

Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 6559

**Entwicklung eines
Verfahrens zur flexiblen
Biofunktionalisierung von
Oberflächen für die
Sensorik mit akustischen
Oberflächenwellen-
Bauelementen**

N. Barié

Institut für Instrumentelle Analytik

Dezember 2000

**Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt
Wissenschaftliche Berichte
FZKA 6559**

**ENTWICKLUNG EINES VERFAHRENS
ZUR FLEXIBLEN BIOFUNKTIONALISIERUNG
VON OBERFLÄCHEN
FÜR DIE SENSORIK MIT AKUSTISCHEN
OBERFLÄCHENWELLEN-BAUELEMENTEN**

N. Barié

Institut für Instrumentelle Analytik

von der Fakultät für Chemie der Universität Karlsruhe genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
2000

Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor
Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe
Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)
ISSN 0947-8620

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Entwicklung und Optimierung eines universell anwendbaren Verfahrens zur Biofunktionalisierung von Oberflächen für die Sensorik mit kommerziell erhältlichen akustischen Oberflächenwellen (OFW)-Bauelementen wurde eine Beprobungs- und Meßapparatur konzipiert und aufgebaut. Diese ermöglicht ein automatisiertes Beprobieren der OFW-Sensoren mit mehreren Analyten bzw. Reagenzien, sowie die gleichzeitige Aufnahme und Darstellung der Meßdaten.

Für die Anwendung in der Biosensorik ist ein Schutz der auf den Bauteilen befindlichen Aluminiumstrukturen notwendig, der durch eine Beschichtung des kompletten Bauteils mit einem polymeren Schutzüberzug aus Polyimid bzw. Parylen realisiert wurde.

Die Immobilisation einer Dextranschicht an der schutzbeschichteten Sensoroberfläche erfolgt über eine Coimmobilisation mit dem photoaktiven Reagenz T-BSA, das als Photovernetzer zwischen der polymeren Schutzbeschichtung und dem Dextran fungiert. Es konnte gezeigt werden, daß diese Methode weder durch das zu immobilisierende Dextran, noch durch das Oberflächenmaterial bzw. den Sensortyp beschränkt ist. Durch Verwendung unterschiedlich funktionalisierter Dextrane konnten mit Hilfe einfacher und schneller Standardprozeduren verschiedenste Proteine reproduzierbar immobilisiert werden. Dazu wurden literaturbekannte, an dextranbeschichteten optischen Sensoren angewandte Immobilisationsprozeduren an die Sensorik mit OFW-Bauelemente angepaßt. Die bei der Optimierung erhaltenen Abhängigkeiten konnten erstmals mit akustischen Sensoren nachgewiesen werden. Die so erzeugten dextranbeschichteten Biosensoren zeichneten sich unter anderem durch hohe Spezifität und geringe unspezifische Adsorptionen von Biomolekülen aus. Aufgrund der Immobilisation rezeptiver Moleküle innerhalb der gesamten dreidimensionalen gequollenen Dextranmatrix konnten um zwei Größenordnungen höhere Empfindlichkeiten erzielt werden, als dies bislang mit den gleichen OFW-Bauelementen bei Immobilisation von zweidimensionalen Rezeptorschichten möglich war. Die Regenerierbarkeit der Sensoroberfläche durch Lösen der gebildeten Immunokomplexe wurde nachgewiesen, wobei wiederholte Messungen mit dem gleichen Sensor eine Verbesserung von Reproduzierbarkeit, Schnelligkeit und Wirtschaftlichkeit der Analyse bedingen. Der Einsatz eines dextranbeschichteten OFW-Bauelementes in einem praxisrelevanten Anwendungsgebiet wurde anhand des chemotaktischen Cytokins ENA-78 dargestellt. Dabei wurden erstmals Messungen mit modifizierten kommerziellen OFW-Bauelementen in Seren durchgeführt. Sowohl in wäßrigen Lösungen, als auch in Seren war eine hohe Spezifität des Sensors gegeben.

Ein Ansatz zur Empfindlichkeitssteigerung, basierend auf dem Konzept der Anregung von Love-Wellen, wurde sowohl theoretisch als auch experimentell untersucht. Es wurden zwei Schichtmaterialien verglichen: Parylen und gesputtertes SiO_2 . Die Bauteile wurden hinsichtlich ihrer Transmissionseigenschaften und Massesensitivität in Abhängigkeit von der Dicke der wellenführenden Schicht charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, daß die Aufbringung einer optimierten wellenführenden Beschichtung die Sensitivität der Bauelemente erhöht. Im Falle des SiO_2 ergab sich eine optimale Schichtdicke zwischen 3 und 4 μm , die zu einer Nachweisgrenze von 1,7 pg/mm^2 führte. Damit konnte die Nachweisgrenze gegenüber unbeschichteten STW-Bauteilen um den Faktor 7,7 verbessert werden. Die Untersuchungen an parylenbeschichteten Bauteilen zeigten, daß sich die ausgesprochen gute Schutzwirkung einer Parylenschicht vor korrosiven Angriffen des umgebenden Mediums mit einer Sensitivitätssteigerung gegenüber unbeschichteten STW-Bauelementen um den Faktor 4,3 (bei einer optimalen Parylen-Schichtdicke von 0,5 μm) kombinieren läßt.

ABSTRACT

Development of a universal process for biofunctionalization of surfaces to be used in sensor technology by surface acoustic wave (SAW) devices

A sampling and measurement system has been conceived and constructed for the development and optimization of a universal process applied to biofunctionalize surfaces to be used in sensor technology by commercially available surface acoustic wave (SAW) devices. This system allows automatic sampling of the SAW sensors with several analytes or reactants as well as simultaneous recording and presentation of the measured data.

For use in biosensor technology, the aluminum structures located on the devices have to be protected. This is achieved by coating the complete device with a polymer layer of polyimide or parylene.

The dextran layer on the coated sensor surface is immobilized by means of co-immobilization using the photoactive reactant T-BSA. It acts as a photolinker between the polymer protective coating and dextran. It was demonstrated that this method is limited neither by the dextran to be immobilized nor by the surface material or sensor type. By using variably functionalized dextrans and simple, rapid standard procedures, various proteins were immobilized in a reproducible manner. For this purpose, immobilization procedures known from literature and applied to dextran-coated optical sensors were adapted to the needs of sensor technology with SAW devices. For the first time, the dependencies obtained by optimization could be demonstrated with acoustic sensors. The thus generated dextran-coated biosensors were characterized among others by a high specificity and small unspecific adsorptions of biomolecules. Due to the immobilization of receptive molecules within the entire three-dimensional swollen dextran matrix, the sensitivities achieved were higher by two orders of magnitude than those resulting from the immobilization of two-dimensional receptive layers with the same SAW devices. It was demonstrated that the sensor surface can be regenerated by dissolution of the immunocomplexes formed. Repeated measurements with the same sensor provided for an improved reproducibility, rapidity, and economic efficiency of the analysis. Based on the example of the chemotactic cytokine, ENA-78, use of a dextran-coated SAW device in a practically relevant field was illustrated. For the first time, measurements were performed with modified commercial SAW devices in serums. Both in aqueous solutions and serums, a high specificity of the sensor was achieved.

An approach to increase the sensitivity based on the excitation of Love waves was studied both theoretically and experimentally. Two materials of wave-guiding layers were compared: Parylene and sputtered SiO₂. The devices were characterized with regard to their transmission properties and mass sensitivity as a function of the thickness of the wave-guiding layer. It was demonstrated that the application of an optimized wave-guiding coating leads to an increase in sensitivity of the devices. In case of SiO₂, an optimum layer thickness of 3 - 4 μm was obtained. It led to a detection limit of 1.7 pg/mm². This value exceeds the detection limit of uncoated STW devices by a factor of 7.7. It was found out by investigations of parylene-coated devices that the excellent protective effect of a parylene layer against corrosive attacks by the surrounding medium is associated with an increase in sensitivity as compared to uncoated STW devices by a factor of 4.3 (at an optimum parylene layer thickness of 0.5 μm).

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung und Aufgabenstellung	1
2 Oberflächenwellen.....	4
2.1 Arten von akustischen Wellen	4
2.1.1 Rayleighwellen	5
2.1.2 Horizontal polarisierte Scherwellen	5
2.1.2.1 Surface Skimming Bulk Waves	6
2.1.2.2 Bleustein-Gulyaev-Wellen	6
2.1.2.3 Love-Wellen	6
2.1.2.4 Transversale Oberflächenwellen	7
2.1.3 Akustische Plattenmoden	7
2.2 Piezoelektrischer Effekt.....	7
2.2.1 Einfluß der Piezoelektrizität auf die Geschwindigkeit der Oberflächenwelle	8
2.3 Erzeugung von Oberflächenwellen.....	9
2.4 Chemische Sensorik mit Oberflächenwellen	10
2.4.1 Meßprinzip	10
2.4.1.1 Verzögerungsleitung und Resonator	11
2.4.2 Beziehung zwischen Schallgeschwindigkeits- und Frequenzänderung.....	12
2.4.3 Beeinflussung der OFW-Schallgeschwindigkeit	12
2.4.3.1 Einfluß dünner Schichten: Einfluß der Masse und der elastischen Konstanten	13
2.4.3.2 Temperatureinfluß	14
2.4.3.3 Einfluß der elektrischen Leitfähigkeit der Oberfläche.....	15
2.4.3.4 Viskositätseinfluß	15
2.4.4 Definition der Massesensitivität für akustoelektrische Bauelemente	16
3 Material und Methoden	17
3.1 Chemikalien.....	17
3.2 Puffer- und Waschlösungen	17
3.3 Instrumentierung und Meßeinrichtungen	17
3.3.1 Verwendete OFW-Bauelemente.....	17
3.3.2 Netzwerkanalysator zur Messung der Übertragungskennlinien	20
3.3.3 Hochfrequenz-Oszillatorelektronik	20
3.3.4 Belichtungsapparatur	21
3.4 Verfahren zur Beschichtung der Oberfläche mit Polymeren bzw. mit SiO₂.....	21
3.4.1 Reinigung der Oberfläche vor der Beschichtung	21
3.4.2 Beschichtung mit Polyimid	21
3.4.3 Beschichtung mit Parylen	22
3.4.4 Beschichtung mit Polystyrol.....	22
3.4.5 Beschichtung mit SiO ₂	22

3.5 Photoimmobilisation	23
3.5.1 Photoimmobilisation von T-BSA auf schutzbeschichteten Oberflächen	23
3.5.1.1 Immobilisation auf Glasplättchen.....	23
3.5.1.2 Immobilisation auf dem OFW-Bauteil	23
3.5.2 Photoimmobilisation von Dextran mittels T-BSA	24
3.5.2.1 CoCoating.....	24
3.5.2.2 Layer-Coating.....	24
3.6 Immobilisation von Proteinen an carboxymethyliertem Dextran.....	25
3.7 Meßmethoden	25
3.7.1 Flüssigszintillationszählung	25
3.7.2 Messungen mit dem OFW-Bauelement	26
3.7.2.1 BSA-Adsorption	26
3.7.2.2 Reaktion von Streptavidin mit biotinyliertem Dextran.....	26
3.7.2.3 Immunoreaktionen.....	27
3.8 Bestimmung von Empfindlichkeit und Nachweisgrenze	27
<i>4 Aufbau der Versuchsanlage.....</i>	<i>29</i>
4.1 Fließinjektionsanalyse.....	29
4.2 Aufbau des Beprobungs- und Meßsystems MAFIA	31
4.2.1 Fluidiksystem	32
4.2.2 Frequenzmeßanlage	33
4.3 Charakterisierung der MAFIA.....	34
4.3.1 Beprobung aus unterschiedlichen Ventilen.....	36
4.3.2 Beprobung bei unterschiedlichen Strömungsgeschwindigkeiten.....	37
4.3.3 Beprobung mit unterschiedlichen Probevolumina	38
4.4 Beispielmessungen zu Anwendungsmöglichkeiten der MAFIA	39
4.4.1 Beprobung von OFW-Bauteilen mit Puffern unterschiedlicher Leitfähigkeit	39
4.4.2 Wiederholte BSA-Abscheidung auf OFW-Bauteilen	39
4.4.3 Mehrstufige Präparation eines OFW-Biosensors	40
<i>5 Schutzbeschichtungen für OFW-Bauelemente</i>	<i>42</i>
5.1 Verwendete Polymere und Beschichtungstechnik	43
5.1.1 Polyimid.....	43
5.1.2 Parylen	44
5.1.2.1 Beschichtungsprozeß.....	45
5.2 Charakterisierung der schutzbeschichteten Bauteile	46
5.2.1 Akustische Eigenschaften und Reproduzierbarkeit der Beschichtung.....	46
5.2.2 Mikroskopische Untersuchung der Beschichtung.....	49
5.2.3 Untersuchung der Masseempfindlichkeit durch Abscheidung von Proteinen	52
5.3 Schutzwirkung vor korrosiven Angriffen.....	53
5.3.1 Mikroskopische Beobachtung.....	53
5.3.2 Regeneration der Sensoroberfläche.....	54
5.4 Photoimmobilisation auf schutzbeschichteten Oberflächen	56
5.5 Zusammenfassender Vergleich und weiterführende Betrachtungen.....	57

6 Biosensorik auf der Basis dextranbeschichteter Sensoroberflächen..... 59

6.1 Allgemeines	59
6.1.1 Möglichkeiten zur Immobilisation von Biomolekülen auf OFW-Sensoroberflächen.....	59
6.1.2 Dextrane	61
6.1.3 Vorteile der Anbindung von Biomolekülen an Dextranoberflächen	62
6.2 Anbindung von Dextran an der Sensoroberfläche.....	63
6.2.1 Anbindung von Dextran auf Goldoberflächen	63
6.2.2 Aktivierung der Schutzbeschichtung durch Bromcyan	64
6.2.3 Photoimmobilisation.....	64
6.2.3.1 Prinzip der Photoimmobilisation mit T-BSA.....	65
6.2.3.1.1 Derivatisierung von BSA und Anbindung an die Schutzschicht.....	66
6.2.3.1.2 Photoinduzierte Coimmobilisation von Dextranen mit T-BSA.....	67
6.2.3.2 Auswahl der Optimierungsmethoden und Durchführung der Photoimmobilisation	68
6.2.3.3 Voruntersuchungen.....	71
6.2.3.3.1 Photoinduzierte Reaktion von T-BSA mit Oberflächen	71
6.2.3.3.2 Ermittlung geeigneter Waschprozeduren für Dextrane	74
6.2.3.3.3 Unspezifische und spezifische Bindung von Streptavidin.....	76
6.2.3.3.4 Qualitativer Nachweis des immobilisierten Dextrans an der Oberfläche	78
6.2.3.4 Optimierung der Beschichtungstechnik.....	79
6.2.3.4.1 CoCoating.....	79
6.2.3.4.1.1 Optimierung des T-BSA/Dextran-Verhältnisses.....	79
6.2.3.4.1.2 Variation der Menge der aufgetragenen Mischung	81
6.2.3.4.1.3 Quantifizierung des immobilisierten Dextrans	82
6.2.3.4.2 Layer-Coating.....	83
6.2.3.4.2.1 Optimierung der aufgetragenen T-BSA-Menge	83
6.2.3.4.2.2 Optimierung der aufgetragenen Dextranmenge.....	84
6.2.3.4.2.3 Quantifizierung des immobilisierten T-BSA's und Dextrans.....	85
6.2.3.4.3 Optimierung der Belichtungszeit.....	86
6.2.3.4.4 Optimierung der Trocknung im Vakuum	86
6.2.3.4.5 Vergleich zweier Optimierungsmethoden	87
6.2.3.4.6 Zusammenfassung der optimalen Beschichtungsbedingungen	90
6.2.3.5 Reproduzierbarkeit der Beschichtungsprozeduren	90
6.2.3.6 Langzeitstabilität der Dextranbeschichtung.....	91
6.2.3.6.1 Verbesserung der Stabilität durch kovalente Anbindung des Dextrans.....	91
6.2.3.6.2 Langzeitstabilität bei Lagerung	93
6.2.3.7 Vergleich der Beschichtungsprozeduren	94
6.2.3.8 Übertragung der Beschichtungstechnik auf OFW-Bauelemente	94
6.2.3.8.1 Bestimmung geeigneter Dextranmengen auf der Sensoroberfläche.....	95
6.2.3.8.2 Vergleich: Szintillationsmessung und Messung der Frequenzänderung	96
6.3 Immobilisation von Biomolekülen an der dextranbeschichteten Oberfläche.....	98
6.3.1 NHS-Ester-Aktivierung der Dextranmatrix und Aminkopplung	99
6.3.1.1 Prinzip der NHS-Ester-Aktivierung.....	99
6.3.1.2 Durchführung der Immobilisation und Beobachtung der Sensorantwort	101
6.3.1.3 Optimierung der Immobilisationsmethode	102
6.3.1.3.1 Aktivierungs- und Deaktivierungsschritt.....	102
6.3.1.3.2 Immobilisation des Liganden	103
6.3.1.3.2.1 Anreicherung von Ligand in der Dextranmatrix.....	104
6.3.1.3.2.2 pH-Wert des Immobilisationspuffers.....	105
6.3.1.3.2.3 Ionenstärke des Immobilisationspuffers	108
6.3.1.3.2.4 Ligandkonzentration und Inkubationszeit	108
6.3.1.4 Kontrollversuche.....	110
6.3.2 Liganden-Einfangreaktionen	111
6.3.2.1 Einfang biotinylierter Liganden durch am Dextran immobilisiertes Streptavidin	112

6.4 Immunologische Untersuchungen	114
6.4.1 Beobachtung der Immunoreaktion.....	114
6.4.2 Kontrollversuche.....	115
6.4.2.1 Unspezifische Bindung am Dextran	115
6.4.2.2 Spezifität des Immunosensors	116
6.4.3 Reproduzierbarkeit der Sensorantwort bei Immunreaktionen.....	117
6.4.4 Quantifizierung des gebundenen Ligaten.....	117
6.4.5 Konzentrationsreihe und Bestimmung der Nachweisgrenzen.....	119
6.5 Regeneration der Sensoren.....	121
6.6 Einsatz dextranbeschichteter OFW-Bauelemente in einem Anwendungsgebiet	123
6.6.1 Immunoreaktion von ENA-78 in wäßrigen Systemen	125
6.6.2 Immunoreaktion von ENA-78 in Seren	126
6.7 Zusammenfassende und weiterführende Betrachtungen	129
7 Sensitivitätssteigerung durch Anregung von Love-Wellen.....	131
7.1 Theoretische Beschreibung von Love-Wellen	131
7.1.1 Auswahl eines geeigneten Schichtsystems.....	131
7.1.2 Bestimmung der optimalen Schichtdicke für maximale Sensitivität.....	132
7.1.2.1 Gang der Sensitivität bei zunehmender Dicke der wellenführenden Schicht.....	133
7.1.2.2 Störungstheoretische Beschreibung von Love-Wellen.....	134
7.2 Überblick über Arbeiten anderer Autoren zum Thema Love-Wellen.....	136
7.2.1 Abgrenzung der vorliegenden Arbeit.....	137
7.3 SiO₂ als wellenführende Schicht.....	139
7.3.1 Theoretische Betrachtung für das System 36YX.LiTaO ₃ /SiO ₂	139
7.3.1.1 Berechnung der Phasengeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Schichtdicke	139
7.3.1.2 Gruppengeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Schichtdicke.....	140
7.3.1.3 Massesensitivität in Abhängigkeit von der Schichtdicke	140
7.3.2 Experimentelle Untersuchungen am System 36YX.LiTaO ₃ /SiO ₂	141
7.3.2.1 Reproduzierbarkeit des Sputterns	141
7.3.2.2 Transmissionseigenschaften in Abhängigkeit von der Schichtdicke	142
7.3.2.3 Resonanzfrequenz in Abhängigkeit von der Schichtdicke	144
7.3.2.4 Massesensitivität in Abhängigkeit von der Schichtdicke	145
7.3.2.4.1 Adsorption von BSA auf SiO ₂ -beschichteten Oberflächen.....	145
7.3.2.4.2 Frequenzänderung bei der BSA-Abscheidung	146
7.3.2.4.3 Ermittlung der Nachweisgrenze	147
7.3.3 Vergleich von theoretischen und experimentellen Daten.....	148
7.3.3.1 Phasengeschwindigkeit.....	149
7.3.3.2 Massesensitivität.....	150
7.4 Parylen als wellenführende Schicht.....	152
7.5 Zusammenfassung und Vergleich der beiden wellenführenden Schichten	155
8 Zusammenfassung.....	157
Literaturverzeichnis.....	160

ANHANG

A Herstellerverzeichnis und Spezifikationen	A-1
A.1 Meßgeräte.....	A-1
A.2 Komponenten der MAFIA.....	A-1
A.3 Laborgroßgeräte.....	A-1
A.4 Sonstiges	A-2
A.5 Firmenliste für die verwendeten Chemikalien.....	A-2
A.6 Belichtungsapparatur.....	A-2
A.7 Parylen-C.....	A-3
A.7.1 FTIR-Photoakustisches Spektrum	A-3
A.7.2 Bestimmung der Schichtdicke der Parylen-Beschichtung	A-3
A.8 Carboxymethyliertes Dextran	A-4
A.8.1 FTIR-Photoakustisches Spektrum	A-4
B Verwendete Chemikalien	A-5
B.1 Dextrane	A-5
B.2 Proteine.....	A-5
B.2.1 Monoklonale Antikörper.....	A-6
B.2.2 Polyklonale Antikörper.....	A-6
B.2.3 Radioaktiv markierte Proteine	A-6
B.3 Sonstige Chemikalien	A-7
C Radioaktive Markierung von T-BSA.....	A-8
C.1 Allgemeines.....	A-8
C.1.1 Reduktive Methylierung von Proteinen	A-8
C.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	A-8
C.2 Durchführung der radioaktiven Markierung von T-BSA.....	A-9
C.3 Ergebnis	A-9
D Komponenten der MAFIA	A-12
D.1 Bestandteile der MAFIA	A-12
D.1.1 Pumpen	A-12
D.1.2 Injektionsventile.....	A-13
D.1.3 Selektionsventil.....	A-14
D.1.4 Gehäuse.....	A-14
D.2 Elektronik.....	A-15
D.2.1 Phasenansteuerung des Schrittmotors	A-15
D.2.2 Taktgenerator	A-15
D.2.3 Positionserkennung.....	A-16
D.2.4 Fehlererkennung	A-16
D.2.5 PC-Schnittstelle.....	A-16
D.2.6 Sensorelektronik	A-18
D.2.7 Schaltpläne.....	A-19

D.3 Software	A-22
D.3.1 Hardware-Anforderungen.....	A-22
D.3.2 Bedienungselemente.....	A-22
D.3.3 Programmablauf.....	A-27
D.3.3.1 Steuerung des zeitlichen Beprobungsablaufs.....	A-28
<i>E Programm zur Berechnung von Love-Wellen</i>	A-30
<i>F Isoelektrische Punkte von Biomolekülen</i>	A-31
<i>G Halbwertszeiten der verwendeten radioaktiven Isotope</i>	A-31
<i>H Abkürzungen und Symbole</i>	A-32
H.1 Abkürzungen.....	A-32
H.2 Symbole.....	A-33

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 2-1	Darstellung der Sagittalebene und des verwendeten Koordinatensystems	4
Abb. 2-2	Teilchenbewegungen und Energiefluß verschiedener Wellentypen	5
Abb. 2-3	Prinzipieller Aufbau eines typischen OFW-Bauelements sowie der elektronischen Beschaltung	11
Abb. 2-4	Prinzipieller Aufbau von OFW-Bauelementen beim Betrieb als Verzögerungsleitung bzw. als Resonator	11
Abb. 2-5	Theoretische Abhängigkeit der Schallgeschwindigkeit von der Massezunahme durch eine isotrope Schicht für OFW-Bauelemente auf der Basis von LiTaO_3 bei unterschiedlichen Grundfrequenzen	13
Abb. 2-6	Temperaturabhängigkeit der Frequenzänderung von Schwingquarzen für verschiedene Kristallschnitte	14
Abb. 2-7	Theoretische Abhängigkeit der Schallgeschwindigkeit von der Leitfähigkeit für OFW-Bauelemente auf der Basis von LiTaO_3 bei unterschiedlichen Grundfrequenzen	15
Abb. 2-8	Theoretische Abhängigkeit der Schallgeschwindigkeit von der Viskosität für OFW-Bauelemente auf der Basis von LiTaO_3 bei unterschiedlichen Grundfrequenzen	16
Abb. 3-1	Lichtmikroskopische Aufnahme eines unbeschichteten OFW-Bauelements im geöffneten Gehäuse	18
Abb. 3-2	Lichtmikroskopische Aufnahme des Sensorchips	18
Abb. 3-3	Übertragungskennlinien (Transmissions- und Phasenkurven) eines unbeschichteten OFW-Bauelements an Luft und in Wasser	19
Abb. 4-1	Schematische Darstellung des Prinzips und der notwendigen Komponenten eines FIA-Systems	30
Abb. 4-2	Das Beprobungs- und Meßsystem MAFIA	31
Abb. 4-3	Schematische Darstellung des Fluidiksystems der MAFIA	32
Abb. 4-4	Schematische Darstellung einer einfachen Methode zur experimentellen Bestimmung des Dispersionskoeffizienten eines Fließsystems	35
Abb. 4-5	Sensorantwort bei Beprobung aus unterschiedlichen Ventilen	37
Abb. 4-6	Sensorantwort bei Beprobung mit unterschiedlichen Strömungsgeschwindigkeiten	37
Abb. 4-7	Sensorantwort bei Beprobung mit unterschiedlichen Probevolumina	38
Abb. 4-8	Sensorantwort bei Beprobung mit Puffern unterschiedlicher Leitfähigkeit	39
Abb. 4-9	Sensorantwort bei wiederholter BSA-Abscheidung auf OFW-Bauelementen	40
Abb. 4-10	Sensorantwort bei Immobilisierung von Proteinen an einem dextranbeschichteten OFW-Bauteil und Immunoreaktion	41
Abb. 5-1	Ausbildung eines Polyimids und kovalente Anbindung an die silanisierte Oberfläche	43
Abb. 5-2	Die drei bekanntesten und meist verwendeten Parylene	44
Abb. 5-3	Schematische Darstellung des Parylen-Beschichtungsprozesses	45
Abb. 5-4	Übertragungskennlinien (Dämpfung) von polyimid- und parylenbeschichteten sowie unbeschichteten OFW-Bauelementen an Luft	46
Abb. 5-5	Übertragungskennlinien (Phasengang) von polyimid- und parylenbeschichteten, sowie unbeschichteten OFW-Bauelementen an Luft	47

Abb. 5-6	Übertragungskennlinien (Dämpfung) von polyimid- und parylenbeschichteten, sowie unbeschichteten OFW-Bauelementen in Wasser	47
Abb. 5-7	Übertragungskennlinien (Dämpfung) von polyimidbeschichteten OFW-Bauelementen einer Beschichtungsserie an Luft	48
Abb. 5-8	Lichtmikroskopische Aufnahme (DIC) eines OFW-Bauelementes mit einem Polyimidfilm, der zu einer Gesamtdämpfung von 2,67 dB	49
Abb. 5-9	Lichtmikroskopische Aufnahme (DIC) eines OFW-Bauelementes mit einem Polyimidfilm, der zu einer Gesamtdämpfung von 5,83 dB	50
Abb. 5-10	Lichtmikroskopische Aufnahme (DIC) eines OFW-Bauelementes mit einem Polyimidfilm, der zu einer Gesamtdämpfung von 22,95 dB	50
Abb. 5-11	Lichtmikroskopische Aufnahme (DIC) eines OFW-Bauelementes mit einem 1,3 µm dicken Parylenfilm	51
Abb. 5-12	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Bonddrahtes, der mit einem 1 µm dicken Parylenfilm beschichtet ist	51
Abb. 5-13	Abscheidung von BSA auf zwei mit unterschiedlichen Polymeren beschichtete OFW-Bauteile	52
Abb. 5-14	Lichtmikroskopische Aufnahme eines polyimidbeschichteten OFW-Bauelements bei Beprobung mit 0,1 M HCl	53
Abb. 5-15	Lichtmikroskopische Aufnahme eines polyimidbeschichteten OFW-Bauelements nach 30 min Beprobung mit 0,1 M HCl	54
Abb. 5-16	Lichtmikroskopische Aufnahme eines parylenbeschichteten OFW-Bauelements nach 15stündiger Beprobung mit 0,1 M HCl bei Raumtemperatur und anschließend 30 min Kochen in der Säure	54
Abb. 5-17	Wiederholte Abscheidung von BSA und anschließendes Ablösen des Proteins mit Salzsäure auf einem polyimidbeschichteten OFW-Bauelement	55
Abb. 5-18	Wiederholte Abscheidung von BSA und anschließendes Ablösen des Proteins mit Salzsäure auf einem parylenbeschichteten OFW-Bauelement	56
Abb. 6-1	Strukturformel von Dextran	61
Abb. 6-2	Derivatisierung von BSA mit TRIMID und Anbindung des T-BSA an die Schutzschicht	66
Abb. 6-3	Kovalente Anbindung von Dextran an schutzbeschichtete Oberflächen mittels Photoimmobilisation mit T-BSA als Photolinker	67
Abb. 6-4	Allgemeines Schema für die Durchführung der Photoimmobilisation von Dextran mit T-BSA	68
Abb. 6-5	Unspezifische und spezifische Reaktionen nach der Photoimmobilisation von T-BSA auf einem polyimidbeschichteten OFW-Bauelement	73
Abb. 6-6	Spezifische Reaktion nach der Photoimmobilisation von T-BSA und Waschen mit 10 mM HCl auf einem parylenbeschichteten OFW-Bauelement und Kontrollexperiment	74
Abb. 6-7	Untersuchung verschiedener Waschlösungen zum Ablösen von nicht-kovalent gebundenem Dextran	75
Abb. 6-8	Untersuchung der unspezifischen und spezifischen Bindung von Streptavidin auf verschiedenen Oberflächen	76
Abb. 6-9	FT-IR Photoakustisches Absorptionsspektrum von carboxymethyliertem Dextran und polyimidbeschichteten OFW-Bauteilen, die mit T-BSA bzw. mit T-BSA und carboxymethyliertem Dextran beschichtet sind	79
Abb. 6-10	Ermittlung des optimalen Mischungsverhältnisses von T-BSA und Dextran beim CoCoating-Prozeß	80
Abb. 6-11	Anbindung unterschiedlicher Dextranmengen beim CoCoating durch Variation der aufgebrauchten Dextranmenge	81
Abb. 6-12	Kalibrationsgerade von [³ H]-Dextran bei der Flüssigszintillationszählung	82

Abb. 6-13	Korrelation von aufgebracht Menge an [³ H]-Dextran und immobilisierter Menge an [³ H]-Dextran	83
Abb. 6-14	Ermittlung der optimalen Menge an aufgebrachtem T-BSA beim Layer-Coating-Prozeß	84
Abb. 6-15	Ermittlung der optimalen Dextranmenge beim Layer-Coating-Prozeß	85
Abb. 6-16	Abhängigkeit der Coimmobilisation von Dextran mit T-BSA von der Belichtungszeit	86
Abb. 6-17	Ermittlung geeigneter Trocknungsbedingungen für die Coimmobilisation von Dextran mit T-BSA	87
Abb. 6-18	Allgemeines Schema für zwei Systeme zur Optimierung der Immobilisation von Dextranen mittels Anbindung radioaktiv markierter Proteine	88
Abb. 6-19	Ermittlung des optimalen Mischungsverhältnisses von T-BSA und Dextran beim CoCoating-Prozeß mittels zweier Systeme zur Anbindung von radioaktiv markiertem Protein	89
Abb. 6-20	Ermittlung der optimalen Menge an aufgebrachtem Dextran beim Layer-Coating-Prozeß mittels zweier Systeme zur Anbindung von radioaktiv markiertem Protein	89
Abb. 6-21	Ermittlung der Reproduzierbarkeit der Beschichtungsprozedur	91
Abb. 6-22	Veränderung der Dextranmenge an der Oberfläche beim Spülen mit 20 mM Phosphatpuffer	92
Abb. 6-23	Untersuchung der Langzeitstabilität der Dextranbeschichtung bei Lagerung	93
Abb. 6-24	Transmissionskurven von OFW-Bauteilen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen der optimierten Mischung von T-BSA und Dextran beschichtet sind, in 20 mM Phosphatpuffer	95
Abb. 6-25	Vergleich von Szintillationsmessung und Messung der Frequenzänderung	96
Abb. 6-26	Schematische Darstellung von drei Immobilisationsmethoden für die Anbindung von Biomolekülen an carboxymethyliertes Dextran	99
Abb. 6-27	Immobilisierung von Biomolekülen an carboxymethyliertem Dextran mittels Carbodiimid-Chemie über NHS-Ester	100
Abb. 6-28	Sensorantwort bei der Immobilisation von Liganden an carboxymethyliertem Dextran	101
Abb. 6-29	Ermittlung geeigneter Konzentrationen und Verhältnisse von EDC und NHS durch Messung der Radioaktivität nach Immobilisation von [³⁵ S]-Immunglobulin	103
Abb. 6-30	Vergleich der Adsorption von Ligand an einer parylenbeschichteten Oberfläche und der elektrostatischen Anreicherung von Ligand in einer Matrix von carboxymethyliertem Dextran	104
Abb. 6-31	Einfluß des pH-Wertes auf die elektrostatische Anreicherung der Liganden in der Dextranmatrix	106
Abb. 6-32	Einfluß des pH-Wertes des Immobilisationspuffers auf die immobilisierte Menge an Ligand	107
Abb. 6-33	Einfluß der Ionenstärke des Immobilisationspuffers auf die immobilisierte Menge an Ligand	108
Abb. 6-34	Ermittlung der Abhängigkeit von angereicherter und immobilisierter Ligandmenge, sowie der Oberflächenbelegung von der Ligandkonzentration im Immobilisationspuffer	109
Abb. 6-35	Immobilisation von Streptavidin an carboxymethyliertes Dextran mittels Carbodiimid-Chemie und anschließende Anbindung von biotinyliertem Liganden	112
Abb. 6-36	Immobilisation von Streptavidin an biotinyliertes Dextran und anschließende Anbindung von biotinyliertem Liganden	113

Abb. 6-37	Immunoreaktion an einem mit carboxymethyliertem Dextran beschichteten und mit monoklonalen anti-Urease Antikörpern modifizierten OFW-Bauelement	114
Abb. 6-38	Unterdrückung unspezifischer Bindung von Proteinen durch geeignete Wahl der Pufferlösung	115
Abb. 6-39	Spezifische und unspezifische Reaktionen an einem mit carboxymethyliertem Dextran beschichteten und mit monoklonalen anti-Urease Antikörpern modifizierten OFW-Bauelement	116
Abb. 6-40	Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Sensorantwort bei Immunreaktionen an OFW-Bauelementen, die mit carboxymethyliertem Dextran beschichtet und mit monoklonalen anti-Urease Antikörpern modifiziert sind	117
Abb. 6-41	Frequenzänderungen und resultierende Oberflächenbelegungen bei Immunreaktionen von mouse [³⁵ S]-Ig in unterschiedlichen Konzentrationen mit anti-mouse Ig Antikörpern auf dextranbeschichteten OFW-Bauelementen	118
Abb. 6-42	Konzentrationsreihe von mouse Ig bei der Immunreaktionen mit OFW-Bauelementen, die mit carboxymethyliertem Dextran beschichtet und mit anti-mouse Ig Antikörpern modifiziert sind	119
Abb. 6-43	Korrelation von Frequenzänderung und Oberflächenbelegung für das System anti-mouse Ig / mouse Ig bei dextranbeschichteten OFW-Bauelementen	120
Abb. 6-44	Wiederholte Regeneration mit Glycin-Puffer und Immunreaktion	122
Abb. 6-45	Spezifische und unspezifische Reaktion von immobilisiertem ENA-78 in wäßrigen Pufferlösungen	125
Abb. 6-46	Konzentrationsreihe von anti-ENA-78 Antikörpern bei der Immunreaktionen mit OFW-Bauelementen, die mit carboxymethyliertem Dextran beschichtet und mit ENA-78 modifiziert sind	126
Abb. 6-47	Sensorsignale bei Beprobung eines ENA-78-Sensors mit negativ- und positiv-Humanseren	127
Abb. 6-48	Sensorsignale bei optimierter Beprobung eines ENA-78-Sensors mit negativ- und positiv-Humanseren	128
Abb. 7-1	Schematische Darstellung des Aufbaus eines LW-Bauteils mit Koordinatensystem und Zuweisung der Variablen	134
Abb. 7-2	Berechnete Phasen- und Gruppengeschwindigkeit der nullten Love-Mode in Abhängigkeit von der normierten Schichtdicke in einem System von 36YX.LiTaO ₃ mit einer gesputterten SiO ₂ -Schicht	140
Abb. 7-3	Theoretische Voraussage der Massesensitivität der nullten Love-Mode in Abhängigkeit von der normierten Schichtdicke in einem System von 36YX.LiTaO ₃ mit einer gesputterten SiO ₂ -Schicht	141
Abb. 7-4	Transmissionskurven von LW-Bauteilen zum Nachweis der Reproduzierbarkeit des Beschichtungsprozesses	142
Abb. 7-5	Transmissionskurven von LW-Bauteilen mit unterschiedlichen SiO ₂ -Schichtdicken und von unbeschichteten Bauteilen an Luft	143
Abb. 7-6	Transmissionskurven von LW-Bauteilen mit unterschiedlichen SiO ₂ -Schichtdicken und von unbeschichteten Bauteilen in Wasser	144
Abb. 7-7	Resonanzfrequenzen der LW-Bauteile in Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Schichtdicke der aufgetragenen SiO ₂ -Schicht	144
Abb. 7-8	Sensorsignale von LW-Bauteilen mit einer SiO ₂ -Schichtdicke von 4 µm bei Beprobung mit BSA-Lösungen in unterschiedlichen Konzentrationen	145
Abb. 7-9	Beprobung von LW-Bauteilen mit einer SiO ₂ -Schichtdicke von 4 µm mit BSA-Lösungen in unterschiedlichen Konzentrationen	146

Abb. 7-10	Frequenzänderungen von LW-Bauteilen unterschiedlicher SiO ₂ -Schichtdicke bei Beprobung mit BSA	147
Abb. 7-11	Vergleich der experimentell ermittelten und der theoretisch berechneten Phasengeschwindigkeit der nullten Love-Mode in Abhängigkeit von der Schichtdicke in einem System von 36YX.LiTaO ₃ mit einer gesputterten SiO ₂ -Schicht	149
Abb. 7-12	Vergleich der experimentell aus der Frequenzänderungen bei Beprobung mit BSA ermittelten und der theoretisch berechneten Massesensitivität der nullten Love-Mode	150
Abb. 7-13	Transmissionskurven von LW-Bauteilen mit unterschiedlichen Parylen-Schichtdicken an Luft	152
Abb. 7-14	Frequenzänderungen von LW-Bauteilen unterschiedlicher Parylen-Schichtdicke bei Beprobung mit BSA bzw. bei Beprobung mit Xylol	153
Abb. A-1	FTIR-Photoakustisches Spektrum von Parylen-C	A-3
Abb. A-2	Beispielmessung zur Bestimmung der Dicke der Parylenbeschichtung mittels eines Dektak-Profilometers	A-3
Abb. A-3	FTIR-Photoakustisches Spektrum von carboxymethyliertem Dextran	A-4
Abb. C-1	Absorption der Fraktionen bei 280 nm nach dem Umpuffern von T-BSA	A-10
Abb. C-2	Radioaktivität und Absorption bei 280 nm (1. Reinigung)	A-10
Abb. C-3	Radioaktivität und Absorption bei 280 nm (2. Reinigung)	A-11
Abb. D-1	Förderraten bei verschiedenen Pumpleistungen für zwei Pumpenschläuche	A-13
Abb. D-2	Schematische Darstellung der Anschlußbelegung eines Injektionsventils	A-14
Abb. D-3	Schematische Darstellung der Anschlußbelegung des Selektionsventils	A-14
Abb. D-4	Schaltplan der PC-Schnittstelle	A-19
Abb. D-5	Schaltplan der Injektionsventile	A-20
Abb. D-6	Schaltplan des Selektionsventils	A-21
Abb. D-7	Fenster beim Starten der Software (hPanel)	A-23
Abb. D-8	Fenster zur Eingabe des Programmablaufs (fPanel)	A-24
Abb. D-9	Fenster bei einer Messung (kPanel)	A-25
Abb. D-10	Fenster zum Anlegen eines Meßprotokolls (pPanel)	A-26
Abb. D-11	Schematische Darstellung der Grundfunktionen der MAFIA	A-29

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2-1	Kopplungsfaktoren und Eigenschaften für in der OFW-Technik gängige Substratmaterialien und Kristallschnitte	9
Tab. 3-1	Parameter des Hochfrequenz-Magnetronspütern von SiO ₂	23
Tab. 4-1	Analysenprotokoll bei Immobilisation von Protein an einem dextranbeschichteten Sensor und Immunoreaktion	41
Tab. 6-1	Bindungseffizienz und Oberflächendichte bei der Photoimmobilisation von T-BSA auf verschiedenen Oberflächenmaterialien	72
Tab. 6-2	Bestimmung der Effizienz verschiedener Waschlösungen beim Ablösen nicht-kovalent gebundenen Dextrans von parylenbeschichteten Glasplättchen	75
Tab. 6-3	Bindungseffizienz von spezifisch und unspezifisch gebundenem Streptavidin auf verschiedenen Oberflächen	76
Tab. 6-4	Absorptionspeaks von Dextranen im FT-IR-PAS-relevanten Bereich	78
Tab. 6-5	Optimale Mischungen von Dextran und T-BSA beim CoCoating	81
Tab. 6-6	Zusammenfassung der optimalen Beschichtungsparameter zur Coimmobilisation von Dextranen mit T-BSA	90
Tab. 6-7:	Immobilisationspuffer bei Liganden mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten	105
Tab. 6-8	Oberflächenbelegung mit Ligand bei Immobilisation auf verschiedenen Oberflächen	110
Tab. 7-1	Werte für ein 36°-rot. XY-LiTaO ₃ (36YX.LT) STW-Bauelement und gesputtertes SiO ₂	139
Tab. A-1	Spezifikation der Belichtungsapparatur	A-2
Tab. D-1	Verwendete PVC-Pumpschläuche	A-13
Tab. D-2	I/O-Ports der parallelen Schnittstelle	A-17
Tab. D-3	Pinbelegung der Centronix-Schnittstelle	A-17
Tab. D-4	Schaltzustände der MAFIA-Komponenten	A-17
Tab. D-5	Adresskodierung der Latches	A-18
Tab. D-6	Legende zum Schaltplan der PC-Schnittstelle	A-19
Tab. D-7	Legende zum Schaltplan der Injektionsventile	A-20
Tab. D-8	Legende zum Schaltplan des Selektionsventils	A-21
Tab. D-9	Textfelder und Editiermöglichkeiten zum hPanel	A-23
Tab. D-10	Textfelder und Editiermöglichkeiten zum fPanel	A-24
Tab. D-11	Textfelder und Editiermöglichkeiten zum kPanel	A-25
Tab. D-12	Textfelder und Editiermöglichkeiten zum pPanel	A-26
Tab. F-1	Isoelektrische Punkte verschiedener Biomoleküle	A-31
Tab. G-1	Halbwertszeiten der verwendeten radioaktiven Isotope	A-31

1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG

Verschärfte gesetzliche Bestimmungen sowie neue analytische Probleme und Anforderungen bedürfen in zunehmendem Maße einer schnellen, kontinuierlichen und höchst sensitiven Überwachung chemischer und biochemischer Analyte in den Bereichen Umwelt, Prozeßkontrolle und Medizin. Bislang erfolgt dies noch hauptsächlich durch klassische diskontinuierliche Off-Line-Verfahren wie beispielsweise Gaschromatographie, Atomabsorptionsspektroskopie oder Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie im chemischen oder Immunoassays (RIA, ELISA, FIA, etc.) im biochemischen Bereich. Mit Hilfe dieser Methoden kann zwar fast jede beliebige Substanz mit hoher Selektivität und guten Nachweisgrenzen detektiert werden, jedoch bedarf es dazu eines enormen apparativen, zeitlichen, kostenintensiven und personellen Aufwands, der den Anforderungen einer modernen chemischen Analytik nicht mehr genügt. Die Entwicklung geht daher in Richtung schneller, kostengünstiger und einfacher Überwachung mit Hilfe chemischer und biochemischer Sensoren, die eine kontinuierliche On-Line-Analyse erlauben [bon92].

Allgemein setzen Sensoren eine physikalische, chemische oder elektrochemische Größe in ein elektrisches Signal um. Unter einem (bio)chemischen Sensor versteht man eine Meßeinrichtung mit einer (bio)chemisch sensitiven Schicht an der Sensoroberfläche, an der eine möglichst schnelle, sensitive, selektive und im Idealfall auch reversible Wechselwirkung mit dem Analyt stattfindet [cam91]. Die daraus resultierenden Veränderungen der Schichteigenschaften werden mittels eines mit dieser Schicht in direktem Kontakt stehenden Signalwandlers in ein elektrisches Meßsignal umgewandelt, das die Identifizierung und Quantifizierung des Analyten ermöglicht. Der Wandler kann sich dabei verschiedener physikalischer Größen bedienen. So existieren Sensoren auf der Basis optischer, elektrochemischer, akustischer, thermischer und elektronischer Meßprinzipien [tur87, sch89].

Biosensoren können aufgrund ihres Erkennungssystems in vier Gruppen unterteilt werden [sch89]:

- *Metabolismussensoren.* Dabei erfolgt die Signalerzeugung über eine biokatalytische Umsetzung des Analyten durch Enzyme, Mikroorganismen, Gewebeteile, etc. Die größte Anzahl entwickelter und kommerziell genutzter Sensorsysteme basiert auf derartigen Metabolismussensoren, insbesondere auf Enzymelektroden [new92]. Mit Hilfe von Enzymelektroden kann eine große Anzahl von Analyten insbesondere mit klinischer Relevanz bestimmt werden. Metabolismussensoren, die mikrobiologische Organismen nutzen, sind aufgrund ihres Multirezeptorverhaltens prädestiniert für die Bestimmung von Summenparametern, die insbesondere für den Umweltschutz von Bedeutung sind, wie der Biologische Sauerstoffbedarf (BSB), Toxizitäten oder Mutagenitäten.
- *Bioaffinitätssensoren.* Sie zeigen die Erkennung und Bindung eines spezifisch bindenden Liganden an einen entsprechenden Rezeptor an. Als Rezeptor-Ligand-Paare kommen eine Vielzahl von biologisch relevanten Molekülen in Frage, z.B. Antigen/Hapten-Antikörper, Enzym-Inhibitor, DNA-Oligonucleotid [eng91], DNA-Protein [jos95], Membranrezeptor-Agonist/Antagonist [koo94]. Im allgemeinen weisen weder Rezeptor noch Ligand in Affinitätsreaktionen (im Gegensatz zu Enzymen) eine nachweisbare intrinsische Aktivität auf. Der Nachweis der Wechselwirkung muß daher entweder indirekt über markierte Hilfssubstanzen oder

direkt durch Registrierung veränderter physikalisch-chemischer Eigenschaften des gebildeten Komplexes erfolgen. Markersubstanzen für den indirekten Nachweis sind hauptsächlich Fluorophore [hem87, vuo91], Enzyme [lit78, bla82], Farbstoffe [gri83, had87] sowie radioaktive Marker [gow86, wia86]. Zum direkten Nachweis der Affinitätsreaktionen können beispielsweise folgende physikalische Parameter beobachtet werden: die Zunahme der Masse oder der Schichtdicke auf der Sensoroberfläche; die Aufnahme oder Abgabe von Wärmeenergie bei der Reaktion; die Änderung der dielektrischen Konstante oder des Brechungsindex; die Änderung der Leitfähigkeit; die Veränderung von (elektro)chemischen Potentialen oder die Änderung des Diffusionskoeffizienten [tur87, sch89].

- *Gekoppelte- und Hybridsysteme.* Diese Sensoren nutzen zur Signalbildung Reaktionskaskaden, konkurrierende oder verstärkende Reaktionen. Dabei kann die Kombination von spezifischen Rezeptoren mit signalverstärkenden Komponenten sowohl künstlich durch den Einbau in komplexe Erkennungsstrukturen erfolgen als auch durch Adaption von natürlichen, biochemischen Systemen wie Zellen oder Zellbestandteilen.
- *Biomimetische Sensoren.* Sie sollen die Funktionsweisen von Sinnesorganen simulieren und damit die menschliche Sinnesleistung objektivieren, ersetzen oder ergänzen. Dies wird derzeit hauptsächlich durch die Kombination von geeigneten Einzelsensoren zu Sensorsystemen, sogenannten "künstlichen" ("elektronischen") Nasen, Augen, Ohren oder Tastorganen erreicht.

An einen idealen Sensor werden zahlreiche Anforderungen gestellt, wie zum Beispiel ausreichend selektive Reaktion auf den Analyten, hohe Empfindlichkeit, gutes Ansprechverhalten, Reversibilität und Reproduzierbarkeit der Meßwerte, sowie hohe Langzeitstabilität. Vor allem für die klassischerweise aufwendige und teure Biosensorik kommen noch die Forderungen nach niedrigen Kosten, einfacher und schneller Messung, sowie idealerweise in-situ Durchführbarkeit in Echtzeit dazu.

Viele dieser Forderungen werden durch massesensitive elektroakustische Bauelemente erfüllt. Solche Bauteile haben sich bereits bei vielen technischen Anwendungen, vor allem in der Elektronik, elektrischen Datenverarbeitung und in der Hochfrequenztechnik längst etabliert. Sie arbeiten im Ultraschallgebiet bei Frequenzen zwischen 10 MHz und 2 GHz. Zum Einsatz in der (Bio)Sensorik werden diese Bauelemente mit einer selektiven Beschichtung versehen und als frequenzbestimmendes Element in einen Oszillatorschaltkreis eingebaut. Durch die Wechselwirkung der akustischen Welle mit dem umgebenden Medium kommt es dann zu einer Veränderung von Geschwindigkeit und Amplitude der Welle, was als Änderung der Resonanzfrequenz und Einfügedämpfung des Oszillators nachgewiesen werden kann. Auf diese Weise können Veränderungen an der Oberfläche, wie z.B. Änderungen der Masse, Viskoelastizität, Leitfähigkeit, Dielektrizitätskonstante oder Temperatur detektiert werden. Wichtigste Meßgröße ist jedoch im allgemeinen die Änderung der Resonanzfrequenz aufgrund der Masseänderung durch Wechselwirkung des Analyten mit der Beschichtung.

Sensoren auf der Basis verschiedenster akustischer Wellen, die nach den Randbedingungen und der Richtung ihrer Auslenkungskomponenten unterschieden werden, sind sowohl für gasförmige als auch für flüssige Medien realisiert worden, wie zum Beispiel Schwingquarze [sau59, sho72, laa88, pru90, ged94, nak96] und Sensoren basierend auf Rayleighwellen [woh79, ami82], akustischen Plattenmoden [jos88, mar89, andle92, dej95], trans-

versalen Oberflächenwellen [tho86, bae92] und Love-Wellen [kov94, hau94, du96a, har96, giz97].

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bauelemente wurden ursprünglich für den Einsatz in der modernen Telekommunikation entwickelt und können damit kostengünstig als Massenprodukte käuflich erworben werden. Solche Bauteile finden in der hiesigen Arbeitsgruppe nach dem Aufbringen polymerer Beschichtungen bereits Anwendung in der Gas-sensorik zur qualitativen und quantitativen Analyse von organischen Lösungsmittelgemischen [rap95, bar96, bar98a]. Darüber hinaus werden Fragestellungen aus der Lebensmittel-, Kosmetik- und Tabakindustrie bearbeitet, um durch die Unterscheidung der verschiedenen Aromen eine Qualitätskontrolle im Prozeß bzw. während der Herstellung zu etablieren [sti97]. In einer früheren Arbeit [wes96] wurden die Bauteile für den Einsatz in flüssigen Phasen erprobt und ihre Eignung zur Biosensorik nachgewiesen. Dabei wurden zwei Möglichkeiten der Immobilisation von biologischen Erkennungsmolekülen entwickelt, die jedoch spezielle Modifikationen der Oberfläche des Bauteils bzw. der zu immobilisierenden Proteine erfordern.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein universell anwendbares Verfahren zur Biofunktionalisierung der Oberfläche zu finden, das mit Hilfe einer einfachen, standardisierten Prozedur die schnelle und reproduzierbare Immobilisation beliebiger Proteine bzw. verschiedenster Biomoleküle erlaubt, ohne daß hierzu für das jeweilige Protein auf spezielle Methoden zurückgegriffen werden muß. Der so entwickelte Biosensor soll die spezifische Wechselwirkung zwischen einem Rezeptor-Ligand-Paar detektieren und folglich der Gruppe der Bioaffinitätssensoren angehören. Bei den exemplarisch vorgestellten Reaktionen wird die Anwendung des Sensors auf die Detektion der spezifischen affinen Reaktion zwischen Antikörpern und Antigenen beschränkt, so daß es sich hier um Immunosensoren handelt.

Im Folgenden soll zunächst kurz auf die Theorie der Oberflächenwellen eingegangen werden. Speziellere theoretische Grundlagen und Prinzipien werden wegen der Komplexität der vorgestellten Themengebiete aus Gründen der Übersichtlichkeit den entsprechenden Kapiteln vorangestellt.

Anschließend werden Aufbau und Charakterisierung der entwickelten Meßeinrichtung dargestellt, sowie Beispielmessungen gezeigt, um das Anwendungspotential der Apparatur zu demonstrieren.

Eine neue Polymerbeschichtung zum Schutz der auf den kommerziell erhältlichen Bauteilen vorhandenen Aluminiumstrukturen vor korrosiven Angriffen wird der bereits vorhandenen Polyimid-Schutzbeschichtung gegenübergestellt.

Schwerpunkt der Arbeit ist dann die Beschichtung der schutzbeschichteten Sensoroberfläche mit einer Dextranschicht, sowie die Immobilisation von Proteinen am Dextran. An diesem System werden immunologische Untersuchungen und eine Regenerationsmöglichkeit vorgestellt, sowie anhand eines praxisrelevanten Anwendungsbeispiels der Einsatz eines solchen Sensors in der medizinischen Diagnostik gezeigt.

Eine Sensitivitätssteigerung ist durch das Aufbringen einer dünnen dielektrischen wellenführenden Schicht auf das piezoelektrische Substrat des Bauteils zu erwarten, was in einem abschließenden Kapitel anhand zweier Schichtmaterialien exemplarisch dargestellt werden soll.

2 OBERFLÄCHENWELLEN

Oberflächenwellen (OFW) sind mechanische Wellen, die sich an der Oberfläche eines Festkörpers ausbreiten. Sie dringen dabei nur etwa eine Wellenlänge tief in den Festkörper ein.

Lord Rayleigh sagte bereits 1885 die Existenz von Oberflächenwellen voraus [ray85], die später das erste Mal in Form von Erdbebenwellen gefunden wurden. Technische Anwendung bekamen die Oberflächenwellen jedoch erst 1946, als es Firestone und Frederick gelang, diese Wellen im Labor auf kristallinen Substraten zu erzeugen [fir46]. Heute haben sich die Oberflächenwellen-Bauelemente bei vielen technischen Anwendungen, vor allem in der Elektronik und elektrischen Datenverarbeitung, sowie in der Hochfrequenztechnik längst etabliert.

Oberflächenwellen können sich auf festen Körpern nur aufgrund der Tatsache ausbilden, daß diese Körper an ihrer Oberfläche kleinere Rückstellkräfte aufweisen als im Inneren. Dies bedeutet, daß die Schallgeschwindigkeit an der Oberfläche kleiner ist als im Inneren und somit die Welle an der Oberfläche des Festkörpers bleibt.

Oberflächenwellen lassen sich von Volumenwellen ableiten, die zunächst den einfachsten Fall, die elastischen Volumenwellen in einem unendlich ausgedehnten, homogenen, isotropen Festkörper darstellen. Mathematisch erfolgt der Übergang zur Oberflächenwelle durch die Wahl geeigneter Randbedingungen, wonach schließlich die Effekte anisotroper, piezoelektrischer Substrate und dünner Beschichtungen der Festkörperoberfläche durch entsprechende Modifikationen berücksichtigt werden [far72, rap91].

2.1 ARTEN VON AKUSTISCHEN WELLEN

Je nach Substratmaterial und Kristallschnitt werden unterschiedliche Arten akustischer Wellen angeregt, die sich nach den einzelnen Randbedingungen und der Richtung ihrer Auslenkungskomponenten klassifizieren lassen [whi70, far72, far78].

Zur Beschreibung der Oberflächenwellentypen ist der Begriff der Sagittalebene wichtig. Man versteht darunter die Ebene, die durch die Flächennormalen der wellenführenden Schicht und die Ausbreitungsrichtung der Welle aufgespannt wird (siehe Abbildung 2-1).

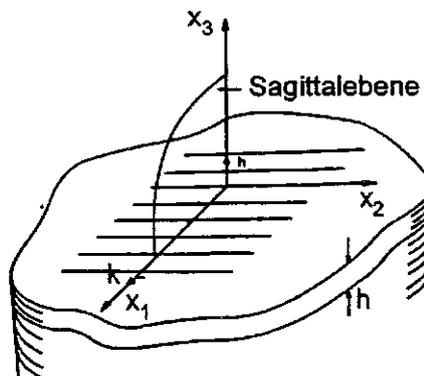


Abb. 2-1: Darstellung der Sagittalebene und des verwendeten Koordinatensystems

2.1 ARTEN VON OBERFLÄCHENWELLEN

Die charakteristischen Teilchenbewegungen an der Oberfläche sind für unterschiedliche Wellentypen in Abbildung 2-2 dargestellt.

Rayleighwellen zeigen Teilchenbewegungen in der Papierebene; bei den horizontal polarisierten Scherwellen (HPSW) dagegen verlaufen sie senkrecht dazu. Im Fall eines ST-Quarzes breiten sich SSBW's und STW's senkrecht zu Rayleighwellen in x_2 -Richtung aus. Bei SSBW's erfolgt im Gegensatz zu STW's ein Abtauchen der Welle in das Substrat.

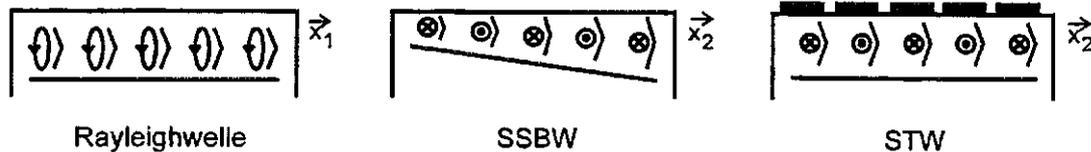


Abb. 2-2: Teilchenbewegungen und Energiefluß verschiedener Wellentypen

2.1.1 Rayleighwellen

Oberflächenwellen auf freien, rein elastisch isotropen Festkörpern wurden erstmals 1885 von Lord Rayleigh beschrieben und werden daher Rayleighwellen (RW) genannt [ray85].

Die Oberfläche ist aufgrund reduzierter Rückstellkräfte akustisch weicher als das Festkörperinnere und hat daher eine geringere Schallgeschwindigkeit, wodurch Rayleighwellen im allgemeinen etwa 10 % langsamer sind als die langsamste Volumenwelle. Aufgrund dieser reduzierten Schallgeschwindigkeit werden Rayleighwellen an der Oberfläche geführt.

Die betreffenden Auslenkungskomponenten der Welle liegen parallel zur Sagittalebene und zeigen damit in den rückstellfreien Raum. Bei der Anregung von Rayleighwellen in flüssigen Medien kann daher die Auslenkungskomponente x_3 an Kompressionsmoden der Flüssigkeit ankoppeln, wodurch die Welle in die Flüssigkeit abgestrahlt wird. Dies führt zur deutlichen Verringerung der akustischen Oberflächenenergie und damit zu einer großen Dämpfung der Oberflächenwelle.

Rayleighwellen werden mathematisch unter der Annahme unendlicher Ausbreitung senkrecht zur Sagittalebene beschrieben. In das Festkörperinnere hinein nehmen die Amplituden der Teilchenauslenkungen ab.

2.1.2 Horizontal polarisierte Scherwellen

Horizontal polarisierte Scherwellen (HPSW) unterscheiden sich in ihren Auslenkungskomponenten prinzipiell von den Rayleighwellen. Die Auslenkungskomponenten der HPSW liegen senkrecht zur Sagittalebene. Das bedeutet, daß die Welle senkrecht zur Ausbreitungsrichtung und parallel zur Substratoberfläche verläuft. Somit existiert keine Auslenkungskomponente in den rückstellfreien Raum. Wird eine HPSW in Flüssigkeiten angeregt, kommt es daher nur zu minimalen Energieverlusten.

Horizontal polarisierte Scherwellen werden je nach Ausbreitungsmedium an der Oberfläche wie folgt klassifiziert.

2.1.2.1 Surface Skimming Bulk Waves

Auf freien, rein elastisch isotropen Festkörperoberflächen existieren neben den Rayleighwellen auch die "Surface Skimming Bulk Waves" (SSBW), für die es im Deutschen keine einheitliche Bezeichnung gibt. Allerdings verläuft die SSBW nicht ausschließlich an der Oberfläche, sondern sie konvertiert zur Volumenwelle, indem sie mit zunehmender Ausbreitung in das Substrat abwandert. Dadurch erleidet der an der Oberfläche verbleibende Teil der Welle im Vergleich zur Rayleighwelle eine höhere Wegstreckendämpfung. Dieser Nachteil kann aber technisch durch kürzere Laufstrecken wieder ausgeglichen werden.

Gegenüber den Rayleighwellen sind für die SSBW jedoch auch einige Vorteile zu verzeichnen [flo87]. So haben die SSBW's höhere Ausbreitungsgeschwindigkeiten als Rayleighwellen, wodurch sich mit OFW-Bauelementen höhere Resonanzfrequenzen erzielen lassen [fro84]. Bei geeigneter Wahl des Kristallschnitts ergeben sich für Quarz Geschwindigkeiten von über 5000 m/s, während die dazugehörigen RW-Geschwindigkeiten maximal 3158 m/s betragen.

Auch zeigt die SSBW im Vergleich zur Rayleighwelle eine höhere mittlere Eindringtiefe in das Substrat und damit eine geringere Energiedichte, was bedeutet, daß bei einer höheren Gesamtenergie gearbeitet werden kann, ohne daß es zu Störeffekten kommt. Gleichzeitig wird die SSBW von Verschmutzungen an der Oberfläche weniger beeinflusst, was zu einer deutlichen Verbesserung der Handhabbarkeit und der Langzeitstabilität von OFW-Bauelementen auf der Basis von SSBW's führt [lew77].

2.1.2.2 Bleustein-Gulyaev-Wellen

Wird eine horizontal polarisierte Scherwelle auf einem freien, anisotropen, piezoelektrischen Medium angeregt, kommt es zur Wechselwirkung der mechanischen Welle mit dem mitgeführten elektrischen Feld. Dieser Effekt der piezoelektrischen Versteifung führt zu einer Erhöhung der Oberflächenschallgeschwindigkeit. Der daraus resultierende Wellentyp wird als Bleustein-Gulyaev-Welle bezeichnet [ble68, has94].

2.1.2.3 Love-Wellen

Das Abtauchen der SSBW in das Substratinnere kann durch eine dünne Beschichtung der Oberfläche verhindert werden, wenn die transversal akustische Geschwindigkeit der Welle in der Beschichtung kleiner ist als im Substrat. Durch die so erzielte Verminderung der Schallgeschwindigkeit im aufgetragenen Film wird die Welle an der Oberfläche gehalten.

Handelt es sich bei dieser Schicht um einen homogenen bzw. kompakten Film, dessen Dicke in der Größenordnung der Wellenlänge liegt, so nennt man diesen Oberflächenwellentyp Love-Welle (siehe Kapitel 7) [aul76, aul79, jos82, wil81]. Love-Wellen (LW) wurden 1911 von A.E.H. Love als ein weiterer Typ von horizontal polarisierten Erdbebenwellen entdeckt [lov11].

2.1.2.4 Transversale Oberflächenwellen

Außer durch kontinuierliche, homogene, dünne Filme kann das Abtauchen der SSBW in das Substrat auch durch Beschichtung mit einer periodisch unterbrochenen Streifenstruktur, wie sie auch zur Erzeugung von Oberflächenwellen benötigt wird (siehe Kapitel 2.3), verhindert werden [tho86, bae92]. Eine solche dünne, strukturierte Metallbeschichtung, die die gleiche Periodizität wie die Interdigitalstrukturen auf dem Substrat aufweist, bezeichnet man als Masegitter. Durch dieses Masegitter wird der HPSW ein periodisches Massepotential aufgeprägt, das das Hineinlaufen in das Substrat für Wellenlängen gleicher Periodizität verhindert. Es werden also nur Wellen einer bestimmten Frequenz gewissermaßen an die Oberfläche gebunden, womit sich neben der schall-erzeugenden und eigentlich frequenzbestimmenden Transducerstruktur durch die Struktur des Masegitters zusätzlich eine frequenzselektierende Wirkung ergibt. Die so entstandenen Wellen werden als transversale Oberflächenwellen (Surface Transverse Waves, STW) bezeichnet [flo87].

2.1.3 Akustische Plattenmoden

Neben den Oberflächenwellen gibt es noch eine Reihe von akustischen Plattenmoden (Acoustic Plate Modes, APM), die in dünnen piezoelektrischen Platten existieren, wobei die akustische Energie hauptsächlich im Innern der Platte konzentriert ist [jos85, mar89, and91, and92, and93]. Die Wellen breiten sich durch vielfache Reflexion zwischen der Ober- und der Unterseite der Platte aus; d.h. das gesamte Substrat wird von der akustischen Resonanz erfaßt. Dabei muß zwischen symmetrischen (Dickenschwingungen) und antisymmetrischen (Biegeschwingungen) Moden unterschieden werden. Findet man Teilchenbewegungen in der Sagittalebene, die bei Dickenschwingungen auftreten, so spricht man von Lamb-Wellen [whi88]. Wird die Substratschichtdicke immer weiter verkleinert (ca. 2 μm), so gelangt man zu einem weiteren Wellentyp, der als "Flexural Plate Waves" (FPW) bezeichnet wird. Ein Sensor auf der Basis von FPW's nutzt vor allem die Biegeschwingungen des Substrats aus [wen90].

Liegen die Teilchenbewegungen senkrecht zur Sagittalebene, so spricht man in Analogie zu den Oberflächenwellen von horizontal polarisierten Plattenmoden (Shear Horizontal Plate Modes, SH-PM) [dej95].

2.2 PIEZOELEKTRISCHER EFFEKT

Um eine Oberflächenwelle auf einem elastischen Festkörper zu erzeugen, wird im allgemeinen ein piezoelektrischer Kristall verwendet.

Der piezoelektrische Effekt wurde 1880 von Jacques und Pierre Curie entdeckt [cur80]. Dabei kommt es durch Krafteinwirkung auf ausgezeichnete Kristallflächen eines piezoelektrischen Kristalls zur Verschiebung der einzelnen Ladungsschwerpunkte und damit zur elektrischen Aufladung zweier gegenüberliegender Flächen des Kristalls, wodurch der

Gesamtkristall makroskopisch zum Dipol wird. Das bedeutet, daß solche Kristalle durch mechanische Belastungen, die eine Verzerrung des Kristalls zur Folge haben, ein elektrisches Feld erzeugen. Auch die Umkehrung dieses Effekts ist zu beobachten, d.h. ein in geeigneter Richtung von außen angelegtes elektrisches Feld führt zu einer mechanischen Verzerrung. Man spricht in diesem Fall von inverser Piezoelektrizität. Eine periodisch angelegte Spannung erzeugt in Abhängigkeit vom Vorzeichen Kompressionen und Dehnungen, die zu Schwingungen des Kristalls führen.

Beobachtet werden kann der Piezoeffekt an Kristallen, die eine oder mehrere polare Achsen, aber kein Symmetriezentrum besitzen, wie zum Beispiel Quarz, Turmalin, Zinkblende, Weinsäure, Bariumtitanat, Lithiumniobat und verschiedene andere Piezokeramiken.

Auf der Basis von Quarz wurden die ersten piezoelektrischen Bauelemente konstruiert, da sich Quarz durch außerordentlich gute mechanische Stabilität, geringe Temperaturabhängigkeit des Piezoeffekts und geringe Dämpfung auszeichnet. Jedoch sind nicht alle Kristallschnitte für eine derartige Anwendung geeignet, sondern es werden zur Erzielung verschiedener Eigenschaften, wie zum Beispiel eines minimalen Temperaturganges der Resonanzfrequenz (siehe Kapitel 2.4.3.2), bestimmte Schnitte ausgewählt.

Seit etwa 10 Jahren gewinnen vor allem Einkristalle aus LiTaO_3 und LiNbO_3 als Substratmaterialien für akustische Bauelemente an Bedeutung.

2.2.1 Einfluß der Piezoelektrizität auf die Geschwindigkeit der Oberflächenwelle

Die Anregung und Detektion von Oberflächenwellen erfolgt im allgemeinen über die piezoelektrische Kopplung.

Einkristalline piezoelektrische Materialien reagieren auf ein von außen angelegtes elektrisches Feld mit einer mechanischen Verzerrung und erzeugen umgekehrt bei Kraftwirkung wiederum ein elektrisches Feld (siehe Kapitel 2.2). Über diesen Piezoeffekt ist die mechanische Oberflächenwelle mit dem elektrischen Feld gekoppelt. Ohne diese Kopplung wäre die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Oberflächenwelle geringfügig langsamer, als dies tatsächlich der Fall ist. Durch die Kopplung wirkt jedoch das mitgeführte elektrische Feld auf die Welle zurück, wodurch es zu einer Erhöhung der Schallgeschwindigkeit im piezoelektrischen Kristall kommt. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von piezoelektrischer Versteifung des Substrats.

Umgekehrt kann die Stärke der Kopplung des mechanischen Feldes mit dem erzeugten elektrischen Feld auch mit Hilfe der piezoelektrischen Versteifung beschrieben werden. Danach hängt die Schallgeschwindigkeit im piezoelektrischen Substrat von der Versteifung der Oberfläche des Substrates ab und wird definiert als:

$$v^{piezo} = \sqrt{\frac{C_{steif}}{\rho}} \quad (2-1)$$

mit:

$$C_{steif} = C(1 + K^2) \quad (2-2)$$

2.2 PIEZOELEKTRISCHER EFFEKT

- v^{piezo} = Schallgeschwindigkeit im piezoelektrischen Medium
 ρ = Massendichte der Volumeneinheit
 C = Elastizitätstensor
 C_{steif} = piezoelektrisch versteifter Elastizitätstensor
 K = piezoelektrischer Kopplungsfaktor

Je stärker also die Kopplung zwischen mechanischen und piezoelektrischen Größen ist (d.h. je größer der Kopplungsfaktor K), desto größer ist C_{steif} und damit auch die Schallgeschwindigkeit im piezoelektrischen Medium.

Der Kopplungsfaktor kann bei Oberflächenwellen im Gegensatz zu Volumenwellen nicht direkt berechnet werden. Er wird daher über die relative Änderung der Schallgeschwindigkeit, die durch die Piezoelektrizität entsteht, definiert:

$$K^2 = 2 \frac{\Delta v}{v} \quad (2-3)$$

Die so ermittelten Kopplungsfaktoren unterscheiden sich für verschiedene Substratmaterialien und Kristallschnitte stark, sind aber im allgemeinen sehr klein. In Tabelle 2-1 sind Werte des Kopplungsfaktors und einige Eigenschaften von in der OFW-Technik gängigen Substratmaterialien und Schnitte zusammengefaßt [rap91].

Substratmaterial	Wellentyp	Kristallschnitt	Laufrichtung	Geschwindigkeit [m/s]	K^2 [%]
LiNbO ₃	RW	Y	Z	3488	4,8
α -Quarz	RW	ST	X	3158	0,11
LiTaO ₃	RW	77,5°-rotY	90° zu X	3379	1,6
LiTaO ₃	STW	36°-rotY	X	4160	4,7

Tab. 2-1: Kopplungsfaktoren und Eigenschaften für in der OFW-Technik gängige Substratmaterialien und Kristallschnitte

2.3 ERZEUGUNG VON OBERFLÄCHENWELLEN

Zur Erzeugung akustischer Oberflächenwellen wird im allgemeinen der piezoelektrische Effekt ausgenutzt. Durch Anlegen einer hochfrequenten elektrischen Wechselspannung an ein piezoelektrisches Substrat wird das Material periodisch verformt, wobei es zur Abstrahlung akustischer Wellen kommt.

Als Substrate dienen im allgemeinen die piezoelektrischen Materialien α -Quarz, LiNbO₃ und LiTaO₃. Deren Einkristalle werden in Scheiben geschnitten, poliert und durch photolithographische Verfahren mit speziell strukturierten Schallwandlern beschichtet. Die heute üblichen miniaturisierten Schallwandler bestehen aus Aluminium oder Gold in einer Dicke von 50 bis 200 nm. Sie besitzen typischerweise Interdigitalstruktur, die man sich anschaulich als zwei gegenüberliegende, kammartig ineinandergreifende Metallelektroden vorstellen kann (Interdigitaltransducer, IDT). Alle Finger eines IDT-Kamms sind über metallische Flächen leitend miteinander verbunden. Über Bonddrähte wird an diese Flächen eine hochfrequente elektrische Wechselspannung angelegt und so zwischen den verschiedenen gepolten Wandlerfingern ein elektrisches Wechselfeld erzeugt. Dadurch wird

die Richtung der elektrischen Feldlinien permanent von Finger zu Finger geändert. Aufgrund des piezoelektrischen Effekts resultiert daraus eine mit der Fingerstruktur periodische mechanische Verzerrung der Substratoberfläche, die als akustische Oberflächenwelle beidseitig abgestrahlt wird. Die Stärke des elektrischen Feldes wird dabei maßgeblich von der Dielektrizitätskonstanten zwischen den IDT's beeinflusst.

2.4 CHEMISCHE SENSORIK MIT OBERFLÄCHENWELLEN

Die schon seit 1946 bekannte technische Umsetzung des Phänomens der Oberflächenwellen gelangte erst ab 1965 zur größeren technischen Anwendung, nachdem von R. White und F. Vollmer Interdigitalwandler entwickelt und auf piezoelektrischen Substraten eingesetzt wurden [whi65]. Seither haben sich die Oberflächenwellen-Bauelemente in der Elektrotechnik vor allem als Hochfrequenzfilter durchgesetzt. Sie finden in zunehmendem Maße aber auch als chemische und biochemische Sensoren Interesse [woh79, wen89, bae92, kon93, ged94, rap95]. Dabei wird das massesensitive Verhalten solcher Bauteile ausgenutzt, indem sie mit einer selektiven Beschichtung versehen und als frequenzbestimmendes Glied eines Oszillatorschwingkreises verwendet werden.

2.4.1 Meßprinzip

Abbildung 2-3 zeigt den prinzipiellen Aufbau eines OFW-Bauelements und dessen elektronische Beschaltung [woh84]. Das Bauelement besteht aus einem piezoelektrischen Substrat, auf dem Interdigitaltransducer aufgebracht sind. Der Sendetransducer wird durch eine hochfrequente Wechselspannung zum Schwingen angeregt. Dadurch entsteht eine akustische Oberflächenwelle, die über das Substrat läuft und im Empfängertransducer wieder in ein elektrisches Signal zurückgewandelt wird (siehe Kapitel 2.3).

Die Transducer werden jeweils mit den Ein- und Ausgängen eines Hochfrequenz (HF)-Verstärkers zu einem Oszillatorschaltkreis verbunden, wodurch das OFW-Bauelement als frequenzbestimmendes Glied im so entstandenen Schwingkreis fungiert. Eine kontinuierliche Resonanz im Oszillationskreis wird durch den HF-Verstärker gewährleistet, der die Verluste, die sich im wesentlichen aus der Eigendämpfung des Bauteils ergeben, ausgleicht. Die Resonanzfrequenz dieses Oszillators wird als Meßsignal ausgewertet.

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Welle auf der Oberfläche hängt von der Oberflächenbeschaffenheit ab. Bringt man auf das piezoelektrische Substrat eine selektive Beschichtung auf und beprobt das Bauelement mit dem Analyten, so kommt es zur Anlagerung des Analyten auf der Oberfläche. Die Anlagerung bewirkt eine Änderung der Schallgeschwindigkeit (siehe Kapitel 2.4.3.1), was zu einer Frequenzänderung des Oszillatorschwingkreises führt. Diese Frequenzänderung wird als eigentlicher Meßwert erfaßt.

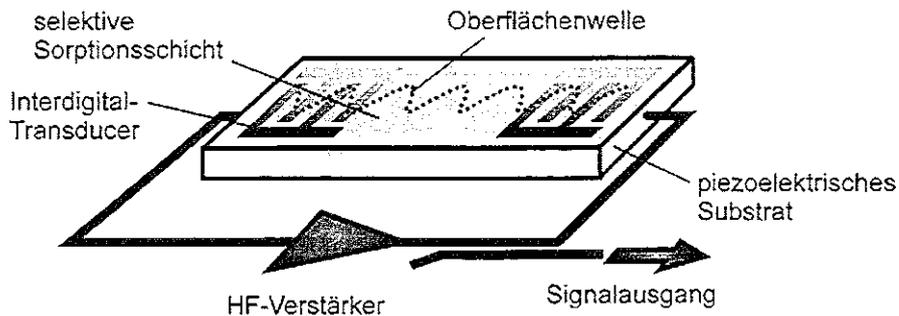


Abb. 2-3: Prinzipieller Aufbau eines typischen OFW-Bauelements sowie der elektronischen Beschaltung

2.4.1.1 Verzögerungsleitung und Resonator

OFW-Bauelemente können als Verzögerungsleitungen oder als Resonatoren betrieben werden. In Abbildung 2-4 sind Prinzipskizzen beider Arten dargestellt.

