS	Triisobutylsilan
tiff	Tagged Image File Format
ToF-SIMS	Sekundärionenmassenspektrometrie (engl. Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry)
TWEEN 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
VR	Vibronische Relaxation

1. Einleitung

Viele Tests in kurzer Zeit durchzuführen – das ist das Ziel von Hochdurchsatzverfahren. Bei der Medikamentenentwicklung steht die Pharmaindustrie vor der Herausforderung, aus einer Vielzahl von möglichen Wirkstoffmolekülen diejenigen herauszufiltern, die eine pharmazeutische Wirkung zeigen. Die Anzahl möglicher Wirkstoffmoleküle liegt allein bei Peptiden – kurzkettigen Proteinen – bei mehr als 10 Billionen¹. Als erster von acht Schritten der Medikamentenentwicklung² stellt die Molekülauswahl die Basis aller folgenden Anstrengungen dar. Die gefundenen Moleküle werden dann den weiteren Prozessschritten zugeführt. Stellt sich in einem der späteren Schritte jedoch heraus, dass keines der Moleküle die gewünschte Wirkung zeigt, muss die Suche von Neuem beginnen. Diese Iterationsschleifen kosten Geld und Zeit, was sich in Entwicklungskosten von durchschnittlich 2,6 Mrd. € und einem Entwicklungsaufwand von 10-15 Jahren widerspiegelt^[1]. Die Minimierung dieser Neustarts ist daher eines der Ziele im Kreislauf der pharmazeutischen Wirkstoffsuche.

Mithilfe von Hochdurchsatzverfahren, die eine immer größer werdende Vielfalt ermöglichen, wird dieses Problem angegangen. Hochdurchsatzverfahren setzen sich dabei aus zwei Teilen zusammen. Zum einen aus der Bereitstellung von Methoden und Produkten zur Durchführung der Experimente und zum anderen aus Methoden, um die große Menge an anfallenden Daten aufzunehmen und zu analysieren.

Diese Arbeit behandelt beide Aspekte aus ingenieurwissenschaftlicher Sicht. Die Bereitstellung von Produkten beschreibt hierbei die Synthese von möglichst vielen Molekülen auf einer begrenzten Fläche, zusammengefasst unter dem Begriff der mikrostrukturierten **Materialablagerung**. Bei der Aufnahme und Analyse der experimentellen Daten beschränkt sich diese Arbeit auf die **bildgebende optische Auslese** im Arrayformat.

1.1. Materialablagerung

Je mehr Moleküle pro Experiment untersucht werden können, desto größer ist die Chance, ein passendes Molekül zu finden. Häufig sind die zu untersuchenden Moleküle fest an ein Trägersubstrat gebunden, wie beispielsweise bei Peptidarrays^[2]. Die angesprochenen Moleküle sind hier Peptide, eine Aneinanderreihung von Aminosäuren. Diese Peptide liegen in räumlich voneinander getrennten Bereichen, Spots genannt, auf dem Substrat vor. Im Vergleich zu Untersuchungen in Lösung bieten trägergebundene Moleküle den Vorteil der schnellen Auswertung, da bekannt ist, an welcher Position welches Molekül vorhanden ist. Dadurch entfallen zeitaufwendige Nachweisverfahren. Um möglichst viele unterschiedliche Peptide auf dem Substrat unterzubringen, sind die Spots rasterförmig angeordnet, wobei der Pitch, der Abstand zweier Spotmittelpunkte, die Dichte und somit die Gesamtanzahl

¹Bei Verwenden von 10-merigen Peptiden bestehend aus den 20 proteinogenen Aminosäuren beträgt die Vielfalt $20^{10} = 10\,240\,000\,000\,000$ Möglichkeiten

²Molekülauswahl – Evaluierung und Optimierung – präklinische Studien – klinische Studien – Auswertung der klinischen Studien – Zulassung – Produktion – Verkauf

bestimmt (s. Abb. 1.1). Die Gesamtheit aller auf dem Substrat befindlichen Peptide wird Bibliothek genannt.

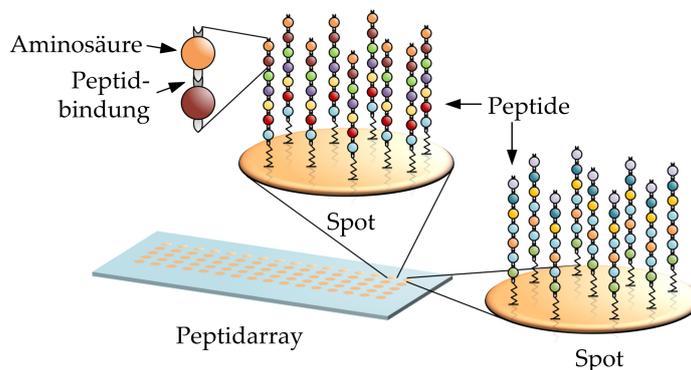


Abb. 1.1.: Schematische Darstellung eines Peptidarrays. In räumlich voneinander getrennten Bereichen, Spots genannt, liegen synthetisierte Peptide, bestehend aus aneinandergereihten Aminosäuren, auf einem festen Substrat vor.^[3]

1.1.1. Stand der Technik

Der Stand der Technik stellt eine Vielzahl von möglichen Technologien bereit, um eine Materialablagerung in Form von Spots zu ermöglichen. Unterschiede ergeben sich bezüglich der erreichbaren Spotdichte, des Zeitaufwands und der Kosten. Die Gesamtheit der Faktoren beschreibt die Anwendbarkeit der jeweiligen Technologie als Hochdurchsatzverfahren.

Im Folgenden werden unterschiedliche Methoden vorgestellt, geordnet nach deren maximal erreichbaren Spotdichte.

SPOT-Synthese

Bei der 1992 von Ronald Frank entwickelten und seitdem weit verbreiteten SPOT-Synthese werden einzelne Monomerbausteine, Aminosäurederivate, nacheinander auf eine funktionalisierte Trägermembran pipettiert, wo sie entsprechend der Festphasensynthese nach Merrifield chemisch binden^[4-6]. Durch Pipettieren unterschiedlicher Aminosäuren kann so Schicht für Schicht eine kombinatorische Peptidbibliothek synthetisiert werden^[7]. Das Auftragen der Tropfen wird dabei von Pipettierrobotern übernommen.

Die maximale Spotdichte der auf Basis der SPOT-Synthese kommerzialisierten Peptidarrays ist auf ca. 25 cm^{-2} beschränkt. Sofern die Dichte der einzelnen Spots weiter gesteigert wird, treten zwei Probleme auf. Höhere Dichten verlangen nach geringeren Pitches. Beim Pipettieren kann es dann vorkommen, dass benachbarte Spots ineinanderfließen, wodurch beide Spots unbrauchbar werden. Zudem müssten immer kleinere Volumina pipettiert werden, was eine schnellere Verdunstung zur Folge hat. Und je schneller die Tropfen verdunsten, desto schlechter fällt die Kupplungseffizienz aus. Von daher muss bei höheren Dichten mit schlechteren Ausbeuten gerechnet werden.

Xerografie

Werden die Monomerbausteine in einem festen Lösungsmittel eingebettet, lassen sich diese mithilfe eines auf 24 Druckwerke erweiterten Laserdruckers verdrucken^[8]. Hierzu werden

die Aminosäurederivate in Form von Tonerpartikeln bereitgestellt und auf einem Glassubstrat verdruckt. Um die Derivate an das Substrat zu koppeln, wird das Substrat nach dem Druckvorgang auf 90 °C erhitzt, wodurch die Partikel aufschmelzen. Durch die so ermöglichte Diffusion können die Aminosäuren an die zuvor chemisch funktionalisierte Oberfläche des Substrats koppeln. Ebenso wie bei der SPOT-Synthese kann durch wiederholtes Aufbringen unterschiedlicher Monomere eine kombinatorische Peptidbibliothek synthetisiert werden. Mit der von der PEPperPRINT GmbH im Jahr 2001 kommerzialisierten Methode können Peptidarrays mit einer Spottedichte von 800 cm⁻² hergestellt werden, jedoch kann diese Dichte aufgrund technologischer Grenzen des xerografischen Druckverfahrens nicht weiter erhöht werden.

LIFT

Unter Zuhilfenahme von Laserstrahlung kann Material ausgehend von einem Ausgangs- auf einen Zielträger übertragen werden. Die als laserinduzierter Vorwärtstransfer (engl. laser-induced-forward-transfer, kurz LIFT) bekannte Methode nutzt hierfür die lokale Hitzeeinwirkung einer fokussierten Laserquelle^[9,10]. Die oberflächliche Verdampfung des Materials im Laserfokus führt zu einem Übertrag auf den Zielträger. Die punktuelle Verdampfung im Laserfokus treibt das Material halbkugelförmig aus.

Metallpartikel können so im Arrayformat strukturiert werden^[11]. Empfindliche Materialien wie Zellen können mit der gewöhnlichen LIFT Methode nicht ohne Weiteres strukturiert werden, da die Laserstrahlung diese zerstören würde. Um Zellen oder andere hitzeempfindliche Materialien wie Polymere oder in Flüssigkeit gelöste Biomoleküle vor der Laserstrahlung zu schützen, wird eine Absorptionsschicht verwendet (s. Abb. 1.2). Diese dynamische Trennschicht (engl. dynamic release layer, kurz DRL) absorbiert einen Großteil der Laserstrahlung, verdampft daraufhin und treibt so das in diesem Bereich befindliche Material aus^[12-15].

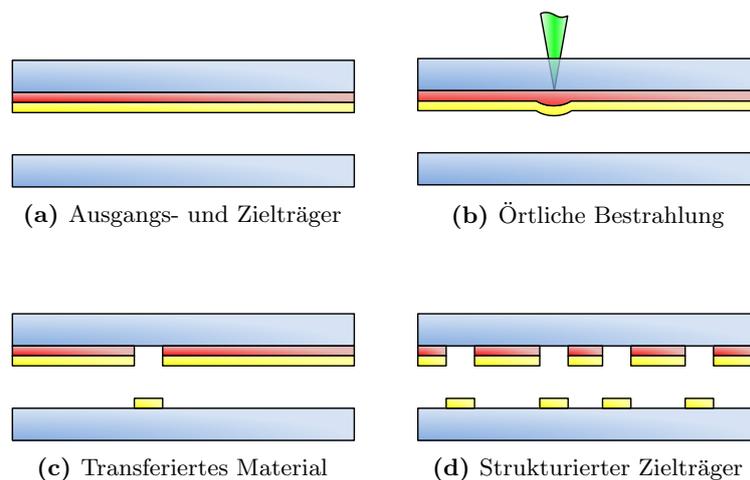


Abb. 1.2.: LIFT-DRL. Um einen Transfer zu ermöglichen, ist der Ausgangsträger mit einer Zwischenschicht (rot) versehen, die die Laserstrahlung absorbiert. Darauf ist das zu übertragende Material beschichtet (gelb) (a). Der Laser verdampft die Zwischenschicht örtlich, woraufhin diese das Material überträgt (b) & (c). Resultat ist ein strukturierter Zielträger (d).^[16]

Der LIFT-DRL stellt die Basis des in der Arbeitsgruppe Molekulare Suchmaschinen am Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT) entwickelten kombinatorischen laserinduzierter Vorwärtstransfers (engl. combinatorial LIFT, kurz cLIFT) dar^[17]. Hierbei werden nanometerdicke Schichten eines Polymers übertragen. Im Polymer sind Aminosäurederivate gelöst, die zur Synthese von Peptidarrays strukturiert werden. Der Vorteil dieser folienbasierten Herangehensweise im Vergleich zum gewöhnlichen LIFT ist die Tatsache, dass bereits belichtete Bereiche auf dem Ausgangsträger wiederholt für den Transfer genutzt werden können^[18].

Durch die Verwendung eines 2D-Scanningsystems zur gezielten Ablenkung des Laserstrahls können bis zu 300 Spots pro Sekunde bei einer Spotdichte von $1\,500\text{ cm}^{-2}$ erstellt werden.

Microcontact Printing

Beim Microcontact printing (μ CP) wird ein Stempel mit einer Tinte benetzt und anschließend analog zur makroskopischen Welt auf ein Substrat gepresst, wodurch die Tinte in Form des vorgegebenen Musters übertragen wird^[19].

Der Stempel wird dabei aus einem wiederverwendbaren lithografisch strukturierten Master gegossen und besteht aus einem Polymer, häufig Polymethylmethacrylat (PMMA), dem Fotolack SU-8 oder Polydimethylsiloxan (PDMS)^[20]. Das zu strukturierende Material ist in einer Flüssigkeit, der Tinte, gelöst. Die Tinte kann auch aus einer Suspension mit Nanopartikeln oder aus einer trockenen Monolage von Nanopartikeln bestehen^[21,22]. Im ersten Schritt wird der Stempel in die Tinte eingetaucht. Danach wird der benetzte Stempel mit einem Substrat in Kontakt gebracht, wodurch die Tinte übertragen wird. Nachdem der Stempel entfernt worden ist, verdunstet die Tinte, wobei das in der Tinte gelöste Material oder die Partikel auf dem Substrat verbleiben.

Die resultierenden Spots haben Dimensionen im Mikro- und Nanometermaßstab^[23]. Ein kombinatorischer Ansatz ist denkbar. Da die Herstellung der Stempel kostenintensiv ist, wird dieser Ansatz wirtschaftlich jedoch erst dann interessant, wenn viele Replikate desselben Musters benötigt werden.

Dip-Pen Nanolithografie

Eine weitere Methode zur Strukturierung von Material, in diesem Fall von in Flüssigkeit gelösten Molekülen, ist die Dip-Pen Nanolithografie (DPN)^[24]. Diese Methode nutzt Spitzen von Rasterkraftmikroskopen (engl. atomic force microscope, kurz AFM) für die serielle Manipulation der Moleküle. Die Flüssigkeit wird auf die AFM-Spitze aufgetragen und auf das Substrat übertragen. Diese Methode hat mehrere Anwendungsmöglichkeiten – das Aufbringen von selbstorganisierenden Monoschichten (engl. self-assembled monolayers, kurz SAMs), die Beseitigung vorhandener SAMs, die Substitution von 2 SAMs sowie die Modifikation von SAM Endtermini^[25]. Mithilfe dieser Methode konnten bereits Linienbreiten von 30 nm erstellt werden^[24].

Die Vorteile der DPN sind die Flexibilität und die bewährte Grundmethodik. Es können beliebige Muster generiert werden, und sie beruht weder auf der lokalen Erhitzung mithilfe eines Lasers, Stempeln oder anderen komplizierten Verarbeitungsmethoden. Jedoch sind der Durchsatz und die Ausdehnungen der Muster begrenzt. Da DPN eine serielle Methode ist, wird für das Schreiben von Mustern viel Zeit benötigt^[26]. Varianten der DPN wurden erfolgreich auf die Möglichkeit der Parallelisierung dieser Methode untersucht^[27].

1.1.2. Zielsetzung Materialablagerung

Die vorgestellten Technologien erlauben alle die strukturierte Materialablagerung auf einem Substrat. Unterschiede ergeben sich in Bezug auf die erreichbare Spotdichte der Muster, den Zeitaufwand zur Ausführung, die Kosten und der daraus resultierenden Anwendbarkeit als Hochdurchsatzverfahren (s. Tab. 1.1).

Tab. 1.1.: Vergleich der Methoden zur Materialablagerung, was die erreichbare Dichte, den Zeitaufwand, die Kosten und die Kompatibilität mit Hochdurchsatzverfahren (engl. High-Throughput Screening, kurz HTS) angeht.

Methode	Dichte	Zeitaufwand	Kosten	HTS-Komp.
SPOT	--	0	++	+
Xerografie	-	++	--	++
LIFT	0	+	0	++
µCP	++	-	-	0
DPN	++	--	-	--

Man kann somit eine Zweiteilung vornehmen – in Methoden, die hohe Dichten ermöglichen und in Methoden, die hochdurchsatzkompatibel sind. Dies macht deutlich, dass es derzeit keine Methode gibt, die schnell und kostengünstig hohe Dichten erreicht. Ziel dieser Arbeit ist es, eine Methode zu entwickeln, die diese Lücke schließt. Ausgangspunkt ist die Überlegung, die Vorteile der beiden Klassen zu vereinen. Sowohl die Xerografie als auch die laserbasierten Verfahren ermöglichen die schnelle Materialablagerung, wodurch sie gut für Hochdurchsatzverfahren geeignet sind. Sie verfügen jedoch nur über eine unzulängliche maximal erreichbare Spotdichte. Also waren unterschiedliche Strategien zur Erhöhung der Spotdichte zu entwickeln und zu evaluieren.

Es wurden folgende qualitative Anforderungen formuliert:

- Der Einsatz für Hochdurchsatzverfahren muss gegeben sein.
- Die Spotdichte muss gegenüber der xerografischen und den laserbasierten Methoden erhöht werden.
- Es soll ein LIFT-basierter Prozess entwickelt werden, der keine kostenintensiven Bauelemente benötigt.
- Empfindliche Materialien sollen ebenfalls übertragbar sein.

1.1.3. Schema Materialablagerung

Als Grundprinzip soll der laserinduzierte Vorwärtstransfer genutzt werden, da dieser sich im Stand der Technik als vielversprechend zeigt, was die hochdichte Ablagerung von empfindlichen Materialien angeht. Demnach galt es, einen Prozess zu entwickeln und zu validieren, mit dem Material ausgehend von einem Ausgangsträger an definierte Positionen auf einen Zielträger transferiert werden kann. In nachfolgenden Schritten sollen die im Material enthaltenen Moleküle chemisch an den Zielträger binden, was voraussetzt, dass die Moleküle den Übertrag unbeschadet überstehen.

Um die Spotdichte gegenüber der xerografischen und den laserbasierten Methoden zu erhöhen, sollen anstelle von flachen Trägern mikrostrukturierte Träger verwendet werden. Der obenliegende Ausgangsträger enthält das zu strukturierende Material. Mithilfe eines Lasers soll das Material in die Vertiefungen des darunterliegenden Zielträgers transferiert werden (s. Abb. 1.3)^[28,29]. Das Material besteht aus Mikropartikeln, die Aminosäurederivate enthalten (s. Kap. 3.3.1). Durch den Einsatz von mikrostrukturierten Substraten ergeben sich drei Vorteile gegenüber flachen Substraten:

1. Das **Befüllen** gestaltet sich einfach – mithilfe eines fussselfreien Tuchs können die Partikel im trockenen Zustand in die Strukturen eingerieben werden^[30].
2. Durch die vorgegebene Geometrie der Strukturen beinhaltet jede Struktur ein **definiertes Volumen**. Beim Transfer werden folglich konstante Volumina übertragen, was sich positiv auf die Reproduzierbarkeit auswirkt.
3. Die Vertiefungen verhalten sich ähnlich wie ein Gewehrlauf, wodurch ein **gerichteter Transfer** ermöglicht wird. Das minimiert die Streuung der Partikel, was zum Erreichen hochdichter Spotmuster unerlässlich ist.

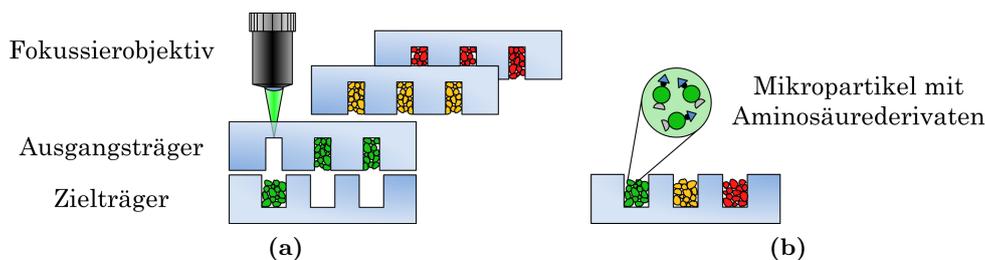


Abb. 1.3.: Schema des für die Materialablagerung entwickelten Selective Particle Transfer (SPT). (a) Zwei mikrostrukturierte Glassubstrate werden übereinander positioniert. Der obenliegende Ausgangsträger ist mit Mikropartikeln befüllt. Die Partikel beinhalten die zu strukturierenden Moleküle. Mithilfe eines fokussierten Laserstrahls werden die Mikropartikel aus ausgesuchten Vertiefungen in die Vertiefungen des darunterliegenden Zielträgers transferiert. (b) Durch Austauschen der Ausgangsträger kann so ein kombinatorisches Muster im Zielträger generiert werden.³

Die vorgestellten qualitativen Anforderungen konnten nun quantifiziert und erweitert werden:

- **Spotdichte** Mithilfe der mikrostrukturierten Substrate soll die Spotdichte auf bis zu $1\,000\,000\text{ cm}^{-2}$ gesteigert werden, was einem Pitch von $10\ \mu\text{m}$ entspricht.
- **Laserfokus** Aus dem Pitch ergibt sich die Anforderung an den Laserfokussdurchmesser, der folglich $<10\ \mu\text{m}$ sein muss.
- **Keine kostenintensiven Bauteile** Die aus der Literatur bekannten Laser haben Pulsdauern im Femtosekundenbereich und sechsstelligen Preise. Um Kosten einzusparen, soll geprüft werden, ob ein Nanosekundenlaser des bereits entwickelten Lasersystems für den Prozess ausreicht.

³Reproduced with permission.^[31] © 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

- **Transfer von empfindlichen Materialien** Inwieweit empfindliche Materialien unbeschadet übertragen werden können, hängt hauptsächlich vom dabei auftretenden Wärmeeintrag in das Material ab. Die Ausgangs- und Zielträger bestehen aus Quarzglas, das eine hohe Transmission für sichtbares Licht aufweist. Aus diesem Grund nutzt das Lasersystem einen Laser mit einer Wellenlänge von 532 nm, da hier lediglich wenige Prozent absorbiert werden, was den Wärmeeintrag in die Träger minimiert. Um die zum Transfer benötigten Intensitäten zu minimieren und die Mikropartikel vor der Laserstrahlung zu schützen, sollen unterschiedliche Absorptionsschichten getestet werden, die als dynamische Trennschicht fungieren.
- **Hochdurchsatz** Mit dem zu entwickelnden Prozess muss es möglich sein, eine Monomerschicht pro Arbeitstag strukturieren zu können, weil dann ein vollständiges Array je nach Länge der Monomerketten in 10 bis 15 Arbeitstagen fertiggestellt werden kann.

Damit waren die Spezifikationen des zu entwickelnden laserbasierten Prozesses definiert. Er wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit als **Selective Particle Transfer (SPT)** bezeichnet.

1.2. Optische Auslese

Mit den vorgestellten Methoden zur Materialablagerung können immer kleinere Muster generiert werden. Als Konsequenz steigen dadurch die Anforderungen an die Technologien, die diese Experimente effizient auslesen und analysieren können.

Dabei können unterschiedliche Strategien der Auslese verfolgt werden. Die erste und grundlegendste Strategie ist die Erzeugung von Ja/Nein-Aussagen – ist Material vorhanden oder nicht. Eine Stufe komplexer ist die Unterscheidung zwischen zwei oder mehreren Materialien. Die letzte Komplexitätsstufe beinhaltet die beiden ersten genannten plus eine quantitative Aussage, beispielsweise über die Intensität einer untersuchten Interaktion.

1.2.1. Stand der Technik

Diese Arbeit beschränkt sich auf die **bildgebende optische** Auslese von Merkmalen im Mikrometermaßstab. Der Stand der Technik liefert hierfür diverse Methoden, die auf der Mikroskopie, dem vergrößerten Betrachten kleiner Dinge, aufbauen. Für jede der drei genannten Strategien gibt es Technologien, die im Folgenden vorgestellt werden.

Lichtmikroskopie

Mithilfe der klassischen Lichtmikroskopie, bei der ein Objekt durch ein Linsensystem vergrößert dargestellt wird, können die ersten beiden Strategien verfolgt werden. Mögliche Anwendungen finden sich auch in den ersten Stufen der Medikamentenentwicklung, von der Molekülauswahl bis einschließlich der präklinischen Phasen. Bevor ein mögliches Medikament Tieren oder Menschen verabreicht werden darf, muss es auf seine Toxizität hin untersucht werden. Dies wird häufig *in vitro* an Zellen getestet^[32,33]. Ein Bestandteil dieser Untersuchungen stellt das Zählen der Zellen in einer Probe dar. Was für eine geringe Anzahl von Proben noch manuell durchgeführt werden kann, muss für viele Proben automatisiert verlaufen. Auf der Basis von Lichtmikroskopieaufnahmen kann dies von Algorithmen übernommen werden^[34–36]. Neben der Fragestellung, ob Zellen, beziehungsweise

Material vorhanden sind, können Lichtmikroskopaufnahmen auch für die Unterscheidung zwischen zwei oder mehreren Materialien genutzt werden^[37].

Entsprechend dem Beugungsverhalten von Licht, veröffentlicht im Jahre 1873 von Ernst Abbe, kann mit der Lichtmikroskopie theoretisch eine maximale Auflösung von ~ 200 nm erreicht werden^[38].

Fluoreszenzmikroskopie

In Lichtmikroskopen sind die kontrastarmen Zellen nur schwer zu sehen und können deshalb nur schwer automatisiert detektiert werden. Um den Kontrast zu erhöhen, können Fluorophore genutzt werden, um bestimmte Bestandteile von Zellen hervorzuheben^[39]. Durch die Bestrahlung mit kurzwelligem Licht werden die Fluorophore angeregt, langwelligeres Licht auszusenden. Mit optischen Filtern werden die kurzwelligen Bestandteile herausgefiltert, wodurch nur die Emission der Fluorophore detektiert wird. Je nach Auflösung kann zwischen der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie und der Super-Resolution-Mikroskopie unterschieden werden^[40].

Zu den konventionellen Methoden zählen die Großfeld-Fluoreszenzmikroskopie (engl. Widefield) und die konfokale Fluoreszenzmikroskopie. Der Unterschied besteht in der Art der Bildgebung. Während bei der Widefield-Mikroskopie eine Fläche abgebildet wird, muss das Bild bei der konfokalen Mikroskopie Punkt für Punkt abgerastert und per Software zusammengefügt werden^[41,42].

Im Gegensatz zur Lichtmikroskopie ist die Auflösung der Widefield-Mikroskopie nicht durch Beugung begrenzt und kann somit entsprechend des 1874 formulierten Rayleigh-Kriteriums die Abbe'sche Auflösungsgrenze unterschreiten. Ihre Auflösung wird von der Fluoreszenzwellenlänge und der numerischen Apertur des verwendeten Objektivs bestimmt und beträgt theoretisch ca. 130 nm^[43]. Unter Anwendung einer strukturierten Beleuchtung kann dies erreicht werden^[44]. Die gewöhnliche Licht-, Widefield- und konfokale Mikroskopien hingegen erreichen Auflösungen, die ca. 100 nm über diesem theoretischen Minimum liegen.

Eine deutliche Steigerung der Auflösung auf bis zu 30 nm ist mit den Methoden der Super-Resolution-Mikroskopie möglich. Durch das ortsgenaue Ein- und Ausschalten von Fluorophoren kann die Auflösung drastisch gesteigert werden. Bekanntestes Beispiel ist die 1994 postulierte, 2003 vorgestellte und 2014 mit dem Nobelpreis für Chemie prämierte Methode der Stimulated Emission Depletion (STED)^[45,46].

Mikroskopscanner

Die Vorteile der genannten Methoden liegen in der hohen Auflösung bis hin in den zweistelligen Nanometerbereich. Nachteile sind das kleine Gesichtsfeld von wenigen 100 μm Kantlänge und der durch die punktuelle Abtastung hohe Zeitaufwand zur Generierung des Bilds.

Sollen größere Flächen, beispielweise ein Objektträger oder eine Mikrotiterplatte erfasst werden, können kamerabasierte Scanningsysteme eingesetzt werden. Ein Widefield-Fluoreszenzmikroskop kann für diesen Zweck derart automatisiert werden, dass eine Probe durch die Aufnahme vieler überlappender Einzelbilder aufgenommen wird^[47]. Dabei kann von der hohen Auflösung des Mikroskops und der automatisierten Bildgebung profitiert werden, jedoch erfordert das nahtlose Aneinanderfügen von Hunderten von Aufnahmen viel Rechenleistung und Speicherkapazität.

Eine Alternative stellen Aufnahmesysteme dar, die eine große Fläche mit einer einzigen Aufnahme abdecken^[48]. Derartige Systeme erlauben die Detektion einer Fläche von $180\text{ mm} \times 130\text{ mm}$ bei einer Auflösung von ca. $80\text{ }\mu\text{m}$ mit einer einzigen Aufnahme.

Fluoreszenzscanner

Um die Auflösung gegenüber den Mikroskopscannern zu erhöhen, kann anstelle der gewöhnlichen Fluoreszenzmikroskopie die konfokale Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden. Kommerziell erhältliche Fluoreszenzscanner⁴ erreichen mit dieser Methode Auflösungen von bis zu $0,5\text{ }\mu\text{m}$. Da die konfokale Mikroskopie auf der pixelweisen Auslese beruht, ist der Zeitaufwand gegenüber den Mikroskopscannern deutlich erhöht.

1.2.2. Zielsetzung optisches System

Vergleicht man die Methoden des Stands der Technik, lässt sich analog zu den Methoden der Materialablagerung eine Zweiteilung erkennen (s. Tab. 1.2). Entweder ist die Auflösung der Systeme hoch oder ihre Kompatibilität mit Hochdurchsatzverfahren. Diese Kompatibilität setzt sich hierbei aus den Faktoren Auflösung, Zeitaufwand und Kosten zusammen.

Tab. 1.2.: Vergleich der Methoden zur optischen Auslese hinsichtlich Auflösung, Zeitaufwand, Kosten und Kompatibilität mit Hochdurchsatzverfahren.

Methoden	Auflösung	Zeitaufwand	Kosten	HTS-Komp.
Lichtmikroskopie	++	-	+	0
Fluoreszenzmikroskopie	++	--	--	0
Mikroskopscanner	-	+	+	+
Fluoreszenzscanner	+	0	-	+

Derzeit gibt es kein System, das die Vorteile beider Klassen vereint. Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines optischen Systems, das diese Lücke schließt. Das System soll in der Lage sein, die Fläche eines Objektträgers mit möglichst wenigen Aufnahmen abzudecken und gleichzeitig eine Auflösung von $<10\text{ }\mu\text{m}$ erreichen.

Folgende qualitative Anforderungen wurden definiert:

- Der Einsatz für Hochdurchsatzscreenings muss gegeben sein.
- Das Gesichtsfeld soll gegenüber der Licht- und Fluoreszenzmikroskopie vergrößert werden.
- Die Auflösung soll mindestens $10\text{ }\mu\text{m}$ betragen.
- Abbildungsfehler sollen minimiert werden.
- Es sollen mehrere Fluoreszenzkanäle verwendbar sein.
- Fluoreszenzkanäle sollen einfach und ohne große Investitionen nachrüstbar sein.

⁴InnoScan 1100 AL, Innopsys

1.2.3. Schema optisches System

Die Zielsetzung stellt sich folgendermaßen dar. Es soll ein optisches System entwickelt, aufgebaut und validiert werden, das die großflächige Detektion von Fluoreszenz ermöglicht und ein Objekt von der Größe eines Objektträgers durch möglichst wenige Einzelaufnahmen abgedeckt. Die Auflösung soll gegenüber den kommerziell verfügbaren Mikroskopscannern auf mindestens $10\ \mu\text{m}$ erhöht werden. Optiken und Bildgebungssensoren aus der Digitalfotografie sollen die Kosten niedrig halten. Zudem soll die Möglichkeit gegeben sein, eine Vielzahl von unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen zu untersuchen.

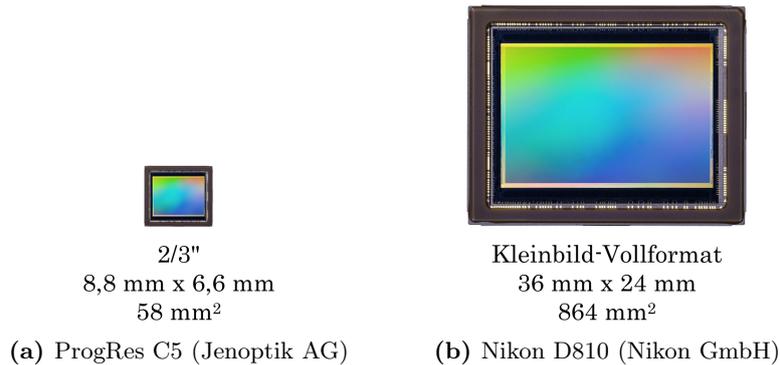


Abb. 1.4.: Maßstäblicher Vergleich zweier Bildgebungssensoren. (a) Industriekameras nutzen kleine Chips, um das korrigierte Gesichtsfeld von Mikroskopobjektiven zu erfassen. Abbildungsfehler verhindern ein größeres Gesichtsfeld. (b) Professionelle Digitalkameras nutzen deutlich größere Chips. Die dafür berechneten Objektive erlauben die Nutzung derartig großer und hochauflösender Chips.

Mikroskope nutzen meist Industriekameras mit kleinen Chips zur Erfassung von Bildern (beispielsweise ProgRes C5 (Jenoptik AG): 2/3" Chip, s. Abb. 1.4). Diese Chipgröße ist auf das korrigierte Gesichtsfeld der verwendeten Objektive abgestimmt. Mit einem 4-fach Objektiv kann so ein Gesichtsfeld von $4\ \text{mm}^2$ abgebildet werden. Um mit dieser Konfiguration eine größere zusammenhängende Fläche eines standardisierten Objektträgers (ca. $10\ \text{cm}^2$) zu erfassen, müssten 330 Aufnahmen erstellt werden. Daraus ergeben sich folgende Nachteile:

1. Die angesprochene Objektiv-Chip-Kombination eines Mikroskops hat eine **geringe Schärfentiefe**⁵ von ca. $130\ \mu\text{m}$ (s. Anhang A.1). Der Fokus des Mikroskops muss sich über der gesamten Fläche in diesem Bereich befinden, ansonsten müsste während der Messung nachfokussiert werden.
2. Bei 330 Aufnahmen entsteht ein **hoher Speicherbedarf**. Bei einer Bildgröße von 9 MB müssten so 3 GB Festplattenspeicher genutzt werden.
3. Um ein einheitliches, zusammenhängendes Bild zu erhalten, müssen die Aufnahmen später mit einer Software aneinandergesetzt werden. Der dazu notwendige **Rechenaufwand** steigt stark mit der Anzahl der Aufnahmen an.

In der professionellen Digitalfotografie geht der Trend zu immer größeren Chips (s. Abb. 1.4). Die dafür entwickelten Objektive erlauben zudem, diese großen und hochauflösenden

⁵Bereich entlang der optischen Achse, der scharf abgebildet wird.

Chips auszuleuchten. Gerade bei der Makrofotografie, der formatfüllenden Abbildung von handgroßen Gegenständen, können so feine Details aufgenommen werden.

Diese Vorteile sollen genutzt werden, um ein optisches System zu entwickeln, das auf Basis der erweiterten Makrofotografie Fluoreszenzaufnahmen einer Probe erstellt (s. Abb. 1.5). Filterräder sollen zwischen Objektiv und Kamerakörper montiert werden, um mehrere Fluoreszenzfilter in den Strahlengang einzuklappen. Als Kamera soll die zu Beginn dieser Arbeit aktuelle Nikon D810 verwendet werden. Ihr Kleinbild-Vollformat besitzt eine Auflösung von 36 Megapixel (7360×4912 Px).

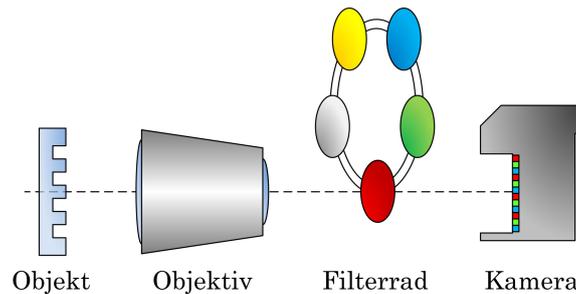


Abb. 1.5.: Schema der für das optische System genutzten erweiterten Makrofotografie. Durch den Abstand zwischen Objektiv und Kamera wird der Abbildungsmaßstab gegenüber der konventionellen Makrofotografie deutlich erhöht. In diesen Zwischenraum sollen Filterräder montiert werden, um unterschiedliche Emissionsfilter in den Strahlengang einzuklappen.

Die Modellprobe zur späteren Validierung setzt sich ebenfalls aus einem mikrostrukturierten Glassubstrat zusammen (s. Kap. 3.1). In die Vertiefungen werden Partikel mit einem Durchmesser von $10\ \mu\text{m}$ eingebracht, die die zu strukturierenden Monomere enthalten (s. Kap. 3.3.2). Zur Unterscheidung der Partikel sind sie mit Quantum Dots (QDs) gefärbt. Da gleichzeitig mehrere Partikelsorten stochastisch in die Vertiefungen eingebracht werden, muss das Ablagerungsmuster dekodiert werden.

Mit der festgelegten Methode der erweiterten Makrofotografie und der geplanten Anwendung konnten die qualitativen Anforderungen der Zielsetzung quantifiziert und erweitert werden:

- **Auflösung** Es sollen Mikropartikel mit einem Durchmesser von $10\ \mu\text{m}$ detektiert werden. Entsprechend dem Nyquist-Shannon-Abtasttheorem muss eine laterale Auflösung von $5\ \mu\text{m}$ erreicht werden^[49].
- **Gesichtsfeld** Setzt man eine Auflösung von $5\ \mu\text{m}$ voraus, ergibt sich mit der Pixelgröße der Nikon D810 ein Gesichtsfeld von $36\ \text{mm} \times 24\ \text{mm}$ ⁶. Es kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass ein derart großes Gesichtsfeld ohne Abbildungsfehler detektiert werden kann, da die Objektive nicht für diese Montageart berechnet sind. Aus diesem Grund wird ein Gesichtsfeld von $12\ \text{mm} \times 8\ \text{mm}$ gefordert.
- **Abbildungsfehler** Chromatische/sphärische Aberration, Koma, Astigmatismus, Bildfeldwölbung und Verzeichnungen (s. Kap. 2.2.1) wirken sich negativ auf die Auflösung und damit auf das zu nutzende Gesichtsfeld aus. Aus diesem Grund sollen Abbildungsfehler minimal gehalten werden. Da professionelle Makroobjektive verwendet werden und deren Daten nicht für Simulationen freigegeben sind,

⁶Pixelgröße der Nikon D810: $4,9\ \mu\text{m}$

soll dieser Anforderung durch Testreihen mit unterschiedlichen Objektiven begegnet werden.

- **Fluoreszenzkanäle** Bei dieser speziellen Methode der Bildgebung (großer Abstand zwischen Objektiv und Kamerakörper) sollen mehrere Filterräder eingesetzt werden, um unterschiedliche Fluoreszenzfilter in den Strahlengang einzubringen. Die Filterräder sollen für den Nutzer leicht zugänglich sein, um ohne Umbaumaßnahmen neue Filter einsetzen zu können. Insgesamt sollen mindestens fünf unterschiedliche Kanäle realisiert werden.
- **Arbeitsabstand** Mikroskope und Fluoreszenzscanner haben geringe Arbeitsabstände (Abstand zwischen Probe und Objektiv). Dadurch wird die Untersuchung hochbauender Proben wie beispielsweise Mikrofluidikkammern erschwert. Mithilfe der erweiterten Makrofotografie soll bei Einhaltung aller oben genannten Anforderungen ein Arbeitsabstand von mindestens 5 cm erreicht werden.
- **Anregung** Die Modellprobe ist mit QDs versehen, die alle bei einer Wellenlänge angeregt werden können (s. Kap. 2.2.3). Aus diesem Grund soll der Aufbau mit einer Lichtquelle auskommen. Deren Wellenlänge soll derart gewählt werden, dass möglichst viele Proben angeregt werden können und gleichzeitig viele Fluoreszenzkanäle realisierbar sind.
- **Hochdurchsatz** Mithilfe des Systems soll ein Objektträger in den geforderten fünf Fluoreszenzkanälen in weniger als 1 h erfasst werden können.

Nachdem die Spezifikationen für das zu entwickelnde System zur optischen Auslese definiert wurden, wird dieses im weiteren Verlauf dieser Arbeit als **optisches System** bezeichnet.

1.3. Gliederung dieser Arbeit

Die vorgelegte Arbeit gliedert sich in sechs Kapitel:

1. Einleitung Die Aufgabenstellung wird motiviert, der Stand der Technik vorgestellt und die entwickelten Lösungskonzepte präsentiert.

2. Grundlagen Entsprechend der zweigeteilten Arbeit werden die Grundlagen des SPT und des optischen Systems dargelegt. Diese gliedern sich in die Einführung in die Gauß'sche Strahlenoptik, die Mechanismen der Ablation und in die Merrifield Festphasensynthese. Bezüglich des optischen Systems werden die Grundgedanken und Funktionsweisen der erweiterten Makrofotografie, von Abbildungs- und Aufnahmefehler und der Fluoreszenz beschrieben.

3. Materialien und Methoden Um diese Arbeit durchführen zu können, wurde auf bereits entwickelte Techniken zurückgegriffen, wo möglich. Diese betreffen die genutzten Glasstrukturen, ihre Funktionalisierung sowie die funktionalen Mikropartikel.

4. Systeme Hier wird das genutzte Lasersystem für den SPT und das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte optische System vorgestellt. Beim SPT lag der Fokus auf der **Prozessentwicklung**. Für jeden Schritt wird die Aufgabe definiert, mögliche Lösungen präsentiert und evaluiert, bevor die gewählte Lösung vorgestellt wird. Beim optischen System lag der Fokus auf der **Systementwicklung**. Die bei der Prozessentwicklung genutzte Struktur aus Aufgabe, Lösungsmöglichkeiten und ausgewählter Lösung wird beim optischen System auf die einzelnen Baugruppen angewandt.

5. Ergebnisse Zur Validierung der gestellten Anforderungen wurden mit jedem System Experimente durchgeführt. Die Ergebnisse werden vorgestellt und evaluiert. Beim Lasersystem ist dies ein Proof-of-principle Experiment, bei dem Monomerpartikel ultrahochdicht abgelagert und gekuppelt wurden. Im Falle des optischen Systems werden die Systemparameter validiert sowie dessen Nutzen für Hochdurchsatzverfahren evaluiert.

6. Diskussion In der abschließenden Diskussion werden die gewonnen Ergebnisse zusammengefasst und die Systeme mit dem Stand der Technik verglichen. Ein Ausblick auf zukünftige Arbeiten zeigt die potentiellen Entwicklungsmöglichkeiten der beiden Systeme auf.

Anhang Die Schlüsselkomponenten der beiden Systeme werden tabellarisch aufgelistet. Um den Lesefluss nicht zu beeinträchtigen, werden die Abschätzungen zum Bremsweg von Mikropartikeln sowie der Schärfentiefe eines gewöhnlichen Mikroskops im Anhang erläutert. Zudem werden die genutzten Syntheseprotokolle zur Verfügung gestellt.

2. Grundlagen

Die für diese Arbeit notwendigen Grundlagen teilen sich wie die Einleitung auf den SPT und das optische System auf. Entsprechend der Zielsetzung des SPT werden die Grundlagen zur Optik von Gaußstrahlen, der laserinduzierten Ablation und zur angewandten Festphasensynthese nach Merrifield behandelt. In Bezug auf das optische System werden Themen zur erweiterten Makrofotografie, Abbildungsfehlern, der Fluoreszenz und zu Aufnahmefehlern in der digitalen Bildgebung vorgestellt.

2.1. Selective Particle Transfer

Entsprechend den abstrakten Anforderungen bezüglich der hohen zu erreichenden Spotdichte muss der Laserstrahl vermessen werden. Zudem fließt die Strahlgeometrie in die Steuerungssoftware ein. Aus diesen Gründen werden die Grundlagen der Optik von Gaußstrahlen behandelt, was die Strahlausbreitung, die maßgeblichen Formeln zur Beschreibung von Strahlparametern und deren Vermessung angeht.

Anschließend wird der Mechanismus hinter dem zugrunde liegenden LIFT Prozess, der Ablation, beschrieben.

2.1.1. Optik von Gauß-Strahlen

Laserlicht zeichnet sich durch seine Kohärenz aus. Die vom Laser ausgehende Strahlung ist kohärent, da die einzelnen Wellenpakete eine feste Phasenverschiebung zueinander haben und die gleiche Wellenlänge aufweisen.

Strahlausbreitung

Mathematisch lässt sich die Strahlausbreitung mithilfe eines Gauß-Strahls beschreiben^[50]. Der Verlauf des Strahlradius $w(z)$ entlang der Ausbreitungsrichtung z ist gegeben durch

$$w^2(z) = \omega_0^2 \left(1 + \frac{z^2}{z_R^2} \right) \quad (2.1)$$

wobei der engste Punkt des Strahlenbündels, die Strahltaile, mit ω_0 definiert ist (s. Abb. 2.1). z_R , die Rayleighlänge, beschreibt den Abstand von der Strahltaile, an dem sich die Fläche des Strahlquerschnitts verdoppelt hat und berechnet sich zu

$$z_R = \frac{\pi \omega_0^2}{\lambda} \quad (2.2)$$

Für $z \gg 0$ lässt sich $w(z)$ als eine Gerade approximieren, deren Winkel zur Strahlausbreitungsrichtung mit der Divergenz Θ bezeichnet wird

$$\Theta = \frac{2\omega_0}{z_R} \quad (2.3)$$

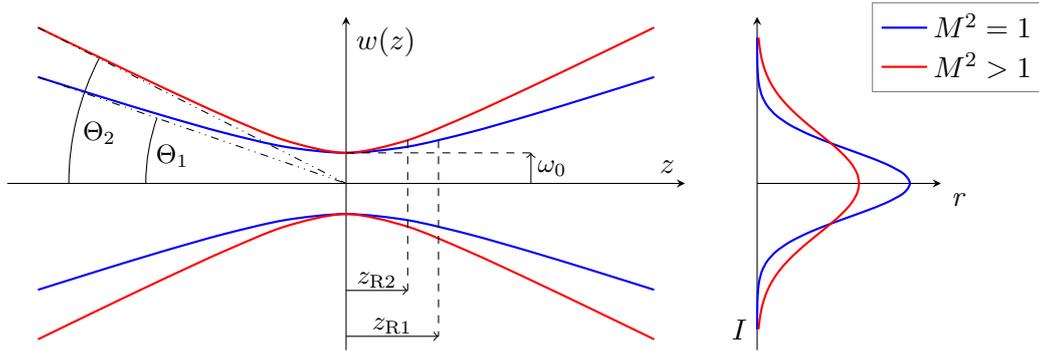


Abb. 2.1.: Axialer Verlauf des Strahlradius $w(z)$ eines idealen ($M^2 = 1$) und eines realen Gauß-Strahls ($M^2 > 1$). Bei gleicher Strahltaile besitzt ein idealer Gauß-Strahl eine geringere Divergenz als ein realer Gauß-Strahl. Rechts ist der Strahlquerschnitt bei $z \neq 0$ für beide Strahlen dargestellt.^[16]

Die Beschreibung mithilfe eines Gauß-Strahls ist ein mathematisches Ideal und nur in der Theorie zu erreichen. In der Praxis weicht die Strahlausbreitung von der eines Gauß-Strahls ab. Diese Abweichung wird durch die Beugungsmaßzahl M^2 beschrieben und setzt die Divergenz des realen Strahls mit der des idealen Strahls ins Verhältnis

$$M^2 = \frac{\Theta_{\text{real}}}{\Theta_{\text{ideal}}} \quad (2.4)$$

Je größer M^2 , desto mehr weicht ein Strahl vom Ideal ab. Bei einer Beugungsmaßzahl von $M^2 = 2$ entspricht die Strahltaile bei gleicher Wellenlänge dem doppelten Wert des idealen Gauß-Strahls. In der Praxis werden je nach Leistungsfähigkeit des Lasers Beugungsmaßzahlen bis zu 1,1 erreicht.

Fokusvermessung

Der Laserfokus wird nach ISO/TR 11146-3:2004 mithilfe der Methode der beweglichen Schneide ermittelt. Diese Methode wird genutzt, wenn der Laserfokusbereich zu klein für die direkte Bestimmung der ersten und zweiten Momente ist. Im Gegensatz zur direkten Abbildung des Laserfokus, bei der bei hinreichend kleinem Fokus nur wenige Pixel zur Auslese genutzt werden können, tragen bei dieser Methode alle Pixel zur Bestimmung bei.

Hierfür wird ein lichtundurchlässiges Metallplättchen schrittweise in den Strahlengang des Lasers gefahren. An jeder Schneidenposition x detektiert eine Kamera das auftreffende Laserlicht und summiert alle Pixelwerte auf. Schließlich wird die Gesamtintensität I über der Eindringtiefe x aufgetragen und mit einer Gauß'schen Fehlerfunktion approximiert:

$$I(x) = \text{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} dt \quad (2.5)$$

Um den Strahldurchmesser d_k zu bestimmen, werden die beiden Schneidenpositionen x_1 und x_2 ermittelt, an denen die Gesamtintensität auf 84 % respektive 16 % abgefallen ist (s. Abb. 2.2):

$$d_k = 2(x_2 - x_1) \quad (2.6)$$

Nach der in der Norm angegebenen Umrechnung

$$d_\sigma = d_k \cdot \frac{1}{\sqrt{M_k^2}} \left[c_k \cdot \left(\sqrt{M_k^2} - 1 \right) + 1 \right] \quad (2.7)$$

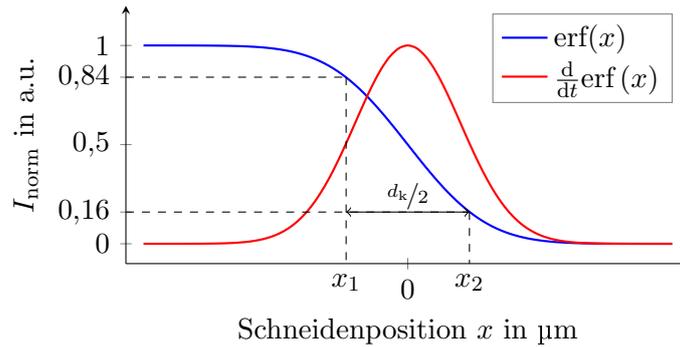


Abb. 2.2.: Fehlerfunktion $\text{erf}(x)$ und deren Ableitung $\frac{d}{dt}\text{erf}(x)$. Die über der Schneidenposition x aufgetragenen Intensitäten I können mit einer Gauß'schen Fehlerfunktion approximiert werden. Durch Bestimmen der Schneidenpositionen bei 84% und 16% lässt sich der Radius $d_k/2$ bestimmen.^[16]

und dem angegebenen Korrelationsfaktor $c_k = 0,81$ erhält man schlussendlich den gesuchten Strahldurchmesser d_σ . Dieses Vorgehen wird an mehreren Positionen z entlang der optischen Achse wiederholt, um den Strahlverlauf $w(z)$ abzubilden.

2.1.2. Laserinduzierte Ablation

Unter dem Begriff der Ablation versteht man einen Materialabtrag durch das Einbringen von Energie in ein festes Werkstück, bei dem Energie in Form von Laserstrahlung zugeführt wird.

Die Energie der Photonen des Lasers überträgt sich auf die Elektronen an der Oberfläche des Materials. Dadurch werden diese aufgeheizt und geben ihre Energie an das Elektronengitter (engl. lattice, kurz L) weiter. Nach einer Relaxationszeit von ca. $\tau_L = 1$ ps tritt eine Wärmeleitung in das umliegende Material ein^[51]. Bei Lasern mit Pulsdauern τ_P im Nanosekundenbereich ($\tau_P \gg \tau_L$) kommt es zu einem Wärmeeintrag in das umliegende Material. Durch die weitere Bestrahlung wird immer mehr Energie in das Material eingebracht, so dass dieses aufschmilzt und schließlich verdampft. Der Energieeintrag kann dabei so groß werden, dass es zu einer Dampfexplosion kommt, bei der das aufgeschmolzene Material ausgeworfen und so abgetragen wird^[52].

Im Gegensatz dazu führen Laserpulse im Femtosekundenbereich zu keinem Wärmeeintrag in das Material. Mit Pulsdauern, die kleiner sind als die Relaxationszeit des Elektronengitters ($\tau_P \ll \tau_L$), kann die Wechselwirkung zwischen Elektronen und Gitter vernachlässigt werden, das heißt, nur die direkt belichteten Elektronen erfahren einen Temperaturanstieg. Die durch den Temperaturanstieg initiierten Schwingungen können diese Elektronen dann aus dem Atomverbund Herausschleudern. Die Verdampfung des Materials führt hier direkt zum Materialabtrag.

Zum Einsatz kommt die Ablation in der industriellen Materialbearbeitung, der Medizintechnik und der Halbleiterfertigung. Mithilfe der Ablation lassen sich Bohrungen mit einem hohen Aspektverhältnis (Verhältnis aus Tiefe und Durchmesser) fertigen, wobei auch spröde Materialien bearbeitet werden können. In der Medizintechnik kommt die Ablation beim Abtrag von menschlichem Gewebe zum Einsatz, und in der Halbleiterfertigung werden damit Verunreinigungen berührungslos von Wafern entfernt. Die Vorteile gegenüber zerspanenden Methoden liegen in der berührungsfreien Fertigung und im geringen Wärmeeintrag in das Material, da nur die obersten Schichten erwärmt werden.

2.1.3. Partikelbasierte Kupplung von Monomeren

Die in den übertragenen Partikeln enthaltenen Monomere werden entsprechend der Festphasensynthese nach Merrifield an die funktionalisierte Oberfläche des Zielträgers gekuppelt^[6].