Beim Betrieb als Verzögerungsleitung ("Delay-Line") breitet sich die erzeugte Oberflächenwelle entlang einer gewissen Laufstrecke über das piezoelektrische Substrat aus und läuft in einen zweiten IDT hinein, der die gleiche Struktur besitzt wie der Sende-IDT. Dort kann die Welle über die piezoelektrische Kopplung Influenzladungen erzeugen, die sich durch konstruktive Interferenz zu einer makroskopisch meßbaren Wechselspannung addieren und somit als elektrisches Signal abgreifen lassen; d.h. die mechanische Schallwelle wird in eine elektromagnetische Welle zurückgewandelt. Da akustische Oberflächenwellen eine wesentlich geringere Ausbreitungsgeschwindigkeit als elektrische Signale haben, kommt es durch die zwischen Sende- und Empfänger-IDT liegende Laufstrecke zu einer akustischen Verzögerung des elektrischen Signals (Verzögerungsleitung).

Bei einem Resonator sind Sende- und Empfänger-IDT dicht beieinander lokalisiert (siehe Abbildung 2-4). Auf der jeweils gegenüberliegenden Seite befinden sich Reflektorfinger, die die erzeugte akustische Welle zu einem geringen Teil an jedem Finger reflektieren. Durch die hohe Anzahl an Reflektorfingern kommt es zur Reflexion eines großen Signalanteils. Die reflektierten Anteile der Oberflächenwelle gelangen zum Empfänger-IDT, interferieren dort und werden als Hochfrequenz ausgekoppelt. Durch diese Anordnung erreicht man im Transmissionsspektrum eine scharfe Kennlinie, während bei der Verzögerungsleitung ein Übertragungsband resultiert [nom92, nom93].

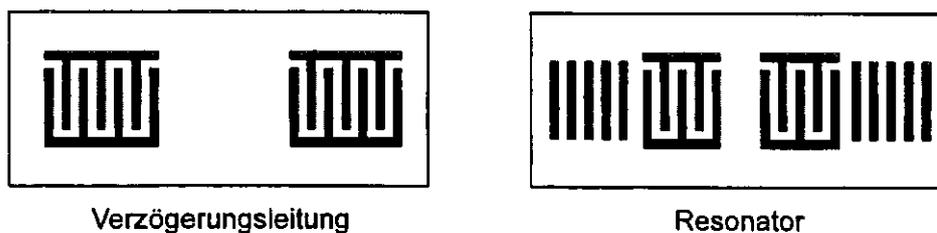


Abb. 2-4: Prinzipieller Aufbau von OFW-Bauelementen beim Betrieb als Verzögerungsleitung bzw. als Resonator

2.4.2 Beziehung zwischen Schallgeschwindigkeits- und Frequenzänderung

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Oberflächenwelle hängt von zahlreichen Substrat- und Schichtparametern ab. Aufgrund der Wechselwirkung der Oberflächenwelle mit der Sensoroberfläche oder dem mit der Oberfläche in Kontakt stehenden Medium kann die OFW-Schallgeschwindigkeit durch physikalische Veränderungen an der wellenführenden Oberfläche (Massenänderung, Änderung der mechanischen Eigenschaften, etc.) beeinflusst werden. Diese Geschwindigkeitsänderung bewirkt eine Frequenzverschiebung des OFW-Bauelements, die mit Hilfe einer Oszillatorschaltung detektiert werden kann. Die relative Änderung der Resonanzfrequenz des Oszillators ist dabei annähernd proportional der relativen Schallgeschwindigkeitsänderung der Oberflächenwelle [rap91]:

$$\frac{\Delta v}{v_0} \approx \frac{\Delta f}{f_0} \quad (2-4)$$

- v_0 = Schallgeschwindigkeit der ungestörten Oberflächenwelle
- f_0 = Grundfrequenz des Oszillators
- Δv = Änderung der OFW-Schallgeschwindigkeit
- Δf = Resonanzfrequenzänderung

2.4.3 Beeinflussung der OFW-Schallgeschwindigkeit

Verwendet man ein OFW-Bauelement als frequenzbestimmendes Glied in einer Oszillatorschaltung, so können über die Verschiebung der Resonanzfrequenz zum Beispiel Änderungen von Druck, Temperatur, Leitfähigkeit, Viskosität oder der Massebelegung gemessen werden. Formal kann man die möglichen Einflußgrößen in einem totalen Differential zusammenfassen [ric85]:

$$\frac{\Delta v}{v_0} = \frac{1}{v_0} \left(\frac{\partial v}{\partial m} \Delta m + \frac{\partial v}{\partial C} \Delta C + \frac{\partial v}{\partial T} \Delta T + \frac{\partial v}{\partial \varepsilon} \Delta \varepsilon + \frac{\partial v}{\partial \eta} \Delta \eta + \frac{\partial v}{\partial \sigma} \Delta \sigma + \frac{\partial v}{\partial F} \Delta F + \dots \right) \quad (2-5)$$

- m = Massebelegung der Oberfläche
- C = elastische Konstanten
- T = Substrattemperatur
- σ = elektrische Leitfähigkeit an der Oberfläche
- ε = Dielektrizitätskonstante
- η = Viskosität
- F = äußere Kraft bzw. Biegemoment auf die Oberfläche

Eine störungstheoretische Betrachtung der verschiedenen Einflußgrößen ist in [kon93, wes96] zu finden.

2.4.3.1 Einfluß dünner Schichten: Einfluß der Masse und der elastischen Konstanten

Um OFW-Bauelemente zur (bio)chemischen Sensorik einsetzen zu können, muß auf die Oberfläche eine selektive Beschichtung aufgebracht werden. Die Änderung der Schichtparameter bei der Anlagerung des Analyten führt zu einer veränderten Ausbreitungsgeschwindigkeit der Oberflächenwelle und damit zu einer Beeinflussung der Resonanzfrequenz des Oszillatorschaltkreises. Diese Frequenzänderung kann mit Hilfe von Gleichung 2-6, die aus störungstheoretischen Ansätzen abgeleitet wurde [aul73], beschrieben und über Gleichung 2-4 mit der relativen Änderung der Oberflächenwellen-Schallgeschwindigkeit in Beziehung gebracht werden.

$$\Delta f(m,c) = (k_1 + k_2) f_0^2 h \rho - k_2 f_0^2 h \left(\frac{4\mu}{v_r^2} \left(\frac{\lambda + \mu}{\lambda + 2\mu} \right) \right) \quad (2-6)$$

- k_1, k_2 = Materialkonstanten des Piezokristalls
- h = Dicke der Beschichtung
- ρ = Dichte der Beschichtung
- v_r = Geschwindigkeit der Oberflächenwelle
- λ = Schermodul der Beschichtung
- μ = Lamé-Konstante der Beschichtung

Die Frequenzänderung setzt sich nach Gleichung 2-6 aus zwei Termen zusammen: einem Term, der die Masse pro Flächeneinheit ($h \rho$) beinhaltet und einem Term, der durch die mechanischen Eigenschaften der Beschichtung beeinflusst wird. Ob die Resonanzfrequenz durch das Aufbringen der Beschichtung nun steigt oder sinkt hängt davon ab, welcher der beiden Terme dominiert.

Für die relative Schallgeschwindigkeitsänderung, die durch eine Massenbelegung der Oberfläche bewirkt wird, resultiert der in Abbildung 2-5 dargestellte Zusammenhang.

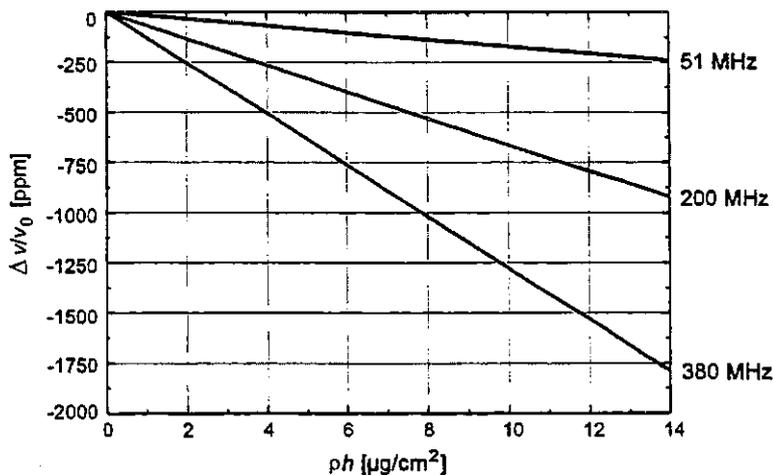


Abb. 2-5: Theoretische Abhängigkeit der Schallgeschwindigkeit von der Massezunahme durch eine isotrope Schicht für OFW-Bauelemente auf der Basis von LiTaO_3 bei unterschiedlichen Grundfrequenzen (aus [wes96])

2.4.3.2 Temperatureinfluß

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit akustischer Wellen in Festkörpern ist temperaturabhängig. Je nach Substrat, Wellentyp und Ausbreitungsrichtung erhält man unterschiedliche Temperaturabhängigkeiten. Ursache dafür sind Anharmonizitäten und Asymmetrien der Teilchenpotentiale im Kristallgitter, die eine Temperaturabhängigkeit der Dichte, der elastischen, piezoelektrischen und dielektrischen Konstanten bewirken. Das bedeutet, daß mit zunehmender Temperatur diese Parameter in den verschiedenen Kristallrichtungen unterschiedlich groß werden und somit die Schallgeschwindigkeit unterschiedlich verringert bzw. vergrößert wird [yam79].

Bei OFW-Bauelementen ist mit dem Kristallschnitt des Substratmaterials die Ausbreitungsrichtung der Oberflächenwelle bereits vorgegeben, wodurch ein Temperaturgang der Schallgeschwindigkeit erhalten wird, der durch die Temperaturabhängigkeit der betreffenden elastischen Konstanten bestimmt ist.

Die Temperaturabhängigkeit der Resonanzfrequenz läßt sich aus der Temperaturabhängigkeit der Schallgeschwindigkeit ableiten, welche durch ein Polynom angenähert wird [mas64]:

$$\frac{\Delta v}{v_0} = a_0 + a_1(T - T_0) + a_2(T - T_0)^2 + a_3(T - T_0)^3 + \dots \quad (2-7)$$

Für viele Substrate überwiegt der quadratische Term in Gleichung 2-7, so daß die Temperaturabhängigkeit der Schallgeschwindigkeit einen parabelförmigen Verlauf hat (siehe Abbildung 2-6). Im Bereich des Extremums ist dann nur noch eine sehr geringe Temperaturabhängigkeit zu beobachten (Temperaturkompensation). Die Temperatur T_0 im Extremum heißt Kompensationspunkt.

Bei OFW-Bauelementen sollten möglichst temperaturunabhängige Kristallschnitte als Substratmaterialien zum Einsatz kommen. Bei Schnitten mit Extremum des Temperaturganges liegt die optimale Arbeitstemperatur am Kompensationspunkt. Aus praktischen Gründen sind Quarzschnitte am gebräuchlichsten, da diese ein Extremum nahe der Raumtemperatur aufweisen.

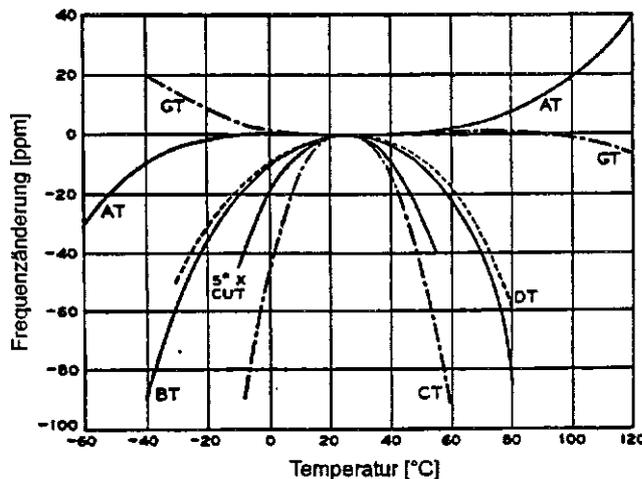


Abb. 2-6: Temperaturabhängigkeit der Frequenzänderung von Schwingquarzen für verschiedene Kristallschnitte (aus [mas64])

2.4.3.3 Einfluß der elektrischen Leitfähigkeit der Oberfläche

Die elektrische Leitfähigkeit an der Oberfläche beeinflusst aufgrund der piezoelektrischen Kopplung ebenfalls die OFW-Schallgeschwindigkeit und damit die Resonanzfrequenz des Oszillators.

Der Einfluß von Leitfähigkeitsänderungen auf die Schallgeschwindigkeit kann für Leitfähigkeiten zwischen Null und Unendlich aus Störungsrechnungen abgeleitet werden [dat86, wes96]. Man erhält daraus den in Gleichung 2-8 und Abbildung 2-7 gegebenen Zusammenhang zwischen relativer Schallgeschwindigkeitsänderung und elektrischer Leitfähigkeit an der Oberfläche.

$$\frac{\Delta v}{v_0} = \frac{K^2}{2} \frac{\sigma^2}{\sigma^2 + v_0^2 (\epsilon_1 + \epsilon_{21})^2} \tag{2-8}$$

K = piezoelektrischer Kopplungsfaktor

σ = Flächenleitfähigkeit an der Substratoberfläche

ϵ_i = DK des Substrats bzw. des Mediums nahe der Substratoberfläche

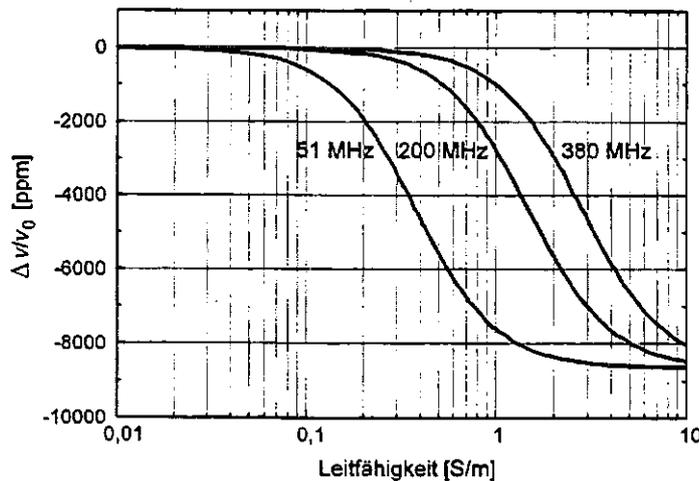


Abb. 2-7: Theoretische Abhängigkeit der Schallgeschwindigkeit von der Leitfähigkeit für OFW-Bauelemente auf der Basis von LiTaO₃ bei unterschiedlichen Grundfrequenzen (aus [wes96])

2.4.3.4 Viskositätseinfluß

Ändert sich die Viskosität der Meßlösung, so beeinflusst dies ebenfalls die Schallgeschwindigkeit der akustischen Welle. Bei einer kurzgeschlossenen Oberfläche, d.h. ohne elektrische Störeinflüsse, wirkt sich die Viskositätsänderung direkt auf die akustische Oberflächenimpedanz und somit auf die relative Geschwindigkeitsänderung aus [kon93].

Es ergibt sich eine Wurzelabhängigkeit der Schallgeschwindigkeit von der Viskosität (siehe Abbildung 2-8).

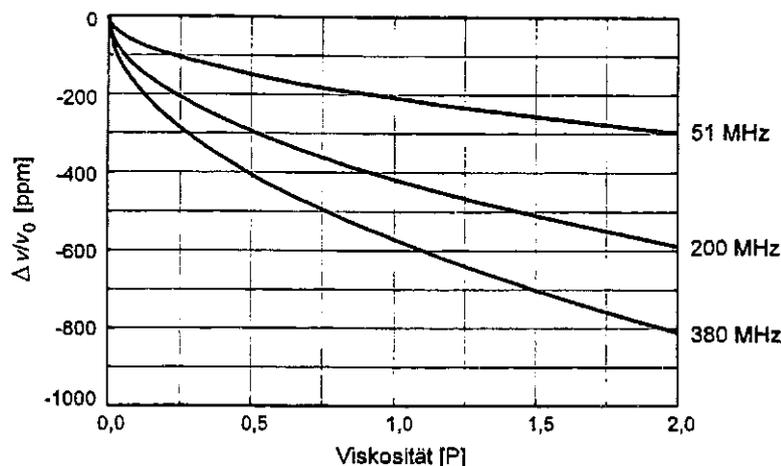


Abb. 2-8: Theoretische Abhängigkeit der Schallgeschwindigkeit von der Viskosität für OFW-Bauelemente auf der Basis von LiTaO_3 bei unterschiedlichen Grundfrequenzen (aus [wes96])

2.4.4 Definition der Massesensitivität für akustoelektrische Bauelemente

Mit Massesensitivität bezeichnet man im Fall akustischer, massesensitiver Bauelemente im allgemeinen die relative Änderung der Resonanzfrequenz des Bauteils aufgrund einer Masseabscheidung auf seiner Oberfläche. Dies kann durch die beiden folgenden alternativen Gleichungen beschrieben werden [kov92b, du96a, du96b]:

$$S_M = \lim_{\Delta M \rightarrow 0} \left[\frac{\Delta f}{\Delta M} \right] \quad [\text{Hz/ng}] \quad (2-9)$$

$$S_m = \lim_{\Delta M \rightarrow 0} \left[\frac{\frac{\Delta f}{f_0}}{\frac{\Delta M}{A}} \right] \quad [\text{mm}^2/\text{g}] \quad (2-10)$$

Δf = Resonanzfrequenzänderung aufgrund von Massebeladung der Oberfläche
 f_0 = Grundfrequenz des Oszillators
 ΔM = Massebeladung
 A = beladene Fläche

Mit Gleichung 2-10 ist die so berechnete Sensitivität unabhängig von der Grundfrequenz und von der Fläche, auf der die Masse abgeschieden wird. Damit ist diese Definition zum Vergleich von Bauteilen unterschiedlicher Grundfrequenz und unterschiedlicher Größe des sensitiven Bereiches besser geeignet als Gleichung 2-9.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 CHEMIKALIEN

Eine Liste der käuflich erworbenen Chemikalien befindet sich in Anhang B. T-BSA und [³H]-T-BSA wurde von Dr. Sigrist (CSEM, Neuchâtel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. [¹⁴C]-T-BSA wurde selbst radioaktiv markiert (siehe Anhang C). ENA-78, Antikörper gegen ENA-78 sowie die Seren wurden von Prof. Walz (Universität Bern, Schweiz) für erste Studien überlassen.

3.2 PUFFER- UND WASCHLÖSUNGEN

Die verwendeten *Phosphatpuffer* (i.a. 0,5, 20 und 50 mM) wurden aus NaH₂PO₄ * H₂O in der entsprechenden Molarität hergestellt; der pH-Wert wurde mit KOH auf pH 7,2 eingestellt. 50 mM *PBS* wurde durch Zugabe von 150 mM NaCl zu 50 mM Phosphatpuffer hergestellt. Das für Waschvorgänge benötigte *PBS/Tween* bestand aus 50 mM PBS mit 0,02 Vol-% Tween-20.

Für den *Acetatpuffer* wurde 10 mM Essigsäure mit KOH auf pH 5,0 titriert. Der *Glycinpuffer* wurde aus 10 mM Glycin hergestellt und mit HCl auf pH 2,3 bzw. 2,5 eingestellt. Der *Maleatpuffer* bestand aus TRIS und 10 mM Maleinsäure, mit KOH auf pH 6,0 gebracht. Für den *Boratpuffer* wurde 10 mM Borsäure mit KOH auf pH 9,6 titriert. *HEPES-Puffer* wurde durch Einwiegen von HEPES in der entsprechenden Molarität und anschließendes Einstellen auf den gewünschten pH-Wert hergestellt.

3.3 INSTRUMENTIERUNG UND MEßEINRICHTUNGEN

Im Folgenden sind die verwendeten, kommerziell erhältlichen Instrumente und Meßeinrichtungen sowie deren Einsatzgebiete und Funktionen zusammengefaßt. Genauere Spezifikationen und Herstellerangaben sind in Anhang A aufgeführt.

Der verwendete Meßaufbau, der sich aus der Frequenzmeßanlage und der Durchfluß- und Dosiereinrichtung zusammensetzt, ist in Kapitel 4 gesondert beschrieben und charakterisiert, da es sich hierbei um eine im Rahmen dieser Arbeit entstandene Entwicklung handelt.

3.3.1 Verwendete OFW-Bauelemente

Bei den verwendeten OFW-Sensoren handelt es sich um kommerziell erhältliche "low-loss-Filter" der Firma Murata (Japan), Typ SAF 380T. Sie werden im allgemeinen in der Hochfrequenz (HF)-Nachrichtentechnik als miniaturisierte HF-Filtereinheiten (Bandpaßfilter) bzw. als Stabilisatoren eingesetzt. Praktische Verwendung finden sie beispielsweise

als Massenprodukte für Funkfernsteuerungen, wie zum Beispiel Garagentüröffner. Die Bauelemente wurden teilweise in luftdicht geschlossenen TO39-Gehäusen geliefert, deren Deckel vor der Beschichtung und Beprobung entfernt werden mußte.

Das piezoelektrische Substrat der Bauteile besteht aus im 36°-rot Y,X-Schnitt geschnittenem Lithiumtantalat (36YX.LT), die Interdigitalstrukturen und Bonddrähte aus Aluminium, da Aluminium als Elektrodenmaterial die besten akustischen Eigenschaften bezüglich der Einkopplung des elektrischen Signals in den Oszillator hat. Bei den auf diesem Kristallschnitt erzeugten Oberflächenwellen handelt es sich um horizontal polarisierte Scherwellen (HPSW, STW; siehe Kapitel 2.1). Die Arbeitsfrequenz dieser Sensoren liegt bei 380 MHz; an Luft weisen die Bauelemente eine Gesamtdämpfung von ca. 2 dB auf, in Wasser von ca. 4 bis 6 dB.

Abbildung 3-1 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme eines solchen unbeschichteten Bauelements mit geöffnetem TO39-Gehäuse. In Abbildung 3-2 ist der Sensorchip nochmals vergrößert dargestellt.

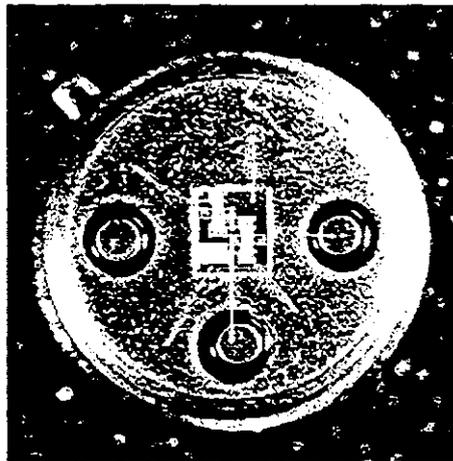


Abb. 3-1: Lichtmikroskopische Aufnahme eines unbeschichteten OFW-Bauelements im geöffneten Gehäuse (Murata SAF 380)

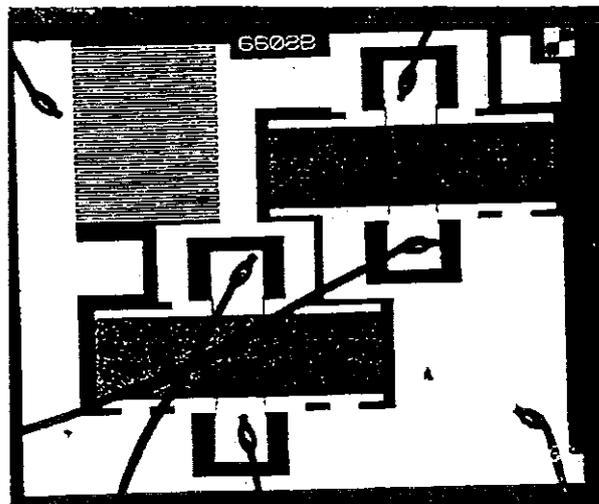


Abb. 3-2: Lichtmikroskopische Aufnahme des Sensorchips (Murata SAF 380)

3.3 INSTRUMENTIERUNG UND MESSANRICHTUNGEN

Bei diesen Bauelementen sind auf dem piezoelektrischen Kristall zwei 1-Port-Resonatorstrukturen (in Abbildung 3-2 zu erkennen als langgezogene Struktur oben rechts und unten) aufgebracht, die beide frequenzselektierende Wirkung besitzen. Die beiden Resonatoren sind in Reihe geschaltet; parallel zu ihnen ist zur Impedanzanpassung und Stabilisierung der Eingangskapazität ein interdigitaler Kondensator (in Abbildung 3-2 oben links) geschaltet.

Einer der beiden Resonatoren (Resonator 2) hat zwei Maxima im Transmissionsspektrum, die an Luft bei etwa 378,5 und 384 MHz liegen und durch Strukturierung der Anregungstransducer zustande kommen. Der andere Resonator (Resonator 1) hat nur ein Maximum, das zwischen den Maxima von Resonator 2 bei ca. 380 MHz liegt. Der parallel geschaltete interdigitale Kondensator dient zur Signalanpassung beider Resonatoren, so daß das Ausgangssignal von Resonator 1 optimal als Eingangssignal des Resonators 2 übergeben werden kann. Daraus ergibt sich das in Abbildung 3-3 dargestellte Transmissionsspektrum mit einem breiten Maximum von geringer Welligkeit in einem Durchlaßbereich von ca. 14 MHz.

Bei Betrieb in wäßrigen Lösungen wird die Impedanzanpassung durch den Kondensator gestört, so daß das Transmissionsspektrum des Resonators 2 dominiert (siehe Abbildung 3-3). Damit hat das Oberflächenwellen-Bauelement, bedingt durch die Transmissionseigenschaften, zwei alternative Betriebspunkte. Bei welcher Frequenz der Oszillator seinen Arbeitspunkt wählt, hängt von der Phasenlage ab, die durch die Oszillatorelektronik bestimmt wird (siehe auch Kapitel 3.3.3).

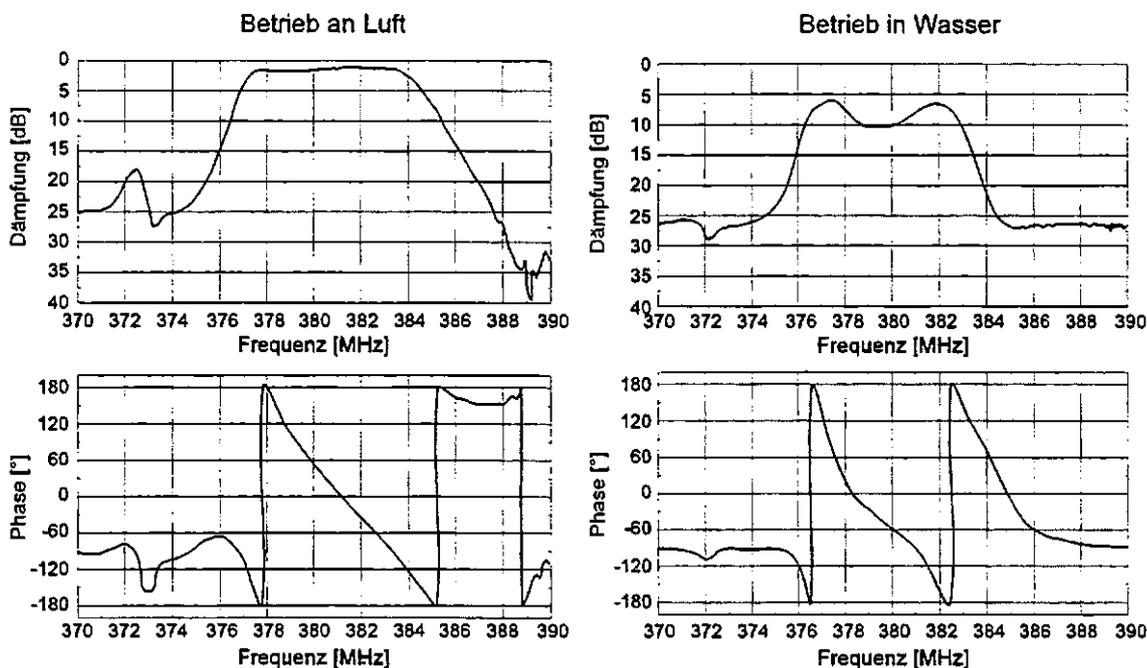


Abb. 3-3: Übertragungskennlinien (Transmissions- und Phasenkurven) eines unbeschichteten OFW-Bauelements (Murata SAF 380) an Luft und in Wasser; die oberen Grafiken geben dabei jeweils die Dämpfung, die unteren den Phasendurchgang in Abhängigkeit von der Frequenz an.

3.3.2 Netzwerkanalysator zur Messung der Übertragungskennlinien

Die akustoelektrischen Eigenschaften der Sensoren und damit ihre Übertragungskennlinien (Phasen- und Transmissionskurve) ändern sich bei Veränderungen des umgebenden Mediums (siehe Abbildung 3-3), sowie bei Beschichtung bzw. Modifikation der Sensoroberfläche. Beispielsweise beeinflussen Schichtdicke, Homogenität und Härte der aufgetragenen Schicht das Transmissions- und Phasenspektrum des Bauelements. Zur Beobachtung der Veränderungen der Übertragungskennlinien kam ein Netzwerkanalysator zum Einsatz [foe90].

In einigen Anwendungsfällen mußte nicht das komplette Spektrum aufgenommen werden, es genügte die Messung der Dämpfung der Bauelemente an einem definierten Punkt der Transmissionskurve. Dazu wurde die Dämpfung mit Hilfe des Netzwerkanalysators bei einer Phasenlage von -10° bestimmt. Diese Phasenlage leitet sich aus der Tatsache her, daß die Oszillatorelektronik auf eine konstante Phase von 0° eingestellt ist und durch das OFW-Bauelement im Oszillatorschaltkreis um -10° verschoben wird. Damit ist im Oszillatorschaltkreis die Resonanzfrequenz immer durch eine Phasenlage von -10° festgelegt. Wichtig ist eine solche Bestimmung der Dämpfung bei -10° , da der HF-Verstärker im Oszillatorschaltkreis Dämpfungen von maximal 18 dB ausgleichen kann.

Ebenso ist die Betrachtung der Steigung der Phasenkurve an dem so festgelegten Oszillationspunkt des OFW-Bauteils im Oszillatorschaltkreis wichtig, da aufgrund des Phasenrauschens das Rauschen der Sensorsignale mit größerer Phasensteilheit abnimmt.

3.3.3 Hochfrequenz-Oszillatorelektronik

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten, die Massezunahme bei Beschichtung und Beprobung mit Analyt zu beobachten: Zum einen kann, wie schon in Kapitel 3.3.2 beschrieben, die Resonanzverstimmung des Oszillatorkreises unter Beibehaltung der ursprünglichen Phasenlage detektiert werden. Zum anderen kann bei fester Frequenz die Phase des Sensors gemessen werden, wobei dann die Änderung der Phasenlage ein Maß für die Änderung der OFW-Schallgeschwindigkeit ist.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die erstgenannte Meßmethode eingesetzt. Bei den dabei verwendeten Hochfrequenz (HF)-Oszillatorelektroniken waren je zwei Anschlüsse für OFW-Bauteile in entsprechenden Aluminiumadaptern vorgesehen. Der so entstandene HF-Schwingkreis bestand aus einem OFW-Bauteil als passivem und einem HF-Verstärker als aktivem Bauelement. Der HF-Verstärker arbeitete mit einer Betriebsspannung von 6 V bei einer Stromaufnahme von 200 mA und konnte eine Einfügedämpfung des OFW-Bauelements von maximal 18 dB ausgleichen. Die Phasenlage der Elektronik war auf 0° eingestellt, die durch das Bauelement auf -10° verschoben wurde. Die Elektronik besaß drei feste SMA-Ausgänge: jeweils zwei HF-Kanäle um die Oszillatorfrequenz zu detektieren und einen dritten Ausgang, mit dem die Ausgabe der Differenzfrequenz zweier Sensoren durch Mischen und Filtern möglich war. Die Oszillatorfrequenz wurde über einen internen Meßverstärker aus der Meßelektronik herausgeführt.

3.3.4 Belichtungsapparatur

Die zur Photoimmobilisation notwendige UV-Belichtung (siehe Kapitel 6.2.3) wurde in einer Stratalinker-Belichtungsapparatur vorgenommen. Diese war mit fünf UV-Röhren (je 15 W) ausgerüstet, die ein Emissionsband von 300 bis 420 nm aufwiesen, mit einer Hauptemission bei 365 nm. Die Proben wurden in einer Entfernung von 4 cm von den UV-Röhren mit einer Bestrahlungsstärke von $0,7 \text{ mW cm}^{-2}$ belichtet.

3.4 VERFAHREN ZUR BESCHICHTUNG DER OBERFLÄCHE MIT POLYMEREN BZW. MIT SiO_2

3.4.1 Reinigung der Oberfläche vor der Beschichtung

Vor der Beschichtung mit Polymeren oder SiO_2 wurden die Oberflächen einer Reinigungsprozedur unterzogen. Dabei kamen verschiedene Verfahren zum Einsatz.

Die Glasplättchen wurden einzeln in Reagenzgläser überführt und je dreimal mit 5 ml Hexan und anschließend mit 5 ml Aceton im Ultraschallbad (je 10 min) gewaschen. Anschließend wurde 30 min bei 30 mbar (RT) getrocknet.

Unmittelbar vor der Beschichtung mit Polyimid bzw. Polystyrol wurden die OFW-Bauteile mit Aceton gewaschen. Dazu wurde das komplette Bauteil mit 50 μl Aceton bedeckt und anschließend das Lösungsmittel abgeschleudert (2000 U/min; 10 s). Ein Trocknungsschritt entfiel, da direkt nach der Reinigung das Polymer mittels Spin-Coating-Prozeß aufgebracht wurde.

Vor der Beschichtung der OFW-Bauteile mit SiO_2 wurden die Bauelemente nacheinander mit je 50 μl H_2O bidest., Aceton und Methanol bedeckt (Inkubationszeit: jeweils 15 s) und das jeweilige Lösungsmittel bei 2000 U/min (20 s) abgeschleudert. Anschließend wurden die Bauteile 10 min bei 30 mbar (RT) getrocknet.

3.4.2 Beschichtung mit Polyimid

Das Verfahren zum Beschichten der OFW-Bauelemente mit Polyimid wurde in einer vorangegangenen Arbeit entwickelt [wes96]. Eine analoge Methode wurde auch für die Beschichtung von Glasplättchen angewandt. Die Beschichtung erfolgte durch einen Spin-Coating-Prozeß, die Polymerisation wurde in einem Muffelofen durchgeführt.

- 5 μl Aminopropyl-triethoxysilan wurden mit 9,5 ml Methanol und 500 μl bidestilliertem Wasser gemischt und 15 Minuten gerührt. Die angesetzte Lösung wurde 12 h bei Raumtemperatur stehen gelassen.
- 50 μl der Silanlösung wurden auf die Oberfläche aufgebracht und nach einer Inkubationszeit von 30 s abgeschleudert (3000 U/min; 30 s).

- Das Polyaddukt wurde in einer Konzentration von 650 µg/ml in N-Methylpyrrolidon gelöst. 50 µl der Polymermischung wurden auf den Sensor pipettiert und nach einer Inkubationszeit von 70 s abgeschleudert (5000 U/min; 30 s).
- Beim anschließenden Tempern mußten alle Pins der Bauelemente geerdet werden, um elektrischen Entladungen, die bei pyroelektrischen Substraten wie LiTaO₃ auftreten können [pop92], vorzubeugen. Zunächst wurde das mit dem Polyaddukt beschichtete Bauteil für 30 min bei 200°C belassen, wobei sich die Polyimidstruktur ausbildet. Danach wurde es für weitere 30 min bei 350°C behandelt, um das bei der Reaktion entstandene Wasser aus der Polymermatrix abzdampfen, sowie die eventuell im Polymer eingeschlossenen Lösungsmittelmoleküle zu entfernen. Anschließend wurde der beschichtete Sensor langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

3.4.3 Beschichtung mit Parylen

Die Beschichtung der OFW-Bauteile und Glasplättchen mit Parylen erfolgte in einer Vakuumbeschichtungsanlage¹ (siehe Kapitel 5.1.2.1). Die Glasplättchen wurden beidseitig mit jeweils 0,8 µm Parylen-C beschichtet; auf die OFW-Bauelemente wurden die in den entsprechenden Kapiteln angegebenen Schichtdicken aufgebracht (mindestens 10 Bauteile je Schichtdicke).

Die Bestimmung der Parylen-Schichtdicke erfolgte mit Hilfe eines Profilometers². Eine Beispielmessung für die Schichtdickenbestimmung ist in Anhang A.7.2 gegeben.

3.4.4 Beschichtung mit Polystyrol

Zur Beschichtung der OFW-Bauelemente und Glasplättchen mit Polystyrol wurde die Spin-Coating-Technik angewendet.

Dazu wurden 50 µl einer Lösung von 50 mg/ml Polystyrol in Xylol auf das Bauteil aufgebracht und nach einer Inkubationszeit von 10 s abgeschleudert (4000 U/min; 30 s). Die so beschichteten Bauteile wurden über Nacht bei 30 mbar (RT) getrocknet.

3.4.5 Beschichtung mit SiO₂

Gesputtertes SiO₂ wurde in unterschiedlichen Schichtdicken (mindestens fünf Bauteile je Schichtdicke) auf das OFW-Bauelement aufgebracht³.

Die SiO₂-Beschichtung wurde mit 3"-Planar-Magnetronkathoden in einer UHV-Sputteranlage (Kathoden-Zerstäubung) durchgeführt [bru96]. Als Target wurde ein SiO₂-Standard-Planartarget mit 75 mm Durchmesser und 2-6 mm Dicke eingesetzt. Die entsprechenden Parameter beim Hochfrequenz-Magnetronspintern sind in Tabelle 3-1 aufgelistet. Die Überwachung der Schichtdicke erfolgte über einen Schwingquarz [lu72].

¹ Die Parylenbeschichtung wurde von der Firma Comelec, La Chaux-de-Fonds, Schweiz aufgebracht.

² Die Bestimmung der Schichtdicke wurde im Centre Suisse d'Electronique et de Microtechnique SA (CSEM), Neuchâtel, Schweiz von J. Gobet durchgeführt.

³ Der Sputterprozeß wurde im Forschungszentrum Karlsruhe, Institut für Instrumentelle Analytik in der Arbeitsgruppe Dr. M. Bruns von H. Lutz, U. Geckle und S. Dosenbach durchgeführt.

3.4 VERFAHREN ZUR BESCHICHTUNG DER OBERFLÄCHE MIT POLYMEREN BZW. MIT SiO₂

Basisdruck	3,5...5,0 x 10 ⁻⁶ mbar
Sputtergas	Ar/O ₂ (80/20 Vol.-%)
Sputtergasdruck	6,4...8,4 x 10 ⁻⁴ mbar
DC-BIAS Spannung	242...294 V
RF-Leistung	150 W
XCT-Rate, vorher	0,8...2,24 nm/min
XCT-Rate, nachher	1,05...2,46 nm/min
Target-Proben-Abstand	106 mm

Tab. 3-1: Parameter des Hochfrequenz-Magnetronsputters von SiO₂

3.5 PHOTOIMMOBILISATION

3.5.1 Photoimmobilisation von T-BSA auf schutzbeschichteten Oberflächen

3.5.1.1 Immobilisation auf Glasplättchen

Die Bestimmung der Bindungseffizienz von T-BSA erfolgte auf polyimid-, parylen- bzw. polystyrolbeschichteten Glasplättchen (5 mm x 5 mm). Diese wurden mit 20 µl einer Lösung von 25 bzw. 50 µg/ml [¹⁴C]-T-BSA in 0,05 mM PBS beschichtet und 2 h bei 20 mbar (RT) getrocknet. Nach einer Belichtungszeit von 30 min wurden die Plättchen dreimal mit PBS/Tween und dreimal mit H₂O bidest. gewaschen (je 200 µl; Inkubationszeit 5 min; RT), um überschüssiges, nicht-gebundenes T-BSA zu entfernen. Anschließend wurden die Plättchen einzeln in Szintillationsröhrchen mit 5 ml Szintillationslösung überführt und die verbleibende Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung bestimmt. Zu Kontrollzwecken wurden weitere Glasplättchen identisch behandelt, jedoch nicht belichtet.

3.5.1.2 Immobilisation auf dem OFW-Bauteil

Zur Immobilisation von T-BSA auf einem schutzbeschichteten OFW-Bauelement wurden 10 µl einer T-BSA-Lösung mit einer Massenkonzentration von 75 µg/ml (in 20 mM Phosphatpuffer) aufgebracht, 30 min inkubiert, zur Entfernung des Wassers 30 min im Vakuum (bei 10⁻² mbar, RT) getrocknet und schließlich 30 min belichtet.

3.5.2 Photoimmobilisation von Dextran mittels T-BSA

Die Photoimmobilisation von Dextranen wurde im allgemeinen wie nachfolgend beschrieben durchgeführt. Ein allgemeines Schema ist in Abbildung 6-4 gegeben. Änderungen und Modifikationen des experimentellen Ablaufs sind bei den jeweiligen Abschnitten in Kapitel 6.2.3 bzw. bei den entsprechenden Bildunterschriften angegeben.

Mit der beschriebenen Beschichtungstechnik können nicht-funktionalisierte Dextrane ebenso wie biotinylierte, carboxymethylierte, etc. Dextrane immobilisiert werden [bar98c].

Als schutzbeschichtete Oberflächen wurden beidseitig mit 0,8 µm Parylen beschichtete Glasplättchen (5 mm x 5 mm) bzw. mit Polyimid oder Parylen beschichtete OFW-Bauteile verwendet.

Die Immobilisation des Dextrans mit T-BSA erfolgte über Layer-Coating bzw. CoCoating. In beiden Fällen wurden T-BSA und Dextran in geeigneten Konzentrationen (i.a. ca. 100 µg/ml T-BSA und 50 µg/ml Dextran) in 0,5 mM PBS (pH 7,2) gelöst. Die Glasplättchen wurden mit jeweils 20 µl, die OFW-Bauteile mit 6 µl Lösung beschichtet.

Mindestens drei Träger wurden gleichbehandelt und daraus der Mittelwert ermittelt. Identisch behandelte aber unbelichtete Proben dienten zur Kontrolle.

3.5.2.1 CoCoating

Auf die schutzbeschichtete Oberfläche wurde eine Mischung aus T-BSA- und Dextranlösung im angegebenen Verhältnis (siehe Kapitel 6.2.3) aufgebracht.

Nach der Trocknung unter reduziertem Druck (i.a. 10^{-3} mbar, 2 h, RT) wurden die beschichteten Träger 45 min belichtet.

Um nicht-gebundenes Dextran und T-BSA zu entfernen, wurde mit jeweils 250 µl 3 M KSCN (fünfmal), PBS/Tween (dreimal) und H₂O bidest. (dreimal) gewaschen. Dabei wurde jeweils 5 min bei Raumtemperatur in der entsprechenden Waschlösung inkubiert; ausgenommen der zweite Waschvorgang mit PBS/Tween, bei dem über Nacht auf dem Schüttler inkubiert wurde (siehe Kapitel 6.2.3.3.2).

3.5.2.2 Layer-Coating

Beim Layer-Coating wurde auf die schutzbeschichtete Oberfläche zunächst die T-BSA-Lösung und nach dem Trocknen bei 30 mbar (30 min, RT) die Dextranlösung aufgebracht. Das anschließende Trocknen, Belichten und Waschen erfolgte wie beim CoCoating-Prozeß angegeben.

3.6 IMMOBILISATION VON PROTEINEN AN CARBOXYMETHYLIERTEM DEXTRAN

Nachfolgend wird eine allgemeine Vorgehensweise zur Durchführung der Immobilisation von Proteinen an carboxymethyliertem Dextran mittels Aminkopplung (NHS-Ester-Aktivierung) aufgezeigt; genaue Versuchsparameter finden sich bei den jeweiligen Beschreibungen der Experimente und den entsprechenden Bildunterschriften.

Alle Schritte wurden i.a. bei Raumtemperatur ausgeführt.

Der mit carboxymethyliertem Dextran beschichtete OFW-Sensor wurde zunächst mindestens 10 min bzw. bis zur Konstanz des Sensorsignals mit Puffer gespült. Als Basispuffer wurde je nach Experiment beispielsweise 20 mM PBS (mit 140 mM NaCl; pH 7,2) oder 10 mM HEPES (mit 140 mM NaCl; pH 7,4) verwendet.

Nach der Einstellung des Gleichgewichtes und der Aufnahme einer stabilen Basislinie erfolgte die 1-Schritt-Aktivierung mit einer frisch hergestellten Mischung aus gleichen Teilen von 100 mM NHS und 400 mM EDC in Wasser für 7 bis 10 min.

Anschließend wurde kurz mit Basispuffer gespült, um die EDC/NHS-Lösung aus der Sensorkammer zu entfernen und dann zum Immobilisationspuffer (z.B. 10 mM Actetatpuffer, pH 5,0) gewechselt. Die kovalente Anbindung des Liganden, der in Immobilisationspuffer vorlag, war i.a. nach ca. 10 bis 30 min beendet. Überschüssiger, nicht-gebundener Ligand wurde im Anschluß an die Immobilisation durch Spülen mit Basispuffer ausgewaschen.

Die Deaktivierung überschüssiger NHS-Ester erfolgte durch 1 M Ethanolamin (mit NaOH auf pH 8,5 eingestellt), das für 7 bis 10 min über den Sensor geleitet wurde, wobei aufgrund der hohen Ionenkonzentration der Lösung auch unspezifisch gebundener Ligand gelöst wurde. Noch vorhandene nicht-kovalent gebundene Substanzen (Ligand, Verunreinigungen, etc.) konnten mit Hilfe einer nachfolgenden kurzen Beprobung mit Lösungen hohen oder niedrigen pH-Wertes (je nach Stabilität des Liganden) entfernt werden.

Je nach Verwendung des so präparierten Biosensors schloß sich an die Immobilisationsprozedur noch eine Behandlung mit einer Lösung von BSA in Basispuffer (i.a. 1 bis 4 mg/ml) an, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken.

3.7 MEßMETHODEN

3.7.1 Flüssigszintillationszählung

Zur Quantifizierung von radioaktiv markiertem T-BSA bzw. Dextran wurden die beschichteten und gewaschenen Träger einzeln in Szintillationsröhrchen mit 5 ml Szintillationslösung überführt und die verbleibende Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung bestimmt [hor74].

Mit T-BSA und biotinyliertem Dextran beschichtete Träger wurden mit je 20 µl einer 0,1 µM Lösung einer Mischung von [³⁵S]-Streptavidin und [³²S]-Streptavidin (Verhältnis ca. 1:20) in 0,5 mM PBS versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei Raumtemperatur

wurde mit jeweils 250 μl PBS/Tween (fünfmal) und H_2O bidest. (dreimal) gewaschen (Inkubationszeit 2 min, RT), um überschüssiges [^{32}S]-Streptavidin zu entfernen. Die Träger wurden einzeln in Szintillationsröhrchen mit 5 ml Szintillationslösung überführt und die über Biotin-Streptavidin-Bindungen angebundene Menge an [^{35}S]-Streptavidin durch Flüssigszintillationszählung bestimmt.

Jede Messung beinhaltete eine Doppelbestimmung der Radioaktivität der verwendeten Streptavidinlösung sowie eine Doppelbestimmung des Blindwertes.

3.7.2 Messungen mit dem OFW-Bauelement

Während der Experimente wurden alle verwendeten Puffer-, Reagenzien- und Proteinlösungen bei Raumtemperatur gehalten. Die Messungen mit OFW-Bauteilen erfolgte unter kontinuierlichem Flüssigkeitsstrom über den Sensor (i.a. 100 bis 500 $\mu\text{l}/\text{min}$).

Die OFW-Bauteile wurden (i.a. nach dem jeweiligen Beschichtungs- und Waschprozeß) in den Oszillatorschaltkreis und die MAFLA-Beprobungsapparatur (siehe Kapitel 4) eingebaut und mit Trägerpuffer bis zur Konstanz der Resonanzfrequenz (± 100 Hz) gespült. Anschließend wurden die Analyt- bzw. Reagenzlösungen in den Trägerstrom injiziert und die Änderung der Resonanzfrequenz beobachtet. Im Anschluß an die Beprobung wurde i.a. mit Trägerpuffer gespült.

3.7.2.1 BSA-Adsorption

Die OFW-Bauelemente wurden mit 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) gespült und mit Lösungen von BSA in 20 mM Phosphatpuffer beprobt.

Zur Quantifizierung der Adsorption wurde [^{14}C]-markiertes und nicht-markiertes BSA im Verhältnis 1:50 gemischt und in 20 mM Phosphatpuffer gelöst. Die BSA-Abscheidung verlief analog zur Abscheidung des nicht-radioaktiv markierten BSA's in der Durchflußzelle. Nach einer Inkubationsdauer von 2 Stunden (RT), während der die BSA-Lösung im Kreis über den Sensor gepumpt und die Änderung der Resonanzfrequenz beobachtet wurde, wurde 5 min mit Phosphatpuffer gespült, um nicht-adsorbiertes BSA von der Oberfläche abzuwaschen und aus der Zelle auszuspülen. Anschließend wurde der Sensor mittels Flüssigszintillationszählung gemessen und somit die adsorbierte Menge an BSA ermittelt.

3.7.2.2 Reaktion von Streptavidin mit biotinyliertem Dextran

Die mit T-BSA und biotinyliertem Dextran beschichteten OFW-Bauteile wurden mit 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) bis zur Konstanz der Resonanzfrequenz gespült (Durchfluß: 500 $\mu\text{l}/\text{min}$) und mit 500 μl von Streptavidinlösungen unterschiedlicher Konzentration in 20 mM Phosphatpuffer beprobt.

3.7.2.3 Immunoreaktionen

Die beschichteten OFW-Bauteile wurden mit Trägerpuffer (i.a. 20 mM Phosphatpuffer bzw. 20 mM PBS, pH 7,2) gespült. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden mit einer Lösung von 1 mg/ml BSA im Trägerpuffer geblockt. Nach erneutem Spülen mit Trägerpuffer wurde mit der jeweiligen Lösung des Immunoreagenzes im Trägerpuffer beprobt.

3.8 BESTIMMUNG VON EMPFINDLICHKEIT UND NACHWEISGRENZE

Die Nachweisgrenze stellt die kleinste, mit dem betreffenden Sensor im entsprechenden Meßsystem noch detektierbare Masse dar. Sie wird definiert als die Massebeladung, die nötig ist, um eine Frequenzänderung zu erhalten, die um den Faktor drei über dem Rauschen des Sensors liegt. (Es gibt allerdings auch Autoren, die die Nachweisgrenze unter Einberechnung des einfachen [hau94] bzw. zweifachen [jos95] Rauschens definieren.)

Zur Bestimmung von Empfindlichkeit und Nachweisgrenze wurden die Frequenzänderungen von Sensoren bei Beprobung mit unterschiedlichen Analytkonzentrationen gemessen und daraus die Kalibrationskurve berechnet.

Die Empfindlichkeit bzw. Sensitivität E des Analyseverfahrens wird üblicherweise durch Differenzierung der Kalibrationskurve bestimmt [sch92]. Für lineare Kalibrationskurven, wie sie bei den untersuchten Sensoren im angegebenen Konzentrationsbereich vorlagen, kann die Empfindlichkeit nach linearer Regression direkt aus der Steigung der Geraden abgelesen werden.

Die Nachweisgrenze hängt von der Empfindlichkeit und vom Rauschen (bzw. der Standardabweichung σ des Blindwerts) ab.

Das Systemrauschen σ ist durch die Standardabweichung der Rauschamplituden vom Blindwert gegeben. Es wurde i.a. durch mehrminütiges Spülen der Sensoren mit Trägerpuffer und Messung der Rauschamplituden über diesen Zeitraum bestimmt.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen des Sensors wurde folgende Gleichung nach der IUPAC-Definition verwendet [iup76]:

$$c_{\min} = \frac{w_N}{E} = \frac{w_B + b\sigma}{E} \quad (3-1)$$

c_{\min} ist die minimal detektierbare Substanzmenge.

w_N ist der kleinste Meßwert, der sich mit einer definierten Sicherheit noch bestimmen läßt. Er berechnet sich als der Wert, dessen Abstand vom Blindwert w_B dem b -fachen Rauschen entspricht.

Der Faktor b stellt ein Maß für die gewünschte Meßwertsicherheit dar.

Die Nachweisgrenze wird im allgemeinen als der Wert definiert, der um drei Standardabweichungen über dem mittleren Blindwert liegt ($b=3$).

Von der Erfassungsgrenze spricht man üblicherweise bei einer Differenz von 6σ . Im Fall einer idealen Gaußverteilung der Meßwerte der Blindmessungen führt dies zu einem Vertrauenswert von 99,8 %.

4 AUFBAU DER VERSUCHSANLAGE

Bei der Entwicklung eines Biosensorsystems für die Flüssigkeitsanalyse werden verschiedene Forderungen an die Beprobung der Sensoren gestellt. Um reproduzierbare Meßergebnisse zu erzielen, muß insbesondere bei OFW-Sensoren ein konstanter, pulsationsarmer Fluß des Puffers und Analyten, definierte Analytmengen und ein luftblasenfreies Beprobieren gewährleistet sein. Eine weitere Forderung stellt das automatisierte Beprobieren des Sensors mit mehreren Analyten bzw. Reagenzien dar, das eine hohe Reproduzierbarkeit bei möglichst geringem Analyt- und Reagenzienverbrauch bieten soll. Gleichzeitig ist es wichtig, den Aufbau möglichst flexibel zu gestalten, so daß das System an verschiedenste Meßprobleme adaptiert werden kann.

Die im Rahmen dieser Arbeit geplante und entwickelte Beprobungseinrichtung sollte den genannten Anforderungen genügen. Sie orientiert sich an den derzeit auf dem Markt am weitesten verbreiteten automatisierten Analysensystemen, die nach dem Durchflußprinzip arbeiten. Dabei wird das Prinzip der Fließinjektion aufgegriffen, das in den letzten Jahren zunehmend zur Analyse von flüssigen Proben eingesetzt wird.

4.1 FLIEßINJEKTIONSANALYSE

Die Anforderung, eine große Anzahl von Proben wirtschaftlich und zuverlässig zu analysieren, hat in den 60er Jahren zum Durchbruch automatisierter Analysenverfahren geführt. Zeit- und Kostenaufwand pro Analyse sind dabei wichtige Faktoren, die durch die Automatisierung von Routineverfahren so klein wie möglich gehalten werden können. Weiterhin sind automatisierte Verfahren durch Vermeidung von Bedienungsfehlern beim Zusatz von Reagenzien, Verdünnen, Überführen von Lösungen etc. genauer und reproduzierbarer als herkömmliche Methoden. Schließlich wird auch ein Kontakt mit gefährlichen Chemikalien, sowie eine mögliche Kontamination der Proben durch Arbeiten in geschlossenen Systemen vermieden. Ein solches automatisiertes Verfahren für naßchemische und biochemische Reaktionen, sowie als Dosiereinheit für Flüssigkeiten und Gase stellt die Fließinjektionsanalyse (FIA) dar.

Der Begriff Fließinjektionsanalyse wurde 1974 an der Technischen Universität von Dänemark, Lyngby, durch Ruzicka und Hansen geprägt [ruz75, ruz78]. Seither hat das Konzept der FIA zu einer rasanten Entwicklung auf dem Gebiet der kontinuierlichen Durchflußanalyse geführt.

Das Prinzip der Fließinjektionstechnik basiert auf der reproduzierbaren Injektion eines vorgegebenen, genau definierten Volumens einer flüssigen Probe in einen kontinuierlich fließenden, unsegmentierten Trägerstrom. Dieser Trägerstrom führt die injizierte Probe mit sich und transportiert sie zum Detektor. Die Parameter der FIA können dabei so gewählt werden, daß es auf dem Weg zum Detektor zu keiner nennenswerten Vermischung oder zu erwünschten Vermischungen der Probenzone mit dem Trägerstrom kommt. Der Detektor zeichnet kontinuierlich die gewünschte physikalische Meßgröße auf, wobei es beim Durchgang der Probe durch die Detektorzelle zu einer Änderung dieser Meßgröße kommt. In der Literatur ist eine Vielzahl von Detektionsprinzipien für die FIA beschrieben, u.a. ionen-

selektive Elektroden, klassische elektrochemische Methoden (Amperometrie, Coulometrie, Voltametrie, Polarographie), AAS, ICP, Photometrie, Chemilumineszenz, Fluorimetrie und Refraktometrie.

Das einfachste FIA-System besteht aus einer Pumpe, die den Trägerstrom mit minimaler Pulsation kontinuierlich durch dünne Schläuche fördert, einer Injektionsstelle, an welcher ein definiertes Probenvolumen in den Trägerstrom eingebracht wird, sowie aus einem Durchflußdetektor. In Abbildung 4-1 ist ein derartiges FIA-System dargestellt. Dabei wird der Analyt über eine Probenschleife mittels eines 4-Wege-Ventils (siehe Anhang D.1.2) in den stetigen Pufferstrom hineingeschaltet. Die Menge des injizierten Analyten wird durch das Volumen der Probenschleife bestimmt.

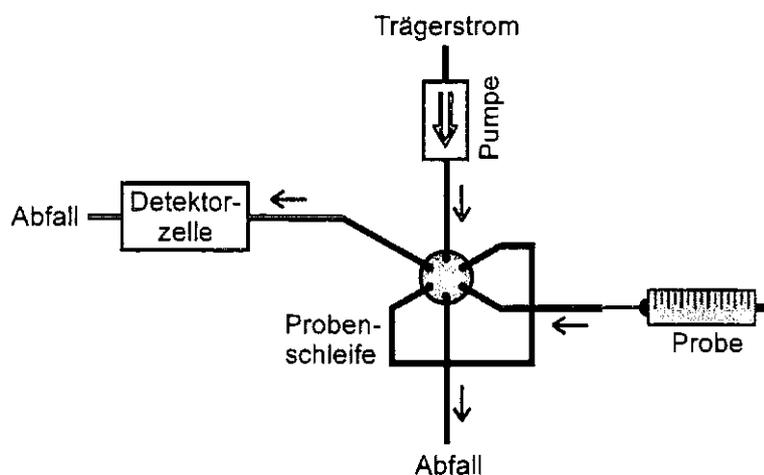


Abb. 4-1: Schematische Darstellung des Prinzips und der notwendigen Komponenten eines FIA-Systems

Viele FIA-Systeme beinhalten weiterhin eine Reaktionsstrecke, in welcher zugesetzte Reagenzien mit dem Flüssigkeitsstrom durchmischt werden. Diese Reagenzien reagieren während des Transports zum Detektor mit Komponenten des Trägerstroms; die Konzentration des entstehenden Reaktionsprodukts wird im Detektor gemessen. Aufgrund der exakten Reproduzierbarkeit der Aufenthaltszeit der Probe im System und der kontrollierten Dispersion der Probenzone werden gut reproduzierbare analytische Signale erhalten, wobei weder der physikalische Prozeß des Vermischens der Probenzone mit dem Trägerstrom, noch die gleichzeitig ablaufenden chemischen Reaktionen einen Gleichgewichtszustand erreichen. Die meisten chemischen und biochemischen Reaktionen, die kurze Reaktionszeiten haben, können auf diese Weise mit FIA automatisiert werden.

Die Charakteristiken und Vorteile eines Fließinjektionssystems lassen sich somit wie folgt zusammenfassen: Kennzeichnend sind kleine Probenvolumina (typischerweise im μl -Bereich), geringer Reagenzienverbrauch und eine hohe Analysengeschwindigkeit aufgrund kurzer Meßzeiten, die zu einem hohen Probendurchsatz führt. Die Methode ist einfach in der Handhabung und bietet flexible Anwendungsmöglichkeiten bei hoher Reproduzierbarkeit. Dadurch ist die FIA-Technik besonders interessant für Routineanwendungen.

4.2 AUFBAU DES BEPROBUNGS- UND MEßSYSTEMS MAFIA

Bei der Konstruktion einer Beprobungs- und Meßapparatur für die OFW-Biosensorik wurde auf das Prinzip der Fließinjektion zurückgegriffen, um den Beprobungsablauf zu automatisieren und die damit verbundenen Prozesse reproduzierbar zu machen. Da die verschiedenen Anwendungsfelder der Biosensorik oftmals mehrere Aktivierungs-, Blockungs- oder sonstige Beprobungsschritte unmittelbar vor der eigentlichen Messung bzw. wiederholte Beprobungen mit Analyten verschiedener Konzentrationen erfordern, wurden in der FIA-Apparatur mehrere Injektionsstellen vorgesehen, die mit Probenschleifen unterschiedlicher Volumina versehen werden können. Damit ist eine Beprobung in variabler Folge mit unterschiedlichen Analyten in einem für das jeweilige Problem festgelegten Beprobungsplan möglich. Die Apparatur trägt aus diesem Grund den Namen Multianalyt-FIA (MAFIA).

Die MAFIA-Anlage (siehe Abbildung 4-2) beinhaltet sowohl das Fluidiksystem als auch die OFW-Meßelektronik, wobei die Ansteuerung des kompletten Systems sowie die Datenaufnahme mit Hilfe einer speziell programmierten Software über die Druckerschnittstelle eines PC's erfolgt. Eine genaue Beschreibung der Komponenten der MAFIA und der dazugehörigen Software ist in Anhang D zu finden.

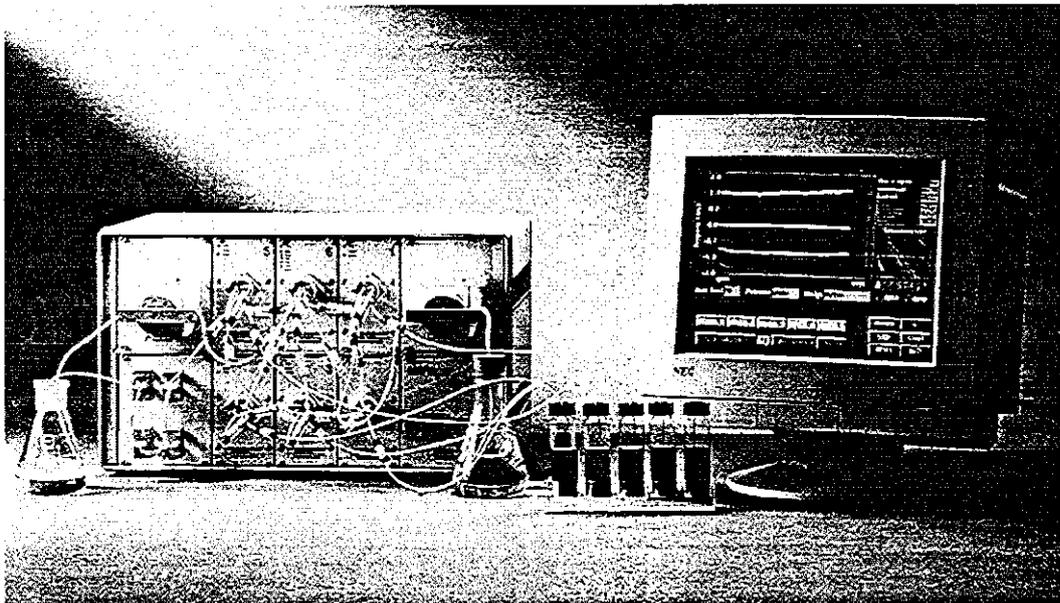


Abb. 4-2: Das Beprobungs- und Meßsystem MAFIA. Links befindet sich das 19-Zoll-Gehäuse der MAFIA mit Pumpen- und Ventilsystem (rechts oben: variable Pumpe, links oben: fixe Pumpe, Mitte: Ventile; links unten: Sensormodul mit vier Aluminium-Meßadaptern), auf dem Monitor rechts ist das Fenster der MAFIA-Software bei der Messung (kPanel) zu erkennen.

4.2.1 Fluidiksystem

Die OFW-Bauelemente werden zur Abschirmung der Hochfrequenz und damit zur Vermeidung eines Übersprechens in Meßadapter aus Aluminium eingebaut, die mit Tefloneinsätzen versehen sind. Die Abdichtung erfolgt über Rundschnurringe direkt auf den Sensorgehäusen. Die Tefloneinsätze besitzen ein Volumen von 80 μl sowie zwei Rohrstützen mit 0,5 mm Innendurchmesser. Über diese Rohrstützen werden die Sensorkammern mit den Teflonschläuchen (0,7 mm Innendurchmesser) des Fluidiksystems verbunden.

Das Fluidiksystem der MAFIA besteht aus fünf Injektionsventilen, welche die Probenschleifen mit den Analyten tragen; einem Selektionsventil, das auswählt, welche der Injektionsschleifen mit Analyt befüllt wird; einer fixen Pumpe, mit deren Hilfe die Injektionsventile befüllt werden und einer variablen Pumpe, die den kontinuierlichen Trägerstrom über alle Injektionsventile und die Sensorkammern befördert. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 4-3 gegeben.

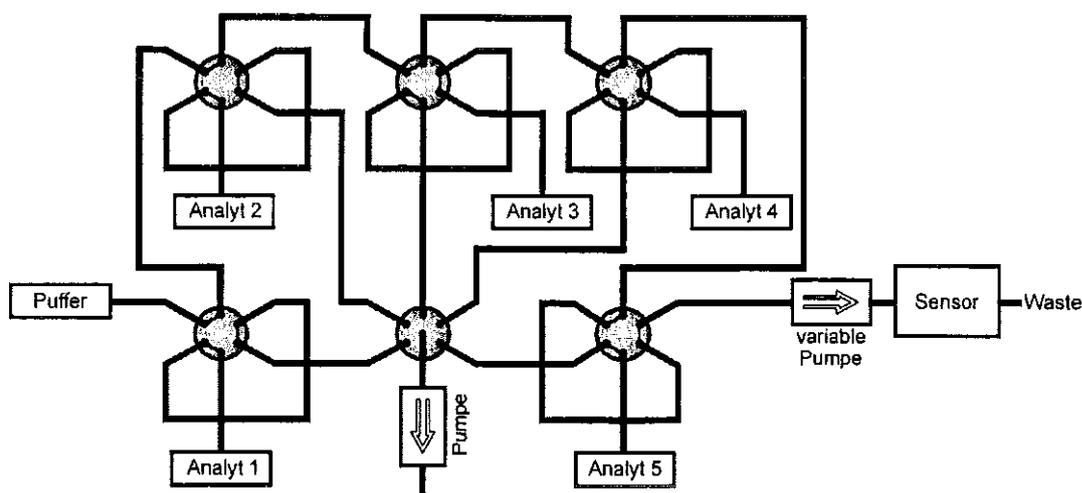


Abb. 4-3: Schematische Darstellung des Fluidiksystems der MAFIA

Die MAFIA besitzt drei Grundfunktionen, die im Betrieb sequentiell ablaufen: Das Spülen der Ventile und Sensorkammern, das Befüllen der Probenschleifen und die Injektion des Analyten (siehe Anhang D.3.3 Abbildung D-11).

- Beim Spülvorgang sind alle fünf Injektionsventile durchgeschleift; der kontinuierliche Pufferstrom durchfließt alle Zuleitungen, Ventilköpfe und Sensorkammern. Dadurch wird sichergestellt, daß keine Analytreste in der Fluidik zurückbleiben und auch keine Verschleppung von Analyten erfolgt. Während des Spülvorganges können zeitgleich die jeweiligen Probenschleifen befüllt werden.
- Beim Befüllen der Probenschleifen wird mit Hilfe der fixen Pumpe der Analyt über das Selektionsventil durch die Probenschleife aus dem entsprechenden Vorratsgefäß angesaugt. Durch diesen Ansaugweg ist immer gewährleistet, daß keine Vermischung von unterschiedlichen Analyten am Selektionsventil erfolgt. Die minimale Befüllungsdauer hängt nur von der Größe der Probenschleife ab, da die Pumpe eine konstante Förderrate besitzt.
- Bei der Beprobung schaltet das entsprechende Injektionsventil um, wodurch der Inhalt der Probenschleife in den kontinuierlichen Pufferstrom injiziert wird. Durch die Bauart

4.2 AUFBAU DES BEPROBUNGS- UND MEßSYSTEMS MAFIA

der Injektionsventile hat dieser Schaltvorgang minimales Totvolumen, geschieht ohne Luft einschlüsse und die Probenschleife wird direkt nach der Beprobung mit Puffer gespült. Eine Verschleppung von Analyten wird durch dieses Verfahren ausgeschlossen. Die Beprobungsdauer richtet sich nach der gewählten Förderrate der variablen Pumpe und dem Volumen der Probenschleife. Während des Beprobungsvorgangs kann eine andere Injektionsschleife befüllt werden.

Durch einen geeigneten Umbau des Fluidiksystems kann die MAFIA auch in kontinuierlicher Beprobungsweise betrieben werden. In diesem Fall werden die Probenschleifen geöffnet und der Analyt direkt aus dem Vorratsgefäß über den Sensor geleitet. Die Injektionsventile werden dann zum Umschalten zwischen Puffer- und Analytstrom verwendet. Dadurch ist eine Beprobung der Sensoren möglich, bei der die jeweilige Reaktion ihren Gleichgewichtszustand erreicht.

4.2.2 Frequenzmeßanlage

Die Sensorelektronik besteht aus zwei Hochfrequenz-Oszillatorelektroniken mit je zwei Anschlüssen für die Sensorkammern und je zwei HF-Ausgängen sowie einem Ausgang für die Differenzfrequenz beider OFW-Bauteile (siehe Kapitel 3.3.3). Damit existieren zwei Möglichkeiten zur Messung der Frequenzen der Oszillatorschaltkreise und der OFW-Sensorsignale: Die Hochfrequenzen der einzelnen Oszillatorschwingkreise werden entweder separat gemessen (direkte Methode), oder die Frequenzen jeweils beider Schwingkreise einer Elektronik werden gemischt, so daß eine niederfrequente Differenzfrequenz erzeugt und gemessen wird (Differenzmethode). Es können somit, je nach Meßmethode, bis zu vier OFW-Bauelemente gleichzeitig untersucht werden.

Bei der direkten Meßmethode werden die Hochfrequenzen der Oszillatorschwingkreise und damit die HF-Signale der einzelnen Sensoren über HF-Koaxialkabel zu einem HF-Scanner und weiter zu einem HF-Zähler geleitet. Die Frequenzbestimmung erfolgt durch den HF-Zähler. Durch den HF-Scanner, der die vier Frequenzkanäle auf den Eingang des HF-Zählers umschaltet, werden die einzelnen Sensorsignale nacheinander gemessen. Die Abtastgeschwindigkeit liegt dabei im Millisekundenbereich, so daß eine parallele Auswertung der Signale möglich ist. HF-Zähler und HF-Scanner werden über eine GPIB-Schnittstelle durch den Meßrechner initialisiert und gesteuert. Die gemessenen Hochfrequenzen werden ebenfalls über die GPIB-Schnittstelle dem Meßrechner übergeben.

Bei der Differenzmethode werden die HF-Signale zweier Bauelemente (i.a. ein Meßsensor und ein Referenzsensor) über einen in der Oszillatorelektronik befindlichen HF-Mischer gekoppelt und die Differenzfrequenz ausgewertet, die üblicherweise im Bereich zwischen 0 und 2 MHz liegt. Dadurch kann bei der Anwendung der Differenzmethode auf die aufwendige und teure HF-Meßtechnik verzichtet werden. Die Verwendung eines Referenzsensors stellt außerdem eine weitgehende Kompensation von Temperatur- und Strömungsschwankungen sicher.

Die Datenerfassung erfolgt in beiden Fällen über ein speziell für das MAFIA-System geschriebenes Meßprogramm (siehe Anhang D.3). Die Daten werden sowohl auf dem Bildschirm ausgegeben als auch gleichzeitig in einer Datei im ASCII-Format abgespeichert. Die so erzeugte Datei kann anschließend mit handelsüblichen Auswerteprogrammen bearbeitet werden.

4.3 CHARAKTERISIERUNG DER MAFIA

Ein wichtiger Parameter bei der Charakterisierung des Beprobungssystems ist die Dispersion der Probenzone auf ihrem Weg zum Detektor. Unter Dispersion eines Fließsystems versteht man die Verbreiterung der Probenzone, die als definierter Sektor in das System kommt, während des Transportes vom Injektions- zum Detektionsort. Diese Verbreiterung beruht auf einer Vermischung von Probenzone und Trägerstrom durch Konvektion und Diffusion. Der Beitrag der radialen, molekularen Diffusion im laminaren Strömungsbereich zur Dispersion ist dabei in der Regel vernachlässigbar klein. Hauptsächlich verantwortlich ist eine axiale (in Strömungsrichtung) konvektive Vermischung, die zu einer Abweichung von der idealen Pfropfenströmung führt. Sie wird hervorgerufen durch ein radiales Geschwindigkeitsprofil im laminaren Strömungsbereich, sowie im Übergangsbereich zu turbulenter Strömung und durch Geschwindigkeitsschwankungen und Wirbelbildung im turbulenten Bereich [ruz81].

Da die Auswertung eines analytischen Signals häufig über die Peakhöhe erfolgt, kann die Dispersion wie folgt über den Dispersionskoeffizienten definiert und bestimmt werden [ruz78, ruz81]:

$$D = \frac{C_0}{C_{\max}} = \frac{H_0}{H_{\max}} \quad (4-1)$$

- D = Dispersionskoeffizient
 C_0 = ursprüngliche Konzentration der unvermischten Probe
 C_{\max} = Konzentration des Teils der dispergierten Probenzone, der beim Signalmaximum den Detektor durchläuft
 H_0 = Sensorsignal, das die unvermischte Probe erzeugt
 H_{\max} = Sensorsignal, das die dispergierte Probe am Signalmaximum erzeugt

Abbildung 4-4 zeigt schematisch eine einfache Methode zur experimentellen Bestimmung des Dispersionskoeffizienten eines Fließsystems.

Zunächst wird eine Markierungssubstanz⁴ kontinuierlich durch das System gepumpt und dabei die Änderung der entsprechenden physikalischen Meßgröße in der Detektorzelle beobachtet. Nach Erreichen des Signal-Endwertes wird der Wert H_0 bestimmt.

⁴ Die Markierungssubstanz muß sich mit dem Trägerstrom gut mischen und sich strömungsmäßig analog verhalten. Weiterhin darf die Markierungssubstanz beim Durchströmen des Systems keine Veränderung erfahren, etwa durch chemische Reaktion, Adsorption an der Behälterwand oder Absetzen. Für genaue Bestimmungen muß ihre Konzentration auch bei starker Verdünnung noch exakt meßbar sein. Als Markierungssubstanz werden beispielsweise Farbstofflösungen, Salzlösung oder Säuren verwendet, deren Konzentrationsänderung über die Messung der Lichtabsorption, der elektrischen Leitfähigkeit bzw. des pH-Wertes verfolgt wird.

4.3 CHARAKTERISIERUNG DER MAFIA

Danach wird ein definiertes Volumen der Markierungssubstanz in den Transportstrom injiziert und das resultierende Signal registriert. Das Signal am Maximum entspricht dem Wert H_{max} .

Aus diesen beiden Werten läßt sich mit Hilfe von Gleichung 4-1 der Dispersionskoeffizient des Systems errechnen.

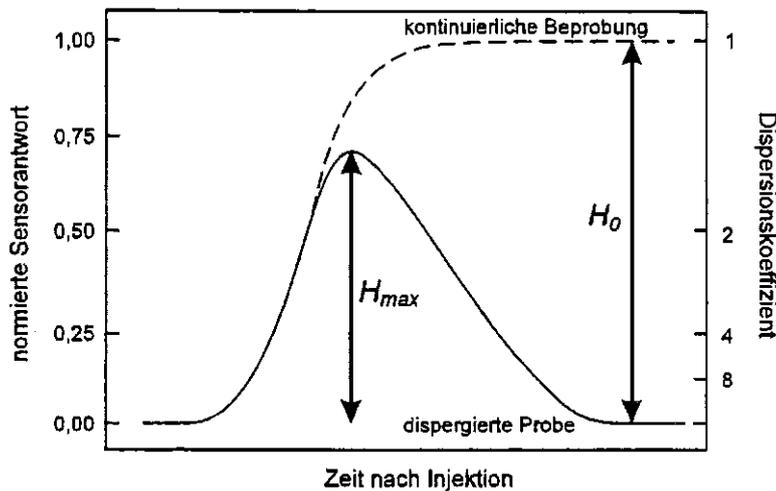


Abb. 4-4: Schematische Darstellung einer einfachen Methode zur experimentellen Bestimmung des Dispersionskoeffizienten eines Fließsystems

Die Dispersion wird beeinflusst durch Faktoren wie die Strömungsgeschwindigkeit des Trägerstroms, das injizierte Probenvolumen, die Länge der Transportstrecke, der Innendurchmesser der verwendeten Schläuche, sowie der Viskosität und Temperatur des Flüssigkeitsstroms. Betrachtet man den Dispersionskoeffizient D bei der Maximalkonzentration im Detektor, so findet man [ruz78, ruz81]:

$$D = \frac{2\pi^{3/2} R^2 \sqrt{D_f T}}{S_V} \quad (4-2)$$

- R = innerer Schlauchradius
- D_f = axialer Diffusionskoeffizient
- S_V = Probevolumen
- T = Verweilzeit der Probe zwischen Injektionsort und Detektor

$$T = \frac{L_R}{F} \quad (4-3)$$

- L_R = Transportstrecke vom Injektionsort zum Detektor
- F = Strömungsgeschwindigkeit

Durch geeignete Wahl der entsprechenden Parameter läßt sich die Dispersion der Probenzone kontrollieren und den jeweiligen Anforderungen anpassen.