Sollen Aminosäuren übertragen werden, so müssen diese derivatisiert werden (s. Abb. 2.3a). Um die benötigte Aktivierungsenergie für die Kupplung zu reduzieren, ist die Carboxylgruppe mit einer Pentafluorphenylester Aktivierung (OPfp) versehen. Um zusätzlich ein Aneinanderreihen identischer Monomere zu verhindern, ist die Aminogruppe mit einer 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl Schutzgruppe (Fmoc) geschützt. Neben Aminosäurederivaten können auch andere Monomere wie beispielsweise das Vitamin Biotin genutzt werden (s. Abb. 2.3b). Um auch hier die Aktivierungsenergie zu reduzieren, ist das Biotin mit einer OPfp-Aktivierung versehen. Da Biotin keine natürliche Aminogruppe besitzt, ist hier keine Fmoc-Schutzgruppe erforderlich.

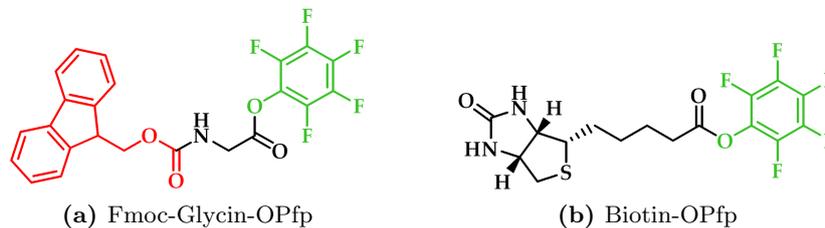


Abb. 2.3.: Verwendete Monomere. (a) Strukturformel des verwendeten Aminosäurederivats Fmoc-Glycin-OPfp. Die Fmoc-Schutzgruppe ist rot, die OPfp-Aktivierung grün dargestellt. (b) Strukturformel des verwendeten Vitamins Biotin-OPfp mit der grün hervorgehobenen OPfp-Aktivierung.

Nach der Übertragung der Partikel wird der Zielträger im Ofen unter einer Schutzgasatmosphäre aus Argon auf 90 °C erhitzt. In dem 90 minütigen Backen wird die Polymermatrix der Partikel über die Glasübergangstemperatur von $T_g = 347\text{ K}$ (74 °C)^[53] erhitzt, wodurch sie aufschmilzt. Die dadurch ermöglichte Diffusion der Monomere erlaubt die Kupplung derselben an die Oberfläche des funktionalisierten Zielträgers (s. Abb. 2.4b). In anschließenden Waschschritten wird die Polymermatrix mitsamt nicht gekuppelter Monomere entfernt. Freie Aminogruppen der funktionalisierten Oberfläche werden geblockt, bevor die Schutzgruppen der gekuppelten Monomere entfernt werden (s. Abb. 2.4c). Um die Monomere anschließend nachzuweisen, werden sie mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert (s. Abb. 2.4d). Im Falle einer übertragenen Aminosäure erfolgt dies über die freie Aminogruppe. Über eine kovalente Bindung kann ein fluoreszenzmarkierter *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) Ester angekuppelt werden. Steht keine freie Aminogruppe zur Verfügung, wie im Beispiel des gezeigten Vitamins Biotin, erfolgt der Nachweis über die nicht kovalente Interaktion mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin.

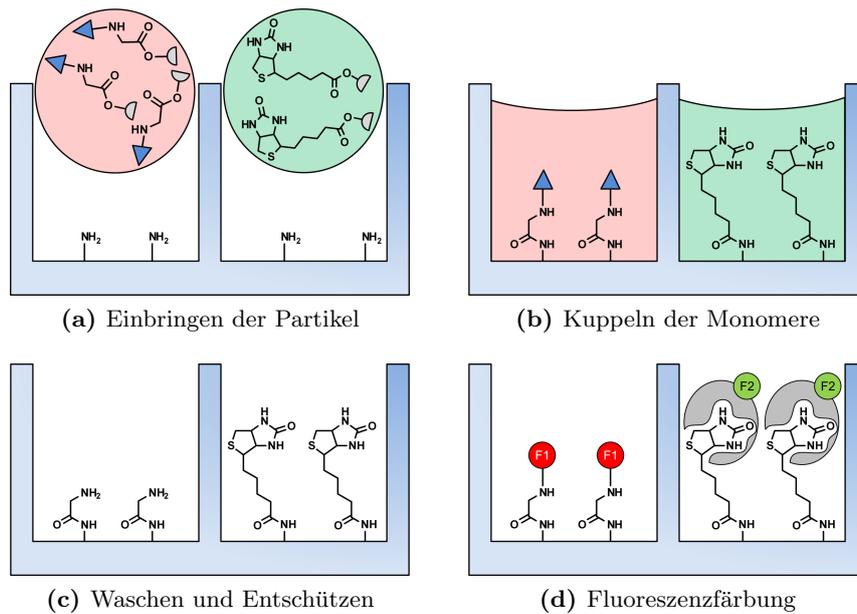


Abb. 2.4.: Partikelbasierte Kupplung von Monomeren. (a) Partikelübertrag. (b) Schmelzen der Partikel im Ofen initiiert die Kupplung der Monomere an die funktionalisierte Oberfläche des Zielträgers. (c) Waschen und Entschützen der Monomere. (d) Fluoreszenznachweis der gekoppelten Monomere durch die freie Aminogruppe (links) und Streptavidin (rechts). Blaues Dreieck: Fmoc-Schutzgruppe; grauer Halbkreis: OPfp-Aktivierung; F1, F2: Fluoreszenzfarbstoff 1 und 2.⁷

2.2. Optisches System

In diesem Abschnitt wird die optische Abbildung der erweiterten Makrofotografie diskutiert, sowie die unterschiedlichen Abbildungsfehler optischer Systeme vorgestellt. Im zweiten Teil werden die Eigenheiten der Fluoreszenz diskutiert, wobei zwischen Fluorophoren und QDs unterschieden wird. Der letzte Teil beschäftigt sich mit den zwei grundlegenden Aufnahme Fehlern der digitalen Bildgebung, dem Rauschen und der Vignettierung.

2.2.1. Erweiterte Makrofotografie

Eine der Aufgaben des zu entwickelnden optischen Systems ist die vergrößerte Darstellung eines Gegenstands. Entsprechend den spezifizierten Anforderungen sollen die Möglichkeiten der Makrofotografie untersucht werden.

Ausgangspunkt ist die gewöhnliche Makrofotografie (s. Abb. 2.5). Das Objektiv wird direkt an den Kamerakörper montiert. Mit dieser Konfiguration können Abbildungsmaßstäbe β (Verhältnis zwischen Bild- B und Gegenstandsgröße G) von 1:2 bis maximal 1:1 erzielt werden. Der Arbeitsabstand entspricht der in Datenblättern angegebenen Naheinstellgrenze und ist >30 cm.

Mithilfe eines Balgengeräts, das zwischen Objektiv und Kamerakörper montiert wird, sind größere Abbildungsmaßstäbe von bis zu 2:1 möglich. Der Balgen übernimmt die Aufgabe, das Objektiv und die Kamera auf der optischen Achse zu halten, sowie elektrische

⁷Reproduced with permission.^[31] © 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

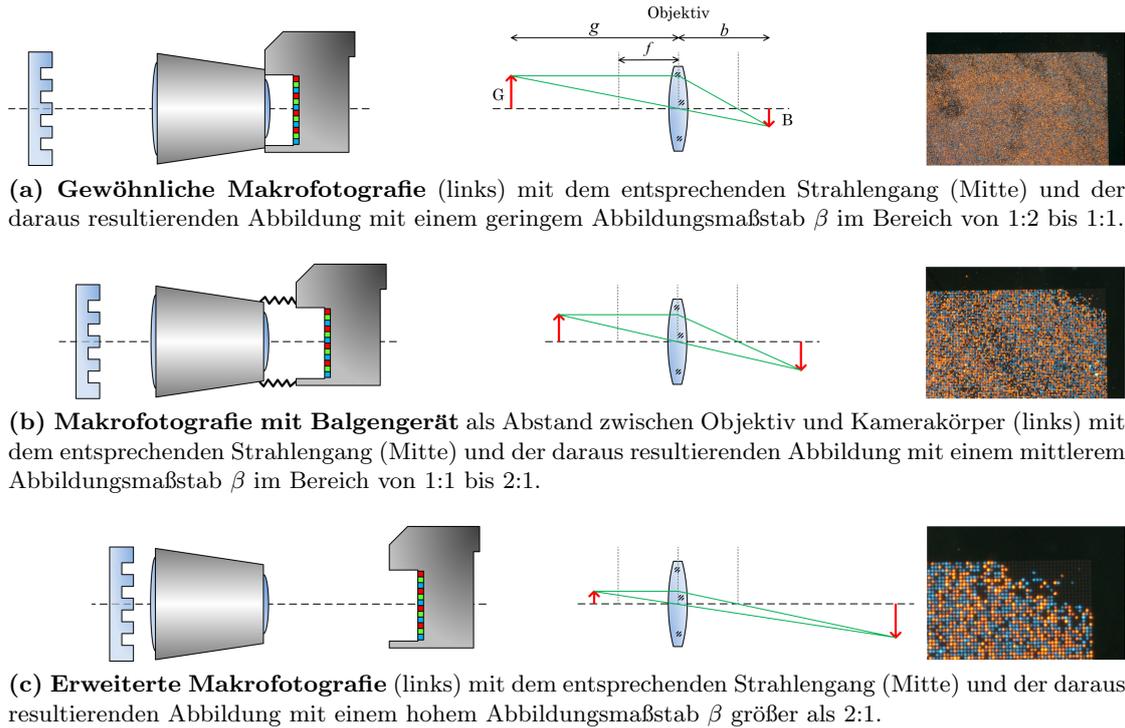


Abb. 2.5.: Abbildungsmaßstäbe in der Fotografie. Je nach Abstand zwischen Objektiv und Kamera können unterschiedliche Abbildungsmaßstäbe erzielt werden. Mit zunehmendem Abstand zwischen Objektiv und Kamera nimmt der Abbildungsmaßstab zu.

Signale von der Kamera zum Einstellen der Blende und Auslösen des Verschlusses an das Objektiv weiterzuleiten. Je größer der Abstand zwischen Objektiv und Kamera, Auszug genannt, desto größer ist der Abbildungsmaßstab. Kommerzielle Balgengeräte erlauben einen maximalen Auszug von 20 cm. Bereits bei diesem Auszug ist eine stabile Montage auf einem Stativ erforderlich, um scharfe Aufnahmen zu erhalten.

Um den Abbildungsmaßstab weiter zu erhöhen, muss der Auszug vergrößert werden. Durch die Montage von Objektiv und Kamera auf schwingungsarmen Portalen kann ein beliebiger Auszug erreicht werden. Hierbei muss jedoch ein dreifacher Kompromiss gefunden werden. Erstens beeinflusst ein großer Auszug die Ausmaße des Aufbaus. Zweitens nimmt mit zunehmendem Auszug der Arbeitsabstand ab. Und drittens muss beachtet werden, dass kommerzielle Makroobjektive nicht für derart große Auszüge berechnet sind und daher keine ausreichend gute Abbildung über das gesamte Gesichtsfeld erlauben. Inwiefern der Abbildungsmaßstab sowie weitere optische Parameter voneinander abhängen, ist in Tabelle 2.1 gezeigt. Diese Überlegungen fußen auf der Linsengleichung, die mithilfe der Strahlensätze aus der in Abbildung 2.5a (Mitte) gezeigten Anordnung ermittelt werden kann:

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{b} + \frac{1}{g} \quad (2.8)$$

Der Abbildungsmaßstab β wird durch das Verhältnis der Bild- und Gegenstandsweite, respektive der Bild- und Gegenstandsgröße gebildet:

$$\beta = \frac{b}{g} = \frac{B}{G} \quad (2.9)$$

Tab. 2.1.: Abhängigkeiten der optischen Parameter bei der erweiterten Makrofotografie. Bei fester Brennweite f des Objektivs verringert sich die Gegenstandsweite g mit zunehmender Bildweite b . Durch diese Veränderungen erhöht sich der Abbildungsmaßstab β auf Kosten des Gesichtsfelds.

Parameter	Formelzeichen	Veränderung
Gegenstandsweite	g	↓
Bildweite	b	↑
Abbildungsmaßstab	β	↑
Gesichtsfeld	–	↓

2.2.2. Abbildungsfehler

Abbildungsfehler, oder Aberrationen, werden als Abweichungen von der idealen geometrisch-optischen Abbildung definiert. In der idealen Optik werden paraxiale Strahlenbündel betrachtet, also nur Strahlen nahe der optischen Achse und Strahlen, die einen kleinen Winkel zur optischen Achse haben. Durch die Beschränkung auf paraxiale Strahlen vereinfacht sich die Berechnung, da die Winkelfunktionen mit dem Winkel selbst approximiert werden können. Zudem werden für den Durchgang eines Strahlenbündels durch das optische System nur Phänomene der Reflexion und der Brechung betrachtet. Beugung sowie nichtlineare Effekte werden ausgeschlossen. Sofern nicht erwähnt, wird auch nur eine Wellenlänge untersucht. In der Realität hingegen hat man auch mit Strahlen weitab der optischen Achse und Strahlen mit großen Winkeln zur selbigen zu tun. Diese Strahlen können Abbildungsfehler hervorrufen. Genauso wie Strahlen unterschiedlicher Wellenlängen, die gleichzeitig ein optisches System durchlaufen. Die daraus resultierenden Abbildungsfehler haben einen negativen Einfluss auf die mit dem optischen System zu erzielenden Aufnahmen.

Die Aberrationen werden zunächst physikalisch beschrieben, anschließend die Erscheinung erläutert und abschließend Maßnahmen vorgeschlagen, um die Aberration zu beheben.

Chromatische Aberrationen

Hängen die Abbildungsfehler von der verwendeten Wellenlänge ab, spricht man von chromatischen Aberrationen. Diese teilen sich in den Farblängs- und Farbquerfehler auf.

Farblängsfehler Da die Brechkraft einer Linse eine Funktion der Wellenlänge ist, treffen sich Strahlen unterschiedlicher Wellenlängen nach dem Durchlaufen der Linse nicht in einem gemeinsamen Brennpunkt, das heißt, verschiedene Wellenlängen besitzen unterschiedliche Brennweiten. Kurze Wellenlängen (blau) werden stärker gebrochen als lange (rot) (s. Abb. 2.6a). Da die Brennpunkte in unterschiedlichen Abständen auf der optischen Achse liegen, wird die chromatische Aberration auch als Farblängsfehler bezeichnet. Die Schnittweitendifferenz zwischen den Brennpunkten ist ein Maß für diesen Abbildungsfehler.

Erkennbar ist der Effekt an blauen und roten Farbrändern an Helligkeitsübergängen (s. Abb. 2.6c (oben)). Diese Farbränder treten überall im Bildfeld auf.

Durch die Kombination einer konvexen Linse und einer konkaven Linse kann der Effekt für zwei Wellenlängen korrigiert werden. Diese Linsenkombination wird als *Doublet* oder *Achromat* (griechisch für „ohne Farbe“) bezeichnet, da es die chromatische Aberration für zwei Wellenlängen korrigiert. Werden drei oder mehr Wellenlängen korrigiert, wird diese Linsenkombination als *Apochromat* (griechisch für „farblos“) bezeichnet. Sobald die chromatische Aberration für drei oder sogar mehr Wellenlängen korrigiert ist, kann der Fehler bei den verbleibenden Wellenlängen vernachlässigt werden.

Farbquerfehler Ähnlich wie beim Farblängsfehler liegt die Ursache des Farbquerfehlers in der Abhängigkeit der Brechkraft von der Wellenlänge. Achsferne und unter einem Winkel auf die Linse treffende Strahlen trennen sich entsprechend auf (s. Abb. 2.6b). Da die Aufteilung im Gegensatz zum Farblängsfehler quer zur optischen Achse erfolgt, spricht man hier vom Farbquerfehler. Auch wenn die Ursachen des Farblängs- und -querfehlers identisch sind, können sie unabhängig voneinander auftreten. Auch ein *Doublet* kann nach der Behebung des Farblängsfehlers immer noch einen Farbquerfehler besitzen.

Bemerkbar macht sich der Farbquerfehler bei Weitwinkelobjektiven durch Farbsäume um Helligkeitsübergänge im Randbereich des Gesichtsfeldes (s. Abb. 2.6c (unten)). In der Gesichtsfeldmitte ist der Fehler gering und somit kaum wahrnehmbar, da hier die eintreffenden Strahlen als paraxial angenommen werden können.

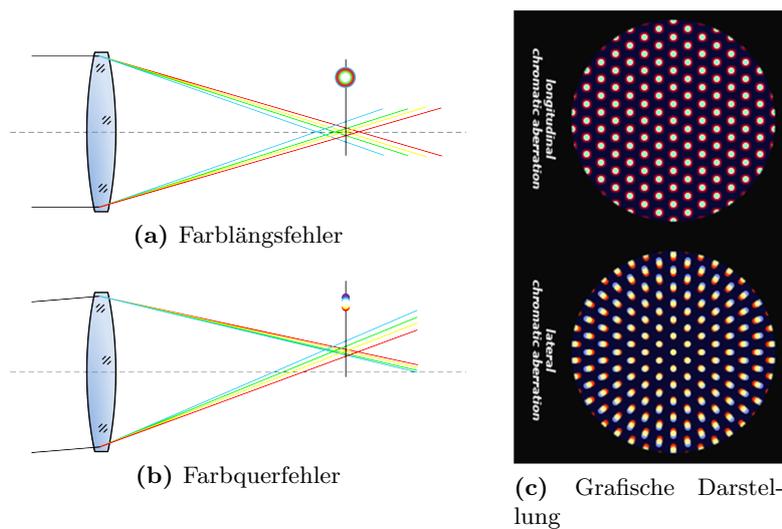


Abb. 2.6.: Chromatische Aberrationen. (a) Unterschiedliche Wellenlängen werden unterschiedlich stark gebrochen, was als Farblängsfehler bezeichnet wird. (b) Tritt kein Farblängsfehler auf, so kann immernoch der Farbquerfehler auftreten. Dabei wird ein einfallendes Strahlenbündel ebenfalls spektral aufgeweitet, jedoch hängt die Aufweitung jetzt vom Einfallswinkel ab. (c) Ein Farblängsfehler resultiert in Farbsäumen um helle Objekte im gesamten Gesichtsfeld. Beim Farbquerfehler beschränken sich die Farbsäume auf den Gesichtsfeldrand.⁸

⁸Farblängs- und Farbquerfehler (<http://www.handprint.com/ASTRO/IMG/seidel11.gif>) von Bruce MacEvoy, Creative Commons license CC BY-ND 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nd/3.0/>).

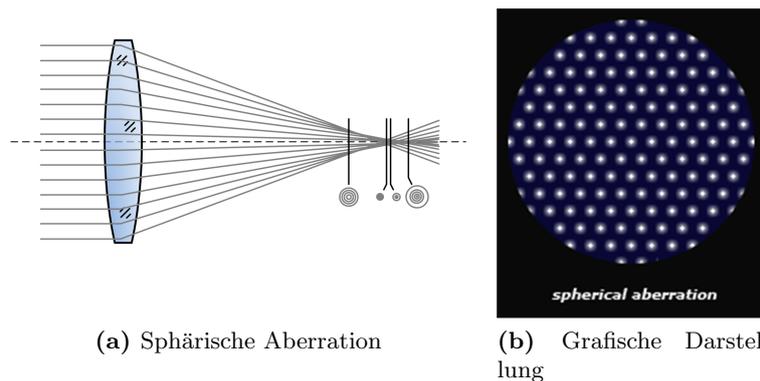
Ebenso wie der Farblängsfehler lässt sich der Farbquerfehler durch geschickte Kombination zweier Linsen aufheben. Werden für die beiden Linsen jeweils mindestens *Doublets* genutzt, kann der Farblängsfehler korrigiert werden.

Soll ein optisches System gänzlich frei von chromatischen Aberrationen sein, müssen anstelle von Linsen Spiegel eingesetzt werden, da das Reflexionsgesetz (Einfallswinkel = Ausfallswinkel) unabhängig von der Wellenlänge ist.

Monochromatische Aberrationen

Monochromatische Aberrationen treten sowohl bei der Verwendung von monochromatischem als auch polychromatischem Licht auf, sie sind demnach unabhängig von der verwendeten Wellenlänge.

Sphärische Aberration Die Brechkraft einer sphärischen Linse ist nicht nur eine Funktion der Wellenlänge, sondern auch eine Funktion der Einfallshöhe eines achsparallelen Strahls. Ähnlich wie beim Farblängsfehler ergeben sich dadurch unterschiedliche Schnittpunkte der gebrochenen Strahlen mit der optischen Achse. Je weiter der Strahl von der optischen Achse entfernt ist, desto stärker wird dieser gebrochen (s. Abb. 2.7a). Die Schnittweitedifferenz ist auch hier ein Maß für den Abbildungsfehler, die sphärische Aberration.



(a) Sphärische Aberration

(b) Grafische Darstellung

Abb. 2.7.: Sphärische Aberration. (a) Bei Linsen mit konstantem Krümmungsradius werden Strahlen mit unterschiedlichen Einfallshöhen unterschiedlich stark gebrochen. (b) Im Bild zeigt sich dieser Fehler als Unschärfefehler – es lässt sich kein optimaler Fokus erzielen.⁹

Tritt eine sphärische Aberration auf, so erscheint das Bild weichgezeichnet und dadurch nicht scharf (s. Abb. 2.7b). Der Effekt ist über die gesamte Bildfläche hin sichtbar.

Wie der Name besagt, ist der Fehler auf die Kugelgestalt von Linsen zurückzuführen. Dem kann auf drei Arten begegnet werden. Sofern keine anderen Linsen verfügbar sind, hilft ein Abblenden der Linse, wodurch nur noch achsnahe Strahlen durch die Linse abgebildet werden. Das verringert zwar die sphärische Aberration, geht aber auf Kosten der Auflösung. Andererseits können Linsen mit unterschiedlichen Krümmungsradien an Vorder- und Rückseite einer sphärischen Aberration vorbeugen (sog. Best-Form Linsen). Die dritte Möglichkeit ist die Verwendung von asphärischen Linsen. Diese mathematisch

⁹Sphärische Aberration (<http://www.handprint.com/ASTRO/IMG/seidel2a.gif>) von Bruce MacEvoy, Creative Commons license CC BY-ND 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nd/3.0/>).

optimierten Linsen mit variablem Krümmungsradius sind frei von einer sphärischen Aberration. Nachteil sind die hohen Herstellungskosten, da sie nicht wie sphärische Linsen geschliffen werden können. Zum Einsatz kommen asphärische Linsen in hochwertigen Linsensystemen.

Koma Die Koma lässt sich ebenfalls auf die Abhängigkeit der Brechkraft von der Einfallshöhe zurückführen. Im Gegensatz zur sphärischen Aberration, bei der achsparallele Strahlen herangezogen wurden, tritt die Koma bei Strahlen auf, die in einem Winkel auf die Linse treffen. Auch hier gilt, je weiter ein Strahl von der optischen Achse entfernt ist, desto stärker wird dieser gebrochen (s. Abb. 2.8a).

Zu erkennen ist die Koma an kometenschweifartigen Verschmierungen von hellen Bildelementen am Rand des Bildfeldes, woher auch der Name rührt (s. Abb. 2.8b). Je weiter ein Objekt am Rand liegt, desto ausgeprägter ist der Effekt.

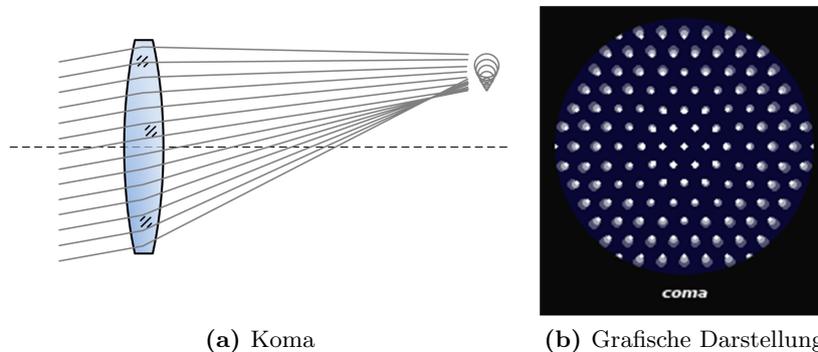


Abb. 2.8.: Koma. (a) Strahlen, die unter einem Winkel auf die Linse treffen, werden ebenfalls abhängig von ihrer Einfallshöhe unterschiedlich gebrochen. (b) Erkennbar ist dieses Phänomen dem Namen entsprechend an einem kometenartigen Schweif, der zum Bildfeldrand hin zunimmt.¹⁰

Ebenso wie bei der sphärischen Aberration kann Abblenden den Effekt verringern, da achsferne und unter hohem Winkel eintreffende Strahlen nicht mehr das System passieren. Doch bereits beim Design eines optischen Systems kann durch einen symmetrischen Aufbau mit mittiger Blende die Koma komplett beseitigt werden.

Astigmatismus Wenn die Krümmungsradien einer Linse längs und quer zu der Linse nicht identisch sind, können schräg eintreffende Strahlen nicht in einem Punkt fokussiert werden. So lässt sich erklären, dass der Brennpunkt bezüglich einer der beiden Hauptebenen, beispielsweise der Sagittalebene, weiter von der Linse entfernt ist als der Brennpunkt der Meridionalebene, die senkrecht auf der ersten steht (s. Abb. 2.9a).

Zu erkennen ist dieser Abbildungsfehler daran, dass kein Punkt gefunden werden kann, wo ein Objekt scharf abgebildet wird (s. Abb. 2.9b) Daher auch die Bezeichnung Astigmatismus, was übersetzt Punktlosigkeit bedeutet.

Weist ein optisches System einen Astigmatismus auf, so stellt dies gewöhnlich einen Rückgabegrund an den Hersteller dar. Abblenden hilft zwar, jedoch wird der Fehler auch

¹⁰Koma (<http://www.handprint.com/ASTRO/IMG/seidel2b.gif>) von Bruce MacEvoy, Creative Commons license CC BY-ND 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nd/3.0/>).

dann noch zum Rand hin erkennbar sein. Ein durchdachtes Design und geringe Fertigungstoleranzen können einem Astigmatismus vorbeugen.

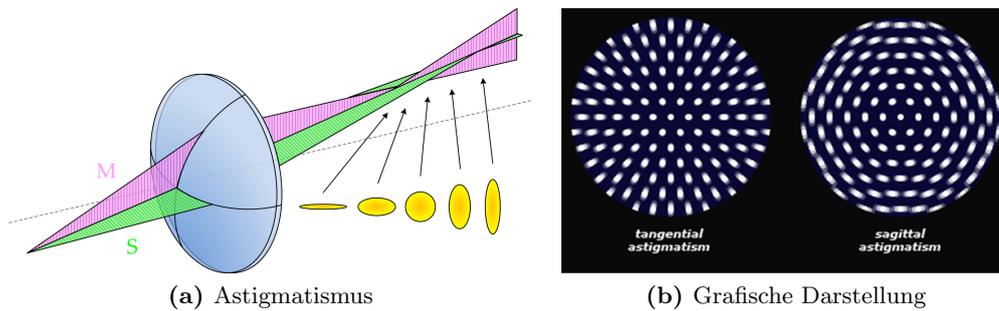


Abb. 2.9.: Astigmatismus. (a) Wenn sich die Krümmungsradien längs und quer zu der Linse aufgrund von Fertigungsfehlern unterscheiden, besitzen Strahlen folglich zwei unterschiedliche Brennpunkte. (b) In der Realität zeigt sich dieser Fehler als Punktlosigkeit, es kann kein optimaler Fokus gefunden werden. Zudem werden Punkte am Bildfeldrand in Form eines „+“-Zeichens verzogen.¹¹

Bildfeldwölbung Selbst wenn alle bisher genannten Bildfehler behoben sind, kann dennoch eine Bildfeldwölbung zurückbleiben. Dabei werden Strahlen nicht in einer senkrecht zur optischen Achse stehenden Brennebene vereint, sondern entlang einer gekrümmten Oberfläche (s. Abb. 2.10a,b).

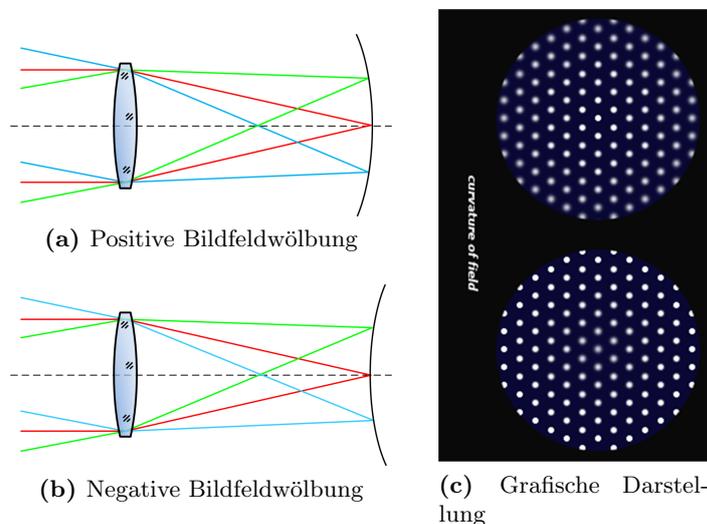


Abb. 2.10.: Bildfeldwölbung. Bei einer positiven Bildfeldwölbung ist die Brennfläche zur Linse hin gekrümmt (a), bei einer negativen Wölbung in die entgegengesetzte Richtung (b). (c) Optisch macht sich eine Bildfeldwölbung als Unschärfefehler bemerkbar, wobei je nach gewählter Fokusposition Objekte zum Bildfeldrand hin verschmiert erscheinen.¹²

¹¹Astigmatismus (<http://www.handprint.com/ASTRO/IMG/seidel3.gif>) von Bruce MacEvoy, Creative Commons license CC BY-ND 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nd/3.0/>).

¹²Bildfeldwölbung (<http://www.handprint.com/ASTRO/IMG/seidel5.gif>) von Bruce MacEvoy, Creative Commons license CC BY-ND 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nd/3.0/>).

Kamerachips sind meist planar¹³. Tritt eine Bildfeldwölbung auf, ist das Bild entweder in der Mitte scharf und zum Rand hin unscharf, oder umgekehrt, je nach Fokussierung (s. Abb. 2.10c). Zu unterscheiden ist die Bildfeldwölbung von der Koma durch die Abnahme der Schärfe zum Bildfeldrand, wohingegen bei der Koma ein scharfes Bild entsteht.

Sogenannte Planfeldoptiken weisen durch eine aufwendige Berechnung bei der Entwicklung der Objektive ein planares Bildfeld auf. Hochwertige Optiken sind mit diesem Prädikat gekennzeichnet.

Verzeichnung Idealerweise besitzt ein optisches System einen festen Abbildungsmaßstab. In der Realität kann der Abbildungsmaßstab jedoch mit zunehmender Einfallshöhe immer mehr vom paraxialen Abbildungsmaßstab abweichen.

Dieser als Verzeichnung bekannte Abbildungsfehler kann in zwei Formen in Erscheinung treten – nimmt der Abbildungsmaßstab mit zunehmender Einfallshöhe zu, ergibt sich eine kissenförmige, bei abnehmendem Abbildungsmaßstab eine tonnenförmige Verzeichnung (s. Abb. 2.11a,b). Linien werden dadurch als Bögen dargestellt. Im Gegensatz zur Bildfeldwölbung entsteht eine über das gesamte Gesichtsfeld scharfe Abbildung, lediglich die Geometrie des Bildes weicht vom Objekt ab.

Durch einen symmetrischen Aufbau eines Objektivs lässt sich die Verzeichnung vollständig vermeiden.

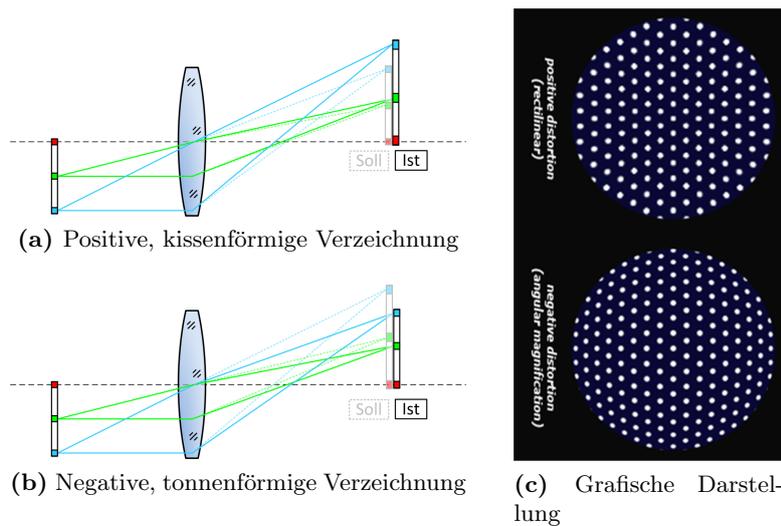


Abb. 2.11.: Verzeichnung. (a) Bei einer positiven Verzeichnung nimmt der Abbildungsmaßstab mit zunehmender Bildhöhe zu, das Objekt wird in die Länge gezogen. (b) Umgekehrt verhält es sich bei einer negativen Verzeichnung, bei der der Abbildungsmaßstab mit zunehmender Bildhöhe abnimmt. Das Objekt wird gestaucht. (c) Linien werden bei einer Verzeichnung als Kurven dargestellt. Im Falle der kissenförmigen Verzeichnung werden Linien in die Ecken gekrümmt. Bei einer tonnenförmigen Verzeichnung werden Linien zur Bildmitte hin verbogen.¹⁴

¹³Gekrümmte Kamerachips werden derzeit von einigen Herstellern getestet.

¹⁴Verzeichnung (<http://www.handprint.com/ASTRO/IMG/seidel4.gif>) von Bruce MacEvoy, Creative Commons license CC BY-ND 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nd/3.0/>).

Abbildungsfehler treten bis auf die sphärische Aberration in Mischformen auf. Durch geschickte Auswahl der optischen Materialien und die Komplexität des Aufbaus kann das Auftreten der Abbildungsfehler beeinflusst werden. Dabei muss ein Kompromiss aus Entwicklungsaufwand und dem Grad der auftretenden Fehler gefunden werden. Die Aufgabe von Optikdesignern liegt daher in der Minimierung der Abbildungsfehler bei Einhaltung der Anforderungen und gleichzeitigem minimalem Entwicklungsaufwand.

2.2.3. Fluoreszenz

Biologische Interaktionen können mithilfe von Fluoreszenz nachgewiesen werden. Als Untergruppe der Lumineszenz beschreibt die Fluoreszenz die spontane Emission von Licht nach einer Anregung. Unter der Anregung versteht man das Einbringen von Energie in Form von Photonen, wodurch Elektronen aus ihrem Grundzustand in einen energiehöheren Zustand gebracht werden. Von dort aus können sie auf unterschiedliche Arten relaxieren und in den Grundzustand zurückgehen. Die Wahrscheinlichkeiten der verschiedenen Relaxationswege werden mit dem Franck-Condon-Prinzip beschrieben. Ausgehend von den entsprechend der Hund'schen Regel¹⁵ und des Pauli-Prinzips¹⁶ besetzten Orbitalen können die unterschiedlichen Wege mithilfe des Jabłoński-Schemas illustriert werden (s. Abb. 2.12)^[54].

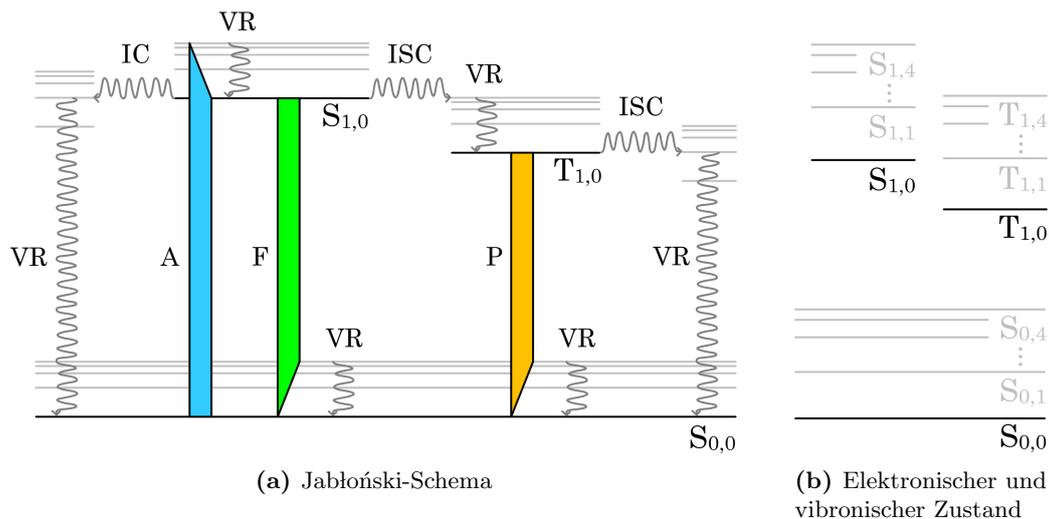


Abb. 2.12.: Jabłoński-Schema. Angeregte Elektronen können auf unterschiedlichen Wegen in den Grundzustand relaxieren – strahlungslos über vibronische Relaxation (VR), über die Aussendung eines Photons aus einem Singulett-Zustand S (Fluoreszenz F) oder über die Aussendung eines Photons aus einem Triplett-Zustand T (Phosphoreszenz P).¹⁷

A Absorption Durch eine Energiezufuhr in Form von elektromagnetischen Wellen werden Elektronen aus dem elektronischen Grundzustand S_{0,0} in einen energiehöheren elek-

¹⁵Der energetisch niedrigste Zustand der meisten Moleküle ist ein Singulett-Zustand.

¹⁶Atomare Teilchen mit nichtganzzahligen Spins (Elektronen, Protonen oder Neutronen) müssen sich, sofern sie sich auf dem gleichen Orbital befinden, in mindestens einer Spinzahl voneinander unterscheiden.

¹⁷Eigene Bearbeitung nach Perhelion (https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5c/Jablonski_Diagramm_Deutsch.png), via Wikimedia Commons CC BY-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>).

tronischen Zustand $S_{1,0}$ angehoben. Der Singulett-Zustand $S_{0,0}$ ist der niedrigste aller möglichen angeregten Zustände. Die Spins aller Elektronen im Singulett-Zustand sind antiparallel ausgerichtet. Da der Gesamtspin S demnach Null ist, folgt die Multiplizität m_S des Singulett-Zustands von Eins¹⁸. Übertrifft die eingebrachte Energie die Differenz von $S_{1,0}$ und $S_{0,0}$, werden die Elektronen in höhere Niveaus, vibronische Zustände $S_{1,n}$ (s. Abb. 2.12b) des gleichen elektronischen Zustands, angehoben.

VR Vibronische Relaxation Durch vibronische Relaxation können diese Elektronen in den elektronischen Grundzustand relaxieren. Dabei geben sie ihre Energie in Form von Reibung an die umliegenden Teilchen ab.

F Fluoreszenz Vom Singulett-Zustand $S_{1,0}$ kann die Energie der Elektronen in Form von Photonen abgegeben werden. Diesen Vorgang, der sich im unteren Mikro- und Nanosekundenbereich abspielt, bezeichnet man als Fluoreszenz. Nach der Aussendung eines Photons muss das Elektron nicht zwingend im Grundzustand $S_{0,0}$ landen. Landet es stattdessen in einem vibronischen Zustand $S_{0,n}$, erfolgt die weitere Relaxation durch die strahlungslose vibronische Relaxation. Da die abgegebenen Photonen unterschiedliche Energien und damit Wellenlängen besitzen, ergibt sich daraus auch das breite Emissionspektrum von Fluorophoren.

Die absorbierte Energie ist stets größer als die durch Fluoreszenz abgegebene Energie der Photonen. Die als Stokes-Verschiebung bekannte Differenz spiegelt sich im Spektrum der Fluorophore wider (s. Abb. 2.14). Die Anregung findet bei niedrigeren Wellenlängen statt als die emittierte Fluoreszenz.

IC Internal Conversion Neben der Aussendung eines Photons besteht auch die Möglichkeit einer internen Umwandlung, wobei die angeregten Elektronen strahlungslos in einen energieärmeren Schwingungszustand wechseln, von wo sie dann strahlungslos mithilfe der vibronischen Relaxation in den Grundzustand herabfallen.

ISC Intersystem Crossing Die dritte Möglichkeit ist der quantenmechanisch verbotene strahlungslose Übergang von einem Singulett- in einen Triplett-Zustand $T_{1,n}$. Hierfür muss die Multiplizität der Elektronenspins auf Drei erhöht werden. Die Spinpaarung eines Elektrons muss hierfür gleichgerichtet sein. Triplett-Zustände unterscheiden sich von Singulett-Zuständen sowohl in ihren Eigenschaften als auch in ihren Energieniveaus – die Triplett-Zustände liegen immer energetisch niedriger als der entsprechende Singulett-Zustand. Vom Triplett-Zustand können die Elektronen durch die vibronische Relaxation in den elektronischen Grundzustand $S_{1,0}$ herabfallen.

P Phosphoreszenz Die Relaxation von einem Triplett- in den Grundzustand unter der Aussendung eines Photons nennt man Phosphoreszenz. Im Gegensatz zur Fluoreszenz kann dieser Vorgang Sekunden bis Minuten andauern.

Neben den Fluorophoren gibt es weitere fluoreszierende Materialien. Quantum Dots, Nanopartikel aus Halbleitermaterialien, die aus wenigen 1000 Atomen bestehen, senden nach der Bestrahlung mit Licht ebenfalls eine Fluoreszenz aus. Diese QDs emittieren Licht

¹⁸ $m_S = 2S + 1$

entsprechend ihrer Bandlücke. Die Bandlücke ist dabei die energetische Differenz zwischen dem Valenz- und dem Leitungsband. Bei der Bestrahlung mit Licht werden Elektronen aus dem Valenzband in das Leitungsband angehoben. Das zurückgelassene Loch im Valenzband und das angehobene Elektron im Leitungsband bilden ein Exziton. Bei der Rekombination des Exzitons, also der Relaxation des Elektrons zurück in das Valenzband, wird die Energiedifferenz ΔE in Form eines Photons freigesetzt. Dieses Photon ist dann als Fluoreszenz detektierbar.

Entsprechend der Brus-Formel ist die Bandlücke einerseits vom Material selbst, andererseits vom Radius des QDs abhängig – im Durchmesser kleine QDs emittieren niedrigere Wellenlängen und umgekehrt^[55].

Ein unendlich ausgedehnter Festkörper aus Halbleitermaterial besitzt entsprechend der vielen Energieniveaus breite Bänder, wodurch ein breites Spektrum emittiert wird (s. Abb. 2.13a).

Durch die starke räumliche Beschränkung in QDs entstehen atomähnliche Zustände. Als Folge werden die Bänder deutlich enger, so dass sich das Spektrum immer mehr einem Linienspektrum annähert. Da die Atome im QD jedoch schwingen, wird dieses Linienspektrum verbreitert, und es entsteht eine Lorentzkurve. Bis ein detektierbares Signal entsteht, müssen mehrere QDs an einem Ort zusammenkommen. Da die QDs nicht alle einen identischen Durchmesser haben, liegen die Linienspektren, respektive deren verbreiterte Version, nicht übereinander. Daher entsteht entsprechend der statistisch verteilten Spektren ein Gaußspektrum (s. Abb. 2.13b).

Ein einzelnes Atom emittiert ein reines Linienspektrum, da die Bänder definierten Energieniveaus entsprechen (s. Abb. 2.13c).

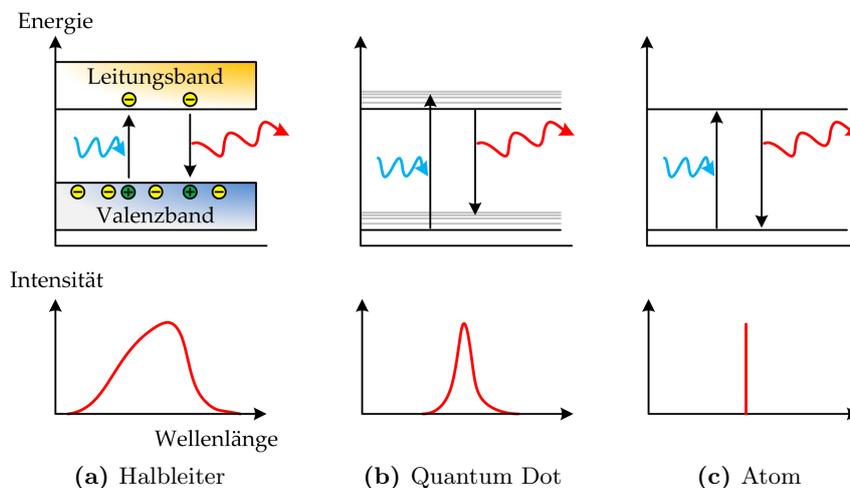


Abb. 2.13.: Zusammenhang zwischen Bänderbreite und Emissionsspektrum. (a) In einem ausgedehnten Halbleiter sind das Valenz- und Leitungsband aufgrund der diversen Energieniveaus sehr breit. Die Energiedifferenz eines angeregten Elektrons und dem zurückgelassenen Elektronenloch kann daher unterschiedliche Werte annehmen, woraus ein breites Emissionsspektrum resultiert. (b) Die Energieniveaus eines Quantum Dots sind enger, woraus das emittierte Spektrum einem lorentzverbreiterten Linienspektrum entspricht. (c) Ein Atom hat nur quantisierte Energieniveaus und emittiert daher ein Linienspektrum.

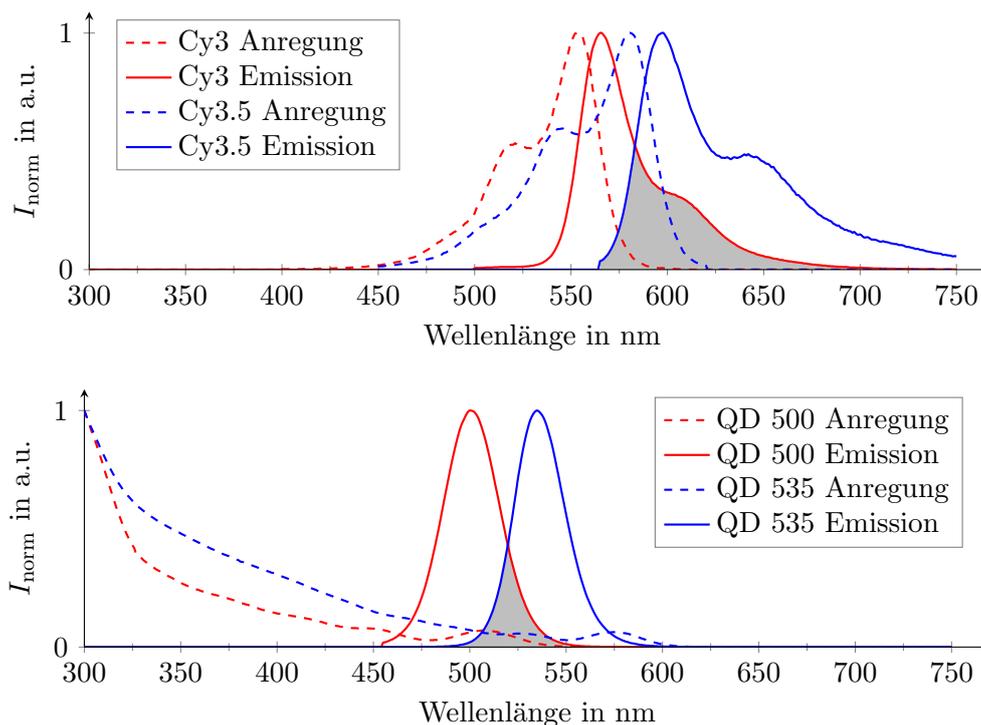


Abb. 2.14.: Anregungs- und Emissionsspektren von Fluorophoren und Quantum Dots. Betrachtet man die Spektren von Fluorophoren und QDs, die einen vergleichbaren spektralen Abstand der Maximalintensitäten besitzen, ergeben sich mehrere Unterschiede (s. Text). Die schraffierte Fläche ist ein Maß für die Überlappung der Emissionen. Bei Fluorophoren ist diese Fläche ungefähr doppelt so groß wie bei QDs. Ist eine Probe mit jeweils beiden Farbstoffen markiert, wird man im Falle der Fluorophore keine gute Unterscheidung der Farbstoffe beobachten können. Im Falle der Probe, die mit QDs gefärbt ist, wird der Unterschied deutlich größer sein.¹⁹

Worin unterscheiden sich Fluorophore und QDs in ihrer Anwendung? Neben den quantenmechanischen Unterschieden ergeben sich drei markante Unterschiede in der Anwendung der beiden Klassen. Diese können teilweise im Spektrum abgelesen werden (s. Abb. 2.14).

Der Abstand zwischen der Anregung und der Emission wird **Stokes-Verschiebung** genannt. Bei Fluorophoren beträgt sie ca. 15 nm – die Anregung ist sehr nahe an der Emission. QDs können alle mit niedrigen Wellenlängen um 300 nm angeregt werden. Die Emission kann dann beispielsweise bei 500 nm oder 535 nm stattfinden. Die Stokes-Verschiebung beträgt demnach mehr als 200 nm. Mit einer derart großen Stokes-Verschiebung kann die Anregungswellenlänge weit abseits der Emission liegen, was die Detektion erleichtert. Zudem können alle QDs mit einer einzigen Lichtquelle angeregt werden. Verschiedene Fluorophore benötigen im Gegensatz dazu spezifische Lichtquellen.

Um möglichst viele unterschiedliche Farbstoffe detektieren zu können, muss der **Crosstalk**, die spektrale Überlappung zweier Emissionsspektren, gering sein. Unter der Voraussetzung, dass die Maxima der Emissionen zweier Fluorophore und QDs ähnlich weit

¹⁹Die Wiedergabe der gezeigten Spektren wurde von Thermo Scientific, Eugene, USA (www.thermofisher.com) genehmigt.

auseinander liegen, ist die Überlappung bei Fluorophoren aufgrund der Ausläufer ungefähr doppelt so groß wie bei QDs (s. Abb. 2.14).

Nicht in den Spektren ablesbar ist die **Quantenausbeute**, die Wahrscheinlichkeit, dass ein angeregtes Elektron bei der Relaxation ein Photon aussendet. Mit ca. 15% ist die Ausbeute bei Fluorophoren deutlich niedriger als bei QDs mit >50%. Bei gleicher Konzentration an Fluorophoren und QDs strahlen QDs eine intensivere Fluoreszenz aus.

2.2.4. Aufnahmefehler

Digitale Bildgebungssensoren wandeln einfallende Photonen in elektrische Signale um. Dieser Prozess ist nicht frei von Fehlern. Diese Fehler verursachen merkliches Rauschen: Helligkeits- und Farbschwankungen der Pixel. Daneben kommt es zu einem Abfall der Helligkeit zum Rand hin, der Vignettierung. Die beiden Phänomene werden vorgestellt und Maßnahmen gezeigt, wie diese unausweichlichen Effekte mit einer nachträglichen Bildbearbeitung minimiert werden können.

Rauschen Fällt ein Photon auf eine Fotodiode, werden dort Elektronen entsprechend der Energie des Photons freigesetzt. Da diese Elektronen nicht ausreichen, um daraus ein Bild zu generieren, müssen sie verstärkt werden. Eine Verstärkung ist nie fehlerfrei – dem Signal wird ein Rauschen auferlegt, das Verstärkerrauschen (s. Abb. 2.15). Bei lichtschwachen Proben oder älteren Bildprozessoren steigt das Verstärkerrauschen an. Das ausgegebene Signal ist zudem analog. Um das analoge in ein digitales Signal umzuwandeln, wird ein Analog-Digital Wandler eingesetzt. Entsprechend der Bittiefe der Kamera (im Falle der in dieser Arbeit eingesetzten Nikon D810 12 bit) entsteht ein Quantisierungsrauschen, das sich zum Verstärkerrauschen addiert. Wird die Kamera oberhalb des absoluten Nullpunkts betrieben, treffen auch infrarote Photonen, thermische Strahlung, auf die Fotodiode. Auch diese werden verstärkt und quantisiert, woraus sich das thermische Rauschen zusammensetzt. Mit zunehmender Temperatur nimmt das thermische Rauschen zu.

Daneben gibt es noch zwei weitere Rauschquellen. Die eine sind Hotpixel – Pixel, die unabhängig von eintreffenden Photonen ein gesättigtes Signal abgeben. Diese Fehlstellen im Chip sind zufällig auf dem Chip verteilt, und ihre Anzahl ist abhängig von der Güteklasse des Chips. Qualitativ hochwertige und damit kostspielige Sensoren haben weniger Hotpixel als beispielsweise günstige Webcams. Die zweite Rauschart ist das Ausleserauschen. Beim Auslesen der Spannungen der einzelnen Pixel entsteht pro Aufnahme ein Rauschen. Dieses ist im Vergleich zum thermischen Rauschen jedoch sehr gering.

Bei ungekühlten Kamerachips, moderaten Verstärkungen und einer modernen Kamera kann man diese fünf Arten des Rauschens absteigend auflisten. Den größten Anteil zum Rauschen liefert das thermische Rauschen, das von der Umgebungs- und der Kamertemperatur abhängt. An zweiter Stelle kommt das Verstärkerrauschen, das von der Signalintensität und damit von den verwendeten ISO-Einstellungen²⁰ abhängt. An dritter Position kommen die Hotpixel, die je nach Güte des Chips mehr oder weniger präsent sind. Das Ausleserauschen ist sehr gering und hängt von der Güte der Elektronik ab. Je besser oder moderner die Elektronik, desto geringer fällt es ins Gewicht. Moderne Kameras besitzen 12 bit AD-Wandler, wodurch ein kontinuierliches Signal in $2^{12} = 4096$ unterschiedliche Graustufen unterteilt werden kann. Der Quantisierungsfehler kann daher

²⁰Bei Digitalkameras wird die Lichtempfindlichkeit und damit die Verstärkung über den ISO-Wert eingestellt, wobei niedrige ISO-Werte einer niedrigen Verstärkung entsprechen und umgekehrt.