Soll beispielsweise das FIA-System als reines Transportsystem der Probe zum Detektor verwendet werden, dann werden die Parameter so gewählt, daß die Dispersion weitgehend zurückgedrängt wird, es also zu keiner nennenswerten Vermischung kommt. In diesem Fall wird ein Dispersionskoeffizient von $D=1$ angestrebt.

Müssen dagegen z.B. bei photometrischen Analysen ein oder mehrere Reagenzien zuge-mischt werden, so wird üblicherweise ein Dispersionskoeffizient von 3 bis 10 gewählt, um während des Transports zum Detektor eine ausreichende Durchmischung von Probenzone und Trägerstrom und damit eine chemische Reaktion zu erzielen.

Der Dispersionskoeffizient ist somit ein Maß für die Verdünnung der Probe im FIA-System. Seine Kenntnis ist wichtig für die Planung bzw. zur Charakterisierung eines FIA-Systems.

Für das Beprobungssystem MAFIA ist ein Dispersionskoeffizient von $D=1$ erwünscht, da hier ausschließlich die entsprechenden Aktivierungs-, Blockungs- und Analytlösungen möglichst unverdünnt und unvermischt zu den einzelnen Sensoren transportiert werden sollen. Einige Einflußfaktoren wurden im Rahmen der Charakterisierung der MAFIA untersucht, indem die OFW-Bauelemente mit Pufferlösungen unterschiedlicher Leitfähigkeiten beprobt und die entsprechenden Sensorsignale registriert wurden. Diese Meßmethode hat den Vorteil, daß sie schnell und reproduzierbar abläuft und reversible Signale erzeugt. Außerdem berücksichtigt sie den Einfluß der Sensor-Meßadapter, die im Vergleich zum Schlauchsystem ein relativ großes Volumen aufweisen und damit selbst einen Beitrag zur Dispersion leisten.

4.3.1 Beprobung aus unterschiedlichen Ventilen

Die Dispersion nimmt mit zunehmender Transportstrecke zwischen Injektionsort und Detektor zu. Theoretische Betrachtungen [ruz78, ruz81] ergeben eine Zunahme der Dispersion proportional zur Quadratwurzel der Länge der durchlaufenen Strecke (siehe Gleichung 4-2).

Dieser Einfluß unterschiedlicher Weglängen auf die Dispersion in der MAFIA-Anlage wurde durch eine Beprobung des OFW-Bauteils aus den verschiedenen Injektionsventilen mit derselben PBS-Lösung untersucht. Da alle Injektionsventile in Reihe geschaltet sind, verlängert sich die Transportstrecke von Ventil 5 (5 cm) bis Ventil 1 (25 cm). In Abbildung 4-5 sind die Sensorantworten bei den Beprobungen dargestellt.

Es ist zu erkennen, daß die Steigung der ansteigenden Flanke des Signals von Ventil 1 zu Ventil 5 zunimmt. Dies ist dadurch zu erklären, daß die Probenzone bei Beprobung aus Ventil 5 einen kürzeren Transportweg zurücklegen muß und damit einer geringeren Vermischung der Randbereiche der Probenzone unterliegt, als bei Beprobung aus Ventil 1. Dieser Punkt muß bei einer kinetischen Auswertung der Daten berücksichtigt werden.

Bei Beprobung aus allen fünf Ventilen ist jedoch festzustellen, daß das gleiche Signalmaximum erreicht wird. Die Frequenzänderung am Maximum entspricht der Sensorantwort bei unverdünntem PBS. Damit liegt bei Beprobung aus jedem der Ventile ein Dispersionskoeffizient von $D=1$ vor. Die Transportwege der MAFIA sind folglich unter den angewandten Bedingungen kurz genug, um den Anforderung eines reinen Transportsystems ($D=1$) zu genügen.

4.3 CHARAKTERISIERUNG DER MAFIA

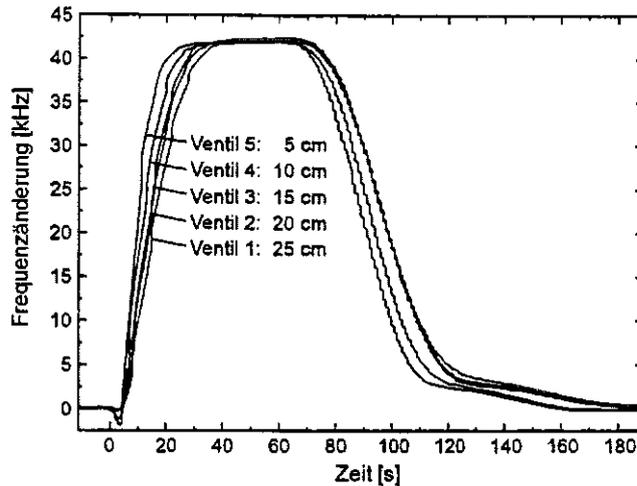


Abb. 4-5: Sensorantwort bei Beprobung aus unterschiedlichen Ventilen, d.h. bei unterschiedlichen Weglängen zwischen Injektionsort und Sensor (Parylenbeschichtetes OFW-Bauelement; Fließrate: 850 $\mu\text{l}/\text{min}$; Probenschleife-Volumen: 1 ml; Spülen: H_2O bidest.; Analyt: PBS (5,0 mS/cm))

4.3.2 Beprobung bei unterschiedlichen Strömungsgeschwindigkeiten

Nach Gleichung 4-2 nimmt die Dispersion der Probenzone mit zunehmender Strömungsgeschwindigkeit ab. Die Strömungsgeschwindigkeit in der MAFIA kann mit Hilfe der einstellbaren Pumpleistung der variablen Pumpe sowie durch Verwendung unterschiedlicher Pumpenschläuche (siehe Tabelle D-1) variiert werden. In Abbildung 4-6 sind die registrierten Sensorantworten bei Beprobung mit PBS für verschiedene gebräuchliche Strömungsgeschwindigkeiten dargestellt. Auch hier sind die Steigungen der ansteigenden Flanken unterschiedlich, da die Vermischung der Randbereiche der Probenzonen von der Strömungsgeschwindigkeit abhängig ist. Jedoch ist hier ebenfalls zu erkennen, daß für alle gebräuchlichen Strömungsgeschwindigkeiten das gleiche Signalmaximum erreicht wird, das zu einem Dispersionskoeffizienten von $D=1$ führt. Somit genügt die Konzeption der MAFIA auch in diesem Punkt den Anforderungen eines reinen Transportsystems.

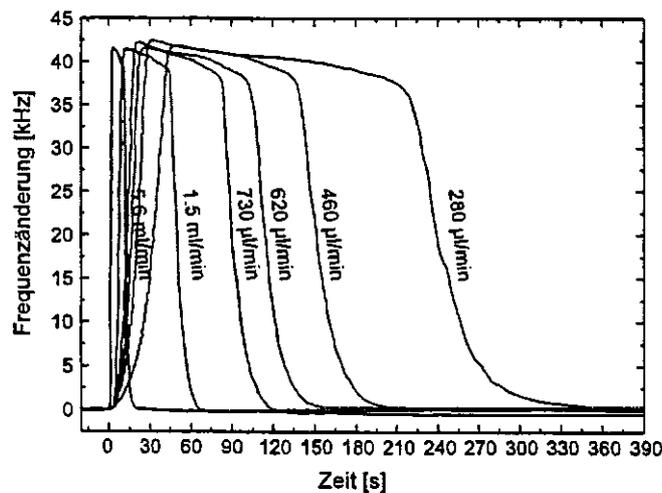


Abb. 4-6: Sensorantwort bei Beprobung mit unterschiedlichen Strömungsgeschwindigkeiten (Parylenbeschichtetes OFW-Bauelement; Probenschleife-Volumen: 1 ml; Spülen: H_2O bidest.; Analyt: PBS (5,0 mS/cm); Beprobung aus Ventil Nr. 3)

4.3.3 Beprobung mit unterschiedlichen Probevolumina

Der Dispersionskoeffizient bei der Maximalkonzentration im Detektor verhält sich nach Gleichung 4-2 umgekehrt proportional zum Probevolumen. Zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Probevolumina auf die Dispersion in der MAFIA-Anlage wurden am selben Ventil nacheinander verschieden lange Probenschleifen angebracht, mit PBS befüllt und in den Trägerstrom injiziert. Das aufgrund der Leitfähigkeitsänderung registrierte OFW-Sensorsignal ist in Abbildung 4-7 dargestellt. Es ist zu erkennen, daß die ansteigenden Flanken aller Signale in Übereinstimmung mit der Theorie [ruz81] die gleiche Steigung haben und daß alle untersuchten Probevolumina (von 100 μl bis 5 ml) das gleiche Signalmaximum erreichen. Die Frequenzänderung am Maximum entspricht der Sensorantwort bei unverdünntem PBS. Damit ist bei allen betrachteten Schleifengrößen der Dispersionskoeffizient $D=1$.

Üblicherweise werden für die FIA kleinere Probevolumina als das untersuchte Minimum von 100 μl injiziert. Gebräuchlich sind Volumina zwischen 30 und 200 μl . Allerdings ist bei Verwendung der Meßadapter ein geringeres Probevolumen nicht sinnvoll, da das Volumen der Meßzelle selbst mit 80 μl relativ groß ist. Bei Verringerung des Probevolumens käme es zu signifikanten Vermischungen und damit zur Verdünnung des Analyten innerhalb der Sensorkammer. Der Dispersionskoeffizient würde folglich ansteigen und die Anforderungen eines Transportsystems wären nicht mehr erfüllt. Jedoch ist bei einer Verkleinerung der Meßkammer (was nicht im Rahmen dieser Arbeit gefordert war) eine Beprobung mit geringeren Probevolumina durch Einbau kleinerer Probeschleifen problemlos möglich.

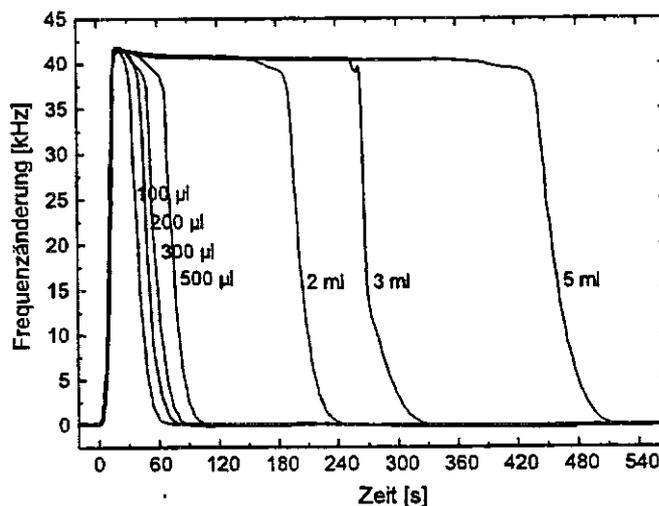


Abb. 4-7: Sensorantwort bei Beprobung mit unterschiedlichen Probevolumina (Parylenbeschichtetes OFW-Bauelement; Fließrate: 700 $\mu\text{l}/\text{min}$; Spülen: H_2O bidest.; Analyt: PBS (5,0 mS/cm); Beprobung aus Ventil Nr. 3)

4.4 BEISPIELMESSUNGEN ZU ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN DER MAFIA

Nachdem in Kapitel 4.3 gezeigt wurde, daß die MAFIA unter den gegebenen Bedingungen als reines Transportsystem mit einem Dispersionskoeffizienten von $D=1$ bei Beprobung aus allen fünf Ventilen in den entsprechenden Bereichen der Strömungsgeschwindigkeit und der Probevolumina verwendet werden kann, sollen im Folgenden die Anwendungsmöglichkeiten der MAFIA anhand von drei Beispielen dargestellt werden.

4.4.1 Beprobung von OFW-Bauteilen mit Puffern unterschiedlicher Leitfähigkeit

Mit Hilfe der MAFIA ist es möglich, Beprobungsabläufe zu automatisieren. Die fünf Injektionsventile ermöglichen eine Beprobung mit fünf unterschiedlichen Analyten innerhalb eines festgelegten Beprobungsplans. Damit können beispielsweise Kalibrationen mit Analytlösungen unterschiedlicher Konzentrationen durchgeführt werden, wie das Beispiel der Beprobung eines OFW-Bauteils mit Puffern unterschiedlicher Leitfähigkeiten in Abbildung 4-8 demonstrieren soll.

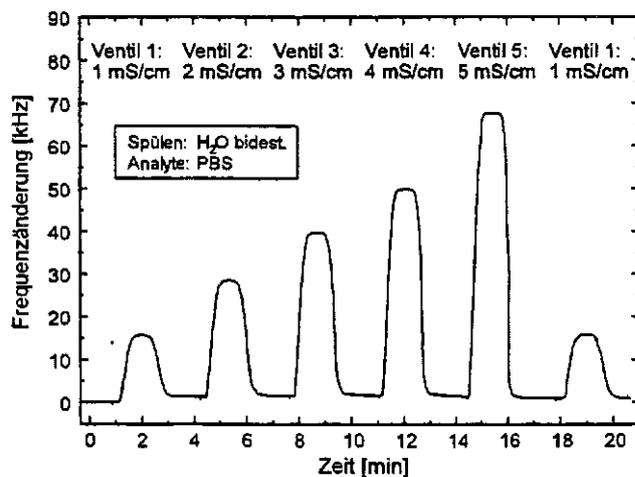


Abb. 4-8: Sensorantwort bei Beprobung mit Puffern unterschiedlicher Leitfähigkeit (Parylenbeschichtetes OFW-Bauteil; Probenschleife-Volumen: 1 ml; Spülen: H₂O bidest.; Analyte: PBS unterschiedlicher Konzentrationen)

4.4.2 Wiederholte BSA-Abscheidung auf OFW-Bauteilen

Eine wiederholte Beprobung mit dem gleichen Analyten aus der selben Probenschleife ist aufgrund des automatisierten Verfahrens mit Hilfe der MAFIA vielfach genauer und reproduzierbarer als herkömmliche Methoden. Damit sind beispielsweise bei reversiblen Reaktionen Reproduzierbarkeitsstudien möglich; bei irreversiblen Reaktionen, wie Immunreaktionen oder Adsorptionen (ohne daß entsprechende Regenerationsschritte eingeschaltet werden), kann eine wiederholte Beprobung (eventuell mit kinetischer Aus-

wertung der Anfangssteigungen der Signale) eine mehrfache Verwendung desselben Bauteils ermöglichen, sofern die Reaktionen jeweils weit vom Gleichgewichtszustand entfernt bleiben, d.h. die Konzentrationen und Probevolumina der Analytlösungen gering genug sind.

In Abbildung 4-9 ist eine wiederholte Abscheidung von BSA auf der OFW-Sensoroberfläche dargestellt. Es ist eine sukzessive Frequenzabnahme durch unspezifische Abscheidung des Proteins auf der Sensoroberfläche zu erkennen. Die Änderung der Resonanzfrequenz wird mit zunehmender Anzahl an Injektionen immer kleiner und geht schließlich gegen Null. (Der Wiederanstieg des Signals am Ende jeder einzelnen Beprobung ist auf eine langsame Desorption des Proteins von der Oberfläche durch Spülen mit Trägerpuffer zurückzuführen.) Die Beprobung führte erst nach ca. 12 bis 13 Beprobungsschritten zu einem Gleichgewichtswert mit einer Gesamtfrequenzänderung von ca. 30 kHz.

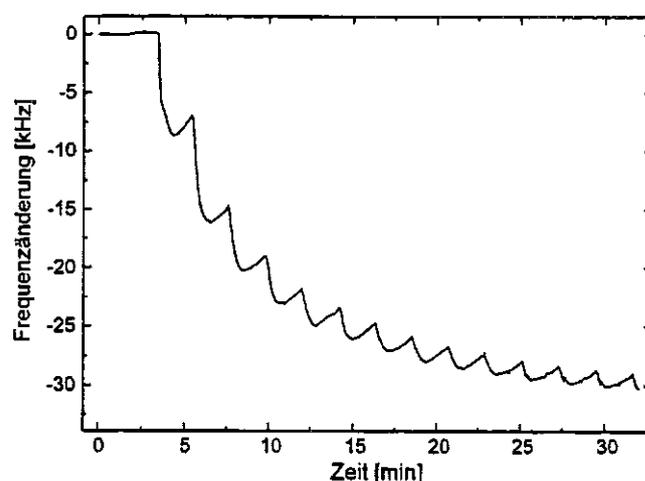


Abb. 4-9: Sensorantwort bei wiederholter BSA-Abscheidung auf OFW-Bauelementen (Parylenbeschichtetes OFW-Bauteil; Probenschleife-Volumen: 100 μ l; Spülen: 20 mM PBS (pH 7,2); Analyt: 4 mg/ml BSA in PBS)

4.4.3 Mehrstufige Präparation eines OFW-Biosensors

Die MAFIA kann schließlich auch zur Automatisierung komplexer Meßprobleme herangezogen werden, was am Beispiel der mehrstufigen Präparation eines Biosensors gezeigt werden soll. (Dies stellt einen Vorgriff auf Kapitel 6.3 dar, wo die entsprechende Methode zur Immobilisation von Proteinen an dextranbeschichteten Oberflächen mittels Carbodiimid-Chemie genauer untersucht und optimiert wurde.)

Ein solches Anwendungsfeld erfordert Aktivierungs-, Immobilisations-, Deaktivierungs- und Blockungsschritte, sowie die abschließende Beprobung mit dem Immunoreagenz. Sämtliche Schritte setzen eine Beprobung mit unterschiedlichen Reagenzlösungen und unterschiedlicher Beprobungsdauer voraus, was durch die fünf Injektionsventile mit Probenschleifen unterschiedlicher Volumina ermöglicht werden kann. In Tabelle 4-1 ist ein Beprobungsplan für das genannte Anwendungsproblem aufgeführt; die entsprechenden Sensorantworten sind in Abbildung 4-10 dargestellt.

4.4 BEISPIELMESSUNGEN ZU ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN DER MAFIA

Schritt	Ventil-Nr.	Beprobungsdauer	Schleifen-volumen	Analyt
1	—	—	—	10 mM HEPES (pH 7,5)
2	1	5 min	750 µl	50 mM NHS + 100 mM EDC
3	—	—	—	10 mM HEPES
4	2	10 min	1,5 ml	5 µg/ml GOD in 10 mM Acetatpuffer (pH 5,0)
5	—	—	—	10 mM HEPES
6	3	6 min	900 µl	1 M Ethanolamin (pH 11,8)
7	—	—	—	10 mM HEPES
8	4	8 min	1,2 ml	4 mg/ml BSA in 10 mM HEPES
9	—	—	—	10 mM HEPES
10	5	8 min	1,2 ml	60 µg/ml polyklonale anti-GOD Antikörper in 10 mM HEPES
11	—	—	—	10 mM HEPES

Tab. 4-1: Analysenprotokoll bei Immobilisierung von Protein an einem dextranbeschichteten Sensor und Immunreaktion (nicht-optimierte Bedingungen; siehe Kapitel 6)

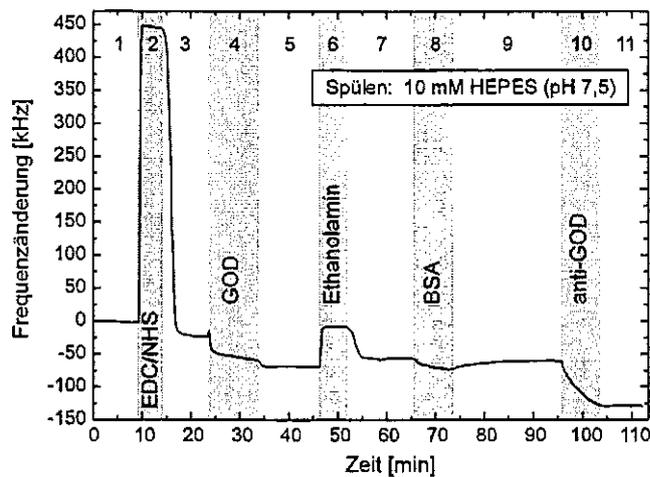


Abb. 4-10: Sensorantwort bei Immobilisierung von Proteinen an einem dextranbeschichteten OFW-Bauteil und Immunreaktion (CoCoating: 50 ng/mm² biotinyliertes Dextran; 100 ng/mm² T-BSA; Trocknung: 2 h, 30 mbar, RT; Belichtungszeit: 30 min; Meßprotokoll siehe Tabelle 4-1)

5 SCHUTZBESCHICHTUNGEN FÜR KOMMERZIELL ERHÄLTICHE OFW-BAUELEMENTE

Verschiedene Strategien zur Herstellung von Biosensoren auf der Basis von akustischen massesensitiven Sensoren wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht und detailliert in der Literatur beschrieben [kon94, tom95, har96, ric97]. Im Gegensatz zu den dort verwendeten selbstkonstruierten und an die Meßproblematik adaptierten Bauteilen mit Goldstrukturen sollen im Rahmen dieser Arbeit kommerziell erhältliche OFW-Bauelemente als massesensitive Sensoren in der Biosensorik zum Einsatz kommen (siehe auch Kapitel 3.3.1 und Kapitel 7). Die käuflichen Bauteile werden in der Telekommunikation als miniaturisierte Hochfrequenz-Filter in Massenproduktion hergestellt. Sie besitzen Strukturen und Bonddrähte aus Aluminium, da Aluminium als Elektrodenmaterial die besten akustischen Eigenschaften bezüglich der Einkopplung des elektrischen Signals in den Oszillator aufweist.

Zur Verwendung für biosensorische Zwecke muß die Oberfläche des Bauteils mit einer biosensitiven Erkennungsschicht aus Proteinen belegt werden, die dann die entsprechenden Analyt-Moleküle in der Probe nachweist. Die Reaktionen erfolgen in wäßrigen Medien, wobei die Immobilisationsprozeduren unter Umständen auch ein Arbeiten in saurer, basischer oder stark chloridhaltiger Umgebung erfordern. Diese Bedingungen machen somit einen Schutz der auf dem Bauteil vorhandenen Aluminiumstrukturen notwendig, die ansonsten den jeweiligen chemischen Bedingungen nicht standhalten. Dazu erwies sich eine Beschichtung des kompletten Bauteils mit einem polymeren Schutzüberzug als am einfachsten und am geeignetsten [wes96]. Die Schutzbeschichtung muß dabei zum einen eine ausreichende Passivierung des Aluminiums bewirken und darf zum anderen die akustischen Eigenschaften nur wenig verändern.

Bislang wurde ein per Spin-Coating-Prozeß aufgebracht und durch anschließendes Tempern ausgehärteter Polyimidfilm eingesetzt [gal91, wes98b], der bei milden Bedingungen einen ausreichenden Schutz der Aluminiumstrukturen gewährleistete. Allerdings war beim Betrieb in stark sauren bzw. alkalischen Medien sowie in chloridhaltigen Pufferlösungen (z.B. PBS) eine erhebliche Korrosion der Strukturen zu beobachten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde alternativ zu Polyimid auch Parylen als polymere Schutzbeschichtung verwendet.

Mit Polyimid und Parylen beschichtete OFW-Bauelemente werden hinsichtlich ihrer mikroskopischen und akustischen Eigenschaften, der Schutzfunktion gegenüber Säuren sowie der Reproduzierbarkeit des Beschichtungsprozesses verglichen.

Die Polymerbeschichtungen müssen allerdings neben ihrer Eigenschaft als Schutzbeschichtung auch als Immobilisationsgrundlage für weitere Modifikationen der Sensoroberfläche geeignet sein. Daher wird die Integration der beiden Schutzschichten in eine Immobilisationsprozedur am Beispiel einer photoinduzierten Immobilisation gezeigt.

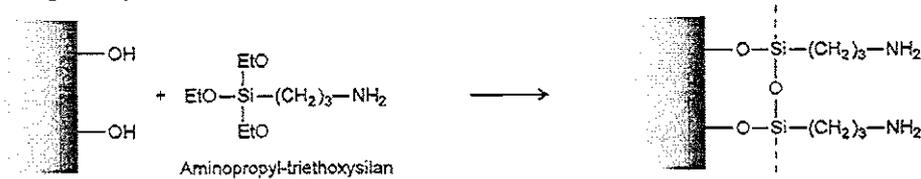
5.1 VERWENDETE POLYMERE UND BESCHICHTUNGSTECHNIK

5.1.1 Polyimid

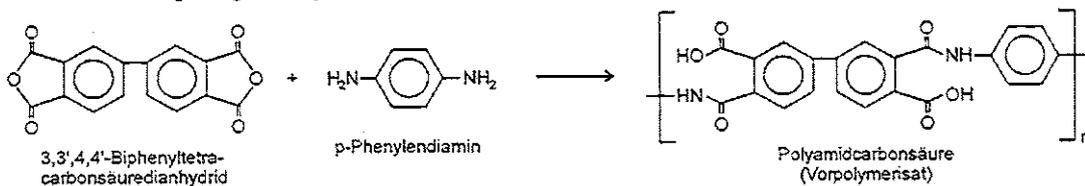
Polyimid ist aus der Halbleitertechnologie als einfach zu handhabendes Material bei der Isolierung von Mikrostrukturen bekannt [sat93]. Dabei werden dünne (bis zu ca. 50 nm), homogene Schutzschichten auf hydrophile Wafer-Oberflächen aufgebracht. Diese Filme zeichnen sich unter anderem durch hohe chemische Resistenz sowohl gegen Säuren als auch gegen Laugen aus. Darüberhinaus sind Polyimide in einer Vielzahl von Strukturvarianten kommerziell zugänglich, so daß die chemischen Eigenschaften des Polymers an die jeweilige Applikation adaptiert werden können.

Eine Schutzbeschichtung mit Polyimid erwies sich in vorangegangenen Arbeiten als geeignete Passivierung der OFW-Sensoroberfläche [wes96, wes98b]. Das dort verwendete Polyimid besteht aus den Monomeren p-Phenylendiamin und 3,3',4,4'-Biphenyltetracarbonsäuredianhydrid. Die beiden Monomere reagieren bereits bei Raumtemperatur unter Ausbildung einer Polyamidcarbonsäure zu einem langkettigen Polyaddukt als Zwischenstufe der Polyimidbildung (siehe Abbildung 5-1). Das Polyaddukt ist käuflich erhältlich und wird über einen Spin-Coating-Prozeß auf die OFW-Bauelemente aufgebracht (siehe Kapitel 3.4.2). Bei einer Reaktionstemperatur von 200°C erfolgt die Polymerisation unter Ausbildung der Polyimidstruktur, wobei unter Wasserabspaltung langkettige Polymerstränge entstehen.

Silanisierung der hydrophilen Oberfläche:



Reaktion zum langkettigen Polyaddukt:



Ausbildung eines Polyimids und kovalente Anbindung an die Oberfläche beim Tempem (200°C):

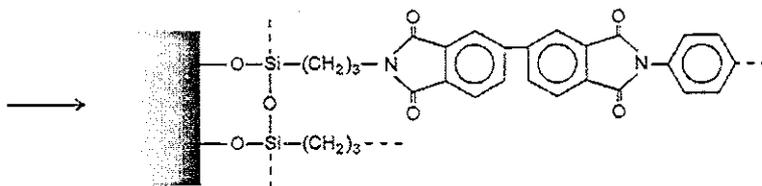


Abb. 5-1: Ausbildung eines Polyimids und kovalente Anbindung an die silanisierte Oberfläche

Um die Haftungseigenschaften des Polyimidfilms auf der Sensoroberfläche zu verbessern, wird die Oberfläche silanisiert [plu83]. Das hierfür verwendete Aminopropyl-triethoxysilan (APTES) enthält Ethoxygruppen, welche als gute Abgangsgruppen bei der Substitutionsreaktion des Silans mit den OH-Gruppen der hydrophilen Sensoroberfläche fungieren. Bei der Silanisierung kommt es zu einer Funktionalisierung der Oberfläche mit Aminogruppen und außerdem zu einer Quervernetzung über die drei Ethoxygruppen des Silans. Wird nun auf diese Silanschicht das Polyaddukt gegeben und getempert, so kommt es während der Polymerisation neben der Polyimidisierung zu einer Konkurrenzreaktion, indem die Aminogruppen der silanisierten Sensoroberfläche ebenfalls mit dem Polymer eine Imidbindung ausbilden und auf diese Weise die kovalente Anbindung des Polyimidfilms an die Trägeroberfläche gewährleisten (siehe Abbildung 5-1).

5.1.2 Parylen

Parylen ist eine Gruppenbezeichnung für thermoplastische Polymere mit über Ethylenbrücken in 1,4-Position verknüpften Phenylenresten [roe95]. Neben Poly(p-xylylen) (Parylen N) sind unter anderem noch die aus den entsprechenden p-Xylole-Derivaten zugänglichen Parylene Poly(2-chlor-p-xylylen) (Parylen C) und Poly(dichlor-p-xylylen) (Parylen D) bekannt (siehe Abbildung 5-2).

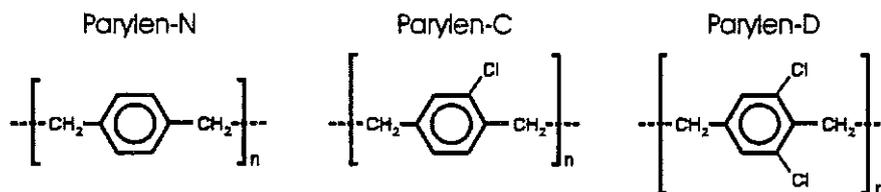


Abb. 5-2: Die drei bekanntesten und meist verwendeten Parylene

Parylenbeschichtungen werden unter Vakuum auf den Träger aufgebracht (siehe Kapitel 5.1.2.1) und bilden dünne, porenfreie Filme gleichmäßiger Schichtdicke, die aufgrund der Beschichtungstechnik die Oberfläche konturgetreu decken. Parylenfilme können auf verschiedensten Oberflächen wie Metall, Glas, Papier, Kunststoff, Keramik und Silikon aufgebracht werden. Parylene sind unterhalb ihrer Schmelzpunkte lösungsmittelbeständig und stellen ausgezeichnete Barrierekunststoffe dar, die eine hochwirksame Sperre gegen Feuchtigkeit, sowie aggressive Chemikalien bilden und damit einen parylenbeschichteten Träger vor Korrosion schützen. Aufgrund der hervorragenden mechanischen, elektrischen, thermischen und Barriereigenschaften [gor89, wil92] sind parylenbeschichtete Materialien aus vielen unterschiedlichen Anwendungsgebieten bekannt. Beispielsweise werden sie in der Elektronik als Zwischenschichten für Isolatoren, zur Passivierung von Halbleitern und kraterfreien Beschichtung von gedruckten Leiterplatten verwendet. Zum Einsatz kommen sie aber auch in der Optik, Mikromechanik, Automobilindustrie, in der Luft- und Raumfahrt und aufgrund ihrer nachgewiesenen Biokompatibilität sogar in der Medizin.

Da sich Parylenfilme dünn und in gleichmäßiger Schichtdicke konturgetreu aufbringen lassen, sollten sie sich auch als Schutzbeschichtung von OFW-Bauteilen eignen, wie im Folgenden dargestellt wird.

5.1.2.1 Beschichtungsprozess

Die Parylenbeschichtung wird, wie in Abbildung 5-3 dargestellt, in speziellen Vakuumbeschichtungsanlagen aufgebracht. Diese bestehen üblicherweise aus drei miteinander verbundenen Kammern, in denen unterschiedlichen Temperaturen und Drücke herrschen [gor89, wil92].

In der ersten Kammer wird das eingewogene Ausgangsmaterial Di-p-Xylylen bei 150°C und ca. 1 mbar verdampft. Der Dampf gelangt dann in die Pyrolysezone, wo er bei ca. 0,5 mbar auf 680°C erhitzt wird und dabei zum reaktiven Monomer p-Xylylen aufgespalten wird. In der Abscheidungskammer treffen die Monomere bei Raumtemperatur und ca. 0,1 mbar auf den rotierenden Trägerwerkstoff. Es kommt zur Kondensation des reaktiven Monomers auf der "kalten" Oberfläche und dadurch gleichzeitig spontan zur Polymerisation zu einem klaren, porenfreien Film.

Bei dem so entstandenen Polymer handelt es sich um eine polykristalline organische Verbindung mit unverzweigter Kettenstruktur und einem Molekulargewicht größer als 20000. Es enthält weder Lösungsmittelrückstände noch Additive. Die Dicke des Polymerfilms wird hauptsächlich durch das Verhältnis der Masse des eingewogenen Dimers zur beschichteten Oberfläche bestimmt. Dabei können in einem Arbeitsgang Schichtdicken zwischen 100 nm und 50 µm erzeugt werden. Da die Polymerisation bei Raumtemperatur erfolgt, entstehen Filme, die weder mechanische noch thermische Spannungen aufweisen. Die Beschichtung ist konturgetreu, so daß auch scharfe Kanten, Spalten und Poren mit einer gleichmäßigen Schicht überzogen werden.

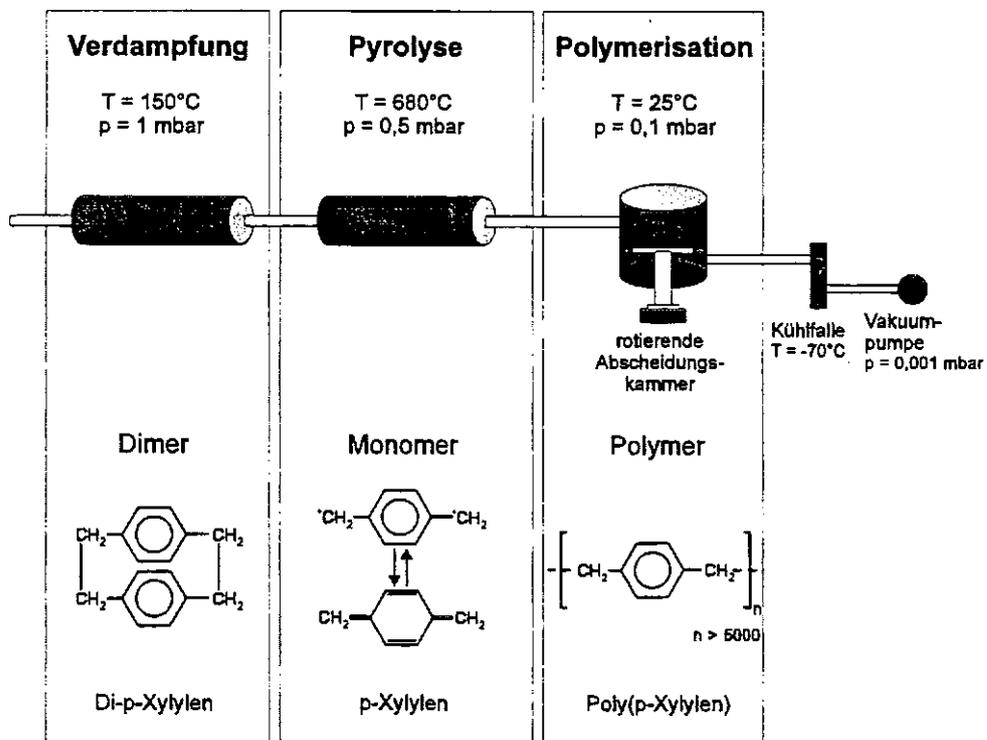


Abb. 5-3: Schematische Darstellung des Parylen-Beschichtungsprozesses

5.2 CHARAKTERISIERUNG DER SCHUTZBESCHICHTETEN BAUTEILE

5.2.1 Akustische Eigenschaften und Reproduzierbarkeit der Beschichtung

Die akustischen und elektrischen Eigenschaften der schutzbeschichteten OFW-Bauteile werden mittels eines Netzwerkanalysators untersucht, wodurch eine erste Aussage über die Qualität des aufgetragenen Polymerfilms getroffen werden kann (siehe Kapitel 3.3.2). Darüberhinaus dient der Kurvenverlauf der Übertragungskennlinien als weiteres Beurteilungskriterium für die abgetragenen Polymerfilme. Eine möglichst geringe zusätzliche Dämpfung, die durch die Schutzschicht hervorgerufen wird, ist erstrebenswert, da der im Oszillatorkreis eingebaute HF-Verstärker nur Verluste bis maximal ca. 18 dB ausgleichen kann.

In den Abbildungen 5-4 und 5-5 sind die Übertragungskennlinien (Dämpfung bzw. Phase in Abhängigkeit von der Frequenz) von unbeschichteten, parylen- und polyimidbeschichteten OFW-Bauelementen an Luft dargestellt; Abbildung 5-6 zeigt die Dämpfungskurven derselben Bauelemente in destilliertem Wasser.

Die Dämpfungskurven zeigen eine geringe zusätzliche Dämpfung durch die aufgetragenen Polymerschichten, deren Betrag bei Parylen⁵ und Polyimid ungefähr gleich ist. Die schutzbeschichteten Bauelemente weisen Dämpfungen von 2,5 bis 5 dB (bei -10°) auf.

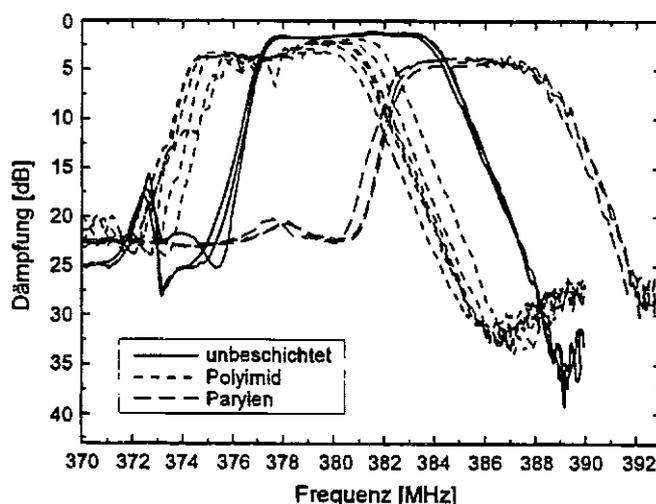


Abb. 5-4: Übertragungskennlinien (Dämpfung) von polyimid- und parylenbeschichteten sowie unbeschichteten OFW-Bauelementen an Luft

⁵ Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich mit Parylen C gearbeitet; nachfolgend bezieht sich die Bezeichnung "Parylen" daher immer auf Parylen C.

5.2 CHARAKTERISIERUNG DER SCHUTZBESCHICHTETEN BAUTEILE

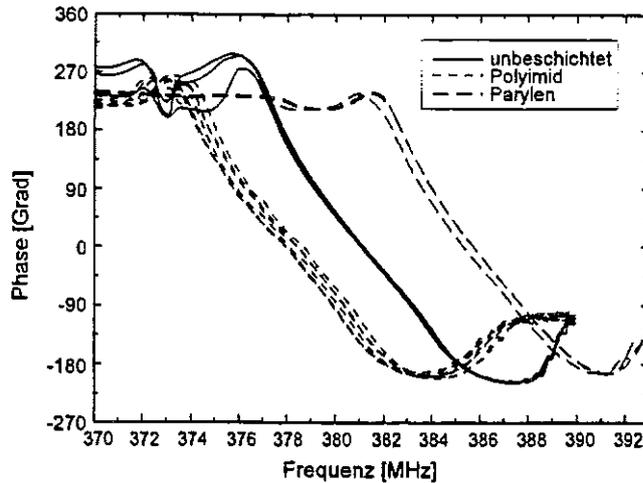


Abb. 5-5: Übertragungskennlinien (Phasengang) von polyimid- und parylenbeschichteten sowie unbeschichteten OFW-Bauelementen an Luft

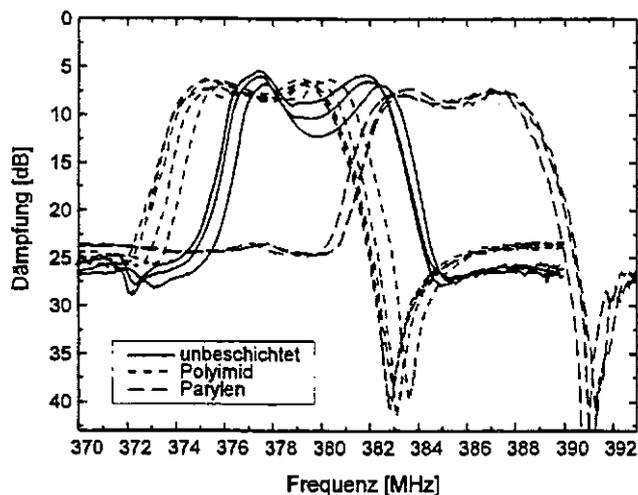


Abb. 5-6: Übertragungskennlinien (Dämpfung) von polyimid- und parylenbeschichteten sowie unbeschichteten OFW-Bauelementen in Wasser

Desweiteren kann anhand der Übertragungskennlinien die Reproduzierbarkeit des jeweiligen Beschichtungsprozesses abgeschätzt werden.

Die Kurven unbeschichteter Bauteile liegen sehr nahe beieinander und haben nahezu identische Verläufe. Die einzelnen Bauelemente zeigen eine Streuung der Resonanzfrequenz von ca. 300 kHz.

Die Beschichtung der OFW-Bauteile mit Polyimid durch Spin-Coating ist vergleichsweise schlecht reproduzierbar. In den Abbildungen 5-4 bis 5-6 sind nur die Kennlinien von Bauteilen dargestellt, die mit geeigneten Polyimidfilmen (Typ 1, siehe unten) beschichtet sind. Betrachtet man, wie in Abbildung 5-7, jedoch eine ganze Beschichtungsserie, so ist eine große Streuung zu erkennen.

Man kann die polyimidbeschichteten Bauteile aufgrund einer visuellen Beurteilung des Dämpfungskurvenverlaufs und dem Wert ihrer Dämpfung bei -10° grob in die folgenden drei Gruppen einteilen und damit ihre Einsetzbarkeit für biosensorische Zwecke beurteilen. Nur etwa 60 % der beschichteten Bauteile (Typ 1) weisen die gewünschte Dämpfung von 2,5 bis 5 dB auf und zeigen einen eindeutigen Kurvenverlauf mit einem breiten Maximum

um 380 MHz und steil abfallenden Flanken. Weitere 30 % (Typ 2) haben eine höhere Dämpfung und eine von Typ 1 abweichende Kurvenform und sind damit für Experimente nur noch bedingt einsetzbar. Die restlichen 10 % (Typ 3) können nicht weiterverwendet werden, da ihre Dämpfung zu hoch ist und der Kurvenverlauf ein nicht-reproduzierbares Verhalten der OFW-Bauelemente bedingt.

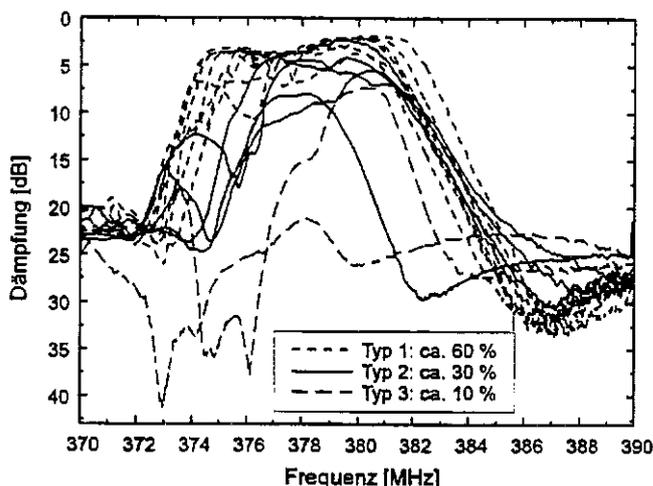


Abb. 5-7: Übertragungskennlinien (Dämpfung) von polyimidbeschichteten OFW-Bauelementen einer Beschichtungsserie an Luft

Bei gleichzeitig parylenbeschichteten Bauteilen findet man eine Streuung von ca. 500 kHz (siehe Abbildung 5-4 bis 5-6), was die gute Reproduzierbarkeit des Parylen-Beschichtungsprozesses zeigt. Allerdings treten signifikante Abweichungen (bis zu 2000 kHz) auf, wenn man parylenbeschichtete Sensoren aus verschiedenen Beschichtungsserien miteinander vergleicht. Dies kann dadurch erklärt werden, daß aufgrund der Beschichtungstechnik (die Schichtdicke wird hauptsächlich durch die Einwaage an Dimer gesteuert) bei jeder Serie geringfügig unterschiedliche Schichtdicken erzeugt werden. Da allerdings eine sehr große Menge von Sensoren (mehrere hundert bis tausend Bauteile) gleichzeitig beschichtet werden kann, können im allgemeinen alle Experimente mit Sensoren einer Beschichtungsserie durchgeführt werden.

Aus diesen Untersuchungen ergibt sich, daß die Parylenbeschichtung (innerhalb einer Beschichtungsserie) deutlich reproduzierbarer verläuft, als die Beschichtung mit Polyimid. Dies ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, daß es sich bei der Parylen-Beschichtungstechnik um eine Einschnitt-Beschichtung handelt, wohingegen bei der Polyimidbeschichtung mehrere Arbeitsschritte zur Schichtaufbringung notwendig sind. Zudem wird jedes Bauteil der Beschichtungsprozedur einzeln unterzogen.

Vergleicht man Bauteile, die polyimid- bzw. parylenbeschichtet sind, so weist die Form der Transmissionsspektren keine erkennbaren Unterschiede auf. Lediglich die Lage des Dämpfungsminimums findet sich bei verschiedenen Frequenzen wieder.

Darüberhinaus ist zu erkennen, daß durch die Polymerbeschichtungen keine drastischen Dämpfungszunahmen im Vergleich zum unbeschichteten Bauteil entstanden sind.

Folglich eignen sich beide Polymere grundsätzlich als Schutzschicht für sensorische Anwendungen.

5.2.2 Mikroskopische Untersuchung der Beschichtung: Charakterisierung der Oberflächenbeschaffenheit

Lichtmikroskopische Aufnahmen stellen eine schnelle Methode dar, erste Aussagen über die Qualität der aufgetragenen Schutzbeschichtung zu treffen. Damit kann der Bedeckungsgrad der Sensoroberfläche und die Ebenheit des aufgetragenen dünnen Polymerfilms qualitativ beurteilt werden. Durch Arbeiten mit differentiellm Interferenzkontrast⁶ (DIC) läßt sich eine Höhenprofilierung der Oberfläche erkennen, was durch eine einfache Hellfeld-Betrachtung im Auflicht nicht erkennbar ist.

Eine möglichst gleichmäßige, glatte und dünne Beschichtung ist bei der Anwendung auf OFW-Bauteilen wichtig, da die Ausbreitung der Oberflächenwelle durch Unregelmäßigkeiten der Oberfläche gestört wird, wobei es zu Teilreflexionen und damit zu zusätzlichen Dämpfungsverlusten kommt.

Die Abbildungen 5-8 bis 5-10 zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen von OFW-Bauelementen, die mit Polyimid beschichtet sind. Die Filme weisen deutliche Unebenheiten (Höhenprofilierung) auf, was auf die Beschichtungsprozedur zurückzuführen ist. Polyimid wird mittels Spin-Coating auf den Sensor aufgebracht, wobei sich der Polymerfilm aufgrund der Oberflächenspannung zur Sensormitte hin zusammenzieht.

In Abbildung 5-8 ist ein polyimidbeschichtetes OFW-Bauteil dargestellt, das aufgrund optischer Beurteilung des Polymerfilms und aufgrund der Dämpfung zu biosensorischen Zwecken verwendet werden kann (Typ 1 – siehe Kapitel 5.2.1). Man erkennt den zur Mitte des Bauteils hin dicker werdenden Polymerfilm anhand der Interferenzringe.

Die Abbildungen 5-9 und 5-10 zeigen unzureichende Schutzbeschichtungen mit Polyimid. Die Polymerfilme bedecken nicht die ganze Sensoroberfläche und haben sich an verschiedenen Stellen zusammengezogen (Typ 2 bzw. 3).

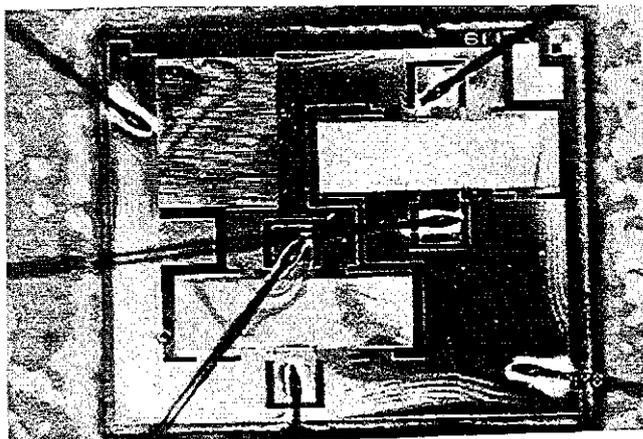


Abb. 5-8: Lichtmikroskopische Aufnahme (DIC) eines OFW-Bauelements mit einem Polyimidfilm, der zu einer Gesamtdämpfung von 2,67 dB bei einer Phasenlage von -10° führt (Typ 1)

⁶ Das angewandte differentielle Interferenzkontrastverfahren arbeitet auf polarisationsoptischer Grundlage. Vom Objekt werden zwei um einen geringen Betrag seitlich versetzte Bilder erzeugt, die miteinander interferieren.

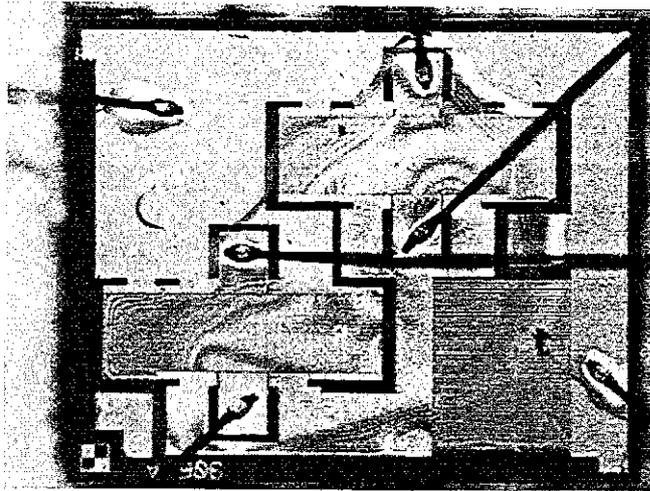


Abb. 5-9: Lichtmikroskopische Aufnahme (DIC) eines OFW-Bauelements mit einem Polyimidfilm, der zu einer Gesamtdämpfung von 5,83 dB bei einer Phasenlage von -10° führt (Typ 2)

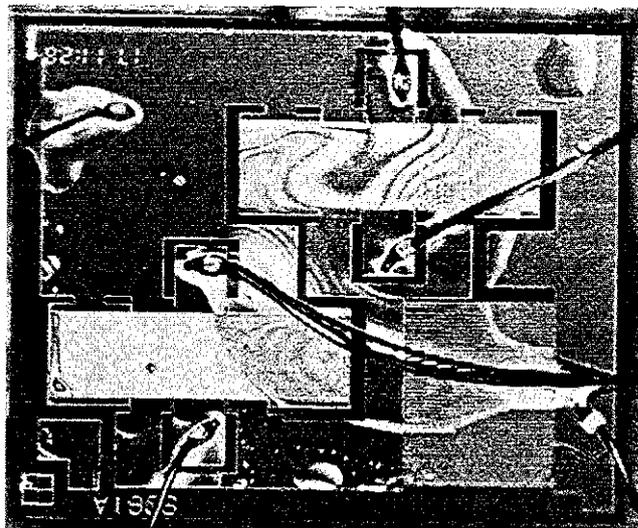


Abb. 5-10: Lichtmikroskopische Aufnahme (DIC) eines OFW-Bauelements mit einem Polyimidfilm, der zu einer Gesamtdämpfung von 22,95 dB bei einer Phasenlage von -10° führt (Typ 3)

In Abbildung 5-11 ist die lichtmikroskopische Aufnahme eines OFW-Bauelements, das mit einem $1,3 \mu\text{m}$ dicken Parylenfilm beschichtet ist, dargestellt. Der Film ist sehr glatt, so daß selbst mit differentiellem Interferenzkontrastverfahren keine Unebenheiten festzustellen sind.

Die Bonddrähte der Bauelemente stellen aufgrund ihrer Geometrie für eine Beschichtungstechnik die größte Herausforderung dar. Hierbei bietet die Vakuumabscheidung von Parylen den Vorteil einer formgetreuen Beschichtung und garantiert somit den kompletten Schutz der Bonddrähte.

5.2 CHARAKTERISIERUNG DER SCHUTZBESCHICHTETEN BAUTEILE

In Abbildung 5-12 ist ein Schnitt eines mit einer 1 μm dicken Parylenschicht beschichteten Bonddrahts gezeigt. Man erkennt die gleichmäßige Beschichtung von allen Seiten des Bonddrahts.

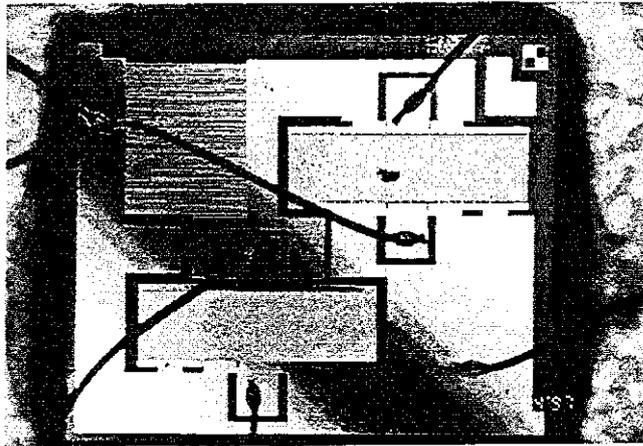


Abb. 5-11: Lichtmikroskopische Aufnahme (DIC) eines OFW-Bauelements mit einem 1,3 μm dicken Parylenfilm, der zu einer Gesamtdämpfung von 3,22 dB bei einer Phasenlage von -10° führt

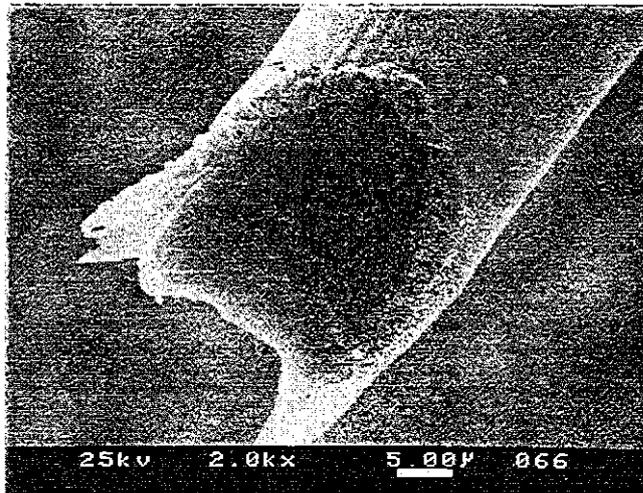


Abb. 5-12: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Bonddrahts, der mit einem 1 μm dicken Parylenfilm beschichtet ist

5.2.3 Untersuchung der Masseempfindlichkeit durch Abscheidung von Proteinen

Die grundsätzliche Masseempfindlichkeit der OFW-Bauteile kann relativ einfach durch die unspezifische Abscheidung eines Proteins (in diesem Fall Rinderserumalbumin, BSA) auf dem Sensor untersucht werden. Die Adsorption von BSA verläuft reproduzierbar und kann daher als Mittel zur Abscheidung immer gleicher Massen auf identischen Sensoroberflächen verwendet werden (siehe auch Kapitel 7.2.1).

Auf unterschiedlichen Polymeren ist jedoch eine Adsorption unterschiedlicher Mengen von BSA aufgrund verschiedener Oberflächeneigenschaften möglich.

Auch können durch unterschiedliche Polymerfilmdicken und dem damit verbundenen sogenannten "Love-Wellen-Effekt" [kov94], der eine Abhängigkeit der Empfindlichkeit des Sensors von der Dicke der Beschichtung beschreibt (siehe Kapitel 7), Unterschiede in der Empfindlichkeit hervorgerufen werden.

In Abbildung 5-13 ist die zeitliche Frequenzänderung zweier schutzbeschichteter OFW-Bauteile dargestellt, wobei zunächst mit 20 mM Phosphatpuffer gespült und dann mit einer Lösung von 4 mg/ml BSA in 20 mM Phosphatpuffer beprobt wurde. Es kam in beiden Fällen zu einer Abscheidung von BSA auf der Sensoroberfläche und einer dadurch hervorgerufenen Änderung der Resonanzfrequenz um ca. 26 kHz. Das Frequenzrauschen in 20 mM Phosphatpuffer betrug in beiden Fällen ca. 40 Hz. Für beide Sensoren liegt damit ein Signal/Rausch-Verhältnis von 650 vor.

Es ist folglich bei den mit unterschiedlichen Polymeren schutzbeschichteten OFW-Bauelemente mit der gleichen Masseempfindlichkeit zu rechnen. Bei einer angenommenen Oberflächenbelegung von ca. 2 ng/mm² (siehe Kapitel 7.3.2.4) kann für beide Sensoren unter Berücksichtigung des dreifachen Rauschens eine Nachweisgrenze von ca. 9 pg/mm² ermittelt werden.

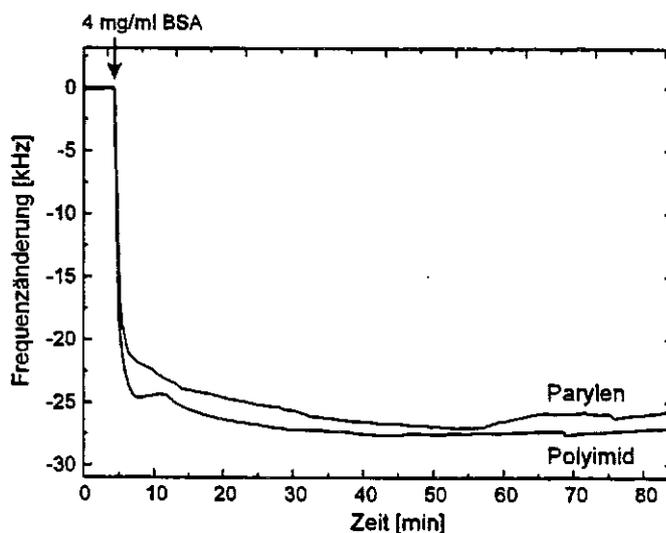


Abb. 5-13: Abscheidung von BSA auf zwei mit unterschiedlichen Polymeren schutzbeschichtete OFW-Bauteile

5.3 SCHUTZWIRKUNG VOR KORROSIVEN ANGRIFFEN

Die Schutzbeschichtung soll das OFW-Bauteil während des Betriebs vor korrosivem Angriff durch wäßrige Lösungen, Säuren, Basen und aggressive Reagenzien schützen, die unter Umständen für Immobilisations-, Meß- oder Regenerationsprozeduren notwendig sind.

Um zu beurteilen ob eine solche Schutzwirkung vorhanden ist, wurde der Sensor mit Salzsäure beprobt, auf daraus resultierende Beschädigungen unter dem Mikroskop geprüft, sowie sein sensorisches Verhalten im Oszillatorschaltkreis bestimmt.

5.3.1 Mikroskopische Beobachtung

Zur Untersuchung der Schutzwirkung der aufgetragenen Schutzschicht wurde das OFW-Bauteil mit 0,1 M Salzsäure beprobt und unter dem Lichtmikroskop im Hellfeld beobachtet, ob Gasentwicklung oder andere Veränderungen auftraten.

Bei polyimidbeschichteten Bauteilen war schon nach wenigen Minuten eine Gasentwicklung vor allem an den Kontaktstellen der Bonddrähte mit den Bondpads zu beobachten, die auf einen korrosiven Angriff der Säure auf das Aluminium schließen ließ (siehe Abbildung 5-14). Die Korrosion führte nach ca. 15-30 min zur vollständigen Zerstörung der Bonddrähte und zu einem deutlich erkennbaren Angriff auf die Interdigitalstruktur (siehe Abbildung 5-15).

Dagegen konnte bei parylenbeschichteten Bauelementen auch nach mehrstündiger Einwirkzeit und sogar nach Erhitzen des Sensors in der Säure (30 min) kein Angriff beobachtet werden (siehe Abbildung 5-16). Der Parylenfilm weist damit einen ausgezeichneten Schutz des Bauteils vor korrosiven Angriffen auf.

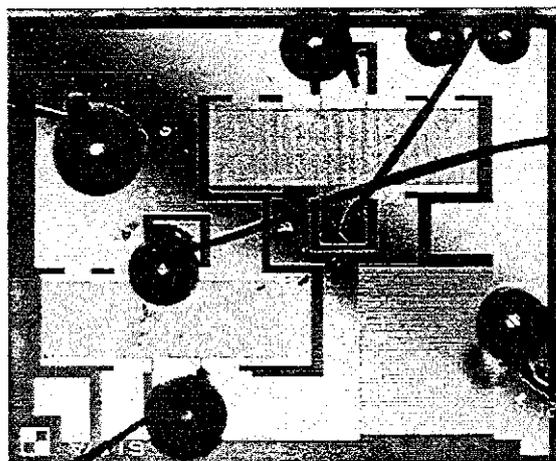


Abb. 5-14: Lichtmikroskopische Aufnahme eines polyimidbeschichteten OFW-Bauelements bei Beprobung mit 0,1 M HCl. Zu erkennen ist die Gasentwicklung an den Kontaktstellen von Bonddrähten und Bondpads.

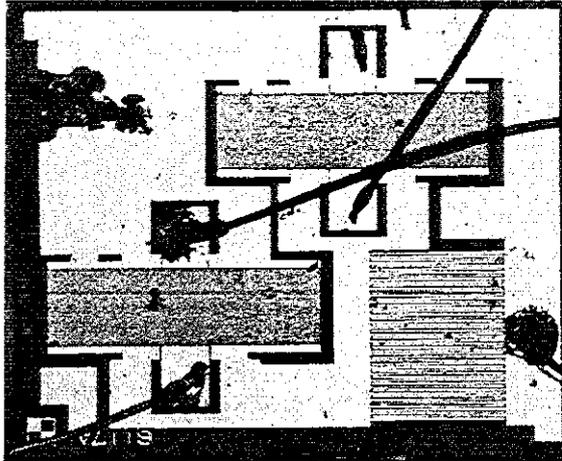


Abb. 5-15: Lichtmikroskopische Aufnahme eines polyimidbeschichteten OFW-Bauelements nach 30 min Beprobung mit 0,1 M HCl. Man erkennt eine völlige Zerstörung der Bonddrähte und einen erheblichen Angriff auf die Interdigitalstrukturen.

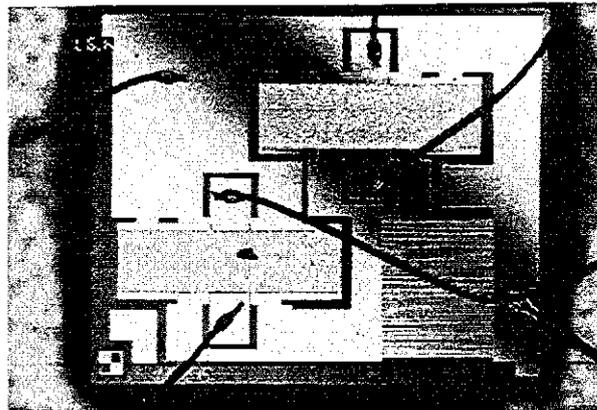


Abb. 5-16: Lichtmikroskopische Aufnahme eines parylenbeschichteten OFW-Bauelements nach 15-stündiger Beprobung mit 0,1 M HCl bei Raumtemperatur und anschließendem 30-minütigem Kochen in der Säure. Es ist keine korrosive Zerstörung der Bonddrähte bzw. Interdigitalstrukturen zu erkennen (vgl. Abbildung 5-8).

5.3.2 Regeneration der Sensoroberfläche

Die Regenerierbarkeit von Sensoroberflächen ist eine generelle Anforderung an Sensoren. Im Falle von Biosensoren können nicht-kovalent gebundene Proteine mit Hilfe von sauren, basischen oder hochkonzentrierten Salzlösungen von der Oberfläche gelöst werden.

Die Regenerierbarkeit (und damit die Korrosionsbeständigkeit im Anwendungsfall) der beiden polymerbeschichteten Oberflächen wird im Folgenden anhand der Adsorption von BSA und der darauffolgenden Desorption mittels HCl gezeigt.

Da das Sensorsignal leitfähigkeitsabhängig ist, wurden die Konzentrationen der Lösungen so gewählt, daß ihre Leitfähigkeitsunterschiede minimal sind. Dadurch können elektrische Einflüsse auf das Sensorsignal vernachlässigt werden.

5.3 SCHUTZWIRKUNG VOR KORROSIVEN ANGRIFFEN

Die Bauteile wurden in den Oszillatorschaltkreis eingebaut und zunächst mit 20 mM PBS gespült, bis sich eine konstante Resonanzfrequenz einstellte. Es wurde mit einer Lösung von 4 mg/ml BSA in 20 mM PBS beprobt, wodurch es zu einer Abnahme der Resonanzfrequenz um ca. 26 kHz aufgrund der Abscheidung von BSA kam. Diese Frequenzabnahme war bei Beprobung mit 7,5 mM HCl vollkommen reversibel, was durch eine vollständige Ablösung des BSA durch die Säure erklärt werden kann.

In Abbildung 5-17 ist dies am Beispiel eines polyimidbeschichteten OFW-Sensors gezeigt. Mit polyimidbeschichteten Sensoren kann diese Prozedur vier- bis fünfmal wiederholt werden, dann allerdings kommt es zur Zerstörung der Aluminiumstrukturen, vor allem der Bonddrähte, wie bereits oben gezeigt.

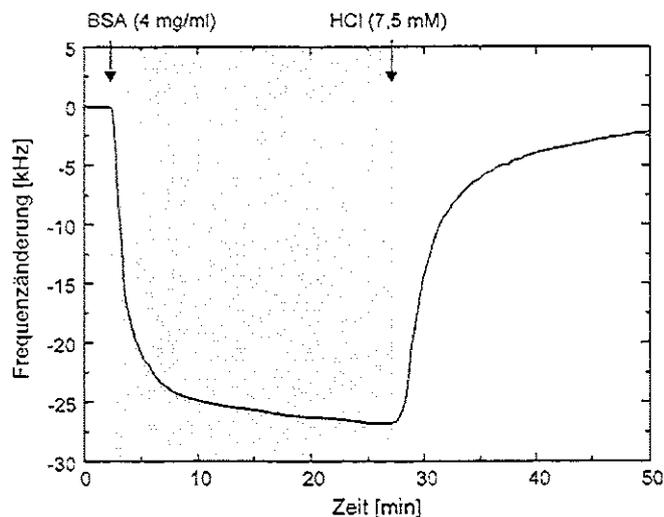


Abb. 5-17: Abscheidung von BSA und anschließendes Ablösen des Proteins mit Salzsäure auf einem polyimidbeschichteten OFW-Bauelement (aus [wes96])

Die Regeneration ist auf parylenbeschichteten Bauteilen ebenfalls möglich. Aufgrund der besseren Korrosionsbeständigkeit können in diesem Fall deutlich mehr Regenerationszyklen durchgeführt werden, als bei Polyimid. In Abbildung 5-18 sind mehrere Regenerationen dargestellt, wobei sich auch nach mehreren Beprobungszyklen noch die gleiche Frequenzänderung einstellte. Der Versuch wurde nach ca. 6 Stunden abgebrochen, ohne daß ein erkennbarer Angriff auf die Aluminiumstrukturen erfolgte.

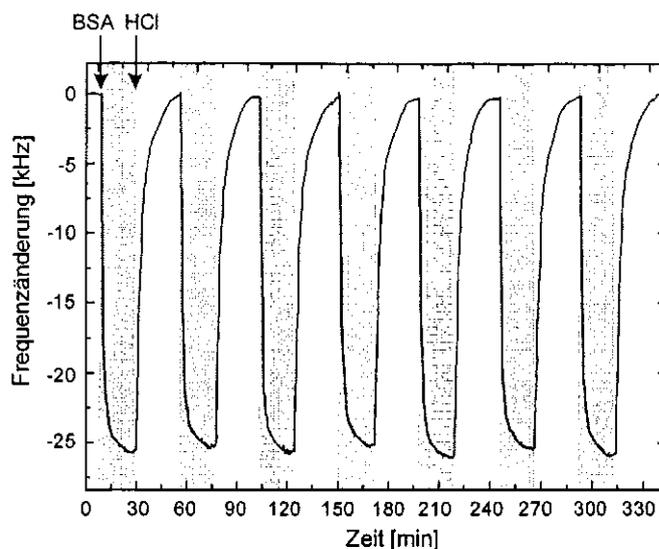


Abb. 5-18: Wiederholte Abscheidung von BSA und anschließendes Ablösen des Proteins mit Salzsäure auf einem parylenbeschichteten OFW-Bauelement

Die Parylenbeschichtung schützt folglich das Bauteil sehr gut vor korrosiven Angriffen und erlaubt eine Regeneration des Sensors, sofern die Proteine an der Oberfläche nicht-kovalent gebunden sind. Die Salzsäure denaturiert dann die adsorbierten Proteine durch Änderung der Ionisation der Aminosäuren, was zu einer Änderung der elektrostatischen Verhältnisse und damit zur Auffaltung der Proteinstruktur führt [voe92], jedoch verändert sie die Oberfläche der Parylenbeschichtung nicht, so daß eine erneute Adsorption der Proteine zu reproduzierbaren Ergebnissen führt.

5.4 PHOTOIMMOBILISATION AUF SCHUTZBESCHICHTETEN OBERFLÄCHEN

Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigen, daß eine Schutzfunktion der beiden Polymere gegeben ist. Die Polymere müssen allerdings neben ihrer Eignung als Schutzschicht auch als Basis für die Anbindung von Biomolekülen auf der OFW-Sensoroberfläche und damit für die Herstellung eines Biosensors geeignet sein.

Dabei ist insbesondere eine Immobilisationsmethode relevant, die für die Biofunktionalisierung von inerten Oberflächen bekannt ist [sig92] und bereits in der Entwicklung optischer [gao95] und massesensitiver [wes96b] Biosensoren eingesetzt wurde, und die auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wieder aufgegriffen wird (siehe Kapitel 6.2.3).

Entsprechende Experimente sind in Kapitel 6.2.3.3.1.2 dargestellt. Sie zeigen, daß beide Polymer-Schutzbeschichtungen als Basis für weitere Immobilisationsmethoden geeignet sind.

5.5 ZUSAMMENFASSENDER VERGLEICH BEIDER SCHUTZBESCHICHTUNGEN UND WEITERFÜHRENDE BETRACHTUNGEN

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß grundsätzlich beide Polymere, Polyimid und Parylen, für die Anwendung als Schutzbeschichtungen in der Biosensorik mit OFW-Bauteilen geeignet sind.

Eine kritische Betrachtung der Ergebnisse zeigt, daß die Parylenbeschichtung im Vergleich zur Beschichtung mit Polyimid zahlreiche Vorteile aufweist.

- Durch das Beschichtungsverfahren ist die Parylenbeschichtung deutlich reproduzierbarer, als die bisher durchgeführte Polyimidbeschichtung mittels Spin-Coating.
- Die Parylenbeschichtung führt aus dem gleichen Grund zu sehr glatten Filmen, was für eine Anwendung auf OFW-Bauteilen eine wichtige Forderung ist.
- Desweiteren wird bei dieser Methode auch ein Schutz der Bonddrähte erreicht, da Parylen die Bonddrähte gleichmäßig von allen Seiten umgibt, was bei der bisherigen Polyimidschicht nur recht unzureichend möglich war.
- Die Parylenschicht weist eine ausgezeichnete Korrosionsschutzfunktion auf, wodurch die OFW-Bauelemente länger in wäßrigen Medien und auch in aggressiverer Umgebung betrieben werden können, als es mit polyimidbeschichteten Oberflächen möglich ist.

Alle diese Vorteile der Parylenbeschichtung führen zu einem deutlich erweiterten Anwendungsbereich der so geschützten OFW-Bauteile gegenüber den in der Arbeitsgruppe zuvor verwendeten polyimidbeschichteten Bauelementen.

Eine Schutzbeschichtung ist im allgemeinen nur bei der Verwendung kommerziell erhältlicher OFW-Bauelemente mit Aluminiumstrukturen erforderlich. Im Gegensatz dazu sind die eingangs erwähnten, literaturbekannten OFW-Sensoren speziell für den Einsatz in der Flüssigkeitssensorik konzipiert, besitzen folglich Elektrodenstrukturen und Bonddrähte aus Gold und sind somit nicht auf eine Schutzbeschichtung angewiesen.

Vom Standpunkt der IDT-Herstellung und des Einsatzes in der HF-Technik eignet sich Aluminium ausgezeichnet als Transducermaterial. Hierfür sind unter anderem folgende Gründe zu nennen [rap91]:

- Aufgrund der geringen Dichte von Aluminium bei guter Leitfähigkeit kann mit geringen Dicken der IDT-Strukturen bei niedrigster Massebelegung gearbeitet werden. Dadurch wird der dämpfende und schallgeschwindigkeitsvermindernde Einfluß der Massebelegung auf den aktiven Transducerflächen minimiert.
- Die hohe Steifigkeit führt im allgemeinen in Verbindung mit den meisten Substratmaterialien zu minimalen akustischen Impedanzsprüngen von Substrat zu Metall. Dies verhindert übermäßig starke, unerwünschte Reflexionen an den Substratkanten.

- Aluminium haftet ausgesprochen gut auf den meisten Kristallen.
- Aluminium ist kompatibel mit der Ultraschall-Bond-Technik, die zum elektrischen Kontaktieren der Transducerpads verwendet wird.
- Schließlich ist auch der günstige Preis von Aluminium ein nicht unerheblicher Faktor im Herstellungsprozeß.

Aluminiumstrukturen besitzen jedoch für den Betrieb in wäßrigen Medien den Nachteil, daß sie einer starken Korrosion unterliegen.

Ein Wechsel von Aluminium zu Gold als Material für die Strukturen ist derzeit geplant, jedoch noch nicht realisiert, da eine derartige Umstellung des Herstellungsprozesses der käuflichen OFW-Bauteile verschiedenste Probleme mit sich bringt.

Unter anderem erfordert ein Ersatz des Aluminiums durch Gold ein neues IDT-Design, da bei Gold andere akustische Impedanzen vorliegen. Bei Beibehaltung des Designs würden die Wellenleitereigenschaften der IDT's ungünstig beeinflusst werden, wodurch sich schlechte elektroakustische Wandlungsgrade ergeben, die sich in hohen Einfügedämpfungen der Bauteile widerspiegeln. Auch würde sich die Resonanzfrequenz bei gleichbleibendem Sensordesign aufgrund der höheren Dichte von Gold zu tieferen Frequenzwerten verschieben [rap91].

6 BIOSENSORIK AUF DER BASIS DEXTRAN-BESCHICHTETER SENSOROBERFLÄCHEN

6.1 ALLGEMEINES

6.1.1 Möglichkeiten zur Immobilisation von Biomolekülen auf OFW-Sensoroberflächen und Auswahl der Methode

Zur Modifikation von OFW-Bauelementen zu Biosensoren gibt es prinzipiell verschiedene Möglichkeiten [tur87, gui89]. Dabei werden allgemein Biomoleküle auf der Oberfläche des Sensors immobilisiert, die dann mit den entsprechenden Analyten reagieren können.

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über bereits untersuchte Möglichkeiten zur Biofunktionalisierung der Oberfläche kommerziell erhältlicher OFW-Bauelemente gegeben und die Überlegungen dargestellt, die zur Auswahl der Immobilisation an dextranbeschichteten Oberflächen führten.

Folgende Immobilisationsmethoden wurden in einer vorhergehenden Arbeit [wes96] und teilweise auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht:

- *Physikalische Adsorption von Proteinen auf der Oberfläche des OFW-Bauteils.*
Diese Methode hat den Nachteil, daß eine Adsorption auf der Oberfläche mit relativ kleinen Bindungskräften einhergeht. Das bedeutet, daß die adsorbierten Biomoleküle relativ leicht wieder desorbieren können und somit eine stabile Rezeptorschicht nur schwer erreicht werden kann.

Daher wurde nach Möglichkeiten gesucht, die Proteine kovalent an die Sensoroberfläche anzubinden. Zwar existiert in der Biochemie eine große Vielzahl unterschiedlichster Immobilisationsmethoden, allerdings haben diese größtenteils den Nachteil, daß sie nur unter drastischen Bedingungen ablaufen und daher für die kommerziell erhältlichen OFW-Bauteile mit Aluminiumstrukturen und -bonddrähten nicht anwendbar sind.