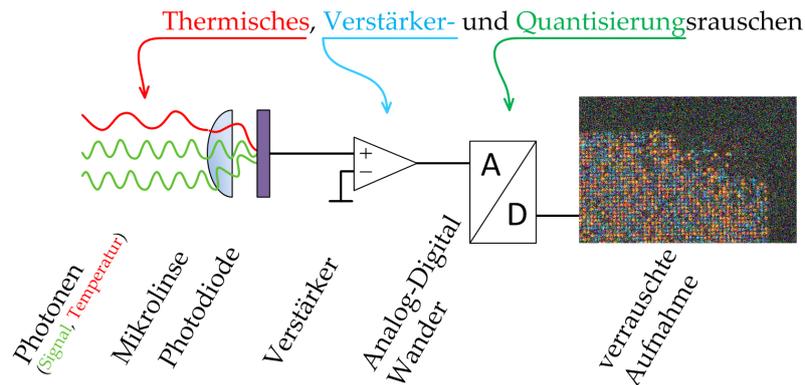


Abb. 2.15.: Rauschen in der digitalen Bildgebung. In absteigender Intensität treten unterschiedliche Arten von Rauschen auf, wenn Photonen auf eine Photodiode treffen: Thermisches Rauschen aufgrund der Umgebungstemperatur, Verstärkerrauschen je nach ISO-Einstellung und Quantisierungsrauschen des Analog-Digital Wandlers.

als gering angesehen werden. Zum Vergleich: Webcams besitzen lediglich 8 bit und damit 256 Graustufen.

Rauschen ist nicht vermeidbar. Daher muss es, sofern es für die spätere Auswertung der Aufnahmen notwendig ist, nachträglich entfernt werden. Da es additiv ist, kann es durch den Abzug von Korrekturaufnahmen herausgerechnet werden. Hierfür werden zwei unterschiedliche Korrekturaufnahmen erstellt. Das thermische Rauschen sowie das Verstärkerrauschen werden durch das Dunkelstrombild (engl. Dark) erfasst. Die Belichtungszeit, die ISO-Einstellung und die Umgebungstemperatur sollten dabei möglichst denen bei der Erstellung der Aufnahme gleichen. Das Quantisierungsrauschen ist gering und leistet demnach einen vernachlässigbaren Anteil am Gesamtrauschen. Zudem kann es nicht durch Korrekturaufnahmen abgebildet werden. Es verbleiben die Hotpixel und das Ausleserauschen. Diese beiden Rauscharten sind unabhängig von den oben genannten Einflüssen. Sie sind in jeder Aufnahme gleich stark vertreten. Um sie zu erfassen, wird eine Korrekturaufnahme bei der geringsten Belichtungszeit erstellt. Dadurch wird der Einfluss des thermischen Rauschens minimiert. Diese Aufnahme nennt man Bias.

Rauschen (ausgenommen der Hotpixel) ist in jeder Aufnahme zufällig verteilt. Um eine möglichst gute Korrektur zu erreichen, werden daher mehrere Darks und Bias erstellt und gemittelt. Diese gemittelten Korrekturaufnahmen, Master genannt, werden dann von jeder Aufnahme, dem Light, subtrahiert:

$$\text{Light}_{\text{Noise}} = \text{Light} - \text{Masterbias} - \text{Masterdark} \quad (2.10)$$

Das Ergebnis ist ein entraschtes Bild (s. Abb. 2.17).

Vignettierung Werden zwei Öffnungen (Linse + Blende oder Linse + Linse) axial hintereinander angeordnet, kann es vorkommen, dass nicht alle Strahlen, die das System passieren, auf dem Sensor landen (s. Abb. 2.16). Diese Abschattung zum Bildrand hin bezeichnet man als Vignettierung (deutsch Randverzerrung). Die Ausprägung des Effekts hängt dabei von der Apertur, dem Blendendurchmesser, dem Abstand der beiden Öffnungen und der Größe des Sensors ab.

Unter der Annahme, dass die Helligkeit am Rand nicht auf Null abfällt, kann eine Vignettierung korrigiert werden. Dazu benötigt man die Helligkeitsinformation von jedem

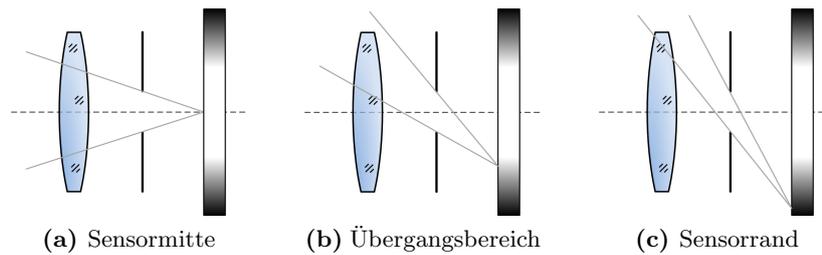


Abb. 2.16.: Vignettierung. Durch die axiale Anordnung zweier optischer Elemente mit endlicher Öffnung entsteht eine Vignettierung. (a) In der Sensormitte kommt es zu keiner Abdunklung. (b) Im Übergangsbereich kann der Sensor nicht komplett ausgeleuchtet werden, wodurch die Helligkeit abnimmt. (c) Je weiter man sich von der Sensormitte entfernt, desto ausgeprägter wird die Vignettierung.

Pixel, wobei die hellste Stelle im Bild auf Eins normiert wird. Um diese Information zu erhalten, wird eine Aufnahme einer gleichmäßig beleuchteten Fläche erstellt. Die Homogenität dieser Fläche bestimmt dabei die Güte der Korrektur. Dividiert man die eigentliche Aufnahme nun durch diese Korrekturaufnahme, Flat genannt, werden alle Helligkeiten angeglichen (s. Abb. 2.17). Die Abschattung zum Rand hin ist korrigiert.

$$\text{Light}_{\text{Noise, Vign}} = \frac{\text{Light} - \text{Masterbias} - \text{Masterdark}}{(\text{Masterflat} - \text{Masterbias})_{\text{norm}}} \quad (2.11)$$

Neben der objektivseitigen Abschattung werden durch das Flat auch andere Defekte korrigiert. Befindet sich Staub im optischen System, sorgt dieser ebenfalls für eine Abschattung. Diese wird durch das Flat erfasst und korrigiert.

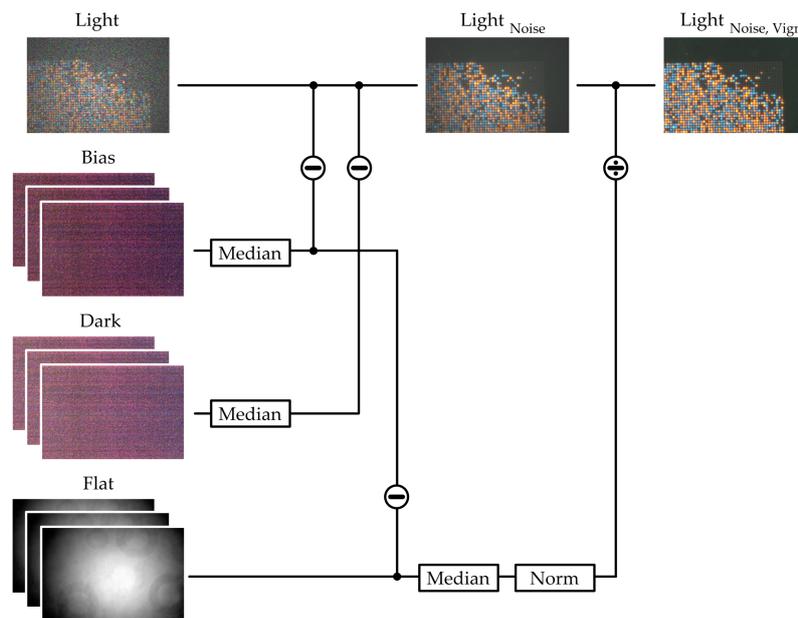


Abb. 2.17.: Nachträgliche Bildbearbeitung. Die aus einem optischen System erhaltenen Aufnahmen sind verrauscht und besitzen einen Helligkeitsabfall zum Bildrand. Das Rauschen wird durch die Subtraktion zweier Korrekturaufnahmen, dem Bias und dem Dark, entfernt. Während das Bias das bei jeder Aufnahme identische Grundrauschen beinhaltet, ist im Dark das thermische Rauschen inbegriffen. Die verbleibende Vignettierung wird mithilfe einer Division durch ein normiertes Flat herausgerechnet. Das Flat beinhaltet die Information, wie sehr die Helligkeit zum Rand hin abfällt.

3. Materialien und Methoden

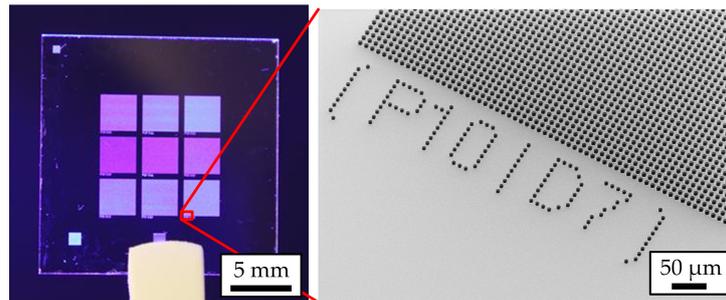
In diesem Kapitel werden die verwendeten Materialien und Methoden vorgestellt. Diese wurden nicht vom Autor entwickelt. Begonnen wird mit den für die Materialübertragung und die optische Auslese verwendeten Glasstrukturen. Im Rahmen der Materialablagerung war eine chemische Funktionalisierung dieser notwendig, auf die in Kapitel 3.2 eingegangen wird. Ebenso werden die polydispersen funktionalen Partikel vorgestellt, die im Rahmen des entwickelten SPT übertragen wurden. Abschließend wird auf die monodispersen Partikel, die mithilfe des optischen Systems detektiert wurden und deren Anwendung eingegangen.

3.1. Glasstrukturen

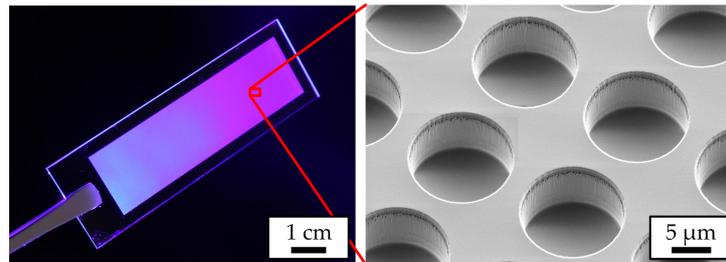
Sowohl der Selective Particle Transfer als auch die Proben für das optische System basieren auf mikrostrukturierten Glassubstraten. Genutzt wurden zylinderförmige Vertiefungen, die rasterförmig auf dem Substrat angeordnet sind (s. Abb. 3.1). Diese wurden zu Beginn dieser Arbeit von der Karlsruhe Nano Micro Facility (KNMF) im Rahmen einer Prototypenfertigung hergestellt. Nach der Validierung der Strukturparameter wurde die Herstellung an die AMO GmbH ausgelagert.

In beiden Fällen wurde reaktives Ionentiefenätzen (engl. deep reactive ion etching, kurz D-RIE) genutzt, um Mikrostrukturen in einem planaren Substrat aus Quarzglas (Fused Silica SiO_2 , SIEGERT WAFER GmbH) herzustellen. Hierfür wird das Substrat mit einer Chromschicht versehen, auf die ein Fotolack durch Schleuderbelackung (engl. spincoating) aufgebracht wird. Mithilfe eines Laserschreibers oder durch den Einsatz von Fotomasken wird das entsprechende Muster im Fotolack belichtet. Dabei werden die Bereiche freigelegt, die die späteren Vertiefungen ergeben sollen. Ein erster Ätzschritt entfernt anschließend die Chromschicht in den freigelegten Bereichen. Nach der Entfernung des Fotolacks kann der eigentliche Ätzschritt erfolgen. Das verwendete Gas, Trifluormethan (CHF_3) besitzt gegenüber Quarzglas eine deutlich höhere Selektivität als gegenüber Chrom. Daher wird Quarzglas schneller geätzt als Chrom. Nach Erreichen der Zieltiefe wird das Chrom entfernt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Layouts genutzt. Um eine Optimierung des SPT zu ermöglichen, wurden verschiedene Strukturkombinationen auf einer Fläche von 1 cm^2 zusammengefasst (s. Abb. 3.1a). Eine Strukturkombination umfasst zwei Substrate, eines für den Ausgangs- und eines für den Zielträger. Die Ausgangsstrukturen variieren von $4 \mu\text{m}$ bis $8 \mu\text{m}$. Auf dem Zielträger variieren die Durchmesser von $6 \mu\text{m}$ bis $30 \mu\text{m}$, womit Spotdichten von $100\,000 \text{ cm}^{-2}$ bis $1\,000\,000 \text{ cm}^{-2}$ ermöglicht werden. Die Tiefe betrug je nach Strukturkombination $5 \mu\text{m}$ oder $10 \mu\text{m}$. Die Strukturen für das optische System entstammen der Arbeit von Roman Popov^[56]. Auf einem Objektträger befinden sich 2,8 Mio. Vertiefungen, wobei diese einen Durchmesser von $12 \mu\text{m}$ bei einem Pitch von $20 \mu\text{m}$ und einer Tiefe von $10 \mu\text{m}$ besitzen.



(a) Glasstrukturen für den SPT



(b) Glasstrukturen für das optische System

Abb. 3.1.: Glasstrukturen. (a) Um unterschiedliche Strukturkombinationen für den SPT testen zu können, wurden mehrere Kombinationen aus Pitch und Durchmesser auf einem Substrat vereint. Der Ausschnitt zeigt eine Rasterelektronenmikroskopaufnahme (REM-Aufnahme) der Strukturen mit einem Pitch von $10\ \mu\text{m}$ und einem Durchmesser von $7\ \mu\text{m}$. (b) Die Glasstrukturen für das optische System sind großflächig auf einem Objektträger angeordnet, wobei 2,8 Mio. Strukturen auf dieser Fläche untergebracht wurden.

3.2. Funktionalisierung

Die geforderte chemische Bindung der mittels des SPT übertragenen Monomere erfordert eine funktionalisierte Oberfläche der Zielstrukturen. Hierzu wurden die Zielträger mit einer Polymerschicht aus 10 % (n/n) Poly(ethylenglycol)methacrylat (PEGMA) und 90 % (n/n) Polymethylmethacrylat (PMMA) funktionalisiert^[57,58]. Die resultierende 10 nm bis 50 nm dicke Polymerschicht besitzt die erforderlichen Aminogruppen zur Anknüpfung der Monomere.

Die Funktionalisierung erfolgt in vier Schritten:

1. **Reinigen der Oberfläche** Mithilfe von Kalilauge (KOH) werden organische Rückstände auf der Oberfläche des Zielträgers entfernt. Dies ist notwendig, um einen kontinuierlichen Polymerfilm zu erhalten. Die Substrate werden hierfür über Nacht in KOH eingelegt. Weiterhin "aktiviert" KOH die obersten atomaren Lagen des SiO_2 -Substrats, wodurch funktionale Hydroxygruppen (OH-Gruppen) entstehen, die für den nachfolgenden Schritt erforderlich sind (s. Abb. 3.2a).
2. **Silanisierung** An die entstandenen OH-Gruppen wird 2-Brom-*N*-(3-Triethoxysilyl-Propyl) Isobutyramid (abgekürzt als Monobromsilan) mit dem Bromatom als funktioneller Gruppe angeknüpft, das als Basis für die eigentliche Polymerisation dient (s. Abb. 3.2b).

3. **Pfropfcopolymerisation** Die eigentliche Polymerschicht aus 10 % (n/n) PEG-MA und 90 % (n/n) PMMA wird mittels der Pfropfcopolymerisation synthetisiert. Daraus resultiert eine baumartige Struktur mit einem Stamm aus Methylmethacrylat (MMA) und Ästen aus Polyethylenglycol (PEG) (s. Abb. 3.2c). Durch diese Struktur besitzen die einzelnen PEG-Äste einen Abstand, der genügend sterische Freiheiten zulässt, damit der Analyt während der späteren Inkubation ungehindert mit den synthetisierten Peptiden interagieren kann.
4. **Spacer-Moleküle** Die PEG-Äste besitzen an ihren Enden OH-Gruppen. Um die erforderlichen Aminogruppen (NH₂-Gruppen) bereitzustellen, wird die Aminosäure Alanin (Fmoc-β-Ala) angekuppelt. Dadurch entsteht eine frei zugängliche Aminogruppe am Ende des PEG-Asts (s. Abb. 3.2d). Um die Zugänglichkeit für den Analyten weiter zu erhöhen, werden zwei weitere Spacer eingebaut.

Die so funktionalisierten Oberflächen können dann den weiteren Prozessschritten der Materialablagerung und der anschließenden Synthese zugeführt werden.

Chemisch gesehen könnte das Fmoc-β-Ala auch an die OH-Gruppen des Glassubstrats kuppeln. Der Grund für die Polymerisation sind die besseren chemischen und biologischen Eigenschaften des Polymers gegenüber dem einfachen Glas. Der entstehende Wald mit den einzelnen PEG-Ästen bietet einerseits deutlich mehr Startpunkte für die Synthese der Peptide, und andererseits erleichtert die flexible Struktur des Polymers das Eingehen von Interaktionen zwischen dem Analyten und den Peptiden.

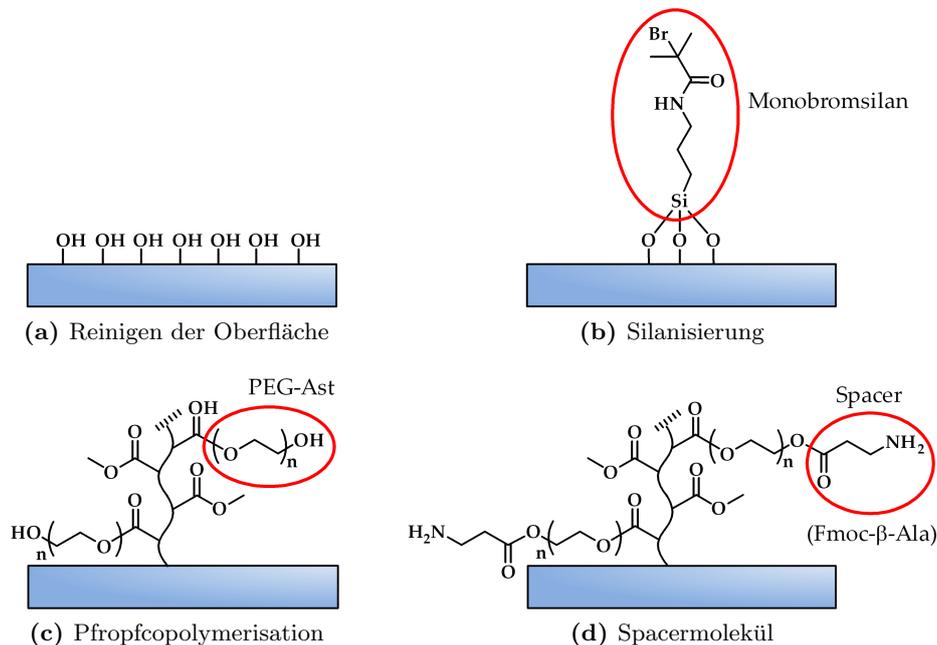


Abb. 3.2.: Funktionalisierung. Für die chemische Anbindung von Monomeren muss die Oberfläche der Zielstrukturen funktionalisiert werden. (a) Mithilfe von Kalilauge wird die Oberfläche gereinigt. Gleichzeitig entstehen dabei freie OH-Gruppen. (b) An die freien OH-Gruppen wird ein Monobromsilan angeknüpft. (c) An das endständige Bromatom wird das eigentliche Polymer aus PEGMA und PMMA synthetisiert. (d) Um die notwendigen NH₂-Gruppen zu generieren, werden die PEG-Äste mit Spacer-Molekülen aus Aminosäuren modifiziert.

Durchgeführt wurde die Funktionalisierung der Zielträger von den Chemikern Dr. Jakob Striffler und Dr. Girish Shankara, die beide in der Arbeitsgruppe des Autors beschäftigt waren und sind.

3.3. Funktionale Partikel

Sowohl die Partikel, die beim SPT übertragen werden sollen, als auch die Partikel, die mit dem optischen System detektiert werden sollen, sind funktional – sie dienen als Träger von Monomeren (s. Abb. 3.3). Zusätzlich tragen die Partikel für das optische System noch QDs. Unterschiede zwischen den Partikeln ergeben sich aus ihrer Beschaffenheit. Die für den SPT genutzten Partikel besitzen eine ausgedehnte Größenverteilung, sie sind polydispers. Die Partikel für das optische System hingegen sind alle gleich groß, sie sind monodispers. In den folgenden Abschnitten wird auf die Herstellung und die Eigenschaften der beiden Partikelsorten eingegangen und die Anwendung der monodispersen Partikel beschrieben.

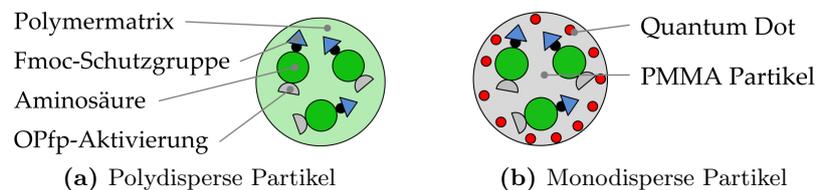


Abb. 3.3.: Funktionale Partikel. (a) Polydisperse Partikel für den SPT. Die zu strukturierenden Monomerbausteine sind in eine Polymermatrix eingebettet. (b) Monodisperse Partikel für das optische System. Die Monomerbausteine werden in die obersten Schichten von sphärischen Partikeln aus PMMA eingebracht. Um unterschiedliche Partikelsorten voneinander unterscheiden zu können, tragen sie fluoreszierende QDs.

3.3.1. Polydisperse Partikel

Nach der Übertragung der Partikel müssen sie im Ofen unter Hitze einwirkung flüssig werden, so dass die eingebetteten Monomere an die funktionalisierte Oberfläche des Zielträgers diffundieren können. Deshalb bestehen diese Partikel aus einem Polymer (SLEC PLT-7552, Sekisui Chemical GmbH) mit einer Glasübergangstemperatur von $T_g = 347\text{ K}$ (74 °C). Die Partikel wurden im Rahmen einer Dissertation mithilfe eines Sprühtrockners hergestellt^[53]. Dabei wird das Polymer samt dem Monomer in einem Lösungsmittel (Dichlormethan, kurz DCM) gelöst. Die Lösung wird durch eine beheizte Düse gepresst und dadurch verstäubt. Durch die Hitze verdampft das Lösungsmittel, wodurch sich sphärische Polymerpartikel bilden (s. Abb. 3.4a).

Aufgrund dieses Herstellungsverfahrens ergibt sich eine ausgedehnte Größenverteilung (s. Abb. 3.4b).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Partikelsorten mit zwei unterschiedlichen Monomeren genutzt. Eine Sorte beinhaltet die Aminosäure Glycin (Fmoc-Gly-OPfp, Merck KGaA), die andere das Vitamin Biotin (OPfp-Biotin, Merck KGaA).

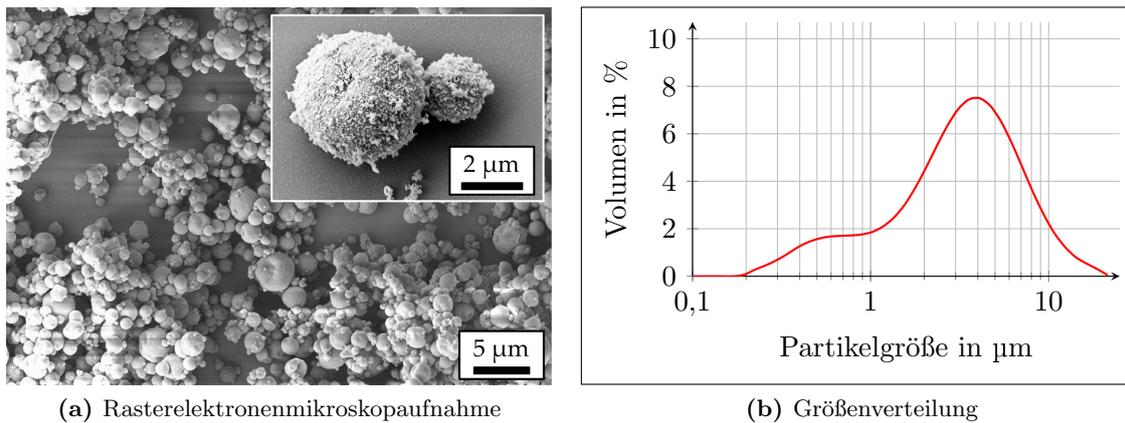


Abb. 3.4.: Polydisperse Partikel. (a) Im REM erscheinen die Partikel aus dem Sprühtrockner als sphärische Objekte mit unterschiedlichen Durchmessern. (b) Die Durchmesser reichen von $0,2\ \mu\text{m}$ bis $20\ \mu\text{m}$ bei einem Median von $3,3\ \mu\text{m}$.

3.3.2. Monodisperse Partikel

Die Partikel, die mit dem optischen System detektiert werden sollen, müssen monodispers sein, weil jede Vertiefung des mikrostrukturierten Substrats lediglich ein einzelnes Partikel enthalten soll. Außerdem sollen keine Partikel auf der Oberfläche der Strukturen zurückbleiben. Aus diesem Grund wurden monodisperse Partikel (Spheromers® CA 10, MICROBEADS®) aus quervernetztem PMMA verwendet (s. Abb. 3.5). Diese werden neben den Monomeren mit QDs beladen (ZnCdSeS legierte Quantum Dots, PlasmaChem GmbH), damit sie detektiert werden können. Um mehrere Partikelsorten voneinander unterscheiden zu können, wurden sie mit diversen QDs versehen: 490 nm, 530 nm, 560 nm und 590 nm.

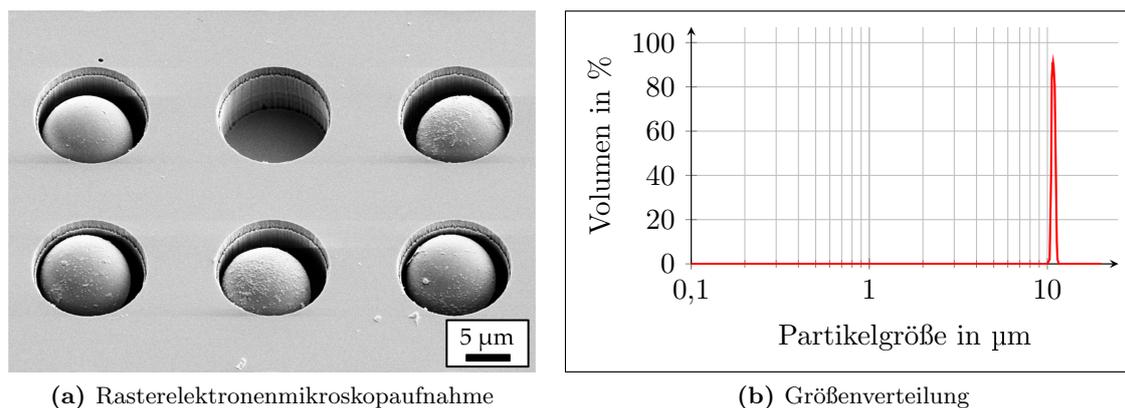


Abb. 3.5.: Monodisperse Partikel. (a) Wegen ihrer Monodispersität findet immer nur ein einziges Partikel in den Vertiefungen des Substrats Platz. (b) Dies zeigt sich auch in der Größenverteilung, die im Gegensatz zu den polydispersen Partikeln deutlich schmaler verläuft²¹. Der Durchmesser reicht von $10,3\ \mu\text{m}$ bis $11,4\ \mu\text{m}$ bei einem Median von $10,7\ \mu\text{m}$. Zu beachten ist die im Vergleich zu den polydispersen Partikeln veränderte y -Achse, die bis 100 % reicht.

Die Partikel bilden die Basis der Dissertation von Roman Popov^[56]. Zum Einsatz kommen die monodispersen Partikel bei der Herstellung von stochastischen ultra-hochdichten Peptidarrays (s. Abb. 3.6). Zuerst wird eine Mischung aus unterschiedlichen Partikeln in die Vertiefungen des Substrats eingebracht. Über die emittierte Fluoreszenz der QDs können den Vertiefungen die entsprechenden Monomere zugeordnet werden. Um das Partikelablagerungsmuster zu dekodieren, werden die Fluoreszenzsignale der einzelnen Partikel mithilfe des entwickelten optischen Systems ausgelesen. Da diese Partikel aufgrund der Quervernetzung auch unter großer Hitze einwirkung nicht flüssig werden, werden die Monomere in einer Dampfphase aus DCM aus den Partikeln extrahiert. Die so extrahierten Monomere werden anschließend im Ofen an die funktionalisierte Oberfläche gekuppelt. Nachdem die Partikel aus den Vertiefungen und die Fmoc-Schutzgruppen der gekuppelten Monomere entfernt wurden, kann der Zyklus erneut mit der Partikelablagerung beginnen.

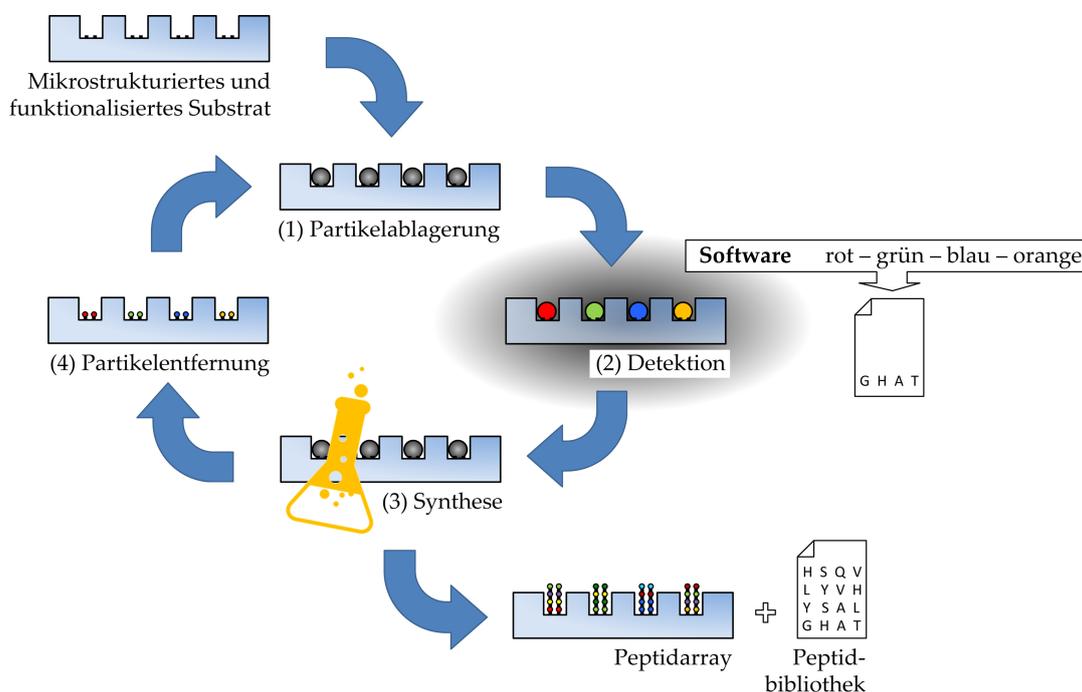


Abb. 3.6.: Herstellung der stochastischen Peptidarrays. (1) Stochastische Ablagerung von unterschiedlichen Mikropartikeln. (2) Dekodierung des Partikelablagerungsmusters mithilfe des optischen Systems. (3) Extrahieren, Kuppeln und Waschen der Monomere entsprechend der Festphasensynthese nach Merrifield. (4) Entfernen der Partikel und der Fmoc-Schutzgruppen, bevor der Zyklus von Neuem beginnt.

²¹Image credit: Microbeads AS.

4. Systeme

Das für den SPT genutzte Lasersystem wird vorgestellt und die Prozessentwicklung beschrieben. Beim optischen System lag der Fokus auf der Systementwicklung. Für beide Prozesse und Systeme wird evaluiert, inwieweit die gestellten Anforderungen erfüllt wurden.

4.1. Lasersystem

4.1.1. Aufbau

Auf Basis des vorgestellten Selective Particle Transfers und der geforderten Spotdichte wurde im Rahmen der Bachelor- und Masterarbeit des Autors ein System entwickelt, das ein inverses Mikroskop (Axiovert 35, Zeiss) als Grundlage nutzt^[16,59,60]. So konnten die Vorteile des Mikroskops genutzt werden:

- Die vorhandenen optischen Komponenten erlauben eine einwandfreie Prozessüberwachung, ohne zusätzliche Entwicklungen tätigen zu müssen.
- Die Öffnungen für die Beleuchtung erlauben die Einkopplung des Lasers.
- Die stabile Bauweise minimiert Störeinflüsse wie Vibrationen und stellt die Konstanz der Justage sicher.
- Die vorhandenen Verfahrmechanismen wie die des Kollimators oder des Objektivrevolvers sind bereits justiert und können direkt übernommen werden.

Die Pulse eines Neodym-dotierten Yttrium-Aluminium-Granat-Lasers (Nd:YAG) mit einer Wellenlänge von 532 nm (MATRIX 532-8-30, Coherent, Inc.) werden dazu genutzt, die Mikropartikel aus den Ausgangsstrukturen in die darunterliegenden Zielstrukturen zu übertragen. Ein Laserpuls dauert 20 ns bei einer maximalen Pulsenergie von 350 μ J. Hierfür wird der Laserstrahl in das Mikroskop geleitet und auf dem Probenstisch fokussiert (s. Abb. 4.1). Auf dem Probenstisch befindet sich das Paket aus Ausgangs- und Zielträger. Mithilfe eines invers montierten Mikroskopobjektivs und einer CMOS-Kamera wird der Prozess an einem Computer überwacht. Der Probenstisch ist motorisiert, damit der stationär montierte Laser das gesamte Substrat bearbeiten kann. Um Vibrationen zu minimieren, ist der gesamte Aufbau auf einem optischen Tisch montiert.

Zur Umsetzung wurde auf das Baukastenprinzip der Komponenten von Thorlabs zurückgegriffen, weil diese hervorragende Funktionalität und Toleranzwerte besitzen. Außerdem waren so weniger Eigenentwicklungen nötig.

Die Gesamtkosten des Systems belaufen sich auf knapp 54 000 €, wobei 34 400 € auf den Laser, 8 490 € auf den Mikroskopstisch und 10 600 € auf die verwendeten Thorlabs Komponenten entfallen. Das Mikroskop wurde kostenlos zur Verfügung gestellt. Zum Vergleich: Die Gesamtkosten des Lasersystems entsprechen ungefähr der Hälfte der Anschaffungskosten für einen Femtosekundenlaser alleine, der gewöhnlich für ablationsbasierte Prozesse eingesetzt wird.

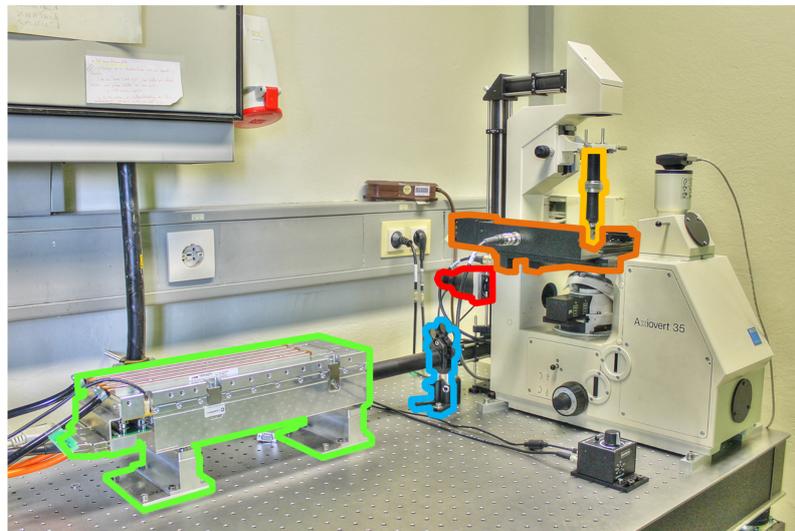
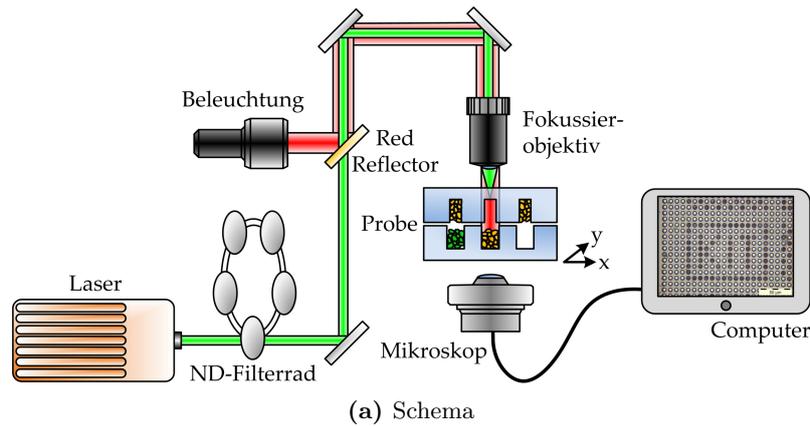


Abb. 4.1.: Lasersystem. (a) Schema des Lasersystems zum SPT. (b) Aufnahme des Lasersystems. Die Leistung des Laser (grün) wird mithilfe von Neutraldichtefiltern, die über ein Filterrad (blau) in den Strahlengang eingeklappt werden können, vorreguliert. Eine langwellige Beleuchtung (rot) wird in den Strahlengang des Lasers eingekoppelt, bevor beide mithilfe einer Fokussiereinheit (gelb) auf den Proben (Ausgangs- und Zielträger) fokussiert werden. Die Proben befinden auch auf einem motorisierten Mikroskoptisch (orange). Über eine am Mikroskop montierte Kamera wird der gesamte Prozess an einem Computer überwacht.²²

Eine Liste der Schlüsselkomponenten des Systems ist in Anhang A.2 zu finden.

Laser und Filterrad

Ausgangspunkt des Systems ist der Laser. Dieser ist fest auf dem optischen Tisch montiert (s. Abb. 4.2a). Eine Wasserkühlung stellt sicher, dass die Laserparameter auch über mehrere Stunden konstant bleiben. Der Hersteller empfiehlt, den Laser bei hohen Leistungen zu betreiben – dies soll sich positiv auf seine Konstanz auswirken. Um neben der Ansteuerung des Diodenstroms des Lasers weitere Freiheiten in der genutzten Intensität zu haben, wird

²²Reproduced with permission.^[31] © 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

nach dem Laser ein Filtrerrad mit unterschiedlichen Neutraldichtefiltern montiert (s. Abb. 4.2b). Mithilfe der Filter kann die Intensität auf 25 % bis 1 % reduziert werden. Eine Position des Filtrerrads wurde freigelassen, um auch auf die volle Laserleistung zurückgreifen zu können.

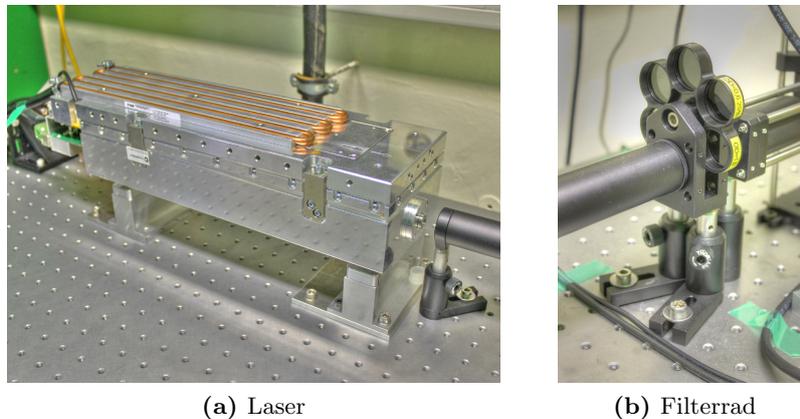


Abb. 4.2.: Laser und Filtrerrad. (a) Der wassergekühlte Laser ist auf drei Kugeln gelagert. Sein Gestell ist fest mit dem optischen Tisch verschraubt. (b) Die auf den Proben auftreffende Leistung kann mithilfe von Neutraldichtefiltern, die in ein Filtrerrad eingesetzt sind, grob voreingestellt werden.

Beleuchtung

Der Laser wird durch die Öffnung in das Mikroskop geleitet die ursprünglich für die Beleuchtung der Proben vorgesehen war. Um dennoch eine Lichtquelle nutzen zu können, wird ein dichroitischer Spiegel genutzt, um eine langwellige Lichtquelle in den Strahlengang des Lasers einzukoppeln (s. Abb. 4.3). Bei einem Einfallswinkel von 45° wird die Beleuchtung zu $>90\%$ reflektiert, wohingegen fast 92% der Laserstrahlung transmittiert werden.

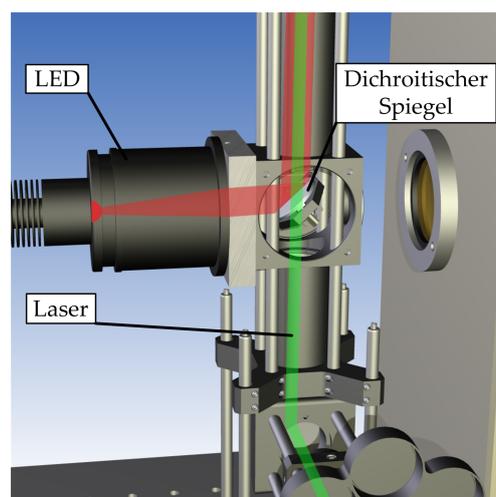


Abb. 4.3.: Einkopplung der Beleuchtung. Mithilfe eines dichroitischen Spiegels wird die langwellige Beleuchtung in den Strahlengang des Lasers eingekoppelt.

Fokussiereinheit mit Fokuskontrolle

Der Laser muss auf den Proben fokussiert werden, um eine ausreichend hohe Intensität für den Transfer zu erreichen. Hierfür wird ein spezielles Fokussierobjektiv verwendet. Aufgrund des kleinen Laserfokusbereichs besitzt der Laserstrahl eine große Divergenz. Der Bereich entlang der z -Achse, in dem der Laser die erforderliche Intensität erreicht, ist demnach gering (s. Kap. 5.1.2). Gleichzeitig sind die Substrate nicht 100 %-ig lotrecht zum Strahlengang ausgerichtet, wodurch die Intensität bei starrem Laserfokus von seiner Position auf dem Substrat abhängt (s. Abb. 4.4 links).

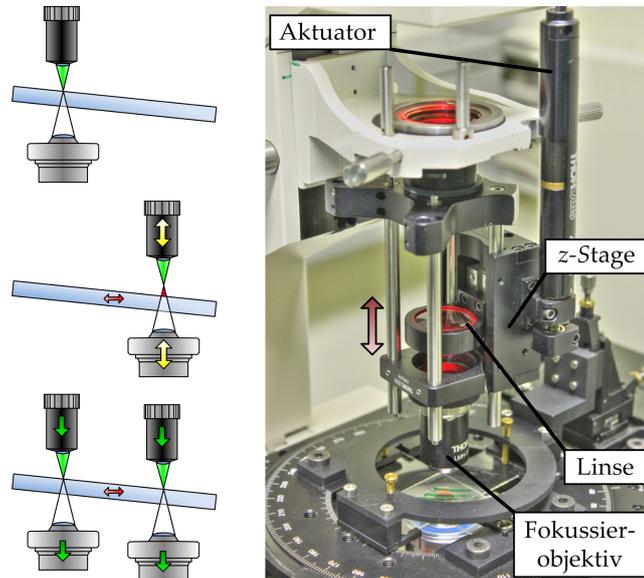


Abb. 4.4.: Fokuskontrolle und Fokussiereinheit.²³

Um dem zu begegnen, wurde im Rahmen der Masterarbeit des Autors eine automatisierte Nachführung auf Basis einer verschiebbaren Linse entwickelt^[16]. Ein motorisierter Aktuator verschiebt eine Linse, wobei das Fokussierobjektiv stationär bleibt (s. Abb. 4.4 rechts). Dadurch kann der Laserfokus an die Substratneigung angepasst werden. Da nur die zusätzliche Linse verschoben wird, wirken sich die Toleranzen der verbauten Elemente nicht so stark auf die Position des Laserfokus aus. Würde das Fokussierobjektiv direkt verschoben, würden Abweichungen 1:1 auf die Position des Laserfokus übertragen werden.

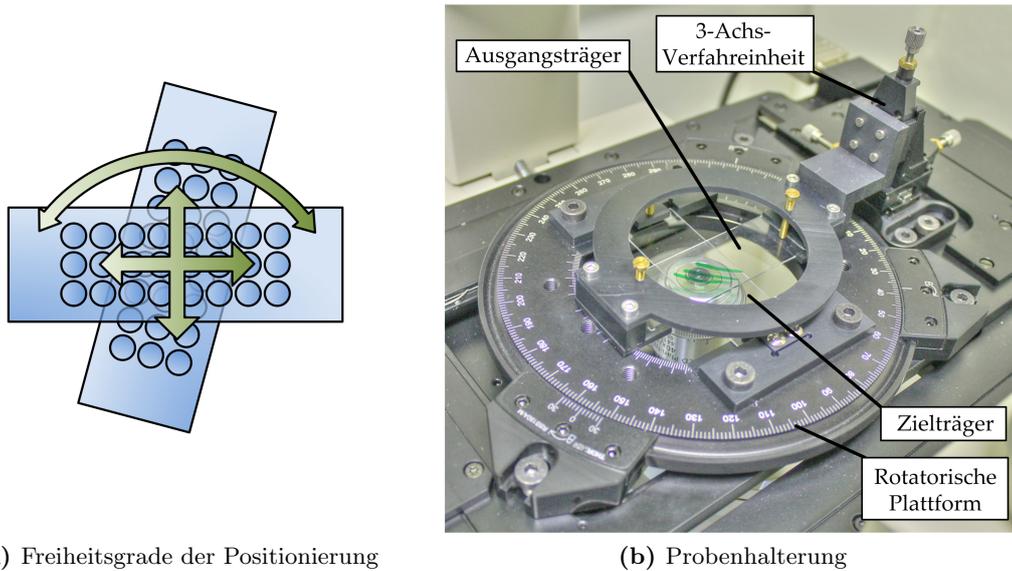
Probenhalterung

Um die Strukturen der Ausgangs- und Zielträger deckungsgleich übereinander zu positionieren, müssen die beiden Substrate gegeneinander ausgerichtet werden können. Dabei geschieht die Ausrichtung in drei Freiheitsgraden (Rotation und Translation in x und y). Der Zielträger wird hierfür in einer rotatorischen Plattform eingespannt (s. Abb. 4.5). Eine 3-Achs-Verfahreinheit trägt den Ausgangsträger. Mithilfe der 3-Achs-Verfahreinheit wird der Ausgangsträger zudem auf den Zielträger gepresst, so dass deren Abstand $(7 \pm 3) \mu\text{m}$ beträgt. Sobald die Substrate derart dicht aufeinanderliegen, können beide Substrate gleichzeitig im Mikroskop beobachtet und ausgerichtet werden.

Probentisch

Das Paket aus Ausgangs- und Zielträger ist auf einen motorisierten Mikroskoptisch (SCAN-IM 130 \times 100, Märzhäuser Wetzlar) montiert. Mit einer aktiven Positionsregelung auf Basis von Glasmessstäben ermöglicht dieser Tisch eine absolute Positioniergenauigkeit von $1 \mu\text{m}$.

²³Reproduced with permission.^[31] © 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.



(a) Freiheitsgrade der Positionierung

(b) Probenhalterung

Abb. 4.5.: Probenhalterung. (a) Die beiden Substrate, der Ausgangs- und der Zielträger müssen gegeneinander verschoben und verdreht werden können. (b) Entwickelte Lösung. Der Zielträger sitzt in einer rotatorischen Plattform, während der Ausgangsträger mithilfe einer 3-Achs-Verfahreinheit gegenüber dem Zielträger verschoben werden kann.²⁴

Peripherie

Sämtliche Komponenten, vom Laser bis hin zum Mikroskop, sind auf einem optischen Tisch montiert. Die stabile Bauweise gepaart mit der passiven Luftdämpfung minimiert Vibrationen.

Der Strahlengang des Lasers liegt offen. Das System wird daher in die Laserklasse 4 eingestuft. Aus Laserschutzgründen befindet sich der gesamte Aufbau in einem gesonderten Bereich des Labors, der durch massive Wände und einen Laserschutzvorhang vom Rest des Raumes abgetrennt ist. Vorsorglich muss der Anwender beim Betreiben der Anlage eine Laserschutzbrille tragen.

Eine der in Kapitel 1.1.3 formulierten Anforderungen konnte durch den beschriebenen Aufbau bereits erfüllt werden:

Tab. 4.1.: Erfüllte Anforderungen an das Lasersystem.

Anforderung	Stand
Spotdichte	
Laserfokus	
keine kostenintensiven Bauteile	erfüllt
Transfer von empfindlichen Materialien	
Hochdurchsatz	

²⁴Reproduced with permission.^[31] © 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

4.1.2. Software

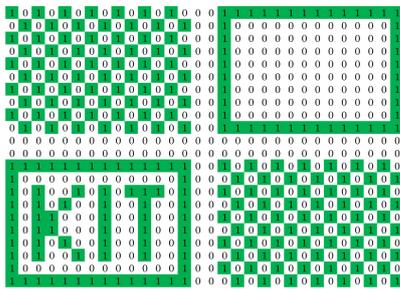


Abb. 4.6.: Zu übertragendes Muster.

fahren, um den Übertrag zeitlich effizient zu gestalten.

Die Abfolge der Aktionen ist dabei wie folgt:

- **Initialisierung** Die Laserparameter und der Abstand zweier Spots werden eingestellt. Zudem wird die Liste mit den Koordinaten geladen. Der Anwender fokussiert den Laser initial. Falls notwendig, werden zwei Korrekturen eingegeben – eine Winkelkorrektur sowie die Fokuskontrolle (s.u.).
- **Schleife** Der Mikroskoptisch verfährt an die erste Position. Die Position ist im Fall der getätigten Winkelkontrolle bereits korrigiert. Wurde auch die Fokuskontrolle aktiviert, verfährt die Linse an die jeweilige Position. Nachdem der Mikroskoptisch und die Linse ihre Endposition erreicht haben, wird der Laser getriggert, woraufhin dieser einen Laserpuls aussendet. Der Puls initiiert den Übertrag. Anschließend verfährt der Mikroskoptisch an die nächste Position in der Liste. Abhängig von der gesetzten Toleranz der Fokuskontrolle wird die Linse nachgestellt, bevor der Laser erneut getriggert wird.
- **Abbruchkriterium** Sobald die Koordinatenliste abgearbeitet ist, wird die Schleife beendet.

In die Software sind zwei Korrekturen integriert: Die Korrektur des Winkels des Substratpakets und die bereits angesprochene Fokuskontrolle.

Winkelkorrektur Der Mikroskoptisch kann in x - und y -Richtung verfahren. Nach der Positionierung der Substrate müssen diese nicht unbedingt entlang dieses Koordinatensystems liegen. Diese Abweichung wird per Software korrigiert. Hierfür wird der Winkel zwischen dem Zielträger und den Achsen des Mikroskoptischs durch Anfahren von zwei Positionen gemessen. Die Koordinatenpaare, die das zu übertragende Muster beschreiben, werden dann von der Software um den gemessenen Winkel gedreht.

Fokuskontrolle Um die Lage des Substratpakets im Raum zu erfassen, wird dessen Position in x , y und z an drei Stellen vermessen. x und y sind die lateralen Positionen des Substrats, z ist die Fokuslage des Lasers. Mithilfe der drei Koordinatentripel wird dann die Fokusebene berechnet.

Wenn der Mikroskoptisch beim Übertrag die erste Position anfährt, wird die Linse im Strahlengang an die entsprechende Stelle positioniert. Verfährt der Mikroskoptisch nach

Sämtliche Geräte werden über einen externen Computer gesteuert. Die Ansteuerung erfolgt über eine grafische Programmieroberfläche (LabVIEW, National Instruments). Ausgangspunkt ist ein zu übertragendes zweidimensionales Muster (s. Abb. 4.6). Dieses Muster wird in Koordinaten umgerechnet, wobei jeder zu übertragende Spot einem Koordinatenpaar (x,y) entspricht. Der Mikroskoptisch verfährt zu jedem Koordinatenpunkt, dort wird der Laser getriggert, bevor der Tisch zum nächsten Punkt verfährt. Der Laserpuls initiiert den Übertrag der Partikel. Das Muster wird meanderförmig abge-

dem Laservorgang an die nächste Position, wird berechnet, wie weit die Fokusslage der nächsten Position von der derzeitigen abweicht. Die Abweichung in Form der Distanz wird in eine Intensitätsänderung umgerechnet. Hierfür werden die realen Strahlparameter (s. Kap. 5.1.2) in Gleichung 2.1 eingesetzt und daraus der Strahldurchmesser an der jeweiligen Position berechnet. Befindet sich diese Abweichung innerhalb einer vom Benutzer festgesetzten Toleranz (hier: 10%), verbleibt die Linse an ihrer Position. Erst bei Überschreiten der Toleranz wird die Linsenposition angepasst. Dies spart Bearbeitungszeit, weil der Aktuator im Gegensatz zum Mikroskopisch nur langsam verfährt.

4.1.3. Prozessentwicklung – Selective Particle Transfer

Es wurden sieben Punkte identifiziert, die einen Einfluss auf die erfolgreiche Synthese von Peptiden haben können (s. Abb. 4.7).