- *Cyanotransfertechnik.*
Die Cyanotransfertechnik stellt eine Abwandlung der in der Biochemie bekannten Bromcyan-Immobilisation dar. Dabei erfolgt die Aktivierung der Polyimid-Schutzbeschichtung mit Hilfe von Bromcyan; die Rezeptormoleküle werden nach Aktivierung mit Carbodiimid angebunden [wes98a].
Die Methode hat jedoch den oben genannten Nachteil, daß sie unter recht drastischen Bedingungen abläuft und es daher zu einem relativ großen Ausschuß von Sensoren kommt, da unter diesen Bedingungen die Aluminiumstrukturen trotz Schutzbeschichtung angegriffen werden.
Desweiteren handelt es sich bei dieser Methode um einen sehr langwierigen Immobilisationsprozeß, der von der Schutzbeschichtung der Sensoren bis hin zum fertigen Sensor etwa eine Woche benötigt.

Die Reproduzierbarkeit ist schlecht, was einerseits auf die vielen Arbeitsschritte, die zum Aufbringen der Rezeptorschicht notwendig sind, zurückzuführen ist und andererseits auf eine mögliche Deaktivierung der rezeptiven Moleküle im Carbodiimid-Aktivierungsschritt.

Schließlich ist Bromcyan ein sehr giftiges, hochreaktives Reagenz, das nur unter entsprechenden Schutzmaßnahmen gehandhabt werden darf.

- *Photoimmobilisation von Proteinen.*

Die Photoimmobilisation von Proteinen auf polyimidbeschichteten OFW-Bauteilen konnte an zwei Modellsubstanzen (photoaktives BSA- bzw. GOD-Derivat) gezeigt werden [wes96b]. Eine Coimmobilisation von GOD unter Verwendung von photoaktivem BSA gelang nicht.

Die Photoimmobilisation hat im Gegensatz zur Cyanotransfertechnik den Vorteil, daß die kovalente Anbindung unter milden Bedingungen abläuft, keine gefährlichen Chemikalien zum Einsatz kommen und außerdem eine Immobilisation innerhalb einer Zeitspanne von maximal 2 Stunden erfolgen kann.

Ein entscheidender Nachteil dieser Methode ergibt sich daraus, daß die zu immobilisierenden Proteine zunächst mit der photoaktiven Gruppe versehen werden müssen. Diese Modifikation der Proteine ist nicht trivial, da alleine die Herstellung der photoaktiven Gruppe eine mehrstufige Synthese erfordert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Verfahrens zur Biofunktionalisierung von Oberflächen für OFW-Bauelemente. Dieses Verfahren sollte universell anwendbar sein, so daß mit Hilfe einer einfachen Standardprozedur eine schnelle und reproduzierbare Immobilisation verschiedenster Biomoleküle möglich ist.

Derzeit existieren auf dem Markt verschiedene, meist auf optischer Signalwandlung basierende Biosensorsysteme, die diese Anforderungen erfüllen [owe97]. Die bekanntesten Systeme sind die Geräte "BIAcore AB" der Firma *Pharmacia Biosensor*, das auf dem Prinzip der Oberflächenplasmonen-Resonanz (surface plasmon resonance, SPR) [lie83, dan88, jön91, kar95] arbeitet; "IASys", ein Modenkoppler (der sogenannte "resonant mirror") [buc93, cus93] der Firma *Affinity Sensors*⁷ sowie ein Gitterkoppler [luk88, nel90, hod94, bra96] der Firma *Artificial Sensing Instruments (ASI)*. Diese Systeme arbeiten unter anderem mit dextranbeschichteten Sensoroberflächen, die vom Anwender einfach und schnell über eine simple Standardvorschrift mit den gewünschten Proteinen modifiziert werden können.

Es bietet sich nun an, eine solche Dextranbeschichtung auch auf den massesensitiven Oberflächenwellen-Bauelementen anzuwenden, um einen möglichst flexiblen Einsatz dieser Bauteile als Biosensoren zu erreichen.

Die Verwendung von OFW-Bauelementen als Biosensoren hat im Vergleich zu den genannten optischen Systemen den Vorteil, daß mehrere OFW-Sensoren ohne größeren apparativen Aufwand parallel betrieben werden können, wohingegen bei optischen Systemen die aufwendige und teure optische Einheit mehrfach benötigt würde. Damit ist der Aufbau eines Arrays von OFW-Biosensoren möglich, wie es in dieser Form bereits in der Gassensorik eingesetzt wird [rap95]. Ein Einsatz eines solchen Arrays ist beispiels-

⁷ bis November 1996: *Fisons Instruments*

6.1 ALLGEMEINES

weise zum Screening von Umweltschadstoffen denkbar, wie z.B. zur Detektion von Pestiziden in Trinkwasser über immunologische Nachweisverfahren.

Die Anbindung der Dextranschicht auf der Sensoroberfläche erfolgt bei den marktführenden optischen Systemen im allgemeinen über 1, ω -Hydroxythiole, die auf einer vergoldeten Oberfläche ab einer Kettenlänge von 7 C-Atomen selbstordnende Monolagen (sogenannte "self-assembled monolayers") ausbilden (siehe Kapitel 6.2.1).

Auf den verwendeten OFW-Bauelementen sind keine Goldstrukturen vorhanden und auch eine Beschichtung des Bauteils mit einem dünnen Goldfilm erwies sich als nicht vorteilhaft. Daher wurde nach einer Möglichkeit gesucht, um Dextrane schnell, einfach und reproduzierbar an die OFW-Sensoroberfläche anzubinden.

6.1.2 Dextrane

Dextrane sind Polysaccharide, die aus langen Ketten von 1,6-vernetzten α -D-Glucopyranosyl-Resten bestehen (siehe Abbildung 6-1) [ing44, coo61, sey76]. Sie werden enzymatisch von Bakterien der Gattung *Leuconostoc* (*L. mesenteroides* und *L. dextranicum*) aus Saccharose gebildet.

Dextrane sind sehr hydrophil und bilden bei Kontakt mit wässrigen Lösungen Hydrogele⁸ aus.

Die Verwendungszwecke von Dextranen sind vielseitig, vor allem auch wegen der Tatsache, daß Dextrane aufgrund der 1,6-Verknüpfung ihrer Monomere nur durch wenige Mikroorganismen abgebaut werden können. Bekannt sind Dextrane vor allem als sogenannte Biomaterialien im biomedizinischen und pharmazeutischen Bereich. Sie werden beispielsweise in 6 %-iger Lösung als Blutplasmaersatzmittel eingesetzt, finden aber auch Verwendung in Klebstoffen, Detergentien, Kosmetika, Membranen usw. oder dienen als stabilisierender Zusatz beim Gefriertrocknen. Außerdem werden vernetzte und funktionalisierte Dextrane als Träger für Pharmaka, Ionenaustauscher und Molekularsiebe, in der Affinitätschromatographie sowie zur Immobilisierung von Enzymen verwendet.

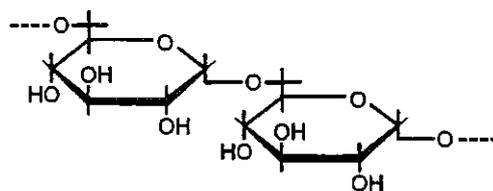


Abb. 6-1: Strukturformel von Dextran

⁸ Hydrogele sind Wasser enthaltende Gele auf der Basis hydrophiler, aber wasserunlöslicher Polymere, die als dreidimensionales Netzwerk vorliegen. In Wasser quellen diese Polymere bis zu einem Gleichgewichtsvolumen auf. Die notwendige Hydrophilie der Polymere vermitteln u.a. Hydroxyl-, Carboxylat-, Sulfonat- oder Amid-Gruppen [roe95, and82].

6.1.3 Vorteile der Anbindung von Biomolekülen an Dextranoberflächen

Die Immobilisation von Biomolekülen an dextranbeschichteten Oberflächen hat gegenüber anderen Immobilisationsmethoden mehrere Vorteile [and82]:

- Viele biologisch aktive Moleküle unterliegen beim direkten Kontakt mit metallischen und einigen anorganischen Oberflächen einer zumindest teilweisen Inaktivierung. Einerseits kann dieser Kontakt unmittelbar durch die polymere Schutzbeschichtung und auch durch die Dextranschicht vermieden werden. Andererseits wechselwirkt das Dextran-Hydrogel weniger stark mit den hydrophilen Biomolekülen als andere, hydrophobere Materialien, die als Immobilisationsgrundlage herangezogen werden, wodurch ein wesentlich größerer Anteil an Molekülen biologisch aktiv bleibt.
- Durch unterschiedliche Funktionalisierung des Dextrans (z.B. mit Carboxy-, Amino- oder Biotingruppen) kann mit Hilfe verschiedenster, gut untersuchter Immobilisationsmethoden eine Vielzahl von Biomolekülen angebonden werden, ohne daß eine vorherige Derivatisierung der Biomoleküle notwendig ist. Dadurch wird eine hohe Flexibilität bei der Planung biosensorischer Experimente erreicht. Die Immobilisationen verlaufen im allgemeinen einfach, schnell und reproduzierbar unter relativ milden Bedingungen. Zudem kann die Sensoroberfläche mit Hilfe dieser Methoden unter Durchflußbedingungen biofunktionalisiert werden, wobei durch eine mögliche Automatisierung auch eine erhebliche Vereinfachung erzielt werden kann.
- In einem definierten pH-Bereich erfolgt eine Anreicherung von Protein in der Dextranmatrix aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung zwischen positiv geladenem Protein und geeignet funktionalisiertem, negativ geladenem Dextran (siehe Kapitel 6.3.1.3.2). Dadurch entsteht eine hohe lokale Konzentration an Protein im Hydrogel, wodurch eine kovalente Anbindung der Biomoleküle bei niedrigen Konzentrationen möglich ist und somit die Reaktionszeiten für effiziente Immobilisation minimiert werden können.
- Die Immobilisationskapazität ist im Vergleich zu herkömmlichen Beschichtungen mit Monolagen deutlich erhöht. In wäßrigen Puffersystemen kommt es aufgrund der hohen Hydrophilie der Dextrane zur Quellung und damit zu einer großen Ausdehnung der Schicht. Die Biomoleküle können in die gequollene Dextranmatrix eindiffundieren und innerhalb der gesamten Schicht angebonden werden. Dagegen handelt es sich bei der allgemein üblichen Immobilisation von Monolagen um zweidimensionale Matrices, die weniger Moleküle binden können als die dreidimensionalen Hydrogele [löf90, löf93].
- Das immobilisierte Biomolekül ist durch die Anbindung an die flexiblen Dextranketten für Wechselwirkungen besser zugänglich, als bei der Immobilisation auf festen Substratoberflächen. Damit ist auch eine erhöhte verbleibende Aktivität der immobilisierten Moleküle verbunden, da diese nicht mehr von der Orientierung der Moleküle nach der Immobilisation abhängig ist. Dagegen ist im Falle der Immobilisation von Monolagen beispielsweise oftmals ein erheblicher Anteil der Biomoleküle sterisch nicht mehr zugänglich und daher die Aktivität der Beschichtung vermindert. Jedoch kann die Flexibilität auch eine chemische Vernetzung von Biomolekülen während der Immobilisation und eine biochemische Vernetzung bei Analyten mit mehr als einer Bindungsstelle verursachen, was bei der späteren, quantitativen Auswertung der Experimente berücksichtigt werden muß [joh91].

6.1 ALLGEMEINES

- Die flexible hydrophile Struktur bedingt auch eine geringe unspezifische Adsorption von Biomolekülen an Dextranschichten [and86, löf90].
- Ein für die Biosensorik wichtiger Punkt ist schließlich auch die Regenerierbarkeit der Oberfläche, wodurch wiederholte Messungen mit demselben Sensor möglich sind. Die chemisch und biologisch außerordentlich stabile Dextranbeschichtung erlaubt eine Regeneration beispielsweise durch Lösen der Immunokomplexe unter den entsprechenden Bedingungen oder durch komplettes Ablösen der bioaktiven Schicht von der Dextranmatrix (siehe Kapitel 6.4).

6.2 ANBINDUNG VON DEXTRAN AN DER SENSOROBERFLÄCHE

Zur kovalenten Anbindung von Dextran an die schutzbeschichtete Sensoroberfläche sind prinzipiell verschiedene Ansätze möglich. Im Folgenden sollen kurz zwei naheliegende Ansätze vorgestellt und diskutiert werden, ehe ausführlich auf die photoinduzierte Co-immobilisation eingegangen wird, die sich als geeignete Methode erwies.

6.2.1 Anbindung von Dextran auf Goldoberflächen

Der erste Ansatz zur Anbindung des Dextrans basiert auf der Übertragung der Immobilisationsmethode, die beim Sensorchip des "BIAcore"-Gerätes angewandt wird [nuz83, tro88, bai89a, bai89b, bai89c, löf90, ber95].

Dieser Sensorchip besteht aus Einkristall-Silicium-Wafern, die zur Erhöhung der Adhäsion zunächst mit einem dünnen Film (5 nm) aus Chrom vorbeschichtet wurden, worauf anschließend eine Schicht von hochreinem Gold (100-200 nm) durch thermische oder Elektronenstrahl-Verdampfung aufgebracht wurde. Um elektrische Leitfähigkeit der Schicht zu vermeiden, besteht dieser Goldfilm aus mikroskopisch kleinen, gleichmäßig verteilten Goldinseln.

Goldoberflächen können durch Adsorption von Sulfiden einfach funktionalisiert werden. Bei der Adsorption von langkettigen 1, ω -Hydroxyalkyl-Thiolen aus Lösungen bilden sich auf Gold selbstordnende Monolagen; also monomolekulare, sehr dicht gepackte, wohlgeordnete, orientierte Strukturen. Dadurch entsteht auf der Oberfläche der Monolage eine dichte Packung von Hydroxygruppen, die eine weitere Modifikation der Oberfläche ermöglicht. (Auf diese Weise kann auch jede weitere funktionelle Gruppe, die mit dem Thiol kompatibel ist, eingeführt werden.)

In einem nachfolgenden Schritt werden die Hydroxygruppen mit Epichlorhydrin unter basischen Bedingungen aktiviert, wodurch Epoxide ausgebildet werden, die dann durch basenkatalysierte Ringöffnung Dextrane kovalent anbinden.

Eine Funktionalisierung der Dextranschicht zur carboxymethyl-modifizierten Matrix ist im Basischen mit Chloressigsäure möglich [win56].

Diese Möglichkeit der Dextrananbindung scheidet allerdings für die verwendeten OFW-Bauteile aus, da auf dem Bauelement keine Goldoberflächen vorhanden sind.

Der Versuch, die polymerbeschichteten OFW-Bauteile noch zusätzlich mit einem dünnen Goldfilm zu beschichten, zeigte nur mäßigen Erfolg, da einerseits die Haftungseigenschaften von gesputtertem Gold auf Polyimid (das als Isolatorschicht auf das Bauteil aufgebracht wurde) ausgesprochen schlecht sind und eine Zwischenschicht aus Chrom die Dämpfung des Bauteils drastisch erhöhte. Andererseits weist das OFW-Bauteil durch die auf der Oberfläche vorhandenen Strukturen Unebenheiten und Kanten auf, die durch die dünne Beschichtung mit Polyimid und Gold nicht ausgeglichen werden können. Inhomogenitäten und Unebenheiten stören jedoch die Ausbildung der Thiol-Monolagen [nuz83, bai89a].

6.2.2 Aktivierung der Schutzbeschichtung durch Bromcyan

Ein zweiter Ansatz besteht in der Anbindung des Dextrans direkt an der Polyimid-Schutzbeschichtung. Allerdings ist Polyimid chemisch relativ inert, weshalb zunächst funktionelle Gruppen in das Polyimid eingeführt werden müssen, an die dann das Dextran kovalent angebunden werden kann.

Eine Möglichkeit zur Einführung funktioneller Gruppen stellt die Bromcyan-Aktivierung der Polyimidoberfläche dar, wie sie schon im Rahmen der Entwicklung einer Immobilisationsmethode in einer vorangegangenen Arbeit praktiziert wurde [wes96]. Diese Möglichkeit ist allerdings aus den bereits in Kapitel 6.1.1 genannten Gründen wenig praktikabel.

6.2.3 Photoimmobilisation

Der im Rahmen dieser Arbeit angewandte und eingehend untersuchte Ansatz zur Immobilisation von Dextran auf der schutzbeschichteten OFW-Sensoroberfläche greift auf das Prinzip der Photoimmobilisation zurück. Allgemein gewinnen Immobilisationsmethoden, die auf einer photoinduzierten Reaktion beruhen, gerade in der Sensortechnik immer mehr an Bedeutung. Die Möglichkeit, auf kleinstem Raum eine definierte Menge an Biomolekülen abzuscheiden, eröffnet in Kombination mit photolithographischen Techniken eine Vielfalt neuer Wege.

6.2.3.1 Prinzip der Photoimmobilisation mit T-BSA

Bei der Photoimmobilisation werden im allgemeinen die zu immobilisierenden Biomoleküle, Polymere oder Oberflächen mit photoreaktiven Gruppen derivatisiert. Diese Gruppen bilden bei Bestrahlung Carbene, Nitrene oder Radikale, welche dann mit Oberflächengruppierungen oder Matrixmolekülen reagieren. Auf diese Weise können einerseits die derivatisierten Moleküle direkt an die Oberfläche gebunden werden (direkte Immobilisation), andererseits ist es aber auch möglich, daß diese Moleküle als Photovernetzer fungieren, wobei sie sowohl eine Bindung an die Oberfläche, als auch eine Bindung zu weiteren nicht-photoaktiven Molekülen vermitteln (Coimmobilisation).

Photoimmobilisationsmethoden haben gegenüber anderen Immobilisationsmethoden den Vorteil, daß sie unabhängig von speziellen Reaktionsbedingungen oder Kopplungsreagenzien, ausgenommen Licht der geeigneten Wellenlänge, sind.

Bislang benötigen die kommerziell erhältlichen Photoreagenzien (hauptsächlich Alkyl- und Arylazide sowie deren Derivate) im allgemeinen Aktivierungsenergien, die mit den Absorptionsbanden von Proteinen (ca. 250 nm) überlappen. Durch die Einführung von Aryldiazirinen als photoaktive Gruppierung kann dieses Problem umgangen werden, da diese Licht im Wellenlängenbereich von 320 bis 380 nm absorbieren, wobei das Absorptionsmaximum bei ca. 348 nm liegt [dol90]. Bei der Photoreaktion entstehen Triplett-Carbene, die in eine Vielzahl chemischer Bindungen insertieren.

Die Verwendung von Trifluoromethyl-aryldiazirin als photoaktive Gruppierung hat den Vorteil, daß die derivatisierten Moleküle unter normalen Laborbedingungen gehandhabt werden können, daß es bei der Photoaktivierung zu keinen intramolekularen Umlagerungsreaktionen kommt und daß somit unerwünschte Nebenreaktionen minimiert werden [sig95].

Die Immobilisation von Proteinen, die mit 3-Trifluoromethyl-3-(m-isothiocyano-phenyl)-diazirin (TRIMID) modifiziert wurden, konnte auf polyimidbeschichteten OFW-Sensoroberflächen in einer vorangegangenen Arbeit bereits nachgewiesen werden [wes96]. Dabei wurden allerdings, wie oben beschrieben, die zu immobilisierenden Proteine selbst mit der photoaktiven TRIMID-Gruppe derivatisiert, was die Flexibilität der Methode stark einschränkte.

Zur kovalenten Anbindung von Dextran an die schutzbeschichtete Sensoroberfläche wurde ebenfalls auf die Photoimmobilisation mit TRIMID-modifiziertem Rinderserumalbumin (T-BSA) zurückgegriffen. Allerdings soll nicht BSA selbst immobilisiert werden, sondern mit Hilfe des T-BSA eine Coimmobilisation des Dextrans durchgeführt werden. Das T-BSA fungiert dabei als Photolinker zwischen Dextran und Schutzschicht. Dieser Beschichtungsschritt bleibt für alle OFW-Bauelemente gleich, so daß ausschließlich BSA mit der TRIMID-Funktion modifiziert werden muß. Die Immobilisation der rezeptiven Proteine erfolgt erst in einem nachfolgenden Schritt, welcher einfach und schnell die Anbindung verschiedenster Biomoleküle an die dextranbeschichtete Oberfläche mittels einer standardisierten Prozedur erlaubt.

6.2.3.1.1 Derivatisierung von BSA und Anbindung des T-BSA an die Schutzschicht

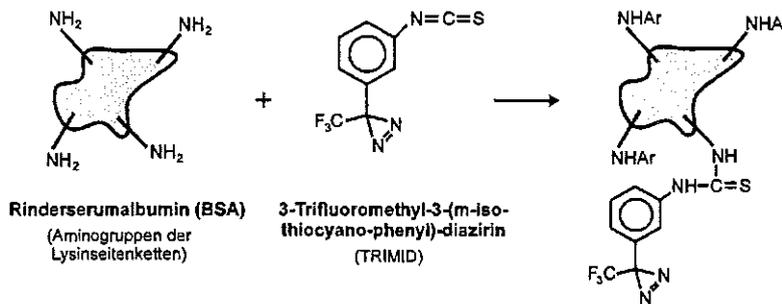
Die Synthese von 3-Trifluoromethyl-3-(m-isothiocyano-phenyl)-diazirin (TRIMID) erfolgt aus dem Ausgangsmaterial Trifluoroacetophenon nach einer Vorschrift von Brunner et al. [bru81] und nachfolgender Oxidation nach Dolder et al. [dol90].

BSA wird an den Aminogruppen der Lysineinheiten mit TRIMID derivatisiert. Aufgrund der hohen Anzahl an Lysineinheiten in BSA können auf diese Weise bis zu 10 photoaktive TRIMID-Gruppen je BSA-Molekül eingeführt werden [gao95].

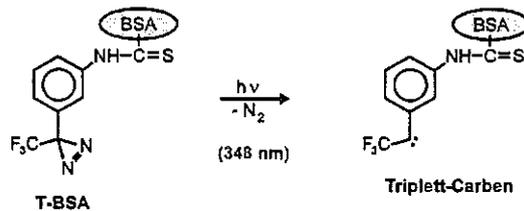
Bei der Bestrahlung des T-BSA mit Licht der Wellenlänge 348 nm spaltet der Diazirin-Ring Stickstoff ab und es entsteht ein Triplett-Carben. Dieses Carben ist sehr reaktiv und insertiert in eine Vielzahl chemischer Bindungen, bevorzugt in C-H, C-C, C=C, N-H, O-H und S-H-Bindungen.

Wird T-BSA auf ein mit Polyimid beschichtetes OFW-Bauteil aufgebracht und bestrahlt, so bindet das Molekül über das Carben kovalent am Polyimid an (siehe Abbildung 6-2). Dieser Schritt wurde bereits über Immunreaktionen zwischen anti-BSA Antikörpern und dem immobilisierten BSA nachgewiesen [wes96].

Derivatisierung von BSA mit TRIMID



Erzeugung des Carbens



Anbindung von T-BSA an Polyimid

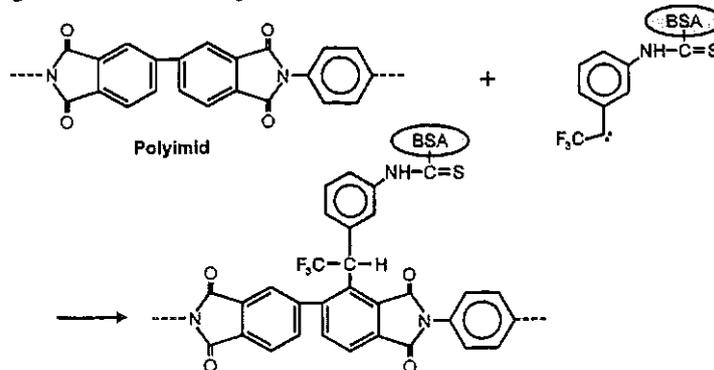


Abb. 6-2: Derivatisierung von BSA mit TRIMID und Anbindung des T-BSA an die Schutzschicht

6.2.3.1.2 Photoinduzierte Coimmobilisation von Dextranen mit T-BSA

Bei der Coimmobilisation dient T-BSA als multifunktionaler Photovernetzer⁹. T-BSA wird zusammen mit dem Dextran auf das schutzbeschichtete OFW-Bauteil aufgebracht. Da pro BSA-Molekül bis zu 10 TRIMID-Einheiten vorhanden sind, können die bei der Bestrahlung gebildeten Triplett-Carbene dann durch simultane Insertion sowohl eine Verknüpfung mit der Schutzschicht als auch mit dem Dextran bewirken. Damit wird das Dextran kovalent an die Oberfläche angebunden (siehe Abbildung 6-3).

Diese Methode hat gegenüber den anderen, vorne kurz beschriebenen Ansätzen den Vorteil, daß es sich um eine sehr einfache und schnelle Prozedur handelt. Außerdem ist das Vorhandensein von funktionellen Gruppen auf der Sensoroberfläche bzw. am Dextran nicht länger erforderlich. Die Immobilisationsmethode ist nicht an polyimid- oder parylenbeschichtete Oberflächen gebunden, sondern eine Coimmobilisation mittels T-BSA ist auf nahezu beliebigen Oberflächenmaterialien möglich [sig92]. Und schließlich dient T-BSA gleichzeitig zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der schutzbeschichteten Oberfläche.

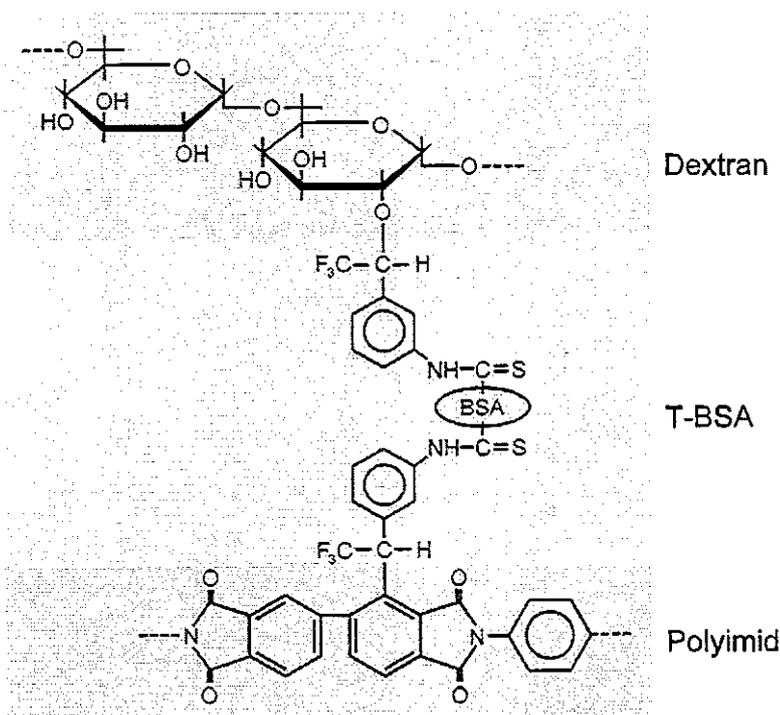


Abb. 6-3: Kovalente Anbindung von Dextran an schutzbeschichtete Oberflächen mittels Photoimmobilisation mit T-BSA als Photolinker

⁹ Ein geeigneter Photovernetzer sollte mehrere photoaktive Gruppen in einem Molekül haben. Jedoch ist es prinzipiell unerheblich, welcher Art das "Gerüst" des Photolinkers ist. Im Rahmen dieser Arbeit stand ausschließlich T-BSA als Photovernetzer zur Verfügung. Allerdings wäre ein Ersatz des BSA's durch ein kleineres Gerüstmolekül eventuell vorteilhaft, da BSA mit seinem relativ hohen Molekulargewicht vermutlich erheblich zur Dämpfung des beschichteten Bauteils beiträgt, ohne daß es selbst zur Immobilisation von Biomolekülen genutzt wird (siehe auch Kapitel 6.7).

6.2.3.2 Auswahl der Optimierungsmethoden und Durchführung der Photoimmobilisation von Dextranen mit T-BSA

Die Optimierung der Anbindung von Dextran durch Photoimmobilisation an die schutzbeschichtete Oberfläche erfolgte auf zwei Arten. Zunächst wurde eine systematische Untersuchung mittels radioaktiv markierter Substanzen und Szintillationszählung durchgeführt und anschließend die dabei erhaltenen Ergebnisse auf das OFW-Bauteil übertragen.

Die Immobilisation des Dextrans erfolgte in beiden Fällen über Layer-Coating bzw. Co-Coating mit T-BSA. Beim Layer-Coating werden T-BSA und Dextran in zwei übereinanderliegenden Schichten aufgetragen, während die Oberfläche beim CoCoating mit einer Mischung aus beiden Substanzen beschichtet wird.

In Abbildung 6-4 ist ein allgemeines Schema für die Durchführung der Photoimmobilisation dargestellt. Die genauen Versuchsbedingungen sind im Kapitel 3.5 und bei den jeweiligen Bildunterschriften beschrieben.

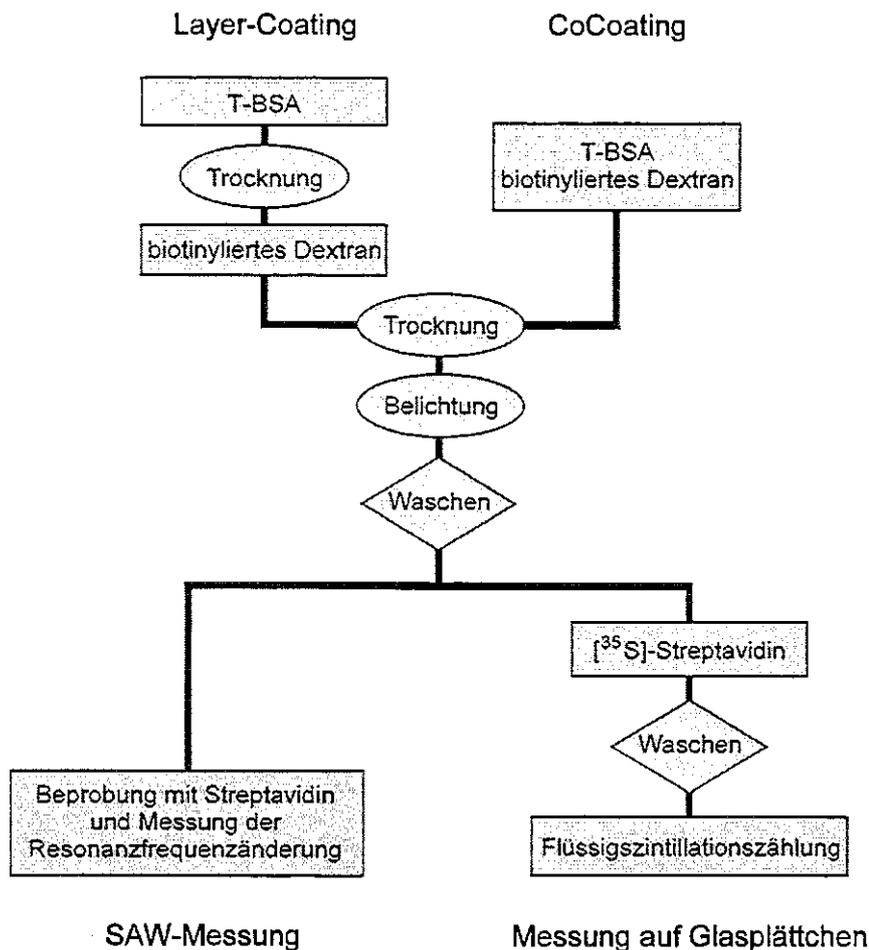


Abb. 6-4: Allgemeines Schema für die Durchführung der Photoimmobilisation von Dextran mit T-BSA

6.2 ANBINDUNG VON DEXTRAN AN DER SENSOROBERFLÄCHE

Zur Szintillationszählung wurden beidseitig parylenbeschichtete Glasplättchen verwendet. Als radioaktiv markierte Substanzen dienten je nach Meßproblem [^{14}C]-BSA, [^3H]-T-BSA, [^{14}C]-T-BSA, [^3H]-Dextran, [^{14}C]-Dextran, [^{35}S]-Streptavidin und [^{35}S]-Immunglobulin.

[^3H]-T-BSA, [^{14}C]-T-BSA und [^{14}C]-Dextran wurden eingesetzt, um eine direkte Quantifizierung der angebondenen T-BSA/Dextranschicht zu ermöglichen und eine Aussage über die Bindungseffizienz zu treffen.

- Für den Einsatz dextranbeschichteter Bauteile als Biosensoren muß die Beschichtungsprozedur in der Weise optimiert werden, daß eine maximale Menge an Protein am Dextran angebunden werden kann. Einerseits wird dies direkt durch die Menge an immobilisiertem Dextran beeinflusst, andererseits spielt dabei aber auch die sterische Zugänglichkeit der Proteinbindungsstellen am funktionalisierten Dextran eine entscheidende Rolle.

Um diese Anforderungen zu berücksichtigen, erfolgte die Optimierung der Photoimmobilisations-Parameter nicht durch direkte Quantifizierung von radioaktiv markiertem Dextran, sondern es wurde für entsprechende Untersuchungen zunächst biotinyliertes Dextran verwendet und nach der Photoimmobilisation mit [^{35}S]-Streptavidin beprobt. Anschließend wurde die über Biotin-Streptavidin-Bindungen angebundene Menge des Isotops [^{35}S] im Szintillationszähler gemessen.

Das System Biotin/[^{35}S]-Streptavidin wurde ausgewählt, da es eine relativ einfache, schnelle Messung erlaubt und die gewünschte Anbindung von Protein an die Dextranschicht simuliert. Als mögliche Fehlerquelle ist dabei allerdings die Multivalenz von Streptavidin, die eine Quervernetzung der biotinylierten Dextranketten bewirken kann, zu berücksichtigen. Dadurch können eventuell Diffusionsprozesse im Dextran behindert werden, wodurch die Kapazität des dreidimensionalen Hydrogels nicht mehr ausgeschöpft werden kann. Weiterhin können unter Umständen andere sterische Verhältnisse und anderes Diffusionsverhalten auftreten, da Streptavidin (MW 60.000) im Vergleich zu beispielsweise Antikörpern (z.B. IgG mit MW 150.000) ein relativ kleines Protein ist.

Der Einfluß dieser Faktoren sollte in einer abschließenden Versuchsreihe untersucht werden, wobei carboxymethyliertes Dextran mittels T-BSA immobilisiert, Protein durch NHS/EDC-Aktivierung angebunden und anschließend mit [^{35}S]-markiertem spezifischem Antikörper versetzt wurde (siehe Kapitel 6.2.3.4.5). Die dabei erzielten Ergebnisse sollten zeigen, inwieweit die Ergebnisse der Optimierung mittels biotinyliertem Dextran und [^{35}S]-Streptavidin auf Antigen/Antikörper-Systeme an carboxymethyliertem Dextran übertragbar sind.

- Für Optimierungszwecke ist es lediglich notwendig, die innerhalb einer Meßreihe erhaltenen Ergebnisse relativ zueinander zu bewerten und dadurch das Optimum für den untersuchten Parameter zu bestimmen.

Aus diesem Grund wurden die bei den radioaktiven Messungen erhaltenen Daten direkt in Zerfällen pro Minute ("decomposition per minute", dpm) angegeben und nur in wenigen Fällen in absolute Werte für die Oberflächenbedeckung umgerechnet.

Der Verzicht auf die Umrechnung in Absolutwerte hat den weiteren Vorteil, daß dadurch mögliche Fehler, die sich durch die kurze Halbwertszeit des Isotops [^{35}S] und durch vom Hersteller nur ungenau angegebene Molaritäten der verwendeten Streptavidinlösung ergeben, umgangen werden, da jede Meßreihe mit derselben Stammlösung an Streptavidin und innerhalb kürzester Zeit durchgeführt wurde.

Allerdings sind dadurch die y-Skalierungen der unterschiedlichen Meßreihen nicht direkt vergleichbar. In jeder Abbildung ist jedoch eine Angabe zur Abschätzung der Absolutmenge an Streptavidin gegeben.

- Die Optimierung der Beschichtungsparameter wurde mittels Szintillationszählung auf Glasplättchen durchgeführt, da hiermit schneller Ergebnisse erzielt werden konnten, als bei der Messung mit OFW-Bauteilen. Dabei wurde vorausgesetzt, daß sich die radioaktiv markierten Substanzen bei der Immobilisation genau wie die unmarkierten verhalten.

Allerdings handelt es sich bei Szintillationsmessung und Messung mit dem OFW-Bauteil um zwei grundsätzlich verschiedene Meßprinzipien. Beispielsweise kann angenommen werden, daß bei der Szintillationszählung sämtliche auf der Oberfläche angebondenen radioaktiven Isotope den gleichen Anteil zum Gesamtsignal liefern, während sich beim OFW-Bauteil ein Signaleinfluß durch Anbindung der Biomoleküle in unterschiedlichen Entfernungen von der Substratoberfläche ergibt (siehe Kapitel 7).

Ein Vergleich der Ergebnisse, die durch Szintillationszählung erhalten wurden, mit Ergebnissen, die das OFW-Bauteil liefert, sollte die Möglichkeiten und Grenzen der Übertragbarkeit der durch Szintillationsmessung erhaltenen Ergebnisse auf das OFW-Bauteil aufzeigen.

6.2.3.3 Voruntersuchungen

6.2.3.3.1 Photoinduzierte Reaktion von T-BSA mit schutzbeschichteten Oberflächen

Die Reaktion von T-BSA mit verschiedenen Oberflächenmaterialien wurde bereits in anderen Arbeiten beschrieben [sig92, gao95, wes96]. Im Folgenden soll die Bindung von T-BSA auf den mit Polyimid bzw. Parylen schutzbeschichteten OFW-Sensoroberflächen untersucht werden.

6.2.3.3.1.1 Bindungseffizienz von T-BSA auf verschiedenen Oberflächenmaterialien

Zum Nachweis und zur Quantifizierung der Bindung von Molekülen an Oberflächen wird im allgemeinen die Bindungseffizienz herangezogen, die das Ausmaß der Immobilisation beschreibt.

Untersucht wurde in diesem Zusammenhang die Bindungseffizienz von T-BSA auf den polymeren Schutzschichten Polyimid und Parylen, die für die Herstellung dextranbeschichteter Biosensoren von Bedeutung ist. Desweiteren wurden polystyrolbeschichtete Oberflächen untersucht, um die Photoimmobilisationsmethode auch auf den in der Biochemie häufig vorhandenen Polystyroloberflächen (z.B. Mikrotiterplatten) zu verifizieren. Schließlich wurde auch die Bindungseffizienz auf gesputtertem SiO₂ untersucht, da dies im Zusammenhang mit der Sensitivitätssteigerung durch die Anregung von Love-Wellen (siehe Kapitel 7) relevant ist.

Um die Bindungseffizienz von T-BSA auf den verschiedenen Oberflächenmaterialien zu bestimmen, wurde radioaktiv markiertes T-BSA verwendet. (Die Durchführung der Markierung des T-BSA ist in Anhang C beschrieben.) Die mit den verschiedenen Polymeren bzw. gesputtertem SiO₂ beschichteten Glasplättchen wurden mit [¹⁴C]-T-BSA beschichtet und die angebundene Menge an [¹⁴C]-T-BSA durch Flüssigszintillationszählung ermittelt (siehe Kapitel 3.5.1.1).

Zu Kontrollzwecken dienten sowohl Experimente mit identisch behandelten, aber unbelichteten Chips, als auch Experimente, bei denen [¹⁴C]-BSA anstelle von [¹⁴C]-T-BSA verwendet wurde.

In Tabelle 6-1 sind die Ergebnisse sowie Literaturdaten zusammengefaßt.

Die Bindungseffizienz ist definiert als die Menge an Photolinker, die nach der Immobilisations- und Waschprozedur auf dem Chip zurückbleibt, wobei die Gesamtmenge an aufgebrachtem Photolinker auf 100 % gesetzt wird.

Die Oberflächendichte wird definiert als Menge an immobilisiertem Photolinker je Quadratmillimeter. Sie wird berechnet mit Hilfe der wiedergefundenen T-BSA Menge und der mit [¹⁴C]-T-BSA Lösung bedeckten Chipfläche.

Die T-BSA Monolagen werden berechnet auf der Basis einer dichtesten Packung von BSA-Molekülen mit einer molekularen Dimension von 4,1 nm x 14,1 nm [pet85].

Oberflächenmaterial	aufgebrachte T-BSA Menge [µg / Chip]	wiedergefundene T-BSA Menge [µg / Chip]		Bindungseffizienz [%]		Oberflächendichte [fmol / mm ²]		berechnete Anzahl an T-BSA Monolagen	Literatur
		+ Licht	- Licht	+ Licht	- Licht	+ Licht	- Licht		
Polyimid	0,5	0,20	0,01	40	2	118	6	4,0	/
	1,0	0,43	0,03	43	3	253	18	8,6	
Parylen C	0,5	0,22	0,02	44	4	129	12	4,4	/
	1,0	0,40	0,02	40	2	235	12	8,0	
	* 1,0	0,02	0,03	2	3	12	18	0,4	
Polystyrol	0,5	0,18	0,02	36	4	106	12	3,6	/
	1,0	0,37	0,04	37	4	218	24	7,4	
SiO ₂	0,5	0,05	0,01	10	2	29	6	1,0	/
	1,0	0,10	0,01	10	1	59	6	2,0	
TiO ₂ / SiO ₂ #	1,4	0,12	0,01	8,23	1,00	33,2	4,0	1,1	[gao95]
	2,8	0,20	0,01	7,28	0,40	55,4	3,15	2,2	
	5,6	0,42	0,02	7,56	0,31	120,7	4,96	4,2	

* Verwendung von [¹⁴C]-BSA anstelle von [¹⁴C]-T-BSA

Chipfläche: 8 mm x 8 mm; beprobte Fläche: 50 mm²

Tab. 6-1: Bindungseffizienz und Oberflächendichte bei der Photoimmobilisation von T-BSA auf verschiedenen Oberflächenmaterialien (Mittelwerte aus jeweils 5 Messungen) ([¹⁴C]-T-BSA bzw. [¹⁴C]-BSA in 0,05 mM PBS; Trocknung: 2 h, 20 mbar, RT; Belichtungszeit: 30 bzw. 0 min)

Für alle Oberflächenmaterialien ist im Fall der belichteten Proben eine Zunahme der immobilisierten Menge an T-BSA bei zunehmender Menge an aufgebrachtem T-BSA zu beobachten.

Die Bindungseffizienzen von T-BSA auf anorganischen und organischen Oberflächenmaterialien unterscheiden sich signifikant voneinander. Bei TiO₂/SiO₂-Oberflächen ist eine Bindungseffizienz von ca. 8 %, bei gesputtertem SiO₂ von ca. 10 % zu beobachten, während T-BSA auf den polymeren Oberflächen Polyimid und Parylen Bindungseffizienzen von ca. 42 % aufweist. Auf Polystyroloberflächen wurden etwas geringere Bindungseffizienzen von ca. 36 % festgestellt.

Weiterhin zeigen die unbelichteten Kontrollproben sowie die Experimente mit [¹⁴C]-BSA anstelle von [¹⁴C]-T-BSA deutlich, daß die Immobilisation sowohl die Gegenwart von aktivierendem Licht, als auch die Anwesenheit der Diazirinfunktion erfordert, was ein Beweis für das angegebene Prinzip der Photoimmobilisation mit Diazirin als photoaktiver Gruppe ist.

6.2.3.3.1.2 Immunologische Untersuchungen zum Nachweis des angebundenen T-BSA

Zum Nachweis des angebundenen T-BSA an der Oberfläche wurden immunologische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurde T-BSA auf den schutzbeschichteten OFW-Bau-elementen immobilisiert (siehe Kapitel 3.5.1 und 5.4) und anschließend durch die Immunoreaktion mit dem entsprechenden Antikörper nachgewiesen. Als Kontrollexperiment dienten unspezifische Reaktionen sowie Versuche mit BSA anstelle von T-BSA.

6.2 ANBINDUNG VON DEXTRAN AN DER SENSOROBERFLÄCHE

Derartige Experimente wurden bereits in einer vorangegangenen Arbeit auf polyimidbeschichteten OFW-Bauelementen erfolgreich durchgeführt [wes96]. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6-5 zusammengefasst. Die Immunreaktion mit polyklonalen anti-BSA Antikörpern ergab ein Signal von 260 kHz. Im Gegensatz dazu zeigten unspezifische anti-POD Antikörper keine signifikante Frequenzänderung. Zum Vergleich wurde in einem weiteren Kontrollexperiment ein polyimidbeschichteter Sensor mit anti-BSA Antikörpern beprobt. Die Frequenzänderung von 38 kHz liegt im üblicherweise beobachteten Bereich einer unspezifischen Adsorption von Proteinen. Damit ist der Nachweis von immobilisiertem T-BSA an der polyimidbeschichteten Oberfläche erbracht.

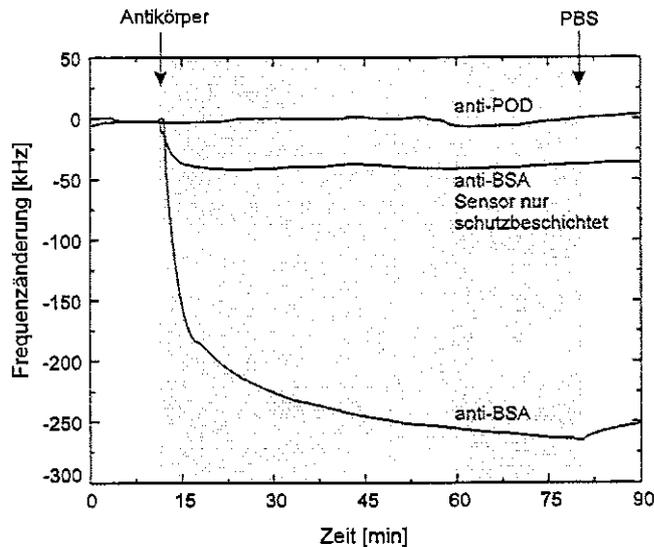


Abb. 6-5: Unspezifische und spezifische Reaktionen mit Antikörpern nach der Photoimmobilisation von T-BSA auf einem polyimidbeschichteten OFW-Bauelement (aus [wes96])

Um die Anwesenheit von immobilisiertem T-BSA auch auf parylenbeschichteten Bauteilen nachzuweisen, wurden entsprechende Experimente durchgeführt. Die Beschichtungstechnik mit T-BSA verlief analog zu der polyimidbeschichteter Bauteile (siehe Kapitel 3.5.1). Nach dem Einbau des beschichteten Sensors in den Oszillatorschaltkreis wurde 2 min mit 10 mM HCl gewaschen, um nicht-kovalent gebundene Proteine abzulösen. Ein weiteres OFW-Bauteil wurde ebenso behandelt, allerdings wurde anstelle von T-BSA unmodifiziertes BSA verwendet. BSA adsorbiert zwar zunächst auf der Parylenbeschichtung, wird aber beim Spülen mit Salzsäure weitgehend wieder abgewaschen (siehe Kapitel 5.3.2).

Beprobte wurden beide Sensoren mit einer Lösung von polyklonalen Antikörpern gegen BSA (100 µg/ml in 20 mM PBS). Die Sensorsignale sind in Abbildung 6-6 dargestellt.

Der mit T-BSA beschichtete Sensor zeigte bei der Beprobung mit Antikörpern gegen BSA eine Frequenzabnahme von ca. 95 kHz. Im Kontrollexperiment führte die Beprobung zu einer Frequenzabnahme von ca. 12 kHz. T-BSA bindet somit (im Vergleich zu BSA) an die Parylenbeschichtung an und kann durch die Immunreaktion mit Antikörpern gegen BSA nachgewiesen werden.

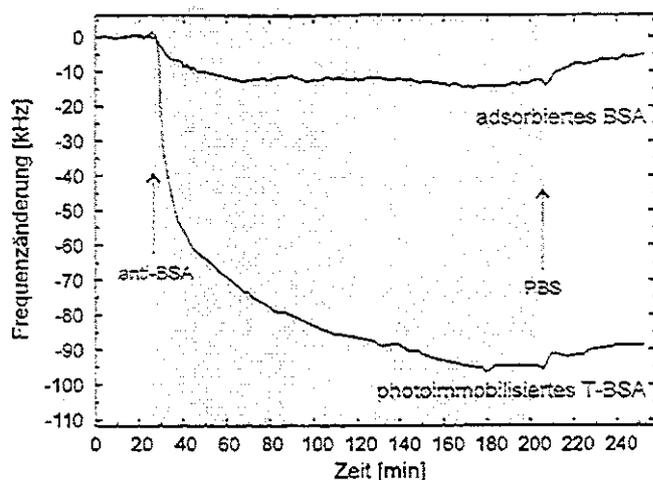


Abb. 6-6: Spezifische Reaktion nach der Photoimmobilisation von T-BSA und Waschen mit 10 mM HCl auf einem parylenbeschichteten OFW-Bauelement und Kontrollexperiment (Spülpuffer: 20 mM Phosphatpuffer; Beprobung mit polyklonalen Antikörpern gegen BSA (100 µg/ml in 20 mM Phosphatpuffer))

6.2.3.3.2 Ermittlung geeigneter Waschprozeduren für Dextrane

Im Verlauf erster Experimente zur Quantifizierung der Immobilisation von Dextranen mit T-BSA mittels Flüssigszintillationszählung wurde festgestellt, daß auch bei unbelichteten Kontrollproben hohe radioaktive Werte auftraten und folglich große Restmengen von adsorbiertem Dextran auf der Oberfläche verbleiben. Diese Tatsache kann dadurch erklärt werden, daß Dextrane sehr gut auf den polyimid- bzw. parylenbeschichteten Oberflächen haften. Aus diesem Grund wurde in einem Vorversuch nach einem geeigneten Waschprozeß gesucht, um nicht-kovalent gebundenes Dextran möglichst quantitativ von der Oberfläche abzuwaschen.

Die mit adsorbiertem Dextran beschichteten Oberflächen wurden hergestellt, indem 20 µl einer 50 mM Lösung von biotinyliertem Dextran in 50 mM PBS auf parylenbeschichtete Glasplättchen aufgebracht und anschließend 30 min bei 30 mbar getrocknet wurde.

Zum Waschen wurden verschiedene Lösungen untersucht, die in Tabelle 6-2 aufgeführt sind. Gewaschen wurden die Plättchen dreimal mit je 250 µl Waschlösung und dreimal mit je 250 µl H₂O bidest., wobei jeweils 2 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

Daraufhin wurden die Glasplättchen mit [³⁵S]-Streptavidinlösung beprobt (analog zum in Kapitel 3.7.1 angegebenen Verfahren) und die am Plättchen verbleibende Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung bestimmt. Die über Biotin-Streptavidin-Bindungen angebundene Menge an [³⁵S]-Streptavidin korreliert mit der an der Oberfläche verbliebenen Menge an Dextran. Somit kann, durch Vergleich der ermittelten Werte, eine Aussage über die Effektivität der Waschlösung gemacht werden.

6.2 ANBINDUNG VON DEXTRAN AN DER SENSOROBERFLÄCHE

In Abbildung 6-7 sind die Daten der einzelnen Waschprozeduren vergleichend dargestellt und in Tabelle 6-2 noch einmal gegenübergestellt. Dabei stellt die "Wascheffizienz" die Menge an [³⁵S]-Streptavidin dar, die durch den entsprechenden Waschprozeß von dem Glasplättchen abgelöst wurde, wobei die Gesamtmenge an aufgebrachtem [³⁵S]-Streptavidin auf 100 % gesetzt wurde.

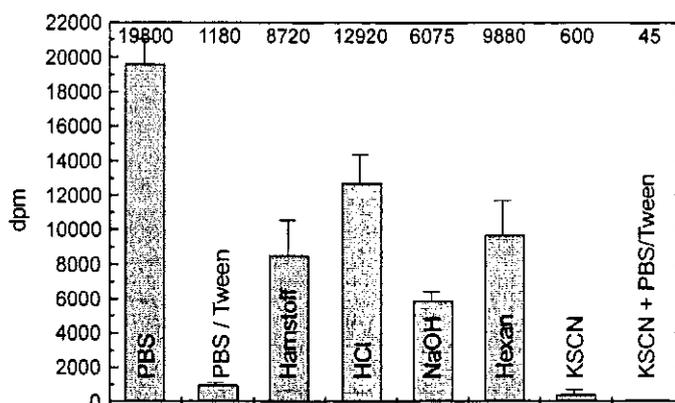


Abb. 6-7: Untersuchung verschiedener Waschlösungen zum Ablösen von nicht-kovalent gebundenem Dextran von parylenbeschichteten Glasplättchen (Mittelwerte aus jeweils 5 Messungen) (1 µmol/mm² biotinyliertes Dextran in 50 mM PBS; Trocknung: 30 min, 30 mbar, RT; Belichtungszeit: 0 min)

Waschlösung	Wascheffizienz
50 mM PBS	81 %
10 mM HCl	88 %
Hexan	91 %
4 M Harnstoff, 1 M NaCl	92 %
400 mM NaOH	94 %
50 mM PBS, 0,02 Vol-% Tween 20	99 %
3 M KSCN	99,4 %
3 M KSCN, anschl. PBS/Tween	99,96 %

Tab. 6-2: Bestimmung der Effizienz verschiedener Waschlösungen beim Ablösen nicht-kovalent gebundenen Dextrans von parylenbeschichteten Glasplättchen

Man erkennt, daß ein Waschen mit KSCN und PBS/Tween zur geringsten verbleibenden Radioaktivität auf dem Plättchen führt, daß jedoch noch immer ein nicht unerheblicher Rest an der Oberfläche zurückbleibt. Diese beiden Waschlösungen wurden daher zu dem folgenden Waschprozeß kombiniert: Zunächst wird fünfmal mit je 250 µl 3 M KSCN und einmal mit 250 µl PBS/Tween gewaschen, wobei jeweils 5 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Daraufhin wurde über Nacht in 250 µl PBS/Tween auf dem Schüttler inkubiert. Schließlich wurde ein weiteres mal mit 250 µl PBS/Tween und dreimal mit 250 µl H₂O bidest. gewaschen (Inkubationszeit 5 min, RT).

Wie in Abbildung 6-7 und Tabelle 6-2 zu erkennen ist, führt diese Prozedur zu einer nahezu quantitativen Entfernung des nicht-kovalent gebundenen Dextrans von der Oberfläche. Dazu ist es aber zwingend erforderlich, die genannten Inkubationszeiten einzuhalten.

6.2.3.3 Unspezifische und spezifische Bindung von Streptavidin an Oberflächen

Die Optimierung der Beschichtungsprozedur sollte, wie oben beschrieben, mit biotinyliertem Dextran und [³⁵S]-Streptavidin durchgeführt werden. Nachdem ein geeigneter Waschprozeß für Dextrane gefunden wurde, mußte in einem weiteren Vorexperiment schließlich noch die unspezifische Bindung des Streptavidins an den verschiedenen Oberflächen untersucht werden (zu unspezifischen Bindung an dextranbeschichteten Oberflächen siehe auch Kapitel 6.4.2.1).

Dazu wurden parylenbeschichtete Glasplättchen verwendet, die, wie in Tabelle 6-3 angegeben, beschichtet wurden. Anschließend wurde nach dem in Kapitel 3.7.1 beschriebenen Verfahren [³⁵S]-Streptavidin auf die verschieden beschichteten Glasplättchen aufgebracht und nach dem Waschen im Szintillationszähler gemessen. Es wurden jeweils belichtete und unbelichtete Proben untersucht.

In Abbildung 6-8 und Tabelle 6-3 sind die erhaltenen Ergebnisse dargestellt. Die Bindungseffizienz wird dabei definiert als die Menge an [³⁵S]-Streptavidin, die nach der Waschprozedur auf dem Glasplättchen zurückbleibt, wobei die Gesamtmenge an aufgebrachtem [³⁵S]-Streptavidin auf 100 % gesetzt wird.

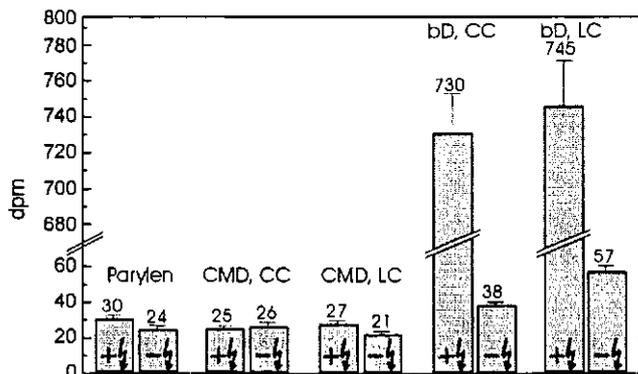


Abb. 6-8: Untersuchung der unspezifischen und spezifischen Bindung von Streptavidin auf verschiedenen Oberflächen (Mittelwerte aus jeweils 5 Messungen) (Trocknung: 10⁻³ mbar, 2 h, RT; Belichtungszeit: 45 bzw. 0 min)

Oberfläche	Bindungseffizienz von [³⁵ S]-Streptavidin [%]	
	+ Licht	- Licht
parylenbeschichtete Glasoberfläche	1,2	1,0
T-BSA + CMD (4:1 w/w), CoCoating	1,0	1,0
T-BSA + CMD (2,5:1 w/w), Layer-Coating	1,1	0,8
T-BSA + bD (4:1 w/w), CoCoating	29,2	1,5
T-BSA + bD (2,5:1 w/w), Layer-Coating	29,8	2,3

Tab. 6-3: Bindungseffizienz von spezifisch und unspezifisch gebundenem Streptavidin auf verschiedenen Oberflächen

Auf Parylen und carboxymethyliertem Dextran (CMD) ist nur unspezifische Adsorption von Streptavidin möglich. Auch wenn, wie in Kapitel 6.4.2.1 gezeigt wird, die Adsorption an Dextranen im Vergleich zur Adsorption auf polymeren Oberflächen um zwei Größenordnungen geringer ist, so ist dennoch in diesem Experiment in beiden Fällen die gleiche Restradioaktivität zu beobachten, da durch die angewandte Waschprozedur die unspezifisch adsorbierten Moleküle weitgehend entfernt werden. Damit bleibt bei beiden Oberflächen nur ein vernachlässigbar geringer Anteil von [³⁵S]-Streptavidin zurück.

Belichtete und unbelichtete Proben unterscheiden sich nicht.

Bei den mit biotinyliertem Dextran (bD) beschichteten Glasplättchen weisen sowohl bei CoCoating (CC) als auch bei Layer-Coating (LC) die belichteten Proben eine hohe verbleibende Radioaktivität und damit auch eine große Menge angebundenes [³⁵S]-Streptavidin auf.

Die Werte der unbelichteten Proben liegen dagegen im Bereich der unspezifischen Bindung, da in diesem Fall keine Immobilisierung von Dextran an der Oberfläche erfolgt und somit die nackte Oberfläche des parylenbeschichteten Glasplättchens vorliegt.

Mit diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Streptavidin entweder nur zu einem vernachlässigbar geringen Anteil unspezifisch an der Oberfläche adsorbiert wird oder durch die Waschprozedur nahezu vollständig wieder entfernt werden kann, wohingegen bei biotinyliertem Dextran Streptavidin angebunden wird und somit an der Oberfläche verbleibt. Da der Anteil an unspezifisch im Vergleich zu spezifisch gebundenem Streptavidin vernachlässigbar ist, eignet sich dieses System – unter der Berücksichtigung der oben genannten weiteren möglichen Fehlerquellen – zur Optimierung der Beschichtungsmethode.

Weiterhin zeigen diese Experimente, daß die Coimmobilisation von Dextran mit T-BSA per CoCoating und Layer-Coating prinzipiell möglich ist und daß es sich hierbei um einen lichtinduzierten Prozeß handelt.

6.2.3.3.4 Qualitativer Nachweis des immobilisierten Dextrans an der Oberfläche

In Kapitel 6.2.3.3.3 konnte indirekt anhand der Szintillationsmessung von [³⁵S]-Streptavidin gezeigt werden, daß eine Coimmobilisation von biotinyliertem Dextran mit T-BSA möglich ist. Das Vorhandensein von Dextran an der Oberfläche sollte jedoch auch direkt nachgewiesen werden. Hierzu wurde auf die am Institut vorhandene Möglichkeit der FT-IR photoakustischen Spektroskopie¹⁰ (FTIR-PAS) zurückgegriffen [hof98]. Relevante Absorptionspeaks für den Nachweis von Dextranen in IR-Spektren befinden sich im Bereich zwischen 730 und 960 cm⁻¹ (siehe Tabelle 6-4) [coo61, bar53, bar54a, bar54b] (zur Zuordnung weiterer IR-Banden im Bereich zwischen 400 und 4000 cm⁻¹ siehe Anhang A.8.1).

917 cm ⁻¹ 768 cm ⁻¹	α-1:6-Verknüpfung
794 cm ⁻¹	α-1:3-Verknüpfung
841 cm ⁻¹	nur bei α-, nicht bei β-Anomeren der D-Glucopyranose Reihe

Tab. 6-4: Absorptionspeaks von Dextranen im FT-IR-PAS-relevanten Bereich

Zum Nachweis des immobilisierten Dextrans an der Oberfläche wurden polyimidbeschichtete OFW-Bauteile mit T-BSA (siehe Kapitel 3.5.1) bzw. mit T-BSA und carboxymethyliertem Dextran (siehe Kapitel 3.5.2.1) beschichtet. Die FT-IR photoakustischen Spektren¹¹ der so beschichteten Bauteile wurden mit dem Spektrum von carboxymethyliertem Dextran (als Preßling der Reinsubstanz) verglichen.

Wie Abbildung 6-9 entnommen werden kann, treten in den Spektren von reinem Dextran und einem dextranbeschichteten Bauteil übereinstimmend die typischen Absorptionspeaks bei 917, 841 und 768 cm⁻¹ auf, nicht jedoch beim T-BSA-beschichteten Bauelement, womit das Vorhandensein von Dextran auf dem entsprechenden Bauteil nachgewiesen ist. Das Fehlen eines Absorptionspeaks bei 794 nm ist auf die Abwesenheit von α-1:3-Verknüpfungen zurückzuführen, da das verwendete Dextran einen linearen, unverzweigten Aufbau hat.

¹⁰ Photothermische Oberflächenprüfverfahren stellen eine zerstörungs- und berührungsfreie dreidimensionale Untersuchungsmethode von Feststoffen dar. Ihr Prinzip beruht auf einer periodischen Bestrahlung einer Prüfoberfläche mit Licht und der Auswertung der dadurch in den oberflächennächsten Schichten erzeugten Wärmesignale. Das Teilgebiet der photoakustischen Spektroskopie beruht auf der Detektion von Schallwellen, die durch die photothermisch erzeugte Ausdehnung des Mediums entstehen. Der photoakustische Effekt steht dabei in direktem Zusammenhang mit der Absorption des eingestrahlt Lichtes in den verschiedenen Festkörpern, d.h. in dunklen Substanzen wird somit der lauteste Schall erzeugt.

Die Verwendung eines intensitätsmodulierten Infrarot (IR)-Strahls aus einem FT-IR-Interferometer ermöglicht die photoakustische Spektroskopie für den Spektralbereich des mittleren IR. Die Probe absorbiert Teile der breitbandigen IR-Strahlung und erwärmt sich dabei. Die entstehenden Wärmewellen breiten sich aus und transportieren die aufgenommene Energie zur Oberfläche der Probe. Dadurch entstehen in dem die Probe umgebenden Gas Druckwellen mit der Frequenz der IR-Strahlmodulation. Diese Druckwellen werden von einem Mikrophon detektiert. Das Meßsignal wird verstärkt und als Standard-Detektorsignal im FT-IR-Spektrometer weiterverarbeitet. Der Vorteil der FT-IR photoakustischen Spektroskopie liegt in der simultanen Messung der spektralen Daten bei allen Wellenlängen, die die Lichtquelle emittiert [hof98].

¹¹ Die Aufnahme der FT-IR photoakustischen Spektren wurde im Forschungszentrum Karlsruhe, Institut für Instrumentelle Analytik von G. Hofmann durchgeführt.

6.2 ANBINDUNG VON DEXTRAN AN DER SENSOROBERFLÄCHE

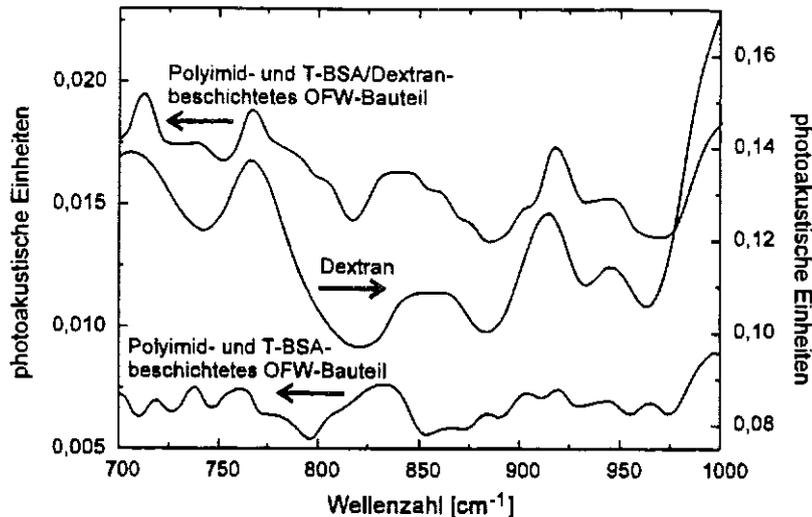


Abb. 6-9: FT-IR Photoakustisches Absorptionsspektrum von carboxymethyliertem Dextran (MW 70.000; Reinsubstanz) und polyimidbeschichteten OFW-Bauteilen, die mit T-BSA (50 ng/mm² T-BSA; Trocknung: 2 h, 10⁻³ mbar, RT) bzw. mit T-BSA und carboxymethyliertem Dextran (CoCoating: 20 ng/mm² carboxymethyliertes Dextran; 200 ng/mm² T-BSA; Trocknung: 2 h, 10⁻³ mbar, RT) beschichtet sind

6.2.3.4 Optimierung der Beschichtungstechnik

Die kovalente Anbindung von Dextranen an schutzbeschichteten Oberflächen erfolgte nach dem Prinzip der Coimmobilisation mit T-BSA als Photovernetzer. Dabei sind prinzipiell zwei Beschichtungsmethoden möglich, CoCoating und Layer-Coating. Beide Methoden wurden hinsichtlich T-BSA- und Dextrankonzentration, sowie Trocknungs- und Belichtungszeiten optimiert.

6.2.3.4.1 CoCoating

Beim CoCoating wird die Oberfläche mit einer Mischung aus Photolinker und zu immobilisierendem Molekül beschichtet. Der Photolinker vernetzt dann die zu immobilisierenden Moleküle innerhalb des kompletten dreidimensionalen Schichtsystems.

6.2.3.4.1.1 Optimierung des T-BSA/Dextran-Verhältnisses

Bei der Coimmobilisation binärer Systeme ist das Mol- bzw. Masseverhältnis der beiden Moleküle entscheidend. Für die Coimmobilisation von Antikörpern mit T-BSA auf anorganischen Oberflächen wird beispielsweise in der Literatur ein Masseverhältnis von T-BSA zu Antikörper von 4:1 angegeben [gao94, gao95].

Um das optimale Verhältnis bei der Coimmobilisation von Dextran mit T-BSA zu ermitteln, wurden parylenbeschichtete Glasplättchen mit verschiedenen Mischungen von biotinyliertem Dextran (MW 10.000) und T-BSA beschichtet (siehe Kapitel 3.5.2). Dabei wurde innerhalb der Versuchsreihe die aufgebrauchte Dextranmenge konstant bei 15 ng/mm² gehalten und die T-BSA-Menge variiert.

In Abbildung 6-10 sind die aus [³⁵S]-Streptavidin-Messungen erhaltenen Daten gegen die Molprozent an Dextran bzw. T-BSA in der Mischung aufgetragen. Es ist ein langsamer Anstieg des Signals mit zunehmendem T-BSA-Anteil (und damit entsprechend abnehmendem Dextrananteil) zu beobachten, da zunächst eine gewisse Menge an Photolinker vorhanden sein muß, um eine kovalente Anbindung des biotinylierten Dextrans (und damit von [³⁵S]-Streptavidin) zu ermöglichen. Bei sehr hohen T-BSA-Anteilen in der Mischung sinkt das Signal wieder drastisch ab, da dann der Dextrananteil immer geringer wird, bis schließlich bei 100 mol-% T-BSA kein Dextran mehr in der Mischung vorliegt.

Im Bereich zwischen 71 und 86 mol-% T-BSA (d.h. 29 und 14 mol-% Dextran) tritt ein Maximum auf, d.h. daß hier die maximale Menge an Dextran immobilisiert wird.

Die unbelichteten Kontrollproben zeigen, wie auch in allen folgenden Experimenten, daß die Versuchsreihe nicht durch unspezifische Adsorptionen beeinflusst wird und daß es sich eindeutig um einen lichtinduzierten Prozeß handelt.

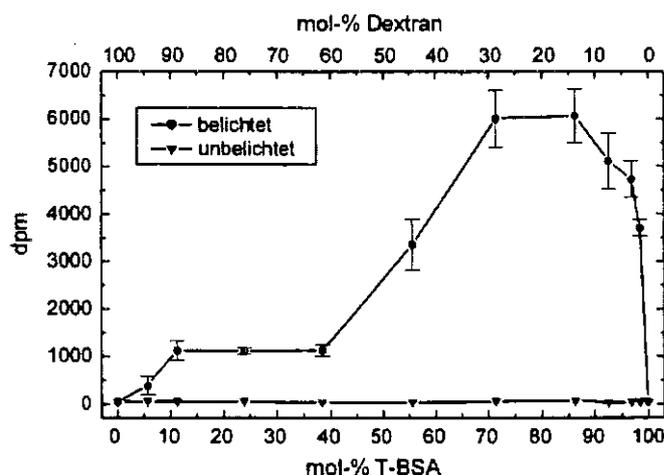


Abb. 6-10: Ermittlung des optimalen Mischungsverhältnisses von T-BSA und Dextran (MW 10.000) beim CoCoating-Prozeß (Mittelwerte aus jeweils drei Messungen) (CoCoating: 15 ng/mm² biotinyliertes Dextran; T-BSA; Trocknung: 2 h, 10⁻³ mbar, RT; Belichtungszeit: 45 bzw. 0 min)

Eine entsprechende Versuchsreihe wurde für Dextran mit einem Molekulargewicht von 70.000 durchgeführt. Daraus ergab sich, daß die Optima für die Dextrane beider Molekulargewichte bei etwa gleichem Masseverhältnis T-BSA/Dextran lagen, wobei sich naturgemäß unterschiedliche optimale Molverhältnisse einstellten.

Die so ermittelten optimalen Mischungen sind in Tabelle 6-5 zusammengestellt.

6.2 ANBINDUNG VON DEXTRAN AN DER SENSOROBERFLÄCHE

	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	aufgebrachte Menge [ng/mm^2]	Gewichts- verhältnis [Gew.-%]	Mol- verhältnis [mol-%]
Dextran (MW 10.000)	50	15	5	25
T-BSA	100	300	95	75
Dextran (MW 70.000)	50	15	5	5
T-BSA	100	300	95	95

Tab. 6-5: Optimale Mischungen von Dextran und T-BSA beim CoCoating

6.2.3.4.1.2 Variation der Menge der aufgetragenen T-BSA/Dextran-Mischung

Beim CoCoating ist es theoretisch möglich, durch Beschichtung mit Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen (aber im jeweils optimalen T-BSA/Dextran-Verhältnis) unterschiedliche Mengen an Dextran an die Oberfläche zu binden. Die Dicke der erzeugten T-BSA/Dextran-Schicht wird allerdings einerseits durch das Lambert-Beer'sche Gesetz begrenzt, andererseits neigt die Beschichtung mit zunehmender Schichtdicke zu einer Ablösung ("Abblättern") von der Oberfläche.

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, inwieweit die genannten Faktoren in einem für sensorische Anwendungen interessanten Bereich zum Tragen kommen. Dazu wurde die auf die parylenbeschichtete Oberfläche von Glasplättchen aufgetragene Menge an T-BSA und Dextran (MW 10.000) je Flächeneinheit variiert, wobei das Verhältnis der beiden Komponenten konstant gehalten wurde.

Wie aus Abbildung 6-11 zu entnehmen, nimmt das Signal mit zunehmender Dextranmenge kontinuierlich zu. Eine mikroskopische Untersuchung der Beschichtung ergab keine Hinweise auf ein Ablösen der Schichten im kompletten untersuchten Bereich. Damit kann davon ausgegangen werden, daß bei einer Beschichtung von Oberflächen mittels CoCoating mindestens bis zu 60 ng/mm^2 Dextran aufgebracht werden können.

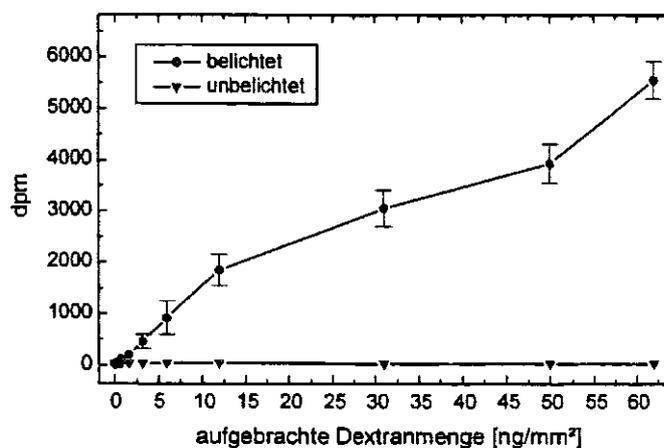


Abb. 6-11: Anbindung unterschiedlicher Dextranmengen beim CoCoating durch Variation der aufgetragenen Dextranmenge (Mittelwerte aus jeweils drei Messungen) (CoCoating: 25 mol-% biotinyliertes Dextran, 75 mol-% T-BSA; Trocknung: 2 h, 10^{-3} mbar, RT; Belichtungszeit: 45 bzw. 0 min)

6.2.3.4.1.3 Quantifizierung des immobilisierten Dextrans bei optimierter T-BSA/Dextran-Mischungszusammensetzung

Eine Aussage über die absolute Menge an immobilisiertem Dextran ist mit Hilfe des Systems von biotinyliertem Dextran und [³⁵S]-Streptavidin nicht möglich, da dieses System, wie schon beschrieben, sterische Einflüsse mit einbezieht, die für den Einsatz der Dextranschicht als Immobilisationsbasis für Proteine wichtig sind.

Die durch Coimmobilisation gebundene Menge an Dextran wurde unter Verwendung von radioaktiv markiertem Dextran ermittelt. Diese Messung erlaubt eine Quantifizierung der tatsächlich an der Oberfläche angebondenen Dextranmenge, beinhaltet aber (im Gegensatz zu der [³⁵S]-Streptavidin-Messung) keine Aussagen darüber, inwieweit die funktionellen Gruppen am immobilisierten Dextran für eine Proteinanbindung sterisch zugänglich sind.

Für entsprechende Messungen wurde [³H]-Dextran mit T-BSA coimmobilisiert und nach dem Waschen mittels Szintillationszähler gemessen. Die Immobilisation erfolgte analog zu dem im Kapitel 6.2.3.4.1.2 beschriebenen Verfahren; es wurden hier ebenfalls unterschiedliche Mengen der Mischung aus T-BSA und [³H]-Dextran (MW 70.000) auf die parylenbeschichtete Oberfläche aufgebracht, wobei das Mischungsverhältnis beider Komponenten konstant gehalten wurde (5 Gew.-% Dextran; 95 Gew.-% T-BSA).

In Abbildung 6-12 ist die Kalibrationsgerade zur Korrelation des Meßsignals der Szintillationszählung (dpm) und der Menge an [³H]-Dextran dargestellt; die sich daraus ergebende Menge an immobilisiertem [³H]-Dextran bezüglich der Menge an auf die Oberfläche aufgebrachtem [³H]-Dextran ist in Abbildung 6-13 dargestellt.

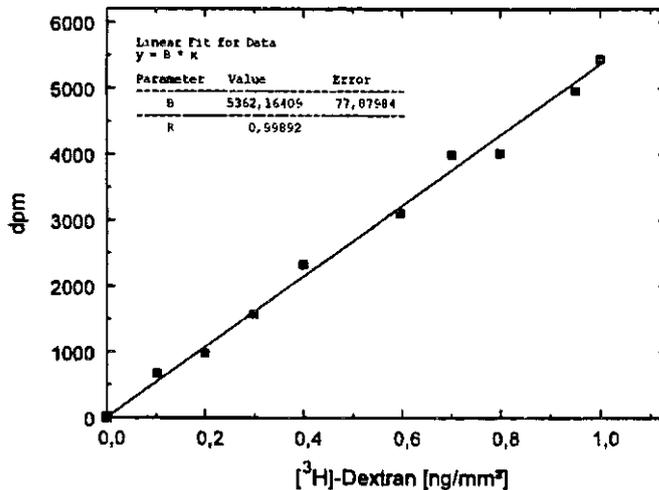


Abb. 6-12: Kalibrationsgerade von [³H]-Dextran bei der Flüssigszintillationszählung

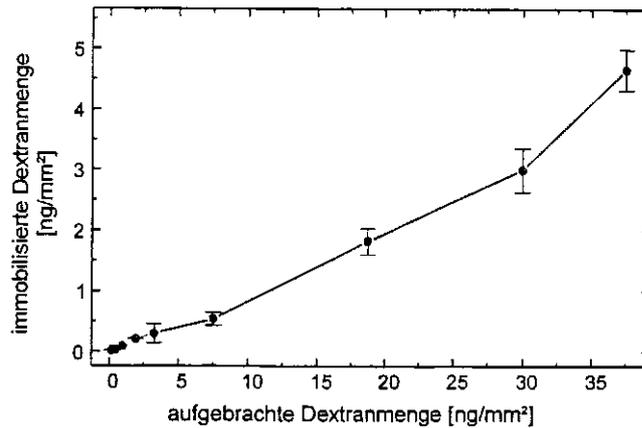


Abb. 6-13: Korrelation von aufgebrachter Menge an $[^3\text{H}]$ -Dextran und immobilisierter Menge an $[^3\text{H}]$ -Dextran (Mittelwerte aus jeweils 5 Messungen) (CoCoating: $[^3\text{H}]$ -Dextran; T-BSA; Trocknung: 2 h, 10^{-3} mbar, RT; Belichtungszeit: 45 min)

Bei Betrachtung von Abbildung 6-13 kann zunächst festgestellt werden, daß auch hier, wie in Abbildung 6-11, ein kontinuierlicher Anstieg mit zunehmender Menge an aufgebrachtem Dextran zu beobachten ist. Die bei den $[^{35}\text{S}]$ -Streptavidin-Messungen erhaltene Aussage korreliert somit mit der der $[^3\text{H}]$ -Dextran-Messungen. Sterische Effekte spielen demzufolge wohl nur eine untergeordnete Rolle, wie es für die stark gequollene Dextranmatrix als Hydrogel zu erwarten war.

Weiterhin kann Abbildung 6-13 entnommen werden, daß beim angewandten CoCoating-Prozeß innerhalb des betrachteten Bereiches eine Bindungseffizienz von etwa 10 % für die Coimmobilisation von Dextran erzielt wird. Dieser relativ niedrige Wert ist vermutlich auf das in Kapitel 6.2.3.4.4 genauer untersuchte Problem der ausgeprägten Hydrathülle des Dextrans zurückzuführen, die durch die Trocknung im Vakuum (10^{-3} mbar) nicht vollständig zu entfernen ist. T-BSA reagiert daraufhin vorwiegend mit dem Wasser der Hydrathülle ab und nur ein kleiner Teil des eingesetzten T-BSA's vermittelt die gewünschte Bindung zum Dextran.

6.2.3.4.2 Layer-Coating

Beim Layer-Coating wird zunächst eine dünne Schicht des Photolinkers und anschließend auf diese Schicht eine zweite Schicht mit dem zu immobilisierenden Molekül aufgebracht. Der Photolinker kann in diesem Fall nur zweidimensional innerhalb der Ebene zwischen beiden Schichten vernetzen.

6.2.3.4.2.1 Optimierung der aufgetragenen T-BSA-Menge

Zunächst wurde die Schicht des Photolinkers optimiert, die die Anbindung der darüberliegenden Dextranschicht vermittelt. Dazu wurde die Menge an aufgetragener T-BSA variiert, während biotinyliertes Dextran in einer konstanten Menge im Überschuß (150 ng/mm^2) aufgebracht wurde. Die aus der anschließenden $[^{35}\text{S}]$ -Streptavidin-Messung

erhaltenen Daten sind in Abbildung 6-14 dargestellt. Es ist ein steiler Anstieg des Signals mit zunehmender Menge an aufgebrachtem T-BSA zu erkennen, der auf ein zunehmendes Vorhandensein von [35 S]-Streptavidin und damit von biotinyliertem Dextran auf der Oberfläche zurückzuführen ist. Bei einer aufgetragenen T-BSA-Menge von ca. 125 ng/mm² geht das Signal über ein Maximum, um schließlich wieder abzufallen. Das Abfallen des Signals kann unter anderem dadurch erklärt werden, daß mit zunehmender T-BSA-Schichtdicke ein Ablösen der Schicht von der Oberfläche stattfindet. Dieses rein mechanische "Abblättern" der T-BSA-Schicht ist auch mikroskopisch zu beobachten.

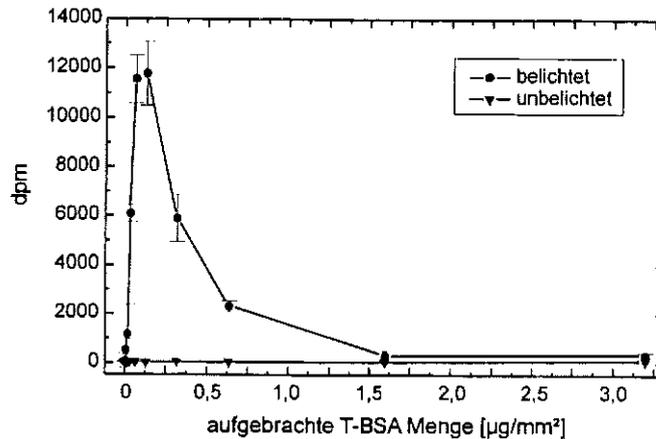


Abb. 6-14: Ermittlung der optimalen Menge an aufgebrachtem T-BSA beim Layer-Coating-Prozeß (Mittelwerte aus jeweils drei Messungen) (Layer-Coating: T-BSA; 150 ng/mm² biotinyliertes Dextran; Trocknung: 2 h, 10⁻³ mbar, RT; Belichtungszeit: 45 bzw. 0 min)

6.2.3.4.2.2 Optimierung der aufgetragenen Dextranmenge

Die Menge an aufgebrachtem Dextran wurde dadurch optimiert, daß die aufgetragene T-BSA-Menge bei dem ermittelten optimalen Wert von 125 ng/mm² konstant gehalten und die Menge an aufgebrachtem biotinyliertem Dextran (MW 10.000) variiert wurde. Die so erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 6-15 dargestellt.

Es ist zu erkennen, daß das Signal mit zunehmender Menge an aufgebrachtem Dextran zunächst zunimmt, um schließlich in einen Plateauwert überzugehen. Dieser Verlauf ist dadurch zu erklären, daß beim Layer-Coating nur eine begrenzte Menge an Dextran ange-bunden werden kann, da die Bindung ausschließlich durch die Photolinker-Zwischen-schicht vermittelt wird und somit nur Dextranmoleküle, die in direktem Kontakt zur T-BSA-Schicht stehen, immobilisiert werden können. Die maximale Anbindung von Dextran wird nach Abbildung 6-15 ab einer aufgetragenen Menge von etwa 30 ng/mm² Dextran erreicht.

Der Kurvenverlauf zeigt auch, daß bei der angewandten Beschichtungsmethode tatsächlich ein Schichtaufbau von T-BSA und Dextran vorliegt. Andernfalls wäre es auch denkbar, daß es bei der Aufbringung der Dextranlösung auf die eingetrocknete T-BSA-Schicht zu einer Vermischung beider Komponenten kommt, wobei es nicht zu einem Plateau, sondern zu einem kontinuierlichen Ansteigen der ange-bundenen Dextranmenge (wie in Abbil-dung 6-11) käme.

6.2 ANBINDUNG VON DEXTRAN AN DER SENSOROBERFLÄCHE

Analoge Experimente wurden auch mit Dextran des Molekulargewichts 70.000 durchgeführt. Dabei wurde der gleiche Kurvenverlauf erhalten und ebenfalls eine Mindestmenge von ca. 30 ng/mm² Dextran ermittelt.

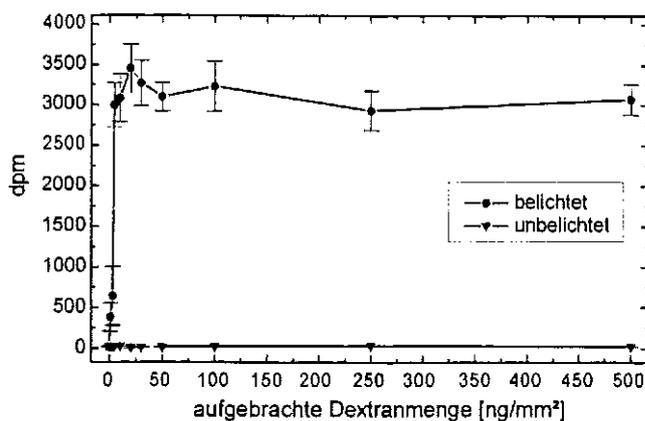


Abb. 6-15: Ermittlung der optimalen Dextranmenge (MW 10.000) beim Layer-Coating-Prozeß (Mittelwerte aus jeweils drei Messungen) (Layer-Coating: 125 ng/mm² T-BSA; biotinyliertes Dextran; Trocknung: 2 h, 10⁻³ mbar, RT; Belichtungszeit: 45 bzw. 0 min)

6.2.3.4.2.3 Quantifizierung des immobilisierten T-BSA's und Dextrans

Eine Quantifizierung der immobilisierten T-BSA-Menge ist mit Hilfe von radioaktiv markiertem T-BSA möglich. Die Markierung des T-BSA's erfolgte wie in Anhang C beschrieben.

Bei einer aufgetragenen Menge von 125 ng/mm² [¹⁴C]-T-BSA in Gegenwart von 150 ng/mm² Dextran ergibt sich durch Szintillationszählung eine immobilisierte Menge von 28 ng/mm² [¹⁴C]-T-BSA. Bei Annahme einer dichtesten Packung von T-BSA-Molekülen entspricht dies einer Schicht aus ca. 13 Monolagen T-BSA (siehe Kapitel 6.2.3.3.1.1).

Die Bindungseffizienz von T-BSA beim angewandten Layer-Coating ist mit 22 % geringer als die bei der Photoimmobilisation von ausschließlich T-BSA auf Parylen bzw. Polyimid (ca. 42 %, siehe Kapitel 6.2.3.3.1.1). Die Gründe hierfür sind vermutlich die gleichen, wie schon beim CoCoating beschrieben.

Die Quantifizierung des immobilisierten Dextrans erfolgte, wie in Kapitel 6.2.3.4.1.3 beschrieben, mittels [³H]-Dextran. Dabei wurde analog zu Kapitel 6.2.3.4.2.2 bei einer konstanten T-BSA-Menge von 125 ng/mm² die aufgetragene [³H]-Dextran-Menge variiert.

Mit zunehmender Menge an aufgetragem [³H]-Dextran wurde hier ebenfalls ab ca. 30 ng/mm² (wie bei den [³⁵S]-Streptavidin-Messungen) ein Plateauwert erreicht. Dieser Plateauwert entspricht ca. 1 ng/mm² an immobilisiertem [³H]-Dextran.

6.2.3.4.3 Optimierung der Belichtungszeit

Bei der Coimmobilisation von Dextranen mit T-BSA handelt es sich um einen licht-induzierten Prozeß, was in den bisher vorgestellten Experimenten anhand des Vergleiches von belichteten und unbelichteten Proben gezeigt wurde.

Die Belichtungszeit wurde anhand der CoCoating-Beschichtungsmethode optimiert, indem auf parylenbeschichtete Glasplättchen eine Mischung aus 25 mol-% biotinyliertem Dextran (MW 10.000; 15 ng/mm²) und 75 mol-% T-BSA (300 ng/mm²) aufgebracht wurde. Nach der Trocknung im Vakuum wurden die Plättchen unterschiedlich lange belichtet. Die nach Waschen und Beprobung mit [³⁵S]-Streptavidin mittels Szintillationszählung ermittelten Daten sind in Abbildung 6-16 dargestellt.

Das Signal steigt zunächst mit zunehmender Belichtungszeit an, da die Menge an immobilisiertem biotinyliertem Dextran und damit auch an [³⁵S]-Streptavidin zunimmt. Ab einer Belichtungszeit von etwa 35 min wird ein Plateauwert erreicht, d.h. nach dieser Zeitspanne ist die Photoimmobilisation von Dextran mittels T-BSA abgeschlossen. Eine Belichtungszeit von 45 min, mit der im Folgenden gearbeitet wird, ist somit für die Immobilisation ausreichend.

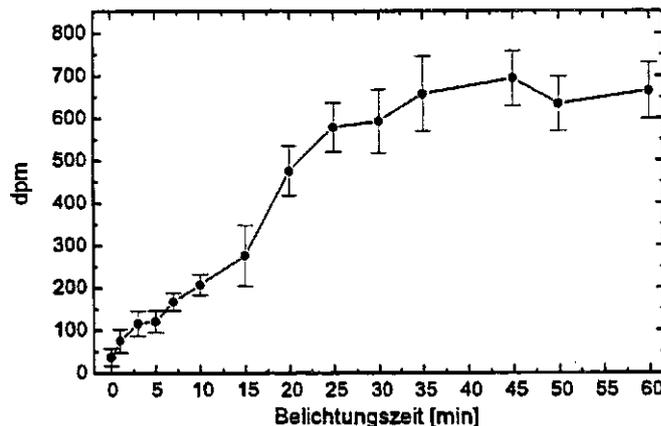


Abb. 6-16: Abhängigkeit der Coimmobilisation von Dextran mit T-BSA von der Belichtungszeit (Mittelwerte aus jeweils drei Messungen) (CoCoating: 15 ng/mm² biotinyliertes Dextran; 300 ng/mm² T-BSA; Trocknung: 2 h, 10⁻³ mbar, RT)

6.2.3.4.4 Optimierung der Trocknung im Vakuum

Bei der Bestrahlung von Diazirinen mit Licht der Wellenlänge 348 nm entstehen unter Abspaltung von Stickstoff Carbene. Carbene sind kurzlebige und sehr reaktive Verbindungen mit Halbwertszeiten im Mikrosekunden-Bereich [wen79]. Sie insertieren in eine Vielzahl chemischer Bindungen und bilden dabei kovalente Bindungen mit allen erreichbaren Molekülen aus. Um bei der Coimmobilisation von Dextranen mit T-BSA überwiegend eine Reaktion der Carbene mit Dextran und der Oberfläche zu erreichen, müssen andere in der Nähe des T-BSA's befindlichen Moleküle vor der Belichtung weitestgehend entfernt werden. Hauptsächlich handelt es sich dabei um Lösungsmittelmoleküle. Aus diesem Grund werden die beschichteten Substrate vor der Belichtung im Vakuum getrocknet.

6.2 ANBINDUNG VON DEXTRAN AN DER SENSOROBERFLÄCHE

Der Trockenschritt wurde anhand dextranbeschichteter Glasplättchen (analog zu Kapitel 6.2.3.4.3) untersucht, wobei sowohl der Druck, als auch die Trockenzeit in der Vakuumkammer variiert wurde. In Abbildung 6-17 sind die nach [³⁵S]-Streptavidin-Beprobung erhaltenen Daten dargestellt. Es ist zu erkennen, daß die Coimmobilisation von Dextran erst bei Drücken von 10⁻³ mbar und einer Trockenzeit von 2 h signifikante Ausmaße annimmt. Eine Verlängerung der Trockenzeit führt zu keiner weiteren Verbesserung der Immobilisation.

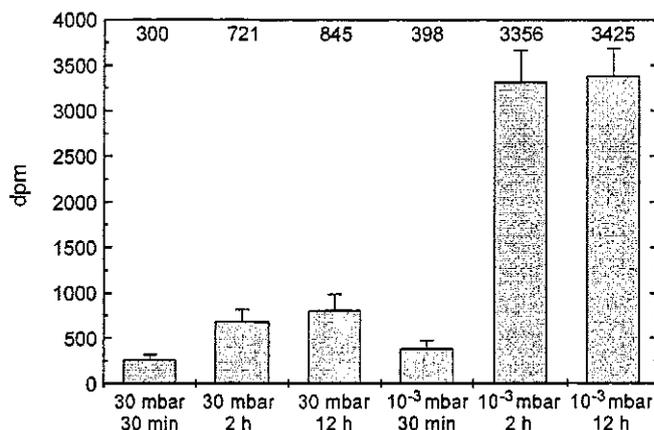


Abb. 6-17: Ermittlung geeigneter Trocknungsbedingungen für die Coimmobilisation von Dextran mit T-BSA (Mittelwerte aus jeweils 5 Messungen) (CoCoating: 15 ng/mm² biotinyliertes Dextran; 300 ng/mm² T-BSA; Belichtungszeit: 45 min)

Im Gegensatz zur Photoimmobilisation von T-BSA bzw. Coimmobilisation von Proteinen mit T-BSA (20 mbar, 30 min [gao95]) sind damit für die Coimmobilisation von Dextranen drastischere Trockenbedingungen erforderlich. Dies kann dadurch erklärt werden, daß Dextran aufgrund seiner zahlreichen Hydroxygruppen im Molekül eine ausgeprägte Hydrathülle aufweist, aus der die darin gebundenen Wassermoleküle nur schwer entfernt werden können (siehe auch Kapitel 6.2.3.4.1.3).

6.2.3.4.5 Vergleich zweier Optimierungsmethoden mit radioaktiv markierten Proteinen

Die Anbindung von Proteinen an carboxymethyliertes Dextran mittels NHS-Ester-Aktivierung der Dextranmatrix stellt einen Vorgriff auf die zu einem späteren Zeitpunkt beschriebene Immobilisation von Proteinen an dextranbeschichteten Oberflächen dar. Einzelheiten der Methode finden sich im nachfolgenden Kapitel 6.3.1.

An dieser Stelle kommt diese Methode zum Einsatz, um die in Kapitel 6.2.3.2 angesprochene Problematik bei der Optimierung der Coimmobilisation von Dextranen mit Hilfe des Systems von biotinyliertem Dextran und [³⁵S]-Streptavidin zu untersuchen. Es sollte festgestellt werden, ob eine Anbindung radioaktiv markierter Proteine an carboxymethyliertes Dextran mittels NHS-Ester-Aktivierung zu den gleichen optimalen Parametern führt, wie jene, die mit Hilfe des Systems biotinyliertes Dextran/[³⁵S]-Streptavidin auf einfacherem und schnellerem Weg ermittelt wurden. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 6-18 kurz skizziert.

Die Coimmobilisation von Dextran mit T-BSA wird in beiden Fällen auf die gleiche Weise durchgeführt (siehe Kapitel 3.5.2).

Anschließend wird an das biotinylierte Dextran [³⁵S]-Streptavidin angebunden (siehe Kapitel 3.7.1), während die Anbindung von [³⁵S]-Immunglobulin an carboxymethyliertes Dextran einen vorgeschalteten Aktivierungsschritt und einen nachgeschalteten Deaktivierungsschritt erfordert (siehe Kapitel 3.6). Der wesentlich aufwendigere Prozeß bei carboxymethyliertem Dextran beinhaltet damit aufgrund der zusätzlichen Modifikationsschritte mehr Fehlerquellen, was sich im Meßfehler niederschlägt (siehe Abbildung 6-19 und 6-20).

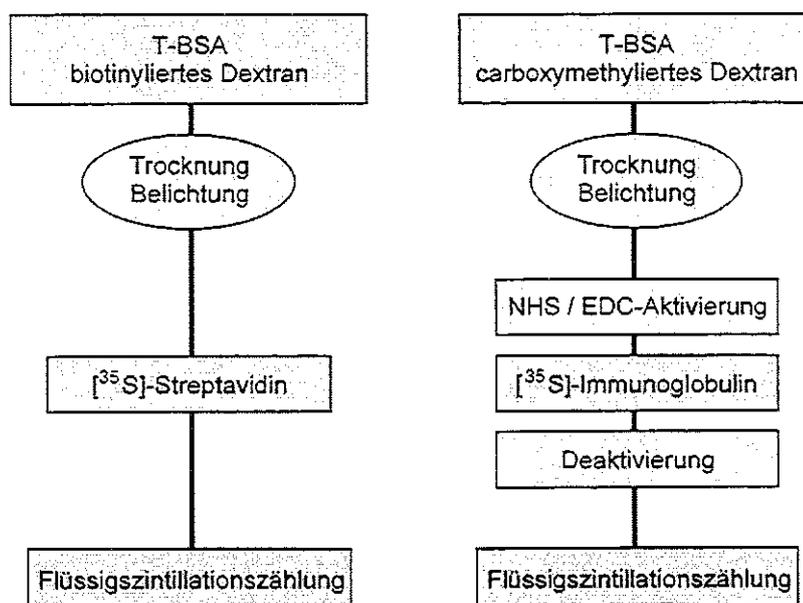


Abb. 6-18: Allgemeines Schema für zwei Systeme zur Optimierung der Immobilisation von Dextranen mittels Anbindung radioaktiv markierter Proteine

Es wurden exemplarisch zwei Versuchsreihen herangezogen, bei denen die Coimmobilisation von Dextranen mit beiden Systemen untersucht werden sollte.

Die erste Versuchsreihe war die in Kapitel 6.2.3.4.1.1 vorgestellte Optimierung des T-BSA/Dextran-Verhältnisses. Die bei der Anbindung von [³⁵S]-Immunglobulin an carboxymethyliertes Dextran erhaltenen Werte sind in Abbildung 6-19 den bei der Anbindung von [³⁵S]-Streptavidin an biotinyliertes Dextran (aus Abbildung 6-10) erhaltenen Werten gegenübergestellt. Wie zu erkennen ist, zeigen beide Kurven einen ähnlichen Verlauf mit einem Maximum bei ca. 75 mol-% T-BSA bzw. 25 mol-% Dextran.

6.2 ANBINDUNG VON DEXTRAN AN DER SENSOROBERFLÄCHE

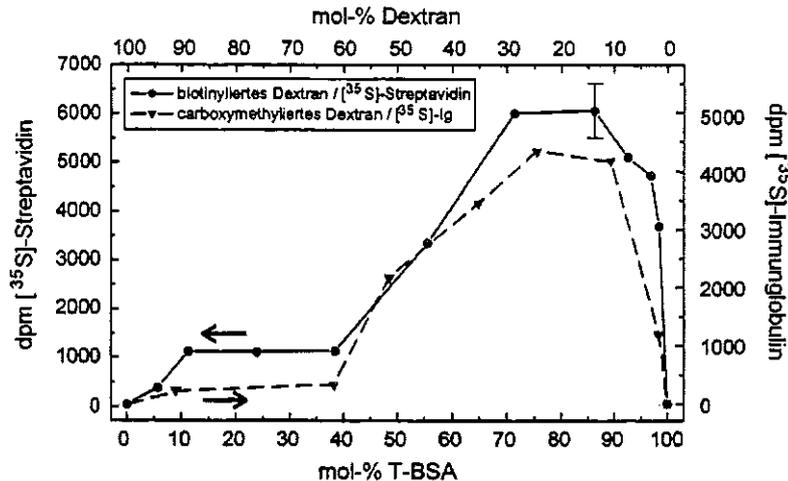


Abb. 6-19: Ermittlung des optimalen Mischungsverhältnisses von T-BSA und Dextran beim CoCoating-Prozeß mittels zweier Systeme zur Anbindung von radioaktiv markiertem Protein (Mittelwerte aus jeweils drei Messungen) (CoCoating: 15 ng/mm² Dextran; T-BSA; Trocknung: 2 h, 10⁻³ mbar, RT; Belichtungszeit: 45 min)

Ebenso ist bei der zweiten Versuchsreihe, der in Kapitel 6.2.3.4.2.2 vorgestellten Optimierung der aufgetragenen Dextranmenge, ein übereinstimmendes Verhalten festzustellen. Wie Abbildung 6-20 zu entnehmen, ergibt sich in beiden Fällen ein Anstieg des Signals bis zu einer aufgetragenen Dextranmenge von ca. 30 bis 40 ng/mm² mit nachfolgendem Übergang in einen konstanten Wert.

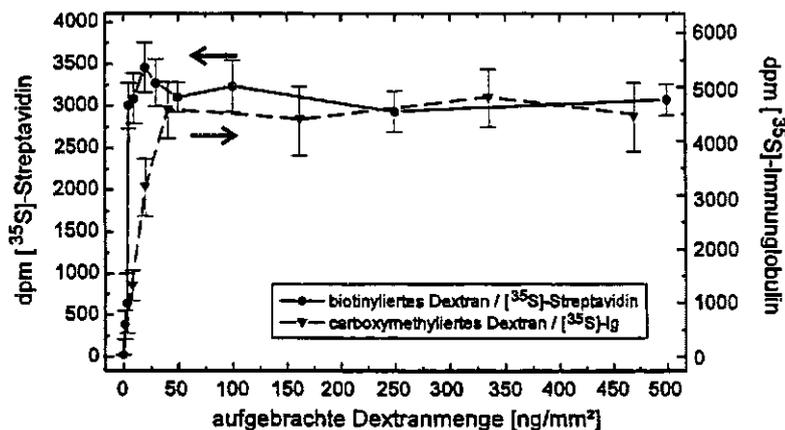


Abb. 6-20: Ermittlung der optimalen Menge an aufgetragener Dextran beim Layer-Coating-Prozeß mittels zweier Systeme zur Anbindung von radioaktiv markiertem Protein (Mittelwerte aus jeweils drei Messungen) (Layer-Coating: 125 ng/mm² T-BSA; Dextran; Trocknung: 2 h, 10⁻³ mbar, RT; Belichtungszeit: 45 min)

Mit diesen beiden Versuchsreihen konnte gezeigt werden, daß die einfachere und schnellere Anbindung von [³⁵S]-Streptavidin an biotinyliertes Dextran eine Optimierung der Dextran-Immobilisationsprozedur erlaubt, die zu den gleichen optimalen Parametern führt, wie eine aufwendigere Anbindung an carboxymethyliertes Dextran über NHS-Ester-Aktivierung.

6.2.3.4.6 Zusammenfassung der optimalen Beschichtungsbedingungen

Die ermittelten optimalen Beschichtungsbedingungen zur Coimmobilisation von Dextranen mit T-BSA sind in Tabelle 6-6 zusammengefaßt. Die komplette Beschichtungsprozedur ist in Kapitel 3.5.2 ausführlich beschrieben.

Bei den angegebenen Werten ist das Molekulargewicht des Dextrans unerheblich. Es wurde für Dextrane der Molekulargewichte 10.000 und 70.000 nachgewiesen, daß sich die optimalen Parameter (bezüglich der Masse des aufgetragenen Dextrans) nicht unterscheiden.

Layer-Coating:	125 ng/mm ² T-BSA 30 ng/mm ² Dextran
CoCoating:	95 Gew.-% T-BSA 5 Gew.-% Dextran
Trocknung:	10 ⁻³ mbar; 2 h
Belichtung:	45 min (348 nm)
Waschen: (5 min; RT)	5 x 3 M KSCN 3 x PBS / Tween (1 x Inkubation über Nacht) 3 x H ₂ O bidest.

Tab. 6-6: Zusammenfassung der optimalen Beschichtungsparameter zur Coimmobilisation von Dextranen mit T-BSA

6.2.3.5 Reproduzierbarkeit der Beschichtungsprozeduren

Die Reproduzierbarkeit der CoCoating- und der Layer-Coating-Prozedur wurde ermittelt, indem die Coimmobilisation von biotinyliertem Dextran auf jeweils 12 parylenbeschichteten Glasplättchen unter Berücksichtigung der optimierten Bedingungen (siehe Kapitel 6.2.3.4.6) durchgeführt wurde. Aus den Meßsignalen der Flüssigszintillationszählung nach der Beprobung mit [³⁵S]-Streptavidin wurde dann die Streuung als die Abweichung des größten vom kleinsten Meßwert ermittelt.

In Abbildung 6-21 sind die bei beiden Beschichtungsprozeduren erhaltenen Signale dargestellt. Man kann der Abbildung entnehmen, daß die Streuung beim Layer-Coating-Prozeß mit 10 % größer ist als die beim CoCoating-Prozeß mit 8 %. Dieser Unterschied ist auf die aufwendigere Beschichtungsmethode des Layer-Coatings zurückzuführen, da in diesem Fall zwei Arbeitsschritte mehr als beim CoCoating notwendig sind.

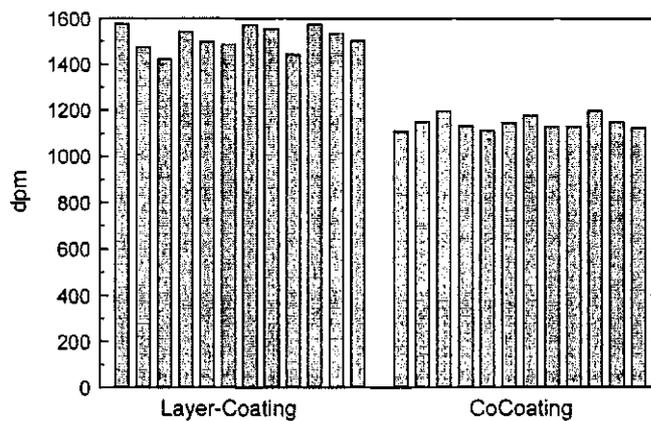


Abb. 6-21: Ermittlung der Reproduzierbarkeit der Beschichtungsprozedur (Layer-Coating: 63 ng/mm² T-BSA, 15 ng/mm² biotinyliertes Dextran; CoCoating: 300 ng/mm² T-BSA; 15 ng/mm² biotinyliertes Dextran; Trocknung: 2 h, 10⁻³ mbar, RT; Belichtungszeit: 45 min)

Die in Abbildung 6-21 dargestellten Meßsignale stammen von Glasplättchen, die in jeweils vier getrennten Arbeitsgängen (mit je 3 Plättchen pro Arbeitsgang) beschichtet wurden. Die Plättchen wurden somit zwar auf identische Art und Weise hergestellt, jedoch mit jeweils neu angesetzten Dextran- und T-BSA-Lösungen und in getrennten Beschichtungs-, Trocknungs-, Belichtungs- und Waschvorgängen.

Weiterführende Experimente zeigten, daß sich bei Verwendung der gleichen Lösungen und bei simultaner Beschichtung die Werte der Streuung jeweils um etwa 1 % auf ca. 7 % bei CoCoating und ca. 9 % bei Layer-Coating reduzieren lassen.

6.2.3.6 Langzeitstabilität der Dextranbeschichtung

Zur Untersuchung der Stabilität der Dextranbeschichtung sind Versuchszeiten von einigen Tagen bis Monaten notwendig. Da vermieden werden sollte, daß die relativ kurze Halbwertszeit des Isotops [³⁵S] von 87,2 Tagen (siehe Anhang G) das Meßergebnis beeinflusst, wurde für diese Messungen auf die Immobilisation von [³H]-markiertem Dextran anstelle von biotinyliertem Dextran zurückgegriffen. Das Isotop [³H] hat eine Halbwertszeit von 12,26 Jahren, so daß bei den folgenden Experimenten davon ausgegangen werden kann, daß über den gesamten Meßzeitraum die Zahl der radioaktiven Zerfälle in erster Näherung konstant bleibt.

6.2.3.6.1 Verbesserung der Stabilität durch kovalente Anbindung des Dextrans

In Kapitel 6.2.3.3.2 wurde festgestellt, daß Dextrane sehr gut auf den polymerbeschichteten Oberflächen haften. Zur möglichst quantitativen Entfernung von nicht-kovalent gebundenem Dextran von der Oberfläche ist, wie beschrieben, eine relativ aufwendige Waschprozedur notwendig. Es stellt sich nun die Frage, ob die kovalente Anbindung des Dextrans mit der beschriebenen Beschichtungsprozedur überhaupt gerechtfertigt ist, wenn eventuell

auch eine rein adsorptive Immobilisation von Dextran für biosensorische Zwecke ausreichen würde. Aus diesem Grund wurde die Stabilität beider Beschichtungsarten miteinander verglichen, indem die dextranbeschichteten Glasplättchen in Phosphatpuffer gespült und die Änderung der auf der Oberfläche vorhandenen Dextranmenge mittels Flüssigszintillationszählung ermittelt wurde. Das Spülen in Phosphatpuffer simuliert dabei einen längeren Betrieb des dextranbeschichteten Sensors bei biosensorischen Experimenten.

Parylenbeschichtete Glasplättchen wurden einerseits durch CoCoating von [^3H]-Dextran mit T-BSA (siehe Kapitel 3.5.2.1) und andererseits durch Adsorption von [^3H]-Dextran (siehe Kapitel 6.2.3.3.2) beschichtet. Um die verschiedenen Proben miteinander vergleichen zu können, wurden die Meßwerte der Szintillationszählung (dpm) jeder Probe auf den Meßwert am Tag der Beschichtung normiert. Abbildung 6-22 zeigt den Verlauf der Dextranmenge an der Oberfläche beim Spülen mit Phosphatpuffer über einen Zeitraum von 5 Tagen.

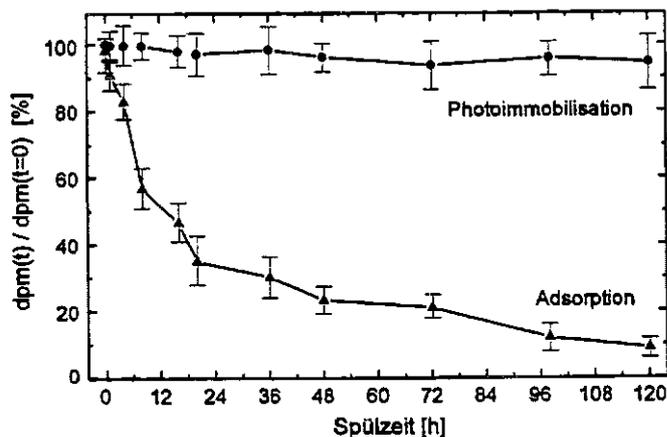


Abb. 6-22: Veränderung der Dextranmenge an der Oberfläche beim Spülen mit 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) (Mittelwerte aus jeweils drei Messungen) (Adsorption: 300 ng/mm² [^3H]-Dextran; Trocknung: 30 min, 30 mbar; Waschen: 3 x 250 μl 50 mM PBS, 3 x 250 μl H₂O bidest.; CoCoating: 300 ng/mm² T-BSA; 15 ng/mm² [^3H]-Dextran; Trocknung: 2 h, RT, 10⁻³ mbar; Belichtungszeit: 45 min)

Bei den mittels Photoimmobilisation beschichteten Proben ist über diesen Zeitraum hinweg keine Abnahme des Signals festzustellen. Dagegen zeigen die Proben, bei denen Dextran per Adsorption immobilisiert wurde, innerhalb der ersten 12 Stunden einen drastischen Abfall des Signals auf etwa 50 % des Ausgangswertes und innerhalb der nächsten 4,5 Tage eine langsame Reduktion bis auf ca. 10 %. Dies bedeutet, daß durch Spülen mit Phosphatpuffer zunächst innerhalb eines halben Tages etwa die Hälfte des an der Oberfläche adsorbierten Dextrans abgelöst wird und auch im Anschluß daran die Dextranmenge kontinuierlich weiter abnimmt. Eine derartige zeitabhängige Veränderung der Beschichtung schließt reproduzierbare Messungen aus. Eine kovalente Anbindung des Dextrans ist daher unbedingt erforderlich.

6.2.3.6.2 Langzeitstabilität bei Lagerung

Die dextranbeschichteten Oberflächen sollen als Ausgangsbasis für die Immobilisation von Biomolekülen dienen. Dazu ist es zweckmäßig, eine große Anzahl von Bauteilen mit einer möglichst identischen Dextranbeschichtung zu versehen und die so beschichteten Bauteile dann bis zum Gebrauch zu lagern.

Eine solche Lagerung sollte für Dextrane selbst unbedenklich sein, da diese nur von wenigen Mikroorganismen angegriffen und abgebaut werden können (siehe Kapitel 6.1.2). Allerdings könnte der verwendete Photolinker ein Problem darstellen, da im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur auf T-BSA als Photolinker zurückgegriffen werden konnte (siehe Kapitel 6.2.3.1). Das BSA kann die Lagerung eventuell zeitlich begrenzen, da durch die Zerstörung der Proteinstruktur die Vernetzung zwischen Oberfläche und Dextran gelöst werden kann.

Zur Untersuchung der Langzeitstabilität der Dextranbeschichtung bei Lagerung wurden parylenbeschichtete Glasplättchen mittels CoCoating beschichtet (siehe Kapitel 3.5.2.1), nach Belichtung und Waschen getrocknet und schließlich im getrockneten Zustand bis zu 190 Tage im Kühlschrank bei 5°C gelagert. Vor der Szintillationsmessung wurden die Proben zunächst 30 min mit 20 mM PBS gespült, um ein Quellen der Dextranschicht zu ermöglichen und dann nochmals der Waschprozedur (siehe Kapitel 6.2.3.3.2) unterzogen.

In Abbildung 6-23 sind die erhaltenen Daten der Szintillationsmessung in Abhängigkeit von der Dauer der Lagerung dargestellt. Es ist innerhalb des gesamten Versuchszeitraums keine Abnahme des Signals und damit der immobilisierten Dextranmenge zu beobachten. Das bedeutet, daß eine Trockenlagerung dextranbeschichteter Bauteile unter den angegebenen Bedingungen mindestens ein halbes Jahr möglich ist.

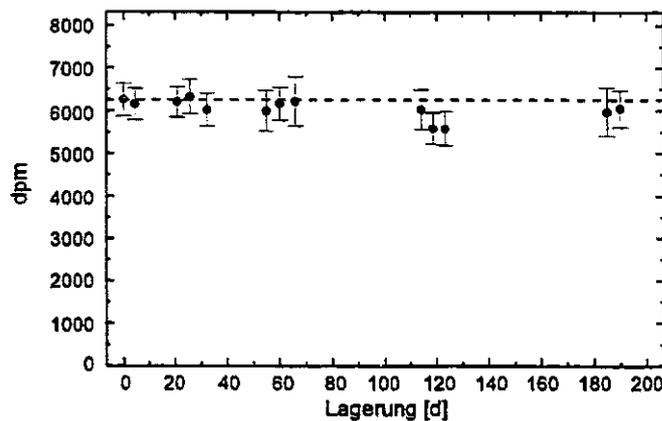


Abb. 6-23: Untersuchung der Langzeitstabilität der Dextranbeschichtung bei Lagerung (Mittelwerte aus jeweils drei Messungen) (CoCoating: 300 ng/mm² T-BSA; 15 ng/mm² [³H]-Dextran; Trocknung: 2 h, 10⁻³ mbar, RT; Belichtungszeit: 45 min; Waschen; Trocknung: 30 min, 30 mbar; Lagerung bei 5°C)

6.2.3.7 Vergleich der Beschichtungsprozeduren

In Kapitel 6.2.3.4 wurden die beiden Beschichtungsprozeduren CoCoating und Layer-Coating vorgestellt und optimiert. Allerdings empfiehlt es sich bei der Dextranbeschichtung von OFW-Bauelementen nur eine der beiden Methoden heranzuziehen, so daß die Dextranschicht auf allen Bauteilen einheitlich ist, um eine möglichst optimale und identische Basis für die Immobilisation von Proteinen zu schaffen.

Bei der Auswahl der geeigneten Beschichtungsprozedur spielen verschiedene Faktoren eine Rolle.

- Eine Beschichtung mittels CoCoating ist schneller durchführbar als eine Beschichtung mittels Layer-Coating, da der CoCoating-Prozeß zwei Arbeitsschritte gegenüber dem Layer-Coating einspart (Trocknung und weiterer Beschichtungsschritt).
- Beim CoCoating-Prozeß treten weniger Fehlerquellen auf, womit die Reproduzierbarkeit besser ist als die des Layer-Coating-Prozesses (siehe Kapitel 6.2.3.5).
- Und schließlich kann beim CoCoating, wie in Kapitel 6.2.3.4.1.2 gezeigt wurde, in einem gewissen Bereich beliebig viel Dextran auf der Oberfläche immobilisiert werden. Dabei wird auch die T-BSA-Menge durch Einhalten des optimalen Mischungsverhältnisses variiert. Dagegen ist beim Layer-Coating die maximal immobilisierbare Dextranmenge begrenzt (siehe Kapitel 6.2.3.4.2.2), wobei unabhängig von der Dextranmenge die Menge an aufgebrachtem T-BSA durch die Optimierung auf 125 ng/mm² festgelegt ist. Dies bedeutet, daß die optimale T-BSA-Schicht bei geringeren Dextranmengen einen unverhältnismäßig hohen Anteil der Beschichtung ausmacht und damit diese für die Immobilisation von Proteinen nicht nutzbare Photolinkerschicht einen erheblichen Beitrag zur Dämpfung des OFW-Bauelements leistet.

Angesichts der genannten Vorteile einer CoCoating-Beschichtungsprozedur wurde im Folgenden mit dieser Methode weitergearbeitet.

6.2.3.8 Übertragung der Beschichtungstechnik auf OFW-Bauelemente

Abschließend muß die anhand von beschichteten Glasplättchen und Flüssigszintillationszählung optimierte Beschichtungstechnik auf OFW-Bauelemente übertragen werden. Dazu wurden die schutzbeschichteten OFW-Bauelemente mittels CoCoating mit der optimierten Mischung von T-BSA und Dextran beschichtet und die für die verwendeten Bauteile optimale Dextranmenge bestimmt. Im Anschluß daran wurden die aus Szintillationsmessung und Frequenzmessung erhaltenen Ergebnisse verglichen.

6.2.3.8.1 Bestimmung geeigneter Dextranmengen auf der OFW-Sensoroberfläche

Beim Einsatz von OFW-Bauelementen kann die auf den Sensor aufgebrauchte Dextranmenge nicht beliebig erhöht werden, da die Dämpfung des Bauteils mit der aufgebrauchten Menge steigt. Wie schon in Kapitel 3.3.3 beschrieben, kann der HF-Verstärker Einfügedämpfungen des OFW-Bauelements im HF-Schwingkreis von bis zu 18 dB ausgleichen. Da die Dextranschicht die Immobilisationsbasis für Proteine darstellt, muß bei der Dämpfung des Bauteils nach der Dextranbeschichtung noch ein gewisser Spielraum für weitere Masseanbindungen vorhanden sein. Daher ist es notwendig, ein Optimum zu finden, bei dem die Dextranmatrix möglichst dick ist, um möglichst viel Protein anbinden zu können und damit hohe Sensitivitäten zu erzielen, aber gleichzeitig die Dämpfung des Bauteils auch nach der Immunoreaktion nicht über die Grenze von 18 dB steigt.

Dazu wurden parylenbeschichtete OFW-Bauelemente analog zu Kapitel 6.2.3.4.1.2 mittels CoCoating-Prozeß mit der optimierten Mischung aus biotinyliertem Dextran und T-BSA beschichtet (siehe Kapitel 3.5.2.1), wobei die Menge an aufgebrachtem Dextran bei gleichbleibender Mischungszusammensetzung variiert wurde. In Abbildung 6-24 sind die Transmissionskurven der Bauelemente dargestellt, wobei die den einzelnen Kurvenscharen zugeordneten Zahlenwerte die Menge an jeweils aufgebrachtem Dextran wiedergeben.

Aus den oben genannten Gründen eignen sich für die Verwendung zu biosensorischen Zwecken am besten dextranbeschichtete Bauteile mit einer Dämpfung von ca. 10 bis 12 dB. Diese Forderung wird nach Abbildung 6-24 von Bauelementen erfüllt, bei denen die mittels CoCoating aufgebrauchte Dextranmenge etwa 12 bis 20 ng/mm² beträgt. Das entspricht nach Abbildung 6-13 einer immobilisierten Dextranmenge von ca. 1 bis 2 ng/mm².

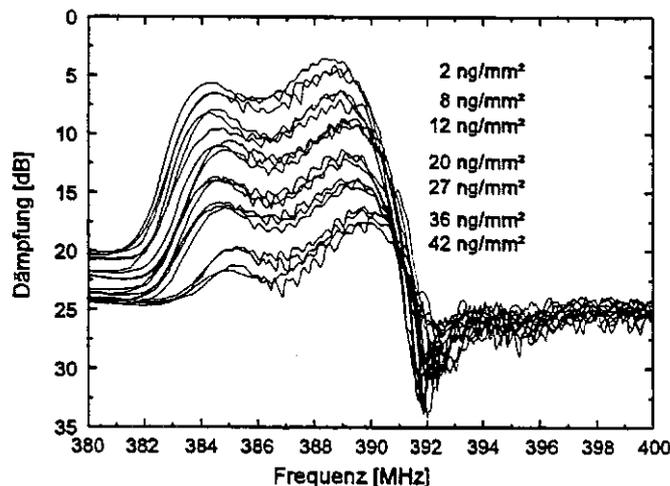


Abb. 6-24: Transmissionskurven von OFW-Bauelementen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen der optimierten Mischung von T-BSA und Dextran beschichtet sind, in 20 mM Phosphatpuffer (jeweils 2 bis 3 gleichbeschichtete OFW-Bauteile) (Schutzschicht: Parylen; CoCoating: 5 Gew.-% biotinyliertes Dextran; 95 Gew.-% T-BSA; Trocknung: 2 h, 10⁻³ mbar, RT; Belichtungszeit: 45 min)

6.2.3.8.2 Vergleich von Szintillationsmessung und Messung der Frequenzänderung

Bei der Flüssigszintillationsmessung und der Messung der Frequenzänderung mit dem OFW-Bauteil handelt es sich um zwei grundsätzlich verschiedene Meßprinzipien (siehe Kapitel 6.2.3.2).

Während die Szintillationszählung sämtliche an der Oberfläche immobilisierte, radioaktiv markierte Proteine mit gleicher Gewichtung mißt, ist dies bei der massesensitiven Messung mit OFW-Bauelementen grundsätzlich nicht anzunehmen, da die Oberflächenwelle nur eine in der Größenordnung der Wellenlänge liegende Eindringtiefe in die Beschichtung und eine damit verbundene Energieverteilung über die Entfernung von der Sensoroberfläche hat. Folglich ist eine Beeinflussung des Signals bei der Messung der Frequenzänderung durch die dreidimensionale Matrix der Dextranbeschichtung möglich.

Daher kann zunächst nicht prinzipiell davon ausgegangen werden, daß alle innerhalb der Matrix angebondenen Proteine unabhängig von der Entfernung zur Oberfläche den gleichen Beitrag zum Sensorsignal leisten.

Die nachfolgenden Messungen sollen zeigen, ob eine Optimierung mittels Szintillationszählung dennoch zu Ergebnissen führt, die auch auf die Frequenzmessungen übertragbar sind.

Dazu wurden parylenbeschichtete OFW-Bauelemente mittels CoCoating mit biotinyliertem Dextran beschichtet (siehe Kapitel 3.5.2.1).

Nach dem Einbau in den Oszillatorschaltkreis und die Durchflußapparatur wurde mit einer Mischung aus [³⁵S]-Streptavidin und [³²S]-Streptavidin (Verhältnis ca. 1:20) in unterschiedlichen Konzentrationen beprobt und die dabei resultierende Frequenzänderung gemessen (siehe Kapitel 3.7.2.2).

Anschließend wurden die Sensoren mit 50 mM PBS gewaschen und die angebundene Menge an Streptavidin mittels Flüssigszintillationszählung bestimmt.

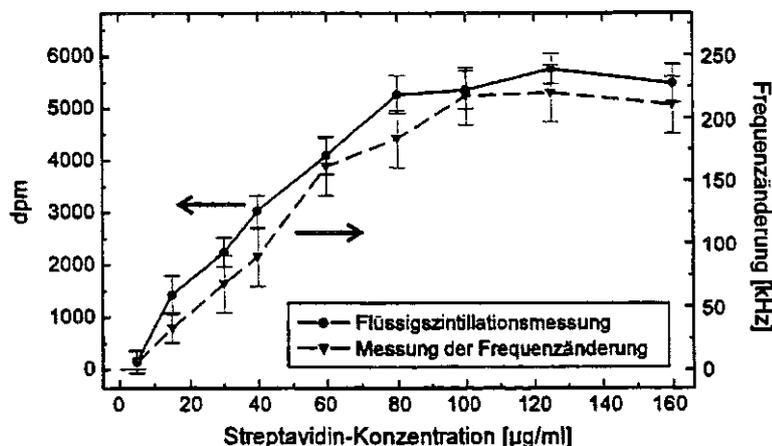


Abb. 6-25: Vergleich von Szintillationsmessung und Messung der Frequenzänderung (Mittelwerte aus jeweils drei Messungen) (Schutzschicht: Parylen; CoCoating: 15 ng/mm² biotinyliertes Dextran; 300 ng/mm² T-BSA; Trocknung: 2 h, 10⁻³ mbar, RT; Belichtungszeit: 45 min)

6.2 ANBINDUNG VON DEXTRAN AN DER SENSOROBERFLÄCHE

Abbildung 6-25 gibt die ermittelten Frequenzänderungen und Meßwerte der Szintillationszählung in Abhängigkeit von der Streptavidinkonzentration an. Man erkennt, daß sich für beide Meßmethoden ein vergleichbarer Kurvenverlauf ergibt. Es ist in beiden Fällen ein linearer Anstieg der Signale bis zu einer Konzentration von etwa 80 µg/ml und ein konstanter Wert ab ca. 100 µg/ml Streptavidin, der auf eine Sättigung der am Dextran vorhandenen Biotingruppierungen schließen läßt, zu beobachten.

Der Einfluß der unterschiedlichen Entfernungen von der Sensoroberfläche der innerhalb der dreidimensionalen Matrix angebondenen Proteine auf das OFW-Sensorsignal ist somit im hier untersuchten Bereich vernachlässigbar, Szintillationszählung und Frequenzmessung führen zu den gleichen Resultaten. Damit ist eine Übertragung der an Glasplättchen optimierten Parameter auf Messungen mit dextranbeschichteten OFW-Bauteilen möglich.

6.3 IMMOBILISATION VON BIOMOLEKÜLEN AN DER DEXTRANBESCHICHTETEN OBERFLÄCHE

Bei der Herstellung eines Biosensors ist die Methode zur Immobilisation von Biomolekülen an der Sensoroberfläche ein wesentlicher Punkt der Entwicklung. Im allgemeinen ist bei der Entwicklung einer neuen Methode eine Reihe von Optimierungsschritten notwendig, um reproduzierbare und im Idealfall auch reversible Sensorsignale zu erzielen.

Für die Immobilisation von Biomolekülen an dextranbeschichteten Oberflächen existiert bereits eine Vielzahl von Methoden, die in diversen Publikationen untersucht und beschrieben worden sind [sha90, sha92, joh91, joh95, mil95, löf93, kar91, cha92]. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit einige bereits optimierte Parameter dieser Immobilisationsprozeduren übernommen. Die Methoden wurden an das Meßproblem mit OFW-Bauelementen adaptiert und der Einfluß der optimierten Parameter in einigen Punkten überprüft, wobei die entsprechenden Abhängigkeiten erstmals anhand massesensitiver Sensoren nachgewiesen werden konnten.

An mit carboxymethylierten Dextranen beschichtete Sensoroberflächen können verschiedenste Biomoleküle (im folgenden Liganden genannt) kovalent angebunden werden. Die in einem entsprechenden pH-Wert-Bereich negativ geladene Oberfläche dient dabei der Anreicherung der Liganden in der dreidimensionalen Hydrogel-Matrix. Die kovalente Anbindung kann mit Hilfe einer großen Anzahl unterschiedlichster Immobilisationsmethoden erfolgen. Die Auswahl der geeigneten Methode richtet sich unter anderem nach der Natur des Liganden und auch nach dem Zweck der Immobilisation.

Drei der am häufigsten verwendeten Methoden, die eine einfache und schnelle Anbindung nahezu beliebiger Biomoleküle unter milden Bedingungen ermöglichen, sind in Abbildung 6-26 dargestellt. Sie gehen jeweils von einer Aktivierung des carboxymethylierten Dextrans mittels N-Hydroxysuccinimid (NHS) und N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) aus. Die so gebildeten NHS-Ester werden entweder direkt mit Liganden mit primären Aminogruppen umgesetzt, oder es wird Streptavidin angebunden, so daß biotinylierte Liganden immobilisiert werden können. Als dritte Möglichkeit wird die Reaktion mit Hydrazin gezeigt, die eine Erweiterung der Anwendungsmöglichkeiten auf Liganden mit anderen funktionellen Gruppen darstellt. Dabei werden die als Zwischenstufen erzeugten Hydrazidgruppen mit Aldehydgruppen umgesetzt, die beispielsweise bei Antikörpern auftreten, deren Kohlenwasserstoffkette oxidiert wurde.

Die beiden erstgenannten Methoden kamen im Verlauf dieser Arbeit zum Einsatz und werden im Folgenden ausführlicher beschrieben.

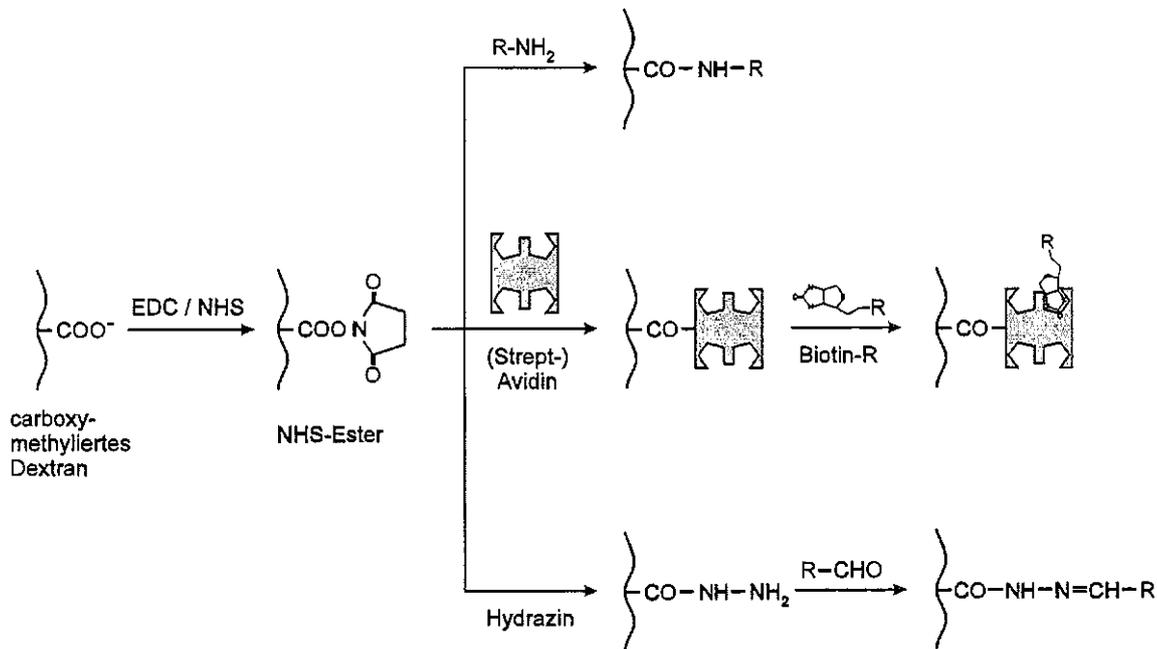


Abb. 6-26: Schematische Darstellung von drei Immobilisationsmethoden für die Anbindung von Biomolekülen an carboxymethyliertes Dextran

6.3.1 NHS-Ester-Aktivierung der Dextranmatrix und Aminkopplung

Die am häufigsten verwendete Immobilisationsmethode an carboxymethyliertem Dextran ist die Aminkopplung, wobei die Aktivierung der Carboxylgruppen mittels Carbodiimid-Chemie erfolgt. Die dabei gebildeten NHS-Ester reagieren mit nukleophilen Gruppen unter Abspaltung von NHS und Ausbildung einer kovalenten Bindung. Als nukleophile Gruppen kommen vor allem primäre Aminogruppen in Betracht, wie sie beispielsweise am N-Terminus und in Lysinresten bei Proteinen und Peptiden vorhanden sind. Aber auch die Thiolgruppe von Cystein, in gewissem Maße die Imidazolgruppe von Histidin und die Hydroxyphenylgruppe von Tyrosin können auf diese Weise zur Immobilisation herangezogen werden [joh91].

Diese Methode hat den Vorteil, daß sie unter relativ milden Bedingungen abläuft und eine einfache und schnelle Immobilisation ermöglicht.

6.3.1.1 Prinzip der NHS-Ester-Aktivierung

Es ist eine wohlbekanntete Tatsache, daß die Ausbildung von Amidbindungen zwischen Carbonsäuren und Aminen mit Hilfe von Carbodiimiden erreicht werden kann [kho53, det66]. Dabei wird die Carboxylgruppe durch den Angriff wasserlöslicher Carbodiimide in ein O-Acyl-Harnstoff-Derivat überführt. Dieses reaktive Intermediat kann direkt von Aminen angegriffen und in ein Amid überführt werden. Allerdings ergibt die Durchführung dieser Reaktion in wäßrigen Medien nur geringe Ausbeuten aufgrund der schnellen Hydrolyse des aktivierten Zwischenprodukts.

Um die aktivierte Spezies vor Hydrolyse zu schützen und damit die Ausbeute signifikant zu erhöhen, wird im vorliegenden Fall in Gegenwart von NHS gearbeitet. Die dabei gebildeten NHS-Ester sind hydrolyse-stabilere reaktive Intermediate, deren Hydrolyse im Vergleich zur Reaktion mit primären Aminogruppen deutlich langsamer abläuft [sta86]. Die Bedingungen, unter denen diese Reaktionen stattfinden, sind von verschiedenen Autoren untersucht und publiziert worden [cua72, anj87].

Das Prinzip der Anbindung von Liganden an carboxymethylierte Dextrane über NHS-Ester ist in Abbildung 6-27 dargestellt.

Zunächst wird das durch Photoimmobilisation an der schutzbeschichteten Oberfläche angebundene carboxymethylierte Dextran durch EDC und NHS aktiviert. Bei dieser 1-Schritt-Aktivierung kommt es zu einer Umwandlung von etwa 30-40 % der Carboxylgruppen am Dextran in NHS-Ester [joh91]. Die NHS-Ester sind sehr reaktiv und haben im gegebenen Puffersystem eine Halbwertszeit von etwa 15 Minuten auf der Sensoroberfläche [joh91]. Wird nun der Ligand zugegeben, so bindet dieser durch nukleophile Substitution über eine seiner Aminogruppen unter Abspaltung von NHS am Dextran an.

Nach der Anbindung der Liganden ist im allgemeinen noch immer eine Vielzahl von aktiven NHS-Ester-Gruppen am Dextran vorhanden. Um unerwünschte Immobilisation von Komponenten während der Analyse zu vermeiden, müssen die überschüssigen NHS-Ester deaktiviert werden. Dies geschieht mit Ethanolamin, wobei die NHS-Ester in 2-Hydroxy-Ethylamid-Derivate überführt bzw. unter diesen Bedingungen auch teilweise hydrolysiert werden.

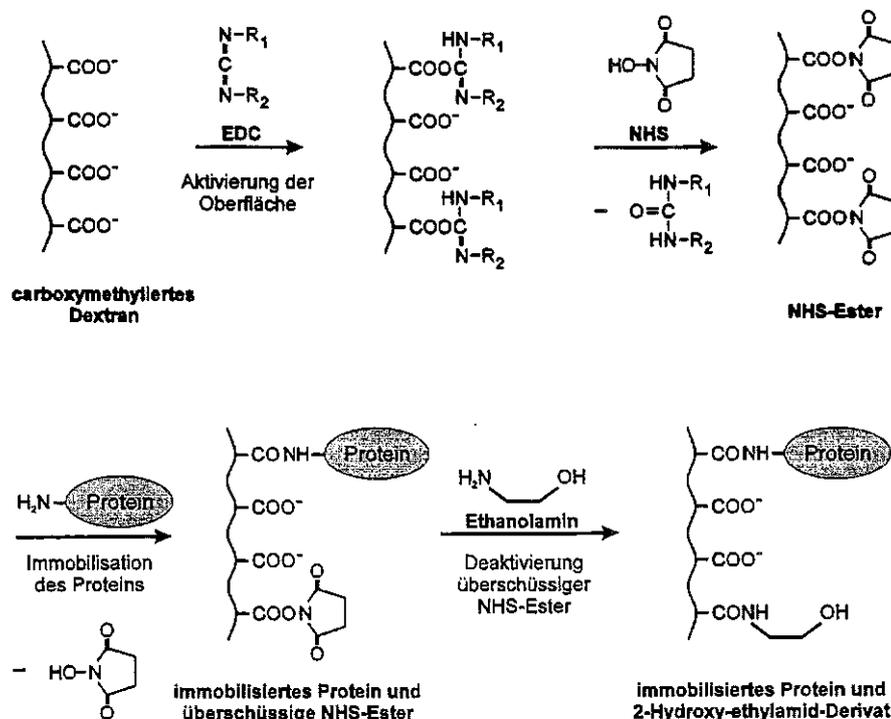


Abb. 6-27: Immobilisierung von Biomolekülen an carboxymethyliertem Dextran mittels Carbodiimid-Chemie über NHS-Ester

6.3.1.2 Durchführung der Immobilisation und Beobachtung der Sensorantwort

Die Immobilisation von Liganden an carboxymethyliertem Dextran erfolgt nach einer an überwiegend optischen Sensorsystemen gut untersuchten Standardprozedur [joh91, kar91, löf93, von93]. Diese Prozedur wurde für OFW-Sensoren aufgegriffen und adaptiert. Die allgemeine Vorgehensweise zur Durchführung der Immobilisation ist in Kapitel 3.6 beschrieben; genaue Versuchsparmeter finden sich bei den jeweiligen Beschreibungen der Experimente und den entsprechenden Bildunterschriften.

Die Immobilisationsprozedur kann anhand der Sensorantwort verfolgt werden, wie in Abbildung 6-28 am Beispiel einer Immobilisation von polyklonalen anti-Glucoseoxidase (GOD) Antikörpern exemplarisch dargestellt. Dabei wurde der mit carboxymethyliertem Dextran beschichtete OFW-Sensor zunächst mit Puffer gespült und dabei die Basislinie aufgenommen. Anschließend erfolgte die 1-Schritt-Aktivierung mit EDC und NHS. Daraufhin wurde zum Immobilisationspuffer gewechselt und mit der Lösung von anti-GOD Antikörpern im Immobilisationspuffer beprobt. Im Anschluß daran fand die Deaktivierung überschüssiger NHS-Ester durch Ethanolamin sowie das Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit BSA statt.

Die Sensorsignale bei dieser Prozedur sind hauptsächlich auf Leitfähigkeitsänderungen (schnelle Frequenzänderungen beim Beprobieren mit Lösungen unterschiedlicher Leitfähigkeit), auf Viskositätsänderungen (durch chemische Modifikationen bzw. unterschiedliche pH-Werte oder Salzgehalte der Lösungen und damit Veränderungen des Ionisationsgrads sowie des Quellungszustands des carboxymethylierten Dextrans) und auf Masseabscheidung (langsame Frequenzänderungen bei der Anbindung des Liganden bzw. beim Blocken mit BSA) zurückzuführen.

Die Frequenzänderung Δf gegenüber dem Ausgangswert, die sich beim Spülen mit Basispuffer nach dem Deaktivierungsschritt einstellt, ist auf die kovalente Anbindung des Liganden zurückzuführen und dient damit der Kontrolle der Immobilisationsprozedur.

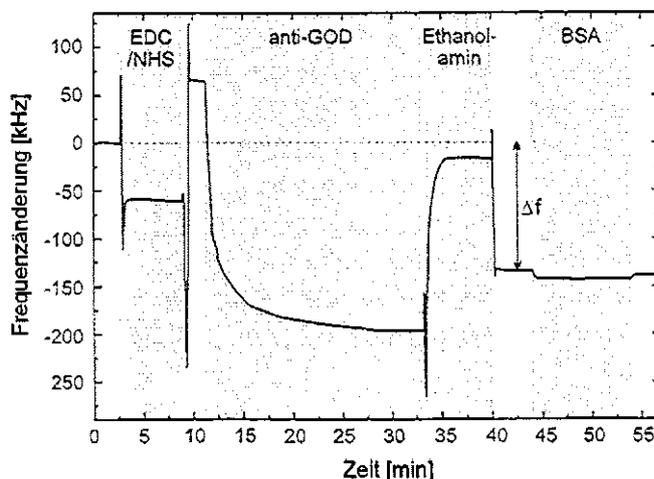


Abb. 6-28: Sensorantwort bei der Immobilisation von Liganden an carboxymethyliertem Dextran (Schutzschicht: Polyimid; Basispuffer: 20 mM PBS mit 140 mM NaCl, pH 7,2; 400 mM EDC, 100 mM NHS; 15 µg/ml polyklonale anti-GOD Antikörper in 10 mM Acetatpuffer, pH 5,0; 1 M Ethanolamin; 1 mg/ml BSA)

6.3.1.3 Optimierung der Immobilisationsmethode

Die Immobilisationsmethode mittels NHS-Ester-Aktivierung soll an die Anwendung mit OFW-Bauteilen adaptiert werden. Dazu wird von den teilweise literaturbekannten optimalen Parametern ausgegangen, die in einigen Punkten angepaßt bzw. überprüft werden. Primäres Ziel dabei ist es, die Bedingungen so zu optimieren, daß maximale Ligandmengen immobilisiert und maximale Sensitivitäten erzielt werden können.

6.3.1.3.1 Aktivierungs- und Deaktivierungsschritt

Für die im Aktivierungsschritt benötigten Lösungen von EDC und NHS sind in der Literatur Werte zwischen 10 bis 400 mM EDC und 1 bis 100 mM NHS angegeben; für das Verhältnis von EDC und NHS sind Werte zwischen 1:1 und 10:1 zu finden [joh91, joh95, kar91, löf93, yon93].

Zur Bestimmung geeigneter Konzentrationen und Verhältnisse wurden mit carboxymethyliertem Dextran beschichtete Glasplättchen mit einer frisch zubereiteten Mischung aus jeweils 10 µl der unterschiedlich konzentrierten wäßrigen Lösungen von EDC und NHS behandelt und daraufhin [³⁵S]-Immunglobulin (Ig) immobilisiert. Nach anschließender Deaktivierung und dreimaligem Waschen mit 20 mM PBS/Tween wurden die Plättchen im Szintillationszähler vermessen.

Auch in diesem Fall wurde auf eine exakte Berechnung der angebondenen Proteinmenge verzichtet (zur Quantifizierung der durch NHS-Ester-Aktivierung immobilisierten Proteinmenge sei auf Kapitel 6.3.1.3.2.4 verwiesen) und die angegebenen γ -Werte (dpm) als Maß für die immobilisierte Menge an [³⁵S]-Immunglobulin herangezogen.

Die so erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 6-29 grafisch dargestellt. Die beiden Kurven repräsentieren zwei unterschiedliche Konzentrationen von NHS, die sich auf EDC-Konzentrationen zwischen 10 und 500 mM beziehen.

Man erkennt, daß die Menge an immobilisiertem Protein bei Verwendung der konzentrierteren NHS-Lösungen größer ist. Weiterhin nimmt bei gleichbleibender Konzentration von NHS die Menge an immobilisiertem Protein mit zunehmender Konzentration von EDC zu und erreicht schließlich ein Maximum. Die Position dieses Maximums ist abhängig von der Konzentration an NHS. Bei Verwendung von 100 mM NHS wird das Maximum bei 400 mM EDC erreicht, bei 50 mM NHS bei 200 mM EDC. Das bedeutet, daß sich in beiden Fällen ein optimales Molverhältnis EDC/NHS von 4:1 ergibt, so daß im Folgenden mit einer 1:1-Mischung von 400 mM EDC und 100 mM NHS gearbeitet wird.

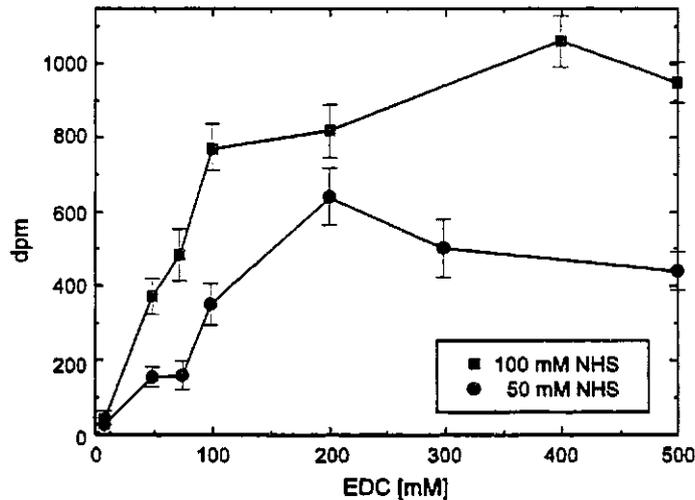


Abb. 6-29: Ermittlung geeigneter Konzentrationen und Verhältnisse von EDC und NHS durch Messung der Radioaktivität nach Immobilisation von $[^{35}\text{S}]$ -Immunglobulin (Schicht: Parylen; Basispuffer: 20 mM PBS mit 140 mM NaCl, pH 7,2; Mischungen aus gleichen Teilen von EDC und NHS wie angegeben, Aktivierungszeit: 10 min; 50 $\mu\text{g/ml}$ rabbit $[^{35}\text{S}]$ -Ig in 10 mM Acetatpuffer, pH 5,0, Inkubationszeit: 30 min; 1 M Ethanolamin)

Die EDC/NHS-Mischung muß stets frisch angesetzt werden. Yonezawa et al. [yon93] untersuchten die Stabilität der Mischung bei Raumtemperatur und fanden eine lineare Abnahme der immobilisierten Menge an Protein mit dem Alter der Mischung. Nach 6,5 h wurde eine Verminderung der ursprünglichen Aktivität um 46 % festgestellt.

Die Aktivierung des carboxymethylierten Dextrans erfolgt relativ rasch. Allgemein wird eine Aktivierungszeit von 7 bis 10 min empfohlen [joh91]. Eine Verkürzung dieser Zeit führt zu einer geringeren Immobilisationsrate und auch zu einer verminderten Reproduzierbarkeit.

Die Behandlung mit 1 M Ethanolamin (pH 8,5) dient sowohl der Deaktivierung der überschüssigen NHS-Ester-Gruppen, als auch der Entfernung von elektrostatisch gebundenen Substanzen. Im allgemeinen ist eine Deaktivierungszeit von 2 min ausreichend, aber prinzipiell werden Zeiten angesetzt, die der Aktivierungszeit entsprechen, um auch bei Immobilisation geringer Ligandmengen ausreichende Deaktivierung sicherzustellen [joh91].

6.3.1.3.2 Immobilisation des Liganden

Bei einer Aktivierung des carboxymethylierten Dextrans unter Standardbedingungen (400 mM EDC, 100 mM NHS, 7 min, RT) werden etwa 30 bis 40 % der Carboxylgruppen in NHS-Ester umgewandelt [joh91]. Somit bleibt noch immer ein beträchtlicher Anteil an Carboxylgruppen am Dextran vorhanden. Für die Anreicherung des Liganden in der Dextranmatrix, die eine wesentliche Rolle bei der Immobilisation spielt, sind diese unmodifizierten Carboxylgruppen eine wichtige Voraussetzung, denn die Anreicherung wird durch

elektrostatische Wechselwirkungen zwischen negativ geladenen (nicht-aktivierten) Carboxylatgruppen am carboxymethylierten Dextran und positiven Ladungen am Liganden erreicht. Die elektrostatischen Wechselwirkungen werden folglich vom pH-Wert und der Ionenstärke des verwendeten Puffers, in dem der Ligand vorliegt, beeinflusst [ste91].

Die Menge an Ligand, die schließlich immobilisiert wird, zeigt die gleiche Abhängigkeit von den verschiedenen Parametern, wie die Menge an angereichertem Liganden in der Dextranmatrix, da angenommen wird, daß ausschließlich elektrostatisch gebundener Ligand kovalent angebunden wird [joh91]. Folglich ist, um eine möglichst effiziente Immobilisation zu erzielen, eine maximale Anreicherung des Liganden und damit das Arbeiten mit einem bezüglich pH-Wert und Ionenstärke optimierten Immobilisationspuffer nötig. Ebenso muß die Ligandkonzentration im Immobilisationspuffer optimiert werden, um maximale Immobilisation und damit maximale Sensitivität zu erzielen.

6.3.1.3.2.1 Anreicherung von Ligand in der Dextranmatrix

Beprobte man OFW-Bauteile, die mit carboxymethyliertem Dextran beschichtet wurden, und solche, die nur mit Parylen beschichtet sind, wie in Abbildung 6-30 dargestellt, mit Ligand in Immobilisationspuffer (hier: $[^{35}\text{S}]$ -Immunglobulin in 10 mM Acetatpuffer, pH 5,0), so lassen sich zwei deutlich unterschiedliche Sensorsignale feststellen.

Im Falle des parylenbeschichteten Bauelements führt die Beprobung nur zu einer Frequenzänderung von ca. 20 kHz, was üblicherweise bei Adsorptionsprozessen von Proteinen auf polymerbeschichteten OFW-Bauteilen zu erwarten ist.

Bei der Beprobung des mit carboxymethyliertem Dextran beschichteten Bauelements ist allerdings eine Frequenzänderung von ca. 220 kHz zu beobachten. Ursache für dieses große Signal ist eine Anreicherung von Ligand in der Dextranmatrix [löf93]. Dabei trägt der Ligand im Immobilisationspuffer eine positive Nettoladung und wird über elektrostatische Wechselwirkungen im negativ geladenen carboxymethylierten Dextran angereichert.

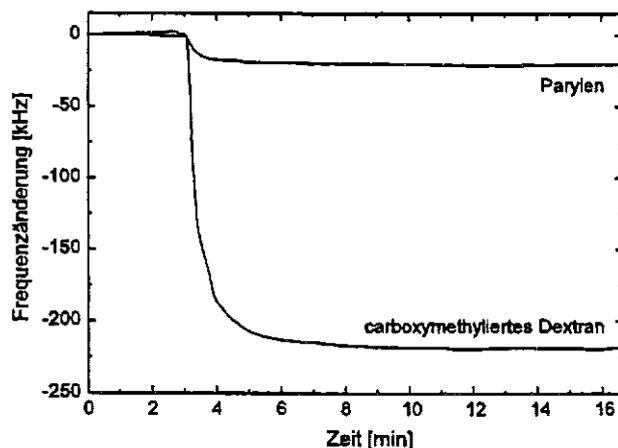


Abb. 6-30: Vergleich der Adsorption von Ligand an einer parylenbeschichteten Oberfläche und der elektrostatischen Anreicherung von Ligand in einer Matrix von carboxymethyliertem Dextran (10 µg/ml rabbit $[^{35}\text{S}]$ -Ig in 10 mM Acetatpuffer, pH 5,0)

Eine Quantifizierung des Anreicherungsprozesses ist mit Hilfe von radioaktiv markierten Liganden möglich (siehe auch Kapitel 6.3.1.3.2.4) [ste91].

Dabei zeigt sich, daß die Oberflächenbedeckung mit [³⁵S]-Immunglobulin auf parylenbeschichteten Oberflächen etwa 1,5 ng/mm² beträgt, was in der Größenordnung einer Bedeckung mit einer Proteinmonolage liegt [ste91, löf93, har96].

Bei carboxymethylierten Dextranen hingegen konnten in diesem Experiment ca. 14 ng/mm² nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis läßt sich so deuten, daß die Dextranmatrix als dreidimensionales Hydrogel Ligandmengen anreichern kann, die mehreren dichtgepackten Monolagen an Proteinen entsprechen [joh91]. Die exakte Struktur dieser Ligand-Dextran-Schicht ist nicht bekannt, sie kann jedoch als Multilage von Liganden angesehen werden, die zwischen den flexiblen, linearen Polymerketten des Dextrans eingelagert ist [löf93].

6.3.1.3.2.2 *pH-Wert des Immobilisationspuffers*

Um eine maximale elektrostatische Wechselwirkung zu erreichen, muß der pH-Wert des Immobilisationspuffers über dem pKa-Wert der Carboxylgruppen am Dextran und unter dem isoelektrischen Punkt (pI) des Liganden (siehe Anhang F) liegen. Unter diesen Bedingungen ist der Ligand im Immobilisationspuffer positiv geladen und wechselwirkt über elektrostatische Kräfte mit dem negativ geladenen carboxymethylierten Dextran.

Allerdings werden für die Bindung des Liganden an die NHS-Ester ungeladene primäre Aminogruppen benötigt, die jedoch erst bei höheren pH-Werten vorherrschen.

Diese beiden Effekte müssen daher für jeden Liganden bei der Optimierung des pH-Wertes berücksichtigt werden. Die Ausbeute der Reaktion (definiert als die Menge an immobilisiertem Liganden dividiert durch die Menge an elektrostatisch gebundenem Liganden) ist bei hohen pH-Werten am größten. Jedoch wird die absolute Menge an immobilisiertem Liganden bei dem pH-Wert maximal, bei dem auch die Anreicherung am größten ist [joh91]. Das bedeutet, daß der optimale pH-Wert für die Immobilisation mit dem optimalen pH-Wert für die Anreicherung übereinstimmt. Daher wird im allgemeinen für den Immobilisationspuffer ein pH-Wert knapp unterhalb des isoelektrischen Punktes des jeweiligen Liganden eingestellt. Tabelle 6-7 gibt einen kurzen Überblick über verschiedene Immobilisationspuffer, die bei Liganden mit unterschiedlichem pI gewählt werden können [ias96].

pI (Ligand)	Immobilisationspuffer
pI > 7	5 mM Maleat (pH 5,5 – 6,0)
5,5 < pI < 7,0	10 mM Acetat (pH 4,0 – 5,5)
3,5 < pI < 5,5	10 mM Formiat (pH 3,0 – 4,5)
pI < 3,5	— (ungeeigneter Ligand)

Tab. 6-7: Immobilisationspuffer bei Liganden mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten

Zur Veranschaulichung der Abhängigkeit der Anreicherung des Liganden vom pH-Wert des Immobilisationspuffers wurden polyklonale anti-Peroxidase (POD) Antikörper in Puffern unterschiedlicher pH-Werte über einen mit carboxymethyliertem Dextran beschichteten Sensor geleitet. Um die unterschiedlichen pH-Werte einzustellen, wurden verschiedene Pufferlösungen verwendet, wobei die Ionenstärke konstant gehalten wurde (siehe Kapitel 6.3.1.3.2.3). Da die Dextranschicht nicht mit EDC/NHS aktiviert wurde, waren die Sensorsignale voll reversibel, d.h. der Ligand wurde nur über elektrostatische Wechselwirkungen in der Matrix gebunden und beim Spülen mit Puffer wieder vollständig entfernt. Die Sensorantworten sind in Abbildung 6-31 dargestellt.