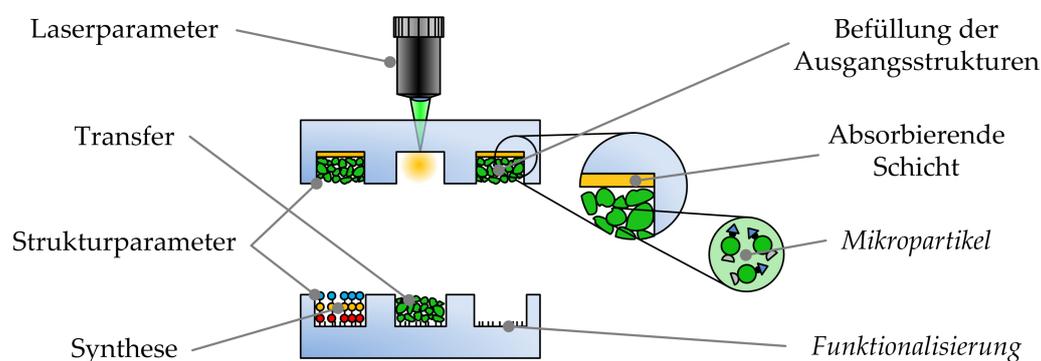


Abb. 4.7.: Einflussfaktoren einer erfolgreichen Synthese von Peptiden. Schon vor dieser Arbeit bekannte Prozesse, die Herstellung der Mikropartikel und die Funktionalisierung der Zielträger sind kursiv dargestellt.

Strukturparameter

Aufgabe Die Strukturparameter des Ausgangs- und des Zielträgers (Durchmesser, Pitch und Tiefe) müssen festgelegt werden. Der Transfer soll bei mehreren Spotdichten erfolgen – $100\,000\text{ cm}^{-2}$, $500\,000\text{ cm}^{-2}$ und $1\,000\,000\text{ cm}^{-2}$.

Möglichkeiten Für die Spotdichte ist der Abstand zweier Spotmittelpunkte, der Pitch, maßgebend. Der Durchmesser der Zielstrukturen können bei konstantem Pitch variiert werden. Für den Pitch und den Durchmesser der Ausgangsstrukturen bestehen keine Einschränkungen.

Das lässt Spielraum für zwei unterschiedliche Strukturpaarungen (s. Abb. 4.8). Der Transfer 1:1 nutzt orthogonal angeordnete Ausgangs- und Zielstrukturen, die beide den selben Pitch, aber unterschiedliche Durchmesser besitzen. Diese Strukturkombination erfordert eine präzise Ausrichtung der Ausgangs- und Zielstrukturen übereinander, sowohl translatorisch als auch rotatorisch. Um die Toleranz bei der Ausrichtung zu erhöhen, besitzen die Ausgangsstrukturen einen kleineren Durchmesser als die Zielstrukturen ($d_{\text{Ausgang}} = 0,7 \cdot d_{\text{Ziel}}$), wodurch ein kleiner Versatz und geringe Winkelabweichungen kompensiert werden können. Außerdem tritt beim Transfer der Partikel eine geringere Streuung auf, weil sie von den größeren Zielstrukturen wie von einem Trichter eingefangen werden.

Der Transfer “klein in groß” erfordert keine Ausrichtung der beiden Substrate. Durch eine hexagonale Anordnung der deutlich kleineren Ausgangsstrukturen ($d_{\text{Ausgang}} = 0,3 \cdot d_{\text{Ziel}}$) befinden sich mehrere Ausgangsstrukturen über der jeweiligen Zielstruktur.

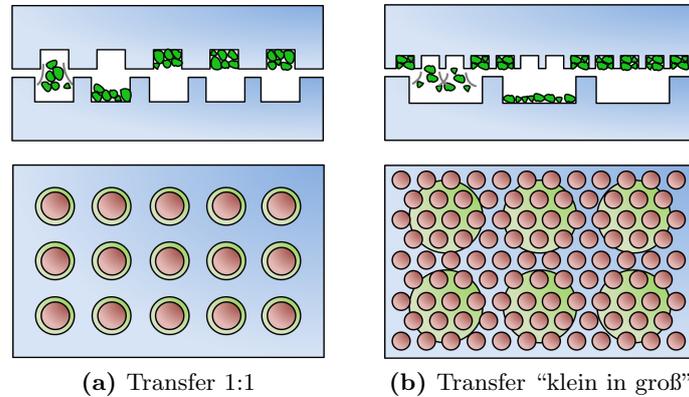


Abb. 4.8.: Transfermethoden. (a) Beim Transfer 1:1 sind die Ausgangsstrukturen geringfügig kleiner als die Zielstrukturen. Die beiden Substrate müssen daher präzise gegeneinander ausgerichtet werden. (b) Der Transfer “klein in groß” nutzt deutlich kleinere Ausgangsstrukturen, die zudem hexagonal angeordnet sind. Die Substrate müssen bei dieser Art des Transfers nicht gegeneinander ausgerichtet werden.²⁵

Bei der Tiefe der Strukturen gibt es die Einschränkung, dass das Verhältnis aus Tiefe und Durchmesser (Aspektverhältnis) kleiner als Eins sein soll. Dies spielt bei der Kupplung im Ofen eine Rolle. Bei einer Temperatur von 90 °C wird die Polymermatrix viskos, was die Diffusion der darin enthaltenen Monomere an die funktionalisierte Oberfläche der Zielstrukturen initiiert. Bei einem Aspektverhältnis von >1 (Tiefe größer als Durchmesser) besteht die Gefahr, dass die Partikel nur die Strukturwände benetzen und nicht den Boden erreichen (s. Abb. 4.9). Um das zu vermeiden, wird die Tiefe der Strukturen derart gewählt, dass das Aspektverhältnis kleiner als Eins ist.

Ausgewählte Lösung Idealerweise würde der Transfer “klein in groß” bevorzugt werden. Jedoch ergeben sich Grenzen, was die Durchmesser der Ausgangsstrukturen betrifft. Die verwendeten Mikropartikel besitzen einen Median von 3,3 μm . Zudem sollte in einer Ausgangsstruktur mehr als ein Partikel Platz finden, um genügend Material transferieren zu können. Aus diesem Grund wurde der minimale Durchmesser der Ausgangsstrukturen auf 5 μm gesetzt. Hieraus ergibt sich auch ein minimaler Durchmesser der Zielstruktur von 17 μm . Da nur bestimmte Strukturpaarungen auf den in Kapitel 3.1 vorgestellten Glasstrukturen zur Verfügung standen, wurde eine Strukturkombination gewählt, die den Berechnungen am nächsten kam. Mit 7 μm großen, hexagonal angeordneten Ausgangsstrukturen konnten 25 μm große Zielstrukturen bedient werden (s. Tab. 4.2). Diese Strukturkombination erlaubt die Erfüllung der geringsten geforderten Spotdichte von 111 111 cm^{-2} .

Für die beiden höheren Spotdichten wurde der Transfer 1:1 gewählt. Entsprechend den genannten Größenverhältnissen und mit den geforderten Spotdichten ergaben sich die jeweiligen Strukturkombinationen (s. Tab. 4.2).

²⁵Reproduced with permission.^[31] © 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

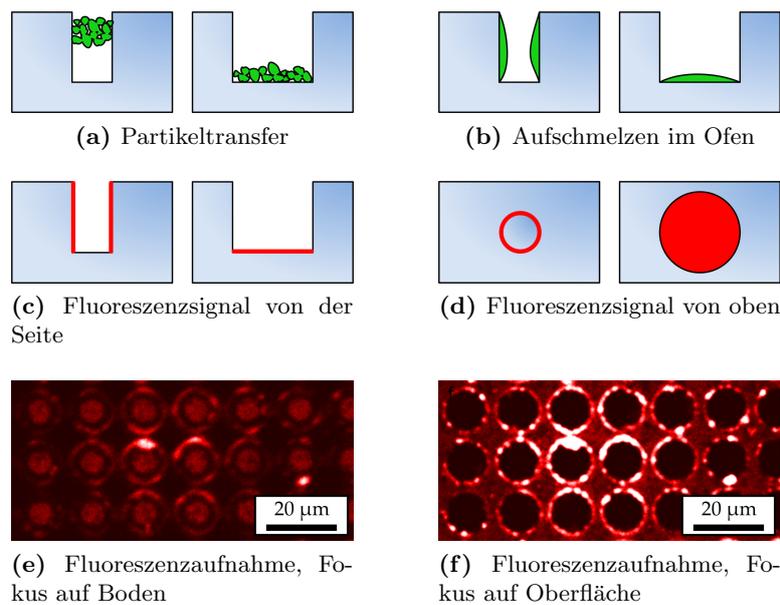


Abb. 4.9.: Vergleich tiefer (Aspektverhältnis $A > 1$) mit flachen ($A < 1$) Zielstrukturen. (a) Nach dem Transfer haften die Partikel entweder an der Wand ($A > 1$, links) oder am Boden ($A < 1$, rechts) der Vertiefung. (b) Im Ofen schmelzen die Partikel auf und benetzen die Wand oder den Boden. (c) Fluoreszenzsignal von der Seite aus gesehen. (d) Fluoreszenzsignal von oben aus gesehen. Fluoreszenzaufnahmen von tiefen Zielstrukturen ($A = 1$) nach dem Transfer, Kuppeln und Anfärben der Monomere, wobei der Fokus auf dem Boden (e) und auf der Oberfläche des Substrats (f) liegt.²⁶

Tab. 4.2.: Gewählte Strukturkombinationen für die Ausgangs- und Zielstrukturen bei unterschiedlichen Spotdichten (Spotdichte in cm^{-2} ; Durchmesser (D), Pitch (P) und Tiefe (T) in μm).²⁷

Spotdichte der Zielstrukturen	Ausgangsstrukturen				Zielstrukturen				Transfermethode	Aspektverhältnis
	D	P	T	Anordnung	D	P	T	Anordnung		
111 111	7	9	10	hexagonal	25	30	10	orthogonal	“klein in groß”	0,33
444 444	8	15	10	orthogonal	11	15	10	orthogonal	1:1	0,67
1 000 000	5	10	5	orthogonal	7	10	5	orthogonal	1:1	0,50

Befüllung der Ausgangsstrukturen

Aufgabe Der Transfer soll homogen und reproduzierbar über das gesamte Substrat erfolgen. Die Mikropartikel müssen hierzu in alle Vertiefungen des Ausgangsträgers eingebracht werden. Ist die Füllrate unter 100 %, könnten Zielstrukturen leer bleiben und die gesamte Synthese negativ beeinflusst werden. Weiterhin sollen die Partikel nur in den Vertiefungen sitzen – die Oberfläche muss frei von Partikeln bleiben.

²⁶Reproduced with permission.^[31] © 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

²⁷Reproduced with permission.^[31] © 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Möglichkeiten Es stehen drei Möglichkeiten zur Auswahl, die Partikel in die Vertiefungen des Ausgangsträgers zu bringen: Sedimentation, Bestäubung und manuelle Befüllung (s. Abb. 4.10).

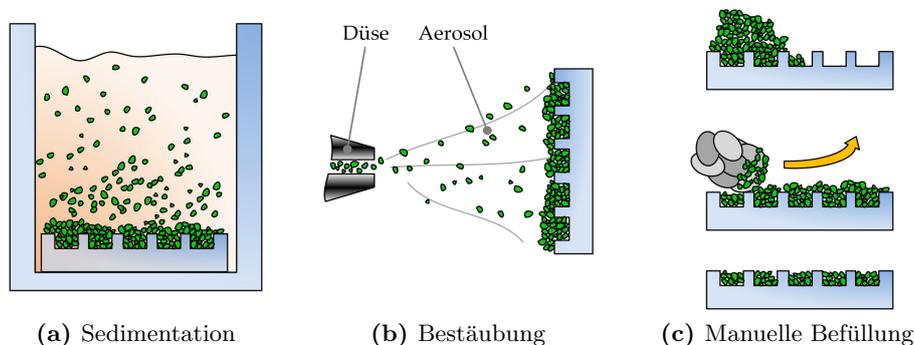


Abb. 4.10.: Befüllung der Ausgangsstrukturen. (a) Die Partikel können durch einen Sedimentationsprozess auf dem Ausgangsträger abgelagert werden. (b) Mithilfe eines Beschichtungsautomaten können Partikel aus einem Aerosol auf der Oberfläche abgeschieden werden. (c) In Pulverform auf das Substrat aufgetragen, können die Partikel mit einem fusselfreien Tuch in die Vertiefungen eingerieben werden.

Zur Sedimentation werden die Partikel als Suspension auf das Substrat gegeben. Durch Dichteunterschiede zwischen den Partikeln und der Flüssigkeit sedimentieren die Partikel auf das unten liegende Substrat. Dadurch lagern sich die Partikel auf der gesamten Oberfläche ab. Daher muss die Oberfläche des Substrats anschließend von überschüssigen Partikeln befreit werden. Daneben ergeben sich weitere Nachteile in Bezug auf die verwendete Flüssigkeit. Polare Lösungsmittel wie Wasser, Methanol und Ethanol reagieren mit der OPfp-Aktivierung der in die Polymermatrix eingebetteten Monomere. Andererseits lösen sie die Polymermatrix nicht auf. Umgekehrt verhalten sich unpolare Lösungsmittel wie Cyclohexan oder Diethylether. Diese reagieren nicht mit der OPfp-Aktivierung, lösen aber die Polymermatrix auf. Inwieweit diese unerwünschten Reaktionen auftreten, wurde in einem Experiment untersucht. Es wurden fünf Suspensionen bei Raumtemperatur mit den genannten Lösungsmitteln hergestellt und auf einen planaren, funktionalisierten Träger pipettiert (s. Abb. 4.11). Als Referenzprobe wurden Partikel als Pulver aufgetragen. Anschließend wurden die Monomere an die Oberfläche gekuppelt, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und in einem Fluoreszenzscanner detektiert (Protokoll s. Anhang A.5.1). Die granulare Struktur der drei linken Spots zeigt, dass die polaren Lösungsmittel die Polymermatrix größtenteils nicht aufgelöst haben. Jedoch zeigt sich um den Methanolspot ein Ring. Vergleicht man die Helligkeit der Partikel mit der Referenzprobe, so erkennt man nahezu keinen Unterschied. Daher kann der Einfluss des Lösungsmittels auf die OPfp-Aktivierung der Monomere im Rahmen der hier verwendeten Zeiträume (30 min) als vernachlässigbar angesehen werden. Das homogene Signal der Bereiche der unpolaren Lösungsmittel zeigt, dass die Polymermatrix aufgelöst wurde. Folglich können Partikel in einer Suspension verarbeitet werden, sofern polare Lösungsmittel genutzt werden. Da der Prozess der Sedimentation jedoch langsam abläuft und zudem eine nachträgliche Bearbeitung der Substratoberfläche erforderlich ist, wird von dieser Möglichkeit der Partikelablagung abgesehen.

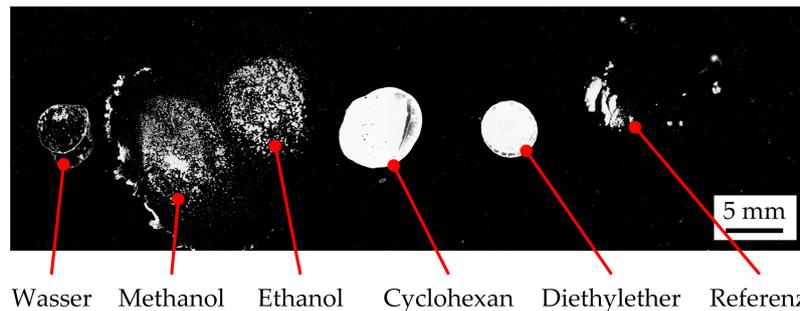


Abb. 4.11.: Suspension. Die Partikel wurden mit verschiedenen polaren und unpolaren Lösungsmitteln gemischt und anschließend auf eine planare, funktionalisierte Oberfläche pipettiert. Nachdem die eingebetteten Monomere an das Substrat gekuppelt hatten, konnten sie mithilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes markiert und gescannt werden. Die Aufnahme wurde im Kontrast angepasst.

Um Partikel als Aerosol auf dem Substrat abzulagern, kann ein Beschichtungsautomat genutzt werden, der in der Arbeitsgruppe des Autors entwickelt wurde^[61]. Ein Aerosolgenerator vermischt die als Pulver vorliegenden Partikel mit einem Luftstrom, der auf das Substrat geleitet wird. Das Substrat wird währenddessen lateral verschoben, um die gesamte Fläche bearbeiten zu können. Die Ablagerung ist dabei sehr komplex und von vielen Einflussfaktoren abhängig. Zudem werden deutlich mehr Partikel abgelagert, als zur Befüllung der Strukturen notwendig sind. Daher muss das Substrat anschließend von den überschüssigen Partikeln befreit werden. Aufgrund der Komplexität der Ablagerung und der nachträglichen Bearbeitung wird auch von dieser Methode abgesehen.

Ausgewählte Lösung Bei der manuellen Befüllung werden die Partikel mithilfe eines Spatels in Pulverform auf das Substrat gegeben. Mit einem fusselfreien Tuch (KIMTECH Science*, Kimberly-Clark Professional), das um einen Finger gewickelt ist, werden die Partikel anschließend auf dem Substrat verteilt^[30]. Dabei werden einerseits die Vertiefungen mit Partikeln befüllt und andererseits Partikel von der Oberfläche vom Tuch aufgenommen und entfernt. Das Ergebnis dieses vergleichsweise einfachen Prozesses ist eine Füllrate von 100 %, wobei die Oberfläche der Strukturen frei von Partikel ist (s. Abb. 4.12).

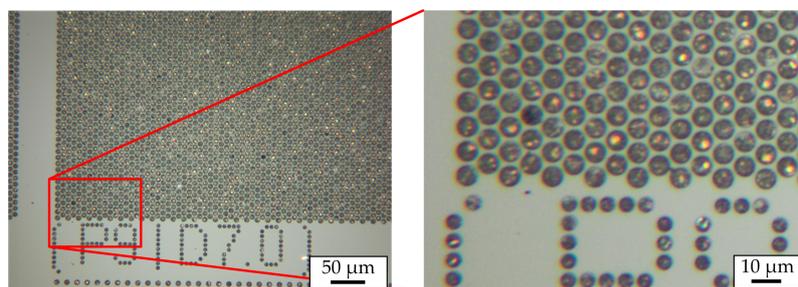


Abb. 4.12.: Gefüllte Ausgangsstrukturen. Durch die manuelle Befüllung können alle Vertiefungen des Ausgangsträgers gefüllt werden. Zudem ist die Oberfläche frei von Partikeln. Gezeigt sind Lichtmikroskopaufnahmen von Ausgangsstrukturen, die für den Transfer “klein in groß” genutzt wurden.

Absorbierende Schicht

Aufgabe Es muss eine absorbierende Schicht gefunden werden, die die Laserstrahlung absorbiert und damit den Transfer ermöglicht. Das Material muss gleichmäßig in alle Vertiefungen eingebracht werden können, wobei die Dicke ausreichend sein muss, einen Großteil der eintreffenden Laserstrahlung zu absorbieren. Die Oberfläche des Ausgangsträgers muss frei bleiben, um den Prozess mithilfe des Mikroskops im Durchlicht beobachten zu können.

Möglichkeiten Um eine nanometerdicke Schicht in die Vertiefungen einzubringen, bieten sich Beschichtungsverfahren wie beispielsweise die Kathodenzerstäubung (engl. to sputter, deutsch: zerstäuben) an. Durch den Beschuss eines Edelgases mit Ionen werden Atome aus einem Target, dem Beschichtungsmaterial, herausgelöst. Diese können sich dann auf dem Substrat ablagern und die gewünschte Schicht bilden. Auf diese Weise können Metalle deponiert werden.

Bei der Wahl des Materials ist die Eindringtiefe entscheidend, die material- und wellenlängenabhängig ist. Für Gold ergibt sich beim eingesetzten Laser eine Eindringtiefe von 20 nm^[62]. Alternativ stand eine Kohlenstoffbeschichtung zur Auswahl.

Um herauszufinden, welches Material sich als Zwischenschicht eignet, wurde jeweils ein Transferexperiment mit den beiden Absorptionsschichten durchgeführt (siehe Abb. 4.13). Während die Kohlenstoffschicht bereits eine Herabsenkung der notwendigen Laserleistung bewirkt, erreicht die Transferrate mit einer Goldschicht ein Optimum. Zusätzlich kann die Laserleistung weiter verringert werden.

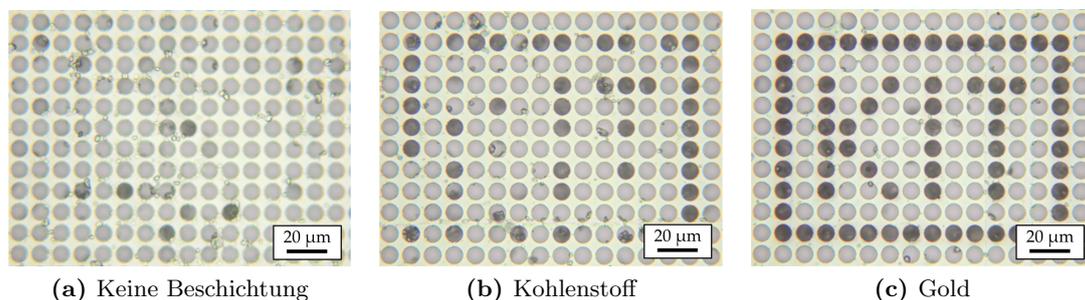


Abb. 4.13.: Einfluss der Beschichtung auf den Transfer. (b) Eine Beschichtung des Ausgangsträgers mit Kohlenstoff bringt eine Verbesserung des Transfers im Vergleich mit einem unbeschichteten Träger. (c) Mithilfe der Goldbeschichtung können geringere Laserleistungen bei gleichzeitig besserer Transferrate erzielt werden. Gezeigt ist jeweils eine Lichtmikroskopaufnahme des Zielträgers, der mit der Transfermethode 1:1 bei einer Spotdichte von $1\,000\,000\text{ cm}^{-2}$ strukturiert wurde.

Ausgewählte Lösung Aufgrund der guten Transferergebnisse wird Gold als Absorptionsschicht gewählt.

Laserparameter

Aufgabe Die Bedingungen für einen erfolgreichen ortsgenauen Transfer müssen ermittelt werden. Die Streuung muss minimal sein, sodass lediglich die gewünschten Vertiefungen mit Partikeln belegt werden. Maßgebend hierfür ist die Lage des Laserfokus sowie die

Laserleistung. Daher müssen die Einstellungen des Lasers hinsichtlich Fokusbereich und Leistung ermittelt werden.

Möglichkeiten Der Laserfokus kann prinzipiell auf vier Arten eingestellt werden (s. Abb. 4.14). Bei zwei Varianten wird ein voll fokussierter, bei den verbleibenden ein extrafokal defokussierter Laser genutzt:

- **Voll fokussiert auf Ausgangsstruktur** Die maximale Intensität trifft die Ausgangsstruktur, wodurch die Goldschicht verdampft und der Transfer initiiert wird. Durch den divergierenden Strahl werden die empfindlichen Zielstrukturen mit einer geringeren Intensität getroffen.
- **Voll fokussiert auf Zielstruktur** Hier kann das Prinzip der optischen Pinzette genutzt werden^[63]. Während der Belichtung werden die Partikel durch die Gradientenkraft zum Strahlmittelpunkt gezogen. Dadurch kann eine Streuung der Partikel minimiert werden. Nachteil ist die hohe Intensität auf dem Zielträger.
- **Extrafokal angepasst auf Ausgangsstruktur** Bei einer hinreichend großen Laserleistung kann die Intensität eines extrafokal auf den Durchmesser der Ausgangsstrukturen angepassten Laserstrahls den Transfer initiieren. Gleichzeitig werden die Zielstrukturen einer minimalen Intensität ausgesetzt, da der Strahldurchmesser im Gegensatz zu den ersten beiden Varianten deutlich größer ist.
- **Extrafokal angepasst auf Zielstruktur** Analog kann der Laserstrahl extrafokal auf den Durchmesser der Zielstrukturen fokussiert werden. Auch hier trifft eine geringe Intensität auf die Zielstrukturen. Gleichzeitig ermöglicht eine hohe Intensität auf den Ausgangsstrukturen einen reproduzierbaren Transfer.

Bei jeder der vier Fokusvarianten wird die Laserleistung entsprechend angepasst, um den Transfer zu ermöglichen.

Ausgewählte Lösung Um die Zielstrukturen vor einer zu großen Intensität und dem damit verbundenen Wärmeeintrag zu schützen, wurde diejenige Variante gewählt, die diese Vorgaben am Besten erfüllt. Des Weiteren soll der Transfer robust gegenüber Änderungen der Fokusebene sein. Wird ein voll fokussierter Laser genutzt, ist der Wärmeeintrag am größten. Wird außerdem der Laser auf die Zielstrukturen fokussiert, kann dies zu einer Verbrennung der funktionalisierten Oberfläche führen. Zusätzlich haben bereits kleine Änderungen der Fokusebene große Auswirkungen auf die Intensität. Dies würde eine kontinuierliche Ansteuerung der Fokuskontrolle erfordern, da diese immer dann aktiviert wird, wenn eine vom Benutzer definierte Intensitätsänderung überschritten wird. Aus den genannten Gründen wurde auf einen voll fokussierten Laser verzichtet.

Es bleibt also nur ein extrafokal angepasster Laser. In Experimenten hat sich gezeigt, dass deutlich mehr Partikel übertragen werden, wenn der Laser extrafokal auf den Durchmesser der Ausgangsstrukturen angepasst ist (s. Abb. 4.14d). Aus diesem Grund werden die Experimente sowohl für den Transfer 1:1 als auch für den Transfer "klein in groß" mit einem nach Variante 3 eingestellten Laserfokus durchgeführt.

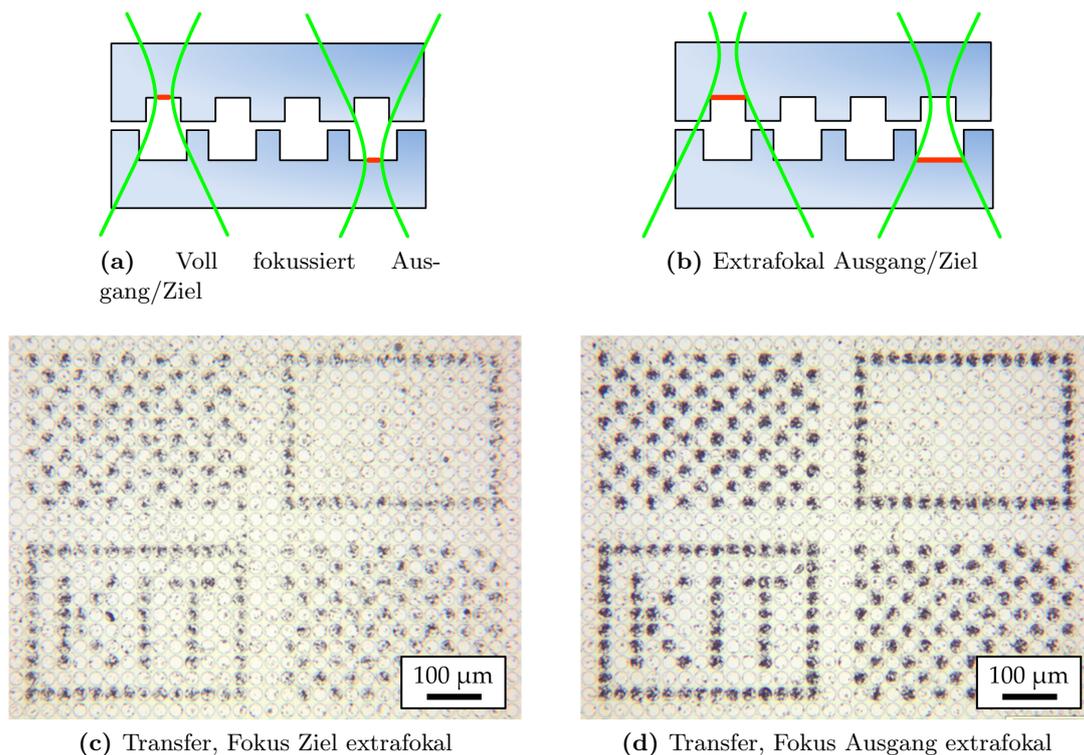


Abb. 4.14.: Fokusvarianten. Der Laser kann entweder auf die Ausgangs-, oder auf die Zielstrukturen fokussiert werden. Bei beiden Varianten kann zudem zwischen einem voll fokussierten und einem extrafokal an die Strukturdurchmesser angepassten Laser unterschieden werden. Am stärksten ist der Einfluss der Fokusebene beim Transfer “klein in groß” wahrnehmbar. (c) Transferergebnis, wenn der Laser extrafokal auf den Durchmesser der Zielstrukturen angepasst ist. (d) Transferergebnis, wenn der Laser extrafokal auf den Durchmesser der Ausgangsstrukturen angepasst ist.

Transfer

Aufgabe Die Bedingungen für einen erfolgreichen ortsgenauen Transfer müssen ermittelt werden. Die Streuung muss minimal sein, so dass lediglich die geforderte Vertiefung mit Partikeln belegt wird.

Theoretische Betrachtung Beim Transfer müssen die Partikel die Distanz zwischen den Substraten von $(7 \pm 3) \mu\text{m}$ überwinden. Dabei sollen die Partikel einer geradlinigen Flugbahn folgen. Sobald diese Flugbahn durch Reibungseinflüsse gestört wird, landet der Partikel nicht in der vorgesehenen Vertiefung – er hat gestreut. Eine theoretische Betrachtung für das zu erwartende Ausmaß der Streuung liefert der Bremsweg (engl. stopping distance). Dieser beschreibt die Distanz, die ein Partikel mit einer Anfangsgeschwindigkeit in einem statischen Fluid wie Luft zurücklegt, bevor es durch Reibungseinflüsse gestoppt wird^[64,65]. Je kleiner diese Distanz, desto eher können die Partikel von einer geradlinigen Bewegung abkommen. Für die verwendeten Partikel wurde der Bremsweg berechnet (s. Anhang A.4). Kleinere Partikel besitzen folglich einen geringeren Bremsweg als große. Obwohl der Bremsweg sowohl der kleinen als auch der großen Partikel mit mindestens $300 \mu\text{m}$ weit größer ist als der Abstand der Substrate, konnte eine starke Streuung der

Partikel beobachtet werden (s. Abb. 4.15a). Die Streuung kann dadurch erklärt werden, dass die losen Partikel beim Übertrag aneinanderprallen und so streuen. Um dem entgegenzuwirken, wurden die Ausgangsträger für 15 min bei 90 °C in einem Ofen erhitzt, um die Partikel zu sintern. Die einzelnen Partikel wurden so zu Agglomeraten in den Vertiefungen zusammengefügt. Da die Partikel nun als Ganzes übertragen werden, ist eine Streuung aufgrund von Kollisionen verhindert. Durch diesen Schritt konnte die Spotdichte auf bis zu $1\,000\,000\text{ cm}^{-2}$ erhöht werden (s. Abb. 4.15b).

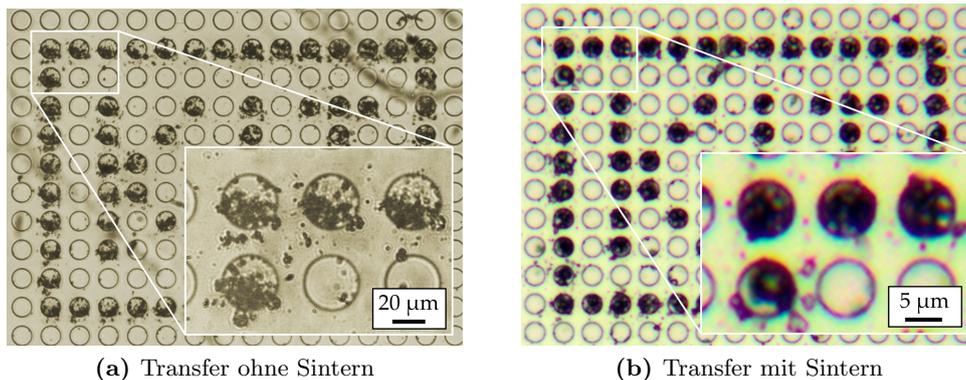


Abb. 4.15.: Auswirkungen des Sinterns der Partikel auf den Transfer. (a) Obwohl der Bremsweg für einzelne Mikropartikel deutlich größer ist als der Abstand zwischen den Substraten, kommt es zu einer deutlichen Streuung. Dies kann auf Kollisionen der einzelnen Partikel während des Übertrags zurückgeführt werden (Spotdichte $40\,000\text{ cm}^{-2}$). (b) Werden die Partikel vor dem Übertrag im Ofen gesintert, tritt dieser Effekt nicht mehr auf und die Spotdichte kann auf bis zu $1\,000\,000\text{ cm}^{-2}$ gesteigert werden.

Vorbereiten der Ausgangsträger

Mit der gefundenen Möglichkeit des Einbringens einer absorbierenden Schicht aus Gold und dem Befüllen der Strukturen mit den Mikropartikeln können die Ausgangsträger hergestellt werden.

Hierfür sind vier Arbeitsschritte notwendig (s. Abb. 4.16). Im ersten Schritt wird eine 15 nm dicke Goldschicht auf den unbearbeiteten Ausgangsträger gesputtert (s. Abb. 4.17a). Diese ist auf der gesamten Trägeroberfläche vorhanden und wird im zweiten Schritt mithilfe eines fusselreinen Tuchs durch manuelles Reiben von der Oberfläche entfernt (s. Abb. 4.17b). Da sich die abgeriebenen Goldflocken in den Vertiefungen sammeln, wird der Träger anschließend in Aceton in einem Ultraschallbad gereinigt, wodurch die losen Goldflocken entfernt werden (s. Abb. 4.17c). Im Anschluss daran werden die Partikel in die Strukturen eingebracht. Eine Sinterung der Partikel in den Strukturen bewirkt eine weitere Verbesserung des Transfers, da die Streuung minimiert wird. Aus diesem Grund wird der Ausgangsträger für 15 min bei 90 °C in einem Ofen erwärmt, wobei die Glasübergangstemperatur der Partikelmatrix von $T_g = 347\text{ K}$ (74 °C) überschritten wird und sich die Partikel miteinander verbinden.

Die so vorbereiteten Ausgangsträger können anschließend für den Transfer verwendet werden.

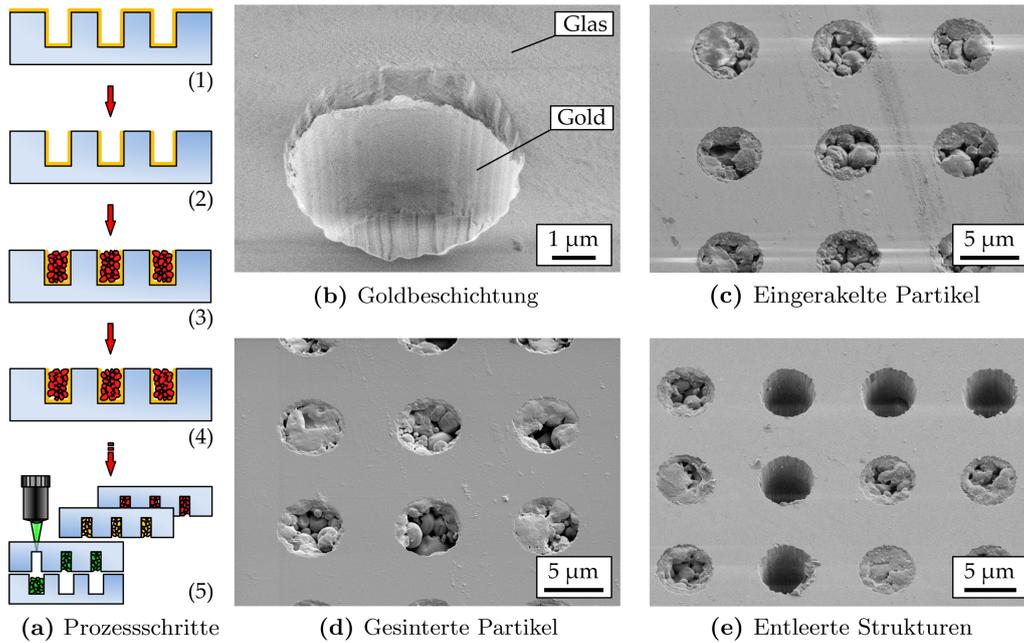


Abb. 4.16.: Vorbereitung der Ausgangsträger. (a) Ein unbearbeiteter Ausgangsträger wird im ersten Schritt mit einer 15 nm dicken Goldschicht belegt (1). Da das Gold lediglich in den Strukturen, aber nicht auf der Oberfläche vorhanden sein soll, wird diese vom Gold befreit (2). Nachdem die Partikel eingerakelt wurden (3) wird der Träger für 15 min bei 90 °C in einem Ofen erwärmt, um die Partikel zu sintern (4). Mit dem so verarbeiteten Ausgangsträger wird anschließend der Transfer vollzogen (5). (b) REM-Aufnahme einer einzelnen Struktur nach dem Reinigungsschritt (2) Der Durchmesser beträgt 5 μm . (c) REM-Aufnahme der eingerakelten Partikel. (d) Partikel nach dem Sintern. (e) Nach dem Transfer sind die belichteten Strukturen komplett geleert. Sowohl die Partikel als auch die Goldschicht wurden restlos entfernt.²⁸

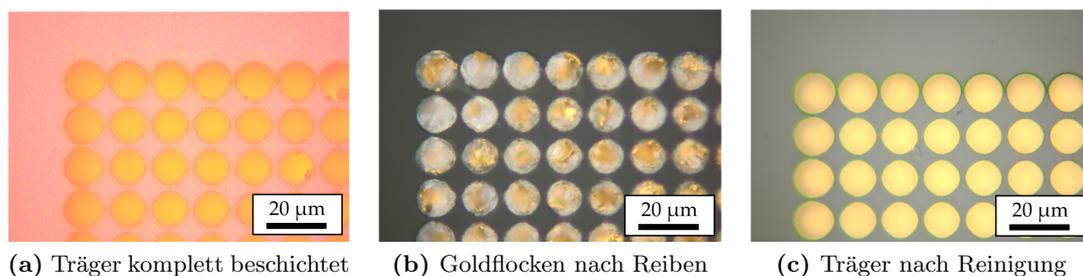


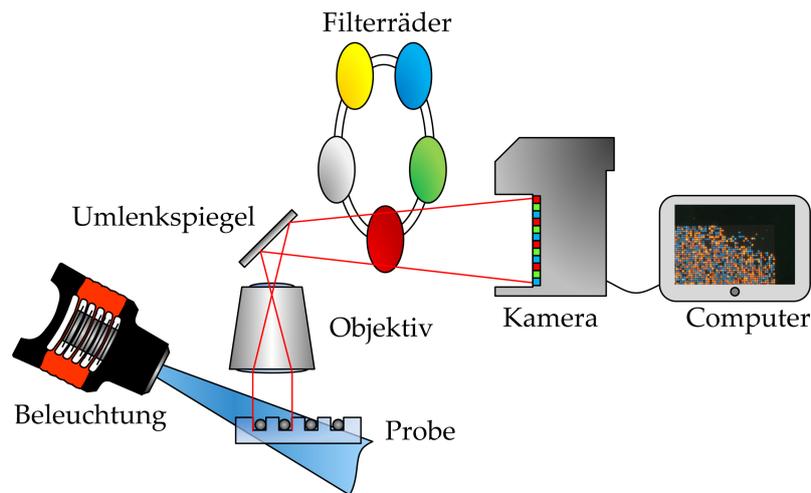
Abb. 4.17.: Goldschicht während der Vorbereitung der Ausgangsträger. (a) Nach dem Beschichtungsvorgang ist die gesamte Oberfläche des Ausgangsträgers mit einer Goldschicht belegt. (b) Durch Wischen mit einem fusselfreien Tuch kann die Oberfläche vom Gold befreit werden. Das abgeriebene Gold sammelt sich in den Vertiefungen. (c) Diese Goldflocken werden durch einen anschließenden Waschschritt entfernt.

²⁸Reproduced with permission.^[31] © 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

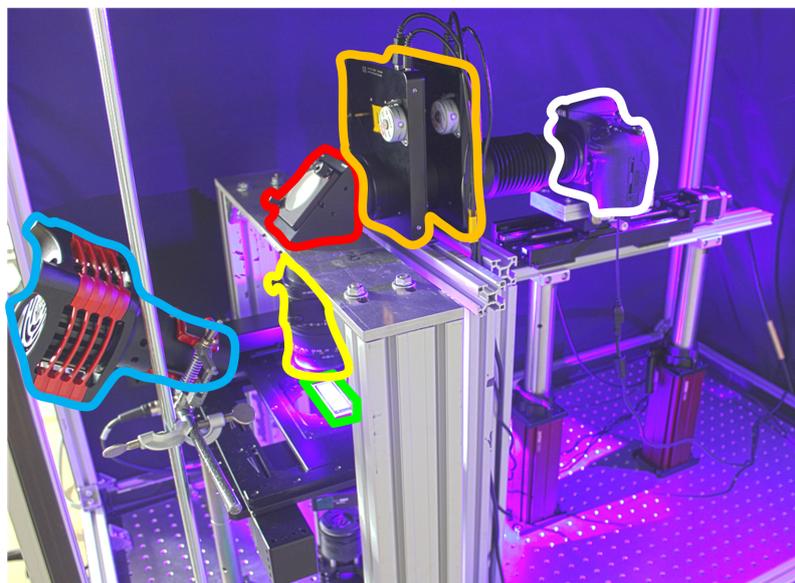
4.2. Optisches System

4.2.1. Aufbau

Das in Kapitel 1.2.3 vorgestellte Prinzip der erweiterten Makrofotografie wurde umgesetzt (s. Abb. 4.18). Ausgehend von einer Lichtquelle, die die zu untersuchende Probe beleuchtet, wird die emittierte Fluoreszenz mithilfe eines kommerziellen Makroobjektivs aus der Digitalfotografie eingefangen. Nach einem Umlenkspiegel befinden sich zwei Filterräder mit unterschiedlichen Fluoreszenzfiltern, um zwischen mehreren Kanälen unterscheiden



(a) Schema



(b) Aufbau

Abb. 4.18.: Optisches System. (a) Schema des optischen Systems zur Detektion von QD-markierten Mikropartikeln. (b) Aufnahme des optischen Systems. Die Beleuchtung (blau) regt die Probe (grün) an, Fluoreszenzstrahlung zu emittieren. Ein Objektiv (gelb) sammelt diese Fluoreszenzstrahlung, leitet sie mithilfe eines Umlenkspiegels (rot) durch die Filterräder (orange), bevor sie mit der Kamera (weiß) detektiert wird.

zu können. Die Kamera, eine kommerzielle Spiegelreflexkamera (D810, Nikon GmbH) befindet sich hinter den Filterrädern. Der gesamte Aufbau ist auf einem optischen Tisch montiert und wird von einem speziellen Stoff umgeben, der das System vom Umgebungslicht abschattet.

Die Modellprobe ist wie in Kapitel 3.1 angegeben ein Objektträger. Auf einer Fläche von 62×18 mm befinden sich Vertiefungen, die mit den monodispersen Mikropartikeln befüllt sind. Die Mikropartikel sind mit QDs markiert, wodurch sie sich voneinander unterscheiden lassen.

Auch bei diesem System wurde für die Umsetzung auf Thorlabs Komponenten zurückgegriffen, um den Anteil an Eigenentwicklungen zu minimieren. Die Gesamtkosten des Systems betragen ca. 27 000 €. Diese teilen sich folgendermaßen auf: 4 300 € für Kamera und Objektiv, 2 850 € für die verwendeten Filter, 2 300 € für die motorisierten Filterräder, 3 200 € für die Beleuchtung, 8 000 € für den Mikroskoptisch, 2 500 € für die motorisierte Linearachse und 4 000 € für Thorlabs Komponenten.

Eine Liste mit den Schlüsselkomponenten des Systems ist in Tabelle A.3 in Anhang A.3 zu finden.

4.2.2. Systementwicklung – Multispectral Widefield Fluorescent Microscope

Im Gegensatz zum Lasersystem, wo die Prozessentwicklung im Vordergrund stand, liegt der Fokus des optischen Systems auf der Systementwicklung. Um ein funktionierendes System zu erhalten muss drei Baugruppen eine besondere Aufmerksamkeit zuteil werden: der Beleuchtung, dem Objektiv sowie der Kameramontage. In der nachfolgenden Beschreibung des Aufbaus wird daher der Entwicklungsprozess der genannten Baugruppen genauer erörtert.

Beleuchtung

Aufgabe #1 Die Beleuchtung muss stark genug sein, eine ausreichende Fluoreszenz auszulösen. Zudem soll eine Leuchtquelle mit einer Wellenlänge gefunden werden, die für alle genutzten QDs nutzbar ist. Weiterhin sollte die Wellenlänge so niedrig wie möglich sein, ohne potentiell schädlich für das menschliche Auge zu sein. Zuletzt muss durch geeignete Filter gewährleistet sein, dass möglichst wenig Licht von der Leuchtquelle während des Betriebs detektiert wird.

Möglichkeiten Generell stehen drei Leuchtmittel zur Auswahl, eine breitbandige Glühlampe, eine schmalbandige Leuchtdiode (LED) und ein Laser.

Die erste Anforderung ist die Stärke der Beleuchtung, die erreichbare Intensität. Alle drei Leuchtmittel bieten dies, wobei hier gilt: je mehr desto besser. Es muss aber auch eine große Fläche gleichmäßig ausgeleuchtet werden. Hier treten bereits Unterschiede auf. Während eine Glühlampe und eine LED mithilfe geeigneter Optiken problemlos eine Fläche von mehreren Quadratzentimeter gleichmäßig ausleuchten können, ist dies mit einem Laser nicht ohne Weiteres möglich. Beim Aufweiten des Laserstrahls bilden sich aufgrund der kohärenten Strahlung Beugungsringe aus. Diese Intensitätsunterschiede würden sich dann auch bei der Detektion als inhomogene Verteilungen sichtbar machen. Zwar kann dies durch den Einsatz von Diffusoren verringert werden, jedoch geht dies auf Kosten der erreichbaren Intensität.

Um alle verwendeten QDs simultan anregen zu können, soll eine Wellenlänge genutzt werden. Der Aufbau soll auch ohne Schutzbrille genutzt werden können und das detektier-

bare Spektrum soll maximiert werden. Das menschliche Auge ist ab einer Wellenlänge von 400 nm empfindlich. Das stellt die untere Grenze dar. Liegt die Anregung darunter, sind Schutzbrillen vorgeschrieben, um sich vor der ultravioletten Strahlung zu schützen. Die obere Grenze ist durch die Kamera gegeben. Da sie das Sehempfinden des menschlichen Auges imitiert, können Wellenlängen bis ca. 600 nm ausreichend gut detektiert werden. Quecksilberdampf lampen beispielsweise besitzen im gesuchten Bereich von 400 nm mehrere Emissionslinien, die zur Anregung genutzt werden könnten. Da aber auch andere teilweise deutlich niedrigere Emissionswellenlängen vorhanden sind, ist die Nutzung ohne geeignete Filter zur Begrenzung des Spektrums nicht möglich. Kommerzielle LEDs in diesem Bereich sind ebenfalls erhältlich. Mit Bandbreiten von 20 nm bis 40 nm konzentriert sich die abgegebene Leistung zudem auf den gewünschten Bereich. Auch Laser mit Emissionswellenlängen in diesem Bereich können ohne Probleme gefunden werden.

Im späteren Betrieb soll ausschließlich die Fluoreszenz der Probe detektiert werden. Selbst mit ihren schmalen Bandbreiten besitzen LEDs Ausläufer, die später zu einem Hintergrund führen können. Daher muss das Anregungslicht unterdrückt werden. Dies kann mit Filtern geschehen. Im Falle der breitbandigen Glühlampe und der schmalbandigen LED müssen zunächst die unerwünschten Emissionswellenlängen geblockt werden. Im Falle des Lasers ist dies nicht vonnöten. Vor der Kamera muss dann anschließend sichergestellt werden, dass das komplette Spektrum der Anregung unterdrückt wird.

Ausgewählte Lösung Da eine breitbandige Glühlampe zu viele unterwünschte Emissionswellenlängen besitzt, die unterdrückt werden müssen, wird von diesem Leuchtmittel abgesehen. Durch die Begrenzung des Spektrums würde zudem die Intensität auf der Probe abnehmen, was zu niedrigeren Signalen führt. Ein Laser ist aus den genannten Gründen grundsätzlich nicht für eine großflächige Beleuchtung geeignet. Aus diesem Grund wird auch von dieser Lösung abgesehen. Es verbleibt die schmalbandige LED.

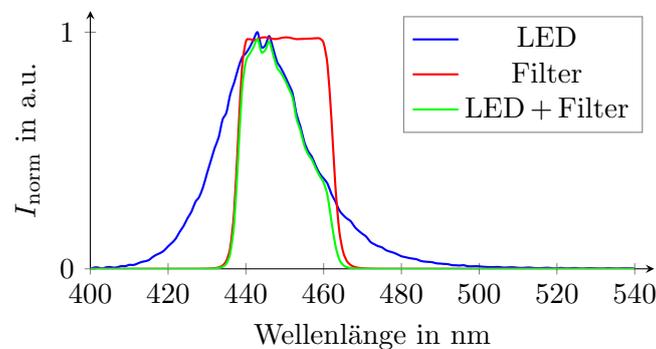


Abb. 4.19.: Spektrum der Beleuchtung. Die verwendete Leistungs-LED emittiert ein Spektrum von ca. 410 nm bis 485 nm. Um die Ausläufer, die einen Hintergrund in den Fluoreszenzaufnahmen generieren können, zu unterdrücken, wird das Spektrum mithilfe eines Bandpassfilters eingengt.²⁹

Die zum Zeitpunkt der Bearbeitung dieser Arbeit stärkste LED hat bei einer zentralen Emissionswellenlänge von 455 nm eine Halbwertsbreite von 18 nm und eine abgegebene Strahlungsleistung von 1 020 mW. Das glockenkurvenförmige Spektrum besitzt jedoch

²⁹Die Wiedergabe der gezeigten Spektren wurde von den Herstellern genehmigt. LED: SOLIS 445-C (<https://www.thorlabs.de/thorproduct.cfm?partnumber=SOLIS-445C>), Thorlabs, Inc.; Filter: 450/25 nm, #86-665 (2009), Edmund Optics GmbH, Karlsruhe.

Ausläufer bis knapp 500 nm, die durch den Einsatz eines Bandpassfilters entfernt wurden (s. Abb. 4.19). Gezeigt ist das Spektrum einer zu einem späteren Zeitpunkt erschienenen deutlich stärkeren LED, die bei gleichem Spektrum eine Leuchtleistung von 7,1 W besitzt. Dadurch konnte das Erscheinungsbild der Aufnahmen bei gleichzeitiger Reduzierung der Belichtungszeit deutlich verbessert werden (s. Abb. 4.20).

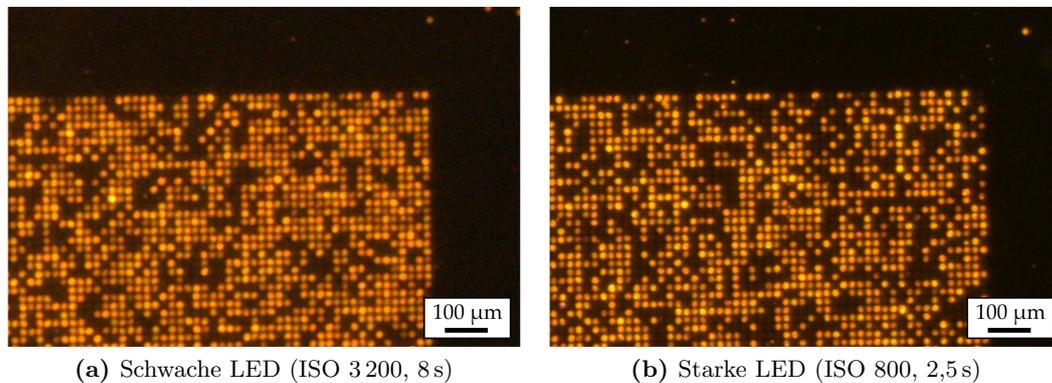


Abb. 4.20.: Auswirkungen der Beleuchtungsintensität auf die Qualität der Aufnahmen. (a) Bei Nutzung der schwachen LED muss mit 8 s relativ lange belichtet werden. Zudem ist die interne Verstärkung mit einem Wert von 3200 recht hoch. Das Resultat zeigt die einzelnen Partikel, jedoch ist die Qualität der Aufnahme nicht so gut wie bei Nutzung der starken LED. (b) Durch die starke LED kann die Belichtungszeit auf 2,5 s und die interne Verstärkung auf 800 reduziert werden. Gleichzeitig ist die Qualität der Aufnahme deutlich gestiegen.

Das resultierende Spektrum begrenzt sich damit im Rahmen der Güte der Filter auf 437 nm bis 463 nm. Das schmale Spektrum gepaart mit der hohen Leistung der LED stellt sicher, dass die QDs Erstens effizient angeregt werden und Zweitens die Intensität stark genug ist, um die Belichtungszeiten der Kamera gering zu halten.

Aufgabe #2 Neben der Auswahl des geeigneten Leuchtmittels gilt es, dieses möglichst effizient einzusetzen. Die Effizienz wird neben dem bereits behandelten nutzbaren Spektrum vom Winkel, unter dem die Beleuchtung auf die Probe trifft, beeinflusst. Der optimale Winkel soll experimentell ermittelt werden.

Möglichkeiten Entsprechend der geometrischen Freiheiten können Einfallswinkel von -90° bis 30° eingestellt werden. Größere Winkel sind nicht möglich, da das Gehäuse der LED dann mit dem Objektiv kollidieren würde. Im genannten Bereich wurden insgesamt sechs Aufnahmen erstellt (s. Abb. 4.21). Der Winkel von -90° gleicht einer Durchlichtbeleuchtung. Hier dominiert trotz entsprechendem Langpassfilter (LP) (s.u.) das blaue Anregungslicht, während nahezu keine Fluoreszenz erkennbar ist. Wird die Probe flach unter einem Winkel von -10° zur Horizontalen beleuchtet, nimmt der Hintergrund bereits deutlich ab, da nun weniger Licht direkt in das Objektiv fällt. Es ist bereits eine Fluoreszenz erkennbar. Bei einem Eintreffwinkel von 0° nimmt die Fluoreszenz wieder ab, bevor sie mit zunehmendem Einfallswinkel deutlich ansteigt.