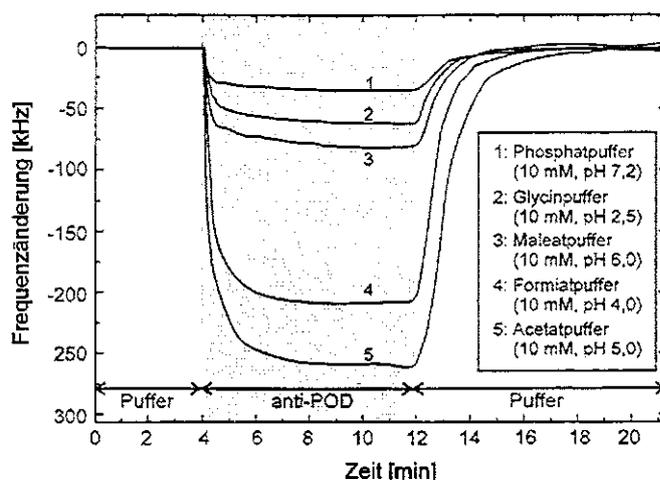


Abb. 6-31: Einfluß des pH-Wertes auf die elektrostatische Anreicherung der Liganden in der Dextranmatrix (Schutzschicht: Parylen; 10 µg/ml polyklonale anti-POD Antikörper in 10 mM Immobilisationspuffer)

Anti-POD Antikörper haben einen isoelektrischen Punkt von etwa 6 – 7 (siehe Anhang F). Nach Tabelle 6-7 sollte damit als idealer Immobilisationspuffer 10 mM Acetatpuffer (pH 4,0 – 5,5) verwendet werden. Dies wird durch Abbildung 6-31 bestätigt.

Bei pH-Werten von 6,0 und 7,2, die über dem isoelektrischen Punkt des Liganden liegen, ist nur eine kleine Frequenzänderung und damit nur geringe Anreicherung in der Matrix festzustellen, da in diesem Fall der Ligand keine positive Nettoladung trägt und damit auch keine elektrostatischen Wechselwirkungen mit den Carboxylatgruppen des carboxymethylierten Dextrans eingehen kann.

Bei pH 2,5 trägt zwar der Ligand die positive Nettoladung, allerdings sind in diesem Fall die Carboxylatgruppen am Dextran ($pK_a = 3,3 - 4,0$ [mya93, joh91]) weitestgehend protoniert, so daß keine negative Ladung am Dextran vorliegt und damit ebenfalls nur eine geringe Anreicherung stattfinden kann.

Bei pH-Werten von 4,0 und 5,0 sind hingegen große Frequenzänderungen zu beobachten, was auf eine starke Anreicherung des Liganden in der Dextranmatrix zurückzuführen ist.

6.3 IMMOBILISATION VON BIOMOLEKÜLEN AN DER DEXTRANBESCHICHTETEN OBERFLÄCHE

Die Anreicherung der Liganden ist eine wesentliche Voraussetzung für die Immobilisation in der Dextranmatrix. Abbildung 6-31 zeigt den Einfluß des pH-Wertes auf die Anreicherung, wobei dieser Einfluß, wie schon beschrieben, in analoger Weise auch für die Immobilisation des Liganden bedeutend ist. Abbildung 6-32 veranschaulicht dies am Beispiel zweier Immobilisationsprozeduren bei unterschiedlichen pH-Werten.

Dabei wurde die Dextranmatrix zunächst mit Basispuffer gespült und mit EDC/NHS-Gemisch aktiviert. Daraufhin erfolgte der Pufferwechsel auf den jeweiligen Immobilisationspuffer, weshalb sich für beide Kurven nach der Aktivierung unterschiedliche Frequenzen einstellen. Beprobung wurde mit polyklonalen anti-GOD Antikörpern im entsprechenden Immobilisationspuffer; anschließend wurde mit Ethanolamin deaktiviert und mit Basispuffer gespült.

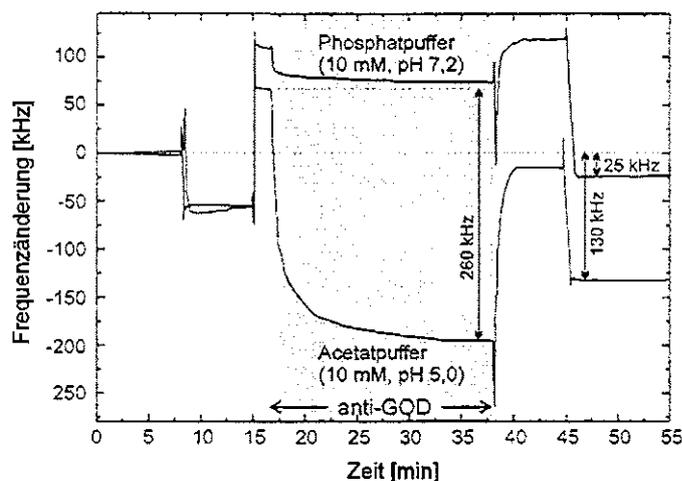


Abb. 6-32: Einfluß des pH-Wertes des Immobilisationspuffers auf die immobilisierte Menge an Ligand (Schutzschicht: Parylen; Basispuffer: 20 mM PBS mit 140 mM NaCl, pH 7,2; 400 mM EDC, 100 mM NHS; 15 µg/ml polyklonale anti-GOD Antikörper in 10 mM Immobilisationspuffer; 1 M Ethanolamin)

Bei der Immobilisation in Acetatpuffer (pH 5,0) wurde der Ligand in erheblichem Maße über elektrostatische Wechselwirkungen im Dextran angereichert, was in der Frequenzänderung von 260 kHz während der Beprobung mit anti-GOD zum Ausdruck kommt. Nach Deaktivierung mit Ethanolamin und anschließendem Spülen mit Basispuffer konnte eine verbleibende Frequenzänderung von 130 kHz (Differenz zwischen Basislinie zu Beginn des Experiments und Basislinie nach Immobilisation und Deaktivierung) beobachtet werden, die dem kovalent gebundenen Anteil an anti-GOD entspricht. In diesem Fall kann aus den gegebenen Daten abgeschätzt werden, daß etwa 50 % der angereicherten Liganden immobilisiert wurden.

Bei der Immobilisation in Phosphatpuffer (pH 7,2) hingegen kam es nur zu einer geringen Anreicherung aufgrund des pH-Wertes des Immobilisationspuffers, der über dem isoelektrischen Punkt des Liganden lag. Die erzielten ca. 25 kHz Frequenzänderung weisen darauf hin, daß die so immobilisierte Menge an anti-GOD nur etwa 19 % der Menge entspricht, die beim Arbeiten in optimiertem Immobilisationspuffer (10 mM Acetatpuffer, pH 5,0) angebunden wurde.

6.3.1.3.2.3 Ionenstärke des Immobilisationspuffers

Die Ionenstärke des Immobilisationspuffers beeinflusst ebenfalls die Anreicherung von Ligand in der Dextranmatrix. Ursache dafür ist eine Konkurrenz der bei optimiertem pH-Wert positiv geladenen Liganden mit anderen positiv geladenen Spezies im Immobilisationspuffer (z.B. Na^+ und K^+ -Ionen) um die Carboxylatgruppen am Dextran. Damit nimmt die angereicherte und schließlich auch immobilisierte Menge an Ligand mit zunehmender Ionenstärke des Immobilisationspuffers ab. Aus diesem Grund sollte seine Ionenstärke so niedrig wie möglich sein (typischerweise 10 bis maximal 25 mM [joh91]), wobei jedoch die Grenze der Salzkonzentration, die die Stabilität von Proteinen und die Pufferkapazität beeinflusst, nicht unterschritten werden darf.

Abbildung 6-33 zeigt die Immobilisation von polyklonalen anti-GOD Antikörpern in zwei unterschiedlich konzentrierten Acetatpuffern bei pH 5,0. Man erkennt, daß die Anreicherung und auch die Immobilisation von anti-GOD in 10 mM Acetatpuffer deutlich größer ist als in 100 mM Acetatpuffer. Aus den Frequenzänderungen nach Deaktivierung läßt sich abschätzen, daß beim Arbeiten in 100 mM Puffer nur etwa 30 % der Ligandmenge immobilisiert wird, die beim Arbeiten in 10 mM Puffer kovalent angebunden werden kann.

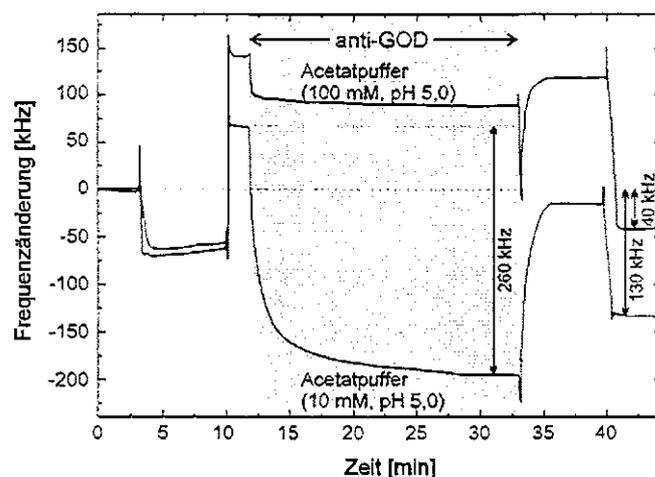


Abb. 6-33: Einfluß der Ionenstärke des Immobilisationspuffers auf die immobilisierte Menge an Ligand (Schutzschicht: Polyimid; Basispuffer: 20 mM PBS mit 140 mM NaCl, pH 7,2; 400 mM EDC, 100 mM NHS; 15 µg/ml polyklonale anti-GOD Antikörper in Acetatpuffer (pH 5,0); 1 M Ethanolamin)

6.3.1.3.2.4 Ligandkonzentration und Inkubationszeit

Die Anreicherung von Ligand im Dextran unterliegt, wie schon beschrieben, einer Konkurrenz zwischen positiv geladenen Liganden und anderen positiv geladenen Spezies in der Lösung. Eine zunehmende Ligandkonzentration verschiebt dieses Gleichgewicht zu einer vermehrten Aufnahme von Ligand in die Matrix und damit auch zu einer vermehrten Immobilisation von Liganden.

Diese Abhängigkeit der Anreicherung und kovalenten Anbindung von der Ligandkonzentration im Immobilisationspuffer wurde untersucht, indem mit carboxymethyliertem Dextran beschichtete OFW-Sensoren mit unterschiedlichen Konzentrationen von Immunglobulin in 10 mM Acetatpuffer (pH 5,0) beprobt wurden. Dabei wurden einerseits die Frequenzänderungen bei Beprobung nicht-aktivierter Oberflächen ermittelt, die ein Maß für die angereicherte Menge an Ligand darstellen, und andererseits die Frequenzänderungen, die sich nach Aktivierung mit EDC/NHS, Beprobung mit Ligand, Deaktivierung und Spülen mit Basispuffer einstellen, die ein Maß für die immobilisierte Menge an Ligand sind. Die Immobilisation radioaktiv markierter Liganden (mouse [35 S]-Ig) erlaubt schließlich die Quantifizierung der an der Oberfläche kovalent gebundenen Liganden und damit die Bestimmung der Oberflächenbelegung mit Ligand.

In Abbildung 6-34 sind die hierbei erhaltenen Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.

Die gestrichelte Linie stellt den Einfluß der Ig-Konzentration auf die elektrostatische Aufnahme bei optimiertem Immobilisationspuffer dar. Es ist zu erkennen, daß bei einer Konzentration von ca. 50 $\mu\text{g/ml}$ die Dextranmatrix gesättigt ist und bei höheren Konzentrationen kein weiterer Ligand mehr angereichert wird.

Die durchgezogene Linie repräsentiert die Menge an kovalent gebundenem Immunglobulin. Auch hier flacht die Kurve bei einer Konzentration von etwa 50 $\mu\text{g/ml}$ ab. Dieser Verlauf korreliert mit der oben gemachten Annahme, daß nur elektrostatisch gebundener Ligand immobilisiert wird und die Menge an immobilisierten Liganden unter den Bedingungen maximal ist, bei denen auch die Anreicherung am größten ist.

Ein Vergleich beider Kurvenverläufe zeigt weiterhin, daß im allgemeinen nur etwa 20 bis maximal 50 % der angereicherten Liganden kovalent angebonden werden. Die dabei immobilisierte Menge führt zu einer Oberflächenbelegung von bis zu 20 ng/mm^2 . Diese ist um etwa den Faktor 10 größer, als bei üblicher monomolekularer Bedeckung zu erwarten wäre (siehe auch Kapitel 6.3.1.3.2.1).

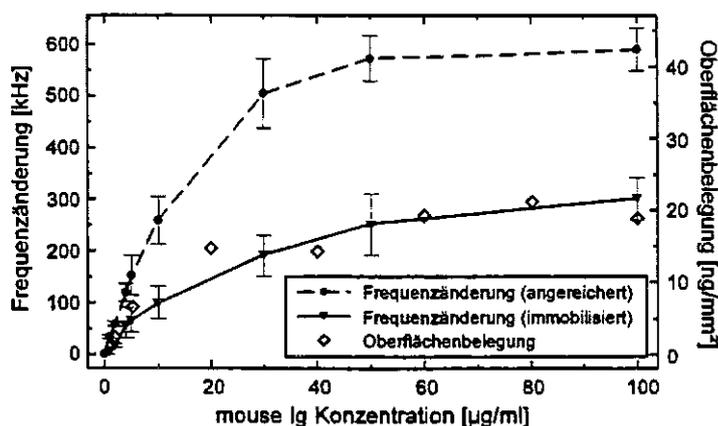


Abb. 6-34: Ermittlung der Abhängigkeit von angereicherter und immobilisierter Ligandmenge, sowie der Oberflächenbelegung von der Ligandkonzentration im Immobilisationspuffer.

linke Achse: Frequenzänderungen bei Beprobung von nicht-aktivierter (mouse Ig in 10 mM Acetatpuffer, pH 5,0) bzw. aktivierter Oberfläche (Schutzschicht: Polyimid; Basispuffer: 20 mM PBS mit 140 mM NaCl, pH 7,2; 400 mM EDC, 100 mM NHS, Aktivierungszeit: 7 min; mouse Ig in 10 mM Acetatpuffer, pH 5,0, Inkubationszeit: 30 min; 1 M Ethanolamin); rechte Achse: entsprechende Oberflächenbelegung (Schutzschicht: Polyimid; Basispuffer: 20 mM PBS mit 140 mM NaCl, pH 7,2; 400 mM EDC, 100 mM NHS, 7 min; mouse [35 S]-Ig in 10 mM Acetatpuffer, pH 5,0, 30 min Inkubation; 1 M Ethanolamin)

Die optimale Ligandkonzentration ist im allgemeinen die niedrigste Konzentration, bei der maximale Anreicherung und damit auch maximale Immobilisation erzielt wird. Eine niedrigere Konzentration wirkt sich in einer Verschlechterung der Nachweisgrenzen des Systems aus, während eine höhere Konzentration eine unnötige Verschwendung an Ligand darstellt.

Die optimale Inkubationszeit für Ligand auf der Dextranoberfläche läßt sich bei der Verwendung von OFW-Bauteilen on-line anhand der Sensorsignale bestimmen. Während der Beprobung des Sensors mit der Ligandlösung kommt es zu einer Frequenzabnahme aufgrund der Anreicherung und Immobilisation des Liganden in der Dextranmatrix. Eine Einstellung des Gleichgewichts wurde bei allen verwendeten Liganden nach ca. 10 bis 30 min beobachtet.

Die hier aufgezeigten Einflüsse dienen dem Verständnis der Immobilisationsprozedur und lassen sich in gewissem Maße auf die unterschiedlichsten Liganden übertragen. Da sich Liganden aber beispielsweise in Molekulargewicht, Diffusionskoeffizient und isoelektrischem Punkt und damit im Anreicherungsverhalten unterscheiden, empfiehlt es sich für genauere Untersuchungen und für quantitative Messungen nahe der Nachweisgrenze, für jeden Liganden eine gesonderte Optimierung der Immobilisationsparameter durchzuführen.

6.3.1.4 Kontrollversuche

Um die Anbindung von Liganden über EDC/NHS-Aktivierung an carboxymethyliertes Dextran zu belegen, wurden verschiedene Kontrollversuche durchgeführt. Dazu wurden parylenbeschichtete (ohne Dextranbeschichtung) und mit Aminodextran beschichtete Oberflächen der kompletten Immobilisationsprozedur unterzogen und mit der Immobilisation auf carboxymethyliertem Dextran verglichen. Mit Hilfe radioaktiv markierter Liganden läßt sich die Oberflächenbedeckung mit Ligand bestimmen. In Tabelle 6-8 sind die so erhaltenen Ergebnisse dargestellt. Es ist zu erkennen, daß eine Anbindung von Ligand ausschließlich an der carboxymethylierten Dextranoberfläche erfolgt. An Parylen bzw. Aminodextran wird nur eine vernachlässigbare Oberflächenbedeckung verzeichnet.

Beschichtung	Oberflächenbelegung [ng/mm ²]
Parylen	0,2 ± 0,1
Parylen; T-BSA / Aminodextran	0,3 ± 0,1
Parylen; T-BSA / carboxymethyliertes Dextran	19,4 ± 1,3

Tab. 6-8: Oberflächenbelegung mit Ligand bei Immobilisation auf verschiedenen Oberflächen (Basispuffer: 20 mM PBS mit 140 mM NaCl, pH 7,2; 400 mM EDC, 100 mM NHS, Aktivierungszeit: 7 min; 100 µg/ml mouse [³⁵S]-Ig in 10 mM Acetatpuffer, pH 5,0, Inkubationszeit: 30 min; 1 M Ethanolamin)

6.3.2 Liganden-Einfangreaktionen

Eine Alternative zur direkten Immobilisation des entsprechenden Liganden sind Liganden-Einfangreaktionen, bei denen zunächst ein sogenanntes Einfangmolekül immobilisiert wird, das anschließend den gewünschten Liganden bindet [ias96].

Von Vorteil ist dabei die Auswahl des Einfangmoleküls in der Weise, daß eine möglichst universelle Oberfläche erzeugt wird, mit der eine Vielzahl unterschiedlicher Liganden angebonden werden kann.

Die Einfangmolekül-Ligand-Bindung muß eine hohe Affinitätskonstante aufweisen, um signifikante Dissoziationen und damit Ligandverluste zu vermeiden.

Auch darf das Einfangmolekül selbstverständlich die Ligand-Ligat-Bindung nicht beeinflussen, was vor allem für kinetische Messungen eine wichtige Voraussetzung ist.

Die genannten Forderungen werden beispielsweise durch Einfangmolekül/Ligand-Systeme erfüllt, bei denen anti-Fc spezifische Antikörper als Einfangmoleküle für die entsprechenden Fc-enthaltenden Liganden fungieren, oder auch durch das (Strept)Avidin/Biotin-System.

Ein solcher Aufbau hat gegenüber der direkten Immobilisation des Liganden verschiedene Vorteile [ias96]:

- Der Ligand wird nicht selbst einer chemischen Reaktion unterzogen, bei der eventuell, je nach Reaktionsbedingungen und Stabilität des Liganden, Modifikationen auftreten können, die Veränderungen der Aktivität und Spezifität des Liganden bewirken können.
- Bei geeigneter Auswahl des Einfangmoleküls ist eine einfache und schnelle Anbindung unterschiedlichster Liganden möglich, ohne dabei jeweils die komplette mehrstufige Immobilisationsprozedur durchführen und optimieren zu müssen.
- In einigen Fällen ist es möglich, eine komplette Regeneration der Sensoroberfläche zu erreichen, indem die Bindung zwischen Ligand und Einfangmolekül gelöst und neuer Ligand immobilisiert wird. Diese Art der Regeneration hat den Vorteil, daß stets mit frisch angebondenem Liganden gearbeitet wird, wohingegen bei der Regeneration durch Lösen der Ligand-Ligat-Bindung (siehe Kapitel 6.4) unter anderem mit Aktivitätsverlusten des Liganden aufgrund der Behandlung mit Regenerationslösungen zu rechnen ist.
- Mit Hilfe der Liganden-Einfangreaktion können auch Liganden immobilisiert werden, die beispielsweise aufgrund fehlender Aminogruppen oder ungünstiger isoelektrischer Punkte ($pI < 3,5$) nicht durch EDC/NHS-Aktivierung gebunden werden können.

6.3.2.1 Einfang biotinylierter Liganden durch am Dextran immobilisiertes Streptavidin

Der Einfang biotinylierter Liganden durch immobilisiertes Streptavidin ist eine der bevorzugten Liganden-Einfangreaktionen, da die Affinitätskonstante der Streptavidin-Biotin-Bindung außerordentlich hoch ist ($K_D = 10^{-15}$ M). Die Anbindung der Liganden ist damit unter nicht-denaturierenden Bedingungen nahezu irreversibel.

Es ist eine Vielzahl von biotinylierten Liganden zugänglich, die entweder käuflich erhältlich sind oder über diverse Reaktionsmechanismen leicht selbst biotinyliert werden können.

Die mit immobilisiertem Streptavidin modifizierte Dextranoberfläche bildet somit eine universelle Oberfläche zur Immobilisation eines weiten Bereiches von Liganden aufgrund der einfachen und spezifischen Reaktion mit biotinylierten Substanzen.

Die Immobilisation von Streptavidin an der Dextranoberfläche kann über zwei verschiedene Möglichkeiten erfolgen. Entweder wird (wie schon in Kapitel 6.2.3) biotinyliertes Dextran durch Photoimmobilisation an der Sensoroberfläche angebunden und anschließend mit Streptavidin beprobt, oder Streptavidin wird mittels EDC/NHS-Aktivierung an carboxymethyliertes Dextran angebunden.

In den Abbildungen 6-35 und 6-36 sind diese beiden Möglichkeiten und die anschließende Anbindung eines biotinylierten Liganden dargestellt.

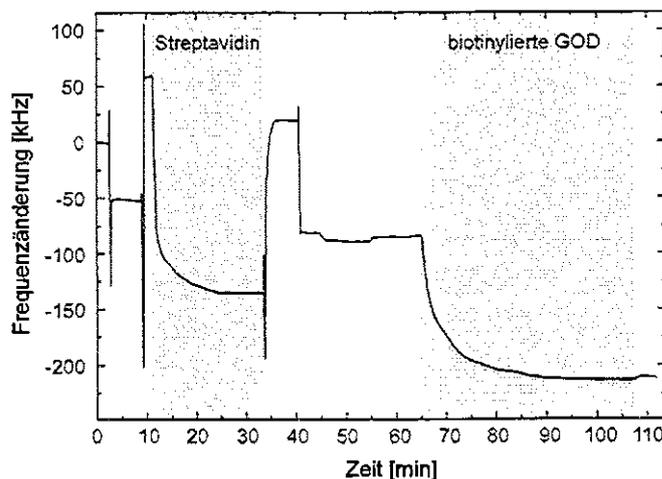


Abb. 6-35: Immobilisation von Streptavidin an carboxymethyliertes Dextran mittels Carbo-diimid-Chemie und anschließende Anbindung von biotinyliertem Liganden (Schutzschicht: Polyimid; Basispuffer: 20 mM PBS mit 140 mM NaCl, pH 7,2; 400 mM EDC, 100 mM NHS; 100 µg/ml Streptavidin in 10 mM Acetatpuffer, pH 5,0; 1 M Ethanolamin; 1 mg/ml BSA; 100 µg/ml biotinylierte GOD)

6.3 IMMOBILISATION VON BIOMOLEKÜLEN AN DER DEXTRANBESCHICHTETEN OBERFLÄCHE

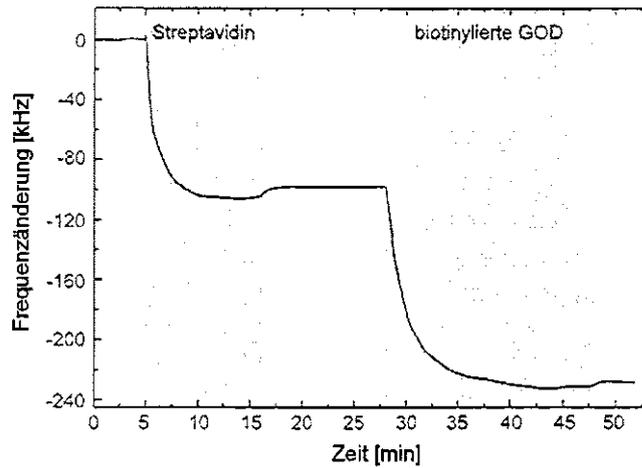


Abb. 6-36: Immobilisation von Streptavidin an biotinyliertes Dextran und anschließende Anbindung von biotinyliertem Liganden (Schutzschicht: Polyimid; Basispuffer: 20 mM PBS mit 140 mM NaCl, pH 7,2; 100 µg/ml Streptavidin in PBS; 100 µg/ml biotinylierte GOD in PBS)

6.4 IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

Nach der Anbindung von Ligand an der Dextranschicht wird die Immunoreaktion mit dem entsprechenden Biomolekül (Ligat) beobachtet, quantifiziert und die Nachweisgrenzen des Systems ermittelt. Weiterhin können aufgrund der Durchführung von Kontrollversuchen mit unspezifischem Protein Aussagen über Spezifität und unspezifische Bindungen an der Dextranoberfläche gemacht werden.

6.4.1 Beobachtung der Immunoreaktion

Für die Immunosensorik ist es wichtig, die Immunoreaktionen unter Bedingungen auszuführen, bei denen möglichst geringe unspezifische Bindung an der Sensoroberfläche vorhanden ist.

Wie schon in Kapitel 6.3.1.3.2.3 beschrieben, wird die Anreicherung von Proteinen in der Dextranmatrix durch den pH-Wert und die Ionenstärke des verwendeten Puffers beeinflusst. Um eine solche elektrostatische Bindung zwischen Ligat und Dextranschicht zu unterdrücken und damit ausschließlich die Immunoreaktion von Ligand und Ligat zu beobachten, sind bei Immunreaktionen an dextranbeschichteten Bauteilen signifikante Konzentrationen von NaCl im möglichst pH-neutralen Trägerpuffer notwendig. Daher werden diese Reaktionen im allgemeinen in 20 mM PBS (mit 140 mM NaCl; pH 7,2) ausgeführt (siehe auch Kapitel 6.4.2.1).

Zur Beobachtung der Immunoreaktion wurde ein mit monoklonalen anti-Urease Antikörpern modifiziertes OFW-Bauteil (nach dem Blocken mit 1 mg/ml BSA) zunächst mit PBS gespült und die Basislinie aufgenommen. Anschließend wurde mit einer Lösung von Urease in PBS beprobt. Das entsprechende Sensorsignal ist in Abbildung 6-37 dargestellt. Man erkennt eine Frequenzabnahme, die nach insgesamt etwa 90 Minuten beendet war. Nach dem Rückspülen mit PBS wurde eine Frequenzänderung von etwa 105 kHz erhalten, die auf die Immunoreaktion zwischen den immobilisierten Antikörpern und dem Antigen Urease zurückzuführen ist.

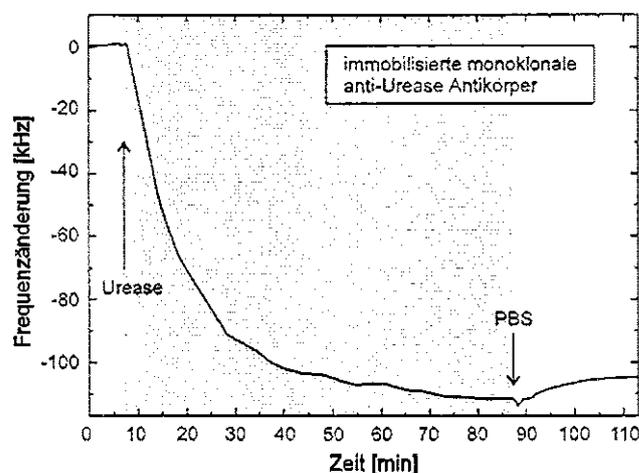


Abb. 6-37: Immunoreaktion an einem mit carboxymethyliertem Dextran beschichteten und mit monoklonalen anti-Urease Antikörpern modifizierten OFW-Bauelement (Basispuffer: 20 mM PBS mit 140 mM NaCl, pH 7,2; 65 µg/ml Urease)

6.4.2 Kontrollversuche

6.4.2.1 Unspezifische Bindung am Dextran

Die unspezifische Bindung an der dextranbeschichteten Oberfläche wird, wie oben erwähnt, durch die Verwendung geeigneter Pufferlösungen unterdrückt.

In Abbildung 3-38 ist dies am Beispiel eines mit carboxymethyliertem Dextran beschichteten OFW-Bauelements dargestellt. Die Beprobung erfolgte mit anti-POD Antikörpern, wobei in diesem Fall an der Dextranmatrix kein Ligand immobilisiert war.

Man erkennt eine Frequenzänderung von ca. 260 kHz bei Verwendung von 10 mM Acetatpuffer (pH 5,0), was auf eine Anreicherung der anti-POD Antikörper hinweist.

Bei Verwendung von 20 mM PBS (mit 140 mM NaCl; pH 7,2) ist dagegen nur eine Frequenzänderung von maximal 1 kHz zu beobachten.

Mit Hilfe von radioaktiv markierten Proteinen kann die gebundene Menge an Protein in der Dextranmatrix bestimmt werden. Bei Beprobungen in PBS wurden Proteinmengen von unter 10 pg/mm^2 gefunden. Im Vergleich dazu konnten bei Verwendung von Acetatpuffer ca. 14 ng/mm^2 Protein in der Dextranmatrix nachgewiesen werden; auf parylenbeschichteten Oberflächen wurden ca. $1,5 \text{ ng/mm}^2$ gefunden (siehe Kapitel 6.3.1.3.2.1).

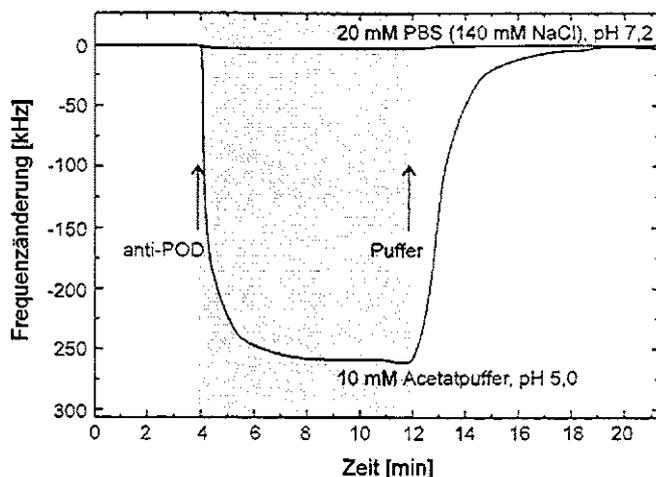


Abb. 6-38: Unterdrückung unspezifischer Bindung von Proteinen durch geeignete Wahl der Pufferlösung (Schutzschicht: Parylen; carboxymethyliertes Dextran; $10 \text{ }\mu\text{g/ml}$ polyklonale anti-POD Antikörper im entsprechenden Puffer)

Diese Ergebnisse zeigen die außerordentlich geringe unspezifische Bindung an dextranbeschichteten Oberflächen bei Verwendung von Puffern hoher Ionenkonzentration und geeignetem pH-Wert. Die Ursache für die gegenüber Polymeroberflächen um zwei Größenordnungen reduzierten unspezifischen Bindungen ist in der Hydrophilie der Dextranoberfläche und in entropischen Effekten aufgrund der flexiblen Dextranketten zu finden [and86, löf93].

6.4.2.2 Spezifität des Immunosensors

Da der Anteil unspezifischer Bindungen von Protein am Dextran vernachlässigbar klein ist, wird folglich die Spezifität des Immunosensors hauptsächlich durch die Spezifität der verwendeten rezeptiven Moleküle bestimmt.

Am Beispiel dextranbeschichteter OFW-Bauteile, die mit immobilisierten monoklonalen anti-Urease Antikörpern modifiziert wurden, wird dieser Einfluß gezeigt. Dazu wurden die Sensoren mit spezifischen und unspezifischen Antigenen beprobt und die resultierende Frequenzänderungen beobachtet (siehe Abbildung 3-39).

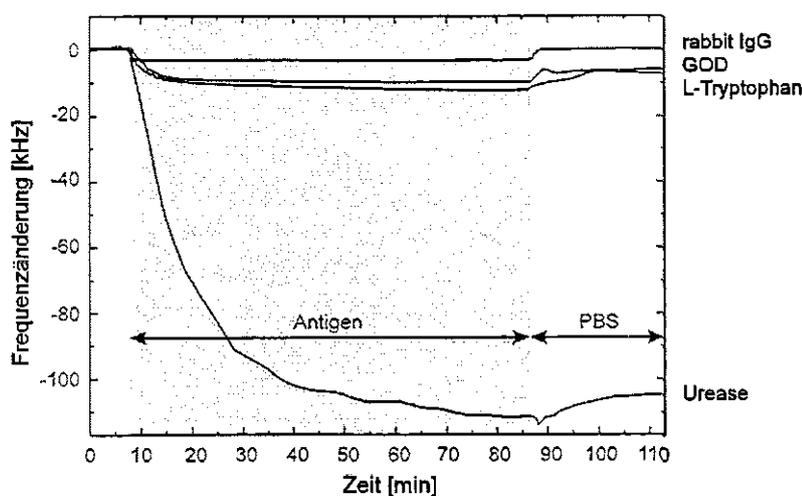


Abb. 6-39: Spezifische und unspezifische Reaktionen an einem mit carboxymethyliertem Dextran beschichteten und mit monoklonalen anti-Urease Antikörpern modifizierten OFW-Bauelement (Basispuffer: 20 mM PBS mit 140 mM NaCl, pH 7,2; je 65 µg/ml Antigen)

Die spezifische Reaktion der immobilisierten monoklonalen anti-Urease Antikörper mit Urease führte zu einer Frequenzänderung von ca. 105 kHz.

Die Beprobung mit unspezifischen Antigenen (L-Tryptophan, GOD, rabbit Ig) ergibt dagegen nur kleine Frequenzänderungen, die maximal etwa 8 % des spezifischen Signals ausmachen.

Die schnelle aber reversible Frequenzänderung bei der Beprobung mit Analyt bzw. beim Zurückspülen mit Puffer, die vor allem bei rabbit Ig zu beobachten war, ist auf eine geringfügig unterschiedliche Leitfähigkeit beider Lösungen zurückzuführen.

Das Verhältnis zwischen spezifischem und unspezifischem Signal ist ein Maß für die Spezifität des jeweiligen Immunosensors. In dem hier gezeigten Fall von L-Tryptophan bzw. GOD und Urease wird ein Verhältnis von etwa 14 gefunden, was die hohe Spezifität des Immunosensors bestätigt.

6.4.3 Reproduzierbarkeit der Sensorantwort bei Immunreaktionen

Die Reproduzierbarkeit der Sensorantwort eines dextranbeschichteten OFW-Immunsensors hängt von verschiedenen Parametern ab.

Ein wichtiger Parameter ist die Reproduzierbarkeit der Dextrananbindung (siehe Kapitel 6.2.3.5). Für den CoCoating-Prozeß ergab sich dabei eine Streuung von ca. 8 % bei Beschichtung in getrennten Arbeitsgängen; bei simultaner Beschichtungsprozedur wurden Streuungen von ca. 7 % erzielt.

Weitere Fehlerquellen schließen die Präparation der Reagenz- und Proteinlösungen bei der Anbindung des Liganden bzw. der Immunreaktion, sowie instrumentelle Abweichungen ein.

Um die Reproduzierbarkeit der Sensorsignale bei der Immunreaktion zu untersuchen, wurden fünf simultan dextranbeschichtete OFW-Bauelemente mit monoklonalen anti-Urease Antikörpern beschichtet und mit Lösungen von 65 µg/ml Urease in PBS beprobt. In Abbildung 6-40 sind die entsprechenden Sensorantworten dargestellt. Es wurde eine mittlere Frequenzänderung von 110 kHz mit einer Streuung von 12 % erzielt.

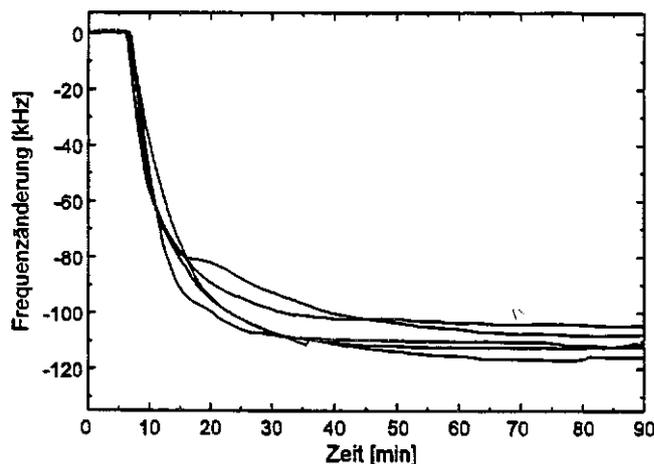


Abb. 6-40: Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Sensorantwort bei Immunreaktionen an OFW-Bauelementen, die mit carboxymethyliertem Dextran beschichtet und mit monoklonalen anti-Urease Antikörpern modifiziert sind (Basispuffer: 20 mM PBS mit 140 mM NaCl, pH 7,2; 65 µg/ml Urease)

6.4.4 Quantifizierung des gebundenen Ligaten

Um eine Quantifizierung des über Immunreaktion am Sensor gebundenen Proteins (Ligat) zu ermöglichen, wurden dextranbeschichtete OFW-Bauelemente mit anti-mouse Ig Antikörpern modifiziert und mit unterschiedlichen Konzentrationen an radioaktiv markiertem mouse Ig beprobt. Die dabei resultierenden Änderungen der Resonanzfrequenz, sowie aus Flüssigszintillationsmessungen erhaltene Oberflächenbelegungen sind in Abbildung 6-41 in Abhängigkeit von der Konzentration der Ig-Lösung dargestellt.

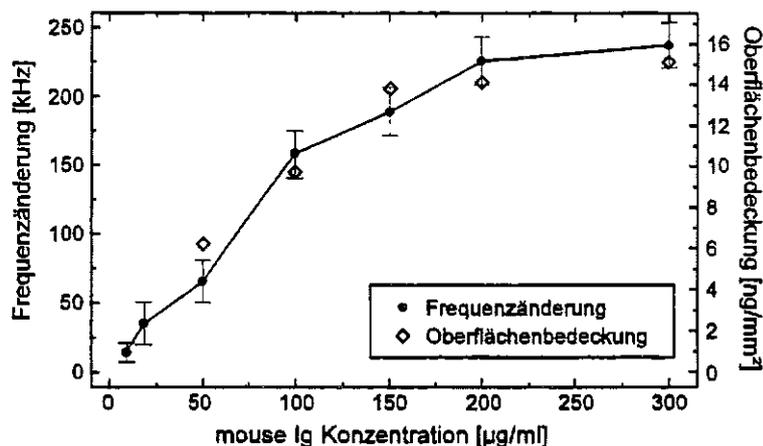


Abb. 6-41: Frequenzänderungen und resultierende Oberflächenbelegungen bei Immunreaktionen von mouse [^{35}S]-Ig in unterschiedlichen Konzentrationen mit anti-mouse Ig Antikörpern auf dextranbeschichteten OFW-Bauelementen (Mittelwerte aus jeweils drei Messungen) (Basispuffer: 20 mM PBS mit 140 mM NaCl, pH 7,2)

Es ist eine Zunahme der Frequenzänderung bzw. Oberflächenbelegung mit steigender Ligat-Konzentration zu beobachten, die ab einer Konzentration von ca. 200 $\mu\text{g/ml}$ in einen Sättigungswert übergeht. Im Sättigungsbereich ist die maximal mögliche Menge an Ligat über Immunreaktionen an sämtliche verfügbaren Liganden gebunden. Die Oberflächenbelegung im Sättigungsbereich beträgt im vorliegenden Fall ca. 16 ng/mm^2 .

Damit ist die Menge an gebundenem Ligat etwas geringer, als die an immobilisiertem Ligand (ca. 20 ng/mm^2 ; siehe Abbildung 6-34). Dies kann folgende Ursachen haben [ias96]:

- Nicht jeder immobilisierte Ligand ist auch für eine Wechselwirkung mit einem Ligat verfügbar. Dies hat vor allem sterische Gründe. Beispielsweise kann ein Teil der Liganden in einer solchen Orientierung immobilisiert sein, daß die rezeptiven Stellen ganz oder teilweise blockiert sind. Auch ist es möglich, daß die kovalente Anbindung des Liganden an der rezeptiven Stelle erfolgt ist, so daß keine spezifische Erkennung des Ligaten mehr möglich ist.
- Die Reinheit der verwendeten Proteinlösungen kann ebenfalls für den genannten Effekt relevant sein. Die Lösungen können neben dem gewünschten Liganden andere Spezies enthalten, die keine spezifische Reaktion mit dem Ligat eingehen. Dabei kann es sich zum Beispiel um aggregierte, degenerierte oder inaktive Formen des Liganden handeln, aber auch um Verunreinigungen mit anderen Proteinen oder sonstigen Stoffen. Diese Spezies werden bei der Immobilisation zusammen mit dem gewünschten Protein co-immobilisiert und gehen daraufhin unspezifische Reaktionen ein.
- Schließlich sind auch die Konzentrationen der Proteinpräparationen oftmals eine nicht zu vernachlässigende Fehlerquelle.

6.4.5 Konzentrationsreihe und Bestimmung der Nachweisgrenzen

Zur Bestimmung von Empfindlichkeit und Nachweisgrenze wurde eine Konzentrationsreihe (analog zu der in Kapitel 6.4.4) durchgeführt. In Abbildung 6-42 sind die Resonanzfrequenzänderungen in Abhängigkeit von der Konzentration dargestellt.

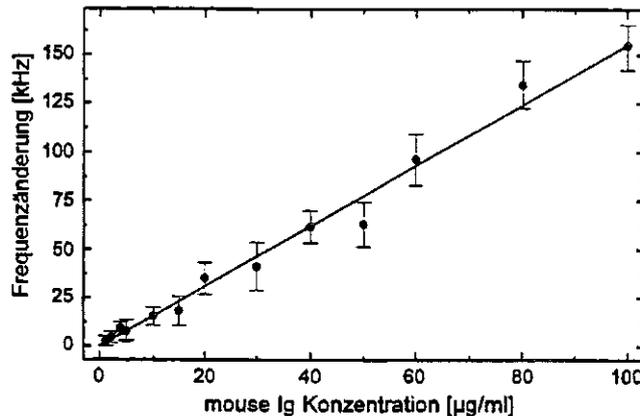


Abb. 6-42: Konzentrationsreihe von mouse Ig bei der Immunoreaktionen mit OFW-Bauelementen, die mit carboxymethyliertem Dextran beschichtet und mit anti-mouse Ig Antikörpern modifiziert sind (Mittelwerte aus jeweils drei Messungen) (Basispuffer: 20 mM PBS mit 140 mM NaCl, pH 7,2)

Man erkennt innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches einen linearen Anstieg der Resonanzfrequenzänderung mit der mouse Ig-Konzentration. Die Steigung der Kurve wurde durch lineare Regression bestimmt und beträgt $1,56 \text{ kHz} / \mu\text{g ml}^{-1}$. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,991.

Unter Berücksichtigung des Frequenzrauschens beim Betrieb in PBS von ca. 40 Hz kann mit dem vorliegenden Immunosensor eine minimale Antigenkonzentration von 70 ng/ml detektiert werden.

Die Nachweisgrenze des Sensors wurde mit Hilfe der in Kapitel 6.4.4 bestimmten Oberflächenbelegungen ermittelt und beträgt 7 pg/mm^2 .

In Abbildung 6-43 ist die Korrelation von Resonanzfrequenzänderung und Oberflächenbelegung für dextranbeschichtete OFW-Bauelementen (Murata SAF 380) am System anti-mouse Ig/mouse Ig dargestellt. Es ist ein linearer Zusammenhang im gesamten untersuchten Bereich (bis zu 20 ng/mm^2) zu beobachten.

Diese Korrelation von Frequenzänderung und Oberflächenbelegung lässt sich in gewissen Grenzen auch auf ähnliche Ligand/Ligat-Paare übertragen, da sie in erster Näherung von den jeweiligen Proteinen unabhängig sein sollte [ias96]. Eine Oberflächenbelegung von 1 ng/mm^2 sollte somit für nahezu beliebige Proteine zu einer Frequenzänderung von ca. 14,5 kHz führen. Damit können die Empfindlichkeiten und Nachweisgrenzen der entsprechenden Immunosensoren abgeschätzt werden.

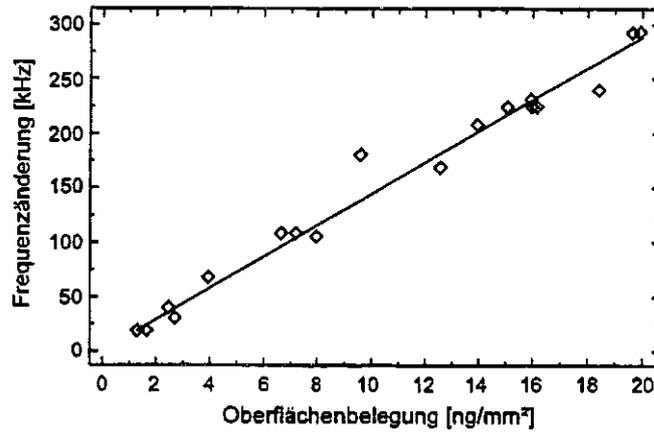


Abb. 6-43: Korrelation von Frequenzänderung und Oberflächenbelegung für das System anti-mouse Ig / mouse Ig bei dextranbeschichteten OFW-Bauelementen (Murata SAF 380)

6.5 REGENERATION DER SENSOREN

Die Anforderungen an einen Sensoren beinhalten generell neben Sensitivität und Selektivität auch Reversibilität. Für Biosensoren, insbesondere Immunosensoren, wird die Regenerierbarkeit der Oberfläche jedoch dadurch beschränkt, daß biologisches Material nur bedingt stabilisiert werden kann. Daher wird in diesen Fällen die Forderung nach Reversibilität oftmals vernachlässigt und die entsprechenden Sensoren als "Dosimeter", d.h. als Einmal-Sensoren, verwendet.

Wünschenswert ist jedoch ein Sensor, dessen Oberfläche regeneriert werden kann und somit für wiederholte Messungen zur Verfügung steht. Damit kann im allgemeinen eine Verbesserung in Reproduzierbarkeit, Schnelligkeit und Wirtschaftlichkeit der Analyse erzielt werden.

Die Regeneration kann einerseits die komplette Ablösung sämtlichen biologischen Materials von der Sensoroberfläche beinhalten; andererseits ist aber auch eine Regeneration durch Zerstörung des Immunokomplexes möglich, wobei allerdings die Erkennungszentren des immobilisierten Moleküls nicht angegriffen werden dürfen.

Für dextranbeschichtete Oberflächen bietet sich insbesondere die letztgenannte Regenerationsmethode an, da die Dextranschicht relativ inert ist und die durch NHS/EDC-Aktivierung kovalent immobilisierten Liganden unter üblichen Regenerationsbedingungen nicht abgelöst werden.

Eine Regeneration kann auf verschiedene Art und Weise durchgeführt werden.

- pH-Wert-Änderungen führen zu einer Veränderung der Ladungsverteilung in den Proteinseitenketten, wodurch ionische Wechselwirkungen zerstört und die entsprechenden Immunokomplexe gelöst werden.
Beispielsweise sind als typische saure Regenerationslösungen 5 bis 100 mM HCl; 100 mM Glycin-HCl (pH 2,2) oder 1 M Ameisensäure zu nennen.
- Detergentien denaturieren Proteine bereits in kleinsten Konzentrationen. Sie lagern sich an die unpolaren Seitenketten des Proteins an und unterbinden die hydrophoben Wechselwirkungen.
- Hohe Konzentrationen wasserlöslicher organischer Substanzen, wie z.B. aliphatische Alkohole, denaturieren ebenfalls auf Grund der Änderung von hydrophoben Wechselwirkungen, indem sie selbst diese Kräfte zum Lösungsmittel Wasser aufbauen.
- Auch bestimmte Salze, wie z.B. KSCN, können die gebildeten Immunokomplexe lösen (chaotroper Effekt). Diese Salze sind in der Lage, unpolare Substanzen verstärkt in Wasser zu lösen, was wiederum zur Störung der hydrophoben Wechselwirkungen führt.

Die Auswahl der geeigneten Regenerationsmethode richtet sich nach dem zu lösenden Immunokomplex. Die Regeneration darf dabei nicht zu einer signifikanten Denaturierung des Liganden führen, woraus ein drastischer Verlust der Fähigkeit des Liganden zur Ausbildung eines Immunokomplexes resultieren würde.

Die maximale Anzahl an Regenerationszyklen hängt folglich von verschiedenen Faktoren ab, wie der intrinsischen Stabilität des Liganden, der Stabilität des Liganden unter Regenerationsbedingungen und der Anwesenheit von Verunreinigungen in den Reagenzlösungen, die zu einer Denaturierung führen [ias96].

Zur Untersuchung der Regeneration von GOD-Immunsensoren auf der Basis dextranbeschichteter OFW-Bauelemente wurden saure Regenerationsbedingungen verwendet (siehe Abbildung 6-44).

Die Sensoren wurden präpariert, indem polyklonale anti-GOD Antikörper mittels NHS/EDC-Aktivierung kovalent an die Dextranschicht angebunden wurden.

Nach der Immunoreaktion mit 100 µg/ml GOD wurde der Immunokomplex gelöst, indem mit einer Lösung von 100 mM Glycin und 500 mM NaCl (pH 2,3) beprobt wurde. Wie in Abbildung 6-44 zu erkennen, war das Signal voll reversibel; die Basislinie wurde im Anschluß an die Regeneration beim Spülen mit Puffer wieder erreicht. (Das Signal bei der Regeneration ist auf die hohe Leitfähigkeit der Regenerationslösung zurückzuführen.)

Bei der wiederholten Beprobung mit GOD wurde jeweils eine Frequenzänderung von 190 kHz mit einer Streuung von ca. 6 % erzielt; die Basislinie stellte sich auch nach mehreren Regenerationszyklen wieder ein.

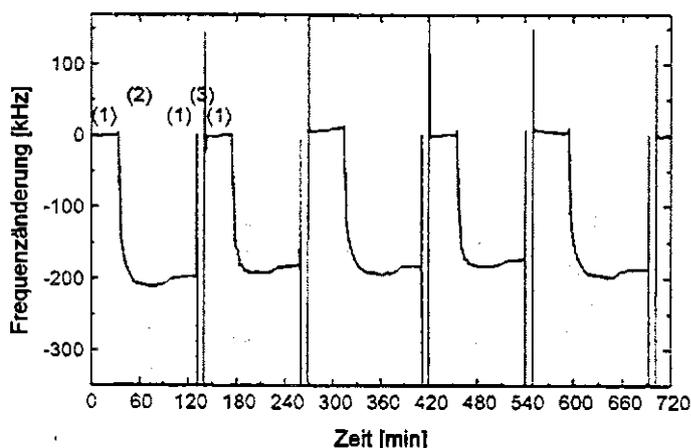


Abb. 6-44: Wiederholte Regeneration mit Glycinpuffer und Immunoreaktion (dextranbeschichteter Sensor; immobilisierte polyklonale anti-GOD Antikörper; (1) Basispuffer: 20 mM PBS mit 140 mM NaCl (pH 7,2); (2) Analyt: 100 µg/ml GOD; (3) Regenerationslösung: 100 mM Glycin, 500 mM NaCl (pH 2,3))

Damit konnte gezeigt werden, daß sich dextranbeschichtete OFW-Immunsensoren prinzipiell aufgrund der Anwendbarkeit von geeigneten Regenerationsmethoden für wiederholte Immunreaktionen eignen.

Die Reproduzierbarkeit des Signals der Immunoreaktion ist mit einer Abweichung von 6 % im vorgestellten Fall besser, als bei der einmaligen Verwendung verschiedener Sensoren (12 %, siehe Kapitel 6.4.3).

6.6 EINSATZ DEXTRANBESCHICHTETER OFW-BAUELEMENTE IN EINEM PRAXISRELEVANTEN ANWENDUNGSGEBIET

Der menschliche Körper besteht aus ca. 85 Billionen Zellen. Um die speziellen Funktionen im Körper erfüllen zu können, muß diese große Ansammlung von individuellen Zellen miteinander kommunizieren und zusammenarbeiten. Dies erfordert ein effizientes und zuverlässiges interzelluläres Kommunikationssystem, das auf der Basis der Cytokine und ihrer zellulären Rezeptoren beruht.

Unter dem Begriff Cytokine wird eine große Klasse von in vivo kurzlebigen Polypeptide zusammengefaßt, die von einzelnen Zellen produziert und freigesetzt werden. Die Ausschüttung der Cytokine in das Blut bzw. das umgebende Gewebe (d.h. endokrin oder parakrin) dient der Übertragung von speziellen Botschaften. Die Botschaften werden durch Wechselwirkung der Cytokine mit ihren spezifischen Rezeptoren auf der Plasmamembran anderer Zellen empfangen. Dadurch werden Mechanismen in den empfangenden Zellen ausgelöst, die die Funktionen dieser Zellen (meist Teilung und Wachstum, aber auch Fortbewegung) beeinflussen und damit eine Reaktion auf die empfangenen Botschaften darstellen [her91].

Cytokine regulieren u.a. das komplizierte Wechselspiel der Zellen des Immunsystems. Ein Beispiel für eine solche interzelluläre Kommunikation ist die Ansammlung von Leukocyten bei entzündlichen Erkrankungen [koo94].

Unter Leukocyten (weiße Blutkörperchen) versteht man allgemein Blutzellen ohne Hämoglobin-Gehalt. Leukocyten entstehen im Knochenmark und haben eine wichtige Funktion im Rahmen der körpereigenen Abwehr. Bei vielen entzündlichen Erkrankungen verändert sich die Anzahl der Leukocyten im Blut, was auch zu diagnostischen Zwecken genutzt wird.

Zu der Gruppe der Leukocyten zählt man unter anderem auch die Granulocyten. Die Aufgabe der neutrophilen Granulocyten (Neutrophile) ist die Beseitigung von eingedrungenen Bakterien und abgestorbenen körpereigenen Zellen, meist im Rahmen einer entzündlichen Reaktion. Die Anhäufung weißer Blutkörperchen an Entzündungsstellen beruht dabei auf positiver Chemotaxis¹² durch bestimmte im Entzündungsherd gebildete, als Attraktantien wirkende Stoffe: Einerseits bewirken Cytokine, wie Interleukine¹³ etc., eine Ausschüttung von Granulocyten aus dem Knochenmark. Andererseits führen weitere chemische Mediatoren zur Orientierung und Bewegung der Zellen aus dem Blut zur Quelle der Signale in das Gewebe hinein [her91].

¹² Als Chemotaxis bezeichnet man die Eigenschaft freibeweglicher Organismen auf chemische Stoffe bzw. deren Konzentrationsunterschiede durch bestimmte, gerichtete Bewegungen zu reagieren. Beispielsweise orientieren sich viele Bakterien, Gameten von Algen und Pilze sowie Geschlechtszellen aller Art, aber auch Leukocyten und andere Zellen nach dem Konzentrationsgefälle bestimmter Reizstoffe, die mit spezifischen Rezeptoren (Chemorezeptoren) erkannt werden. Im allgemeinen lösen die chemotaktisch wirksamen Stoffe eine Bewegung in Richtung der höheren Reizstoffkonzentration aus (positive Chemotaxis; Attraktantien), seltener von ihr weg (negative Chemotaxis; Repellantien).

¹³ Interleukine sind zu den Cytokinen gehörende Mediatorstoffe des Immunsystems, die in geringen Konzentrationen von Leukocyten produziert werden und auf Wachstum (als Wachstumsfaktoren), Differenzierung und Aktivität von Zellen des Immunsystems Einfluß nehmen (Immunmodulation) [koo94].

Ein wichtiges Chemotaxin in vivo ist ENA-78 (epithelial neutrophil-activating protein-78) [sch97, wal97]. ENA-78 ist ein Mitglied der Gruppe der chemotaktischen Cytokine (CXC-Chemokine) und ähnelt in strukturellen Merkmalen und biologischen Aktivitäten dem Interleukin-8¹⁴ (IL-8). Es besteht aus 78 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 8357 Da. Exprimiert wird es in vielen Zelltypen, z.B. Epithelzellen der Lunge, Dünndarm, Dickdarm, Niere und Bauchspeicheldrüse, aber auch in Monocyten und Makrophagen.

Bei Patienten mit rheumatischer Arthritis (Gelenkentzündung) ist die Konzentration an ENA-78 im Blut und in der Gelenkschmiere stark erhöht [wal79].

Bei gesunden Personen werden ENA-78 Konzentrationen im Blut von unter 0,2 ng/ml gefunden, wohingegen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis Blutwerte von bis zu 70 ng/ml erreicht werden.

In der Gelenkschmiere werden ENA-78 Konzentrationen von über 200 ng/ml gefunden, was um den Faktor 100 höher ist als bei Patienten mit Osteoarthritis.

Weiterhin gilt ENA-78 als eines der wichtigsten CXC-Chemokine, das in den Epithelzellen der Darmschleimhaut von Patienten mit Enteritis Regionalis Crohn (unspezifische granulomatöse Entzündung, die alle Abschnitte des Verdauungstraktes befallen kann), Colitis Ulcerosa (diffuse Entzündung der Dickdarmschleimhaut) und akuter Appendicitis (Blinddarmentzündung) exprimiert wird. Außerdem wird eine hohe Expression von ENA-78 und IL-8 im exokrinen Drüsengewebe von Patienten mit chronischer Pancreatitis (Entzündung der Bauchspeicheldrüse) festgestellt [psc82].

Der Nachweis von ENA in Seren mit Hilfe eines ENA-Sensors ist somit beispielsweise als Screeningmethode für die Diagnostik einer Vielzahl entzündlicher Erkrankungen geeignet. Eine qualitative Bestimmung der ENA-Konzentrationen bei bekannter Erkrankung läßt weiterhin Rückschlüsse auf den Grad der jeweiligen Krankheit zu.

Die Entwicklung eines ENA-Sensors hat schließlich auch Modellcharakter für eine Vielzahl anderer Anwendungen, wobei insbesondere an eine Übertragung der Methode auf die Detektion verschiedenster Chemokine und Interleukine gedacht werden kann. In vielen Fällen können die Konzentrationen von Chemokinen bzw. Interleukinen in Körperflüssigkeiten mit dem Grad der Krankheit oder auch mit der Sterblichkeitsrate in Bezug gebracht werden [wal98].

¹⁴ Interleukin-8 (IL-8) ist ein von vielen Zellen (Monocyten, T-Zellen, Epithelzellen, etc.) nach Stimulation gebildeter Wachstumsfaktor, der chemotaktisch auf neutrophile Granulocyten und T-Lymphocyten wirkt [psc82].

6.6.1 Immunoreaktion von ENA-78 in wässrigen Systemen

Für erste Versuche zur Beobachtung der Immunreaktion von ENA-78 und Antikörpern gegen ENA-78 wurde synthetisches¹⁵ ENA-78 durch NHS-Ester-Aktivierung und Aminkopplung an das dextranbeschichtete OFW-Bauteil angebunden und mit gereinigten Antikörpern beprobt.

Abbildung 6-45 zeigt, daß eine Immobilisation von ENA-78 an der dextranbeschichteten Sensoroberfläche durch NHS/EDC-Aktivierung möglich ist und daß das Peptid nach der Immobilisation spezifische Immunreaktionen mit dem entsprechenden Antikörper eingeht. In wässrigen Puffersystemen führt die Beprobung mit unspezifischem Antikörper (anti-GOD) nur zu einer geringen Frequenzänderung, die im dargestellten Fall etwa 12 % des spezifischen Signals ausmacht. Damit ist eine hohe Spezifität des ENA-78-Immunsensors gegeben.

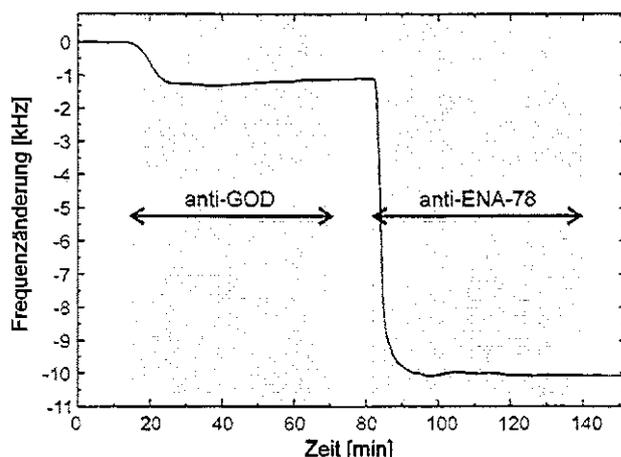


Abb. 6-45: Spezifische und unspezifische Reaktion von immobilisiertem ENA-78 in wässrigen Pufferlösungen (carboxymethyliertes Dextran; Basispuffer: 20 mM PBS mit 140 mM NaCl, pH 7,2; (1) Immobilisation: 400 mM EDC, 100 mM NHS, Aktivierungszeit: 10 min; 80 µg/ml synthetisches ENA-78 in 10 mM Acetatpuffer, pH 5,0 (5 µl), Inkubationszeit: 45 min; 1 M Ethanolamin; (2) Immunoreaktion: 7 µg/ml anti-ENA-78 Antikörper bzw. 7 µg/ml monoklonale anti-GOD Antikörper)

In Abbildung 6-46 sind die Sensorsignale für eine Konzentrationsreihe von Antikörpern gegen ENA-78 mit dextranbeschichteten, ENA-78 modifizierten OFW-Bauteilen dargestellt.

Innerhalb des dargestellten Konzentrationsbereiches ist ein linearer Anstieg der Resonanzfrequenzänderung mit der Antikörperkonzentration zu beobachten. Eine lineare Regression der Daten führt mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,988 zu einer Sensorempfindlichkeit von 1,4 kHz / µg ml⁻¹. Unter Berücksichtigung eines Frequenzrauschens beim Betrieb in PBS von ca. 40 Hz kann mit dem vorliegenden Sensor eine minimale Antikörperkonzentration von 80 ng/ml detektiert werden.

¹⁵ Die Verwendung eines synthetischen Peptids zur Entwicklung der Methode hat den Vorteil, daß die Stabilität und damit auch die Haltbarkeit gegenüber nativem Peptid erhöht ist.

Damit entsprechen die Empfindlichkeiten des ENA-Sensors in wässrigen Lösungen denen des in Kapitel 6.4.5 untersuchten Modell-Immunsensors.

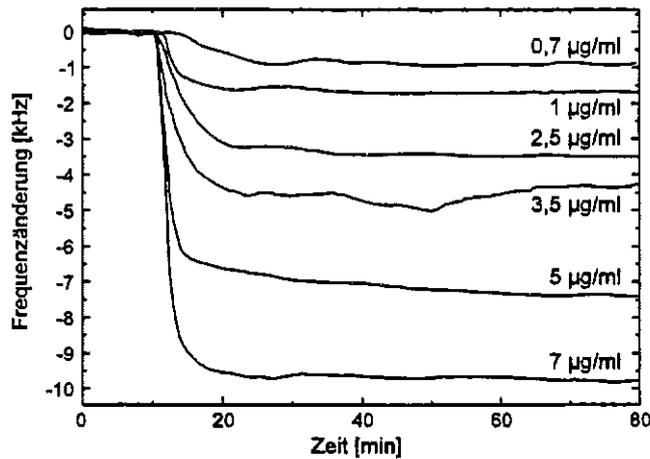


Abb. 6-46: Konzentrationsreihe von anti-ENA-78 Antikörpern bei der Immunreaktionen mit OFW-Bauelementen, die mit carboxymethyliertem Dextran beschichtet und mit ENA-78 modifiziert wurden (Basispuffer: 20 mM PBS mit 140 mM NaCl, pH 7,2)

6.6.2 Immunoreaktion von ENA-78 in Seren

Im vorigen Abschnitt konnte gezeigt werden, daß die Entwicklung eines ENA-Sensors prinzipiell möglich ist. Im Folgenden sollen erste Experimente zum Betrieb des Sensors in Seren vorgestellt werden.

Dazu wurde ein dextranbeschichtetes OFW-Bauelement wie in Kapitel 6.6.1 mit ENA-78 modifiziert. Die ENA-78 Antikörper lagen in Humanserum (Verdünnung 1:99 mit 20 mM PBS) vor ("positiv-Serum").

Abbildung 6-47 zeigt die Sensorsignale bei Beprobung mit negativ- und positiv-Serum. Als Trägerstrom wurde 20 mM PBS verwendet.

Bei der ersten Beprobung des Sensors mit negativ-Serum war eine signifikante Frequenzänderung von ca. 27 kHz zu beobachten. Beim nachfolgenden Spülen mit PBS war das Signal teilweise wieder reversibel, wie an dem langsamen Signalanstieg zu erkennen ist.

Eine erneute Beprobung mit negativ-Serum führte anschließend zu einer Frequenzänderung von ca. 10 kHz. Die Sensorantworten auf Beprobungen mit positiv-Serum betragen ebenfalls etwa 10 kHz. Eventuelle Differenzen zwischen positiv- und negativ-Signal waren klein gegenüber den entsprechenden Signalen, so daß eine eindeutige Unterscheidung von negativ- und positiv-Proben in diesem Experiment nicht möglich war.

6.6 OFW-BAUELEMENTE IN EINEM PRAXISRELEVANTEN ANWENDUNGSGBIET

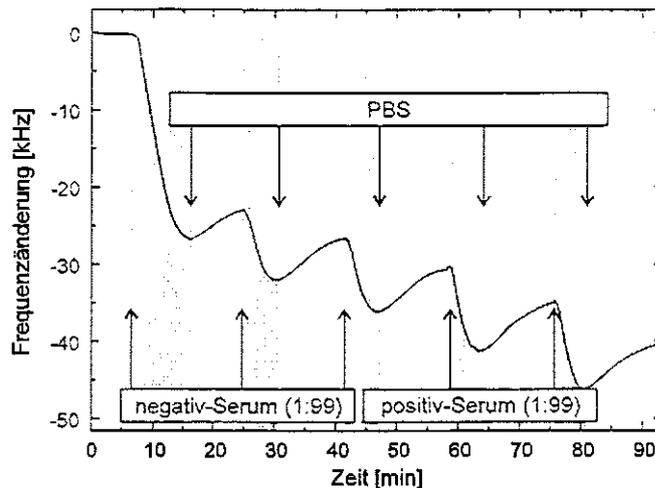


Abb. 6-47: Sensorsignale bei Beprobung eines ENA-78-Sensors mit negativ- und positiv-Humanseren (carboxymethyliertes Dextran; (1) Immobilisation: 400 mM EDC, 100 mM NHS, Aktivierungszeit: 10 min; 80 µg/ml synthetisches ENA-78 in 10 mM Acetatpuffer, pH 5,0 (5 µl), Inkubationszeit: 45 min; 1 M Ethanolamin; (2) Trägerpuffer: 20 mM PBS mit 140 mM NaCl, pH 7,2; Serumsverdünnungen: 1:99 mit 20 mM PBS)

Die großen Signale bei der Beprobung mit negativ- und positiv-Serum können auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. Vor allem zwei Faktoren spielen dabei eine wichtige Rolle: Unspezifische Adsorption der verschiedenen Bestandteile des Serums und Viskositätsunterschiede von Puffer- und Serumsproben.

- Zwar wurde in Pufferlösungen (siehe Abbildung 6-45) nur eine geringe Frequenzänderung bei Beprobung mit unspezifischem Antikörper festgestellt (ca. 12 % des spezifischen Signals), jedoch kann sich der Anteil unspezifischer Bindungen bei Verwendung von Serum mit komplexer Zusammensetzung deutlich erhöhen.
- Bei der Verwendung akustischer OFW-Bauelemente tragen neben Masseänderungen unter anderem auch Viskositäts-, Leitfähigkeits- und Temperaturunterschiede zum Sensorsignal bei (siehe Kapitel 2.4.3). Im vorliegenden Fall ist insbesondere der Einfluß unterschiedlicher Viskositäten von Puffer und Serum nicht zu vernachlässigen.

Sowohl die Adsorption der unspezifischen Serums-Inhaltsstoffe, als auch der auf Viskositätsunterschieden beruhende Effekt ist reversibel. Jedoch verlaufen beide Reaktionen ausgesprochen langsam (wie in Abbildung 6-45 am langsamen Signalanstieg beim Spülen mit Basispuffer zu erkennen ist), was vermutlich auf die Dreidimensionalität der Dextran-schicht zurückzuführen ist, die einen nur langsamen Austausch der in der Schicht vorhandenen Flüssigkeit erlaubt.

Zur Unterdrückung der genannten Störeffekte wurde statt reinem PBS als Trägerpuffer Humanserum in einer Verdünnung von 1:99 mit PBS verwendet. Die bei Beprobung mit negativ- bzw. positiv-Serum erhaltenen Sensorantworten sind in Abbildung 6-48 dargestellt.

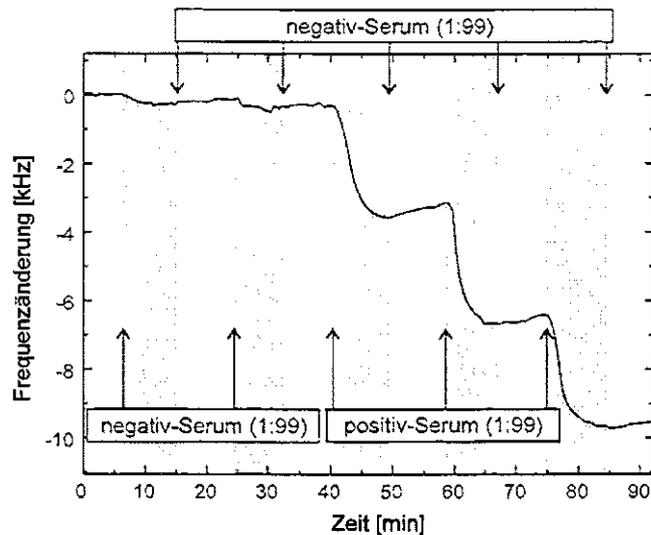


Abb. 6-48: Sensorsignale bei optimierter Beprobung eines ENA-78-Sensors mit negativ- und positiv-Humanseren (carboxymethyliertes Dextran; (1) Immobilisation: 400 mM EDC, 100 mM NHS, Aktivierungszeit: 10 min; 80 µg/ml synthetisches ENA-78 in 10 mM Acetatpuffer, pH 5,0 (5 µl), Inkubationszeit: 45 min; 1 M Ethanolamin; (2) Trägerpuffer: Humanserum, Verdünnung 1:99 mit 20 mM PBS)

Unter diesen Bedingungen werden für das negativ-Serum nur noch vernachlässigbar kleine Frequenzänderungen von maximal 300 Hz gefunden.

Dagegen können nun die Sensorantworten bei Immunoreaktionen mit positiv-Seren eindeutig bestimmt werden. Im vorliegenden Fall wurden Frequenzänderungen von ca. 3,5 kHz gefunden. Bei einer ENA-78 Antikörperkonzentration von 15 µg/ml im verdünnten positiv-Serum kann damit eine Sensorempfindlichkeit von 230 Hz / µg ml⁻¹ abgeschätzt werden. Die Empfindlichkeit bei Messungen im Serum ist somit gegenüber Messungen in Puffersystemen um etwa den Faktor 6,5 schlechter. Die mit dem ENA-Sensor minimal detektierbare Antikörperkonzentration im Serum beträgt ca. 520 ng/ml.

6.7 ZUSAMMENFASSENDE UND WEITERFÜHRENDE BETRACHTUNGEN

Mit der vorgestellten Methode zur Coimmobilisation von Dextranen mit T-BSA ist es möglich, auf einfachem und schnellem Weg reproduzierbar dextranbeschichtete Oberflächen zu erzeugen. Die Methode erlaubt eine Dextranbeschichtung von verschiedensten Oberflächen [bar98c]. Sie ist weder durch das zu immobilisierende Dextran, noch durch das Oberflächenmaterial bzw. den verwendeten Sensortyp beschränkt.

- Die Funktionalisierung des Dextrans ist für die Durchführung der Dextrananbindung an die Oberfläche nicht relevant. Es wurde gezeigt, daß unterschiedlichste Dextrane (Molekulargewichte von 10.000 und 70.000; biotinylierte Dextrane, carboxymethylierte Dextrane, [³H]-Dextran) mit der gleichen Beschichtungstechnik immobilisiert werden können.
- Ebenso ist die entwickelte Beschichtungstechnik auf verschiedensten Oberflächenmaterialien anwendbar. So konnte gezeigt werden, daß das Verfahren sowohl auf Polymerbeschichtungen (z.B. Parylen, Polyimid und Polystyrol), als auch auf anorganischen Oberflächenmaterialien (z.B. gesputtertes SiO₂) angewandt werden kann.
- Schließlich wird derzeit im Rahmen einer Diplomarbeit die Übertragung der Coimmobilisation von Dextranen mit dem hier vorgestellten Verfahren von polymerbeschichteten massesensitiven OFW-Bauelementen auf die anorganischen Oberflächen (i.a. TiO₂/SiO₂) von Gitterkoppler-Sensorchips (optisches Meßprinzip) untersucht [sig98]. Erste Experimente ergaben, daß trotz der geringeren Bindungseffizienz von T-BSA auf TiO₂/SiO₂ (8 %) gegenüber Parylen (42 %) (siehe Tabelle 6-1) eine Anbindung von Dextran mittels T-BSA möglich ist.

Eine Verbesserung der Beschichtungstechnik läßt sich voraussichtlich durch einen Austausch des Photolinkers erzielen.

- BSA trägt vermutlich aufgrund seines hohen Molekulargewichts und des hohen Anteils von T-BSA in der Photolinker/Dextran-Mischung erheblich zur Dämpfung der beschichteten Bauteile bei. Das Protein wird jedoch nur als Gerüst genutzt, das die photoaktiven Gruppen trägt. Eine Immobilisation von Liganden erfolgt ausschließlich am Dextran, nicht am BSA.
Die Verwendung eines kleineren und leichteren Photolinkers könnte sich daher positiv auf die Dämpfung der Bauteile und damit auf die immobilisierbare Menge an Dextran auswirken und dadurch eine Sensitivitätssteigerung ermöglichen.
- Eine weitere Möglichkeit wäre die Einführung photoaktiver Gruppen direkt am Dextran, wodurch gänzlich auf den Photolinker T-BSA verzichtet werden kann [sig98].

An den dextranbeschichteten OFW-Bauelementen konnten mit Hilfe einfacher und schneller Standardprozeduren verschiedenste Proteine immobilisiert werden. Die entsprechenden Immobilisierungsprozeduren wurden von den literaturbekannten optischen Systemen auf die massensensitiven Bauelemente übertragen, wobei die bei der Optimierung erhaltenen Abhängigkeiten erstmals mit akustischen Sensoren beobachtet werden konnten.

Die geringe unspezifische Bindung an der Dextranoberfläche und die hohe Spezifität des Immunosensors wurde durch Reaktionen mit spezifischen und unspezifischen Bindungspartnern nachgewiesen.

Für die dextranbeschichteten Immunosensoren wurden um zwei Größenordnungen höhere Empfindlichkeiten erzielt, als dies bislang mit den gleichen OFW-Bauelementen nach Photoimmobilisation von Proteinen bzw. Immobilisation durch Cyanotransfertechnik möglich war [wes96]. Ursache dafür sind vor allem das größere Ausmaß an Ligand-Immobilisation in der dreidimensionalen Dextranmatrix gegenüber den zweidimensionalen rezeptiven Schichten bei Photoimmobilisation und Cyanotransfertechnik und die geringeren unspezifischen Adsorptionen an der Dextranschicht.