Ausgewählte Lösung Das beste Signal-Hintergrund Verhältnis wird im Bereich von 10° bis 30° erreicht. Aus diesem Grund wird ein Einfallswinkel von 20° gewählt. Hier besteht

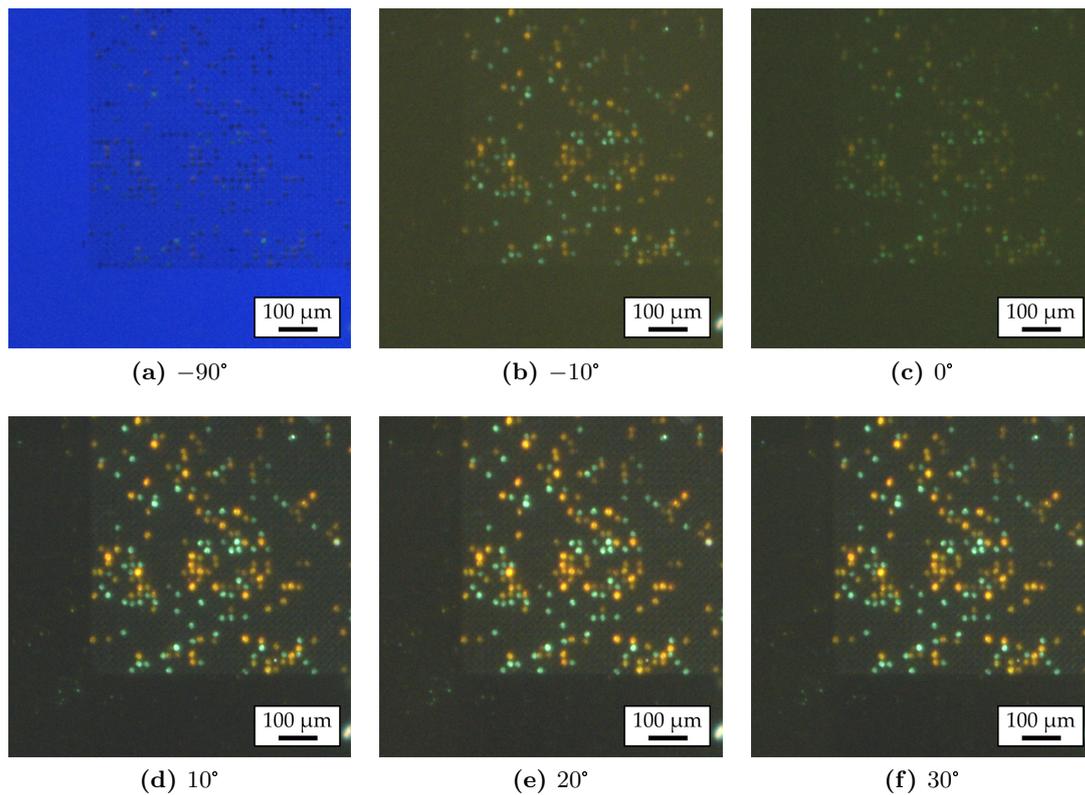


Abb. 4.21.: Winkel der Beleuchtung. Um den Einfluss unterschiedlicher Einstrahlwinkel der Beleuchtung auf die Fluoreszenzdetektion zu testen, wurden sechs Winkel eingestellt (a-f). Alle Aufnahmen wurden gleichermaßen in der Helligkeit und im Kontrast angepasst.

eine gute Erreichbarkeit der Probe und die Gefahr, dass reflektierte Strahlung einen Hintergrund erzeugt, ist minimal.

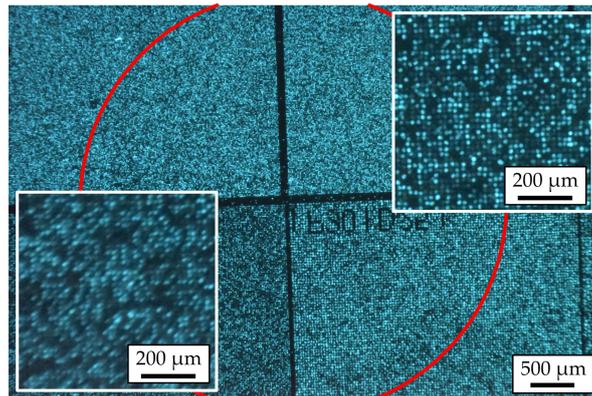
Probentisch

Analog zum Lasersystem befindet sich die Probe auf einem motorisierten Mikroskoptisch. Die Motorisierung erlaubt eine automatisierte Akquisition der benötigten Aufnahmen ohne ein manuelles Eingreifen des Anwenders.

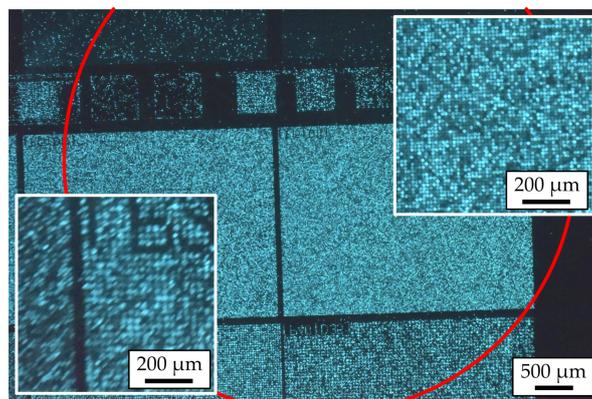
Objektiv

Aufgabe Das Objektiv muss die ausgesandte Fluoreszenz einfangen. Die Abbildungsleistung muss über das gesamte Gesichtsfeld einwandfrei sein, Abbildungsfehler sollen minimal sein. Zudem soll auf ein kommerzielles Objektiv aus der Tageslichtfotografie zurückgegriffen werden, da eine Eigenentwicklung deutlich zu teuer und zeitaufwendig ist. Die Vergrößerung, sprich der Abbildungsmaßstab, muss derart gewählt sein, dass die Mikropartikel eindeutig detektiert werden können.

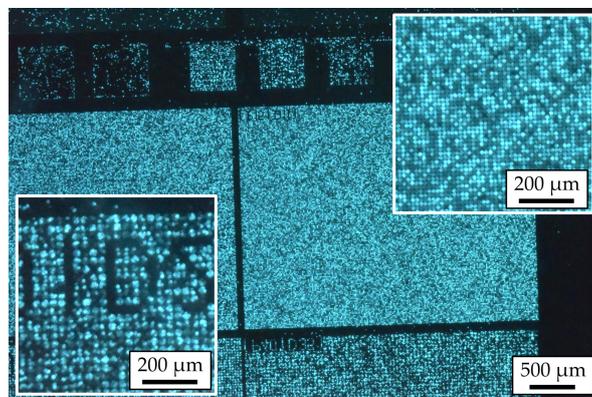
Möglichkeiten Zur Auswahl standen drei unterschiedliche Objektive mit Brennweiten um die 100 mm. Diese wurden freundlicherweise von der Fotostelle des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) bereitgestellt.



(a) Nikon 105 mm Makroobjektiv



(b) Zeiss 100 mm Makroobjektiv



(c) Nikon 85 mm Tilt-Shift Objektiv

Abb. 4.22.: Objektivauswahl. (a) Nikon AF-S VR Micro-Nikkor 105 mm 1:2,8G IF-ED Makroobjektiv. Der Bildkreis (rot) erfasst nicht das gesamte Gesichtsfeld. Daher treten in den Ecken starke Abbildungsfehler auf (s. Ausschnitt unten links). Die Bildfeldmitte löst die einzelnen Partikel gut auf (s. Ausschnitt oben rechts). (b) Carl Zeiss 100 mm / F2,0 MAKRO-PLANAR T* ZE Makroobjektiv. Der Bildkreis ist bereits deutlich größer als beim Nikon Makroobjektiv. Auch treten die Abbildungsfehler in den Ecken nicht derart ausgeprägt zur Geltung. In der Bildfeldmitte übersteigt die Abbildungsleistung die des Nikon Objektivs. (c) Nikon PC-E Micro Nikkor 85 mm 1:2,8D Tilt-Shift Objektiv. Bei diesem Objektiv ist der Bildkreis größer als das Bildfeld, wodurch die Abbildungsleistung in der Mitte wie auch in den Bildfeldecken einwandfrei ist.

Das erste Objektiv ist ein Makroobjektiv von Nikon mit einer Brennweite von 105 mm (AF-S VR Micro-Nikkor 105 mm 1:2,8G IF-ED) (s. Abb. 4.22a). Selbst bei optimaler Einstellung von Blende und Abbildungsmaßstab zeigen sich deutliche Abbildungsfehler in den Bildfeldecken. Diese sind derart stark ausgeprägt, dass der nutzbare Bereich lediglich die mittleren 50 % des Bildes belegt. Dieser als Bildkreis bezeichnete Bereich ist zur besseren Identifikation rot umrandet.

Zeiss ist für hochwertige Optiken bekannt. Da die Fotostelle des KIT sehr gute Erfahrungen mit dem Zeiss Makroobjektiv mit 100 mm Brennweite (Carl Zeiss 100 mm / F2,0 MAKRO-PLANAR T* ZE Makroobjektiv) gemacht hat, gleichwohl sich diese auf Portraitaufnahmen beschränken, wurde die Tauglichkeit des Objektivs für die Fluoreszenzdetektion hin überprüft (s. Abb. 4.22b). Die Abbildungsleistung ist der des Nikon Makroobjektivs überlegen, was Schärfe und Grad der Abbildungsfehler angeht. Durch den größeren Bildkreis kann bereits fast die gesamte Aufnahme genutzt werden. Die verbleibenden Bildfehler in den Ecken machen jedoch ein Aneinanderfügen mehrerer überlappender Aufnahmen unmöglich.

Das mit Abstand am besten abbildende Objektiv ist ein Tilt-Shift Objektiv von Nikon mit einer Brennweite von 85 mm (Nikon PC-E Micro Nikkor 85 mm 1:2,8D) (s. Abb. 4.22c). Mit einem Bildkreis, der größer als das Bildfeld ist, wird das gesamte Feld fehlerfrei abgebildet. Die Schärfe ist daher gleichbleibend hoch.

Ausgewählte Lösung Aufgrund der außergewöhnlichen Abbildungsleistung über das gesamte Feld wird das Tilt-Shift Objektiv von Nikon gewählt.

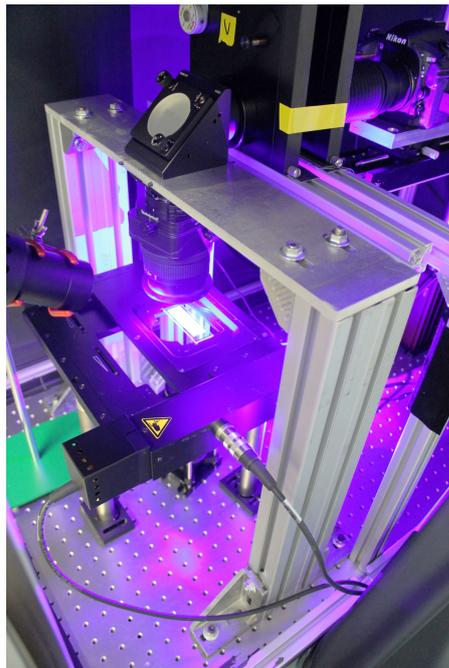
Objektivhalterung

Das Objektiv ist an einem Portal aus Boschprofilen befestigt und besitzt einen Arbeitsabstand von 50 mm. Dadurch haben auch hochbauende Proben wie beispielsweise Mikrofluidiksysteme unter dem Objektiv Platz. Zum Vergleich: In einem gewöhnlichen Mikroskop beträgt der Abstand zwischen Probe und Objektiv maximal 20 mm.

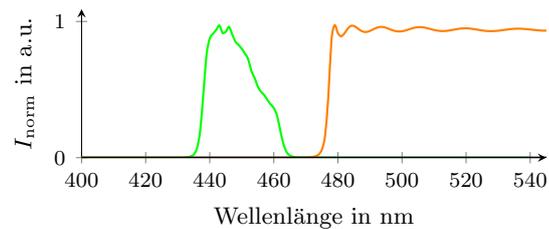
Um den Aufbau insgesamt niedrig zu halten, wird der Strahlengang nach dem Objektiv mithilfe eines 90°-Spiegels in die Horizontale geleitet (s. Abb. 4.23a).

Direkt im Anschluss an den Umlenkspiegel befindet sich ein Langpassfilter mit der Grenzwellenlänge von 475 nm. Mit einer optischen Dichte von 4 im Sperrbereich wird die Strahlung der LED dadurch um einen Faktor 150 000 reduziert (s. Abb. 4.23b+c). Somit kann mit der Kamera ein Bereich von 475 nm bis 600 nm erfasst werden. Die obere Grenze ergibt sich aus der Charakteristik der Kamera. Da diese derart optimiert ist, das menschliche Sehempfinden nachzubilden, nimmt die Quanteneffizienz ab 600 nm rapide ab.

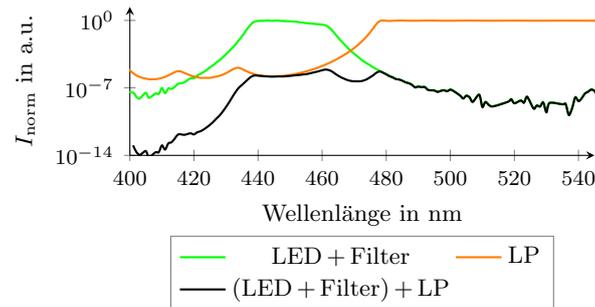
Mit diesem Aufbau können bereits Fluoreszenzaufnahmen erstellt werden. Besonders ist hierbei die Tatsache, dass ein breites Spektrum in einer Aufnahme abgedeckt werden kann. Ist eine Probe mit mehreren Fluorophoren oder QDs markiert, stellen sie sich in dieser sog. “no Filter”-Konfiguration als farblich voneinander unterscheidbare Objekte dar. Daneben hat diese Spezifikation weitere Vorteile: Das Bild ist heller, was das Auffinden und Fokussieren deutlich erleichtert. Zudem können auf diese Weise Komposite aus mehreren Kanälen in einer einzigen Aufnahme zusammengefasst werden. Diese Art der Fluoreszenzmikroskopie ist mit keinem bekannten System aus dem Stand der Technik möglich, da diese Systeme immer auf bestimmte Fluorophore ausgerichtet sind.



(a) Objektivhalterung



(b) Spektrum der Beleuchtung nach dem Langpassfilter



(c) Wie (b), aber semilogarithmisch dargestellt.

Abb. 4.23.: Objektivhalterung und Spektrum der Beleuchtung nach dem Langpassfilter (LP). (a) Objektivhalterung. (b+c) Das eingeeingte Spektrum der LED trifft auf die Proben. Für die Detektion der Fluoreszenz muss die Beleuchtung vor der Kamera möglichst stark unterdrückt werden. Hierfür wird ein Langpassfilter mit einer Grenzwellenlänge von 475 nm eingesetzt. Dadurch wird die Beleuchtung um einen Faktor 150 000 verringert.³⁰

Filterräder und Filter

Gefordert waren fünf unterschiedliche Fluoreszenzkanäle. Zudem soll das System automatisiert arbeiten. Daher wurden motorisierte Filterräder für jeweils fünf 2"-Filter gewählt. Um die Anforderung an die Anzahl der Fluoreszenzkanäle zu erfüllen, wurden zwei Filterräder hintereinander geschaltet.

Eine weitere Anforderung war der benutzerfreundliche Austausch der Fluoreszenzfilter. Aus diesem Grund wurden die Filterräder derart montiert, dass die Filter bequem von außen erreichbar sind. Somit können die Filter entsprechend der spezifischen Aufgabenstellungen der Benutzer ergänzt oder ausgetauscht werden. Die verwendeten Filter besitzen eine Halbwertsbreite von 10 nm. Die geringe Breite der Emission erhöht die Spezifität bei der Auslese von mit mehreren QDs gefärbten Proben. Folgende Filter befinden sich in der Standardspezifikation (s. Abb. 4.24): 500 nm (blau), 532 nm (hellgrün), 560 nm (grasgrün) und 589 nm (orange).

³⁰Die Wiedergabe des gezeigten Spektrums wurde von Edmund Optics GmbH, Karlsruhe genehmigt. LP: Langpassfilter 475 nm, #84-749 (2009).

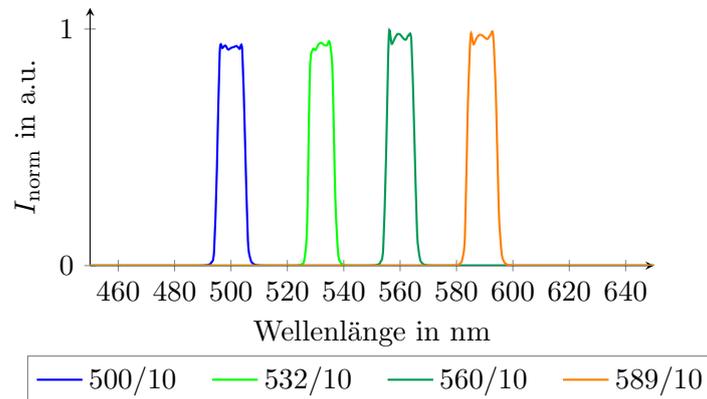


Abb. 4.24.: Spektren der Fluoreszenzfilter.³¹ Die erste Zahl steht für die Zentralwellenlänge, die zweite Zahl für die Bandbreite.

Montage der Kamera

Aufgabe Die Montage der Kamera muss sicherstellen, dass sie vibrationsfrei auslösen kann und sich während des Belichtungsprozesses nicht bewegt. Des Weiteren steht und fällt die Güte der erzielten Aufnahmen mit der Fokussierung. Dieses zentrale Element der Bildgenerierung muss zuverlässig umgesetzt werden.

Möglichkeiten Eine vibrationsfreie Montage ist durch eine massive Unterkonstruktion möglich. Die größere Herausforderung stellt der Fokussierungsprozess dar. Dies könnte durch den manuellen Fokusserring des Objektivs geschehen, während man das Livebild der Kamera auf dem Bildschirm beobachtet. Dies ist aus zwei Gründen jedoch nicht möglich. Zum einen haben bereits kleinste Verdrehungen große Auswirkungen auf die Fokusebene. Zum anderen kann aufgrund der geringen Lichtverhältnisse bei der Fluoreszenzmikroskopie die LiveView-Funktion der Kamera nicht zum Fokussieren genutzt werden – man sehe nur einen schwarzen Bildschirm. Daher muss eine Reihe von Testbelichtungen an unterschiedlichen Fokuspositionen angefertigt werden, die am Bildschirm ausgewertet werden müssen. Das Verhältnis von Verfahrweg zu Änderung der Fokusebene ist beim Verschieben der Kamera im Gegensatz zum manuellen Fokusserring des Objektivs deutlich größer, was eine feinfühligere Fokussierung ermöglicht.

Dabei kann die Kamera auf drei Arten verschoben werden. Wird die Kamera auf einer Schiene montiert, kann die Kamera manuell verschoben werden. Da die Fokusebene aber auf weniger als 1 mm genau getroffen werden muss, ist ein manuelles Verschieben nicht zielführend. Zudem können unterschiedliche Fokusebenen nicht reproduzierbar angefahren werden, wenn die Probe beispielsweise unterschiedliche Substratdicken aufweist.

Eine feinfühligere Manipulation erlauben Linearverfahreinheiten. Durch Verdrehen einer Stellschraube kann der Fokus genau eingestellt werden. Sofern die Stellschraube über einen Indikator verfügt, können somit unterschiedliche Fokusebenen reproduzierbar angefahren werden.

Die beiden vorgestellten Verfahrmeechanismen eint, dass sie ein manuelles Eingreifen des Anwenders erfordern. Der Aufbau müsste jedes Mal vom Anwender geöffnet, die Kamera-

³¹Die Wiedergabe der gezeigten Spektren wurde von Edmund Optics GmbH, Karlsruhe genehmigt. 500/10: Art.-Nr. #65-210 (2009); 532/10: Art.-Nr. #65-216 (2009); 560/10: Art.-Nr. #88-017 (2009); 589/10: Art.-Nr. #65-223 (2009).

halterung gelöst, die Kamera verschoben und dann alles wieder fest und zugemacht werden. Um den Fokussierprozess effizienter zu gestalten, kann die Kamera auf einer motorisierten Linearachse montiert werden. In diesem Fall könnte der gesamte Prozess automatisiert und reproduzierbar ablaufen.

Ausgewählte Lösung Die Kamera ist 30 cm vom Objektiv entfernt montiert. Der große Abstand erhöht die Vergrößerung, um die geforderte Auflösung von $<10 \mu\text{m Px}^{-1}$ zu erreichen. Huckepack auf einer motorisierten Linearachse montiert kann der Fokussierprozess ohne manuelles Eingreifen des Anwenders von PC aus gesteuert werden.

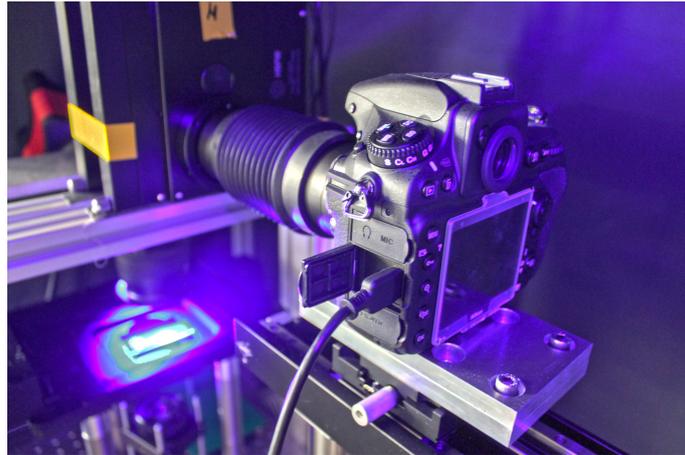


Abb. 4.25.: Kamerahalterung. Die Kamera ist auf einer motorisierten Linearachse montiert. Dadurch kann eine automatisierte Fokussierung erfolgen.

Peripherie

Wie das Lasersystem auch ist das optische System auf einem optischen Tisch montiert. Dieser bietet einerseits durch die rasterförmig angeordneten Gewindelöcher Befestigungsmöglichkeiten für die Aufbauten und andererseits minimiert die schwingungsdämpfende Sandwichbauweise Vibrationen, die bei längeren Belichtungszeiten zu verschwommenen Aufnahmen führen könnten. Bei der Fluoreszenzmikroskopie soll lediglich das emittierte Licht der Proben detektiert werden – das Umgebungslicht muss dafür komplett ausgeblendet werden. Dies geschieht mit einem speziellen Stoff, der das komplette System vom Umgebungslicht abschirmt. Um die Zugänglichkeit für Wartung und Nutzung des Systems zu gewährleisten, wurde der Stoff mithilfe von Magnetbändern an einer Konstruktion aus Boschprofilen befestigt. Sämtliche elektronischen Bauteile – Mikroskoptisch, Filterräder, Linearachse und Kamera – können von einem externen Computer aus bedient werden.

4.2.3. Software

Auch für dieses System wurde eine grafische Benutzeroberfläche erstellt. Sie erlaubt den Zugriff auf alle erwähnten Baugruppen. Bevor mit den eigentlichen Aufnahmen begonnen werden kann, muss die Kamera auf die Probe fokussiert werden. Hierfür wird, wie bereits erwähnt, die Linearachse genutzt. An verschiedenen Positionen entlang der optischen Achse werden Einzelbelichtungen angefertigt, an den PC übertragen und angezeigt. Um dem Nutzer die Auswertung der Schärfe abzunehmen, evaluiert die Software jedes Bild und

zeigt die Schärfe in Form des erzielten Kontrasts auf einem Graphen an. Nachdem alle vom Nutzer geforderten Belichtungen abgeschlossen sind kann der Nutzer an die Position mit dem höchsten Kontrast verfahren und mit den eigentlichen Aufnahmen beginnen.

Der Prozess der Bildakquisition läuft dabei folgendermaßen ab:

- **Initialisierung** Der Nutzer verfährt mithilfe des Mikroskoptisches an die Startposition. Weiterhin gibt er an, welche Kanäle erfasst werden sollen und welche Kameraparameter für die jeweiligen Kanäle verwendet werden sollen. Die Kameraparameter umfassen die Belichtungszeit und die ISO-Einstellung. Zuletzt wird angegeben, in welchen Schritten und wie oft der Mikroskoptisch verfahren soll, um die geforderte Fläche abzurastern.
- **Startkonfiguration** Die Filterräder rotieren zum gewünschten Kanal, die Kamera wird auf die gesetzten Parameter eingestellt und der Mikroskoptisch verfährt an die geforderte Startposition.
- **Schleife** Die Kamera erstellt und speichert die erste Aufnahme. Anschließend verfährt der Mikroskoptisch an die nächste Position, wo die Kamera erneut eine Aufnahme erstellt. Diese Schleife wird solange fortgeführt, bis das gesamte Substrat erfasst wurde.
- **Filterwechsel** Nachdem ein Kanal vollständig erfasst wurde, verdrehen sich die Filterräder zur nächsten Position. Danach beginnt die Schleife erneut: Anfahren der Position, Aufnahme, Verfahren zur nächsten Position usw.
- **Abbruchkriterium** Sobald alle Kanäle erfasst sind, wird die Schleife beendet.

Analog zum SPT wird im Folgenden überprüft, welche gestellten Anforderungen durch den beschriebenen Aufbau erfüllt werden konnten:

Tab. 4.3.: Erfüllte Anforderungen an das optische System.

Anforderung	Stand
Auflösung	
Gesichtsfeld	
Abbildungsfehler	
Fluoreszenzkanäle	erfüllt
Arbeitsabstand	erfüllt
Anregung	erfüllt
Hochdurchsatz	

5. Ergebnisse

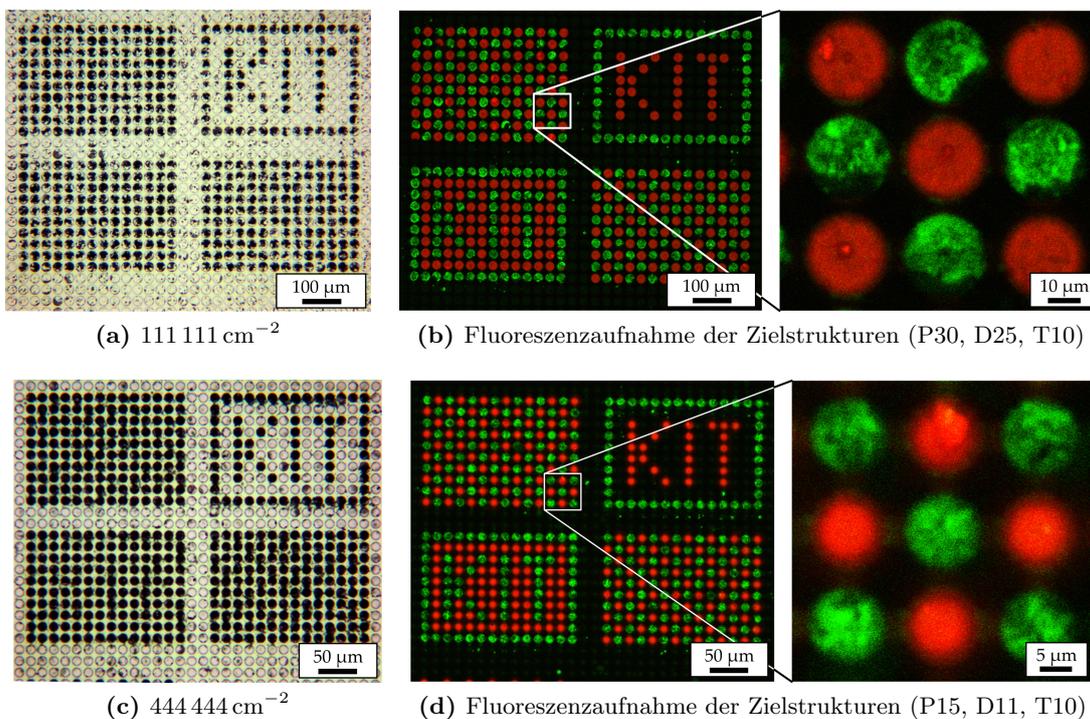
5.1. Selective Particle Transfer

Die übertragenen Monomere sollen an die funktionalisierte Oberfläche kuppeln. Der Nachweis soll erbracht werden.

Mit dem Lasersystem und der entwickelten Methode des Selective Particle Transfer wurden daher drei Proof-of-principle Experimente durchgeführt, je ein Experiment pro geforderter Spotdichte. Dabei werden die Ergebnisse der Synthese samt nachfolgender Auswertungen zur Reproduzierbarkeit, der Streuung, der gewonnenen Fluoreszenzwerte und dem übertragenen Gold vorgestellt. Im Anschluss daran werden die Systemparameter – der Laserfokus sowie die Prozesszeit – präsentiert.

5.1.1. Proof-of-principle Experimente

Mit den benannten Strukturkombinationen für den Transfer “klein in groß” und den Transfer 1:1 konnten die drei geforderten Spotdichten von $111\,111\text{ cm}^{-2}$, $444\,444\text{ cm}^{-2}$ und $1\,000\,000\text{ cm}^{-2}$ erfolgreich umgesetzt werden (s. Abb. 5.1a,c,e). Nach den in Kapitel 2.1.3 beschriebenen Schritten zum Kuppeln, Waschen, Blocken, Entschützen und Anfärben der Monomere wurden die Substrate in einem konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop (TCS SP-5, Leica Microsystems) untersucht. Grüne Signale stammen von mit fluoreszenzmarkier-



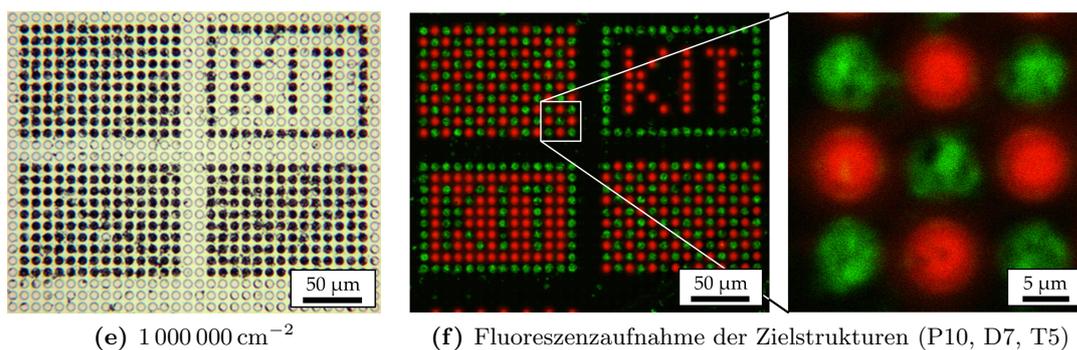


Abb. 5.1.: Proof-of-principle Experimente zum Selective Particle Transfer. (a,c,e) Lichtmikroskopaufnahmen der transferierten Monomerpartikel bei unterschiedlichen Spotdichten. (b,d,f) Fluoreszenzaufnahme nach der Synthese und dem Anfärben mit Fluoreszenzfarbstoffen. Rote Signale entsprechen gekoppeltem Glycin, grüne Signale gekoppeltem Biotin. (P: Pitch in μm ; D: Durchmesser in μm ; T: Tiefe in μm).³²

tem Streptavidin gefärbten Biotin, rote Signale von mit fluoreszenzmarkiertem NHS-Ester gefärbten Glycin.

Auswertung Physikalischer Transfer

Die übertragenen Partikelmuster wurden hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit und der Streuung der Partikel untersucht. Der folgende Abschnitt wurde aus der Veröffentlichung des Autors übersetzt³³:

Die Reproduzierbarkeit wurde anhand der gewonnenen Lichtmikroskopaufnahmen der übertragenen Partikel ermittelt (s. Abb. 5.1a,c,e). Durch einen Vergleich des in das System eingelesenen Musters mit dem übertragenen Muster kann die Reproduzierbarkeit als Quotient der wirklich gefüllten und den theoretisch gefüllten Zielstrukturen definiert werden. Mithilfe der beschriebenen Absorptionsschicht zur Minimierung der notwendigen Energie zum Übertrag konnte eine Reproduzierbarkeit von 99,9 % für die Spotdichten von $111\,111\text{ cm}^{-2}$ und $444\,444\text{ cm}^{-2}$ und eine Reproduzierbarkeit von 99,5 % für die höchste Spotdichte von $1\,000\,000\text{ cm}^{-2}$ erreicht werden (s. Tab. 5.1). Die geringere Reproduzierbarkeit für die höchste Spotdichte kann mit den Toleranzen des Lasersystems begründet werden. Die Positionierung des Laserspots auf den Substraten kann mit einer Genauigkeit von $\pm 1\ \mu\text{m}$ erfolgen. Der Mikroskopoptisch weist dieselbe Genauigkeit auf, was zu einem maximalen Fehler von $2\ \mu\text{m}$ führt. Somit kann es vorkommen, dass der Laser eine Struktur nicht vollständig belichtet. Die Fluktuationen der absorbierten Energie können dann dazu führen, dass das Gold nicht ablatiert wird und folglich kein Transfer stattfindet.

Die Streuung ist durch den Quotient des Volumens gestreuter Partikel und des Volumens der tatsächlich übertragenen Partikel definiert. Für alle drei untersuchten Spotdichten lag die Streuung bei $< 4\%$ (s. Tab. 5.2). Dabei führte die Streuung nicht zu Kontaminationen benachbarter Vertiefungen, sondern lediglich zu einer Belegung der Stege zwischen den Vertiefungen.

³²Reproduced with permission.^[31] © 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

³³Reproduced with permission.^[31] © 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

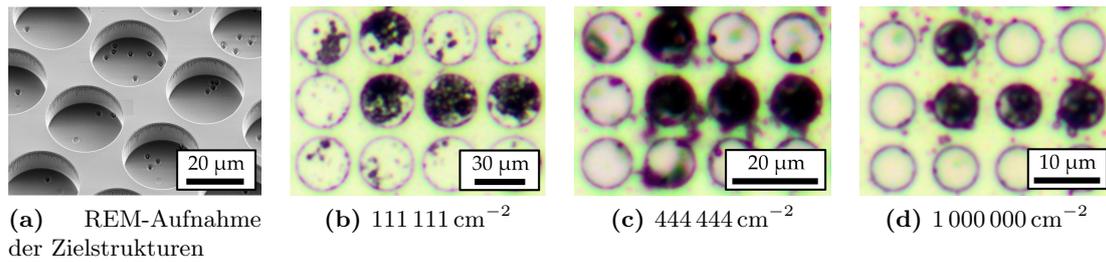


Abb. 5.2.: Reproduzierbarkeit und Streuung. (a) REM-Aufnahme des Zielträgers, mit dem die Spotdichten von 111 111 cm⁻² und 444 444 cm⁻² durchgeführt wurden. Es sind Defekte sichtbar, die vom Ätzprozess herrühren und Größenordnungen der verwendeten Partikel besitzen. Diese wurden bei der Analyse der Streuung beachtet und ausgeschlossen. (b-d) Ausschnitte von Abbildung 5.1 (a,c,e), die zur Analyse der Streuung genutzt wurden.³⁴

Tab. 5.1.: Reproduzierbarkeit.³⁵

Spotdichte in cm ⁻²	Anzahl Spots	Übertragene Spots	Reproduzierbarkeit in %
111 111	980	979	99,9
444 444	1 470	1 469	99,9
1 000 000	1 470	1 462	99,5

Tab. 5.2.: Streuung.³⁶

Spotdichte in cm ⁻²	Volumen Ausgangsstrukturen in µm ³	Volumen gestreute Partikel in µm ³	Streuung in %
111 111	1 155	41,9	3,6
444 444	950	37,7	4,0
1 000 000	98	3,7	3,7

Auswertung Fluoreszenzfärbung

Entsprechend des Syntheseprotokolls (s. Anhang A.5.2) wurden die Glycin- und Biotinmonomere gekuppelt und mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt. Die gewonnenen Fluoreszenzaufnahmen wurden anschließend hinsichtlich der Homogenität der Signale statistisch ausgewertet. Der folgende Abschnitt wurde aus der Veröffentlichung des Autors übersetzt³⁷:

Für jeden Spot wurde sein Mittelwert und Median der Intensität ermittelt. Um die Intensitäten zu charakterisieren, wurden drei Arraykategorien **X**, **Y** und **Z**

³⁴Reproduced with permission.^[31] © 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

³⁵Reproduced with permission.^[31] © 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

³⁶Reproduced with permission.^[31] © 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

³⁷Reproduced with permission.^[31] © 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

genutzt – \mathbf{X} ist die Liste der Mittelwerte, \mathbf{Y} die Liste deren Mediane und \mathbf{Z} die Liste der Intensitäten leerer Vertiefungen.

Die Streudiagramme (engl. scatter plot) der Mediane \mathbf{Y} über den Mittelwerten \mathbf{X} jeder Spotdichte zeigen die Intensitätsverteilungen innerhalb der Spots (s. Abb. 5.3a-c). Diese Verteilungen können mit dem Variationskoeffizient

$$v = \frac{\sigma(\mathbf{X})}{\bar{x}_{\text{arithm}}(\mathbf{X})} \quad (5.1)$$

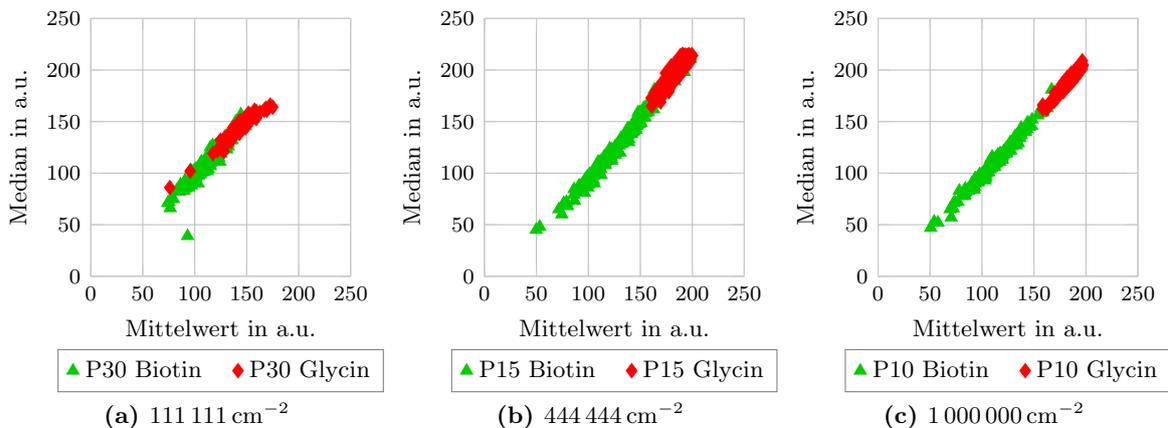
numerisch quantifiziert werden, wobei die Standardabweichung σ auf den Mittelwerte \bar{x}_{arithm} normiert wird. Die in den Fluoreszenzaufnahmen sichtbare granulare Struktur der Biotinsignale kann auf die schlechte Löslichkeit des Biotin-OPfp in DCM während der Herstellung der Partikel zurückgeführt werden. Während Glycin bei einer Konzentration von 10 % (m/m) problemlos in der Polymermatrix gelöst werden kann, formen sich bei der gleichen Konzentration mit Biotin Agglomerate aus. Dieser Effekt lässt sich auch im geringeren Variationskoeffizient v der Glycinspots von $<7\%$ im Vergleich zu $<19\%$ der Biotinspots erkennen (s. Abb. 5.3d).

Um die Heterogenität der Spots, also die unterschiedlichen Intensitäten gleicher Spots darzustellen, wurde ein Histogramm aller Spots generiert (s. Abb. 5.3e). Auch hier zeigen sich die Folgen der schlechten Löslichkeit des Biotin-OPfp durch zwei deutlich unterschiedliche Standardabweichungen von 74 a.u. für Biotin und 24 a.u. für Glycin.

Das Signal-Rausch Verhältnis (engl. signal-to-noise ratio, kurz SNR)

$$\text{SNR} = \frac{\bar{x}_{\text{arithm}}(\mathbf{X}) - \bar{x}_{\text{arithm}}(\mathbf{Z})}{\sigma(\mathbf{Z})} \quad (5.2)$$

beschreibt das Verhältnis der realen Fluoreszenz (Differenz zwischen Intensität der Spots \mathbf{X} und der Intensität leerer Vertiefungen \mathbf{Z}) und der Standardabweichung leerer Vertiefungen der jeweiligen Spotdichte (s. Abb. 5.3f). In allen drei Spotdichten konnten mit >15 relativ hohe SNR gemessen werden.



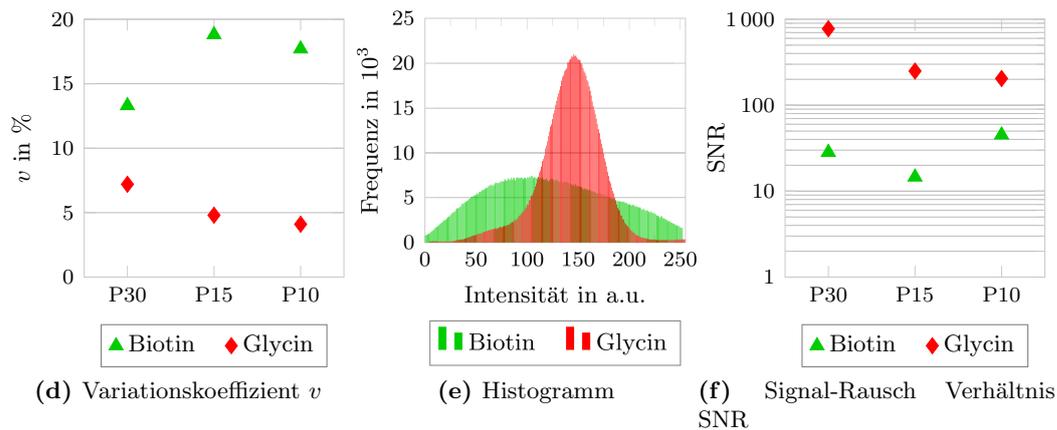


Abb. 5.3.: Auswertung der Fluoreszenz. (a-c) Streudiagramme der Biotin- und Glycin-spots für alle drei verwendeten Spotdichten. Gezeigt sind die Mediane über den Mittelwerten. (d) Variationskoeffizient v für jeden Kanal in jeder Spotdichte. (e) Im Histogramm aller Spots in beiden Kanälen spiegelt sich die Inhomogenität der Biotinspots gegenüber den homogenen Glycinspots wieder. (f) Signal-Rausch Verhältnis für jeden Kanal in jeder Spotdichte. Das niedrige SNR der Biotinspots kann mit dem hohen Variationskoeffizient erklärt werden, der von der schlechten Löslichkeit des Biotin-OPfp in der Partikelmatrix herrührt.³⁸

5.1.2. Systemparameter

Nach den erfolgten Proof-of-principle Experimenten werden nun die entscheidenden Systemparameter vorgestellt. Diese teilen sich in die Bestimmung des Laserfokus, der Laserfluenz, in die Substratneigung und die Betrachtung der notwendigen Prozesszeit auf.

Laserfokusbereich und -fluenz

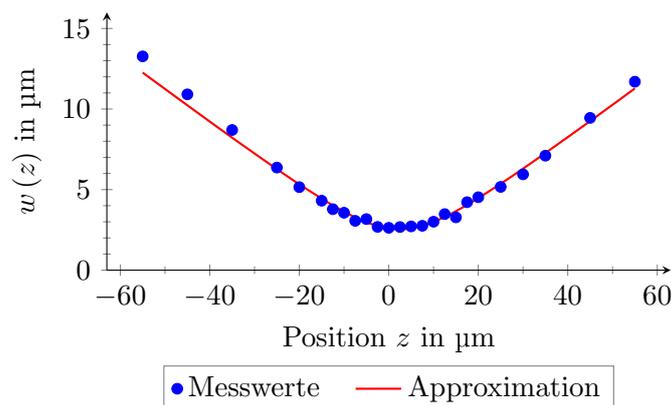


Abb. 5.4.: Strahlradius $w(z)$ entlang der optischen Achse. Zu beachten ist, dass hier die bereits umgerechneten Werte dargestellt sind. Der minimale Strahldurchmesser beträgt $d_{\sigma,x} = 5,1 \mu\text{m}$.^[16]

³⁸Reproduced with permission.^[31] © 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Der Laserfokus wurde nach ISO/TR 11146-3:2004 mithilfe der Methode der beweglichen Schneide ermittelt (s. Kap. 2.1.1).

Mit dem beschriebenen Verfahren kann der Fokusbereich d_σ bestimmt werden. Dieses Verfahren wird an unterschiedlichen Positionen z entlang der optischen Achse wiederholt. Die einzelnen Messwerte können anschließend mit der Funktion des Strahlradius $w(z)$ (Formel 2.1) approximiert werden (s. Abb. 5.4).

Mithilfe der gewonnenen Daten können alle relevanten Strahlparameter bestimmt werden (s. Tab. 5.3).

Tab. 5.3.: Ergebnisse der Strahlvermessung.^[16]

		x	y
Durchmesser	d_σ	5,1 μm	6,5 μm
Beugungsmaßzahl	M_σ^2	1,7	1,9
Divergenz	Θ_σ	12,8°	14,2°
Rayleighlänge	$z_{R,\sigma}$	22,7 μm	32,9 μm

Wie viel Energie wird pro Flächeneinheit in den Ausgangsträger eingebracht? Eine direkte Messung ist aufgrund des geringen Laserfokus und der zu erwartenden Fluenz, die einen Sensor leicht irreparabel schädigen kann, nicht möglich. Daher wird dieser Frage durch eine Abschätzung begegnet. Folgende Annahmen wurden dabei getroffen:

- Der Laser besitzt eine maximale Pulsenergie von $E_{\text{Puls}} = 350 \mu\text{J}$.
- Zum Transfer wird ein Einzelpuls genutzt.
- Um die Leistung des Lasers voreinzustellen, werden Neutralsichtfilter mit unterschiedlichen optischen Dichten (OD) in den Strahlengang eingeklappt.
- Zudem wird der Laser bei unterschiedlichen Leistungen, angegeben in $\%_{\text{Laser}}$, betrieben.
- Es wird ein extrafokal defokussierter Laser mit unterschiedlichen Radien w genutzt.

Somit kann die Laserfluenz Φ abgeschätzt werden:

$$\Phi = \frac{E_{\text{Puls}} \cdot 10^{-\text{OD}} \cdot \%_{\text{Laser}}}{\pi w^2} \tag{5.3}$$

Tab. 5.4.: Laserfluenzen bei unterschiedlichen Spotdichten.

Spotdichte in cm^{-2}	OD	$\%_{\text{Laser}}$	Fokusbereich messer w in μm	Laserfluenz Φ in J cm^{-2}
111 111	1,3	42	25	1,5
444 444	1,3	37	11	6,8
1 000 000	2,0	45	7	4,1

Für die drei Spotdichten ergeben sich Fluenzen von $1,5 \text{ J cm}^{-2}$ bis $6,8 \text{ J cm}^{-2}$ (s. Tab. 5.4). Damit liegen die Fluenzen in dem in der Literatur angegebenen Bereich für die Ablation von Metallen mit Nanosekundenlasern^[51].

Substratneigung

Die mechanische Aufnahme des Substrate erzeugt zwangsmäßig eine Neigung. Der Zielträger liegt zwar an beiden Enden der langen Kante auf, jedoch ist die Aufnahme des Ausgangsträgers nur an einer Seite mit der 3-Achs-Verfahreinheit verbunden. Zudem wird der Ausgangsträger durch eine Feder in der Verfahreinheit auf den Zielträger gepresst.

Um die Notwendigkeit der Fokuskontrolle zu belegen, wurde die Neigung des Substratpakets bestimmt. Hierfür wurde die Position des Laserfokus an drei Positionen vermessen und daraus eine Ebene ermittelt (s. Abb. 5.5). Aus den gewonnenen Werten konnte die Neigung ermittelt werden (s. Tab. 5.5).

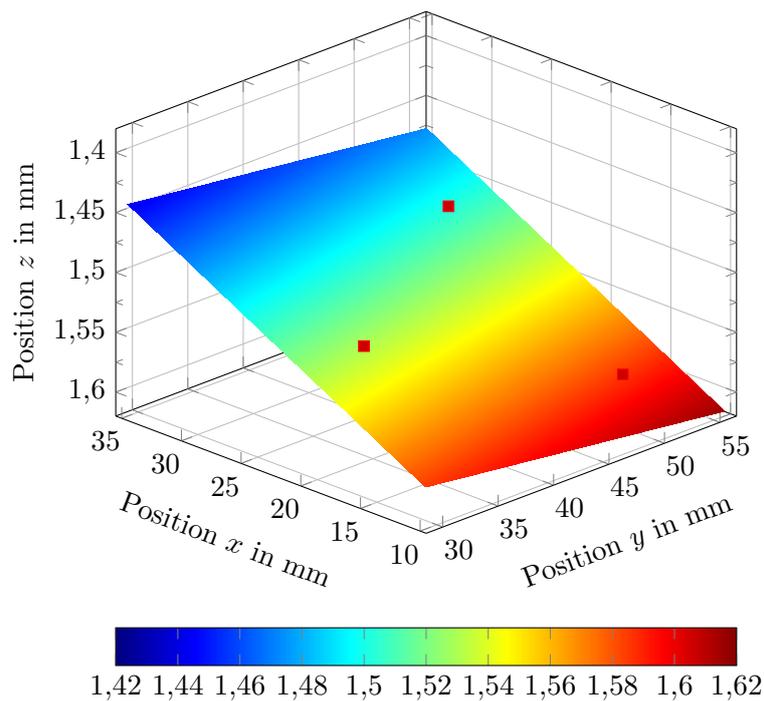


Abb. 5.5.: Substratneigung. Durch die einseitige Einspannung des Ausgangsträgers an der y -Kante liegt das Substratpaket nicht orthogonal zur optischen Achse des Lasers.³⁹

Tab. 5.5.: Substratneigung. Der Höhenunterschied Δz bezieht sich auf eine Fläche von $25 \text{ mm} \times 25 \text{ mm}$.^[16]

	Neigung	Δz in μm	Intensitätsunterschied
x	$-0,327^\circ$	$-142,5$	125
y	$0,066^\circ$	$28,6$	7

Würde der Fokus nicht nachgeführt werden, würde die Intensität auf dem Substrat um einen Faktor 125 variieren. Auf dieser Grundlage wäre die zu bearbeitende Fläche viel zu gering. Aus diesem Grund wird der Laser nachgeführt.

³⁹Reproduced with permission.^[31] © 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Prozesszeit

Die Anforderung an die Hochdurchsatzkompatibilität wird von mehreren Faktoren beeinflusst. Neben der Tatsache, dass der Transfer erfolgreich vonstatten gehen soll, muss der notwendige Zeitbedarf betrachtet werden. Ein Prozessschritt, respektive eine Lage eines Peptidarrays, darf nicht länger als einen Arbeitstag mit 8 h benötigen. Um dieser Anforderung gerecht zu werden, wurden die Prozesszeiten für 10 000 Spots gerechnet, wobei 20 unterschiedliche Monomere genutzt werden.

Eine der beiden Transfermethoden bedarf einer Positionierung des Ausgangs- über dem Zielträger. Daher wird zwischen den Transferarten mit Positionierung und ohne Positionierung unterschieden.

An einem Arbeitstag müssen fünf Prozessschritte durchgeführt werden (s. Abb. 5.6a+c). Bei den Transferarten mit Positionierung teilt sich die Prozesszeit dabei zur Hälfte auf die Synthese und zur Hälfte auf den SPT auf. In den letzten Jahren wurde das Syntheseprotokoll in der Arbeitsgruppe des Autors in Zusammenarbeit mit der Firma PEPperPRINT optimiert, sodass an dieser Stelle keine zeitlichen Veränderungen möglich sind. Damit verbleibt die Zeit für den SPT. Hier findet eine Dreiteilung statt. Ein Drittel der Zeit muss für die Positionierung des Ausgangsträgers über dem Zielträger angesetzt werden. Ein weiteres Drittel wird für die softwareseitigen Korrekturen des Winkels und des Fokus benötigt, bevor im letzten Drittel der eigentliche Transfer stattfindet. Somit müssen insgesamt 8 h und 15 min für eine Lage eingeplant werden.

Müssen die Substrate nicht positioniert werden, können pro Arbeitstag 100 min eingespart werden. Damit reduziert sich der Gesamtzeitbedarf pro Lage auf 6 h und 35 min.

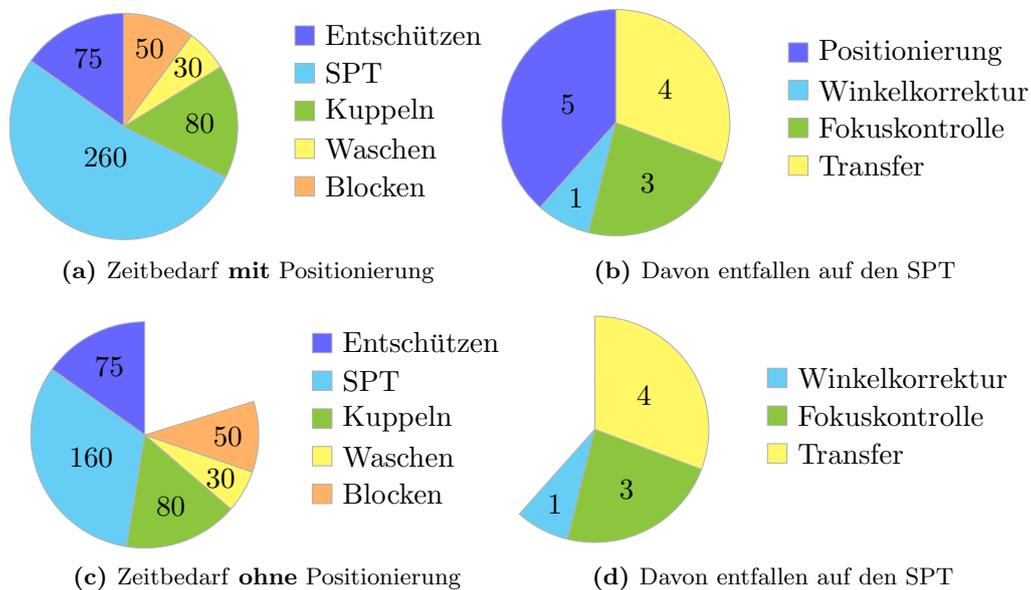


Abb. 5.6.: Prozesszeiten des Selective Particle Transfer. (a) Werden die Substrate übereinander positioniert, kann eine Lage in 8 h und 15 min fertiggestellt werden. (b) Dabei entfallen pro Monomer 13 min auf den SPT. (c) Kann auf die Positionierung verzichtet werden, reduziert sich der Zeitbedarf pro Lage um 100 min auf 6 h und 35 min. (d) Die Einsparung resultiert aus dem Wegfall der Positionierung. Alle Angaben in min.

5.1.3. Der Selective Particle Transfer bei Multilagenexperimenten

Einfluss der Laserstrahlung

Die Proof-of-principle Experimente belegen, dass der Selective Particle Transfer für eine Monolage genutzt werden kann. Wie sieht es jedoch aus, wenn komplexere Bibliotheken aus mehreren Lagen synthetisiert werden sollen? Durch die iterative Wiederholung der gesamten Prozessschritte soll gezeigt werden, wie groß der Einfluss der Laserstrahlung auf die funktionalisierte Oberfläche des Zielträgers ist. Um diesen Einfluss zu untersuchen, wurden die Modellpeptide des humanen Influenza Hämagglutinins (HA, Sequenz N→C YPYDVPDYA) und des FLAG-Peptids (N→C DYKDDDDK) mithilfe der Transfermethode “klein in groß” synthetisiert, mit entsprechenden Antikörpern markiert und in einem Fluoreszenzscanner detektiert (Protokoll s. Anhang A.5.3). Entsprechend der Länge der Peptide ergeben sich insgesamt neun Iterationen.

Auf den Scanbildern zeigt sich die bearbeitete Fläche als dunkler Bereich (s. Abb. 5.7). Dies kann auf eine verminderte Funktionalität der Oberfläche hindeuten. Durch die Absorption von Laserlicht könnte die funktionalisierte Oberfläche Schicht für Schicht abgebaut werden. Eigentlich müsste ein Schachbrett aus den beiden Peptiden, die mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert wurden, zu sehen sein. Die vereinzelt hellen Flecken sind dabei Rückstände der Inkubationslösung, die nicht vollständig entfernt werden konnten. Folglich konnte in diesem Experiment die Tauglichkeit des Selective Particle Transfer für ein Multilagenexperiment nicht belegt werden.

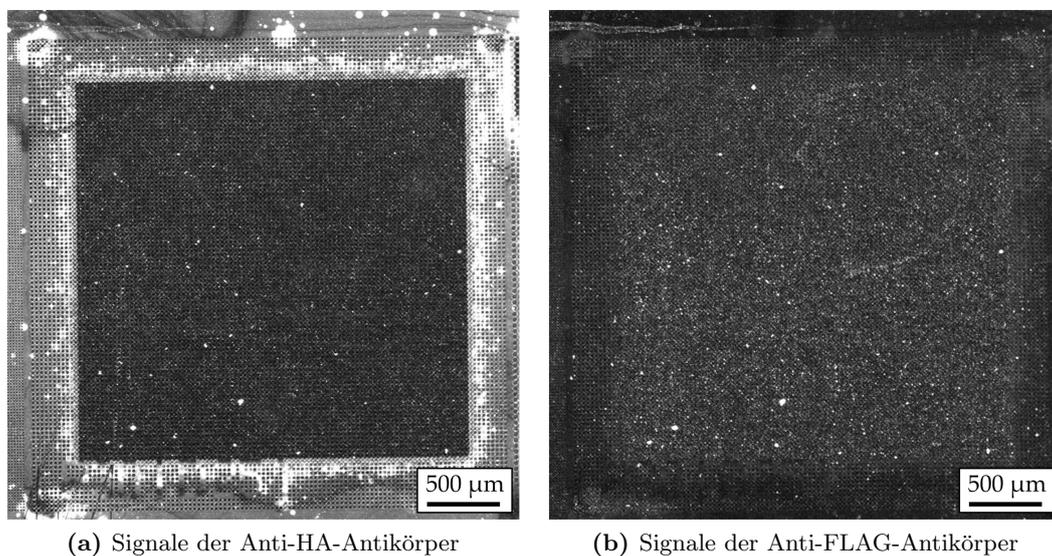


Abb. 5.7.: Multilagenexperiment. Über neun Lagen wurden die Peptide HA und FLAG mithilfe der Transfermethode “klein in groß” synthetisiert. (a) Signale der Anti-HA-Antikörper. Es sind keine spezifischen Signale von synthetisierten Peptiden erkennbar. Stattdessen zeichnet sich der bearbeitete Bereich vor dem helleren unbearbeiteten Bereich ab. (b) Signale der Anti-FLAG-Antikörper. Auch hier sind keine spezifischen Signale erkennbar. Beide Aufnahmen wurden in der Helligkeit und im Kontrast angepasst.

Direkte Belichtung der Syntheseoberfläche

Um die Ursache für die Untauglichkeit zu untersuchen, wurde ein Folgeexperiment vollzogen. Eine funktionalisierte Oberfläche wurde direkt mit dem Laser belichtet. Dabei wurden unterschiedliche Laserfokussdurchmesser und -leistungen genutzt. Anschließend wurde die gesamte Oberfläche mit einem Fluorophor angefärbt (Protokoll s. Anhang A.5.4). Werden für die Belichtung die gleichen Einstellungen genutzt wie für den Transfer, so lassen sich an den Vertiefungen des Zielträgers keine Beschädigungen erkennen (s. Abb. 5.8a). Erst beim Blick auf die entsprechende Fluoreszenzaufnahme zeigt sich der negative Einfluss der Laserstrahlung. Die meisten Vertiefungen zeigen die gleiche Intensität wie nicht belichtete

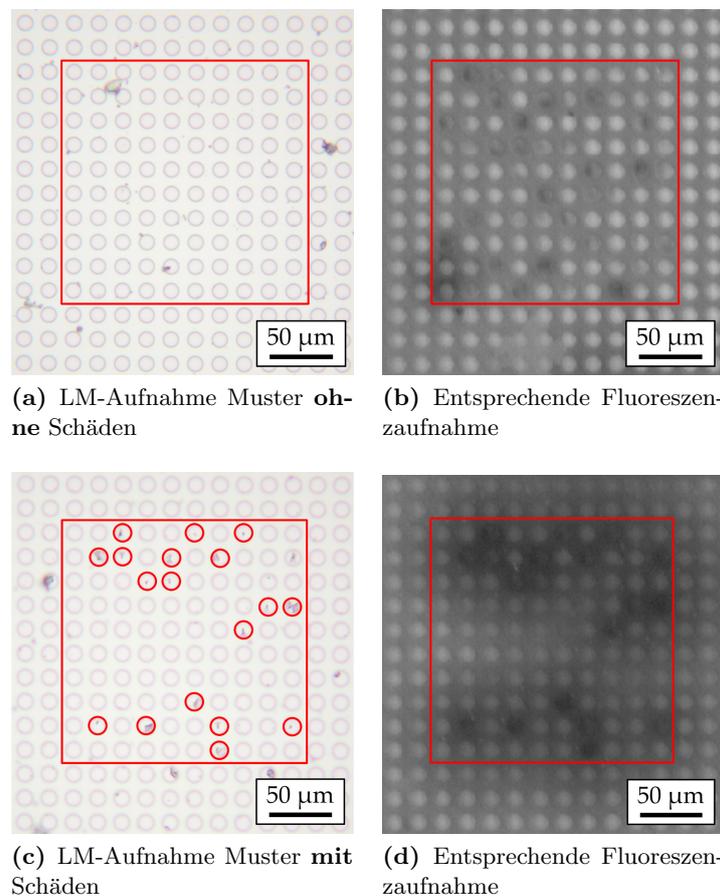


Abb. 5.8.: Einfluss der Laserstrahlung auf die Syntheseoberfläche. Ein funktionalisierter Zielträger wurde direkt mit dem Laser belichtet. (a) Lichtmikroskopaufnahme (LM-Aufnahme) eines belichteten Musters, wobei die gleichen Einstellungen für Fokus und Intensität genutzt wurden, wie sie bei den gezeigten Experimenten zum Transfer zum Einsatz kamen. (b) Fluoreszenzaufnahme des Musters aus (a). Einige Vertiefungen erscheinen dunkler als andere. (c) LM-Aufnahme eines Musters, wobei die Laserintensität stark genug war, das Glas in einigen Vertiefungen zu zerstören (rote Kreise). (d) Durch den erhöhten Wärmeeintrag beim Zerstören der Vertiefungen sind diese nun deutlich dunkler als nicht zerstörte Vertiefungen. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden beide gleichermaßen in der Helligkeit und im Kontrast angepasst.

Vertiefungen. Bei einigen ist die Intensität jedoch geringer. Der Wärmeeintrag hat wahrscheinlich zu einer Herabsenkung der Funktionalität der Syntheseoberfläche geführt. Dabei sind diese Bereiche zufällig über das Array verteilt.

Wird der Laser bei höheren Leistungen betrieben, oder liegt die Fokusebene nicht korrekt, ist die eingebrachte Energie so groß, um das Glas irreparabel zu beschädigen (s. Abb. 5.8c). In der entsprechenden Fluoreszenzaufnahme stellen sich diese Vertiefungen als deutlich dunkler dar, wobei die Beeinträchtigung der Funktionalität radial abnimmt, erkennbar als dunkler Halo um die zerstörten Vertiefungen.

Dieses Experiment zeigt, dass der Laser die empfindliche Syntheseoberfläche schädigen kann.

Einfluss der Absorptionsschicht

Neben der direkten Belichtung mit dem Laser könnte es einen weiteren Grund für die Abwesenheit von spezifischen Signalen beim Mehrlagenexperiment geben. Durch die Belichtung mit dem Laser werden die Vertiefungen des Ausgangsträgers komplett entleert (s. Abb. 5.9a). Mit den Partikeln wird auch die Goldschicht rückstandslos entfernt, was die Annahme unterstützt, dass das Gold verdampft. Während in den REM-Aufnahmen keine

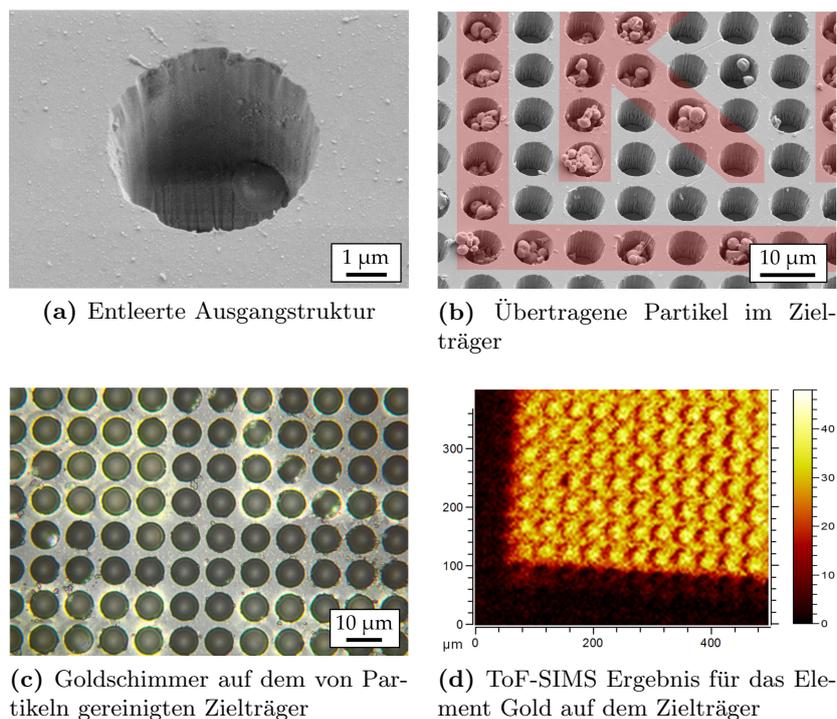


Abb. 5.9.: Gold auf Zielträger. (a) Die REM-Aufnahme einer entleerten Ausgangsstruktur zeigt, dass die Partikel mitsamt der Goldschicht entfernt wurden. (b) REM-Aufnahme des Zielträgers mit den übertragenen Partikeln. (c) Zielträger nach der Synthese im Auflicht. Das kondensierte Gold ist als heller Schimmer auf der Oberfläche erkennbar. (d) Die grafische Darstellung der ToF-SIMS Messung des Zielträgers für das Element Gold belegt die Präsenz desselbigen.⁴⁰

⁴⁰Reproduced with permission.^[31] © 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Goldrückstände auf dem Zielträger zu sehen sind, kann man auf dem von Partikeln gereinigten Zielträger unter Aufsichtbedingungen einen goldenen Schimmer erkennen, der darauf schließen lässt, dass das Gold auf dem Zielträger kondensiert (s. Abb. 5.9b,c). Das kondensierte Gold lässt sich auch mittels Sekundärionenmassenspektrometrie (engl. Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry, kurz ToF-SIMS) nachweisen (s. Abb. 5.9d). Gezeigt ist ein Array aus 13×13 Vertiefungen, das mit Transfermethode "klein in groß" gefüllt wurden. Die ToF-SIMS Messungen wurden im Rahmen des KNMF Laboratory for Spectroscopy and Microscopy von Dr. Alexander Welle am KIT durchgeführt.

Die Goldrückstände können die Absorption der Laserstrahlung erhöhen. Die resultierende Beeinträchtigung der Funktionalität ist bei den Proof-of-principle Experimenten nicht zu Tage getreten, da die Restfunktionalität immer noch zu positiven Signalen geführt hat. Betrachtet man nun das Mehrlagenexperiment, so ist ersichtlich, dass die Synthesoberfläche durch die wiederholten Belichtungen derart stark geschädigt wurde, dass keine spezifischen Signale mehr detektierbar waren.

5.1.4. Optische Markierungen

Die Laserpulse sind stark genug, Glas zu zerstören (s. Abb. 5.8c). Nach dieser Beobachtung stellte sich die Frage, ob die Laserpulse auch derart kontrolliert werden können, gezielt Mikrostrukturen in das Glas zu schreiben. Durch eine extrafokale Fokussierung und höhere Laserleistungen können Mikromarkierungen in das Glas eingebracht werden (s. Abb. 5.10). Dabei zeigt sich, dass kein alleiniger Ablationsprozess stattfindet. In REM-Aufnahmen der Markierungen ist ausgeworfenes Material um eine zentrale Schmelzfront erkennbar. Demnach erhitzt der Laserpuls die Oberfläche, woraufhin diese noch während der Belichtung zu schmelzen beginnt. Aufgrund des andauernden Laserpulses beginnt das flüssige Glas zu siedeln und es kommt zu einer Dampfexplosion. Diese treibt das Material dann aus. Die hierfür genutzten Laserfluenzen lagen bei ca. 20 J cm^{-2} .

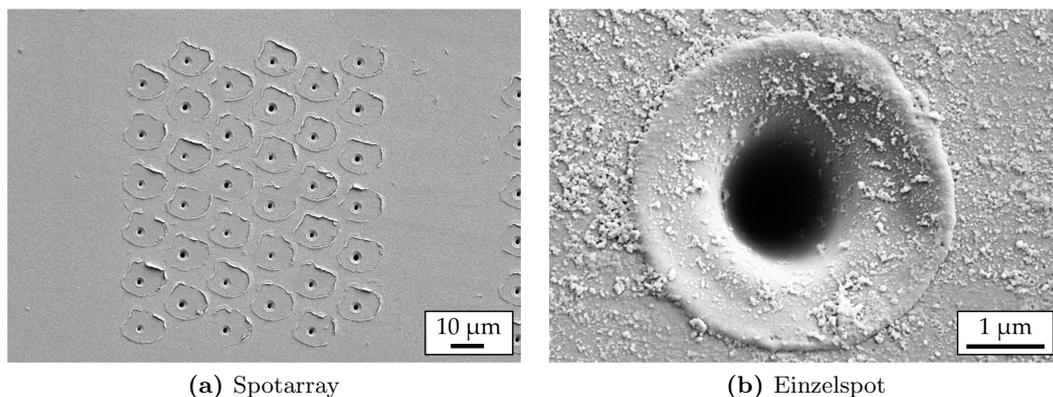


Abb. 5.10.: Optische Markierungen – Spots. (a) REM-Aufnahme eines Spotarrays. Durch den Beschuss mit Einzelpulsen konnten Mikromarkierungen in das Glas eingebracht werden. (b) Nahaufnahme eines Einzelspots mit erkennbarer Schmelzfront und ausgeworfenem Material.⁴¹

Werden nun viele Einzelpulse hintereinander geschaltet, wobei sich das Substrat bewegt, können beliebige Markierungen generiert werden, unter anderem Kreise (s. Abb.

⁴¹Vertiefung und Schmelze nach einem einzelnen Laserpuls^[60] von Dr. Frieder Märkle, Creative Commons license CC BY-SA 3.0 DE (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/de/>).

5.11). Derartige Mikromarkierungen sind chemisch inert, können nicht entfernt werden und sind beständig gegenüber mechanischer Beanspruchung durch Spatel, Pinzetten oder Ähnlichem. Bedarf zeigt sich beim vorgestellten cLIFT. Da der Zielträger im Gegensatz zum SPT nicht mikrostrukturiert ist, benötigt das System Kalibrationsmarkierungen, um wiederholt die identischen Spots belichten zu können. Befinden sich zwei dieser Kreisarrays auf einem Zielträger, kann dessen Lage bestimmt werden, was die Grundvoraussetzung für das wiederholte Belichten der Spots ist. Derartige optische Markierungen kamen bei mehreren Experimenten zum Einsatz, die veröffentlicht wurden oder für Veröffentlichungen vorgesehen sind^[17,66–68].

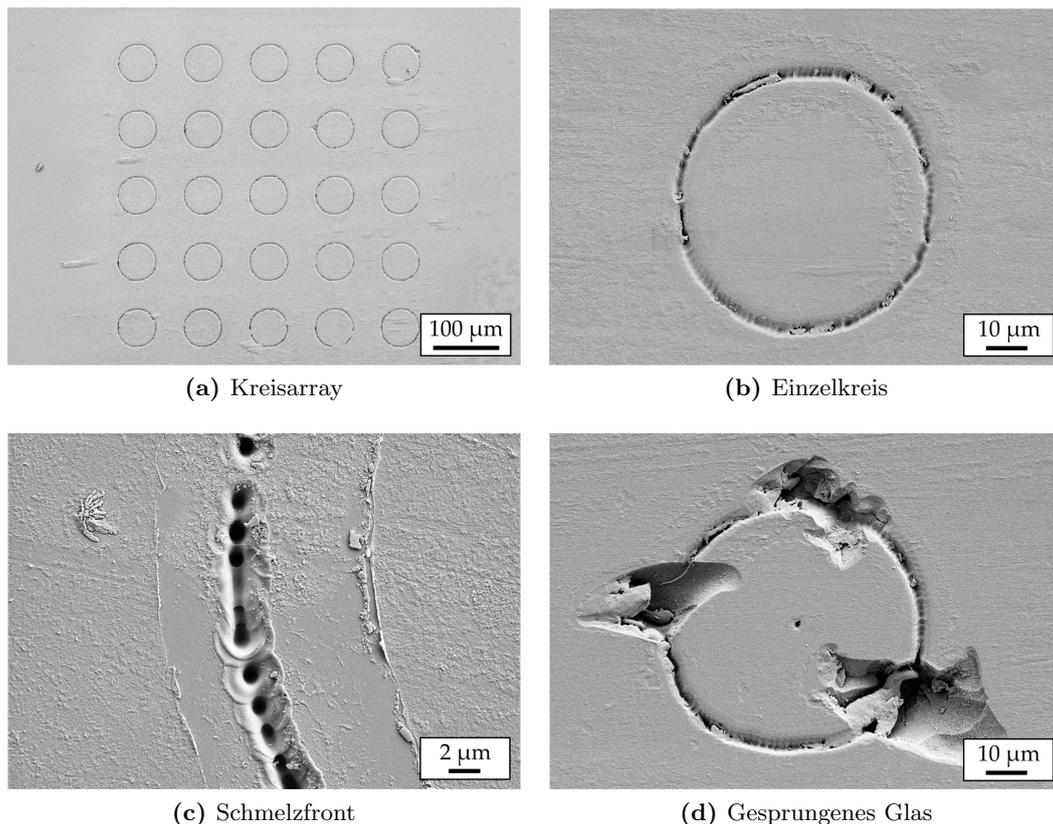


Abb. 5.11.: Optische Markierungen – Kreise. (a) REM-Aufnahme eines Kreisarray aus 5×5 Kreisen zur Identifikation der Slideposition für das cLIFT System.⁴³ (b) Aufnahme eines Einzelkreises.⁴⁴ (c) Nahaufnahme der Schmelzfront, wie sie beim Markierungsprozess entsteht. (d) Wenn der Laserfokus oder die Laserparameter falsch gewählt werden, kann es passieren, dass Glasstücke herausgebrochen werden.⁴⁵

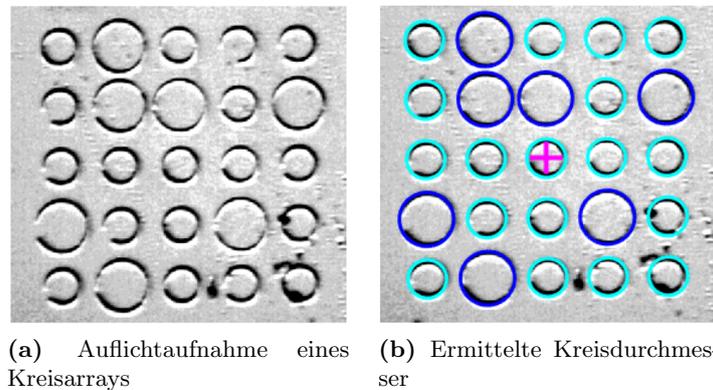
Dr. Tobias Förtsch, der ebenfalls in der Arbeitsgruppe des Autos promovierte, nutze die optischen Markierungen nicht nur für die Ortsbestimmung im cLIFT System, sondern

⁴³Positionsmarkierung aus 25 Kreisen^[60] von Dr. Frieder Märkle, Creative Commons license CC BY-SA 3.0 DE (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/de/>).

⁴⁴Mehrere Pulse nebeneinander ergeben Kreise mit einem Durchmesser von $50 \mu\text{m}$ ^[60] von Dr. Frieder Märkle, Creative Commons license CC BY-SA 3.0 DE (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/de/>).

⁴⁵Abplatzungen infolge zu hoher Laserintensität^[60] von Dr. Frieder Märkle, Creative Commons license CC BY-SA 3.0 DE (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/de/>).

auch, um kodierte Informationen einzuarbeiten. Mithilfe unterschiedlicher Kreisdurchmesser konnten so Daten wie eine Slide-ID kodiert werden (s. Abb. 5.12). Durch Verwenden von 5×5 Kreisen mit 2 unterschiedlichen Durchmesser können so $2^{25} = 33\,554\,432$ Kombinationen kodieren. Seine Ergebnisse wurden ebenfalls veröffentlicht^[69].



(a) Auflichtaufnahme eines Kreisarrays (b) Ermittelte Kreisdurchmesser

Abb. 5.12.: Durch Verwendung von zwei unterschiedlichen Kreisdurchmessern und einer Analysesoftware können Daten binär in die Kreismarkierung eingearbeitet werden.⁴⁶

5.2. Multispectral Widefield Fluorescence Microscope

Mit QDs markierte Mikropartikel, die in den Vertiefungen eines Glassubstrats abgelagert sind, sollen mit dem optischen System detektiert werden.

Zwei unterschiedlich komplexe Proof-of-principle Experimente zum Multispectral Widefield Fluorescence Microscope werden vorgestellt. Dabei werden die gewonnenen Aufnahmen gezeigt und die Auswertung der Fluoreszenzen vorgestellt. Ein drittes Experiment belegt, dass auch Fluorophore detektiert werden können, deren Anregung im Deep-UV Bereich des Spektrums liegt. Im Anschluss daran werden die Systemparameter vorgestellt. Hier werden die Ermittlung der Auflösung genannt, der Abbildungsmaßstab bestimmt und der Crosstalk beziffert. Eine große Bedeutung bei der Entwicklung kam den Abbildungsfehlern zu, die minimiert werden sollen. Daher wird das System auf mögliche Abbildungsfehler hin überprüft.

5.2.1. Proof-of-principle Experiment – 2 QDs

Das erste Proof-of-principle Experiment soll zeigen, dass das System in der Lage ist, einzelne Mikropartikel aufzulösen. Weiterhin soll gezeigt werden, dass unterschiedlich markierte Partikel voneinander unterschieden werden können.

Daher hat Roman Popov im Rahmen seiner Dissertation ein Experiment durchgeführt, bei dem pro Lage bis zu zwei unterschiedliche Partikel stochastisch in Mikrostrukturen abgelagert wurden. Dabei wurde das in Kapitel 3.3.2 vorgestellte Prinzip umgesetzt. Da hierbei nicht vorherbestimmt wird, in welcher Vertiefung welcher Partikel landet, muss eine Ablagerungsmaske erstellt werden, bevor die Monomere aus den Partikeln extrahiert und an die funktionalisierte Oberfläche des Substrats gekuppelt wurden. Bei der Detektion des Ablagerungsmusters wurde neben dem entwickelten optischen System auch der direkte

⁴⁶Die Wiedergabe der Abbildungen wurde vom Verlag genehmigt:^[69]

Konkurrent, ein kommerzieller Fluoreszenzscanner, verwendet, um die beiden Systeme miteinander vergleichen zu können. Das so hergestellte Peptidarray bestand aus neun Lagen und hatte zum Ziel, die beiden Peptide HA und FLAG zu synthetisieren.

Für die Detektion wurde die “no Filter”-Konfiguration gewählt. Hierbei detektiert die Kamera sämtliche Strahlung ab einer Wellenlänge von 475 nm. Der Vorteil dieser Konfiguration liegt in der gemeinsamen Detektion eines breiten Spektrums, wodurch die unterschiedlich markierten Mikropartikel anhand deren Farbe deutlich voneinander unterschieden werden können. Markiert wurden die Partikel mit zwei unterschiedlichen QDs. Die blauen Partikel wurden mit QDs mit einer Wellenlänge von 490 nm, die orangenen mit QDs mit einer Wellenlänge von 590 nm markiert. Abbildung 5.13 zeigt beispielhaft eine der neun Lagen.

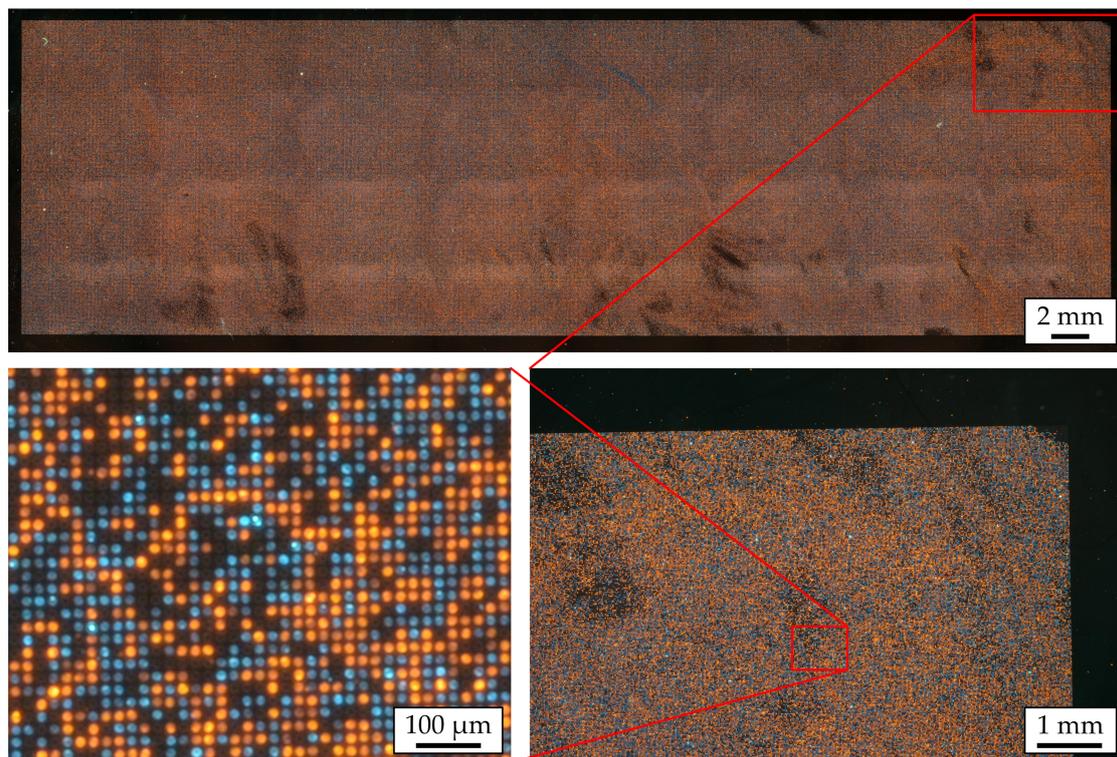


Abb. 5.13.: Proof-of-principle Experiment des optischen Systems mit zwei QDs. Durch Aneinanderreihen von 32 Aufnahmen konnte das gesamte Substrat abgedeckt werden. Der Ausschnitt unten rechts zeigt eine einzelne Aufnahme. Der weitere Ausschnitt unten links zeigt die Auflösung des Systems. Durch die “no Filter”-Konfiguration können die beiden Partikelsorten anhand deren Farbe in einer einzigen Aufnahme unterschieden werden.

Die gesamte mikrostrukturierte Fläche von $18\text{ mm} \times 62\text{ mm}$ konnte durch Aneinanderreihen von 32 Aufnahmen abgedeckt werden. Die über das gesamte Gesichtsfeld konstante Abbildungsleistung des Objektivs erlaubt das nahtlose Aneinanderfügen der einzelnen Aufnahmen in einem Bildverarbeitungsprogramm (Photoshop CS6, Adobe Systems, Inc.). Die in der Gesamtansicht erkennbaren hellen Balken sind Artefakte der Bildgebung, die mithilfe der weiter unten gezeigten Korrektur durch Flat-Aufnahmen entfernt werden können. Da der dazu notwendige Algorithmus zum Zeitpunkt des Experiments noch nicht vorhanden war, konnte dies nicht korrigiert werden. Eine nachträgliche Korrektur ist ebenso nicht möglich, da die Korrekturaufnahmen experimentspezifisch erstellt werden müssen.

Auswertung Belegung – 2 QDs

Für jede der neun Lagen wurden die erwähnten 32 Aufnahmen des gesamten Substrats erstellt. Nach dem Aneinanderfügen der einzelnen Aufnahmen kann die Ablagerungsmaske anhand der farbigen Partikel rekonstruiert werden. In einer kommerziellen Software (Mapix, Innopsys) können die Intensitäten jedes Spots ausgelesen und verarbeitet werden. Die einzelnen Prozessschritte zur Ermittlung des Ablagerungsmusters sind wie folgt (s. Abb. 5.14):

1. Splitten der gewonnenen RGB-Aufnahmen in die einzelnen Kanäle R, G und B.
2. Abspeichern der einzelnen Kanäle als Multilagenbild im Tagged Image File Format (tiff).
3. Einlesen dieser Datei in Mapix.
4. Ermittlung der Intensitäten der einzelnen Spots.
5. Normierung der Intensitäten der einzelnen Kanäle in Bezug auf die Gesamtintensität in allen Kanälen.
6. Vergleich der prozentualen Verteilung der Intensitäten.

Die Schritte 1 und 2 sowie die Schritte 4 bis 6 können dabei automatisiert werden.

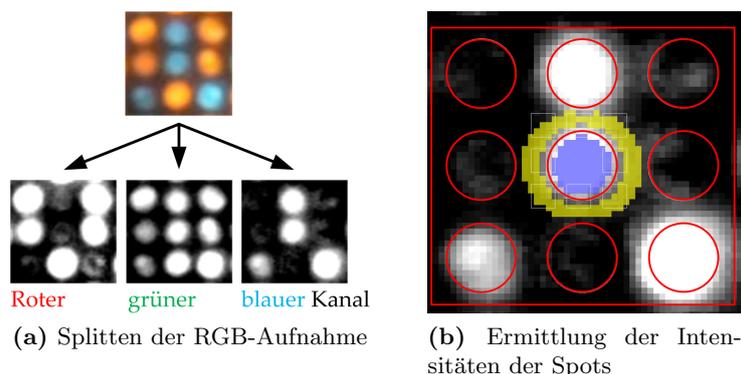


Abb. 5.14.: Prozessschritte zur Ermittlung des Ablagerungsmusters. (a) Die mit dem optischen System gewonnenen RGB-Aufnahmen müssen in die drei Kanäle gesplittet und als Multilagenbild abgespeichert werden. (b) Diese Datei kann anschließend in die Software Mapix eingelesen werden. Durch Erstellung eines Grids können die einzelnen Spotintensitäten (blau hervorgehobene Pixel) ermittelt und für die weitere Verarbeitung abgespeichert werden.

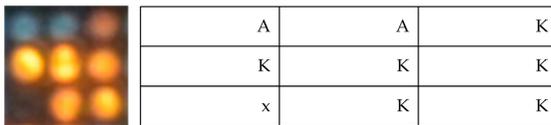
Zwei unterschiedlich markierte Partikel können so voneinander unterschieden werden. Besitzt ein Spot die größte Intensität im roten Kanal, liegt ein orangener Partikel vor. Umgekehrt liegt ein blauer Partikel vor, sofern der Großteil der Intensität auf den blauen Kanal entfällt (s. Tab. 5.6).

Wird dieses Vorgehen auf alle anderen Lagen angewandt, kann die Peptidbibliothek ermittelt werden (s. Abb. 5.15). Ist bereits in der ersten Lage eine Vertiefung frei geblieben, so wird hier kein Peptid aufgebaut, da die freien Aminogruppen des Zielträgers während der Synthese blockiert werden. Die verbleibenden acht Spots werden entsprechend ihrer

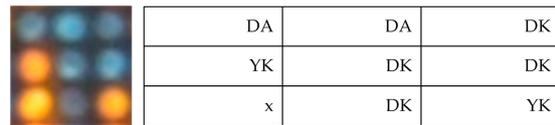
Tab. 5.6.: Dekodierung von zwei Partikelsorten. Links sind die gewonnenen Intensitäten von neun Spots gezeigt, wie sie sich auf die drei Kanäle (rot, grün und blau) verteilen. Die rechte Tabelle zeigt die prozentuale Verteilung der Intensitäten in Bezug auf die Gesamtintensität eines Spots in den drei Kanälen. Durch den Vergleich dieser Angaben kann das Partikelmuster dekodiert werden. (O – orangener Partikel; B – blauer Partikel)

Spalte	Reihe	R	G	B		Spalte	Reihe	R	G	B	Farbe
1	1	117	94	4		1	1	55	44	1	O
2	1	6	81	112		2	1	3	41	56	B
3	1	109	90	30		3	1	48	39	13	O
1	2	110	57	20		1	2	59	30	11	O
2	2	8	80	110		2	2	4	41	55	B
3	2	139	74	0		3	2	73	27	0	O
1	3	16	59	75		1	3	11	39	50	B
2	3	125	104	0		2	3	55	45	0	O
3	3	17	115	138		3	3	6	43	51	B

Intensitäten dekodiert. Die in der 1. Lage verwendeten Monomere waren für blaue Partikel Alanin (A) und für die orangenen Partikel Lysin (K). Mit diesem Wissen kann die erste Lage der Peptidbibliothek erstellt werden. Sollte im weiteren Verlauf der Synthese die in der ersten Lage frei gebliebene Vertiefung mit einem Partikel belegt werden, so hat dies keine Auswirkungen auf das Peptid, da diese Vertiefung bereits chemisch blockiert ist und somit kein weiteres Monomer hier kuppeln kann. Verbleibt eine Vertiefung im weiteren Verlauf der Synthese leer, die vorher immer gefüllt war, so entsteht eine Abbruchsequenz, zu sehen bei der rechten unteren Vertiefung.



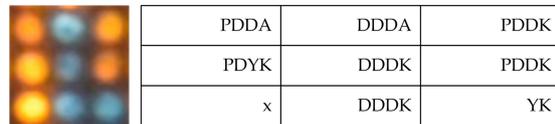
(a) Schicht 1 (A – Alanin und K – Lysin)



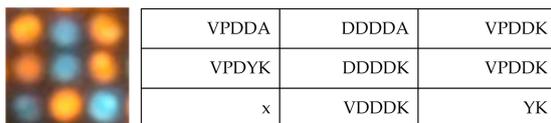
(b) Schicht 2 (D – Asparaginsäure und Y – Tyrosin)



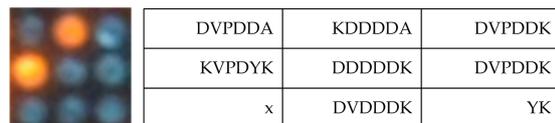
(c) Schicht 3 (D – Asparaginsäure)



(d) Schicht 4 (D – Asparaginsäure und P – Prolin)



(e) Schicht 5 (D – Asparaginsäure und V – Valin)



(f) Schicht 6 (D – Asparaginsäure und K – Lysin)

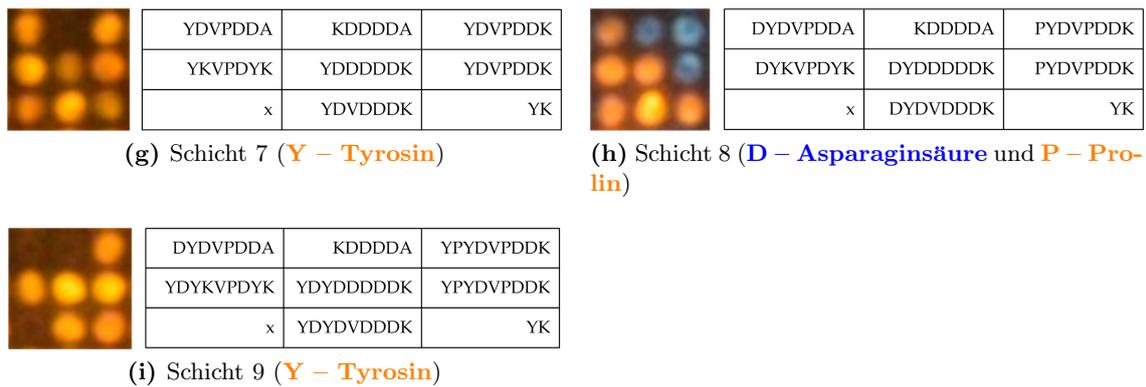
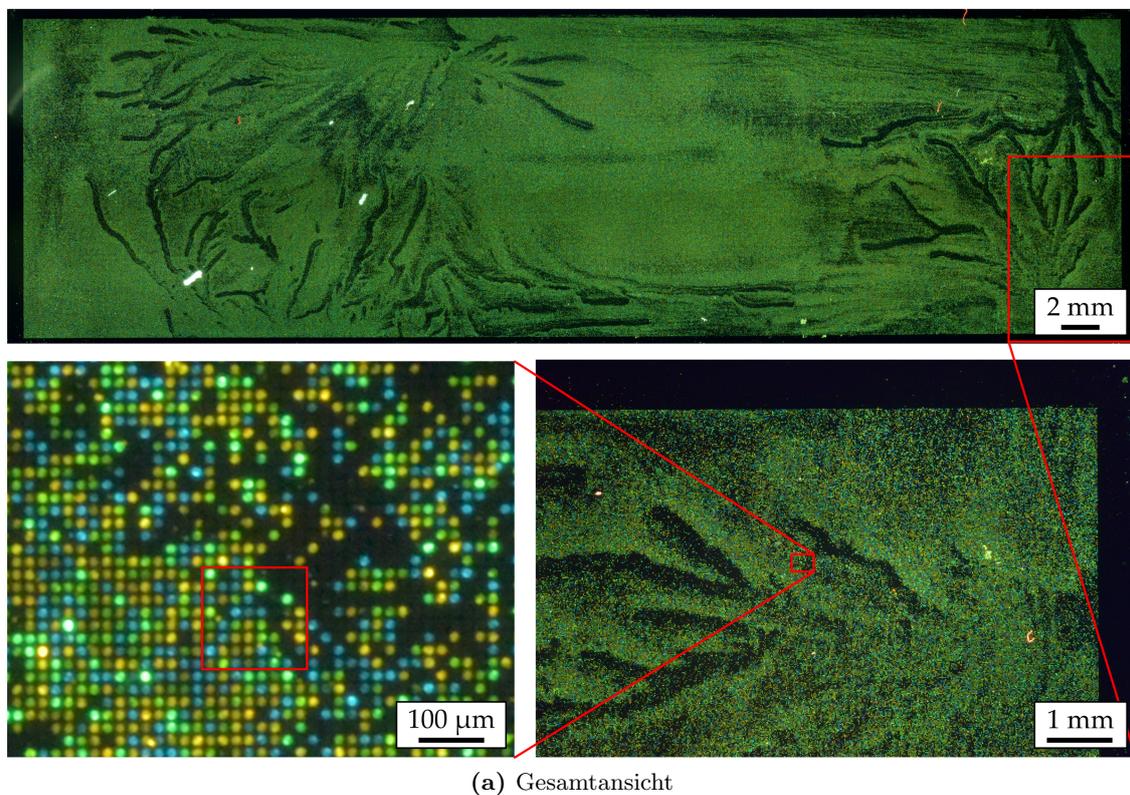


Abb. 5.15.: Auswertung Belegung 2 QDs. Beispielhaft ist die Auswertung eines 3×3 Arrays für das Proof-of-principle Experiment mit zwei unterschiedlichen QDs pro Lage gezeigt. Die Peptidbibliothek im 1-Buchstabencode wird vom N- zum C-Terminus geschrieben. Abbruchsequenzen mit einer Länge von weniger als neun Aminosäuren entstehen, wenn in einer Lage kein Partikel vorliegt.

5.2.2. Proof-of-principle Experiment – 4 QDs

Das System ist neben der erwähnten “no Filter”-Konfiguration mit vier spezifischen Fluoreszenzkanälen ausgestattet – 500, 532, 560 und 589 nm. Daher wurden für das Folgeexperiment vier unterschiedlich markierte Partikel stochastisch in den Vertiefungen verteilt (s. Abb. 5.16). Die hier verwendeten QDs haben Zentralwellenlängen von 490, 530, 560 und 590 nm. Damit sind sie spezifisch in den genannten Fluoreszenzkanälen detekierbar.



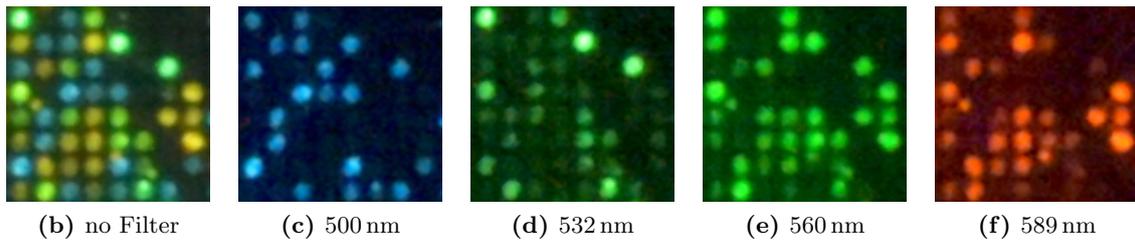


Abb. 5.16.: Proof-of-principle Experiment des optischen Systems mit vier QDs. (a) Durch einen anderen Abbildungsmaßstab reichten hier bereits 24 Aufnahmen aus, um die gesamte Fläche abzurastern. Auch hier ist unten rechts eine Einzelaufnahme gezeigt, aus der ein Ausschnitt unten links vergrößert dargestellt ist. (b-f) Der rot umrandete Ausschnitt ist hier in den einzelnen Fluoreszenzkanälen gezeigt.

Zudem zeigen sie sich unter der Nutzung der “no Filter”-Konfiguration als Partikel mit vier unterschiedlichen Farben.

Im Gegensatz zum Proof-of-Principle Experiment mit zwei QDs gestaltet sich die Auswertung von vier QDs bereits deutlich aufwendiger. Da der Fokus dieser Arbeit auf der Entwicklung des optischen Systems lag, wurde die automatisierte Dekodierung für mehr als zwei QDs nicht umgesetzt. Im Rahmen seiner Dissertation hat Roman Popov die Dekodierung mehrerer durch QD markierten Partikelsorten durch eine dichte-basierte räumliche Clusteranalyse mit Rauschen (engl. Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise, kurz DBSCAN) gelöst^[56].

5.2.3. Proof-of-principle Experiment – Deep-UV

Kommerzielle Fluoreszenzscanner besitzen Anregungswellenlängen im sichtbaren oder infraroten Bereich des Spektrums. Eine Anregung im ultravioletten oder gar tief ultravioletten Bereich ist nicht verfügbar, zumindest sind dem Autor keine Systeme bekannt, die das können.

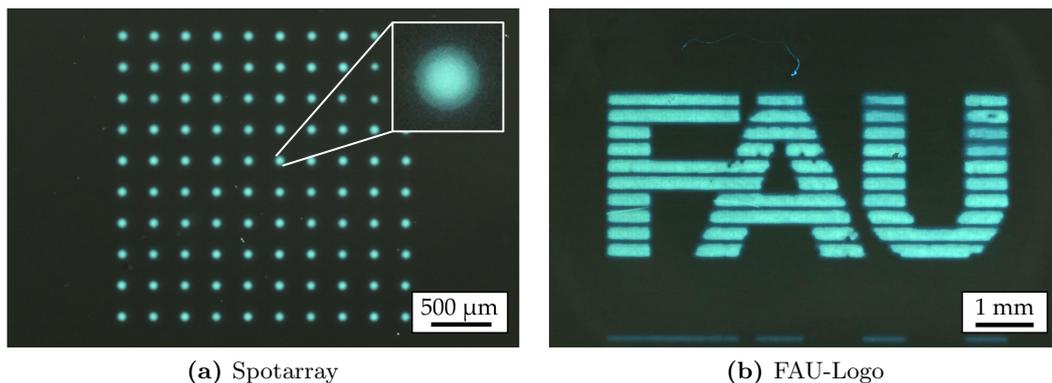


Abb. 5.17.: Proof-of-principle Experiment des optischen Systems mit Deep-UV Anregung. Durch Austauschen der LED gegen eine UV-pe können Fluorophore (hier: fluoreszierende Chromophore) auch im Deep-UV Bereich (UV-C) angeregt werden. (a) 10×10 Spotarray eines fluoreszierenden Chromophors.⁴⁷ (b) Wird der Pitch kleiner gewählt als die laterale Ausdehnung der einzelnen Spots, können geometrische Formen übertragen werden.⁴⁸ Gezeigt ist jeweils ein Ausschnitt des gesamten Gesichtsfelds.

Bei dem entwickelten optischen System ist dies im Gegensatz dazu sehr einfach umsetzbar, indem die LED durch eine UV-Lampe ausgetauscht wird. Mit einer zentralen Anregungswellenlänge von 254 nm können so Fluorophore im UV-C Bereich angeregt werden (s. Abb. 5.17). Das detektierte Molekül, ein fluoreszierendes 2,6-Dicyanoanilin-basiertes Multichromophor, ist die Vorstufe eines pharmazeutisch wirksamen Chinazolins^[70].

Betrachtet man das Absorptions- und Emissionsspektrum des Moleküls, zeigt sich, dass die eingesetzte UV-Lampe (UVGL-58 Handheld UV Lamp, UVP, LLC) einen Großteil des Absorptionsspektrums abdeckt (s. Abb. 5.18). Mit der bereits mehrfach angesprochenen “no Filter”-Konfiguration werden Wellenlängen größer als 475 nm detektiert. Demnach entspricht das detektierte Signal ungefähr $1/7$ der maximalen Signalstärke. Dennoch ist das System in der Lage, das Molekül eindeutig nachzuweisen. Einerseits ist ein Array aus 10×10 Spots, andererseits ein Logo der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (FAU) gezeigt, die beide mithilfe der cLIFT Methode übertragen wurden. Im Falle des Arrays resultieren einzelne Laserpulse in einzelnen Spots. Wählt man den Pitch kleiner als die laterale Ausdehnung der Spots, ergibt die Vielzahl an Einzelspots eine zusammenhängende Fläche und man kann geometrische Formen wie das FAU-Logo annehmen.

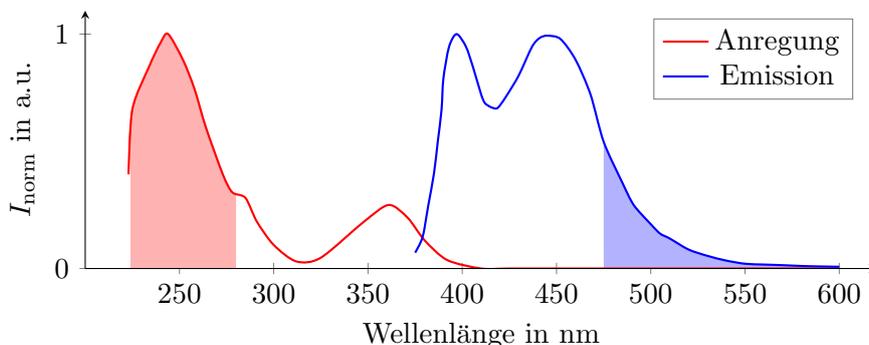


Abb. 5.18.: Anregungs- und Emissionsspektrum des fluoreszierenden Chromophors. Mit der genutzten UV-Lampe kann der Chromophor ideal angeregt werden (rot hinterlegter Bereich). Aufgrund des eingebauten Langpassfilters kann nur ca. $1/7$ des Emissionsspektrums detektiert werden (blau hinterlegter Bereich).⁴⁹

5.2.4. Systemparameter

Als elementarer Parameter ist die Auflösung zu bestimmen, sowohl lateral als auch axial. Im Zusammenhang mit der Auflösung ist der Abbildungsmaßstab für das abgebildete Gesichtsfeld entscheidend. Da mit dem System bis zu fünf Kanäle erfasst werden können, wird die Prozesszeit bestimmt. Für die Differenzierung mehrerer QDs in unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen spielt der Crosstalk eine Rolle. Dieser wird bestimmt und ein Algorithmus vorgestellt, um ihn teilweise zu kompensieren.

⁴⁷Fluorescent image of an array^[70] von Held, F. E. *et al.*, Creative Commons license CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

⁴⁸Imaging of Friedrich-Alexander University logo^[70] von Held, F. E. *et al.*, Creative Commons license CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

⁴⁹Emission and absorption spectrum of compound 5d^[70] von Held, F. E. *et al.*, Creative Commons license CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Auflösung lateral und axial

Bei der Bestimmung der Auflösung des optischen Systems kommt das in der Fluoreszenzmikroskopie genutzte Rayleigh-Kriterium zum Tragen, das die Auflösung selbstleuchtender Objekte anhand deren Beugungsverhalten bestimmt. Betrachtet man ein Objekt, das kleiner ist als die zu erwartende Auflösung des Systems, kann die Auflösung anhand des Beugungsmusters ermittelt werden. Dafür bestimmt man den Abstand des 0. Maximums zum 1. Minimum der entstandenen Beugungsringe (s. Abb. 5.19). Für das entwickelte optische System kann die laterale Auflösung demnach zu $d_{\text{lat}} = 5 \mu\text{m}$ bestimmt werden.

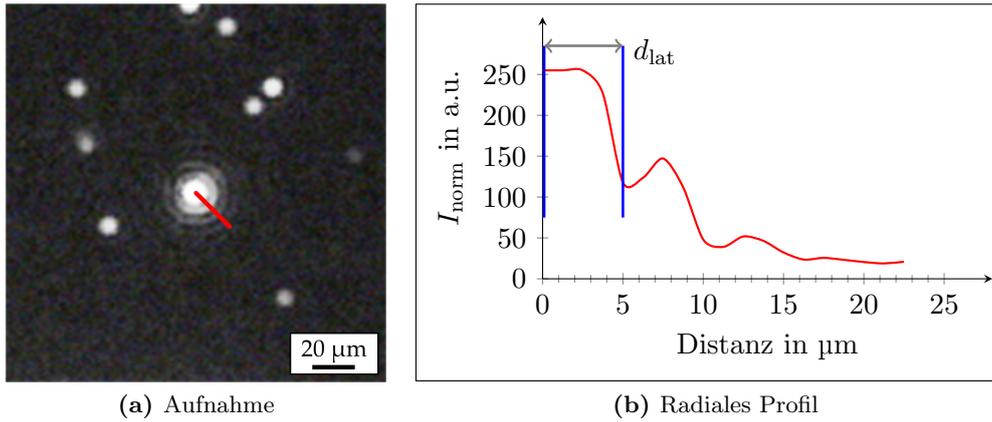


Abb. 5.19.: Laterale Auflösung des optischen Systems. (a) Beugungsringe eines Objekts, das kleiner als die Auflösung ist. (b) Radiales Profil entlang der roten Linie in (a) zur Bestimmung der Auflösung.

Mithilfe der von Rayleigh angegebenen Abschätzung zur lateralen Auflösung

$$d_{\text{lat}} = \frac{0,61\lambda}{A_N} \quad (5.4)$$

zusammen mit einer mittleren Wellenlänge von $\lambda = 550 \text{ nm}$ kann die bisher unbekannte numerische Apertur zu $A_N = 0,067$ berechnet werden.