Eine weitere Empfindlichkeitssteigerung kann von mehreren Ansätzen ausgehen:

- Ein klassischer Weg zur Sensitivitätssteigerung ist die Kopplung des Ligaten an schwere Partikel (z.B. kolloidales Gold) [ias96]. Dadurch ist bei massensensitiven Bauelementen eine drastische Erhöhung der Sensorantwort bei der Immunreaktion dieser Ligat-Partikel-Komplexe mit dem immobilisierten Liganden zu erwarten.
- Für Analyte mit niedrigem Molekulargewicht ($M_r < 1,5$ kDa) bieten sich Verfahren, angelehnt an das Prinzip kompetitiver ELISA-Verfahren, an. Dabei werden Konkurrenzreaktionen zwischen Ligat und einem mit einem höhermolekularen Marker gekoppeltem Ligat um den immobilisierten Liganden ausgenutzt.
- Bei akustischen Bauelementen, basierend auf horizontal polarisierten transversalen Oberflächenwellen (STW), kann durch die Überführung des Wellentyps in Love-Wellen eine generelle Sensitivitätssteigerung erzielt werden (siehe Kapitel 7).

7 SENSITIVITÄTSSTEIGERUNG DURCH ANREGUNG VON LOVE-WELLEN

Ein Ansatz zur Steigerung der Sensitivität und damit zur Verbesserung der Nachweisgrenzen von akustischen Sensoren ist die Verwendung eines speziellen Wellentyps, den Love-Wellen. Diese sind in jüngster Zeit zum Gegenstand einiger theoretischer und experimenteller Untersuchungen geworden (siehe Kapitel 7.1). Wie diese Untersuchungen zeigen, lassen akustische Oberflächenwellen-Bauelemente, basierend auf Love-Wellen, eine erhöhte Sensitivität erwarten. Durch das Aufbringen einer dünnen dielektrischen wellenführenden Beschichtung auf das piezoelektrische Substrat sollte es zu einer Überführung der horizontal polarisierten SSBW in die sensitivere Love-Welle kommen (siehe Kapitel 2.1). Allerdings steht bislang noch eine praktische Nutzung dieses Effekts aus.

Im Folgenden wird ein Ansatz zur Übertragung des Konzepts der Love-Wellen auf die kommerziell erhältlichen OFW-Bauelemente *Murata SAF 380* vorgestellt. Dabei wird der Effekt der Sensitivitätssteigerung gegenüber den unmodifizierten Bauteilen sowohl theoretisch betrachtet als auch experimentell nachgewiesen.

7.1 THEORETISCHE BESCHREIBUNG VON LOVE-WELLEN

Bei Love-Wellen (siehe Kapitel 2.1.2.3) handelt es sich generell um akustische Moden, die sich in einer Schichtstruktur fortpflanzen, welche aus einem Substrat und einer darauf liegenden dünnen wellenführenden Schicht besteht. Im Falle von OFW-Bauelementen kann durch das akustisch weichere Schichtmaterial die auf einem Substrat erzeugte Oberflächenwelle an der Oberfläche konzentriert werden, was zu einer erhöhten Empfindlichkeit dieses Wellentyps für Störungen an der Oberfläche führt und auf diese Weise eine hohe Massesensitivität bewirkt. Aufgrund der hohen Sensitivität und des rein transversalen Wellentyps sind Sensoren, die auf Love-Wellen basieren, ausgesprochen vielversprechend für (bio)chemische Anwendungen in Gasen und Flüssigkeiten [giz92a, giz92b, giz95, kov92a, kov94, hau94, du96b, har96].

7.1.1 Auswahl eines geeigneten Schichtsystems

Um Love-Wellen anzuregen, muß die transversal akustische Schallgeschwindigkeit in der aufgetragenen Schicht kleiner sein als die im piezoelektrischen Substrat. Nur unter dieser Bedingung ist es möglich, eine SSBW in eine Love-Welle zu überführen. Je größer die Differenz beider Geschwindigkeiten ist, desto effizienter ist diese Umwandlung der Wellenarten und desto höher damit der Sensitivitätsgewinn.

Eine verringerte Dichte des Schichtmaterials führt ebenfalls zu einer erhöhten Sensitivität, jedoch spielt dieser Effekt im Vergleich zu dem der Schallgeschwindigkeitsdifferenz nur eine untergeordnete Rolle [ste93].

Das Material des piezoelektrischen Substrates ist im allgemeinen durch das verwendete STW-Bauteil vorgegeben. Eingesetzt werden hierbei spezielle Kristallschnitte, wie ST-Schnitt-Quarz (ST-Quarz) [har96, kov92a, du96a, du96b, du98], Y-Schnitt-Quarz (Y-Quarz) [giz92a, giz92b] und 36°-rot. YX-Schnitt-LiTaO₃ (36YX.LT) [kon93, kon95].

Um maximale Sensitivität zu erzielen, sollten als wellenführende Schicht Materialien gewählt werden, die geringe transversale Schallgeschwindigkeit und geringe Dichte haben. Außerdem sollten diese Materialien gute elastische Eigenschaften aufweisen, um geringe akustische Absorption zu erhalten, da andernfalls das Bauelement starker Dämpfung unterliegt [kov92a, giz92b]. Aus diesem Grund ist auch von einer Verwendung der (bio)chemischen Beschichtung selbst als wellenführender Schicht abzuraten, da diese im allgemeinen schlechte akustische Eigenschaften aufweist [kov92b].

Am häufigsten werden gesputtertes SiO₂ [kov92a, kov92b, kov94, hau94, du96a, du96b, har96] und Polymere wie Polymethylmethacrylat (PMMA) [giz92a, giz92b, giz93, giz95] als wellenführende Schicht eingesetzt. (Die hier aufgeführten Arbeiten befinden sich noch im Versuchsstadium; eine praktische Nutzung des Effekts der Love-Wellen ist bislang noch nicht realisiert.)

Die Schallgeschwindigkeit von gesputtertem SiO₂ liegt mit etwa 2850 m/s [wan94] deutlich unter der von ST-Quarz (5060 m/s) [wan94], Y-Quarz (3764 m/s) [giz92b] und 36YX.LiTaO₃ (4162 m/s) [kon95], wodurch die oben genannte Bedingung für die Existenz von Love-Wellen erfüllt ist. Weiterhin hat gesputtertes SiO₂ gute elastische und thermische Eigenschaften [du96b] und kann somit als wellenführende Schicht verwendet werden.

Als polymere Beschichtungen werden beispielsweise Polyethylen, Polyethylenoxid und Polymethylmethacrylat (PMMA) in ersten Experimenten eingesetzt [ste93]. Aufgrund der geringeren Dichte und geringeren transversalen Schallgeschwindigkeit (z.B. $V_{\text{PMMA}} = 1100 \text{ m/s}$) [giz92b]) sollten sich damit im allgemeinen noch größere Sensitivitäten als bei SiO₂-besputterten Bauteilen erzielen lassen [du98], jedoch hat sich gezeigt, daß die akustischen Verluste ebenfalls deutlich größer sind [du96b, giz92b, ste93].

7.1.2 Bestimmung der optimalen Schichtdicke für maximale Sensitivität für ein bestimmtes Schichtsystem

Die Massesensitivität eines akustischen Bauteils ist abhängig von der akustischen Energie an der Oberfläche. Aufgrund des Effektes der wellenführenden Schicht eines auf Love-Wellen basierenden Bauelements (LW-Bauelement) wird die akustische Energie an der Oberfläche konzentriert, wodurch eine hohe Sensitivität erzielt werden kann. Die Dicke dieser aufgetragenen Schicht hat einen starken Einfluß auf die Massesensitivität. Mit steigender Schichtdicke durchläuft die Sensitivität ein Maximum. Dies bedeutet, daß bei gegebenem Schichtsystem und definierter Wellenlänge die Dicke der wellenführenden Schicht optimiert werden muß, um maximale Sensitivität zu erlangen. Hierzu sind zahlreiche theoretische Ansätze bekannt [far70, tou69, tua72, aul73, aul76, aul79, wan94,

7.1 THEORETISCHE BESCHREIBUNG VON LOVE-WELLEN

end94], jedoch wird aufgrund der Komplexität des Problems im allgemeinen eine numerische Lösung herangezogen [far72, kov92a, kov92b, du96a, giz92a, jak97]. Nach erfolgter Optimierung der Schichtdicke können LW-Bauteile mit bis zu 25-fach höheren Sensitivitäten erhalten werden, als bei entsprechenden SH-OFW-Bauteilen auf gleichem Substratmaterial und bei gleicher Grundfrequenz [wan94, du96b].

7.1.2.1 Gang der Sensitivität bei zunehmender Dicke der wellenführenden Schicht

Die hohe Sensitivität der LW-Bauelemente beruht auf einem wellenführenden Effekt der Beschichtung. Da es sich bei Love-Wellen um Oberflächenwellen handelt, befindet sich der größte Anteil der akustischen Energie in der wellenführenden Schicht und in oberflächennahen Regionen des Substrates. Die Verteilung dieser Energie und damit die Sensitivität hängt bei gegebener Wellenlänge von der Dicke der Beschichtung ab.

Bei sehr geringen Dicken ($h \ll \lambda$) der wellenführenden Schicht dringt das akustische Feld tief in das piezoelektrische Substrat ein. Mit zunehmender Schichtdicke wird die akustische Energie in zunehmendem Maße in der wellenführenden Schicht und damit an der Oberfläche gebunden, wodurch es zu einer Zunahme der Sensitivität kommt. Wenn schließlich nahezu die gesamte akustische Energie in der Beschichtung konzentriert ist, führt eine weitere Zunahme der Schichtdicke wiederum zu einer Abnahme der Sensitivität, da sich die Energie über die gesamte Dicke der Beschichtung verteilt und daher die Energiedichte der Welle abnimmt [kov92a, kov92b]. Damit existiert eine optimale Schichtdicke, bei der maximale Sensitivität für eine gegebene Wellenlänge erhalten wird.

Bei dicken Schichten kann zudem mehr als eine Love-Mode angeregt werden, wobei jedoch die Mode nullter Ordnung sensitiver ist als die Moden höherer Ordnung, da bei dieser die räumliche Verteilung der akustischen Energie am stärksten an der Oberfläche konzentriert ist [kov92b, wan94, jak97].

Die maximale Schichtdicke (h_0) für den Nullmodenbetrieb kann nach Gizeli et al. [giz92b] mit Gleichung 7-1 abgeschätzt werden:

$$h_0 = \frac{V_S V_L}{2f \sqrt{(V_S^2 - V_L^2)}} \quad (7-1)$$

V_S = transversal akustische Schallgeschwindigkeit des Substrats
 V_L = transversal akustische Schallgeschwindigkeit der wellenführenden Schicht
 f = Resonanzfrequenz

Die im Folgenden gemachten Angaben beziehen sich, falls nicht anders angegeben, ausschließlich auf die Nullmode.

7.1.2.2 Störungstheoretische Beschreibung von Love-Wellen zur Berechnung der Massesensitivität bei dünnen Massebeladungsfilmen

Abbildung 7-1 zeigt schematisch den Aufbau eines LW-Bauelements. Es besteht aus einem Substrat (Dichte ρ_s , transversale Schallgeschwindigkeit V_s , Schermodul μ_s) und der wellenführenden Schicht (ρ_L, V_L, μ_L , Dicke h). Die auf dem Bauteil abgeschiedene Masse ist als sehr dünner Massebeladungsfilm (ρ_M, V_M, μ_M , Dicke ε) dargestellt. Die zur Anregung der Welle notwendigen Interdigitaltransducer sind in dieser Abbildung nicht gezeigt. Sie befinden sich zwischen Substrat und wellenführender Schicht.

Die Auslenkung der Welle findet in x-Richtung statt, die Welle pflanzt sich in z-Richtung fort. Die y-Achse stellt die Normale auf das Substrat dar.

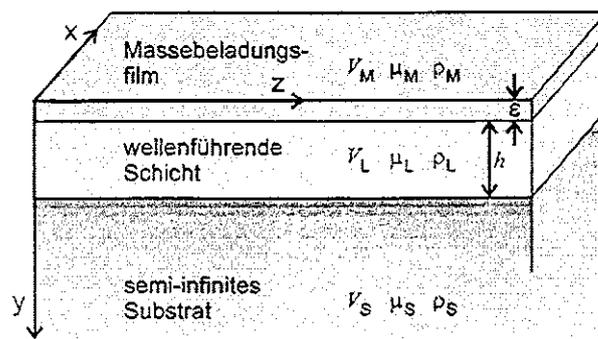


Abb. 7-1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines LW-Bauelements mit Koordinatensystem und Zuweisung der Variablen

Die Dispersionsgleichung für Love-Wellen in einem solchen System ohne Massebeladungsfilm ist gegeben durch Gleichung 7-2 [far72, wan94]:

$$\tan(\beta_L h) = \frac{\mu_s}{\mu_L} \sqrt{\frac{1 - \frac{V^2}{V_s^2}}{\frac{V^2}{V_L^2} - 1}} \quad (7-2)$$

- V_s = Schallgeschwindigkeit im Substrat
- V_L = Schallgeschwindigkeit in der wellenführenden Schicht
- V = Phasengeschwindigkeit der Love-Welle
- h = Schichtdicke der wellenführenden Schicht
- $\mu_{s,L}$ = Schermodule von Substrat bzw. wellenführender Schicht
- β_L = Ausbreitungskonstante in der wellenführenden Schicht

$$\beta_L = \sqrt{\frac{\omega^2}{V_L^2} - \frac{\omega^2}{V^2}} \quad (7-3)$$

- β_s = Ausbreitungskonstante im Substrat

$$\beta_s = \sqrt{\frac{\omega^2}{V^2} - \frac{\omega^2}{V_s^2}} \quad (7-4)$$

- ω = Kreisfrequenz

7.1 THEORETISCHE BESCHREIBUNG VON LOVE-WELLEN

Für Sensoranwendungen wird die Massebeladung auf der Oberfläche des LW-Bauelements als ein dünner, gleichmäßiger Film betrachtet. Die Dicke dieses Films muß so gering sein, daß die Partikelgeschwindigkeit innerhalb des gesamten Films als konstant und gleich der auf der Oberfläche der wellenführenden Schicht angenommen werden kann. Mit Hilfe der Störungstheorie erster Ordnung kann dann die Änderung der Wellengeschwindigkeit aufgrund der Masseabscheidung berechnet werden, indem der Film als Störung der Randbedingungen behandelt wird [tie69, far72, aul73]. Diese Masseabscheidung soll hier als einzige Störung betrachtet werden.

Zur Berechnung der Sensitivität geben Wang et al. [wan94] eine aus der Störungstheorie von Auld [aul73] abgeleitete Näherungsformel an, wobei folgende Annahmen gemacht werden:

1. Das Bauelement wird in Resonanz betrieben.
2. Das Substrat wird als semi-infinit angenommen.
3. Der Massebeladungsfilm ist dünn, sodaß die Störungstheorie erster Ordnung angewendet werden kann.
4. Die Elastizität des Massebeladungsfilms wird vernachlässigt.
5. Das Verhältnis μ_s/μ_L geht gegen unendlich.
6. Für Sensoranwendungen müssen β_s und β_L als real angenommen werden.
7. Die Schallgeschwindigkeiten in Substrat und wellenführender Schicht sind signifikant unterschiedlich.
8. Aus Annahme 6 folgt: Die Phasengeschwindigkeit der Love-Welle liegt zwischen den beiden Schallgeschwindigkeiten von Substrat und wellenführender Schicht.

Damit erhält man folgende Gleichung für die Sensitivität von LW-Bauelementen [wan94]:

$$S = -\frac{1}{\rho_L \lambda} \left[\frac{h}{\lambda} \left(1 + \frac{\cos(\beta_L h) \sin(\beta_L h)}{\beta_L h} + \frac{\rho_s / \rho_L}{\beta_s h} \cos^2(\beta_L h) \right) \right]^{-1} \quad (7-5)$$

λ = Wellenlänge der Love-Mode
 ρ_s = Dichte des Substrats
 ρ_L = Dichte der wellenführenden Schicht

Aus Gleichung 7-5 ist ersichtlich, daß die Sensitivität maximal wird, wenn $\cos(\beta_L h) = 0$. Für die niedrigste Mode führt diese Voraussetzung zu $\beta_L h = \pi/2$, was einer $\lambda/4$ -Resonanz der wellenführenden Schicht entspricht.

Mit Hilfe von Gleichung 7-2 kann Gleichung 7-5 numerisch gelöst werden, so daß die Phasengeschwindigkeiten und Sensitivitäten für verschiedene Schichtdicken erhalten werden [adl90, kov92a, wan94]. Eine Ableitung einer einfachen algebraischen Gleichung ist jedoch nicht möglich, da es sich bei Gleichung 7-2 um eine implizite Funktion handelt.

Eine numerische Lösung soll im Folgenden am Beispiel des hier verwendeten Systems $\text{LiTaO}_3/\text{SiO}_2$ gezeigt werden (siehe Kapitel 7.3.1).

7.2 ÜBERBLICK ÜBER ARBEITEN ANDERER AUTOREN ZUM THEMA LOVE-WELLEN

Love-Wellen, insbesondere auch die Massesensitivität von LW-Bauteilen in Abhängigkeit von der Schichtdicke der wellenführenden Schicht, wurden von zahlreichen Autoren theoretisch beschrieben und auch experimentell beobachtet. Dabei wurden verschiedene Konzepte zur Realisation von LW-Sensoren angewandt, die alle auf dem Betrieb des Bauteils als Verzögerungsleitung basieren. Im Folgenden soll eine Auswahl einiger Arbeiten kurz vorgestellt werden.

- Eine unlängst von Jakoby et al. [jak97] veröffentlichte Studie faßt grundlegende Eigenschaften von Love-Wellen zusammen und belegt diese durch numerische Berechnungen an einem Schichtsystem von SiO_2 auf ST-Quarz.
- Wang et al. [wan94] stellten eine analytische Formel zur Berechnung der Massesensitivität von LW-Sensoren vor, die auf einem störungstheoretischen Ansatz beruht. Mit Hilfe dieser Formel ist es möglich, die optimale Dicke der wellenführenden Schicht zu berechnen.
Auf diesem Ansatz beruht auch die in Kapitel 7.1.2.2 vorgestellte und in Kapitel 7.3.1 angewandte störungstheoretische Berechnung der Massensensitivität von LW-Bauteilen.

- Ebenfalls ein störungstheoretischer Ansatz wurde von Kovacs et al. [kov92b] präsentiert. Die Autoren berechneten und verglichen damit die Sensitivitäten von verschiedenen akustischen Oberflächenwellen.

Weiterhin wurden die theoretischen Voraussagen für ein LW-Bauteil (Betrieb als Verzögerungsleitung) mit SiO_2 als wellenführender Schicht auf ST-Quarz mit experimentellen Daten verglichen. Die verwendeten Bauteile hatten im unbeschichteten Zustand eine Grundfrequenz von 122,5 MHz mit einer Einfügedämpfung von ca. 20 dB. Es wurden gesputterte SiO_2 -Schichten bis zu einer Dicke von 1,46 μm aufgebracht [kov92a, kov94], wobei diese Schichtdicken allerdings deutlich unter der berechneten optimalen Schichtdicke für das gegebene System von ca. 6 μm blieben. Die Erzeugung dickerer Schichten war den Autoren aufgrund von Adhäsionsproblemen und inneren Spannungen der Schichten nicht möglich. Die experimentelle Bestimmung der Massesensitivität erfolgte durch Aufbringen von Photoresist-Filmen.

- Gizeli et al. [giz92a, giz92b, giz93, giz95, giz97] publizierten größtenteils experimentelle Betrachtungen an Bauteilen mit polymeren wellenführenden Schichten. Die hergestellten LW-Sensoren basierten auf OFW-Bauteilen (Verzögerungsleitung) mit dem Substratmaterial Quarz (Y-Schnitt), einer Grundfrequenz von 110 MHz und einer Einfügedämpfung von ca. 29 dB. Als wellenführende Schicht wurde bevorzugt Polymethylmethacrylat (PMMA) verwendet, das mittels Spin-Coating-Prozeß bis zu einer Dicke von 1,6 μm aufgebracht wurde. Auch hier war die maximal erzeugte Schichtdicke geringer als die theoretisch vorausgesagte optimale Schichtdicke von ca. 3 μm . Der limitierende Faktor war in diesem Fall der schnelle Anstieg der Dämpfung der LW-Bauteile mit der Schichtdicke der wellenführenden PMMA-Schicht.

Die Veränderung der Einfügedämpfung sowie der Resonanzfrequenz der Bauteile wurde in Abhängigkeit von der Schichtdicke des PMMA-Films experimentell beobachtet. Die Untersuchung der Massesensitivität erfolgte durch wiederholte Abscheidung von Langmuir-Blodgett-Filmen und ergab eine 3 (1,0 μm PMMA) bzw. 7-fach (1,6 μm PMMA) erhöhte Sensitivität im Vergleich zum unbeschichteten Quarz-Bauteil.

Ein erster Schritt zum Einsatz von LW-Sensoren in der Biosensorik wurde durch die Adsorption von IgG auf dem Bauteil, sowie durch die Abscheidung von Protein-Multilag, bestehend aus IgG, anti-IgG Antikörpern und Protein A, gezeigt.

- Wellenführende Schichten in einem Schichtdickenbereich, der das theoretisch berechnete Optimum einschließt, wurden erstmals von Du, Harding et al. [du96a, du96b, har96] realisiert. Sie arbeiteten mit Bauelementen (Verzögerungsleitung), die auf ST-Quarz basieren, mit einer Grundfrequenz von 124 MHz und einer Einfügedämpfung von ca. 23 dB. Als wellenführende Schicht wurde gesputtertes SiO_2 in einem Schichtdickenbereich zwischen 0 und 7,3 μm aufgebracht.

Zur Bestimmung der Massesensitivität in Abhängigkeit von der SiO_2 -Schichtdicke wurden Experimente an Luft durchgeführt, wobei die Massebelegung durch einen ultradünnen Goldfilm simuliert wurde. Die Untersuchungen ergaben in Übereinstimmung mit der Theorie einen schnellen Anstieg der Sensitivität mit der Schichtdicke bis zu einem Maximum bei 5,5 μm und eine anschließende Abnahme mit weiter zunehmender Schichtdicke. Am Maximum wurde eine etwa 25-fach höhere Massesensitivität erreicht als beim unbeschichteten Bauteil.

In flüssigen Medien wurden mit IgG Immunoreaktionen durchgeführt, wobei hier allerdings keine Bestimmung der Sensitivitätsänderung mit der Schichtdicke erfolgte.

Neueste Arbeiten der Autoren befassen sich mit dem Aufbau einer Hybrid-Struktur für LW-Bauteile, die aus einem Zweischichtenaufbau von SiO_2 (2,2 und 3,2 μm) und PMMA (0 bis 1,9 μm) auf ST-Quarz besteht [har96b, har97, du98]. Diese Mehrlagenstruktur soll die Vorteile beider Schichtmaterialien kombinieren und zu höheren Sensitivitäten bei geringen Dämpfungen führen.

7.2.1 Abgrenzung der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit unterscheidet sich von den oben vorgestellten hauptsächlich in zwei Punkten.

Als Basis der LW-Bauelemente wurden erstmals kommerziell erhältliche Bauteile eingesetzt (siehe Kapitel 3.3.1). Da diese als Massenware produziert werden, sind sie kostengünstig zu erhalten. Im Gegensatz zu den im Eigenbau produzierten Bauteilen der obigen Autoren sind die hier verwendeten Bauteile wesentlich kleiner und weisen extrem geringe Einfügedämpfungen, sowie eine hohe Resonanzfrequenz auf. Das Design der verwendeten Bauteile unterscheidet sich signifikant von dem der einfachen Verzögerungsleitungen (siehe Abbildung 3-2). Als Substratmaterial kommt 36°-rot. XY-LiTaO₃ zum Einsatz.

Der zweite Punkt, der einen bedeutenden Unterschied der vorliegenden Arbeit darstellt, ist die Bestimmung der Abhängigkeit der Massesensitivität der LW-Bauteile von der Schichtdicke der wellenführenden Schicht, die durch physikalische Adsorption von BSA auf der Oberfläche erfolgt.

- Im Vergleich zu den von anderen Autoren verwendeten Massebeladungsfilmen aus Photoresists [kov92a, kov94], Goldfilmen [du96a] und Langmuir-Blodgett-Filmen [giz92a, giz92b] hat diese Methode den Vorteil, daß es sich hierbei um eine einfache, wenig aufwendige Technik handelt, die eine schnelle experimentelle Ermittlung der optimalen Schichtdicke der wellenführenden Schicht ermöglicht.
- Die Abscheidung des Proteins erfolgt aus wäßriger Lösung, wodurch die Massesensitivität in flüssigen Medien und nicht in Luft bestimmt wird, was für den Einsatz in der Biosensorik wichtig ist.
- Die Massebelegung der Oberfläche kann bei der Abscheidung von BSA auf OFW-Sensoroberflächen on-line beobachtet werden, was den Vorteil hat, daß unerwünschte Einflüsse wie Sensordrift etc. erkannt und eliminiert werden können.
- Bei der abgeschiedenen BSA-Schicht handelt es sich um einen sehr dünnen Film im Vergleich zur Dicke von SiO_2 und Parylen als wellenführender Schicht (molekulare Monolagen von Proteinen haben Dicken von maximal 100 nm). Damit kann dieser Massebeladungsfilm als kleine Störung angesehen werden, wie es bei den theoretischen Berechnungen vorausgesetzt wird. Diese Annahme war zum Beispiel bei den von anderen Autoren verwendeten Photoresists nicht möglich, da diese Dicken im μm -Bereich aufwiesen und damit eine beträchtliche Störung des Systems darstellen [kov92a].

Da sich BSA reproduzierbar auf identischen Oberflächen abscheidet, kann eine bei allen Bauteilen gleiche Massebeladung der Oberfläche angenommen werden, wenn auch die absolute Menge an abgeschiedenem BSA hier nicht direkt über die Änderung der Resonanzfrequenz bestimmt wird. Damit ist jedoch ein direkter Vergleich der Sensitivitätsänderung der unterschiedlichen Bauteile möglich.

Die Bestimmung der absoluten Menge an abgeschiedenem BSA erfolgte im Rahmen dieser Untersuchungen durch radioaktiv markiertes Protein mit Hilfe von Flüssigszintillationszählung.

7.3 SiO₂ ALS WELLENFÜHRENDE SCHICHT7.3.1 Theoretische Betrachtung für das System 36YX.LiTaO₃/SiO₂

Für den hier zu betrachtenden Fall von gesputtertem SiO₂ auf einem 36YX.LT STW-Bauelement gelten die in Tabelle 7-1 zusammengestellten Werte, die bei der Berechnung und Erzeugung von Love-Wellen berücksichtigt werden müssen:

f_0	380 MHz	
λ	10,8 μm	[¹]
V_s	4160 m/s	[kon95]
V_L	2850 m/s	[wan94]
ρ_s	7450 kg/m ³	[aul73]
ρ_L	2200 kg/m ³	[kov92a]
μ_s	$9,4 \cdot 10^{10}$ N/m ²	[²]
μ_L	$3,12 \cdot 10^{10}$ N/m ²	[aul73 ³]

[¹] anhand der Interdigitalabstände des Bauteils ausgemessen

[²] Das Schermodul für 36YX.LiTaO₃ ist in der Literatur nicht explizit angegeben. Daher wurden nach [aul73] die Lamékonstanten ($\mu = c_{44}$) eingesetzt.

[³] Der angegebene Wert gilt für amorphes SiO₂. Die Materialkonstanten für gesputtertes SiO₂ unterscheiden sich in gewissem Maße von denen des amorphen SiO₂, sind aber nicht tabelliert, da sie je nach Sputterbedingungen variieren können. Die Annahme der Werte des amorphen SiO₂ wird von Kovacs et al. [kov92a], Wang et al. [wan94] und Jakoby et al. [jak97] gemacht, um eine numerische Lösung durchführen zu können.

Tab. 7-1: Werte für ein 36°-rot. XY-LiTaO₃ (36YX.LT) STW-Bauelement und gesputtertes SiO₂ als wellenführende Schicht

Die maximale Schichtdicke für den Nullmodenbetrieb beträgt in diesem Fall nach Gleichung 7-1 5,1 μm .

7.3.1.1 Berechnung der Phasengeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Schichtdicke

Für die Phasengeschwindigkeit wurde eine numerische Lösung der Dispersionsgleichung 7-2 durchgeführt. Dazu wurde für $0,1 \mu\text{m} < h < 10 \mu\text{m}$ die Phasengeschwindigkeit mit Hilfe von Gleichung 7-2 berechnet, die zwischen den Schallgeschwindigkeiten von Substrat ($V_{s, \text{LiTaO}_3} = 4160$ m/s) und wellenführender Schicht ($V_{L, \text{SiO}_2} = 2850$ m/s) liegen muß¹⁶. Die so ermittelte Phasengeschwindigkeit in Abhängigkeit von der normierten Schichtdicke (h/λ) ist in Abbildung 7-2 dargestellt.

¹⁶ Das zur Berechnung der Phasengeschwindigkeit und Massesensitivität in Abhängigkeit von der Schichtdicke verwendete Programm ist in Anhang E zu finden.

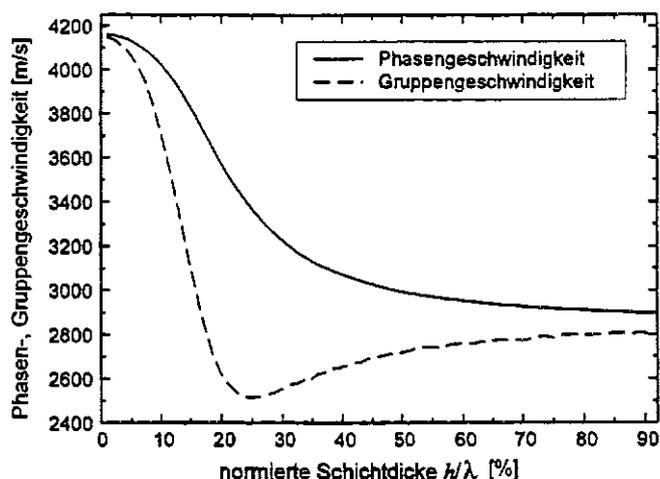


Abb. 7-2: Berechnete Phasen- und Gruppengeschwindigkeit der nullten Love-Mode in Abhängigkeit von der normierten Schichtdicke in einem System von 36YX.LiTaO₃ mit einer gesputterten SiO₂-Schicht

Bei sehr dünnen SiO₂-Schichten ($h \ll \lambda$) befindet sich der größte Anteil der akustischen Energie im Substrat; damit entspricht die Phasengeschwindigkeit der im 36YX.LiTaO₃ (4160 m/s). Mit zunehmender Schichtdicke nimmt die Phasengeschwindigkeit ab und nähert sich für sehr dicke Schichten der Schergeschwindigkeit in SiO₂ (2850 m/s).

7.3.1.2 Gruppengeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Schichtdicke

Die Gruppengeschwindigkeit in Abhängigkeit von der normierten Schichtdicke berechnet sich aus der Phasengeschwindigkeit wie folgt [kov92a]:

$$V_g = V \left(1 + \frac{h/\lambda}{V} \frac{dV}{d(h/\lambda)} \right) \tag{7-6}$$

Der Verlauf der Gruppengeschwindigkeit ist ebenfalls in Abbildung 7-2 dargestellt.

7.3.1.3 Massesensitivität in Abhängigkeit von der Schichtdicke

Zur Bestimmung der Massesensitivität wurden die erhaltenen Wertepaare für die Phasengeschwindigkeit bei den entsprechenden Schichtdicken in Gleichung 7-5 eingesetzt. Die so berechneten Sensitivitäten besitzen ein negatives Vorzeichen, da die Phasengeschwindigkeit bei Massebeladung abnimmt. Abbildung 7-3 zeigt die Sensitivität für die nullte Love-Mode als Funktion der normierten Schichtdicke.

Für die gegebene Materialkombination wird ein Betrag der maximalen Sensitivität von 42,85 m²/kg bei der normierten Schichtdicke von 31,11 % erhalten. Dies entspricht bei einer Wellenlänge von 10,8 μm einer SiO₂-Schichtdicke von 3,4 μm.

7.3 SiO₂ ALS WELLENFÜHRENDE SCHICHT

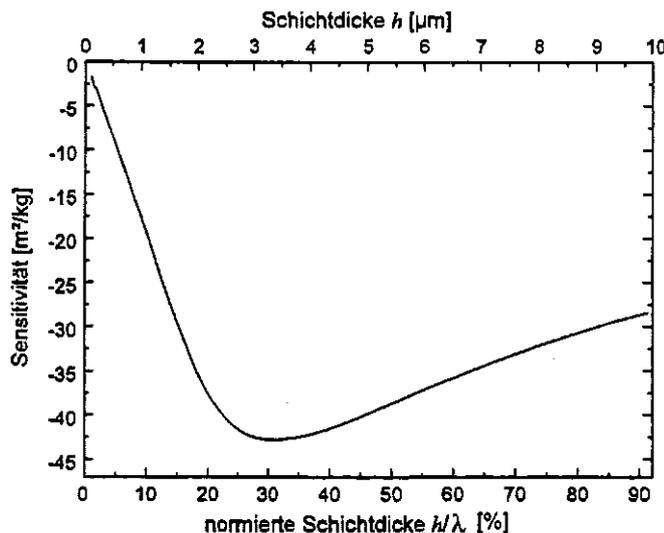


Abb. 7-3: Theoretische Voraussage der Massesensitivität der nullten Love-Mode in Abhängigkeit von der normierten Schichtdicke (untere Achse) in einem System von 36YX.LiTaO₃ mit einer gesputterten SiO₂-Schicht. Die obere Achse gibt die entsprechende Schichtdicke der wellenführenden Schicht für das betrachtete STW-Bauelement an.

7.3.2 Experimentelle Untersuchungen am System 36YX.LiTaO₃/SiO₂

LW-Sensoren auf der Basis der beschriebenen OFW-Bauteile (36YX.LiTaO₃, $f_0 = 380$ MHz,) mit gesputtertem SiO₂ als wellenführender Schicht wurden experimentell hinsichtlich ihres Dämpfungsverhaltens, der Massesensitivität, etc. untersucht. Es wurden SiO₂-Schichten mit Dicken zwischen 0,2 und 5 μm aufgebracht (siehe Kapitel 3.4.5).

Dickere Schichten wurden nicht untersucht, da ansonsten einerseits die Dämpfung des Bauteils zu groß wäre, um das Bauteil in der Hochfrequenz-Oszillatorelektronik (siehe Kapitel 3.3.3) zu betreiben und andererseits bei größeren Schichtdicken ein Nullmodenbetrieb nicht mehr gewährleistet ist (siehe Gleichung 7-1).

7.3.2.1 Reproduzierbarkeit des Sputterns

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit des Sputterprozesses wurden Bauteile in drei unabhängigen Chargen mit jeweils 0,5 μm SiO₂ beschichtet. Die Reproduzierbarkeit läßt sich am besten anhand der Transmissionskurven nachweisen (siehe Kapitel 3.3.1). In Abbildung 7-4 sind die Transmissionskurven der beschichteten Bauteile an Luft dargestellt.

Man erkennt zunächst, daß geringfügige Unterschiede zwischen den Kurven der verschiedenen Chargen existieren, die vor allem in der Frequenzverschiebung deutlich werden. Innerhalb der einzelnen Chargen existiert eine Streuung von ca. 8 %.

Die Unterschiede sowohl innerhalb einer einzelnen Charge als auch zwischen den verschiedenen Chargen sind jedoch im Rahmen der folgenden Experimente vernachlässigbar klein, so daß die Sputtertechnik eine geeignete Methode zur reproduzierbaren Beschichtung der Bauteile darstellt.

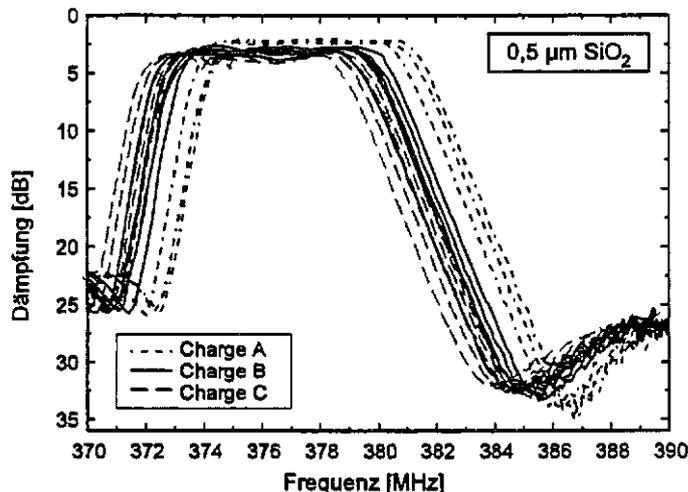


Abb. 7-4: Transmissionskurven von LW-Bauteilen zum Nachweis der Reproduzierbarkeit des Beschichtungsprozesses. Dargestellt sind drei Chargen von jeweils mit $0,5 \mu\text{m SiO}_2$ besputterten Bauteilen an Luft.

7.3.2.2 Transmissionseigenschaften in Abhängigkeit von der Schichtdicke

Im allgemeinen nimmt die Einfügedämpfung bei LW-Bauteilen mit zunehmender Dicke der wellenführenden Schicht zunächst ab, erreicht ein Minimum und nimmt dann mit weiter zunehmender Schichtdicke wieder zu [jos88]. Für dieses Verhalten sind zwei gegenläufige Effekte verantwortlich. Einerseits wird durch die Umwandlung der SSBW zur Love-Welle die akustische Energie in der wellenführenden Schicht geführt anstatt in das Substrat abzustrahlen, was zu einer Abnahme der Einfügedämpfung führt. Andererseits bringt das Aufbringen der wellenführenden Schicht selbst eine zusätzlichen Bedämpfung mit sich.

Insgesamt führt dies dazu, daß bei geringen Schichtdicken zunächst die Dämpfung des Bauteils abnimmt, da die durch die dünne Beschichtung verursachte Dämpfung zunächst noch vernachlässigbar ist. Erst bei dickeren Schichten wird die Dämpfung in der wellenführenden Schicht bestimmend, so daß die Einfügedämpfung des Bauteils schließlich wieder zunimmt.

Die Transmissionskurven der LW-Bauteile mit SiO_2 -Schichtdicken zwischen $0,2$ und $5 \mu\text{m}$ sowie von unbeschichteten Bauteilen wurden an Luft gemessen und sind in Abbildung 7-5 dargestellt.

7.3 SiO₂ ALS WELLENFÜHRENDE SCHICHT

Wie schon im vorigen Abschnitt gezeigt, weisen die Kurven für Bauteile gleicher Schichtdicke geringe Streuungen auf, die jedoch mit zunehmender Dicke der aufgetragenen Schicht zunehmen.

Die Einfügedämpfung unbeschichteter Bauteile beträgt etwa 1,4 dB (siehe Abbildung 3-3). Die Dämpfungen der LW-Bauteile sind größer als die der unbeschichteten Bauteile und nehmen mit zunehmender Schichtdicke geringfügig zu.

Dieses Verhalten widerspricht dem theoretisch vorhergesagten [jos88] und von anderen Autoren experimentell gefundenen [giz92b, giz97, du96a, du96b] Verlauf, wie er eingangs beschrieben wurde. Die Ursache hierfür ist vor allem im speziellen Design der verwendeten Bauteile zu suchen (siehe Kapitel 3.3.1). Einerseits werden die Bauteile als Resonatoren und nicht, wie bei den genannten Untersuchungen, als Verzögerungsleitungen betrieben, wodurch auch die Näherungen theoretischer Ableitungen, die sich im allgemeinen auf Verzögerungsleitung beziehen, nicht angewendet werden können. Andererseits handelt es sich bei den verwendeten Bauelementen um sogenannte "low-loss-Filter", was bedeutet, daß die Einfügedämpfung der unbeschichteten Bauteile mit ca. 1,4 dB an Luft von vornherein schon sehr gering ist. Daher kann sich der Effekt der Dämpfungsabnahme durch die Führung der Welle an der Oberfläche nicht so drastisch auswirken, wie es bei den Bauteilen der anderen Autoren möglich ist. Stattdessen kommt der Beitrag der wellenführenden Schicht zur Dämpfung relativ rasch zum Tragen.

Dennoch werden auch für Bauteile mit 4 bzw. 5 µm SiO₂-Schichtdicke noch Dämpfungen unter 10 dB erhalten. Damit ist ein Betrieb aller gezeigten LW-Bauteile in der HF-Oszillatorelektronik möglich.

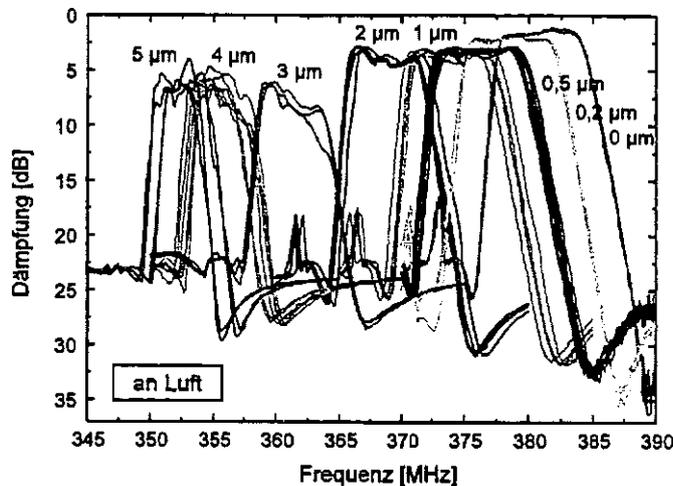


Abb. 7-5: Transmissionskurven von LW-Bauteilen mit unterschiedlichen SiO₂-Schichtdicken und von unbeschichteten Bauteilen an Luft

Love-Wellen gehören der Klasse der horizontal polarisierten Scherwellen an und sind damit für den Einsatz in Flüssigkeiten geeignet (siehe Kapitel 2.1.2). In Abbildung 7-6 sind die Transmissionskurven der verwendeten Bauteile beim Betrieb in Wasser dargestellt.

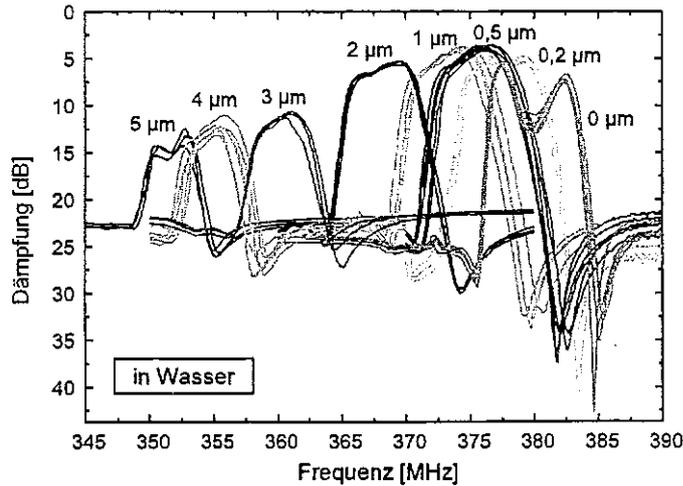


Abb. 7-6: Transmissionskurven von LW-Bauteilen mit unterschiedlichen SiO₂-Schichtdicken und von unbeschichteten Bauteilen in Wasser

7.3.2.3 Resonanzfrequenz in Abhängigkeit von der Schichtdicke

Bei der Beschichtung des STW-Bauteils mit der wellenführenden Schicht kommt es zur Verringerung der Phasengeschwindigkeit aufgrund der geringeren Schergeschwindigkeit in der aufgetragenen Schicht und damit – neben der schon beschriebenen Änderung der Einfügedämpfung – auch zu einer Veränderung der Resonanzfrequenz des akustischen Bauteils.

Abbildung 7-7 zeigt die Resonanzfrequenzen der LW-Bauteile beim Betrieb in 20 mM Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der SiO₂-Schichtdicke. Die Resonanzfrequenz nimmt von 375 MHz (bei 0,2 µm SiO₂) auf 351 MHz (bei 5 µm SiO₂) ab. Der Verlauf der Resonanzfrequenz mit der Schichtdicke spiegelt qualitativ den theoretisch errechneten Verlauf der Phasengeschwindigkeit der nullten Love-Mode mit der Schichtdicke wider, wie er in Abbildung 7-2 dargestellt ist.

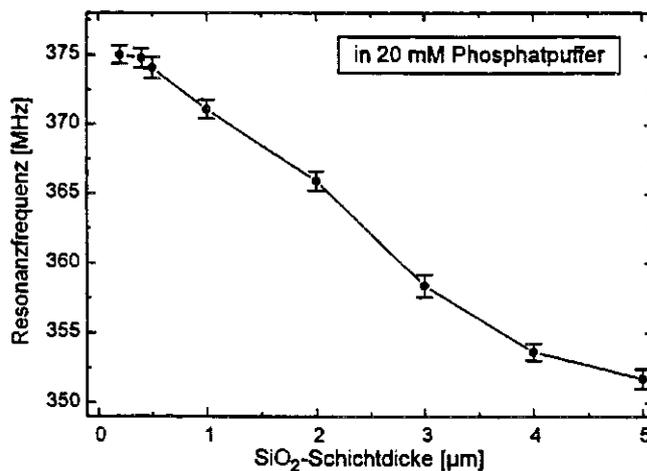


Abb. 7-7: Resonanzfrequenzen der LW-Bauteile in 20 mM Phosphatpuffer in Abhängigkeit von der Schichtdicke der aufgetragenen SiO₂-Schicht (Mittelwert aus mindestens drei Messungen)

7.3.2.4 Massesensitivität in Abhängigkeit von der Schichtdicke

Die Massesensitivität der LW-Bauteile in Abhängigkeit von der Dicke der aufgetragenen wellenführenden Schicht wurde experimentell durch die Abscheidung von BSA auf der Oberfläche bestimmt. Damit konnte die optimale Schichtdicke für maximale Sensitivität ermittelt werden.

7.3.2.4.1 Adsorption von BSA auf SiO₂-beschichteten Oberflächen

Wie in Kapitel 7.2.1 dargestellt, wurde die Massesensitivität der LW-Bauteile durch die physikalische Adsorption von BSA aus wässrigen Lösungen bestimmt. Dazu mußte zunächst das Adsorptionsverhalten von BSA auf SiO₂-beschichteten Oberflächen untersucht werden.

Hierzu wurden Bauteile gleicher Schichtdicke mit BSA-Lösungen unterschiedlicher Konzentration beprobt und die daraus resultierenden Frequenzänderungen bestimmt. In Abbildung 7-8 sind exemplarisch einige der dabei erhaltenen Sensorsignale dargestellt.

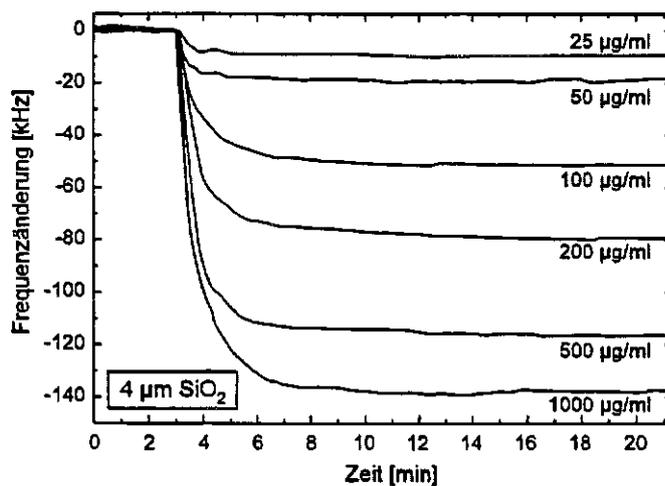


Abb. 7-8: Sensorsignale von LW-Bauteilen mit einer SiO₂-Schichtdicke von 4 µm bei Beprobung mit Lösungen von BSA in 20 mM Phosphatpuffer im Konzentrationsbereich zwischen 25 bis 1000 µg/ml

Die physikalische Adsorption von Proteinen an fest/flüssig-Grenzflächen kann im allgemeinen mit Hilfe der Langmuir'schen Adsorptionsisothermen beschrieben werden [lin35, ore61, jam66, dez71, lee74, bras78, mor78], auch wenn sich die physikalischen Voraussetzungen in beiden Fällen grundsätzlich unterscheiden. Dieser Verlauf kann auch im Fall der BSA-Adsorption an SiO₂-Oberflächen beobachtet werden, wenn der Betrag der Frequenzänderung im Gleichgewicht gegen die entsprechende BSA-Konzentration aufgetragen wird (siehe Abbildung 7-9). Dabei kann für niedrige BSA-Konzentrationen ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Frequenzänderung angenommen werden; für hohe Konzentrationen nähert sich die Frequenzänderung einem Sättigungswert.

Um die absolute Masse an adsorbiertem Protein auf der Oberfläche zu ermitteln, wurde [^{14}C]-markiertes BSA aus Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen abgeschieden und durch Flüssigszintillationszählung quantifiziert (siehe Kapitel 3.7.1). Die so erhaltene Oberflächenbelegung, die sich durch die Normierung auf die beprobte Fläche ergibt, ist in Abbildung 7-9 an der rechten Achse aufgetragen.

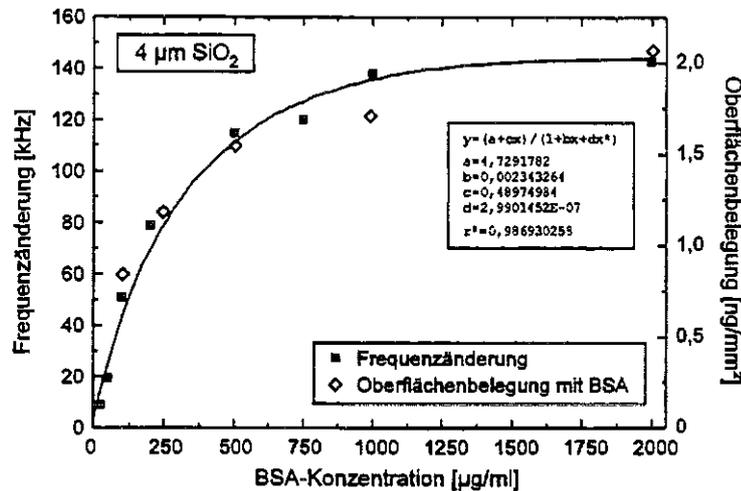


Abb. 7-9: Beprobung von LW-Bauteilen mit einer SiO_2 -Schichtdicke von $4\ \mu\text{m}$ mit BSA-Lösungen in $20\ \text{mM}$ Phosphatpuffer in unterschiedlichen Konzentrationen. Linke Achse: Betrag der ermittelten Frequenzänderungen im Gleichgewicht (Mittelwert aus mindestens drei Messungen). Die Linie stellt die angegebene Fitfunktion der Datenpunkte dar. Rechte Achse: normierte BSA-Masse auf der Oberfläche (mittels radioaktiv markiertem BSA durch Flüssigszintillationszählung ermittelt)

7.3.2.4.2 Frequenzänderung bei der BSA-Abscheidung in Abhängigkeit von der Schichtdicke der wellenführenden Schicht

Zur Untersuchung der Massesensitivität der LW-Bauteile in Abhängigkeit von der SiO_2 -Schichtdicke wurden BSA-Lösungen der Konzentration $2\ \text{mg/ml}$ verwendet, um im ermittelten Sättigungsbereich der Adsorption zu arbeiten und damit maximale Sensorsignale zu erhalten. Die so erzielten Frequenzänderungen sind in Abbildung 7-10 in Abhängigkeit von der Schichtdicke der wellenführenden Schicht dargestellt und beziehen sich auf eine Oberflächenbelegung von ca. $2\ \text{ng/mm}^2$ (siehe Abbildung 7-9).

Die Frequenzänderung der Bauelemente bei Abscheidung von BSA hängt von der Dicke der wellenführenden Schicht ab. Sie nimmt von $18\ \text{kHz}$ (unbeschichtetes STW-Bauteil) auf $32\ \text{kHz}$ (LW-Bauteil mit $0,2\ \mu\text{m}$ SiO_2) und weiter bis auf $140\ \text{kHz}$ (LW-Bauteil mit $4\ \mu\text{m}$ SiO_2) zu und sinkt dann wieder auf $125\ \text{kHz}$ (LW-Bauteil mit $5\ \mu\text{m}$ SiO_2) ab. Damit ist die Frequenzänderung bei einem LW-Bauteil mit einer SiO_2 -Schichtdicke zwischen 3 und $4\ \mu\text{m}$ um etwa den Faktor $7,5$ größer als die eines unbeschichteten Bauelements.

Dieser Faktor kann allerdings nicht ausschließlich auf den LW-Effekt zurückgeführt werden, da hierbei die Adsorption von BSA auf unterschiedlichen Oberflächenmaterialien

7.3 SiO₂ ALS WELLENFÜHRENDE SCHICHT

(LiTaO₃ mit Aluminiumstrukturen bzw. SiO₂) betrachtet werden muß und die Adsorption von Proteinen stark vom Oberflächenmaterial beeinflusst werden kann. Ein Vergleich der Frequenzänderungen bei LW-Bauteilen mit 0,2 µm SiO₂ und 4 µm SiO₂ ergibt einen Faktor von 4,4.

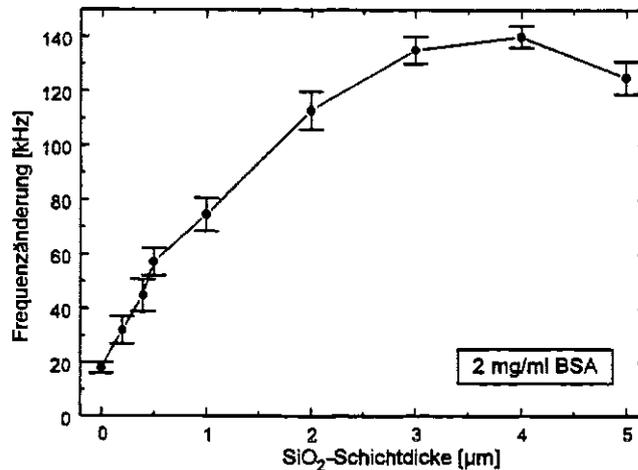


Abb. 7-10: Frequenzänderungen von LW-Bauteilen unterschiedlicher SiO₂-Schichtdicke bei Beprobung mit 2 mg/ml BSA in 20 mM Phosphatpuffer. Die Datenpunkte entsprechen dem Betrag der Frequenzänderung im Gleichgewicht (Mittelwert aus mindestens drei Messungen)

Der in Abbildung 7-10 dargestellte Verlauf entspricht qualitativ der theoretisch berechneten Abhängigkeit der Massesensitivität der nullten Love-Mode von der Schichtdicke für das System LiTaO₃/SiO₂ (siehe Abbildung 7-3). In beiden Fällen wurde eine optimale Schichtdicke im Bereich zwischen 3 und 4 µm gefunden.

7.3.2.4.3 Ermittlung der Nachweisgrenze

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze (siehe Kapitel 3.8) wurde die Resonanzfrequenz der LW-Bauteile in Luft bzw. bei Beprobung mit destilliertem Wasser und 20 mM Phosphatpuffer über 10 min beobachtet. Das Frequenzrauschen an Luft betrug ca. 4 Hz, in Wasser ca. 20 Hz und in 20 mM Phosphatpuffer ca. 40 Hz und war von den unterschiedlichen SiO₂-Schichtdicken nahezu unbeeinflusst.

Für die verwendeten LW-Bauteile mit optimierter Dicke der wellenführenden Schicht (3 bis 4 µm SiO₂) ergibt sich aus der Frequenzänderung von 140 kHz und der entsprechenden Oberflächenbelegung von ca. 2 ng/mm² (siehe Abbildung 7-9) unter Berücksichtigung des dreifachen Rauschens in 20 mM Phosphatpuffer eine Nachweisgrenze von 1,7 pg/mm². Im Vergleich dazu kann für unbeschichtete STW-Bauteile unter gleichen Bedingungen eine Nachweisgrenze von 13,3 pg/mm² ermittelt werden.

7.3.3 Vergleich von theoretischen und experimentellen Daten

Im Folgenden werden die theoretisch berechneten mit den experimentell ermittelten Daten verglichen. In den bisherigen Kapiteln wurden nur qualitative Vergleiche der Kurvenverläufe angestellt, nicht jedoch der absoluten Werte. Der quantitative Vergleich findet nun in einem gesonderten Kapitel statt, da diese Werte oftmals erheblich voneinander abweichen und daher einer genaueren Betrachtung und Diskussion bedürfen.

Diese Abweichung begründen sich auf vielerlei Ursachen:

- Bei der Berechnung der theoretischen Kurven mit Hilfe der angegebenen Gleichungen mußten zahlreiche Annahmen gemacht werden, da es sich hierbei um ein sehr komplexes System handelt.
So wurde zum Beispiel ausschließlich die abgeschiedene Masse als Störung betrachtet, die elastischen Parameter des Massebeladungsfilms wurden vernachlässigt. Ebenso wurde die Dicke des Massebeladungsfilms als sehr gering angenommen (im Idealfall wurde von einem unendlich dünnen Film ausgegangen), wohingegen in der Praxis der endlich dicke Film einen gewissen Beitrag zur wellenführenden Struktur leistet und damit eine zusätzliche Störung darstellt. Neben den ausführlicher in Kapitel 7.1.2.2 beschriebenen Annahmen fanden auch verschiedene weiterreichende Vereinfachungen statt. So wurde beispielsweise die piezoelektrische und anisotrope Natur des Substrates vernachlässigt. Der Transduktionsprozeß wurde ignoriert.
- Nicht berücksichtigt werden in der Rechnung auch Einflüsse von Faktoren, die beim Arbeiten in realen Medien auftreten, wie zum Beispiel der Einfluß des Meßmediums (Luft, Puffer, etc.) oder eine nicht gleichmäßige Ausbildung des Massebeladungsfilms, was beim Abscheiden von Proteinen durchaus zu erwarten ist [har96]. Vernachlässigt wird auch die Tatsache, daß die adsorbierten Proteine hydratisiert sind und damit die effektiv aufgebraachte Masse durch das in der Hydrathülle gebundene Wasser größer ist als die Masse des reinen Proteins. Schließlich spielen bei konzentrierteren Proteinlösungen auch Änderungen der Viskosität an der fest/flüssig-Grenzfläche eine nicht unbeträchtliche Rolle [laa88].
- Der Aufbau der verwendeten OFW-Bauteile (siehe Kapitel 3.3.1) entspricht nicht dem typischen Aufbau von Bauelementen, die als Verzögerungsleitung betrieben werden. Ein solcher Aufbau liegt jedoch den theoretischen Berechnungen zugrunde.
- Der Sensoraufbau führt außerdem dazu, daß die sensitive Fläche des Bauteils nicht exakt bestimmt werden kann. Dadurch kann kein genauer Wert für die aufgebraachte Masse pro Flächeneinheit und damit auch für die Sensitivität S_m , die für akustische Biosensoren üblich ist (siehe Gleichung 2-10), angegeben werden.
Die genannten Werte wurden bei experimenteller Bestimmung ermittelt, indem der komplette Sensorchip (siehe Abbildung 3-2) mit einer Fläche von $3,7 \text{ mm}^2$ als sensitiver Bereich angenommen wurde. (Die akustisch penetrierte Fläche der beiden Resonatorstrukturen ist jedoch mit $0,6 \text{ mm}^2$ um den Faktor 6 kleiner als die Fläche des Sensorchips.)

7.3 SiO₂ ALS WELLENFÜHRENDE SCHICHT

- Die für die Berechnungen angenommenen Materialdaten des gesputterten SiO₂ wurden nicht gemessen, sondern als Näherung aus Literaturdaten übernommen. Dies führt zweifellos zu einem beträchtlichen Fehler, da diese Werte im allgemeinen stark durch die Abscheidungsbedingungen beim Sputterprozeß beeinflußt werden. Beispielsweise fanden Kovacs et al. [kov92a] für ihre gesputterten SiO₂-Schichten ein wesentlich kleineres Schermodul ($1,74 \cdot 10^{10} \text{ N/m}^2$), als das des amorphen SiO₂ ($3,12 \cdot 10^{10} \text{ N/m}^2$ [aul73]). Eine Messung der SiO₂-Dichte bei Du et al. [du96a] ergab einen 6 % höheren Wert (2340 kg/m^3), als der von Kovacs et al. (2200 kg/m^3 , [kov92a]) angegebene.
- Wie die Transmissionskurven der SiO₂-beschichteten Bauteile zeigen (siehe Abbildung 7-4, 7-5 und 7-6), ist der Sputterprozeß nicht exakt reproduzierbar und führt auch innerhalb einer Charge zu gewissen Abweichungen. Weiterhin ist auch die Bestimmung der SiO₂-Schichtdicke mittels Schwingquarz mit einem relativ großen Fehler behaftet ($\pm 0,2 \text{ }\mu\text{m}$).
- Nicht zuletzt führen auch experimentelle Fehler zu Abweichungen von den theoretisch vorhergesagten Kurven.

7.3.3.1 Phasengeschwindigkeit

Die Phasengeschwindigkeit der nullten Love-Mode in Abhängigkeit von der normierten Schichtdicke wurde in Kapitel 7.3.1.1 berechnet. In Kapitel 7.3.2.3 wurde die Resonanzfrequenz der LW-Bauteile in Abhängigkeit von der Schichtdicke experimentell bestimmt.

Abbildung 7-11 zeigt die theoretisch berechnete und die experimentell aus der Resonanzfrequenz bestimmte Phasengeschwindigkeit in Abhängigkeit von der SiO₂-Schichtdicke.

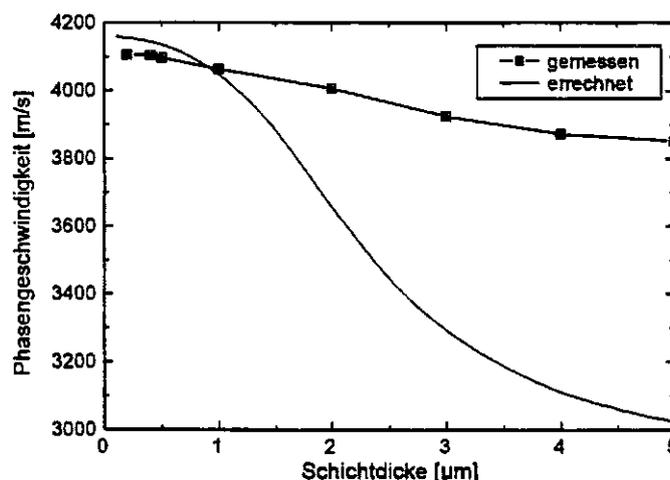


Abb. 7-11: Vergleich der experimentell aus der Resonanzfrequenz der LW-Bauteile in 20 mM Phosphatpuffer ermittelten und der theoretisch berechneten Phasengeschwindigkeit der nullten Love-Mode in Abhängigkeit von der Schichtdicke in einem System von 36YX.LiTaO₃ mit einer gesputterten SiO₂-Schicht

Man erkennt einen vergleichbaren Verlauf beider Kurven, die beide von etwa dem gleichen Ausgangspunkt bei einer Schichtdicke von 0 bzw. $0,2 \mu\text{m}$ ausgehen. Dieser Punkt entspricht, wie in Kapitel 7.3.1.1 beschrieben, der Schergeschwindigkeit im Substrat ($V_{\text{LiTaO}_3} = 4160 \text{ m/s}$). Jedoch verläuft dann die experimentell bestimmte Kurve deutlich flacher; die Änderung der Phasengeschwindigkeit mit der Schichtdicke beträgt nur etwa 22 % der Änderung der theoretisch berechneten Kurve.

Zu diesen Abweichungen tragen sicherlich alle oben beschriebenen Fehlerquellen bei. Die Ähnlichkeit der Kurvenform und vor allem der gleiche Ausgangswert bei geringen Schichtdicken lassen jedoch darauf schließen, daß die angenommenen Materialkonstanten des gesputterten SiO_2 einen großen Anteil an den Differenzen zwischen experimentellen und theoretischen Daten haben.

7.3.3.2 Massesensitivität

Die in Kapitel 7.3.1.3 theoretisch berechnete Massesensitivität ist in Abbildung 7-12 der experimentell aus der Frequenzänderung bei Abscheidung von BSA ermittelten Sensitivität gegenübergestellt.

Beide Kurven zeigen qualitativ einen ähnlichen Verlauf mit Minima bei SiO_2 -Schichtdicken zwischen 3 und $4 \mu\text{m}$. Allerdings verläuft auch hier – wie bei der Phasengeschwindigkeit – die experimentell bestimmte Kurve flacher; es ist eine ca. 44 % geringere Sensitivität in den Minima zu beobachten. Als Ursache hierfür sind die schon bei der Betrachtung der Phasengeschwindigkeit (welche Grundlage für die Berechnung der theoretischen Massesensitivität ist) genannten Gründe zu nennen. Außerdem spielt hier auch der Einfluß der realen Medien eine nicht unbedeutende Rolle, da die Sensitivität nicht mit einem idealen Massebeladungsfilm (siehe Kapitel 7.1.2.2), sondern mit Hilfe von abgediebstem Protein bestimmt wurde.

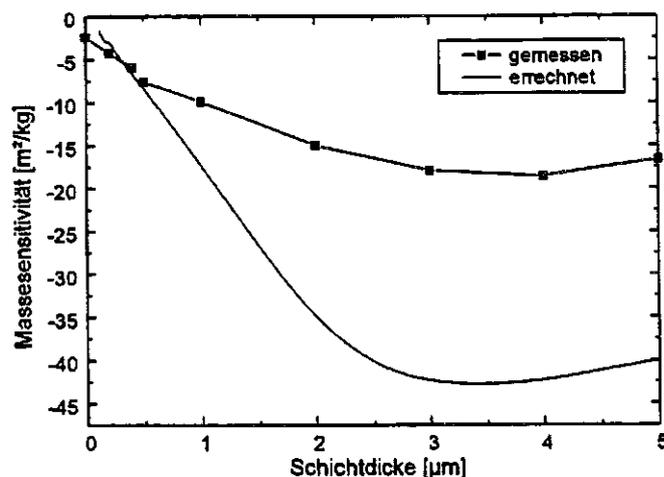


Abb. 7-12: Vergleich der experimentell aus der Frequenzänderungen bei Beprobung mit BSA-Lösungen in 20 mM Phosphatpuffer ermittelten und der theoretisch berechneten Massesensitivität der nullten Love-Mode

7.3 SiO₂ ALS WELLENFÜHRENDE SCHICHT

Die Vergleiche von theoretischer Berechnung und experimentellen Daten zeigen in beiden Fällen, daß das vorgestellte Modell geeignet ist, auch bei dem speziellen Design der verwendeten LW-Bauteile und beim Betrieb als Resonatoren qualitative Kurvenverläufe und damit beispielsweise die optimalen Schichtdicken der wellenführenden Schicht vorherzusagen, daß jedoch im vorliegenden Fall eine quantitative Aussage nicht möglich ist.

Die experimentell bestimmte Massesensitivität im Optimum der Schichtdicke ist mit ca. 18,5 m²/kg etwa um den Faktor 7,7 größer als die eines unbeschichteten Bauelements; die aus den theoretischen Berechnungen erhaltene Sensitivität von ca. 42,8 m²/kg ergibt einen Faktor von ca. 20.

Damit liegt der theoretische Wert im Bereich der literaturbekannten Werte für Bauelemente, betrieben als Verzögerungsleitung [du96a, du96b, giz95, giz97, hau94, har97]; die aus der experimentell bestimmten Massesensitivität abgeleitete Nachweisgrenze von 1,7 pg/mm² hingegen ist etwa um den Faktor 3 bis 5 schlechter. Hauptursache dafür ist sicherlich das suboptimale Sensordesign, wie es schon in den vorausgegangenen Kapiteln diskutiert wurde.

Die ermittelten Nachweisgrenzen der hier vorgestellten LW-Sensoren sind jedoch niedrig genug, um Oberflächenbeladungen detektieren zu können, die deutlich unterhalb der von typischen Protein-Monolagen liegen, welche üblicherweise eine Oberflächenbelegung von einigen ng/mm² aufweisen (z.B. 2 ng/mm² für BSA [gao95], 4 ng/mm² für IgG Antikörper [gol88, har96]).

7.4 PARYLEN ALS WELLENFÜHRENDE SCHICHT

Die Steigerung der Sensitivität gegenüber unbeschichteten Bauteilen konnte durch das Aufbringen einer wellenführenden Schicht aus SiO_2 nachgewiesen werden. Allerdings schützte diese Beschichtung die Aluminiumstrukturen auf dem Bauteil nur unzureichend.

Daher wurden erste Untersuchungen mit dem als Schutzschicht geeigneten Polymer Parylen-C (siehe Kapitel 5) als wellenführender Schicht durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.3). Eine theoretische Betrachtung dieses Systems war jedoch nicht möglich, da die erforderlichen Daten für Parylen-C bislang nicht literaturbekannt sind.

In Abbildung 7-13 sind die Transmissionskurven von akustischen Bauelementen mit unterschiedlichen Parylen-Schichtdicken dargestellt. Es ist auch hier, analog zu Abbildung 7-5, zu erkennen, daß die Dämpfung der Bauteile mit zunehmender Schichtdicke ansteigt. Die für den Betrieb der Bauteile in der Hochfrequenz-Oszillatorelektronik kritische Einfügedämpfung von 18 dB (siehe Kapitel 3.3.3) ist in diesem Fall schon bei Parylen-Schichtdicken von ca. $3,5 \mu\text{m}$ erreicht.

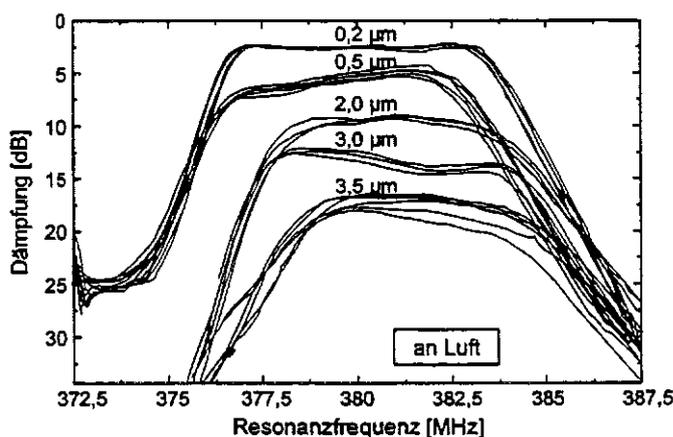


Abb. 7-13: Transmissionskurven von LW-Bauteilen mit unterschiedlichen Parylen-Schichtdicken an Luft

Die Ermittlung der Massensensitivität erfolgte analog zu Kapitel 7.3.2.4 mittels Abscheidung von BSA auf der Sensoroberfläche.

Wie in Abbildung 7-14 dargestellt, geht die daraus resultierende Frequenzänderung mit zunehmender Parylen-Schichtdicke über ein Maximum bei $0,5 \mu\text{m}$. Die an diesem Maximum erreichte Frequenzänderung von 82 kHz ist um den Faktor 4,3 größer als die eines unbeschichteten Bauteils. Die erzielte Nachweisgrenze beträgt $2,9 \text{ pg/mm}^2$ und ist damit geringfügig schlechter als die Nachweisgrenze bei optimierter SiO_2 -Schichtdicke von $1,7 \text{ pg/mm}^2$.

Da die aufgebraute Parylenbeschichtung die Aluminiumstrukturen der Bauteile ausgesprochen gut vor korrosiven Angriffen schützt und extrem glatt ist, wurde diese Beschichtung auch für den Einsatz in der Gassensorik getestet¹⁷. Dort soll sie als Zwischenschicht zur Anpassung der Oberflächenenergien von Substrat und sensitiver Polymerschicht und zum Schutz der Strukturen vor korrosiven Gasen verwendet werden.

Üblicherweise werden in der Gasphase Rayleighwellen (RW)-Baelemente verwendet, es kommen vereinzelt aber auch die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen STW-Bauteile der Firma Murata zum Einsatz [rap95, sti97, bar98].

Durch Aufbringen einer wellenführenden Schicht auf STW-Baelemente (nicht jedoch bei RW-Baelementen) ist in der Gassensorik ebenfalls eine Sensitivitätssteigerung aufgrund der Anregung von Love-Wellen zu erwarten. Daher wurde die Abhängigkeit der Masse-sensitivität der parylenbeschichteten LW-Baelemente mit zunehmender Schichtdicke auch in der Gasphase untersucht.

Da parylenbeschichtete Bauteile selbst nur eine geringe Frequenzänderung bei Beprobung mit organischen Lösungsmitteldämpfen zeigen, wurden die LW-Bauteile mit einer zusätzlichen dünnen sensitiven Polymerschicht aus Polymethacrylsäurebutylester (PBMA) beschichtet. Die Dicke der PBMA-Schicht wurde so gering wie möglich gehalten (ca. 100 nm), sodaß sie die Ausbreitung der Love-Wellen nur minimal stört. Diese Schicht geht mit dem zu messenden Analyten eine reversible Sorptionsreaktion ein. In der Schicht kommt es zur Anreicherung des Analyten, was einer Massezunahme entspricht, wodurch eine Änderung der Resonanzfrequenz des Oszillatorschaltkreises beobachtet werden kann.

In Abbildung 7-14 sind die bei Beprobung mit 3000 ppm Xylol erhaltenen Frequenzänderungen in Abhängigkeit von der Schichtdicke aufgetragen.

Ein Vergleich mit den Messungen in Flüssigkeiten (BSA-Abscheidung) zeigt einen ähnlichen Kurvenverlauf mit einem Maximum bei ebenfalls 0,5 μm .

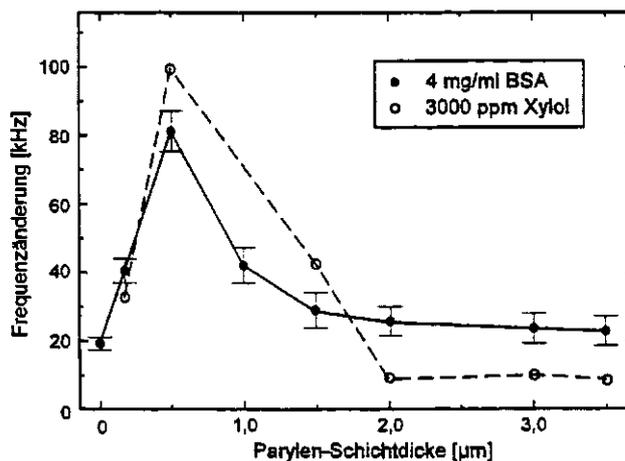


Abb. 7-14: Frequenzänderungen von LW-Bauteilen unterschiedlicher Parylen-Schichtdicke bei Beprobung mit 4 mg/ml BSA in 20 mM Phosphatpuffer bzw. bei Beprobung mit 3000 ppm Xylol in Stickstoff nach Beschichtung der LW-Bauteile mit einer zusätzlichen sensitiven Polymerschicht (Mittelwerte aus mindestens zwei Messungen)

¹⁷ Die entsprechenden Experimente in der Gasphase wurden im Rahmen der Dissertation von U. Stahl (Forschungszentrum und Universität Karlsruhe, Institut für Instrumentelle Analytik) durchgeführt. Details der Untersuchungen lassen sich in der voraussichtlich im April 1999 erscheinenden Arbeit nachlesen.

Damit kann Parylen als eine vielseitige Beschichtung für akustische Oberflächenwellen-Bauelemente sowohl in der Gas- als auch in der Flüssigkeitssensorik eingesetzt werden. Die Beschichtung dient sowohl der Sensitivitätssteigerung, als auch dem Korrosionsschutz und der Verbesserung der Haftungseigenschaften von sensitiven Polymerschichten.

7.5 ZUSAMMENFASSUNG UND VERGLEICH DER BEIDEN WELLENFÜHRENDEN SCHICHTEN

Bislang waren nur einfache LW-Bauelemente, betrieben als Verzögerungsleitung, literaturbekannt. Die in dieser Arbeit verwendeten OFW-Bauelemente weisen jedoch ein spezielles Design auf, bestehend aus zwei Resonatorstrukturen und einem interdigitalen Kondensator.

Auch war $36YX.LiTaO_3$ bisher als Substratmaterial für LW-Bauelemente nicht bekannt.

Es wurden zwei unterschiedliche Materialien für die wellenführende Beschichtung untersucht: das polymere Parylen-C und gesputtertes SiO_2 .

Im Fall des SiO_2 führten theoretische Betrachtungen zu einer für maximale Massesensitivität optimalen Schichtdicke von $3,4 \mu m$. Die mittels Sputterprozeß aufgetragenen Schichtdicken zwischen 0 und $5 \mu m$ schließen diese optimale Dicke ein. Experimentelle Ermittlungen der Massesensitivität in Abhängigkeit von der Schichtdicke ergaben in Übereinstimmung mit der Theorie eine optimale Schichtdicke zwischen 3 und $4 \mu m$, die zu einer Nachweisgrenze von $1,7 \text{ pg/mm}^2$ führte. Damit konnte die Nachweisgrenze gegenüber unbeschichteten STW-Bauteilen um den Faktor $7,7$ verbessert werden.

Ein wesentliches Problem bei der SiO_2 -Beschichtung war allerdings, daß die Sputtertechnik bei den relativ großen Schichtdicken ein ausgesprochen zeitaufwendiges Verfahren darstellt. Im allgemeinen führten die zur Erzeugung von Schichten mit günstigsten akustischen Eigenschaften notwendigen Sputterparameter zu einer Abscheiderate von ca. $1 \mu m SiO_2/\text{Tag}$. Weiterhin bot die SiO_2 -Schicht nur einen unzureichenden Schutz der Aluminiumstrukturen des Bauteils vor korrosiven Angriffen.