Neben der lateralen Auflösung ist bei Mikroskopen die axiale Auflösung d_{ax} von Interesse. Dieser Parameter beschreibt, wie viel Licht von Schichten über und unter dem eigentlichen Objekt auf den Kamerachip fällt. Im Bereich der Fotografie entspricht dieser Wert der Schärfentiefe. Generell führt eine große Schärfentiefe dazu, dass Objekte verwaschen erscheinen. Ist die Schärfentiefe aber gering, wie sie es bei konfokalen Systemen der Fall ist, wird nur Licht aus einem begrenzten axialen Bereich detektiert, wodurch Objekte deutlich an Schärfe gewinnen. Eine Abschätzung der Schärfentiefe kann mithilfe der berechneten numerischen Apertur und dem Brechungsindex $n = 1$ (Luft) durch

$$d_{\text{ax}} = \frac{2\lambda n}{A_N^2} \quad (5.5)$$

erfolgen. Demnach kann mit einer axialen Auflösung von $d_{\text{ax}} = 245 \mu\text{m}$ gerechnet werden. Dieser Wert konnte mithilfe einer Messung bestätigt werden. Hierfür wurde dasselbe Objekt, wie es zur Bestimmung der lateralen Auflösung genutzt wurde, an unterschiedlichen Fokuspositionen z abgeleuchtet. Mit den gewonnenen Aufnahmen kann der Verlauf der Intensität entlang der optischen Achse z nachvollzogen werden, der als Punktspreizfunktion

(engl. point spread function, kurz PSF) bezeichnet wird (s. Abb. 5.20). Es zeigt sich der typische Sanduhr-ähnliche Verlauf eines nicht konfokal abbildenden Systems.

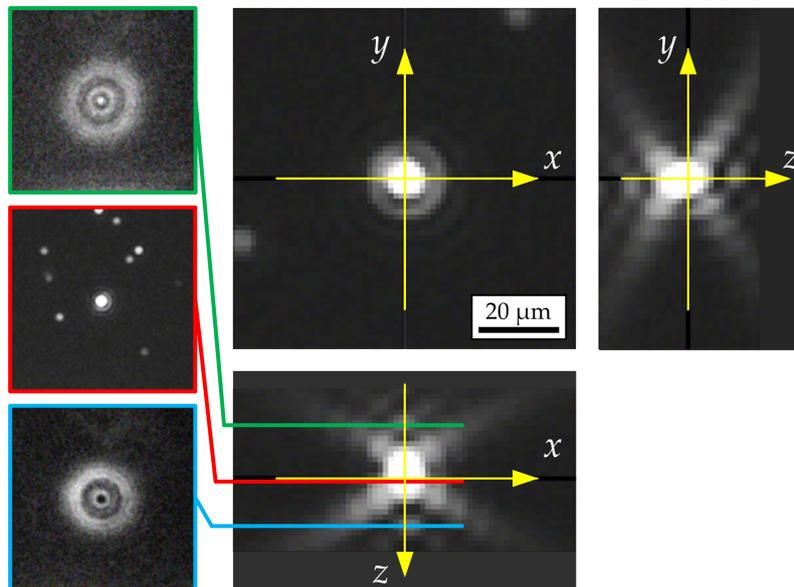


Abb. 5.20.: Punktstreiffunktion des optischen Systems.

Um die axiale Auflösung zu beziffern, betrachtet man den Verlauf der Intensität entlang der optischen Achse z für die beiden Koordinatenrichtungen x und y . Analog zur lateralen Auflösung wird auch hier der Abstand des 0. Maximums zum 1. Minimum bestimmt (s. Abb. 5.21).

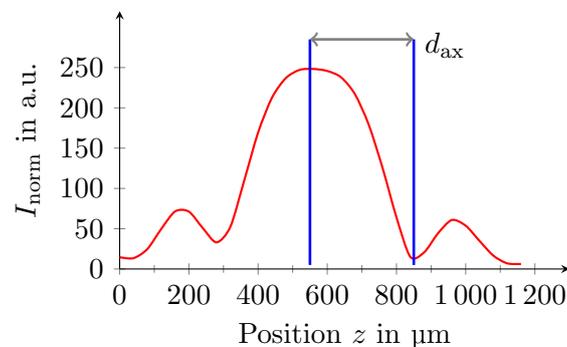


Abb. 5.21.: Axiale Auflösung des optischen Systems.

Demnach kann die Schärfentiefe sowohl in xz - als auch in yz -Richtung auf $320 \mu\text{m}$ beziffert werden.

Abbildungsmaßstab, Gesichtsfeld und Vergrößerung

Mit der ermittelten lateralen Auflösung stellt sich die Frage, wie die Abtastrate (engl. Sampling rate) des optischen Systems ist. Dabei unterscheidet man zwischen einer Über- und Unterabtastung (engl. over- und undersampling). Ist die Pixeldichte der Kamera zu gering, werden Objekte womöglich nicht komplett aufgelöst. Bei einer Überabtastung hingegen wird die Pixeldichte der Kamera nicht ausreichend genutzt.

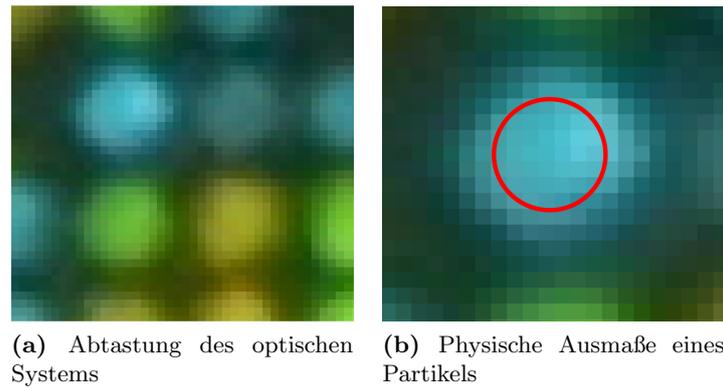
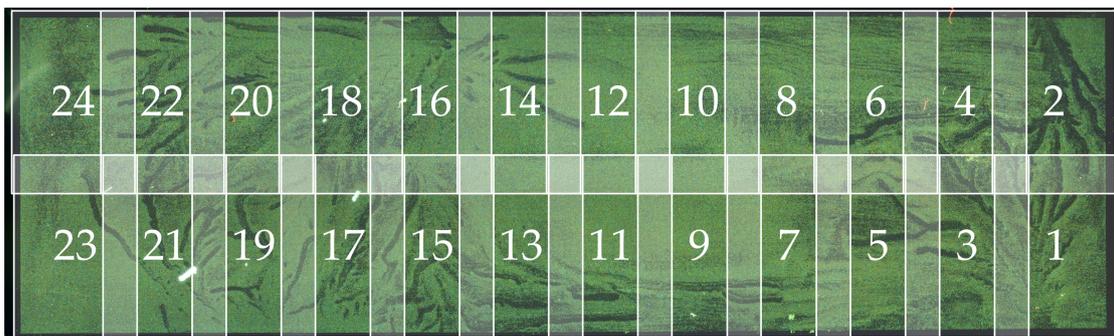
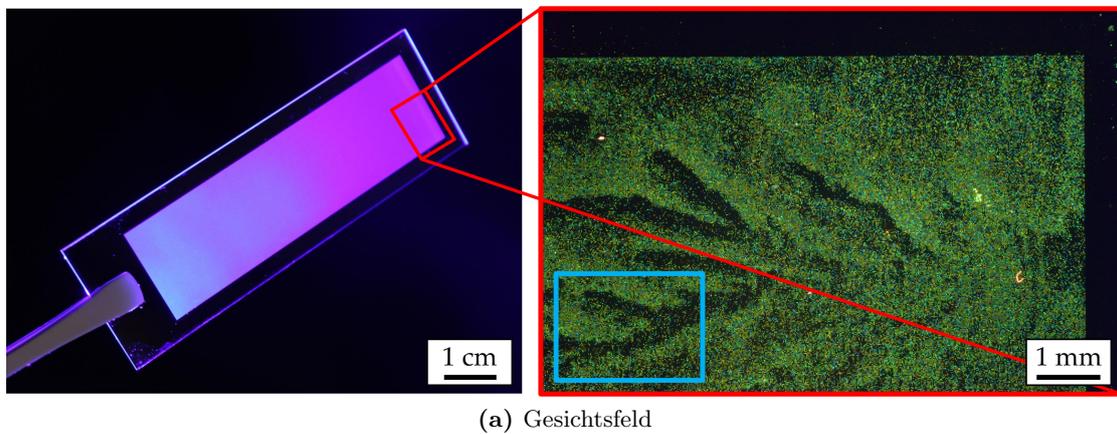


Abb. 5.22.: Abtastung des optischen Systems. (a) Ausschnitt aus einer Aufnahme zur Bestimmung der Abtastrate. (b) Der rote Kreis markiert die physischen Ausmaße des Partikels. Aufgrund der Auflösung von $d_{lat} = 5 \mu\text{m}$ wird der Partikel vergrößert dargestellt.



(b) Abtastung zur Erfassung großer zusammenhängender Bereiche

Abb. 5.23.: Gesichtsfeld des optischen Systems. (a) Das rote Rechteck auf der linken Seite zeigt, wie groß das Gesichtsfeld des optischen Systems ist. Zum Vergleich ist rechts das Gesichtsfeld eines gewöhnlichen Mikroskops markiert (blaues Rechteck). Dieses müsste 25 Aufnahmen machen, um eine Aufnahme des optischen Systems bei gleicher Überlappung abzudecken. (b) Mit 24 Aufnahmen des optischen Systems hingegen kann der gesamte Objektträger erfasst werden.

Bei einer lateralen Auflösung von $5\ \mu\text{m}$ besitzt das optische System einen **Abbildungsmaßstab** von $1,4\ \mu\text{m Px}^{-1}$ (s. Abb. 5.23). Damit ist die Abtastung gut 3-Mal höher als die Auflösung und kann als normale Abtastung angesehen werden. Mit dem Wissen des Abbildungsmaßstabs und der Anzahl von Pixeln der Kamera kann direkt das **Gesichtsfeld** berechnet werden. Mit einer einzigen Aufnahme können so $9,2\ \text{mm} \times 6,1\ \text{mm}$ belichtet werden. Zum Vergleich, ein gewöhnliches Mikroskop kann bei einer vergleichbaren Vergrößerung eine Fläche von nur $2,3\ \text{mm} \times 1,7\ \text{mm}$ erfassen. Neben einzelnen Aufnahmen bestimmter Bereiche ist die Erfassung eines kompletten Objektträgers interessant. Für die mikrostrukturierte Fläche der verwendeten Substrate von $18\ \text{mm} \times 62\ \text{mm}$ werden mit dem optischen System 24 Aufnahmen benötigt (s. Abb. 5.23). Dabei wird eine Überlappung der einzelnen Aufnahmen von 15 % genutzt, um das nahtlose Aneinanderfügen der Aufnahmen zu erleichtern. Die angesprochene **Vergrößerung** kann durch Kenntnis des Abbildungsmaßstabs, der Objektdimensionen und der absoluten Pixelabmessungen der Nikon D810 zu 3,5:1 bestimmt werden.

Prozesszeit

Analog zum SPT wird untersucht, wie lange das optische System für die vorgesehenen Aufgaben benötigt. Für ein allumfassendes Experiment, wobei die Probe in allen fünf Kanälen abgelichtet wird, müssen 48 min eingeplant werden (s. Abb. 5.24a). Dabei entfallen 15 min auf die Initialisierung des Systems. Hier werden die Fokuspunkte und die Belichtungszeiten aller Kanäle bestimmt sowie der Startpunkt und die Anzahl der Aufnahmen für die großflächige Abtastung festgelegt. Ist die Initialisierung abgeschlossen, erfolgt die Bildakquisition automatisch. Für die Erfassung in der “no Filter”-Konfiguration sind 5 min not-

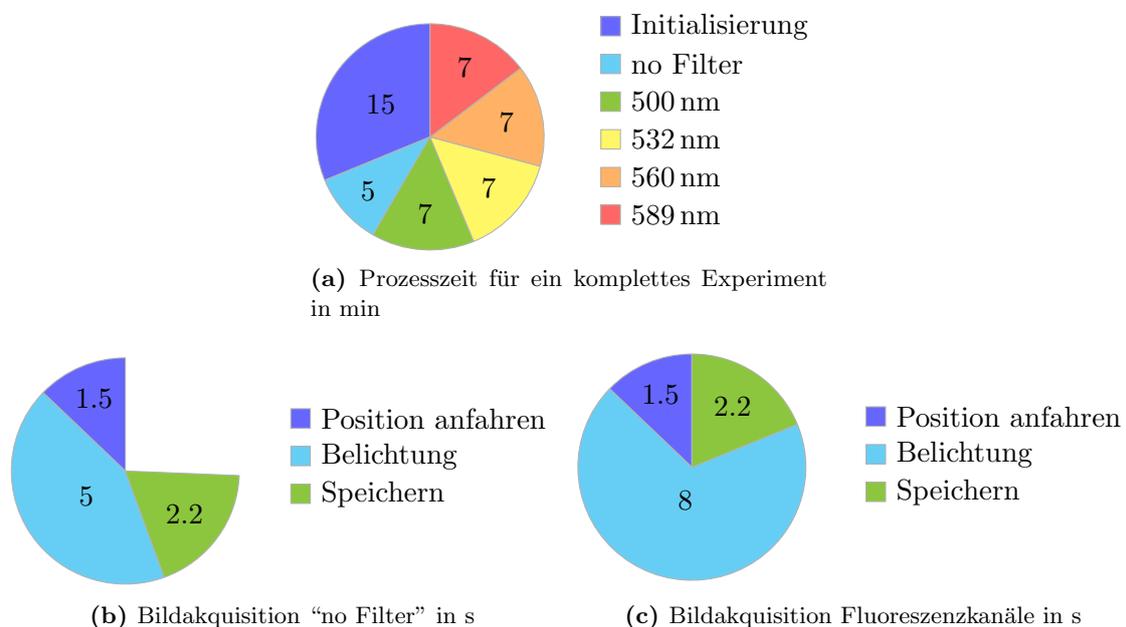


Abb. 5.24.: Prozesszeiten des optischen Systems. (a) Wird die komplette Fläche des Objektträgers in allen fünf Kanälen benötigt, müssen insgesamt 48 min eingeplant werden. (b) In der “no Filter”-Konfiguration reicht eine Belichtungszeit von 5 s aus. (c) Diese muss für die spezifischen Fluoreszenzkanäle auf 8 s erhöht werden.

wendig. Da die Filter der spezifischen Kanäle mit einer Halbwertsbreite von 10 nm sehr engbandig sind, müssen diese länger belichtet werden.

Für das Anfahren einer Position mithilfe des motorisierten Mikroskoptischs vergehen im Schnitt 1,5 s. Für das Abspeichern der Bildrohdaten muss mit 2,2 s pro Aufnahme gerechnet werden (s. Abb. 5.24b,c). Die angesprochene kürzere Belichtungszeit bei der “no Filter”-Konfiguration beträgt 5 s pro Aufnahme, wohingegen die spezifischen Fluoreszenzkanäle 8 s lang belichtet werden.

Crosstalk

Betrachtet man die einzelnen Kanäle, so zeigt sich, dass die QDs nicht nur in einem Kanal sichtbar sind (s. Abb. 5.16). Diesem Problem kann durch die Korrektur des Crosstalks begegnet werden.

Dafür wird gemessen, wie sich die Intensität beispielsweise der blauen QDs über die vier Fluoreszenzkanäle verteilt. Idealerweise sollten 100 % im blauen Kanal (500 nm) vorhanden sein. Aufgrund des gaußförmigen Spektrums der QDs gepaart mit dem geringen spektralen Versatz der Fluoreszenzfilter wird dieser Wert jedoch um den Crosstalk reduziert. Für alle vier QDs ergibt sich die folgende Verteilung:

$$\mathbb{C} = \begin{bmatrix} 0,57 & 0,23 & 0,14 & 0,08 \\ 0,26 & 0,43 & 0,27 & 0,14 \\ 0,08 & 0,21 & 0,32 & 0,34 \\ 0,09 & 0,13 & 0,27 & 0,44 \end{bmatrix} \quad (5.6)$$

Diese sogenannte Color-Spread Matrix \mathbb{C} zeigt die gemessene Verteilung. Auf der Diagonalen ist jeweils der Anteil der Intensität im korrekten Kanal gegeben. Im Falle der blauen QDs entfallen 57 % auf den blauen Kanal. Die verbleibenden 43 % verteilen sich auf die anderen Kanäle. Mit Kenntnis der Color-Spread Matrix und den Belichtungszeiten kann der Crosstalk kompensiert werden. Dafür wird eine Aufnahme durch die Gleichung

$$\mathbf{y} = \mathbb{E}\mathbb{C}\mathbf{x} + \mathbf{b} \quad (5.7)$$

beschrieben^[71]. Der Vektor \mathbf{y} enthält die gemessenen Intensitäten in jedem Kanal. \mathbb{E} ist eine Diagonalmatrix und enthält die Belichtungszeiten der einzelnen Kanäle. Ziel ist, den Vektor \mathbf{x} zu bestimmen, der die wahren Intensitäten beinhaltet. Durch Auflösen der Matrixgleichung nach \mathbf{x} können diese Intensitäten bestimmt werden. Gleichzeitig kann ein globaler Hintergrund durch Subtraktion des Vektors \mathbf{b} abgezogen werden.

Nach der Anwendung des Algorithmus auf die Bilder ist ersichtlich, dass die Kompensation nicht vollständig gelingt (s. Abb. 5.25 untere Reihe). Beim hellgrünen Kanal (532 nm) sind neben den eigentlichen Partikeln (hellgrün umrandet) auch weitere Partikel des benachbarten dunkelgrünen Kanals (560 nm) sichtbar. Anders verhält es sich beim blauen (500 nm) und orangenen Kanal (589 nm). Besonders im blauen Kanal tritt die Stärke des Algorithmus hervor. Der Crosstalk der hellgrünen Partikel wird vollständig kompensiert (s. Abb. 5.25b rote Kreise). Gleichzeitig werden die Intensitäten der blauen Partikel verstärkt und der Hintergrund reduziert. Das Ergebnis erlaubt eine einwandfreie Zuordnung der Partikelfarbe. Ähnlich gut sieht es beim orangenen Kanal aus. Auch hier wurden die Intensitäten verstärkt und der Hintergrund reduziert. Aufgrund des recht hohen Crosstalks von insgesamt 56 % wird der Kontrast durch den Algorithmus stark angehoben.

Das Ergebnis der Kompensation ist jedoch nicht auf mangelnde Fähigkeiten des Algorithmus zurückzuführen. Der Algorithmus ist nur so stark wie die Daten, die man hineingibt. An der Color-Spread Matrix erkennt man bereits einen hohen Grad an Crosstalk.

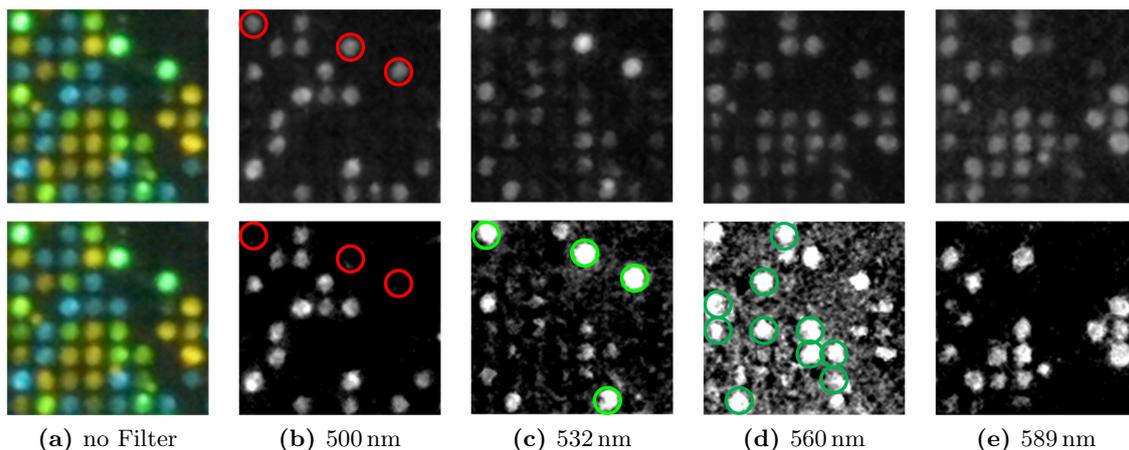


Abb. 5.25.: Crosstalk Kompensation. Mithilfe des beschriebenen Algorithmus kann der auftretende Crosstalk verringert oder sogar kompensiert werden (b und e). Ist der Crosstalk jedoch zu groß, kann dieser nicht mehr korrigiert werden (c und d). Um die Zordnung der Partikelfarbe zu erleichtern, ist der gezeigte Ausschnitt auch in der “no Filter”-Konfiguration gezeigt. Die obere Bildreihe zeigt die gewonnenen Aufnahmen, die in der unteren Reihe durch den beschriebenen Algorithmus bearbeitet wurden.

Derart große Abweichungen können dann zu den gezeigten Resultaten führen. Abhilfe kann durch zweierlei Änderungen geschaffen werden. Zum Einen durch Verwenden von QDs, die einen größeren spektralen Abstand besitzen und zum Anderen durch Fluoreszenzfilter mit eben denselben größeren spektralen Abständen.

Abschließend sei an dieser Stelle angemerkt, dass die vorgestellte Kompensation des Crosstalks nur für Partikel angewendet werden kann, die mit nur einem QD markiert sind.

5.2.5. Abbildungsfehler

Wird das Objektiv direkt an den Kamerakörper montiert, also in seiner dafür vorgesehenen Konfiguration genutzt, sind keine Abbildungsfehler zu erkennen. Die komplette Entwicklung des Objektivs ist schließlich darauf ausgelegt. Für den Einsatz im optischen System hingegen muss der Einfluss des großen Abstands auf mögliche Abbildungsfehler untersucht werden.

Farblängsfehler In der Tat entsteht ein deutlicher Farblängsfehler. Daher müssen die einzelnen Fluoreszenzkanäle unabhängig voneinander fokussiert werden. Hierfür wird die motorisierte Linearachse genutzt, auf der die Kamera montiert ist. An unterschiedlichen Positionen z werden Testbelichtungen gemacht, die Schärfe beziffert und auf einem Graph über der Position z , gleichbedeutend der Schnittweite s'_λ , ausgegeben (s. Abb. 5.26).

Ein Maß für den Farblängsfehler ist die Schnittweitendifferenz

$$\Delta s' = s'_{\lambda_{\min}} - s'_{\lambda_{\max}} \quad (5.8)$$

Diese beschreibt, wie weit die Fokusebenen der kleinsten und größten genutzten Wellenlänge voneinander entfernt sind. Mithilfe der bestimmten Fokusebenen können die Schnittweiten s'_λ abgelesen werden (s. Tab. 5.7).

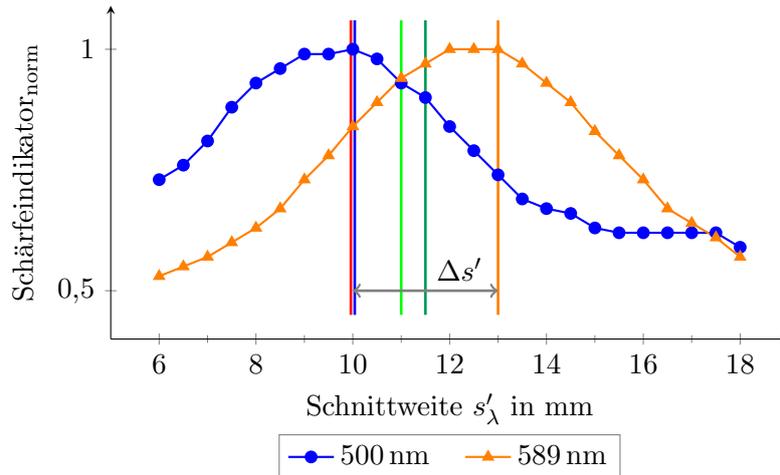


Abb. 5.26.: Fokusebenen des optischen Systems. An der Lage der Fokusebenen kann der Farblängsfehler charakterisiert werden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur die Verläufe der Schärfe der kleinsten und größten genutzten Wellenlänge gezeigt. Die vertikalen Linien markieren die Fokuslage der unterschiedlichen Wellenlängen: Rot – no Filter; blau – 500 nm; hellgrün – 532 nm; dunkelgrün – 560 nm; orange – 589 nm.

Tab. 5.7.: Schnittweiten des optischen Systems. Schnittweiten angegeben als Abstand von den Filterrädern.

Wellenlänge in nm	Schnittweite s'_λ in mm
500	10,0
532	11,0
560	11,5
589	13,0

Damit kann die Schnittweitendifferenz und damit der Farblängsfehler zu $\Delta s' = -3$ mm beziffert werden, womit eine chromatische Unterkorrektur vorliegt. Trotz des hohen Werts fällt der Farblängsfehler in der “no Filter”-Konfiguration nicht störend ins Gewicht, da die Fokusebene hier derart gewählt ist, dass eine gemittelte Schärfe erreicht wird.

Verzeichnung Für die Auslese der Spotintensitäten wird in der Software Mapix ein ideales Gitter über die gewonnenen Aufnahmen gelegt (vgl. Abb. 5.14). Da dieses Gitter nur skaliert, verschoben und verdreht werden kann, ist es essentiell, dass die Aufnahmen keine Verzeichnung aufweisen. Aufgrund der geringen Dimensionen der verwendeten Mikrostrukturen kann bereits eine minimale Verzeichnung dazu führen, dass das Gitter nicht korrekt angepasst werden kann. Daher wurde das optische System auf eine eventuelle Verzeichnung hin überprüft. Zur Messung wurde eine Aufnahme von Mikrostrukturen im Durchlicht genutzt (s. Abb. 5.27a). Da die Mikrostrukturen Toleranzen im oberen Nanometerbereich aufweisen, was sowohl die Strukturdimensionen als auch die Orthogonalität angeht, können diese als ideal orthogonal angesehen werden. Im Durchlicht treten die Strukturwände als dunkle Kreise hervor und können für die Ermittlung der Verzeichnung genutzt werden. Dafür werden diese Kreise mithilfe der Software MATLAB (MathWorks, Inc.) gesucht

und die Kreismittelpunkte ermittelt (s. Abb. 5.27b). Im nächsten Schritt wird ein ideales Gitter über die Aufnahme gelegt, das nur durch eine Rotation und Translation an die gefundenen Kreismittelpunkte angepasst wird. Idealerweise sollten die Abstände zwischen den gefundenen und den idealen Kreismittelpunkten gleich Null sein. Die ermittelten Abstände bewegen sich im Subpixelbereich (s. Abb. 5.27c+d). Die Verzeichnung von weniger als $1/2$ Pixel kann auf die Genauigkeit bei der Bestimmung der Kreismittelpunkte zurückgeführt werden. Berechnet man den Winkel der Abweichung und plottet diesen, so ist lediglich ein Rauschen erkennbar (s. Abb. 5.27e). Somit bildet das optische System verzeichnungsfrei ab. Die Software wurde freundlicherweise von Dr. Tobias Förtsch, der in der Arbeitsgruppe des Autors promovierte, geschrieben.

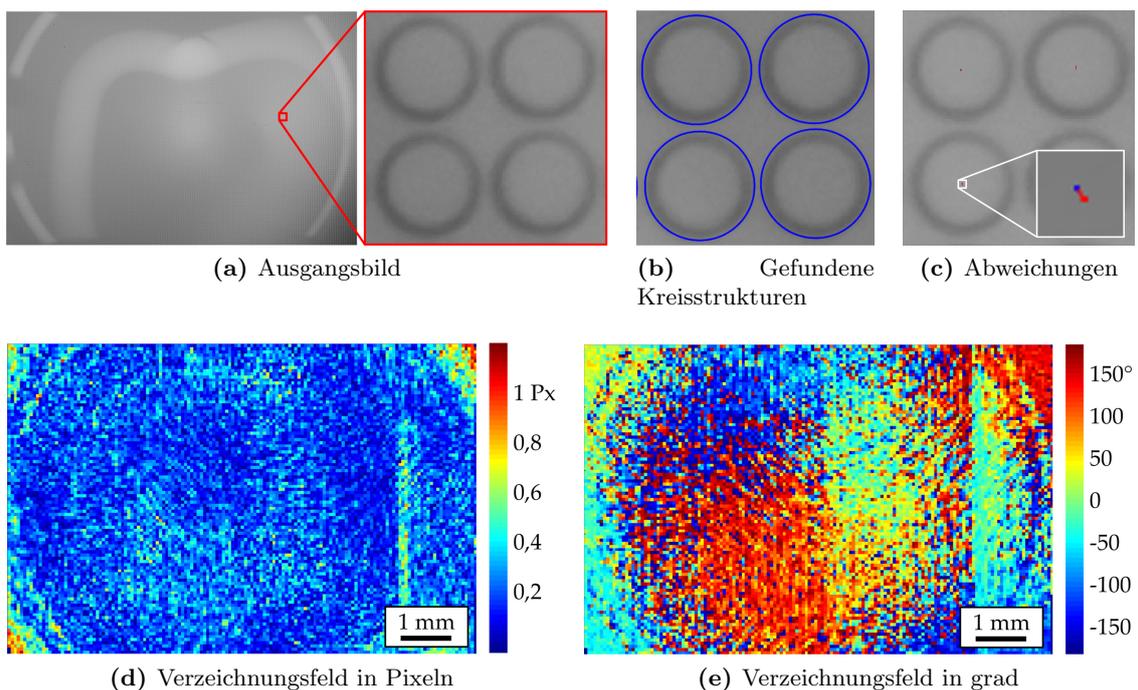


Abb. 5.27.: Verzeichnung des optischen Systems. (a) Durchlichtaufnahme von Mikrostrukturen zur Bestimmung der Verzeichnung. (b) Mithilfe der Software gefundene Kreisstrukturen. (c) Sehr geringe Abweichungen zwischen den gefundenen (blau) und approximierten Kreismittelpunkten (rot). (d) Verzeichnungsfeld in Pixeln zeigt Abweichungen im Subpixelbereich. (e) Verzeichnungsfeld in grad zeigt die zufällige Verteilung der gefundenen Abweichungen, was belegt, dass die ermittelte Verzeichnung der Messgenauigkeit bei der Bestimmung der Kreisstrukturen (b) entspricht.

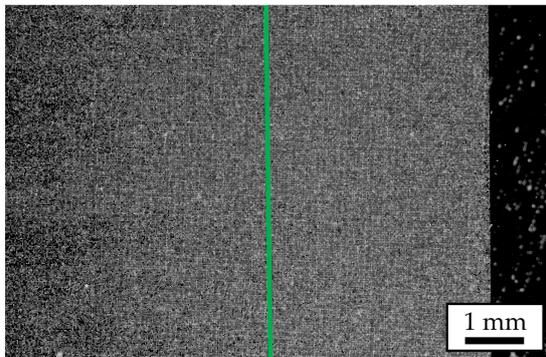
Außer des Farblängsfehlers konnten keine weiteren Abbildungsfehler festgestellt werden.

5.2.6. Nachträgliche Bildbearbeitung

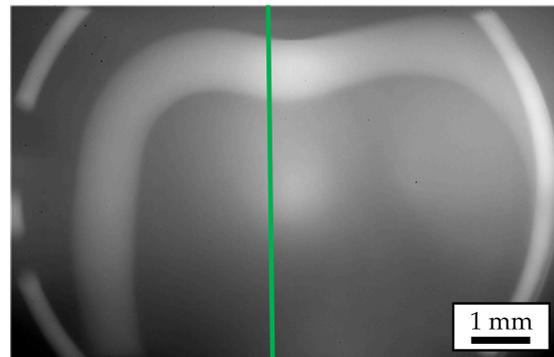
Jedes optische System, bestehend aus Objektiv und Kamera, generiert Artefakte bei der Bildakquisition (s. Kap. 2.2.4). Signale können im Rauschen untergehen oder durch die Vignettierung verfälscht werden. Um diese Artefakte zu korrigieren, werden die gewonnenen Aufnahmen mit Korrekturaufnahmen verarbeitet (s. Abb. 2.17).

Da die erwähnten Artefakte des Rauschens und der Vignettierung optisch nicht zu sehr auffallen, wird deren Anwendung mithilfe von Spotintensitäten verdeutlicht. Hierfür wur-

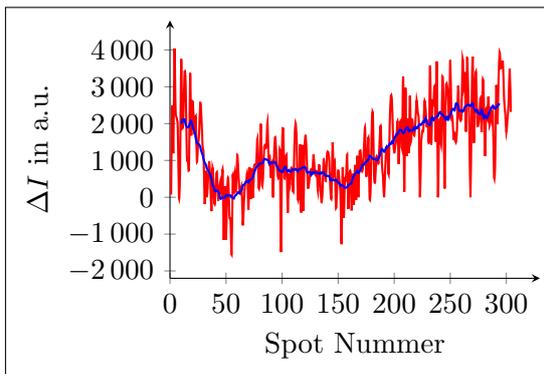
den die Intensitäten einer Spalte von Spots vor und nach der Korrektur ermittelt und voneinander subtrahiert (s. Abb. 5.28a+c). An exakt der gleichen Stelle wurden die Intensitäten auch bei dem Masterflat, das zur Korrektur einer ungleichmäßigen Ausleuchtung genutzt wird, ermittelt (s. Abb. 5.28b+d). Der Intensitätsverlauf beider Aufnahmen korreliert, die ungleichmäßige Ausleuchtung wurde korrigiert.



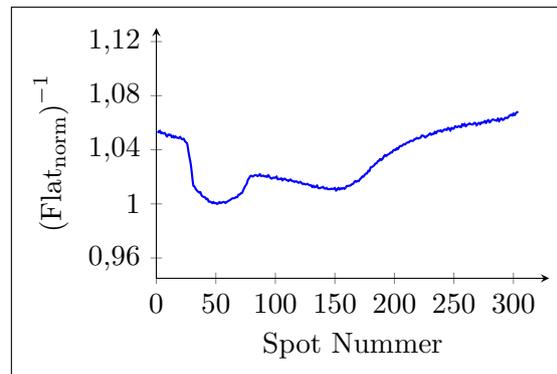
(a) Ausgewählte Spalte in einer Aufnahme



(b) Identische Spalte wie (a) im Masterflat



(c) Intensitätsverlauf der Spalte (a) mit zentriertem Mittelwert (blau)



(d) Invertierter Verlauf der Intensität im Masterflat

Abb. 5.28.: Nachträgliche Bildbearbeitung – Korrektur der ungleichmäßigen Beleuchtung. (a) Spalte zur Ermittlung der Intensitäten. (b) Identische Spalte im Masterflat als Bezug. Das Masterflat wurde zur besseren Darstellung stark im Kontrast angehoben. (c) Zur Demonstration der Wirkweise der Korrektur einer ungleichmäßigen Beleuchtung wurden die Intensitäten einer Spalte in einer bereits korrierten Aufnahme von den Intensitäten der gleichen Spalte vor der Korrektur subtrahiert. Der zentrierte Mittelwert ($n = 20$, Versatz $\tau = 10$) bildet den durchschnittlichen Intensitätsverlauf ab. (d) Invertierter Intensitätsverlauf im Masterflat in der gleichen Spalte wie (a).

In der gezeigten Spalte variiert die Ausleuchtung um maximal 8%. Für die Ermittlung der Schwankungen über das gesamte Gesichtsfeld wurden die Intensitäten des Masterflats auf einen Wert von 100 normiert und in Falschfarben dargestellt (s. Abb. 5.29). Die vorherrschenden orangenen Farbtöne zeigen, dass die Intensität zwischen 60% bis 80% schwankt. Höhere Schwankungen treten auf, da vereinzelte Staubpartikel eine stärkere Abdunklung verursachen.

Analog zur Veranschaulichung der Vignettierung wurde das Rauschen untersucht. Hierfür wurde dieselbe Spalte vor und nach der Korrektur des Rauschens betrachtet. Die

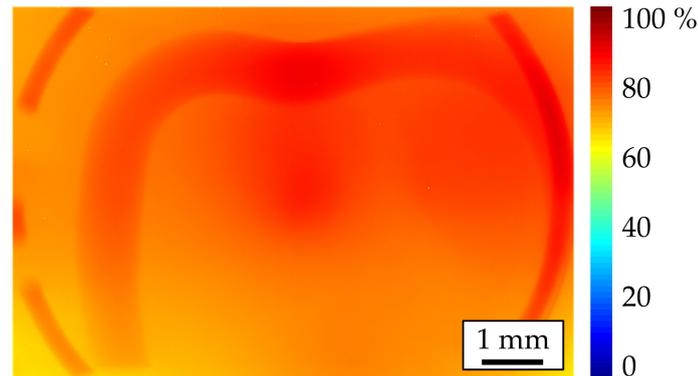


Abb. 5.29.: Vignettierung des optischen Systems. Falschfarbendarstellung des Masterflats aus Abbildung 5.28b. Die mehrheitlich orangenen Farbtöne zeigen, dass die Helligkeit im Bereich von 60 % bis 80 % variiert. Höhere Werte entsprechen punktuellen Staubkörnern.

Kennwerte der Standardabweichung σ und des Signal-Rausch Verhältnisses (SNR) dienen zur Illustration. Innerhalb der Spots sollte das Rauschen zu einer höheren Standardabweichung der Intensitäten führen. Umgekehrt müsste das Signal-Rausch Verhältnis darunter leiden. Subtrahiert man die jeweiligen Kennwerte nach und vor der Korrektur, ist ein deutlicher Unterschied erkennbar (s. Abb. 5.30).

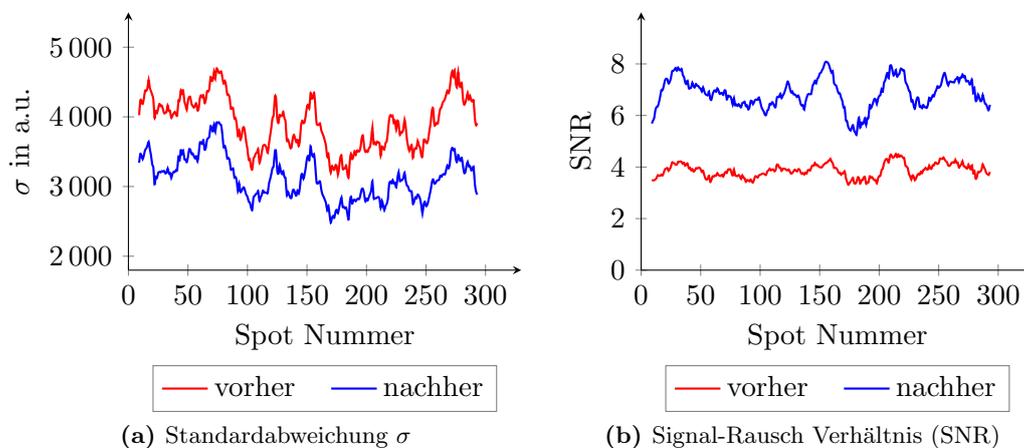


Abb. 5.30.: Nachträgliche Bildbearbeitung – Rauschreduzierung. (a) Durch den Abzug des Masterdarks kann das Rauschen reduziert werden, was sich in einer herabgesetzten Standardabweichung σ der Intensitäten innerhalb der Spots widerspiegelt. Die Daten entstammen derselben Spalte wie in Abbildung 5.28. Gezeigt ist der zentrierte Mittelwert ($n = 20$, Versatz $\tau = 10$). (b) Analog wurde das Signal-Rausch Verhältnis (SNR) analysiert. Hier konnte durch Herausrechnen des Rauschens eine Erhöhung erzielt werden. Auch hier ist der zentrierte Mittelwert ($n = 20$, Versatz $\tau = 10$) gezeigt.

Die Korrektur des Rauschens durch den Abzug des Masterdarks resultiert in einer Abnahme der Standardabweichung der Intensitäten innerhalb der Spots. Gleichzeitig konnte das Signal-Rausch Verhältnis erhöht werden.

5.2.7. Vergleich mit Fluoreszenzscanner

Als Next Best Alternative zum Fluoreszenzscanner muss sich das optische System mit selbigem vergleichen. Dabei werden die Parameter des Signal-Hintergrund Verhältnisses (engl. signal-to-background ratio, kurz SBR) und die notwendige Prozesszeit herangezogen.

Betrachtet man das vorgestellte Proof-of-principle Experiment mit zwei unterschiedlichen QDs sowohl mit optischen System als auch mit dem Fluoreszenzscanner (InnoScan 1100 AL, Innopsys), kann man die Unterschiede erkennen (s. Abb. 5.31).

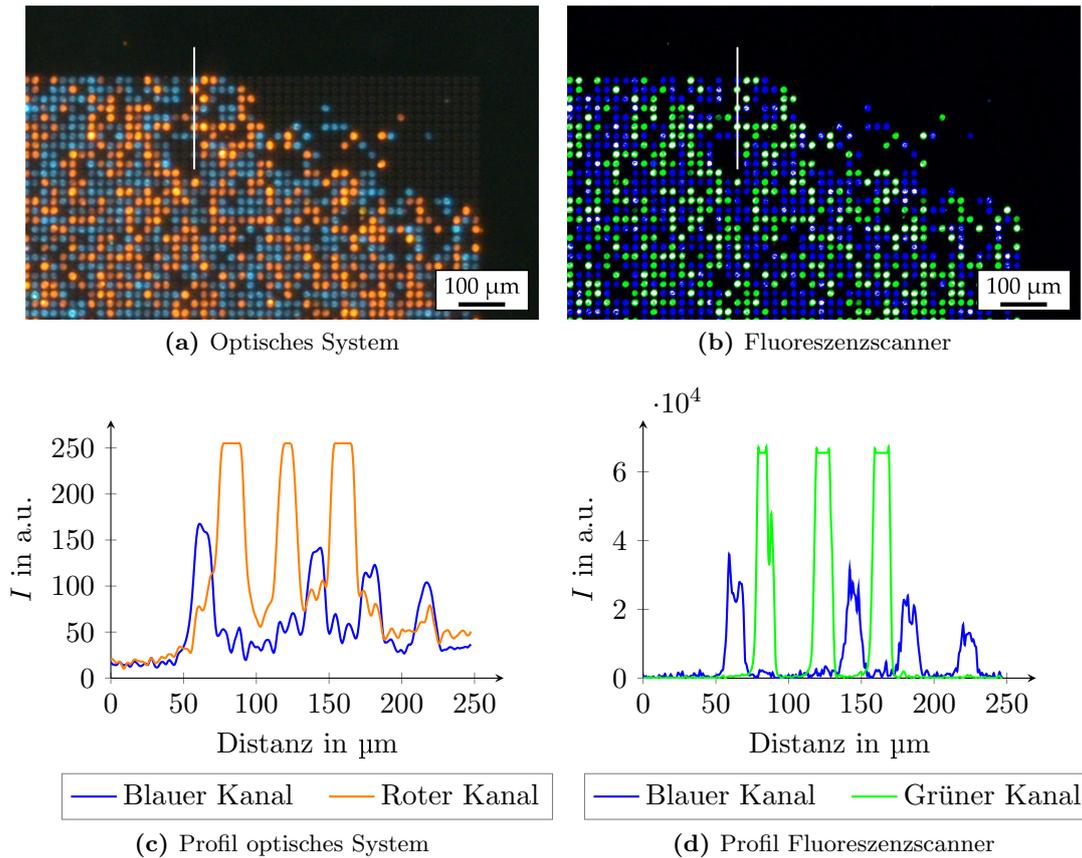


Abb. 5.31.: Vergleich des optischen Systems mit einem Fluoreszenzscanner. (a) Ausschnitt aus dem Proof-of-principle Experiment mit zwei QDs. (b) Derselbe Ausschnitt, aufgenommen mit dem Fluoreszenzscanner⁵⁰. (c) Profil entlang der Linie in (a). (d) Profil entlang der Linie in (b).

Qualitativ ergeben sich die gleichen Resultate – die Partikel können ihren Farben entsprechend unterschieden werden. Aufgrund der konfokalen Aufnahmetechnik kann der Hintergrund im Fluoreszenzscanner gegenüber dem optischen System jedoch drastisch reduziert werden. Zudem werden die Partikel aufgrund der höheren Auflösung deutlich schärfer dargestellt. Diese beiden Tatsachen spiegeln sich auch in den unterschiedlichen SBRs wider – das optische System erreicht ein SBR von 17, der Fluoreszenzscanner ein SBR von über 300 (s. Tab. 5.8).

⁵⁰InnoScan 1100 AL, Innopsys. Auflösung: $1 \mu\text{m Px}^{-1}$. Blauer Kanal: Anregung 488 nm; Filter 520/5nm; Laserpower low; PMT 90. Grüner Kanal: Anregung 532 nm; Filter 580/14nm; Laserpower low; PMT 15.

Tab. 5.8.: Vergleich des optischen Systems mit einem Fluoreszenzscanner.

	Optisches System		Fluoreszenzscanner	
	Blaue QDs	Orangene QDs	Blaue QDs	Orangene QDs
Signal in a.u.	168	255	35 850	65 535
Hintergrund in a.u.	13	15	700	200
SBR	13	17	51	328

In der Bildqualität ist der Fluoreszenzscanner dem optischen System überlegen. Umgekehrt verhält es sich beim Zeitbedarf. Um die Aufnahmen, die für den Vergleich herangezogen wurden, zu erhalten, müssen mit dem optischen System 20 min für die Initialisierung sowie die eigentliche Bildakquisition eingeplant werden. Mit dem Fluoreszenzscanner hingegen dauerte der Vorgang 50 min, wobei 40 min für den Scanvorgang an sich und 10 min für das Abspeichern der Aufnahme entfielen.

Weitere Unterschiede ergeben sich in Bezug auf die Proben, die mit dem jeweiligen System untersucht werden können und in Bezug auf die Möglichkeit, unterschiedliche Fluorophore detektieren zu können. Der Fluoreszenzscanner akzeptiert lediglich Proben im Objektträgerformat. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass alle Ecken intakt sind, da die Probe sonst im Scanner steckenbleiben kann. Zudem darf die Höhe nicht mehr als 1 mm betragen. Im Gegensatz dazu können Proben jeglichen Ausmaßes mit dem optischen System untersucht werden. Da die Proben auf einen Probenstisch gelegt werden, können auch Bruchstücke oder Proben mit irregulärer Form beobachtet werden. Standardmäßig bietet der Fluoreszenzscanner drei Kanäle an, die jeweils mit unterschiedlichen Filtern ausgerüstet werden können. Will man Fluorophore detektieren, die nicht in einen der Kanäle fallen, muss man die notwendigen Filter kosten- und zeitintensiv nachrüsten lassen. Andere Anregungswellenlängen sind aus technischen Gründen nicht austausch- oder nachrüstbar. Hier kann das optische System punkten. In der "no Filter"-Konfiguration können beliebige Fluorophore detektiert werden. Zudem kann die LED einfach durch andere Leuchtquellen ausgetauscht werden, um die Spanne möglicher Fluorophore zu erweitern.

6. Diskussion

6.1. Zusammenfassung

6.1.1. Materialablagerung

Eine der fünf Anforderungen konnte bereits durch den Aufbau des Lasersystems erfüllt werden – der Verzicht auf kostenintensive Bauteile. Mit den vorgestellten Strukturpaarungen konnte der Selective Particle Transfer bei einer maximalen Spotdichte von $1\,000\,000\text{ cm}^{-2}$ umgesetzt werden. Mithilfe des speziellen Laserfokussierobjektivs konnte zudem ein Laserfokussdurchmesser von $5,1\text{ }\mu\text{m}$ erzielt werden, der klein genug war, um die genannte Spotdichte zu ermöglichen. Im Proof-of-principle Experiment wurden Monomere übertragen, die in Mikropartikel eingebettet waren. Durch den Nachweis der erfolgreich gekuppelten Monomere kann diese Anforderung als erfüllt angesehen werden. Jedoch zeigte sich in Multilagenexperimenten, dass die absorbierte Laserstrahlung zu irreparablen Schäden der funktionalisierten Oberfläche des Zielträgers führen kann. Lösungsmöglichkeiten werden im Ausblick (s. Kap. 6.2.1) diskutiert, so dass diese Anforderung als nicht erfüllt angesehen werden muss. Hinsichtlich der Hochdurchsatzkompatibilität galt es zu prüfen, ob eine komplette Lage aus 20 Monomeren an einem Arbeitstag strukturierbar ist. Wenn sich das Array aus 10 000 Spots zusammensetzt, ist dies möglich. Insgesamt konnten somit vier der fünf Anforderungen erfüllt werden (s. Tab. 6.1).

Tab. 6.1.: Evaluierung des Selective Particle Transfer.

Anforderung	Stand
Spotdichte	erfüllt
Laserfokus	erfüllt
keine kostenintensiven Bauteile	erfüllt
Transfer von empfindlichen Materialien	nicht erfüllt
Hochdurchsatz	erfüllt

Neben der Erfüllung der gestellten Anforderungen muss der SPT auch im Hinblick auf den Stand der Technik evaluiert werden (s. Tab. 6.1):

- **Dichte** Mit einer maximalen Spotdichte von $1\,000\,000\text{ cm}^{-2}$ liegt der SPT weit über den Möglichkeiten der SPOT-Synthese und der Xerografie. Diese sind in der Lage, Spots mit einer Dichte von 25 beziehungsweise 800 cm^{-2} zu strukturieren. Mit den Methoden des Mikrocontact printing und der Dip-Pen Nanolithografie können deutlich höhere Spotdichten im Nanometerbereich erreicht werden. Aus diesem Grund wird der SPT mit einem “+” bewertet.
- **Zeitaufwand** Eine Lage aus 20 Monomeren kann an einem Arbeitstag strukturiert werden. Damit befindet sich der SPT im Mittelfeld. Weil die zur Verfügung stehende

Peptidbibliothek sehr klein ist, kann auch mit der SPOT-Synthese eine Lage an einem Arbeitstag fertiggestellt werden. Für eine größere Zahl an Spots müssen hier dagegen mehrere Arrays zeitaufwendig hergestellt werden. Demgegenüber kann durch paralleles Aufbringen von 20 Monomeren bei der Xerografie viel Zeit eingespart werden. Genau wie beim SPT werden beim LIFT-Prozess die verschiedenen Monomere sequentiell aufgebracht. Hier kann allerdings ein sehr schnelles 2D-Scanningsystem zum Einsatz kommen. Die beiden verbleibenden Methoden sind im Bezug auf die Prozesszeit sehr langsam. Deshalb wird der SPT ebenso wie der LIFT-Prozess mit einem “+” bewertet.

- **Kosten** Das teuerste Bauteil des SPT bildet der Laser mit 34 400 €. Derart kostspielige Komponenten sind für die SPOT-Synthese nicht erforderlich. Prinzipiell könnte hier auch von Hand pipettiert werden. Der für die Xerografie erforderliche Drucker ist ein speziell entwickeltes Einzelstück – seine Kosten belaufen sich auf mehr als 1 Mio. €. Auch hier schneiden die beiden hochdichten Technologien nicht gut ab. Für das Microcontact printing werden kostspielige Stempel benötigt, und die Dip-Pen Nanolithografie beruht auf einem AFM. Zur Umsetzung des LIFT-Prozesses müssen mit dem SPT vergleichbare Investitionen getätigt werden. Aus diesem Grund werden beide Methoden mit einer “0” bewertet.
- **Hochdurchsatzkompatibilität** In diese Kategorie fließen alle vorher genannten Punkte mit ein. Wegen ihrer Einfachheit ist die SPOT-Synthese uneingeschränkt für Hochdurchsatzverfahren geeignet. Noch besser schneidet hier die Xerografie ab. Der speziell für die kommerzielle Produktion von Peptidarrays entwickelte Drucker führt zu der “++” Bewertung. Der LIFT-Prozess erhält die gleiche Bewertung, weil hier die Spotdichte gegenüber der Xerografie erhöht werden konnte. Gleichzeitig ist der Zeitbedarf durch den Scanhead akzeptabel. Die beiden seriellen Technologien können auch hier nicht punkten, da sie prinzipiell nicht für Hochdurchsatzverfahren entwickelt worden sind. Mit dem SPT können sehr hohe Spotdichten erreicht werden, die auch an einem Arbeitstag fertiggestellt werden können. Jedoch gibt es derzeit noch Probleme mit der Absorption der Laserstrahlung, die aber durch geeignete Maßnahmen behoben werden können. Daher wird die Hochdurchsatzkompatibilität des SPT mit einem “+” bewertet.

Tab. 6.2.: Der Selective Particle Transfer im Vergleich zum Stand der Technik im Hinblick auf die erreichbare Dichte, den Zeitaufwand, die Kosten und die Kompatibilität mit Hochdurchsatzverfahren.

Method	Dichte	Zeitaufwand	Kosten	HTS-Komp.
SPOT	--	0	++	+
Xerografie	-	++	--	++
LIFT	0	+	0	++
μCP	++	-	-	0
DPN	++	--	-	--
SPT	+	+	0	+

6.1.2. Optische Auslese

Ebenso wie schon beim Lasersystem konnten auch beim optischen System durch den Aufbau bereits mehrere Anforderungen erfüllt werden – die Anzahl der Fluoreszenzkanäle, der Arbeitsabstand und die Anregung mit nur einer Leuchtquelle. Mit den ermittelten Systemparametern können zwei weitere Anforderungen evaluiert werden. Mit einer lateralen Auflösung von $5\ \mu\text{m}$ können die untersuchten Mikropartikel mit einem Durchmesser von $10\ \mu\text{m}$ aufgelöst werden. Damit ist diese Anforderung erfüllt. Anders verhält es sich beim Gesichtsfeld. Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass nicht davon ausgegangen werden kann, dass ein Objektiv ein beliebig großes Gesichtsfeld fehlerfrei abbilden kann, wenn es nicht in einer dafür vorgesehenen Konfiguration betrieben wird. Dies wurde bereits bei der Anforderung an das Gesichtsfeld berücksichtigt. Diese Anforderung konnte dennoch nicht ganz erfüllt werden. Gefordert war ein Gesichtsfeld von $12\ \text{mm} \times 8\ \text{mm}$, erreicht wurde ein um 50 % kleineres Gesichtsfeld mit den Maßen von $9,2\ \text{mm} \times 6,1\ \text{mm}$. Ähnlich verhält es sich bei den Abbildungsfehlern. Gefordert waren minimale Fehler, die eine Auswertung der gewonnenen Aufnahmen nicht negativ beeinflussen. Es trat ein Farblängsfehler auf, der zur Folge hat, dass die Fluoreszenzkanäle einzeln fokussiert werden müssen. Da das System jedoch vollständig automatisiert ist, wirkt sich dieser Abbildungsfehler nicht allzu negativ auf die Performance des Systems aus. In der “no Filter”-Konfiguration fällt die chromatische Unterkorrektur ebenfalls nicht auf, da für die Bildgewinnung hier eine mittlere Fokusebene gewählt wird. Aus den genannten Gründen kann die Anforderung an die Abbildungsfehler als erfüllt angesehen werden. Es verbleibt die Anforderung der Hochdurchsatzkompatibilität. Wie beim SPT versteht man darunter die Möglichkeit, ein vollständiges Experiment innerhalb kurzer Zeit, im Falle des SPT an einem Tag, im Falle des optischen Systems in einer Stunde, durchführen zu können. Die ermittelten Prozesszeiten belegen, dass dies erreicht wurde. Im Ergebnis konnten sechs der sieben gestellten Anforderungen erfüllt werden (s. Tab. 6.3):

Tab. 6.3.: Evaluierung des optischen System.

Anforderung	Stand
Auflösung	erfüllt
Gesichtsfeld	nicht erfüllt
Abbildungsfehler	erfüllt
Fluoreszenzkanäle	erfüllt
Arbeitsabstand	erfüllt
Anregung	erfüllt
Hochdurchsatz	erfüllt

Auch das optische System muss sich dem Vergleich mit dem Stand der Technik stellen (s. Tab. 6.4)

- **Auflösung** Mit einer lateralen Auflösung von $5\ \mu\text{m}$ kann das optische System nicht gegen ein gewöhnliches Mikroskop mit Auflösungen von unter $1\ \mu\text{m}$ ankommen. Dennoch liegt die Auflösung deutlich unter der der vorgestellten Mikroskopscanner von $80\ \mu\text{m}$. Umgekehrt verhält es sich beim erzielten Gesichtsfeld. Eine Aufnahme des optischen Systems deckt eine Fläche von $9,2\ \text{mm} \times 6,1\ \text{mm}$ ab und stellt damit jedes

Mikroskop in den Schatten. Demgegenüber stehen auch hier die Mikroskopscanner, die eine deutlich größere Fläche detektieren können. Damit schließt das optische System die Lücke zwischen diesen beiden Technologien. Da seine Auflösung nicht zu sehr von der von Mikroskopen abweicht, kann eine “+” Bewertung ausgesprochen werden.

- **Zeitaufwand** Die angesprochenen Gesichtsfelder haben neben der gewünschten Anzahl an Fluoreszenzkanälen direkten Einfluss auf den Zeitaufwand. Je kleiner das Gesichtsfeld, desto mehr Aufnahmen müssen erstellt werden, um die gleiche Fläche abzurastern. Mit ihrem kleinen Gesichtsfeld benötigen Mikroskope weitaus länger zur Abrasterung eines Objektträgers. Mikroskopscanner können hingegen gleich mehrere Objektträger in einer Aufnahme erfassen, jedoch bei unzureichender Auflösung. Es verbleibt der direkte Konkurrent des optischen Systems, der Fluoreszenzscanner. Für die gleiche Anzahl an Fluoreszenzkanälen benötigt ein Fluoreszenzscanner, obwohl bis zu drei Kanäle gleichzeitig detektiert werden können, ungefähr doppelt so lange wie das optische System. Mit dem optischen System ist die komplette Erfassung eines Objektträgers in fünf Fluoreszenzkanälen in unter einer Stunde möglich, weshalb sein Zeitaufwand mit einem “+” bewertet wird.
- **Kosten** Lichtmikroskope sind mit Anschaffungskosten im Bereich von 10 000 € verbunden. Mikroskopscanner sind für ungefähr das Doppelte zu bekommen. Für ein konfokales Laserscanning Fluoreszenzmikroskop hingegen muss bereits mit 100 000 € gerechnet werden. In der gleichen Preisstufe bewegen sich Fluoreszenzscanner. Mit Gesamtkosten von 27 000 € bewegt sich das optische System im unteren Preissegment. In Anbetracht der Fähigkeiten ist hier “++” angebracht.
- **Hochdurchsatzkompatibilität** Wie gut lässt sich das optische System in den Alltag einbinden, wie komfortabel ist es in Bezug auf den Durchsatz? Hier spielen die drei bereits genannten Kriterien hinein. Seine verhältnismäßig niedrigen Anschaffungskosten senken die Hürde für einen industriellen Einsatz. Der Zeitaufwand von nur einer Stunde zur vollständigen Erfassung eines Objektträgers bei gleichzeitig guter Auflösung kann in Zukunft seine Anwendungsspektren deutlich erhöhen. Der einfache Austausch der Leuchtquelle genügt, um weitere Wellenlängenbereiche zugänglich zu machen. Dies ist mit keinem am Markt verfügbaren System möglich. Ein weiteres Alleinstellungsmerkmal stellt die “no Filter”-Konfiguration zur Erfassung eines breiten Spektrums an Fluoreszenzen dar. Mit einer Aufnahme können so verschiedene Fluorophore und QDs detektiert und unterschieden werden, ohne dass zusätzliche Aufnahmen in unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen angefertigt werden müssen. Das Gesamtsystem wird daher ebenfalls mit einem “++” bewertet.

Tab. 6.4.: Vergleich der Methoden zur optischen Auslese hinsichtlich Auflösung, Zeitaufwand zur Erfassung, Kosten für die Gerätschaften und Kompatibilität mit Hochdurchsatzverfahren.

Methode	Auflösung	Zeitaufwand	Kosten	HTS-Komp.
Lichtmikroskopie	++	-	+	0
Fluoreszenzmikroskopie	++	--	--	0
Mikroskopscanner	-	+	+	+
Fluoreszenzscanner	+	0	-	+
optisches System	+	+	++	++

6.2. Ausblick

Was muss getan werden, um mit dem Lasersystem auch empfindliche Materialien übertragen zu können? Welche weiteren Anwendungsbereiche können durch zukünftige Entwicklungen des optischen Systems eröffnet werden?

6.2.1. Selective Particle Transfer

Der Wärmeeintrag in den Zielträger führt dazu, dass die funktionalisierte Oberfläche des Zielträgers Schicht für Schicht zerstört wird. Um dies zu verringern, könnte ein Laser mit kürzerer Pulsdauer eingesetzt werden. Ob hierfür Pulsdauern im Piko- oder Femtosekundenbereich notwendig sind, müsste durch Versuchsreihen oder Simulationen ermittelt werden. Unterschiede ergeben sich in Bezug auf die Anschaffungskosten und dem Wärmeeintrag. Gepulste Laser im Pikosekundenbereich sind preisgünstiger, jedoch könnte ihr Wärmeeintrag immer noch zu groß sein. Umgekehrt verhält es sich mit Lasern im Femtosekundenbereich – diese sind teurer in der Anschaffung, ihr Wärmeeintrag kann jedoch vernachlässigt werden. Die Wellenlänge sollte nicht im ultravioletten Bereich des Spektrums liegen, da bereits gekuppelte Monomere durch die energiereiche Strahlung Schaden nehmen könnten.

Zur Ermittlung der Prozesszeit wurde ein vergleichsweise kleines Array aus 10 000 Spots betrachtet. Der Vorteil des Selective Particle Transfer liegt in der ultrahohen Spotdichte. Momentan wird das Substratpaket aus Ausgangs- und Zielträger unter dem stationären Laserstrahl bewegt. Wegen der Trägheit des Mikroskoptisches ist dieser Vorgang recht langsam. Eine drastische Beschleunigung des Vorgangs kann durch den Einsatz eines 2D-Scanningsystems erfolgen^[17,60]. Zwei galvanometrisch angesteuerte Spiegel lenken den Laserstrahl ab. Da diese Spiegel sehr schnell verfahren können, kann der Laser die vorgegebene Fläche deutlich schneller abrastern.

Unter den Transfermethoden bietet der Transfer “klein in groß” gegenüber dem Transfer 1:1 den Vorteil, dass der Ausgangsträger nicht über dem Zielträger positioniert werden muss. Da der Zeitbedarf für den Positionierungsschritt pro Monomer mit 5 min zu Buche schlägt, können durch den Verzicht auf diese Transfermethode bei 20 Monomeren pro Tag 100 min eingespart werden. Wenn auch auf die höchste Spotdichte verzichtet wird, schlägt die Transfermethode “klein in groß” mit $111\,111\text{ cm}^{-2}$ immer noch den Stand der Technik.

Mit den drei vorgestellten Maßnahmen könnte der Selective Particle Transfer als Hochdurchsatzmethode die frühen Stadien der Medikamentenentwicklung erheblich beschleunigen.

gen und so ihre Kosten deutlich reduziert werden. Außerdem könnten mit der verfügbaren großen Bibliothek neue Anwendungsgebiete erschlossen werden, die bisher faktisch nicht zugänglich waren. Hierzu zählt die Suche nach neuen Antibiotika. Durch den allzu häufigen Einsatz von Antibiotika entstehen heute immer mehr Resistenzen, die nur schwer behandelt werden können. Peptidbasierte Antibiotika zeichnen sich durch eine hohe Spezifität aus. Um sie zu finden, müssen allerdings sehr viele Peptide kombinatorisch untersucht werden, weil die Suche heute noch praktisch bei Null beginnt. Gerade hier ist eine große Peptidbibliothek sehr hilfreich.

6.2.2. Optisches System

Die künftige Entwicklung des optischen Systems kann an drei Punkten ansetzen – der Bildakquisition, der automatisierten Auslese und an einer komplett neuartigen Anwendung.

Die verwendete Nikon D810 besitzt einen ungekühlten CMOS-Chip mit einer Bittiefe von 12 bit. Die Vorteile dieser Kamera liegen in der schnellen Bildakquisition und ihren niedrigen Anschaffungskosten. Wissenschaftlich hochwertigere Kameras arbeiten mit gekühlten CCD-Chips und erfassen Signale mit 16 bit. Die Kühlung des Chips reduziert das Rauschen. Als Faustregel gilt, das Rauschen halbiert sich bei einer Temperaturerniedrigung um 10 K. Und durch Erhöhung der Bittiefe können zudem feinere Intensitätsunterschiede detektiert werden.

Zur Darstellung der Ergebnisse wurden zusammengesetzte Aufnahmen verwendet. Dieser Prozess ist jedoch zeit- und rechenaufwendig und häufig nicht erfolgreich. Trotzdem muss die komplette Fläche dekodiert werden. Anstatt Bildaufnahmen zusammensetzen, könnte ein alternativer Ansatz bessere Ergebnisse erwarten lassen. Wird jede Aufnahme für sich betrachtet, gestaltet sich die Auswertung deutlich einfacher, da weniger Daten verarbeitet werden müssen. Aus jeder Aufnahme resultiert eine Textdatei, die die dekodierte Bibliothek beinhaltet. Nun könnten die unterschiedlichen Textdateien so zusammengefügt werden, dass deutlich weniger Rechenaufwand entsteht, weil die Anpassung nur in ganzen Spalten oder Zeilen erfolgen muss und damit weit weniger anfällig ist als das pixelweise Aneinanderfügen von Bildern.

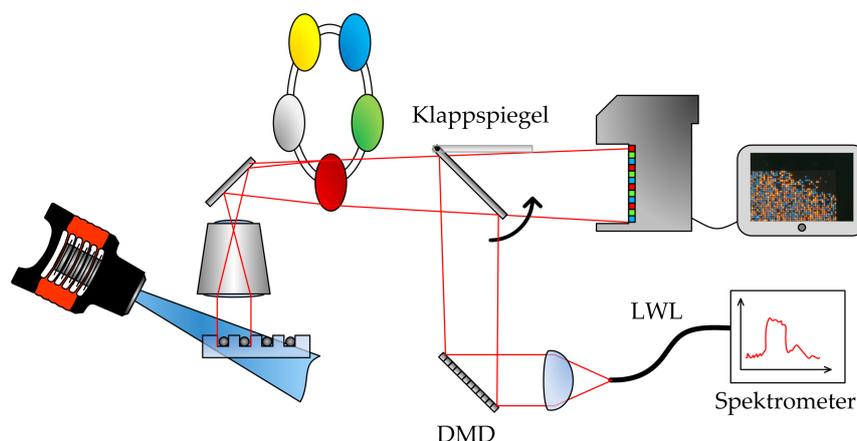


Abb. 6.1.: Ortsaufgelöste Spektrometrie mit dem optischen System. Durch den Einsatz eines digitalen Spiegelarrays (DMD) und eines Lichtwellenleiters (LWL) können ortsaufgelöste Spektren einer Probe angefertigt werden.

Neben den Bildinformationen sind auch spektrale Informationen von Interesse. In der Materialforschung beispielsweise stellt die Suche nach neuen hitzebeständigen Fluorophoren eine Herausforderung dar. Außerdem sollen die Fluorophore vorgegebene spektrale Eigenschaften besitzen. Die Untersuchung von unterschiedlichen Fluorophoren im Arrayformat war bisher nicht möglich. Das optische System kann hierfür erweitert werden. Über ein digitales Spiegelarray (engl. digital mirror device, kurz DMD) können definierte Bereiche des Gesichtsfelds in ein Spektrometer geleitet und spektral untersucht werden (s. Abb. 6.1). Um eine Korrelation zwischen den gewonnenen Spektren und der Probe selbst herzustellen, kann die Kamera über einen Klappspiegel Aufnahmen des Bildbereichs anfertigen, der untersucht werden soll. Dadurch kann beispielsweise ein Array aus unterschiedlichen Spots sowohl bildgebend als auch spektral untersucht werden.

Diese orts aufgelöste Spektrometrie wird auch bei Großobservatorien zur Untersuchung der spektralen Zusammensetzung von Sternen eingesetzt. Der Unterschied zur Funktionsweise des optischen Systems besteht darin, dass dort jeder Pixel an ein separates Spektrometer angeschlossen ist, um den Durchsatz zu steigern. Beim optischen System hingegen werden die Spektren der unterschiedlichen Bereiche sequentiell erfasst.

Diese Möglichkeit der orts aufgelösten Spektrometrie ist bisher nicht kommerziell verfügbar. Gegaart mit den genannten Vorteilen des optischen Systems kann das Anwendungsgebiet erweitert werden, um viele Tests in kurzer Zeit durchzuführen.

Literaturverzeichnis

- [1] Joseph A. DiMasi, Henry G. Grabowski, and Ronald W. Hansen. Innovation in the pharmaceutical industry: new estimates of r&d costs. *Journal of health economics*, 47:20–33, 2016.
- [2] Mario Beyer, Alexander Nesterov, Ines Block, Kai König, Thomas Felgenhauer, Simon Fernandez, Klaus Leibe, Gloria Torralba, Michael Hausmann, and Ulrich Trunk. Combinatorial synthesis of peptide arrays onto a microchip. *Science*, 318(5858):1888, 2007.
- [3] Andrea Palermo. *Development of immuno assays for the investigation of peptide antibody interactions in array format*. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), expected in 2018.
- [4] Ronald Frank. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron*, 48(42):9217–9232, 1992.
- [5] Helen E. Blackwell. Hitting the spot: small-molecule macroarrays advance combinatorial synthesis. *Current opinion in chemical biology*, 10(3):203–212, 2006.
- [6] Robert B. Merrifield. Solid phase peptide synthesis. i. the synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 85(14):2149–2154, 1963.
- [7] Ronald Frank. The spot-synthesis technique: synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications. *Journal of immunological methods*, 267(1):13–26, 2002.
- [8] Volker Stadler, Thomas Felgenhauer, Mario Beyer, Simon Fernandez, Klaus Leibe, Stefan Güttler, Martin Gröning, Kai König, Gloria Torralba, and Michael Hausmann. Combinatorial synthesis of peptide arrays with a laser printer. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(37):7132–7135, 2008.
- [9] J. Bohandy, B. F. Kim, and F. J. Adrian. Metal deposition from a supported metal film using an excimer laser. *Journal of applied physics*, 60(4):1538–1539, 1986.
- [10] F. J. Adrian, J. Bohandy, B. F. Kim, An N. Jette, and P. Thompson. A study of the mechanism of metal deposition by the laser-induced forward transfer process. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics Processing and Phenomena*, 5(5):1490–1494, 1987.
- [11] David A. Willis and Vicentiu Grosu. Microdroplet deposition by laser-induced forward transfer. *Applied Physics Letters*, 86(24):244103, 2005.
- [12] A. Palla-Papavlu, V. Dinca, C. Luculescu, J. Shaw-Stewart, M. Nagel, T. Lippert, and M. Dinescu. Laser induced forward transfer of soft materials. *Journal of Optics*, 12(12):124014, 2010.

- [13] P. Serra, M. Colina, Juan Marcos Fernández-Pradas, Lidia Sevilla, and J. Luis Morenza. Preparation of functional dna microarrays through laser-induced forward transfer. *Applied Physics Letters*, 85(9):1639–1641, 2004.
- [14] M. Colina, Martí Duocastella, J. Marcos Fernández-Pradas, P. Serra, and José L. Morenza. Laser-induced forward transfer of liquids: Study of the droplet ejection process. *Journal of applied physics*, 99(8):084909, 2006.
- [15] J. M. Fernández-Pradas, M. Colina, P. Serra, J. Dominguez, and J. L. Morenza. Laser-induced forward transfer of biomolecules. *Thin Solid Films*, 453:27–30, 2004.
- [16] Clemens von Bojnicic-Kninski. *Automatisierung eines Lasersystems zum ortsgenauen Transfer von Mikropartikeln*. Masterthesis (unveröffentlicht), Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, 2014.
- [17] Tobias C. Förtsch. *Kombinatorische Mikrostrukturierung von Biooberflächen mit Hilfe des laserinduzierten Vorwärtstransfers*. unveröffentlichte Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2017.
- [18] Felix F. Loeffler, Tobias C. Foertsch, Roman Popov, Daniela S. Mattes, Martin Schlageter, Martyna Sedlmayr, Barbara Ridder, Florian-Xuan Dang, Clemens von Bojnicic-Kninski, Laura K. Weber, Andrea Fischer, Juliane Greifenstein, Valentina Bykovskaya, Ivan Buliev, F. Ralf Bischoff, Lothar Hahn, Michael A. R. Meier, Stefan Brase, Annie K. Powell, Teodor Silviu Balaban, Frank Breitling, and Alexander Nesterov-Mueller. High-flexibility combinatorial peptide synthesis with laser-based transfer of monomers in solid matrix material. *Nature communications*, 7:11844, 2016.
- [19] Amit Kumar and George M. Whitesides. 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. *Applied Physics Letters*, 63(14):2002–2004, 1993.
- [20] Younan Xia and George M. Whitesides. Soft lithography. *Annual review of materials science*, 28(1):153–184, 1998.
- [21] Pirmin C. Hidber, Wolfgang Helbig, Enoch Kim, and George M. Whitesides. Microcontact printing of palladium colloids: micron-scale patterning by electroless deposition of copper. *Langmuir*, 12(5):1375–1380, 1996.
- [22] Venugopal Santhanam and Ronald P. Andres. Microcontact printing of uniform nanoparticle arrays. *Nano Letters*, 4(1):41–44, 2004.
- [23] Arjan P. Quist, Elisabeth Pavlovic, and Sven Oscarsson. Recent advances in microcontact printing. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 381(3):591–600, 2005.
- [24] Richard D. Piner, Jin Zhu, Feng Xu, Seunghun Hong, and Chad A. Mirkin. ” dip-pen” nanolithography. *Science*, 283(5402):661–663, 1999.
- [25] Stephan Krämer, Ryan R. Fuieler, and Christopher B. Gorman. Scanning probe lithography using self-assembled monolayers. *Chemical Reviews*, 103(11):4367–4418, 2003.
- [26] David S. Ginger, Hua Zhang, and Chad A. Mirkin. The evolution of dip-pen nanolithography. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(1):30–45, 2004.

-
- [27] Khalid Salaita, Yuhuang Wang, and Chad A. Mirkin. Applications of dip-pen nanolithography. *Nature nanotechnology*, 2(3):145–155, 2007.
- [28] Nicholas C. Dobes, Rahul Dhopeswarkar, W. Hampton Henley, J. Michael Ramsey, Christopher E. Sims, and Nancy L. Allbritton. Laser-based directed release of array elements for efficient collection into targeted microwells. *Analyst*, 138(3):831–838, 2013.
- [29] Jae Hak Lee, Choong Don Yoo, and Yong-Seok Kim. A laser-induced thermal spray printing process for phosphor layer deposition of pdp. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 17(2):258, 2006.
- [30] Valentina Bykovskaya. *Microstructure-Assisted Particle Pattern Generation for High Density Peptide Arrays*. Dissertation, Dissertation, Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie, 2016.
- [31] Clemens von Bojnicic-Kninski, Valentina Bykovskaya, Frieder Maerkele, Roman Popov, Andrea Palermo, Daniela S. Mattes, Laura K. Weber, Barbara Ridder, Tobias C. Foertsch, and Alexander Welle. Selective functionalization of microstructured surfaces by laser-assisted particle transfer. *Advanced Functional Materials*, 26(39):7067–7073, 2016.
- [32] Albert P. Li, Chris Bode, and Yumiko Sakai. A novel in vitro system, the integrated discrete multiple organ cell culture (idmoc) system, for the evaluation of human drug toxicity: comparative cytotoxicity of tamoxifen towards normal human cells from five major organs and mcf-7 adenocarcinoma breast cancer cells. *Chemico-biological interactions*, 150(1):129–136, 2004.
- [33] Gretchen J. Mahler, Mandy B. Esch, Raymond P. Glahn, and Michael L. Shuler. Characterization of a gastrointestinal tract microscale cell culture analog used to predict drug toxicity. *Biotechnology and bioengineering*, 104(1):193–205, 2009.
- [34] Erik Meijering. Cell segmentation: 50 years down the road [life sciences]. *IEEE Signal Processing Magazine*, 29(5):140–145, 2012.
- [35] *Improved red blood cell counting in thin blood smears*. IEEE, 2011.
- [36] H-S Wu, J. Berba, and J. Gil. Iterative thresholding for segmentation of cells from noisy images. *Journal of microscopy*, 197(3):296–304, 2000.
- [37] Su Eun Chung, Jiyun Kim, Dong Yoon Oh, Younghoon Song, Sung Hoon Lee, Seungki Min, and Sunghoon Kwon. One-step pipetting and assembly of encoded chemical-laden microparticles for high-throughput multiplexed bioassays. *Nature communications*, 5, 2014.
- [38] Ernst Abbe. Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 9(1):413–418, 1873.
- [39] David J. Stephens and Victoria J. Allan. Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science*, 300(5616):82–86, 2003.
- [40] Marta Fernández-Suárez and Alice Y. Ting. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(12):929–943, 2008.

- [41] Milind Rajadhyaksha, Melanie Grossman, Dina Esterowitz, Robert H. Webb, and R. Rox Anderson. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast. *Journal of Investigative Dermatology*, 104(6):946–952, 1995.
- [42] Jason R. Swedlow and Melpomeni Platani. Live cell imaging using wide-field microscopy and deconvolution. *Cell structure and function*, 27(5):335–341, 2002.
- [43] Rayleigh. Xv. on the theory of optical images, with special reference to the microscope. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 42(255):167–195, 1896.
- [44] Mats G. L. Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of microscopy*, 198(2):82–87, 2000.
- [45] Stefan W. Hell and Jan Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics letters*, 19(11):780–782, 1994.
- [46] Stefan W. Hell. Toward fluorescence nanoscopy. *Nature biotechnology*, 21(11):1347–1355, 2003.
- [47] Beate Neumann, Thomas Walter, Jean-Karim Hériché, Jutta Bulkescher, Holger Erfle, Christian Conrad, Phill Rogers, Ina Poser, Michael Held, and Urban Liebel. Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes. *Nature*, 464(7289):721–727, 2010.
- [48] Annemieke Strijkstra, Kathleen Trautwein, Stefan Roesler, Christoph Feenders, Daniel Danzer, Udo Riemenschneider, Bernd Blasius, and Ralf Rabus. High performance ccd camera system for digitalisation of 2d dige gels. *Proteomics*, 16(14):1975–1979, 2016.
- [49] Claude Elwood Shannon. Communication in the presence of noise. *Proceedings of the IRE*, 37(1):10–21, 1949.
- [50] Hans Joachim Eichler and Jürgen Eichler. *Laser: Bauformen, Strahlführung, Anwendungen*. Springer-Verlag, 2015.
- [51] Boris N. Chichkov, C. Momma, Stefan Nolte, F. von Alvensleben, and A. Tünnermann. Femtosecond, picosecond and nanosecond laser ablation of solids. *Applied Physics A*, 63(2):109–115, 1996.
- [52] Martin v. Allmen and Andreas Blatter. *Laser-beam interactions with materials: physical principles and applications*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [53] Bastian Münster. *Entwicklung von Mikropartikeln für die kombinatorische Synthese hochdichter Peptidarrays durch laserbasierte Verfahren*. Dissertation, Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie, 2014.
- [54] Aleksander Jablonski. Efficiency of anti-stokes fluorescence in dyes. *Nature*, 131(839-840):21, 1933.
- [55] Louis E. Brus. Electron–electron and electron–hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state. *The Journal of chemical physics*, 80(9):4403–4409, 1984.

-
- [56] Roman Popov. *Process Development for Manufacturing Stochastic Peptide Microarrays*. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), expected in 2018.
- [57] Mario Beyer, Thomas Felgenhauer, F. Ralf Bischoff, Frank Breitling, and Volker Stadler. A novel glass slide-based peptide array support with high functionality resisting non-specific protein adsorption. *Biomaterials*, 27(18):3505–3514, 2006.
- [58] Volker Stadler, Robert Kirmse, Mario Beyer, Frank Breitling, Thomas Ludwig, and F. Ralf Bischoff. Pegma/mma copolymer graftings: generation, protein resistance, and a hydrophobic domain. *Langmuir*, 24(15):8151–8157, 2008.
- [59] Clemens von Bojnicic-Kninski. *Entwicklung eines Lasersystems zum ortsgenauen Transfer von Mikropartikeln*. Bachelorthesis (unveröffentlicht), Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, 2012.
- [60] Frieder Märkle. *Laserbasierte Verfahren zur Herstellung hochdichter Peptidarrays*. KIT Scientific Publishing, 2014.
- [61] Sebastian Mathias Schillo. *Prozessentwicklung für die Automatisierung der Herstellung und Anwendung von hochdichten Peptidmicroarrays*. KIT Scientific Publishing, 2014.
- [62] Matthew S. Brown and Craig B. Arnold. Fundamentals of laser-material interaction and application to multiscale surface modification. *Laser precision microfabrication*, 135:91–120, 2010.
- [63] Arthur Ashkin, James M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and Steven Chu. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics letters*, 11(5):288–290, 1986.
- [64] Kvetoslav R. Spurny. *Advances in Aerosol Gas Filtration*. CRC Press, 1998.
- [65] Felix Löffler, J. Wagner, K. König, F. Märkle, S. Fernandez, C. Schirwitz, G. Torralba, M. Hausmann, V. Lindenstruth, and F. R. Bischoff. High-precision combinatorial deposition of micro particle patterns on a microelectronic chip. *Aerosol Science and Technology*, 45(1):65–74, 2011.
- [66] Barbara Ridder, Tobias C. Foertsch, Alexander Welle, Daniela S. Mattes, Clemens M. von Bojnicic-Kninski, Felix F. Loeffler, Alexander Nesterov-Mueller, Michael A. R. Meier, and Frank Breitling. Development of a poly (dimethylacrylamide) based matrix material for solid phase high density peptide array synthesis employing a laser based material transfer. *Applied Surface Science*, 389:942–951, 2016.
- [67] Jordyn Alwater, Daniela Mattes, Bettina Streit, Clemens von Bojnicic-Kninski, Felix Löffler, Harald Fuchs, and Michael Hirtz. Combinatorial synthesis of macromolecular arrays by microchannel cantilever spotting (μcs). *Advanced Materials (submission planned)*, expected in 2018.
- [68] Tobias Foertsch, Daniela Mattes, Alex Davis, Roman Popov, Clemens von Bojničić-Kninski, Felix Held, Svetlana Tsogoeva, Felix Löffler, Frank Breitling, and Alexander Nesterov-Mueller. Material flow photonics. *Nature Photonics (submission planned)*, expected in 2018.

- [69] Tobias C. Förtsch, Clemens von Bojnicic-Kninski, M. Shahbaz Khan, Frieder Märkle, Laura K. Weber, Andrea Fischer, Bastian Münster, Barbara Ridder, Daniela Althuon, and Jakob Striffler. Robuste erkennung von kombinierten positions- und identifizierungs-mikromarkierungen. *MikroSystemTechnik 2015*, 2015.
- [70] Felix E. Held, Anton A. Guryev, Tony Fröhlich, Frank Hampel, Axel Kahnt, Corina Hutterer, Mirjam Steingruber, Hanife Bahsi, Clemens von Bojničić-Kninski, and Daniela S. Mattes. Facile access to potent antiviral quinazoline heterocycles with fluorescence properties via merging metal-free domino reactions. *Nature communications*, 8:15071, 2017.
- [71] Hyohoon Choi, Kenneth R. Castleman, and Alan C. Bovik. Color compensation of multicolor fish images. *IEEE transactions on medical imaging*, 28(1):129–136, 2009.
- [72] Max Berek. *Grundlagen der Tiefenwahrnehmung im Mikroskop: mit einem Anhang über die Bestimmung der obersten Grenze des unvermeidlichen Fehlers einer Messung aus der Häufigkeitsverteilung der zufälligen Maximalfehler*. 1927.
- [73] Eckart Laurien and Herbert Oertel Jr. Numerische strömungsmechanik. *Vieweg Teubner, Wiesbaden, Germany*, 2009.

A. Anhang

A.1. Abschätzung der Schärfentiefe eines Mikroskopobjektivs

Eine Abschätzung der visuell empfundenen Schärfentiefe kann nach der von Max Berek ermittelten Formel

$$T_{\text{vis}} = n \left(\frac{\lambda}{A_{\text{N}}^2} + \frac{340 \mu\text{m}}{A_{\text{N}} \cdot M_{\text{tot vis}}} \right) \quad (\text{A.1})$$

erfolgen^[72].

Das Objekt wird vom Medium mit dem Brechungsindex n umgeben. Mit der Wellenlänge λ wird das Objekt bestrahlt. A_{N} beschreibt die numerische Apertur des verwendeten Objektivs (hier: 4-fach). Die visuelle Gesamtvergrößerung des Mikroskops ($M_{\text{Objektiv}} \cdot M_{\text{Kamerakonverter}} = 4 \cdot 0,75$) wird mit dem Parameter $M_{\text{tot vis}}$ beschrieben.

Mit den in Tabelle A.1 genannten Parametern kann die Schärfentiefe eines gewöhnlichen Lichtmikroskops bei Verwendung eines 4-fach Objektivs zu $130 \mu\text{m}$ bestimmt werden.

Tab. A.1.: Parameter zur Abschätzung der Schärfentiefe T_{vis} .

Parameter		Maßzahl	Einheit
Brechungsindex	n	1	–
Wellenlänge	λ	0,55	μm
Numerische Apertur	A_{N}	0,2	–
Visuelle Gesamtvergrößerung	$M_{\text{tot vis}}$	3	–

A.2. Schlüsselkomponenten des Lasersystems

Tab. A.2.: Schlüsselkomponenten des Lasersystems, geordnet nach Baugruppen.

Baugruppe	Beschreibung	Art.-Nr. ⁵¹	Hersteller
Laser	MATRIX 532-8-30	–	Coherent, Inc.
	Water cooling kit	–	
	Kinematic mounting plate	–	
Filterrad	Neutraldichtefilter	NE06B	Thorlabs, Inc.
Beleuchtung	Kollimierte LED (625 nm)	M625L3-C4	Thorlabs, Inc.
	Dichroitischer Spiegel	FM02	

Weiter auf nächster Seite.

Tab. A.2 fortgeführt.

Baugruppe	Beschreibung	Art.-Nr. ⁵¹	Hersteller
Fokussiereinheit	z-Stage	CT1	Thorlabs, Inc.
	Aktuator	Z812B	
	Linse, plankonvex, $f = 125$ mm	LA1986	
	Fokussierobjektiv	LMH-20X-532	
Positionierung	rotatorische Plattform	RBB150A/M	Thorlabs, Inc.
	3-Achs-Verfahreinheit	T12XYZ/M	
Mikroskoptisch	SCAN-IM 130 × 100	–	Märzhäuser Wetzlar
Optischer Tisch	Optical Breadboard	PBI52512	Thorlabs, Inc.

Tabelle abgeschlossen.

A.3. Schlüsselkomponenten des optischen Systems

Tab. A.3.: Schlüsselkomponenten des optischen Systems, geordnet nach Baugruppen.

Baugruppe	Beschreibung	Art.-Nr. ⁵²	Hersteller
LED	High-Power LED for Microscopy	SOLIS-445C	Thorlabs, Inc.
LED-Filter	450/25 nm	#86-665	Edmund Optics GmbH
Mikroskoptisch	SCAN-IM 130 × 100	–	Märzhäuser Wetzlar
Objektiv	PC-E Micro Nikkor 85 mm 1:2,8D	–	Nikon GmbH
Langpassfilter	475 nm	#84-749	Edmund Optics GmbH
Filterräder	USB Motorized Filter Wheel	#84-889	Edmund Optics GmbH
Bandpassfilter	500/10 nm	#65-210	Edmund Optics GmbH
	532/10 nm	#65-216	
	560/10 nm	#88-017	
	589/10 nm	#65-223	
Kamera	D810	–	Nikon GmbH
Linearachse	LTM 80-200-HSM	41.083.206D	OWIS GmbH
Optischer Tisch	Nexus Breadboard	B60120B	Thorlabs, Inc.
Optical Enclosure	Black Rubberized Fabric	BK5	Thorlabs, Inc.

⁵¹Stand 24.08.2017⁵²Stand 24.08.2017

A.4. Bremsweg von Mikropartikeln

Der folgende Abschnitt wurde aus der Veröffentlichung des Autors übersetzt⁵³:

Die Partikel streuen beim Transfer sehr stark, wenn sie nicht in den Vertiefungen des Ausgangsträgers gesintert werden. Daher wurde der Bremsweg S (engl. stopping distance) der Mikropartikel bestimmt^[65]. Der Bremsweg

$$S = v_0 \cdot \tau_C \quad (\text{A.2})$$

beschreibt die Distanz, nach der ein Partikel, das sich in einem statischen Fluid mit der Anfangsgeschwindigkeit v_0 bewegt, aufgrund der Reibungskraft gestoppt wird^[64]. Im Falle des ablationsgetriebenen Transfers resultiert die Anfangsgeschwindigkeit v_0 aus dem Druck, der durch die Verdampfung der Goldschicht während der Belichtung mit dem Laser entsteht. τ_C beschreibt die charakteristische Zeit der Partikel. Diese Zeit

$$\tau_C = \frac{\rho_P \cdot d_P^2}{18 \cdot \eta_F} \quad (\text{A.3})$$

hängt von den Partikeleigenschaften wie der Dichte ρ_P , dem Durchmesser d_P sowie von der Viskosität η_F des umgebenden Fluids ab, das in dem Fall Luft ist^[73].

Verbleibt die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit v_0 . Über die Kraft, die durch die Verdampfung der Goldschicht während der Belichtung mit dem Laser entsteht, kann der Impuls auf die Partikel berechnet werden. Unter den beiden Annahmen, dass erstens die Goldschicht verdampft wird und zweitens, dass die Verdampfung während des Laserpulses vonstatten geht, kann eine isochore Zustandsänderung⁵⁴ für die Dampfungsentwicklung angenommen werden. Der entstehende Druck resultiert in einer Kraft

$$F = p_0 \frac{T_1}{T_0} A_C \quad (\text{A.4})$$

auf das Partikelagglomerat in der Vertiefung und treibt es gewehrlaufähnlich aus. Hierbei ist p_0 der atmosphärische Druck, T_0 die Umgebungstemperatur, T_1 die Siedetemperatur von Gold und A_C die Grundfläche der Vertiefung. Da die Kraft F während der Belichtungszeit des Lasers τ_P ausgeübt wird, kann der Impuls, der das Partikelagglomerat auf die Anfangsgeschwindigkeit v_0 beschleunigt, mithilfe der Gleichung

$$F = \frac{m_P \cdot v_0}{\tau_P} \quad (\text{A.5})$$

mit der Partikelmasse m_P beschrieben werden. Kombiniert man Gleichung A.4 mit A.5, kann die Anfangsgeschwindigkeit zu

$$v_0 = \frac{p_0 \cdot T_1 \cdot A_C \cdot \tau_P}{T_0 \cdot m_P} \quad (\text{A.6})$$

berechnet werden. Einsetzen von τ_C und v_0 in Gleichung A.2 ergibt den gesuchten Bremsweg

$$S = \frac{p_0 \cdot T_1 \cdot r_C^2 \cdot \tau_P}{6 \cdot T_0 \cdot r_P \cdot \eta_F} \quad (\text{A.7})$$

Wendet man Gleichung A.7 unter Nutzung der Parameter (s. Tab. A.4) auf unterschiedliche Partikeldurchmesser an, kann der Bremsweg bestimmt werden (s. Tab. A.5).

⁵³Reproduced with permission.^[31] © 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

⁵⁴Die Zustandsänderung der Goldschicht erfolgt bei konstantem Volumen.

Tab. A.4.: Parameter zur Bestimmung des Bremswegs.⁵⁵

Parameter		Maßzahl	Einheit
Partikeldichte	ρ_P	1,15	g cm^{-3}
Umgebungsdruck	p_0	100 000	N m^{-2}
Umgebungstemperatur	T_0	293	K
Siedetemperatur von Gold	T_1	3 243	K
Laserpulsdauer	τ_P	20	ns
Dynamische Viskosität	η_F	18,232	$10^{-6} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Tab. A.5.: Berechneter Bremsweg für unterschiedliche Partikeldurchmesser.⁵⁶

Partikeldurchmesser d_P in μm	Charakteristische Zeit τ_C in μs	Anfangsgeschwindigkeit v_0 in m s^{-1}	Bremsweg S in μm
3	31	9,6	302
5	87	5,8	503
7	171	4,1	704

A.5. Syntheseprotokolle

Tab. A.6.: Genutzte Chemikalien

Abkürzung	Chemikalie
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
ESA	Essigsäureanhydrid
H ₂ O	Deionisiertes Wasser
MeOH	Methanol
PBS-T	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit 0,05 % (v/v) TWEEN 20
TFA	Trifluoressigsäure
TIBS	Triisobutylsilan
TWEEN 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat

Anmerkung Sich wiederholende Prozessschritte wie die „Entschützung des Zielträgers“, das „Waschen und Entfernen der Polymermatrix“, das „Blocken der freien Aminogruppen des Zielträgers“ sowie die „Entschützung der Aminogruppen der gekuppelten Monomere“ werden aus Gründen der Übersichtlichkeit einmalig ausführlich genannt und später abgekürzt.

⁵⁵Reproduced with permission.^[31] © 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

⁵⁶Reproduced with permission.^[31] © 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

A.5.1. Suspension

1. Entschützung des Zielträgers
 - 10 min in DMF quellen lassen
 - 30 min Piperidin 20 % (v/v) in DMF
 - 3 × 5 min DMF
 - 2 × 3 min MeOH
 - Trocknen mit Argon
2. Aufgeben der Suspensionen (10 µL pro Spot)
3. 60 min kuppeln der Monomere bei 90 °C im Ofen unter Schutzgasatmosphäre aus Argon
4. Waschen und Entfernen der Polymermatrix
 - Abspülen mit Aceton
 - 5 min in Aceton im Ultraschallbad reinigen
 - 3 × 5 min DMF
 - 2 × 3 min MeOH
5. Blocken der freien Aminogruppen des Zielträgers
 - ESA 10 % (v/v), DIPEA 20 % (v/v) in DMF 70 % (v/v) über Nacht
 - 3 × 5 min DMF
 - 2 × 3 min MeOH
6. Entschützung der Aminogruppen der gekuppelten Monomere
 - 30 min Piperidin 20 % (v/v) in DMF
 - 3 × 5 min DMF
 - 2 × 3 min MeOH
7. Waschen 15 min in PBS-T
8. Fluoreszenzfärbung 2 h DyLight 650 NHS-Ester 1 % (v/v) in PBS-T
9. Waschen in PBS-T
 - 30 s
 - 1 min
 - 2 min
10. Abspülen mit H₂O
11. Trocknen im Luftstrom
12. Detektion der Fluoreszenz im Fluoreszenzscanner (GenePix 4000B Microarray Scanner, Molecular Devices, LLC.)
 - Kanal 635 nm
 - PMT 10 %
 - Gain 500

A.5.2. Proof-of-principle Experiment

1. Entschützung des Zielträgers
2. Selective Particle Transfer im Lasersystem
3. 60 min kuppeln der Monomere bei 90 °C im Ofen unter Schutzgasatmosphäre aus Argon
4. Waschen und Entfernen der Polymermatrix
5. Blocken der freien Aminogruppen des Zielträgers
6. Entschützung der Aminogruppen der gekuppelten Monomere
7. Waschen 15 min in PBS-T
8. Fluoreszenzfärbung 2 h DyLight 650 NHS-Ester 1 % (v/v) in PBS-T
9. Waschen in PBS-T
 - 30 s
 - 1 min
 - 2 min
10. Abspülen mit H₂O
11. Waschen 15 min in PBS-T
12. Blocken 30 min Rockland blocking buffer
13. Waschen 1 min in PBS-T
14. Fluoreszenzfärbung 1 h DyLight 550 Streptavidin 10 % (v/v) in PBS-T
15. Waschen in PBS-T
 - 30 s
 - 1 min
 - 2 min
16. Abspülen mit H₂O
17. Trocknen im Luftstrom
18. Detektion der Fluoreszenz im konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop (TCS SP-5, Leica Microsystems)
 - Argonlaser 514 nm für Streptavidin
 - Laserintensität 20 %
 - Filter 520 nm bis 570 nm
 - Helium-Neon-Laser 633 nm für NHS-Ester
 - Laserintensität 20 %
 - Filter 640 nm bis 700 nm

A.5.3. Einfluss der Laserstrahlung auf die Synthesefläche – HA/FLAG-Synthese

Iterative Wiederholung der folgenden Prozessschritte zur Synthese der 9-merigen Peptide:

1. Entschützung des Zielträgers
2. Selective Particle Transfer im Lasersystem
3. 60 min kuppeln der Monomere bei 90 °C im Ofen unter Schutzgasatmosphäre aus Argon
4. Waschen und Entfernen der Polymermatrix
5. Blocken der freien Aminogruppen des Zielträgers
6. Entschützung der Aminogruppen der gekuppelten Monomere

Seitengruppen entschützen :

7. 30 min in DCM quellen lassen
8. 3 × 30 min TFA 51 % (v/v), DCM 44 % (v/v), TIBS 3 % (v/v) in H₂O 2 % (v/v)
9. 5 min DCM waschen
10. 5 min DMF waschen
11. 30 min DIPEA 5 % (v/v) in DMF
12. 3 × 5 min DMF
13. 2 × 3 min MeOH
14. 1 min DCM
15. Trocknen im Luftstrom

Inkubation mit Antikörpern:

16. 30 min in PBS-T quellen lassen
17. Blocken 30 min Rockland blocking buffer
18. Waschen 3 × 1 min Rockland blocking buffer 10 % (v/v) in PBS-T
19. Fluoreszenzfärbung 1 h Anti-HA Cy3 0,05 % (v/v) in (Rockland blocking buffer 10 % (v/v) in PBS-T)
20. Fluoreszenzfärbung 1 h Anti-FLAG Cy5 0,05 % (v/v) in (Rockland blocking buffer 10 % (v/v) in PBS-T)
21. Waschen 3 × 1 min PBS-T
22. Abspülen mit H₂O

23. Trocknen im Luftstrom
24. Detektion der Fluoreszenz im Fluoreszenzscanner (InnoScan 1100 AL, Innopsys)
 - Kanal 532 nm für Anti-HA
 - Laserpower low
 - Filter 582/75 nm
 - Gain 2
 - Kanal 635 nm für Anti-FLAG
 - Laserpower low
 - Filter 677/45 nm
 - Gain 20

A.5.4. Einfluss der Laserstrahlung auf die Syntheseoberfläche – Direkte Belichtung

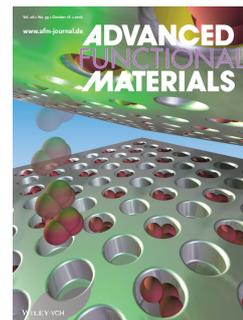
1. Entschützung des Zielträgers
2. Belichtung mit dem Laser
3. Waschen 15 min in PBS-T
4. Fluoreszenzfärbung 2 h DyLight 650 NHS-Ester 1 % (v/v) in PBS-T
5. Waschen in PBS-T
 - 30 s
 - 1 min
 - 2 min
6. Abspülen mit H₂O
7. Trocknen im Luftstrom
8. Detektion der Fluoreszenz im Fluoreszenzscanner (InnoScan 1100 AL, Innopsys)
 - Kanal 635 nm
 - Laserpower low
 - Filter 677/45 nm
 - Gain 0,5

Publikationsliste

Lasersystem

VIP-Paper – **Clemens von Bojnicic-Kninski**, Valentina Bykovskaya, Frieder Maerke, Roman Popov, Andrea Palermo, Daniela S. Mattes, Laura K. Weber, Barbara Ridder, Tobias C. Foertsch, Alexander Welle, Felix F. Loeffler, Frank Breitling, and Alexander Nesterov-Mueller. Selective functionalization of microstructured surfaces by laser-assisted particle transfer. *Advanced Functional Material* 26(39): 7067-7073, 2016.

(Cover image: Reproduced with permission.^[31] © 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.)



Invited Review – **Clemens von Bojnicic-Kninski**, Roman Popov, Edgar Dörsam, Felix F. Löffler, Frank Breitling and Alexander Nesterov-Müller. Combinatorial Particle Patterning. *Advanced Functional Material*, 2017.

Felix F. Loeffler, Tobias C. Foertsch, Roman Popov, Daniela S. Mattes, Martin Schlage-ter, Martyna Sedlmayr, Barbara Ridder, Florian-Xuan Dang, **Clemens von Bojnicic-Kninski**, Laura K. Weber, Andrea Fischer, Juliane Greifenstein, Valentina Bykovskaya, Ivan Buliev, F. Ralf Bischoff, Lothar Hahn, Michael A. R. Meier, Stefan Brase, Annie K. Powell, Teodor Silviu Balaban, Frank Breitling, and Alexander Nesterov-Mueller. High-flexibility combinatorial peptide synthesis with laser-based transfer of monomers in solid matrix material. *Nature communications* 7:11844, 2016.

Barbara Ridder, Tobias C. Foertsch, Alexander Welle, Daniela S. Mattes, **Clemens M. von Bojnicic-Kninski**, Felix F. Loeffler, Alexander Nesterov-Mueller, Frank Breitling. Development of a poly(dimethylacrylamide) based matrix material for solid phase high density peptide array synthesis employing a laser based material transfer. *Applied Surface Science* 389:942-951, 2016.

Jordyn Atwater, Daniela Mattes, Bettina Streit, **Clemens von Bojničić-Kninski**, Felix Löffler, Harald Fuchs, and Michael Hirtz. Combinatorial synthesis of macromolecular arrays by microchannel cantilever spotting (μ CS). *Advanced Materials (submission planned)*, expected in 2018.

Tobias Foertsch, Daniela Mattes, Alex Davis, Roman Popov, **Clemens von Bojničić-Kninski**, Felix Held, Svetlana Tsogoeva, Felix Löffler, Frank Breitling, and Alexander Nesterov-Mueller. Material flow photonics. *Nature Photonics (submission planned)*, expected in 2018.

Optisches System

Felix E. Held, Anton Guryev, Tony Fröhlich, Frank Hampel, Axel Kahnt, Corina Hutterer, Mirjam Steingruber, Hanife Bahsi, **Clemens von Bojnicic-Kninski**, Daniela S. Mattes, Tobias Förtsch, Alexander Nesterov-Mueller, Manfred Marschall and Svetlana B. Tsogoeva. Facile access to potent antiviral quinazoline heterocycles with fluorescence properties via merging metal-free domino reactions. *Nature Communications*, 8:15071, 2017.

Kongressbeiträge

Tobias C. Förtsch, **Clemens von Bojnicic-Kninski**, M. Shahbaz Khan, Frieder Märkle, Laura K. Weber, Andrea Fischer, Bastian Münster, Barbara Ridder, Daniela Althuon, and Jakob Striffer. Robuste Erkennung von kombinierten Positions- und Identifizierungs-Mikromarkierungen. *MikroSystemTechnik 2015*, 2015.

L. K. Weber, A. Fischer, M. Soehndrijo, T. C. Förtsch, **C. von Bojnicic-Kninski**, D. Althuon, S. M. Schillo, J. Striffer, F. F. Löffler, and F. Breitling. Automatisiertes Mikrofluidik-System mit optischem Aufbau zur Untersuchung von Peptid-Antikörperwechselwirkungen im Arrayformat. *MikroSystemTechnik 2015*, 2015.

Patente

Alexander Nesterov-Müller, Valentina Bykovskaya, **Clemens von Bojničić-Kninski**, Felix Löffler, Roman Popov, Barbara Ridder, Frank Breitling und Daniela Althuon. Schutzrechtanmeldung PCT/EP2016/074542: *Ultra-hochdichte Oligomerarrays und Verfahren zu deren Herstellung* (Anmeldetag: 16. Oktober 2015)

Frieder Märkle, Alexander Nesterov-Müller, Frank Breitling, Felix Löffler, Sebastian Schillo, Valentina Bykovskaya, **Clemens von Bojničić-Kninski** und Klaus Leibe. Schutzrechtanmeldung PCT/EP2013/001141: *Verfahren zur kombinatorischen Partikelablagerung zur Herstellung von hochdichten Molekülarrays, insbesondere von Peptidarrays, und damit erhältliche Molekülarrays* (Anmeldetag: 14. April 2013)

Danksagung

Diese Arbeit ist nicht das Werk eines einzelnen. Ich möchte mich bei all denen bedanken, die so ungeheuer viel zu dieser Arbeit beigetragen haben. Neben der reinen wissenschaftlichen Arbeit habe in den vergangenen drei Jahren hier am Institut für Mikrostrukturtechnik auch immer die schöne Zeit zu schätzen gewusst, die ich hier im Arbeitskreis verbringen konnte.

Einige mir ganz besonders wichtige Menschen möchte ich herausheben:

- Prof. Dr. Alexander Nesterov-Müller für seine außergewöhnliche Betreuung und stete Unterstützung meiner Vorhaben. An die interessanten und gelegentlich auch munteren Diskussionen mit ihm werde ich mich immer gerne zurück erinnern.
- Prof. Dr. Martin Dienwiebel für die Übernahme des Korreferats.
- Prof. Dr. Frank Breitling, der mir diese Arbeit erst ermöglicht hat. Ihm verdanke ich viele interessante Diskussionen und Exkurse in die Immunologie und erstaunliche Visionen für zukünftige Anwendungen.
- Roman Popov für drei tolle Jahre, in denen wir zusammen geforscht und gelernt haben. Unsere gemeinsam erarbeiteten Denkanstöße und Mindsets werden mich noch lange beschäftigen.
- Markus Breig, Patrick Langer und Amadeus Bramsiepe von der Fotostelle des KIT für ihre überaus freundliche Unterstützung und Beratung rund um das Thema der erweiterten Makrofotografie.
- Dr. Felix Held von der FAU Erlangen für die kurze, aber dennoch erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Untersuchung seiner Deep-UV Fluorophore.
- Unter den zahlreichen Hilfswissenschaftlern, die mich immer tatkräftig unterstützt haben, sei Chia-Wei Chen für die Programmierung des optischen Systems, Manmeet Singh für die Experimente rund um den Selective Particle Transfer und Andrés Vega-Pérez für die Programmierung der nachträglichen Bildbearbeitung gedankt.
- Dr. Felix Löffler, Dr. Jakob Striffler, Dr. Bastian Münster, Dr. Tobias Förtsch, Dr. Laura Weber, Andrea Palermo, Karin Herbster, Dr. Girish Shankara, Dr. Valentina Bykosvkaya und Simone Rentschler aus meiner Arbeitsgruppe, die mir während der gesamten Zeit eine tolle und angenehme Arbeitsatmosphäre geboten haben. Mein besonderer Dank gilt Dr. Frieder Märkle, der meine Bachelor- und Masterarbeit betreut hat und mich an das Thema der laserbasierten Herstellungsverfahren herangeführt hat.
- Paul Abaffy für die Anfertigung der REM-Aufnahmen, der KNMF und dem Reinraum-Team für die Herstellung der Mikrostrukturen und Dr. Alexander Welle für die ToF-SIMS Untersuchung.

- Dem Institut für Toxikologie und Genetik (ITG) für die Ermöglichung der Untersuchung der Proof-of-principle Experimente zum SPT mithilfe des konfokalen Laserfluoreszenzmikroskops SP-5.
- Alexandra Moritz und André Wolfschläger der Werkstatt des Instituts für Mikrostrukturtechnik für die Fertigung der Bauteile der beiden Systeme.
- Dr. Jürgen Reuter für seine Korrekturen und die anregenden Diskussionen nach Feierabend.
- Meinen Freunden für alles neben der Arbeit.
- Ganz besonderen Dank aber schulde ich meinen Eltern,
- Und schließlich Ralf Jordan, ohne den das alles nicht möglich gewesen wäre.