Daher wurde der Einsatz des bereits als Schutzbeschichtung verwendeten Parylens als wellenführendes Schichtmaterial untersucht. Die Beschichtungsprozedur ist in diesem Fall wesentlich einfacher und weniger zeitaufwendig. Mit den parylenbeschichteten Bauelementen war ebenfalls ein Maximum der Massesensitivität bei zunehmender Schichtdicke zu beobachten. Diese ersten Untersuchungen an parylenbeschichteten LW-Bauteilen zeigten, daß sich die ausgesprochen gute Schutzwirkung einer Parylenschicht vor korrosiven Angriffen des umgebenden Mediums (siehe Kapitel 5.3) mit der Möglichkeit der Sensitivitätssteigerung durch Anregung von Love-Wellen kombinieren lassen.

Das Maximum der Massesensitivität trat bei einer Parylen-Schichtdicke von $0,5 \mu m$ auf. Die geringere optimale Schichtdicke im Vergleich zur SiO_2 -Beschichtung läßt sich durch die im allgemeinen geringere transversal akustische Schallgeschwindigkeit von polymeren Materialien erklären. Die im Optimum erzielte Nachweisgrenze von $2,9 \text{ pg/mm}^2$ ergab eine Verbesserung gegenüber unbeschichteten STW-Bauelementen um den Faktor $4,3$. Damit beläuft sich die Sensitivitätssteigerung jedoch auf nur ca. 56% der mit SiO_2 erzielten Steigerung.

Mit den hier vorgestellten Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß auch auf den verwendeten Bauelementen, deren Design von dem der literaturbekannten LW-Bauelemente abweicht, eine Anregung von Love-Wellen und damit eine Steigerung der Sensitivität und Verbesserung der Nachweisgrenzen möglich ist.

Eine weitere Verbesserung der Sensitivität wäre prinzipiell durch die Verwendung von Polymeren mit niedrigerer transversal akustischer Schallgeschwindigkeit zu erzielen. Dies könnte durch eine Variation der Parylen-Beschichtungsbedingungen zu erreichen sein; eventuell empfiehlt sich aber auch ein Ausweichen auf ein anderes Polymer, das ebenfalls günstige Korrosionsschutzeigenschaften aufweist.

Nach dem Aufbringen einer geeigneten sensitiven Schicht können diese Bauteile in der chemischen und biochemischen Sensorik verwendet werden. Aufgrund der Tatsache, daß es sich bei den verwendeten OFW-Bauteilen, im Gegensatz zu denen anderer Autoren um kostengünstige, kommerziell erhältliche Bauelemente handelt, sind diese Bauteile für einen Einsatz als Chemo- oder Biosensor bestens geeignet.

8 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Optimierung eines universell anwendbaren Verfahrens zur Biofunktionalisierung von Oberflächen für die Sensorik mit kommerziell erhältlichen akustischen Oberflächenwellen (OFW)-Bauelementen. Dieses Verfahren sollte mit Hilfe einfacher, standardisierter Prozeduren eine schnelle und reproduzierbare Immobilisation verschiedenster rezeptiver Moleküle für die Bioaffinitätssensorik erlauben. Ein derart modifiziertes Bauelement sollte dann den Nachweis des spezifisch an den immobilisierten Rezeptor bindenden Liganden ermöglichen.

Das Meßprinzip dieser OFW-Sensoren beruht auf einer Detektion der Frequenzverschiebung der Bauteile im Oszillatorschwingkreis, die aus einer Veränderung der Oberflächenwellen-Schallgeschwindigkeit bei der Anbindung des Liganden resultiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Beprobungs- und Meßapparatur konzipiert und aufgebaut, mit der ein automatisiertes Beprobieren der OFW-Sensoren mit mehreren Analyten bzw. Reagenzien, sowie gleichzeitige Aufnahme und Darstellung der Meßdaten möglich war. Das dem System zugrundeliegende Prinzip der Fließinjektion gewährleistete eine hohe Reproduzierbarkeit bei geringem Analyt- und Reagenzienverbrauch aufgrund von konstantem, pulsationsarmem Fluß der Flüssigkeitsströme, definierten Analytmengen und luftblasenfreiem Beprobieren. Der modulare Aufbau ermöglichte eine flexible Adaption der Anlage an verschiedenste Meßprobleme.

Die verwendeten, in der modernen Telekommunikation als Massenware hergestellten OFW-Bauelemente besitzen Strukturen und Bonddrähte aus Aluminium, da Aluminium als Elektrodenmaterial außerordentlich gute akustische Eigenschaften bezüglich der Einkopplung des elektrischen Signals in den Oszillator aufweist. Für die Anwendung in der Biosensorik war allerdings ein Schutz der Aluminiumstrukturen notwendig, da diese ansonsten den jeweiligen chemischen Bedingungen bei Immobilisation und Messung in wäßrigen Medien nicht standhielten. Zu diesem Zweck erwies sich eine Beschichtung des kompletten Bauteils mit einem polymeren Schutzüberzug als am einfachsten und am geeignetsten. Die Schutzbeschichtung mußte dabei einen ausreichenden Schutz des Aluminiums vor korrosiven Angriffen bewirken und durfte gleichzeitig die akustischen Eigenschaften des Bauteils nur wenig verändern.

Es wurden zwei Polymere hinsichtlich ihrer mikroskopischen und akustischen Eigenschaften, ihrer Schutzfunktion gegenüber Säuren, sowie der Reproduzierbarkeit des Beschichtungsprozesses untersucht und verglichen: Polyimid und Parylen.

Beide Polymere erwiesen sich prinzipiell für die Anwendung als Schutzbeschichtung in der Biosensorik mit OFW-Bauteilen als geeignet. Eine Beschichtung mit Parylen wies jedoch aufgrund ihrer besseren Reproduzierbarkeit, der gleichmäßigeren Filmbildung und vor allem aufgrund des deutlich verbesserten Schutzes der Aluminiumstrukturen und auch der Bonddrähte vor korrosiven Angriffen erhebliche Vorteile gegenüber Polyimid für den Einsatz als Schutzbeschichtung in der Biosensorik auf.

Um einen möglichst flexiblen Einsatz der schutzbeschichteten OFW-Bauteile als Biosensoren zu ermöglichen, wurde an der Sensoroberfläche eine Dextranschicht immobilisiert, an welcher einfach, schnell und reproduzierbar verschiedenste Biomoleküle angebunden werden konnten.

Die Immobilisation der Dextranschicht erfolgte über eine Coimmobilisation mit dem photoaktiven Reagenz T-BSA, das als Photovernetzer zwischen der polymeren Schutzbeschichtung und dem Dextran fungierte. Die Beschichtungsprozedur wurde optimiert. Es konnte gezeigt werden, daß die Methode weder durch das zu immobilisierende Dextran, noch durch das Oberflächenmaterial bzw. den verwendeten Sensortyp beschränkt ist.

Durch Verwendung unterschiedlich funktionalisierter Dextrane konnten mit Hilfe einfacher und schneller Standardprozeduren verschiedenste Proteine immobilisiert werden. Dazu wurden literaturbekannte, an dextranbeschichteten optischen Sensoren angewandte Immobilisationsprozeduren an die Sensorik mit OFW-Bauelemente angepaßt. Die bei der Optimierung erhaltenen Abhängigkeiten konnten erstmals mit akustischen Sensoren nachgewiesen werden.

Die so erzeugten dextranbeschichteten Biosensoren zeichneten sich unter anderem durch hohe Spezifität und geringe unspezifische Adsorptionen von Biomolekülen aus, was anhand von Reaktionen mit spezifischen und unspezifischen Bindungspartnern gezeigt wurde. Aufgrund der Immobilisation rezeptiver Moleküle innerhalb der gesamten dreidimensionalen gequollenen Dextranmatrix konnten um zwei Größenordnungen höhere Empfindlichkeiten erzielt werden, als dies bislang mit den gleichen OFW-Bauelementen bei Immobilisation von zweidimensionalen Rezeptorschichten möglich war. Die Regenerierbarkeit der Sensoroberfläche durch Lösen der gebildeten Immunokomplexe wurde nachgewiesen, wobei wiederholte Messungen mit dem gleichen Sensor eine Verbesserung von Reproduzierbarkeit, Schnelligkeit und Wirtschaftlichkeit der Analyse bedingen.

Der Einsatz eines dextranbeschichteten OFW-Bauelementes in einem praxisrelevanten Anwendungsgebiet wurde anhand des chemotaktischen Cytokins ENA-78 dargestellt. Dabei wurden erstmals Messungen mit modifizierten kommerziellen OFW-Bauelementen in Seren durchgeführt. Sowohl in wäßrigen Lösungen, als auch in Seren war eine hohe Spezifität des Sensors gegeben. Durch eine optimierte Beprobungsmethode konnte bei Messungen im Serum eine Sensorempfindlichkeit nahe der in wäßrigen Pufferlösungen erzielt werden.

Ein Ansatz zur Empfindlichkeitssteigerung, basierend auf dem Konzept der Anregung von Love-Wellen, wurde sowohl theoretisch als auch experimentell untersucht. Es wurden zwei unterschiedliche Schichtmaterialien verglichen: Parylen und gesputtertes SiO_2 . Die Bauteile wurden hinsichtlich ihrer Transmissionseigenschaften und Massesensitivität charakterisiert, wobei die Einfügedämpfung, Resonanzfrequenz, Frequenzänderung bei BSA-Abscheidung und das Rauschen der LW-Bauteile in Abhängigkeit von der Dicke der wellenführenden Schicht betrachtet wurden. Es konnte gezeigt werden, daß die Aufbringung einer optimierten wellenführenden Beschichtung die Sensitivität der Bauelemente erhöht.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sich die kommerziell erhältlichen, kostengünstigen OFW-Bauteile nach der Aufbringung einer polymeren Schutzbeschichtung für einen Einsatz in der chemischen und biochemischen Sensorik bestens eignen. Durch Verwendung geeigneter Dicken des Schutzfilms ist eine generelle Sensitivitätssteigerung des Bauteils um den Faktor 4 bis 8 möglich. Die kovalente Anbindung einer Dextranschicht auf dem schutzbeschichteten Bauteil erlaubt eine schnelle, reproduzierbare und flexible Biofunktionalisierung der Oberfläche und führt zu einem Biosensor mit hoher Spezifität und Sensitivität.

LITERATURVERZEICHNIS

- [adl90] Adler, E.L.; Slaboszewicz, J.K.; Farnell, G.W.; Jen, C.K. "PC software for SAW propagation in anisotropic multilayers" IEEE Trans., UFFC-37 (1990) 215-223
- [ami82] D'Amico, A.; Palme, A.; Verona, E. "Surface acoustic wave hydrogen sensor" Sens. Act. 3 (1982/83) 31-39
- [and82] Andrade, J.D. "Synthetic hydrogels for biomedical applications" in: "Hydrogels for medical and related applications" ACS Symp. Ser. 31 (1982)
- [and86] Andrade, J.D.; Hlady, V. "Protein adsorption and materials biocompatibility: a tutorial review and suggested hypotheses" Adv. Polym. Sci. 79 (1986) 1-63
- [and91] Andle, J.C.; Vetelino, J.F.; Josse, F. "A theoretical study of acoustic plate modes as biosensing elements" Proc. IEEE Ultrasonics Symp. (1991) 285-288
- [and92] Andle, J.C.; Vetelino, J.F.; Lade, M.W.; McAllister, D.J. "An acoustic plate mode biosensor" Sens. Act. B8 (1992) 191-198
- [and93] Andle, J.C.; Weaver, J.T.; McAllister, D.J.; Josse, F.; Vetelino, J.F. "Improved acoustic plate mode biosensor" Sens. Act. B13-14 (1993) 437-442
- [anj87] Anjaneyulu, P.S.R.; Staros, J.V. "Reactions of N-hydroxysuccinimide active esters" Int. J. Peptide Protein Res. 30 (1987) 117-124
- [aul73] Auld, B.A. "Acoustic fields and waves in solids" J. Wiley & Sons Inc., New York (1973)
- [aul76] Auld, B.A.; Gagnepain, J.J.; Tan, M. "Horizontal shear surface waves on corrugated surfaces" Electron. Lett. 12 (1976) 650-652
- [aul79] Auld, B.A.; Yeh, B.H. "Theory of surface skimming SH wave guidance by a corrugated surface" Proc. IEEE Ultrasonics Symp. (1979) 786-790
- [bae92] Baer, R.L.; Flory, C.A.; Tom-Moy, M.; Solomon, D.S. "STW chemical sensors" Proc. IEEE Ultrasonics Symp. (1992) 293-298
- [bai89a] Bain, C.D.; Troughton, E.B.; Tao, Y.-T.; Evall, J.; Whitesides, G.M.; Nuzzo, R.G. "Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold" J. Am. Chem. Soc. 111 (1989) 321-335
- [bai89b] Bain, C.D.; Evall, J.; Whitesides, G.M. "Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the head group, tail group and solvent" J. Am. Chem. Soc. 111 (1989) 7155-7164
- [bai89c] Bain, C.D.; Whitesides, G.M. "Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the length of the alkyl chain" J. Am. Chem. Soc. 111 (1989) 7164-7175
- [bar53] Barker, S.A.; Bourne, E.J.; Stacey, M.; Whiffen, D.H. "Infra-red absorption spectra of dextran and other polyglucosans" Chem. Ind. (1953) 196-197
- [bar54a] Barker, S.A.; Bourne, E.J.; Stacey, M.; Whiffen, D.H. "Infra-red spectra of carbohydrates. Part I. Some derivatives of D-glucopyranose" J. Chem. Soc. (1954) 171-176

- [bar54b] Barker, S.A.; Bourne, E.J.; Bruce, G.T.; Neely, W.B.; Stacey, M. "Immunopolysaccharides. Part II. Structure of a betacoccus arabinosaceous dextran" J. Chem. Soc. (1954) 2395-2399
- [bar96] Barié, N. "Untersuchung an UV-vernetzten Polysiloxanen als Beschichtungsmaterialien für akustische Oberflächenwellen-Bauelemente" Wissenschaftliche Berichte, FZKA-5804 (Juli 1996)
- [bar98a] Barié, N.; Rapp, M.; Ache, H.J. "UV crosslinked polysiloxanes as new coating materials for SAW devices with high long-term stability" Sens. Act. B46 (1998) 97-103
- [bar98b] Barié, N.; Rapp, M.; Sigrist, H.; Ache, H.J. "Covalent photolinker-mediated immobilization of an intermediate dextran layer on polymer coated surfaces for biosensing applications" Biosens. Bioelectr. 13 (1998) 855-860
- [bar98c] Barié, N.; Gobet, J.; Rapp, M.; Sigrist, H. "Dextranbeschichtete Oberfläche" Patentanmeldung 19818360.7 vom 24.04.1998
- [bar98d] Barié, N.; Rapp, M.; Sigrist, H.; Ache, H.J. "Covalent binding of dextran as an intermediate layer on surface acoustic wave (SAW) biosensors" Proc. 5th World Congress on Biosensors, Berlin (1998) 406
- [ber95] Bergström, J.; Löfas, S.; Johnsson, B. "Matrix coating for sensing surfaces capable of selective biomolecular interactions, to be used in biosensor systems" U.S. Patent Document 5,436,161 7/1995
- [bla82] Blake, C.; Al-Bassam, M.N.; Gould, B.J.; Marks, V.; Bridges, J.W.; Riley, C. "Simultaneous enzyme immunoassay of two thyroid hormones" Clin. Chem. 28 (1982) 1469-1473
- [ble68] Bleustein, J. "A new surface wave in piezoelectric materials" Appl. Phys. Lett. 13 (1968) 412-413
- [bon92] Bonfig, K.W. "Sensoren und Sensorsysteme" expert Verlag (1992)
- [bor71] Borch, R.F.; Bernstein, M.D.; Durst, H.D. "The cyanohydrinborate anion as a selective reducing agent" J. Am. Chem. Soc. 39 (1971) 2897-2904
- [bra78] Brash, J.L.; Samak, Q.M. "Dynamics of interactions between human albumin and polyethylene surface" J. Colloid Interface Sci. 65 (1978) 495-504
- [bra96] Brandenburg, A.; Polzius, R.; Bier, F.; Bilitewski, U.; Wagner, E. "Direct observation of affinity reactions by reflected-mode operation of integrated optical grating coupler" Sens. Act. B30 (1996) 55-59
- [bru81] Brunner, J.; Semenza, G. "Selective labeling of hydrophobic core of membranes with 3-trifluoromethyl-3-(m-[¹²⁵I]iodophenyl)-diazirine, a carbene-generating reagent" Biochem. 20 (1981) 7174-7182
- [bru96] Bruns, M.; Dosenbach, S.; Geckle, U.; Klewe-Nebenius, H.; Lutz, H.; William, E.; Ache, H.J. "Herstellung von dünnen sensitiven Membranen für Gas- und elektrochemische Sensoren mittels HF-Magnetron-Co-Sputtern" Forschungszentrum Karlsruhe, Wissenschaftliche Berichte (1996); FZKA 5852

- [buc93] Buckle, P.E.; Davies, R.J.; Kinning, T.; Yeung, D.; Edwards, P.R.; Pollard-Knight, D.; Lowe, C.R. *"The resonant mirror: a novel optical sensor for direct sensing of biomolecular interactions. Part II: Applications"* Biosens. Bioelectr. 8 (1993) 355-363
- [cam91] Cammann, K., Lemke, U., Rohen, A., Sander, J., Wilken, H., Winter, B. *"Chemo- und Biosensoren – Grundlagen und Anwendungen"* Angew. Chem. 103 (1991) 519-541
- [cha92] Chaiken, I.; Rosé, S.; Karlsson, R. *"Analysis of macromolecular interactions using immobilized ligands [Review]"* Anal. Biochem. 201 (1992) 197-210
- [coo61] Cook, J.W.; Carruthers, W. *"The chemistry of dextran"* Progr. Org. Chem., Vol. 5; London Butterworths (1961) Chapter 3
- [cua72] Cuatrecasas, P.; Parikh, I. *"Adsorbents for affinity chromatography. Use of N-hydroxysuccinimide esters of agarose"* Biochem. 11 (1972) 2291-2299
- [cur80] Curie, M.; Curie P. *"Développement par compression de l'électricité polaire dans les cristaux hémihédres à faces inclinées"* Bull. Soc. Min. Paris 3 (1880) 90-93
- [cus93] Cush, R.; Cronin, J.M.; Stewart, W.J.; Maule, C.H.; Molloy, J.; Goddard, N.J. *"The resonant mirror: a novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions. Part I: Principle of operation and associated instrumentation"* Biosens. Bioelectr. 8 (1993) 347-354
- [dan88] Daniels, P.B.; Deacon, J.K.; Eddowes, M.J.; Pedley, D.G. *"Surface plasmon resonance applied to immunosensing"* Sens. Act. 15 (1988) 11-18
- [dat86] Datta, S. *"Surface acoustic waves"* Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey (NJ07632), 1986
- [dej95] Dejous, C.; Savart, M.; Rebiere, D.; Pistre, J. *"A shear-horizontal acoustic plate mode (SH-APM) sensor for biological media"* Sens. Act. B26-27 (1995) 452-456
- [det66] DeTar, D.F.; Silverstein, R. *"Reactions of carbodiimides. Part I. The mechanisms of the reactions of acetic acid with dicyclohexylcarbodiimide"* J. Am. Chem. Soc. 88 (1966) 1013-1019
- [dez71] Dezelic, G.; Dezelic, N.; Telisman, Z. *"Binding of human serum albumin by monodisperse polystyrene latex particles"* Eur. J. Biochem. 23 (1971) 575-581
- [dol90] Dolder, M.; Michel, H.; Sigrist, H. *"3-(Trifluoromethyl)-3-(m-isothiocyanophenyl)diazirine: synthesis and chemical characterization of a heterobifunctional carbene-generating crosslinking reagent"* J. Prot. Chem. 9 (1990) 407-415
- [du96a] Du, J.; Harding, G.L.; Ogilvy, J.A.; Dencher, P.R.; Lake, M. *"A study of Love wave acoustic sensors"* Sens. Act. A56 (1996) 211-219
- [du96b] Du, J.; Harding, G.L.; Collings, A.F.; Dencher, P.R. *"An experimental study of Love wave acoustic sensors operating in liquids"* Sens. Act. A60 (1997) 54-61
- [du98] Du, J.; Harding, G.L. *"A multi-layer structure for Love mode acoustic sensors"* Sens. Act. A65 (1998) 152-159

- [end94] Enderlein, J.; Chilla, E.; Fröhlich, H.J. "Comparison of the mass sensitivity of Love and Rayleigh waves in a three-layer system" *Sens. Act.* A41-42 (1994) 472-475
- [eng91] Engels, J. "Krankheit – Fehler in der Informationsübertragung" *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 39 (1991) 1250-1254
- [far70] Farnell, G.W. "Symmetry considerations for elastic layer modes propagating in anisotropic piezoelectric crystals" *IEEE Trans. Sonics Ultrason.*, SU-17 (1970) 229-238
- [far72] Farnell, G.W.; Adler, E.L. "Physical acoustics" ed. W.P. Mason and R.N. Thurston; Academic, New York, Vol. IX (1972) 35-127
- [far78] Farnell, G.W. "Types and properties of surface waves" Springer Verlag, Berlin 1978
- [fir46] Firestone, F.A.; Frederick, J.R. "Refinements in supersonic reflectoscopy. Polarized sound" *J. Acous. Soc. Am.* 18 (1946) 200-211
- [flo87] Flori, C.A.; Baer, R.L. "STW mode analysis and coupling to interdigital transducers" *IEEE Ultrasonics Symp. Proc.* (1987) 313-318
- [foe90] Förster, H.J. "Kleines Taschenlexikon der Spektrum- und Netzwerkanalyse" Wandel & Goltermann, Eningen u.A., 1990
- [fro84] Fröhlich, H.J. "Taschenbuch der Akustik" VEB Verlag Technik, Berlin 1984, Band II
- [gal91] Galipeau, D.W., Vetelino, J.F., Lec, R., Feger, C. "The study of polyimide films and adhesion using a surface acoustic wave sensor" *Sens. Act.* B5 (1991) 59-65
- [gao94] Gao, H; Kislig, E.; Oranth, N.; Sigrist, H. "Photolinker polymer-mediated immobilization of monoclonal antibodies, $F(ab')_2$ and $F(ab')$ fragments" *Biotechnol. Appl. Biochem.* 20 (1994) 251-263
- [gao95] Gao, H; Sängler, M.; Luginbühl, R.; Sigrist, H. "Immunosensing with photo-immobilized immunoreagents on planar optical wave guides" *Biosens. Bioelectr.* 10 (1995) 317-328
- [ged94] Geddes, N.J.; Paschinger, E.M.; Furlong, D.N.; Ebara, Y.; Okahata, Y.; Than, K.A.; Edgar, J.A. "Piezoelectric crystals for the detection of immunoreactions in buffer solutions" *Sens. Act.* B17 (1994) 125-131
- [gia80] Gianazza, E.; Righetti, P.G. "Size and charge distribution of macromolecules in living systems" *J. Chromatography* 193 (1980) 1-8
- [giz92a] Gizeli, E.; Goddard, N.J.; Lowe, C.R.; Stevenson, A.C. "A Love plate biosensor utilizing a polymer layer" *Sens. Act.* B6 (1992) 131-137
- [giz92b] Gizeli, E.; Stevenson, A.C.; Goddard, N.J.; Lowe, C.R. "A novel Love-plate acoustic sensor utilizing polymer overlayers" *IEEE Trans. UFFC-39* (1992) 657-659
- [giz93] Gizeli, E.; Stevenson, A.C.; Goddard, N.J.; Lowe, C.R. "Acoustic Love plate sensors: comparison with other acoustic devices utilizing surface SH waves" *Sens. Act.* B13-14 (1993) 638-639

- [giz95] Gizeli, E.; Liley, M.; Lowe, C.R. "Detection of supported lipid layers by utilising the acoustic Love waveguide devices: application to biosensors" 8th Inter. Conf. Solid-State Sens. Act.; Tech. Digest, 2 (1995) 521-523
- [giz96] Gizeli, E.; Lowe, C.R., Liley, M.; Vogel, H. "Detection of supported lipid layers with the acoustic Love waveguide device: application to biosensors" Sens. Act. B34 (1996) 295-300
- [giz97] Gizeli, E. "Design considerations for the acoustic waveguide biosensor" Smart Mater. Struct. 6 (1997) 700-706
- [gol88] Golander, C.G.; Kiss, E. "Protein adsorption of functionalized and ASCA-characterised polymer-films studied by ellipsometry" J. Colloid Interface Sci. 121 (1988) 240-253
- [gor89] Gorham, W.F.; Niegisch, W.D. "Xylylene polymers" Encyclopedia of polymer science and engineering; 1st ed.; Vol. 15 (1989) 98-124
- [gow86] Gow, S.M.; Caldwell, G.; Toft, A.D.; Beckett, G.J. "SimulTRAC™ simultaneous radioimmunoassay of thyrotropin and free thyroxin evaluated" Clin. Chem. 32 (1986) 2192-2194
- [gri83] Gribnau, T.C.J.; Roeles, F.; Leuvering, J.H.W. "Application of water-dispersible hydrophobic dyes or pigments as labels in immunoassays" US Patent 4,373,932 (1983)
- [gui89] Guilbault, G.G. "Immobilization methods for piezoelectric biosensors" Biotechnology 7 (1989) 349-351
- [had87] Hadfield, S.G.; Lane, A.; McIlmurray, M.B. "A novel coloured latex test for the detection and identification of more than one antigen" J. Immunol. Meth. 97 (1987) 153-158
- [har96] Harding, G.L.; Du, J.; Dencher, P.R.; Barnett, D.; Howe, E. "Love wave acoustic immunosensor operating in liquid" Sens. Act. A61 (1997) 279-286
- [har97] Harding, G.L.; Du, J. "Design and properties of quartz-based Love wave acoustic sensors incorporating silicon dioxide and PMMA guiding layers" Smart Mater. Struct. 6 (1997) 716-720
- [has94] Hashimoto, K. Yamaguchi, M. "Bleustein-Gulyaev-Shimizu wave propagating under metallic gratings of finite thickness" Jpn. J. Appl. Phys. 33 (1994) 3026-3030
- [hau94] Haueis, R.; Vellekoop, M.J.; Kovacs, G.; Lubking, G.W.; Venema, A. "A Love wave based oscillator for sensing in liquids" Proc. 5th Inter. Meeting on Chemical Sensors, Rome, 1 (1994) 126-129
- [hem87] Hemmilä, I.; Holttinen, S.; Petterson, K.; Lövgren, T. "Double-Label Time-Resolved Immunofluorometry of Lutropin and Follitropin in Serum" Clin. Chem. 33 (1987) 2281-2283
- [her91] Herder "Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie" Freiburg (1991)
- [hod94] Hodgson, J. "Light, Angles, Action. Instruments for label-free, real-time monitoring of intermolecular interactions" Bio/Technology 12 (1994) 31-35

- [hof98] Hofmann, G.R.A. *"Photoakustische Untersuchungen zur Tiefenprofilierung und Quantifizierung von Feststoffen unter Verwendung von Continuous- und Step-Scan-FTIR als Aufnahmetechnik"* Dissertation, Universität Karlsruhe, Institut für Instrumentelle Analytik (1998)
- [hor74] Horrocks, D.L. *"Applications of liquid scintillation counting"* Academic Press, New York (1974)
- [ias96] Affinity Sensors *"Methods guide for IAsys and IAsys Auto+"* (1996)
- [ing44] Ingelman, B.; Siegbahn, K. *"An electron-microscopic study of dextran molecules"* Ark. Kemi Min. Geol. 18 (1944) 1-6
- [iup76] International Union for Pure, Applied Chemistry (IUPAC); Pure Appl. Chem. 45 (1976) 101
- [jak97] Jakoby, B.; Vellekoop, M.J. *"Properties of Love waves: applications in sensors"* Smart Mater. Struct. 6 (1997) 668-679
- [jam66] James, L.K.; Augenstein, L.G. *"Adsorption of enzymes at interfaces: Film formation and the effect on activity"* in F.F. Nord (Ed.) *"Advances in Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol."* 28 (1966) 1-40
- [jan68] Janatova, J.; Fuller, J.K.; Hunter, M.J. *"The heterogeneity of bovine albumin with respect to sulfhydryl and dimer content"* J. Biol. Chem. 243 (1968) 3612-3622
- [jen79] Jentoft, N.; Dearborn, D. *"Labeling of proteins by reductive methylation using sodium cyanoborohydride"* J. Biol. Chem. 254 (1979) 4359-4365
- [joh91] Johnsson, B.; Löfas, S.; Lindquist, G. *"Immobilization of proteins to a carboxymethyl dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors"* Anal. Biochem. 198 (1991) 268-277
- [joh95] Johnsson, B.; Löfas, S.; Lindquist, G.; Edström, A.; Müller-Hillgren, R.M.; Hansson, A. *"Comparison of methods for immobilization to carboxymethyl dextran sensor surfaces by analysis of the specific activity of monoclonal antibodies"* J. Mol. Recogn. 8 (1995) 125-131
- [jön91] Jönsson, U.; Fägerstam, L.; Ivarsson, B.; Johnsson, B.; Karlsson, R.; Lundh, K.; Löfas, S.; Persson, B.; Roos, H. *"Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology"* BioTechniques 11 (1991) 620-624
- [jos82] Josse, F.; Lee, D.L. *"Analysis of the excitation interaction and detection of bulk and surface acoustic waves on piezoelectric substrates"* IEEE Trans. Sonics Ultrason., SU-29 (1982) 261-273
- [jos85] Josse, F.; Vetelino, J.F.; Soluch, W.; Andle, J.C. *"On the reflection of bulk acoustic waves in rotated Y-cut quartz"* Ultrason. Symp. (1985) 319-324
- [jos88] Josse, F.; Shana, Z.A. *"Analysis of shear horizontal surface waves at the boundary between a piezoelectric crystal and a viscous fluid medium"* J. Acoust. Soc. Am. 84 (1988) 978-984

- [jos95] Josse, F.; Andle, J.C.; Vetelino, J.F.; Dahint, R.; Grunze, M. "Theoretical and experimental study of mass sensitivity of SAW-APMs on ZX-LiNbO₃" IEEE Trans. UFFC 42 (1995) 517-524
- [jos95] Joshua-Tor, L.; Xu, H.E.; Johnston, S.A.; Rees, D.C. "Crystal structure of a conserved protease that binds DNA: The bleomycin hydrolase, Gal6" Science 269 (1995) 945-950
- [kar91] Karlsson, R.; Michaelsson, A.; Mattsson, L. "Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system" J. Immunol. Meth. 145 (1991) 229-240
- [kar95] Karlsson, R.; Stahlberg, R. "Surface plasmon resonance detection and multispot sensing for direct monitoring of interactions involving low-molecular-weight analytes and for determination of low affinities" Anal. Biochem. 228 (1995) 274-280
- [kho53] Khorana, H.G. "The chemistry of carbodiimides" Chem. Rev. 53 (1953) 145-166
- [kon93] Kondoh, J.; Shiokawa, S. "A liquid sensor based on a shear horizontal SAW device" Electron. Comm. in Japan 76 (1993) 69-82
- [kon94] Kondoh, J.; Matsui, Y.; Shiokawa, S.; Wlodarski, W. "Enzyme immobilized SH-SAW biosensor" Sens. Act. B20 (1994) 199-203
- [kon95] Kondoh, J.; Saito, K.; Shiokawa, S.; Suzuki, H. "Multichannel shear horizontal surface acoustic wave microsensor for liquid characterization" IEEE Ultrasonics Symp. Proc. (1995) 445-449
- [koo94] Koolman, J.; Röhm, K.H. "Taschenatlas der Biochemie" G. Thieme Verlag, Stuttgart (1994)
- [kov92a] Kovacs, G.; Lubking, G.W.; Vellekoop, M.J.; Venema, A. "Love waves for (bio)chemical sensing in liquids" Proc. IEEE Ultrason. Symp. (1992) 281-285
- [kov92b] Kovacs, G.; Venema, A. "Theoretical comparison of sensitivities of acoustic shear wave modes for (bio)chemical sensing in liquids" Appl. Phys. Lett. 61 (1992) 639-641
- [kov94] Kovacs, G.; Vellekoop, M.J.; Haueis, R.; Lubking, G.W.; Venema, A. "A Love wave sensor for (bio)chemical sensing in liquids" Sens. Act. A43 (1994) 38-43
- [laa88] Laatikainen, M.; Lindstrom, M. "Determination of adsorption isotherms with quartz crystal microbalances in liquid phase" J. Colloid Interface Sci. 125/2 (1988) 610-614
- [lee74] Lee, R.G.; Kim, S.W. "Adsorption of proteins onto hydrophobic polymer surfaces. Adsorption isotherms and kinetics" J. Biomed. Mater. Res. 8 (1974) 251-259
- [lew77] Lewis, M. "Surface skimming bulk waves" Proc. IEEE Ultrasonics Symp. (1977) 744-752
- [lie83] Liedberg, B.; Nylander, C.; Lundström, I. "Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing" Sens. Act. 4 (1983) 299-304

- [lin35] Lindau, G.; Rhodius, R. "Die physikalisch-chemische Analyse adsorbierter Eiweißmoleküle in der Grenzfläche fest-flüssig" Z. Phys. Chem. A172 (1935) 321-347
- [lit78] Litman, D.J.; Harel, Z.; Ullman, E.F. "Macromolecular environment control in specific receptor assays" US Patent 4,275,149 (1978)
- [löf90] Löfas, S.; Johnsson, B. "A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands" J. Chem. Soc. Chem. Commun. 21 (1990) 1526-1528
- [löf93] Löfas, S.; Johnsson, B.; Tegendal, K.; Rönnerberg, I. "Dextran modified gold surfaces for surface plasmon resonance sensors: immunoreactivity of immobilized antibodies and antibody-surface interaction studies" Coll. Surf. B: Biointerfaces 1 (1993) 83-89
- [löf95a] Löfas, S.; Johnson, B.; Edström, A.; Hansson, A.; Lindquist, G.; Müller-Hillgren, R.M.; Stigh, L. "Method for site controlled coupling to carboxymethyl dextran surfaces in surface plasmon resonance sensors" Biosens. Bioelectr. 10 (1995) 813-822
- [löf95b] Löfas, S. "Dextran modified self-assembled monolayer surfaces for use in biointeraction analysis with surface plasmon resonance" Pure Appl. Chem. 67 (1995) 829-834
- [lov11] Love, A.E.H. "Some problems of geodynamics" Cambridge University Press, London, 1911
- [low51] Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. "Protein measurement with the folin phenol reagent" J. Biol. Chem. 193 (1951) 265-275
- [lu72] Lu, C.S., Lewis, O. "Investigation of film-thickness determination by oscillating quartz resonators with large mass load" J. Appl. Phys. 43 (1972) 4385-4390
- [luk88] Lukosz, W.; Tiefenthaler, K. "Sensitivity of integrated optical grating and prism couplers as (bio)chemical sensors" Sens. Act. 15 (1988) 273-284
- [mar89] Martin, S.J.; Ricco, A.J.; Niemczyk, T.M.; Frye, G.C. "Characterization of SH acoustic plate mode liquid sensors" Sens. Act. 20 (1989) 253-268
- [mas64] Mason, W.P. "Use of piezoelectric crystals and mechanical resonators in filters and oscillators" Physical Acoustics, 1a (1964)
- [mil95] Millot, M.C.; Martin, F.; Bousquet, D.; Sébille, B.; Lévy, Y. "A reactive macromolecular matrix for protein immobilization on a gold surface. Application in surface plasmon resonance" Sens. Act. B29 (1995) 268-273
- [mor78] Morrissey, B.W.; Han, C.C. "The conformation of gamma globulin adsorbed on polystyrene latices determined by quasielectric light scattering" J. Colloid Interface Sci. 65 (1978) 423-431
- [mya93] Myajima, T.; Yoshida, K.; Högfeldt, E. "Polyelectrolyte titrations. System Na⁺-H⁺ on carboxymethyl-dextran" J. Colloid Interface Sci. 156 (1993) 383-387
- [nak77] Nakamura, K.; Kazumi, M.; Shimuzu, H. "SH-type and Rayleigh-type surface waves on rotated γ -cut LiTaO₃" IEEE Ultrasonics Symp. Proc. (1977) 819-822

- [nak96] Nakanishi, K.; Muguruma, H.; Karube, I. "A novel method of immobilizing antibodies on a quartz crystal microbalance using plasma-polymerized films for immunosensors" *Anal. Chem.* 68 (1996) 1695-1700
- [nel90] Nellen, P.M.; Lukosz, W. "Integrated optical input grating couplers as chemo- and immunosensors" *Sens. Act. B1* (1990) 592-596
- [new92] Newman, J.D.; Turner, A.P.F. "Biosensors: principles and practise" in: *Essays in Biochemistry*, Hrsg. K.F. Tipton, Portland Press, London, 1992
- [nom92] Nomura, T.; Yasuda, T.; Furukawa, S. "Liquid sensor using two-port surface acoustic wave resonator" *Jpn. J. Appl. Phys.* 32 (1992) 78-81
- [nom93] Nomura, T.; Yasuda, T.; Furukawa, S. "Surface acoustic wave liquid sensors based on one-port resonator" *Jpn. J. Appl. Phys.* 32 (1993) 2372-2375
- [nuz83] Nuzzo, R.G.; Allara, D.L. "Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces" *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 4481-4483
- [ore61] Oreskes, J.; Singer, J.M.; *J. Immunol.* 86 (1961) 338
- [owe97] Owen, V. "Real-time optical immunosensors – a commercial reality" *Biosens. Bioelectr.* 12 (1997) 1-2
- [pet85] Peters, T.J.R. "Serum albumin" *Adv. Prot. Chem.* 37 (1985) 161-245
- [plu83] Plueddemann, E.P. "Silane adhesion promoters in coatings" *Prog. Org. Coat.* (1983) 297-308
- [pop92] Poplavko, Y.; Ilchenko, M.; Pereverzeva, L. "Pyroelectric response of piezoelectrics" *Ferroelectrics* 134 (1992) 207-212
- [pru90] Prusak-Sochaczewski, E.; Luong, J.H.T.; Guilbault, G.G. "Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of salmonella typhimurium" *Enzyme Microb. Technol.* 12 (1990) 173-177
- [psc82] Pschyrembel, W. "Klinisches Wörterbuch" 254. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin (1982)
- [rap91] Rapp, M. "Chemische Sensorik mit akustischen Oberflächenwellen" Dissertation, Universität Heidelberg, Institut für Angewandte Physik II (1991)
- [rap95] Rapp, M.; Barié, N.; Stier, S.; Ache, H.J. "Optimization of an analytical SAW microsystem for organic gas detection" *Proc. IEEE Ultrasonics Symp.* (1995) 477-480
- [ray85] Lord Rayleigh "On waves propagated along the plane surface of an elastic solid" *Proc. London Math. Soc. Proc.* 17 (1885) 4
- [ric85] Ricco, A.J.; Martin, S.J.; Zipperian, T. "Surface acoustic wave gas sensor based on film conductivity changes" *Sens. Act.* 8 (1985) 319-333
- [ric97] Rickert, J.; Brecht, A.; Göpel, W. "QCM operation in liquids: constant sensitivity found during formation of extended protein multilayers by affinity" *Anal. Chem.* 69 (1997) 1441-1448
- [roe95] Römpp Chemielexikon; 9. Auflage, G. Thieme Verlag (1995)

- [ruz75] Ruzicka, J.; Hansen, E.H. "Flow injection analysis. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis" *Anal. Chim. Acta* 78 (1975) 145-157
- [ruz78] Ruzicka, J.; Hansen, E.H. "Flow injection analysis. Part X. Theory, techniques and trends" *Anal. Chim. Acta* 99 (1978) 37-76
- [ruz81] Ruzicka, J.; Hansen, E.H. "Flow injection analysis" J. Wiley, New York (1981)
- [sat93] Sato, M.; Yamamoto, T.; Takeuchi, M.; Yamanouchi, K. "Humidity sensitivity of lamb waves on composite polyimide / ZnO / Si₃N₄ structure" *Jpn. J. Appl. Phys.* 32 (1993) 2380-2383
- [sau59] Sauerbrey, G.Z. "Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung" *Z. Phys.* 155 (1959) 206-222
- [sch89] Scheller, F.; Schubert, F. "Biosensoren" Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 1989
- [sch92] Schwedt, G. "Taschenatlas der Analytik" G. Thieme Verlag, Stuttgart (1992)
- [sch97] Schnyder-Candrian, S.; Walz, A. "Neutrophil-activating protein ENA-78 and IL-8 exhibit different patterns of expression in lipopolysaccharide- and cytokine-stimulated human monocytes" *J. Immunol.* 158 (1997) 3888-3894
- [sey76] Seymour, F.R.; Knapp, R.D.; Bishop, S.H. "Determination of the structure of dextran by [¹³C]-nuclear magnetic resonance spectroscopy" *Carbohydrate Research* 51 (1976) 179-194
- [sha90] O' Shannessy, D.J.; Wilchek, M. "Immobilization of glycoconjugates by their oligosaccharides: use of hydrazido-derivatized matrices [Review]" *Anal. Biochem.* 191 (1990) 1-8
- [sha92] O' Shannessy, D.J.; Brigham-Burke, M.; Peck, K. "Immobilization chemistries suitable for use in the BIAcore surface plasmon resonance detector" *Anal. Biochem.* 205 (1992) 132-136
- [sho72] Shons, A.; Dorman, F.; Najarian, J. "An immunospecific microbalance" *J. Biomed. Mater. Res.* 6 (1972) 565-570
- [sig92] Sigrist, H.; Gao, H.; Wegmüller, B. "Light-dependent, covalent immobilization of biomolecules on inert surfaces" *Bio/Technology* 10 (1992) 1026-1028
- [sig95] Sigrist, H.; Collioud, A.; Clémence, J.F.; Gao, H.; Luginbühl, R.; Sängler, M.; Sundarababu, G. "Surface immobilization of biomolecules by light" *Optical Engineering* 34 (1995) 2339-2348
- [sig98] Sigrist, H.; mündliche Mitteilung (1998)
- [sta86] Staros, J.V.; Wright, R.W.; Swingle, D.M. "Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions" *Anal. Biochem.* 156 (1986) 220-222
- [ste91] Stenberg, E.; Persson, B.; Roos, H.; Urbaniczky, C. "Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins" *J. Colloid Interface Sci.* 143 (1991) 513-526

- [ste93] Stevenson, A.C.; Gizeli, E.; Goddard, N.J.; Lowe, C.R. "Acoustic Love plate sensors: a theoretical model for the optimization of the surface mass sensitivity" Sens. Act. B13-14 (1993) 635-637
- [sti97] Stier, S. "Grundlegende Untersuchungen zum Verhalten von chemischen Sensoren auf der Basis akustischer Oberflächenwellen und Einsatz zur Detektion komplexer flüchtiger organischer Stoffgemische" Dissertation, FZKA-Bericht 5817, Forschungszentrum Karlsruhe (1997)
- [tho86] Thompson, M., Auld, B.A. "Surface transverse wave propagation under metal strip gratings" Proc. IEEE Ultrasonics Symp. (1986) 261-266
- [tie69] Tiersten, H.F. "Elastic surface waves guided by thin films" J. Appl. Phys. 40 (1969) 770-789
- [tom95] Tom-Moy, M.; Baer, R.L.; Solomon, D.S.; Doherty, T.P. "Atrazine measurements using surface transverse wave devices" Anal. Chem. 67 (1995) 1510-1516
- [tou69] Tournois, P.; Lardat, C. "Love wave dispersive delay lines for wide band pulse compression" IEEE Trans. Sonics Ultrason., SU-16 (1969) 107-117
- [tro88] Troughton, E.B.; Bain, C.D.; Whitesides, G.M.; Nuzzo, R.G.; Allara, D.L.; Porter, M.D. "Monolayer films prepared by the spontaneous self-assembly of symmetrical and unsymmetrical dialkyl sulfides from solution onto gold substrates: structure, properties and reactivity of constituent functional groups" Langmuir 4 (1988) 365-385
- [tua72] Tuan, H.S.; Ponamgi, S.R. "Excitation of Love waves in a thin film layer by a line source" IEEE Trans. Sonics Ultrason. SU-19 (1972) 9-14
- [tur87] Turner, A.P.F.; Karube, I.; Wilson, G.S. "Biosensors – fundamentals and application" Oxford University Press, Oxford (1987) 85-99
- [van90] Vann, W.F.; Sutton, A.; Schneerson, R. "Enzyme-linked immunosorbent assay" Meth. Enzymol. 184 (1990) 537-541
- [voe92] Voet, D.E.; Voet, J.G. "Biochemie" Verlag Chemie, Weinheim (1992)
- [vuo91] Vuori, J.; Rasi, S.; Takala, T.; Väänänen, T. "Dual-label time-resolved fluoro-immunoassay for simultaneous detection of myoglobin and carbonic anhydrase III in serum" Clin. Chem. 37 (1991) 2087-2092
- [wal97] Walz, A.; Schmutz, P.; Mueller, C.; Schnyder-Candrian, S. "Regulation and function of the CXC chemokine ENA-78 in monocytes and its role in disease" J. Leukoc. Biol. 62 (1997) 604-611
- [wal98] Walz, A.; mündliche Mitteilung (1998)
- [wan94] Wang, Z.; Cheeke, J.D.N.; Jen, C.K. "Sensitivity analysis for Love mode acoustic gravimetric sensors" Appl. Phys. Lett. 64 (1994) 2940-2942
- [wen79] Wentrup, C. "Reaktive Zwischenstufen" Band 1, 1. Auflage, G. Thieme Verlag, Stuttgart (1979)

- [wen89] Wenzel, S.W.; White, R.M. *"Analytic comparison of the sensitivities of bulk-wave, surface-wave, and flexural plate-wave ultrasonics gravimetric sensors"* Appl. Phys. Lett. 54 (1989) 1976-1978
- [wen90] Wenzel, S.W.; White, R.M. *"Flexural plate wave gravimetric chemical sensor"* Sens. Act. A21-A23 (1990) 700-703
- [wes96] Wessa, T. *"Entwicklung eines Immunosensors auf der Basis akustischer Oberflächenwellen"* Dissertation, FZKA-Bericht 5803, Forschungszentrum Karlsruhe (1996)
- [wes96b] Wessa, T.; Rapp, M.; Sigrist, H.; Ache, H.J. *"Immunosensing with surface acoustic wave devices using photoinduced immobilization techniques"* Conf. Proc. Biosensor'96, Bangkok (1996)
- [wes98a] Wessa, T.; Rapp, M.; Ache, H.J. *"New immobilization method for SAW-biosensors: covalent attachment of antibodies via CNBr"* Biosens. Bioelectr. 14 (1999) 93-98
- [wes98b] Wessa, T.; Barié, N.; Rapp, M.; Ache, H.J. *"Polyimide, a new shielding layer for sensor applications"* Sens. Act. B 53 (1998) 63-68
- [whi65] White, R.M.; Volltmer, F.W. *"Direct piezoelectric coupling to surface elastic waves"* Appl. Phys. Lett. 7 (1965) 314-316
- [whi70] White, R.M. *"Surface elastic waves"* Proc. IEEE Ultrasonics Symp. (1970) 1238-1276
- [whi88] White, R.M.; Wenzel, S.W. *"Fluid loading of a Lamb-wave sensor"* Appl. Phys. Lett. 52 (1988) 1653-1655
- [wia86] Wians, F.H.; Dev, J.; Powell, M.M.; Heald, J.I. *"Evaluation of simultaneous measurement of lutropin and follitropin with the SimulTROPIN™ radio-immunoassay kit"* Clin. Chem. 32 (1986) 887-890
- [wil81] Wilcox, J.Z.; Yen, K.H. *"Shear horizontal surface waves on rotated Y-cut quartz"* IEEE Trans. Sonics Ultrason., SU-28 (1981) 449-454
- [wil92] Williams, D.F. *"Materials science and technology"* Vol. 14 (1992) 317-361
- [win56] Winter, S.S.; Beckmann, C.O. *"The influence of structure upon the viscous behavior of some carboxymethyl polysaccharides"* J. Phys. Chem. 60 (1956) 883-890
- [woh79] Wohltjen, H.; Dessy, R.E. *"Surface acoustic wave probe for chemical analysis"* Anal. Chem. 51 (1979) 1458-1475
- [woh84] Wohltjen, H. *"Mechanism of operation and design considerations for surface acoustic wave device vapour sensors"* Sens. Act. 5 (1984) 307-325
- [yam79] Yamanouchi, K. *"Temperature dependance of Rayleigh waves and piezoelectric leaky surface waves"* Wave Electronics 3 (1979) 319-333
- [yon93] Yonezawa, S.; Kambegawa, A.; Tokudome, S. *"Covalent coupling of a steroid to microwell plates for use in a competitive enzyme-linked immunosorbent assay"* J. Immunol. Meth. 166 (1993) 55-61

ANHANG

A Herstellerverzeichnis und Spezifikationen

A.1 MEßGERÄTE

HF-Scanner	Phillips PM 2327	Phillips, Eindhoven, Niederlande
HF-Zähler	Phillips PM 6680	Phillips, Eindhoven, Niederlande
HF-Oszillator-elektronik		Universität Heidelberg, Deutschland
GPIB-Schnittstellenkarte	GPIB-PC II/IIA	National Instruments, München, Deutschland
pH-Meßgerät	654 pH-Meter	Metrohm, Filderstadt, Deutschland
Leitfähigkeitsmeßgerät	Mikroprozessor-Präzisions-Konduktometer LF 539	WTW, Weilheim, Deutschland

A.2 KOMPONENTEN DER MAFIA

Ventile		Bohlender, Lauda-Königshofen, Deutschland
Pumpen		Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, Deutschland
Schläuche, Schlauchverbindungen (BOLA-Hohlschrauben, -Kupplungen)		Bohlender, Lauda-Königshofen, Deutschland
PVC-Pumpenschläuche		Spetec GmbH, Erding, Deutschland
Schrittmotoren, Getriebe, Netzteil, diverse Elektronikbauteile		RS Components GmbH, Mörfelden-Walldorf, Deutschland
Compac-Gehäuse, Ausbausatz, Teilfrontplatten		Schroff GmbH, Schraubenhardt, Deutschland
Programmpaket LabWindows Test Team Plus DM 120086		Phillips, Eindhoven, Niederlande
Perfluorkautschuk-Rundschnurringe Viton 500, 8 x 1		Freudenberg Karlsruhe, Deutschland

A.3 LABORGROßGERÄTE

Vakuumschrank	FVT-420 K	Heraeus, Hanau, Deutschland
Muffelofen	KM 170	Heraeus, Hanau, Deutschland
Netzwerk-analysator	HP-85046A	Hewlett Packard, Amstelveen, Niederlande
Belichtungs-apparatur	Stratalinker 2400 UV Crosslinker mit 5 UV-Röhren (F15T8BL) à 15 W	Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland

Flüssigszintillationszähler	Tri-Carb Model 2300TR	Canberra Packard Instrument Company, Meriden, USA
Spin-Coater	Biofuge A	Fa. Heraeus Christ, Hanau, Deutschland
Lichtmikroskop	Auflichtmikroskop Axiotech 100 D	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland

A.4 SONSTIGES

Magnetronkathoden	Typ US Gun II low profile	AP&T, Nürtingen, Deutschland
SiO ₂ -Standard-Planartarget	99,9 % SiO ₂	Leybold, Hanau, Deutschland
Schichtdickenmeßgerät	Schichtdickenmeßgerät	Leybold, Hanau, Deutschland
Mikrotiterplatten	48-well-Mikrotiterplatten	Costar, Cambridge, Großbritannien
Chromatographiesäule	PD-10 Sephadex® G-25M	Pharmacia Biotech, Freiburg, D.
Schüttler	IKA Vibrax VXR	IKA Labortechnik, Staufen i.Br., D
Vortex	Vortex Genie 2™	Bender&Hobein, Zürich, Schweiz

A.5 FIRMENLISTE FÜR DIE VERWENDETEN CHEMIKALIEN

Amersham, Zürich, Schweiz
 BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland
 Boehringer, Ingelheim, Deutschland
 Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
 DuPont De Nemours GmbH, Bad Homburg, Deutschland
 Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
 Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA
 Schuchardt & Co., Hohenbrunn, Deutschland
 Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, Deutschland
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland

A.6 BELICHTUNGSAPPARATUR

Vom Hersteller werden folgende Kenndaten angegeben:

Hersteller:	Stratagene GmbH
Modell:	Stratalinker 2400 UV-Crosslinker
UV-Röhren:	5 Stück, je 15 Watt
Hauptemission:	365 nm
Gesamtausgangsleistung:	ca. 4000 µW/cm ²
Bestrahlungsabstand:	ca. 24 cm

Tab. A-1: Spezifikation der Belichtungsapparatur

A.7 PARYLEN-C

A.7.1 FTIR-Photoakustisches Spektrum

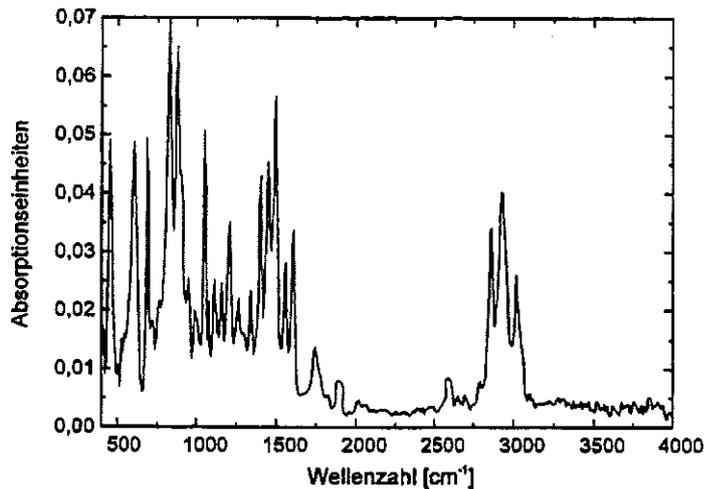


Abb. A-1: FTIR-Photoakustisches Spektrum¹ von Parylen-C

A.7.2 Bestimmung der Schichtdicke der Parylen-Beschichtung

25/8/97 Messure d'échelle de tests accompagnant 3/4 des capteurs STM (requis)

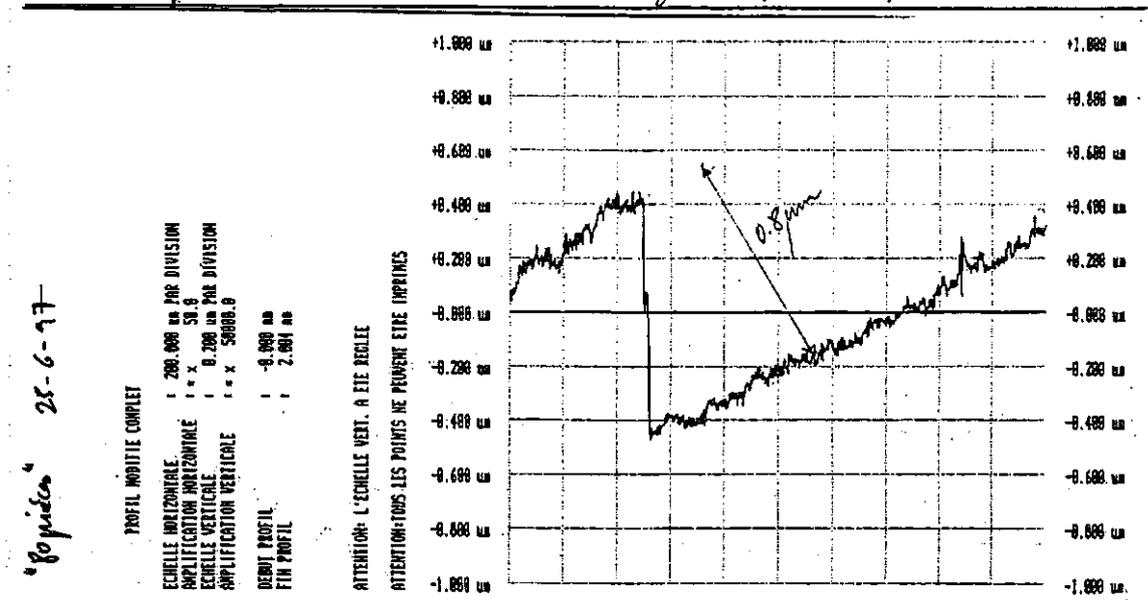


Abb. A-2: Beispielmessung zur Bestimmung der Dicke der Parylenbeschichtung mittels eines Dektak-Profilometers²

¹ aufgenommen von G. Hofmann, Forschungszentrum Karlsruhe, Institut für Instrumentelle Analytik

² durchgeführt vom Centre Suisse d'Electronique et de Microtechnique SA (CSEM), Neuchâtel, Schweiz

A.8 CARBOXYMETHyliERTES DEXTRAN

A.8.1 FTIR-Photoakustisches Spektrum

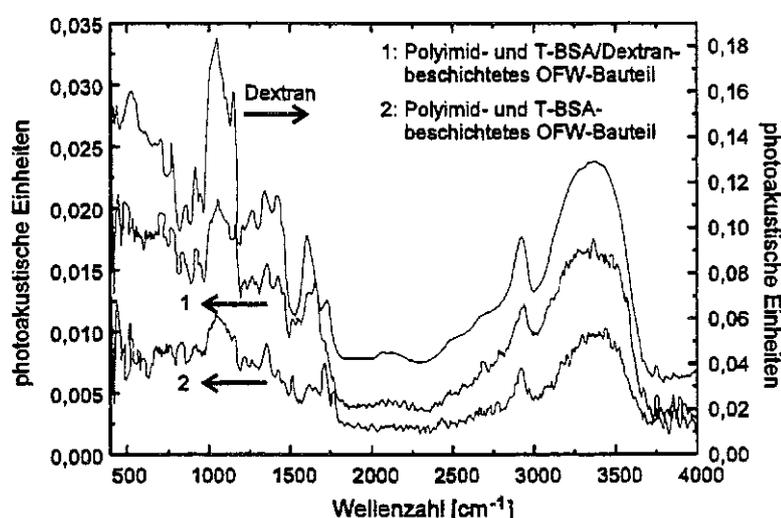


Abb. A-3: FTIR-Photoakustisches Absorptionsspektrum³ von carboxymethyliertem Dextran (MW 70.000; Reinsubstanz) und polyimidbeschichteten OFW-Bauteilen, die mit T-BSA (50 ng/mm² T-BSA; Trocknung: 2 h, 10⁻³ mbar, RT) bzw. mit T-BSA und carboxymethyliertem Dextran (CoCoating: 20 ng/mm² carboxymethyliertes Dextran; 200 ng/mm² T-BSA; Trocknung: 2 h, 10⁻³ mbar, RT) beschichtet sind
 (Bandenzuordnung für carboxymethyliertes Dextran: 1047 cm⁻¹ C-O-Streckschwingung; 1154 cm⁻¹ CH₂-O-CH₂-Streckschwingung; 1270 cm⁻¹ C-O-C im Ring; 1344 cm⁻¹ OH-Biegeschwingung (plan); 1420 cm⁻¹ COOH-symmetr. Valenzschwingung; 1605 cm⁻¹ C=O asymmetr. Streckschwingung; 2925 cm⁻¹ CH₂-Streckschwingung; 3317 cm⁻¹ OH-Streckschwingung bzw. Wasserstoffbrückenbindung)

³ aufgenommen von G. Hofmann, Forschungszentrum Karlsruhe, Institut für Instrumentelle Analytik

B Verwendete Chemikalien

B.1 DEXTRANE

Bezugsquelle: Molecular Probes

Best.-Nr.	Substitution (mol Substituent / mol Dextran)	MW
D-1953	carboxymethyl (71 mol/mol)	70.000
D-1856	biotin (2,2 mol/mol)	10.000
D-1860	amino	10.000
D-1861	amino	40.000
D-1862	amino	70.000
D-1821	fluorescein (1,8 mol/mol)	10.000
D-1823	fluorescein (8,3 mol/mol)	70.000
D-1819	tetramethylrhodamin (4,7 mol/mol)	70.000
D-1895	tetramethylrhodamin und biotin	10.000
D-1896	tetramethylrhodamin und biotin	70.000

B.2 PROTEINE

Protein	Firma	Best.-Nr.
BSA (Fraktion V)	Serva	11924
BSA, biotin-labeled	Sigma	A-8549
ENA-78	Prof. Walz, Universität Bern	
ExtrAvidin	Sigma	E-2511
ExtrAvidin-Cy3 Conjugate (3,4 mol/mol)	Sigma	E-4142
ExtrAvidin-FITC Conjugate (3,6 mol/mol)	Sigma	E-2761
ExtrAvidin-TRITC Conjugate (1,7 mol/mol)	Sigma	E-3011
Glucoseoxidase (Aspergillus niger) 15-25 U/mg	Sigma	G-6641
Glucoseoxidase (Aspergillus niger), Conjugat: caproyl-Biotin (10-15 mol Biotin/mol)	Biotrend	4665-8104
L-Tryptophan	Serva	37422
Peroxidase	Sigma	P-8250
Streptavidin	Biotrend	9000-01
Streptavidin-Cy3 Conjugate (6,8 mol/mol)	Sigma	S-6402
Streptavidin-FITC	Sigma	S-3762
T-BSA	Dr. Sigrist, CSEM Neuchâtel	
Urease (Jack Bean) 600 U/mg; MW 480 kD	Biotrend	9470-0192

B.2.1 Monoklonale Antikörper

Antikörper	Firma	Best.-Nr.
anti-Avidin (mouse IgG1; Clone WC19.10)	Sigma	A-5680
anti-Biotin (mouse IgG1; Clone BN-34)	Sigma	B-7653
anti-Biotin, FITC conjugated (mouse IgG1; Clone BN-34)	Sigma	F-4024
anti-BSA (mouse IgG2a; Clone BSA-33)	Sigma	B-2901
anti-Folsäure (mouse IgG2b; Clone VP-52)	Sigma	F-5766
anti-Glucoseoxidase (mouse IgG1; Clone GO-40)	Sigma	G-5399
anti-Peroxidase (mouse IgG1; Clone P6-38)	Sigma	P-2419
anti-Urease (mouse IgG1; Clone UR-25)	Sigma	U-4879

B.2.2 Polyklonale Antikörper

Antikörper	Immunogen	Host	Firma	Best.-Nr.
anti-Biotin	Biotin (KLH)	Goat	Sigma	B-3640
anti-BSA	BSA (Cohn Fraction V)	Rabbit	Sigma	B-1520
anti-ENA-78	ENA-78		Prof. Walz, Bern	
anti-Glucoseoxidase	GOD (<i>Aspergillus niger</i>)	Goat	Biotrend	4665-7504
anti-Glucoseoxidase	GOD (<i>Aspergillus niger</i>)	Rabbit	Biotrend	4665-8004
anti-Goat IgG; Biotin-conj.	Goat IgG	Rabbit	Sigma	B-7014
anti-Mouse IgG; Biotin-conj.	Mouse IgG	Goat	Sigma	B-7264
anti-Peroxidase	POD (Horseradish)	Goat	Biotrend	200-1138
anti-Rabbit IgG; Biotin-conj.	Rabbit IgG	Goat	Sigma	B-7389
anti-Urease	Urease (Jack Bean)	Rabbit	Biotrend	100-4182

B.2.3 Radioaktiv markierte Proteine

markiertes Protein	Firma	Best.-Nr.
mouse Ig [³⁵ S]-SLR labelled; 7,4-74 TBq/mmol	Amersham	SJ.431
rabbit Ig [³⁵ S]-SLR labelled; 7,4-74 TBq/mmol	Amersham	SJ.434
[³⁵ S]-Streptavidin; 7,4-74 TBq/mmol	Amersham	SJ.436
[methyl ¹⁴ C] methylated BSA; 15 µCi/mg	Biotrend	ARC-422
Dextran-carboxyl [Carboxyl ¹⁴ C]; MW 70.000; 1,3 µCi/mg	Biotrend	ARC-115
Dextran [³ H]; MW 70.000; 50 µCi/mg	Biotrend	ART-215
[¹⁴ C]-T-BSA	selbst markiert	
[³ H]-T-BSA	Dr. Sigrist, CSEM Neuchâtel	

B.3 SONSTIGE CHEMIKALIEN

Chemikalien	Firma	Best.-Nr.
Borsäure, krist.	Merck	165
EDTA	Merck	100944
Essigsäure, 0,1 M Titrisol	Merck	9944
Ethanolamin	Merck	100844
Glycin	Merck	4201
Harnstoff	Merck	8487
HEPES	Boehringer	25245
n-Hexan	Merck	104367
KOH	Merck	105021
KSCN	Merck	105125
N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide (EDC)	Fluka	03449
Na ₂ HPO ₄	Merck	106559
NaCl	Merck	6404
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	Merck	103090
NaOH	Merck	106495
N-Hydroxysuccinimid	Merck	804518
Polyimid (Vorpolymerisat)	DuPont	PI 2610
Polystyrol	Roth	9151
Promoter (APTES)	DuPont	VM 651
Salzsäure, 0,1 M HCl	Merck	9060
Szintillationslösung "Ultima Gold; high flash-point LSC-Coctail"	Packard	6013329
TRIS	Merck	8382
Tween-20	Schuchardt	822184

C Radioaktive Markierung von T-BSA

Um bei der Coimmobilisation von Dextranen mit T-BSA die Bindungseffizienz bestimmen zu können, wurde das verwendete T-BSA radioaktiv markiert und mit Hilfe von Flüssigszintillationszählung quantifiziert. Die Markierung erfolgte durch reduktive Methylierung mit [^{14}C]-Formaldehyd.

C.1 ALLGEMEINES

C.1.1 Reduktive Methylierung von Proteinen

Bei der reduktiven Methylierung werden Aminofunktionen mit Formaldehyd umgesetzt und die entstehenden Schiff'schen Basen reduziert [jen79]. Diese Reaktion greift nur die ϵ -Aminogruppen der Lysineinheiten im Protein, sowie den N-Terminus in der Aminosäuresequenz an. Um eine Denaturierung durch Zerstörung der Disulfidbrücken, sowie die sofortige Reduktion des Formaldehyds zu vermeiden, wird ein mildes Reduktionsmittel verwendet, das zu N,N-Dimethylderivaten führt (Borch-Reduktion) [bor71].

Ein selektives und mildes Reduktionsmittel ist NaBH_3CN . Die Chemoselektivität, die mit diesem Reduktionsmittel erzielt werden kann, ist stark abhängig von Lösungsmittel und pH-Wert. Unter neutralen oder leicht sauren Bedingungen ($\text{pH} > 5$) werden in protischen (wässrig oder alkoholisch) oder etherischen (z.B. THF) Lösungen nur Iminium-Ionen reduziert. Die meisten anderen funktionellen Gruppen, wie Aldehyde, Ketone, Ester, Lactone, Amide, Nitrogruppen und Epoxide sind unter diesen Bedingungen inert. Diese relative Inertheit von Aldehyden oder Ketonen erlaubt eine reduktive Methylierungen mit [^{14}C]-Formaldehyd über in-situ generierte Iminium-Ionen, die anschließend zu Aminen reduziert werden. Es resultiert eine nahezu vollständige Umsetzung bei Einsatz des sechsfachen Überschusses an Formaldehyd, bezogen auf die Proteinmasse [gao95].

C.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Die Bestimmung der T-BSA-Konzentration erfolgte nach der Methode von Lowry [low51]. Die Reaktion beruht auf der Ausbildung eines Kupfer-Protein-Komplexes. Bei der Zugabe von Folin wird dieser Komplex dadurch gestört, daß das Tyrosin von dem im Folin enthaltenen Molybdat oxidiert wird, wodurch es zur Änderung der Absorption im untersuchten Wellenlängenbereich kommt.

Es wird eine Stammlösung aus 0,5 ml CuSO_4 -Lösung (2 %), 0,5 ml Tartratlösung (2 %) und 49 ml Na_2CO_3 -Lösung (2 %) in 0,1 M NaOH verwendet. Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, werden unterschiedliche Verdünnungen hergestellt, mit 1 ml der Stammlösung versetzt und 10 min stehengelassen. Anschließend erfolgt die Zugabe von 100 μl 0,5 N Folinlösung, die ein Extinktionsmaximum bei 578 nm erzeugt, was nach 30 min vermessen werden kann.

Die Berechnung der BSA-Konzentration erfolgt über den optischen Absorptionswert, wobei ein Wert von 0,667 bei 280 nm 1 mg/ml BSA entspricht [jan68].

C.2 DURCHFÜHRUNG DER RADIOAKTIVEN MARKIERUNG VON T-BSA

Da die reduktive Methylierung in 0,1 M HEPES-Puffer (pH 7,5) durchgeführt wird, wurde die Lösung von T-BSA in 0,05 mM PBS über einer PD10-Säule umgepuffert und die Proteinfraction zur radioaktiven Markierung verwendet. Nach der Markierung wurde das [¹⁴C]-T-BSA von überschüssigem Formaldehyd durch Chromatographie abgetrennt. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde nach der Methode von Lowry bestimmt [sig98].

Vorgehensweise:

1. Umpuffern der T-BSA-Lösung:

- PD10-Säule equilibrieren mit 30 ml HEPES-Puffer
- 2 mg T-BSA auf die Säule aufbringen und mit HEPES-Puffer chromatographieren (10 Fraktionen à 800 µl)
- Adsorption bei 280 nm messen

2. Reduktive Methylierung:

- 800 µl der Proteinfraction in ein lichtgeschütztes Reaktionsgefäß einbringen (Schutz der TRIMID-Gruppe)
- Zugabe von 200 nmol [¹⁴C]-Formaldehyd (54 µCi/µmol)
- Zugabe von 24 µmol NaBH₃CN (frische Lösung in H₂O)
- Auffüllen mit HEPES-Puffer auf 1 ml
- 3 h Rühren bei Raumtemperatur (lichtgeschützt)
- Chromatographie der Reaktionsmischung mit 0,05 mM PBS über eine PD10-Säule (15 Fraktionen à 1 ml)

3. Proteinbestimmung nach Lowry und Bestimmung des Ausmaßes der radioaktiven Markierung:

- Adsorption der Fraktionen bei 280 nm messen
- Szintillationszählung von 5 µl der Fraktionen in 5 ml Szintillationslösung

C.3 ERGEBNIS

Die Absorptionen der einzelnen Fraktionen bei 280 nm nach dem Umpuffern sind in Abbildung C-1 dargestellt. In Fraktion 4 ist hier der Hauptanteil der Proteinmenge enthalten.

Abbildung C-2 zeigt die Absorptionen bei 280 nm, sowie die durch Flüssigszintillationszählung ermittelten Radioaktivitäten (dpm) der einzelnen Fraktionen nach der ersten Reinigung des radioaktiv markierten Produktes. Es ist eine schlechte Separation der beiden Peaks zu erkennen, d.h. der Peak des freien [¹⁴C]-Formaldehyds (hohe Radioaktivität) überlappt relativ stark mit dem Proteinpeak (hohe Absorption). Daher wurde eine erneute chromatographische Trennung der Fraktionen 4 und 5 durchgeführt, die das meiste Protein enthalten, jedoch auch noch eine große Menge Formaldehyd. (Die Hauptmenge an Formaldehyd ist in Fraktion 8, jedoch sind auch noch beträchtliche Mengen in Fraktion 4 und 5 vorhanden.)

Abbildung C-3 stellt die Absorptionen und Radioaktivitäten nach der erneuten Reinigung der vereinigten Fraktionen 4 und 5 dar. Hier ist nun eine gute Separation von [¹⁴C]-T-BSA und [¹⁴C]-Formaldehyd (kleiner Peak bei Fraktion 8 und 9; Übereinstimmung der Kurvenverläufe bei Fraktion 4 und 5) zu erkennen.

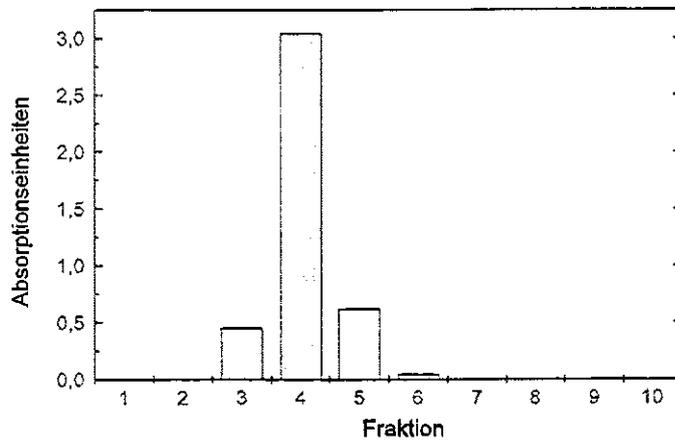


Abb. C-1: Absorption der Fraktionen bei 280 nm nach dem Umpuffern von T-BSA

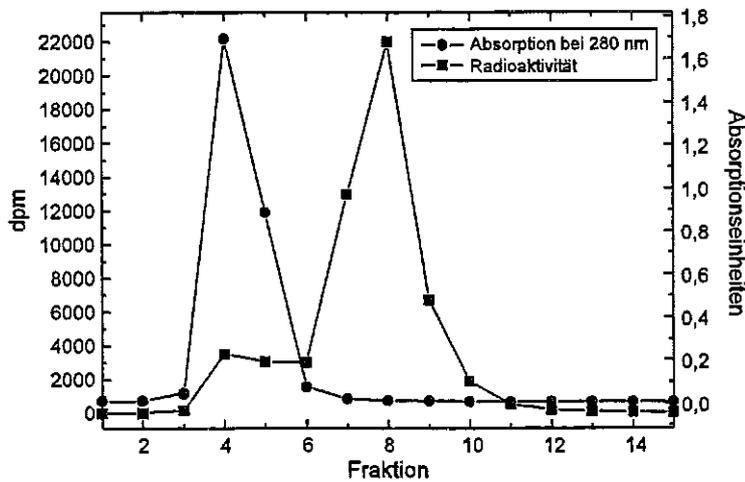


Abb. C-2: Radioaktivität und Absorption bei 280 nm (1. Reinigung)

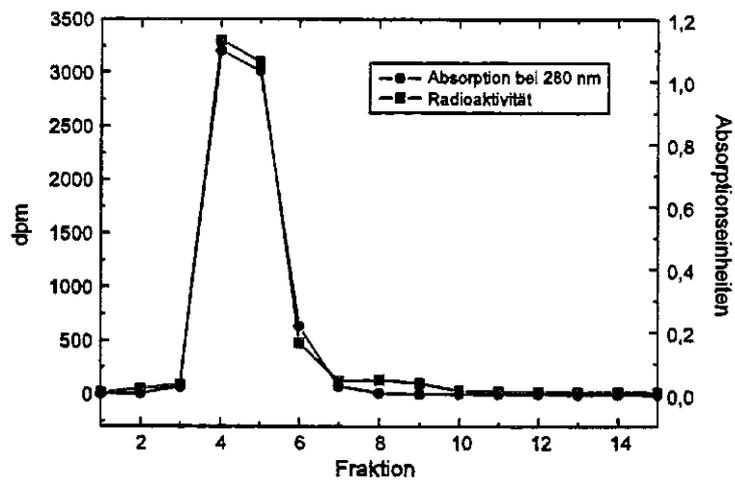


Abb. C-3: Radioaktivität und Absorption bei 280 nm (2. Reinigung)

Die Proteinbestimmung nach Lowry ergab einen Mittelwert der T-BSA-Konzentration von 0,508 mg/ml ($\sigma = 0,042$). Die spezifische Radioaktivität des radioaktiven Markers betrug 54 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$. (1 μCi entspricht $2,22 \times 10^6$ dpm.) Eine Korrelation der Ergebnisse der Szintillationszählung mit den Ergebnissen der Lowrybestimmung ergab ein Ausmaß der Markierung von 0,714 mol $[^{14}\text{C}]$ pro mol $[^{14}\text{C}]$ -T-BSA.

D Komponenten der MAFIA

Die MAFIA wurde als kompaktes, modulares Meßsystem für die Durchflußanalytik konzipiert, das sowohl das Fluidiksystem als auch die Meßelektronik beinhaltet und über eine spezielle Software gleichzeitig Beprobungskomponenten und Meßelektronik ansteuert, sowie die anfallenden Meßdaten einliest. Im Vordergrund der Entwicklungsarbeit stand unter anderem der modulare Aufbau und eine damit verbundene hohe Flexibilität bei der Analyse (siehe Kapitel 4).

D.1 BESTANDTEILE DER MAFIA

Das 19-Zoll-Gehäuse der MAFIA beherbergt folgende Komponenten:

- fünf Injektionsventile (4-Wegeventile) mit Probenschleifen
- ein Selektionsventil (6-Wegeventil)
- eine Pumpe mit variabler Geschwindigkeit
- eine Pumpe mit fixem Antrieb zum Befüllen der Probenschleifen
- ein Einschub zur Aufnahme des Sensorsystems
- eine Steuerungseinheit (Steuerung über die Druckerschnittstelle eines PC's)
- ein 19-Zoll-Netzteil zur Versorgung der einzelnen Komponenten

Speziell im Bereich der Biosensorik muß darauf geachtet werden, daß die verwendeten Analyte nicht mit metallischen Teilen in Berührung kommen. Dies wird unter anderem durch die Verwendung von Peristaltikpumpen mit PVC-Pumpenschläuchen gewährleistet. Die Fluidik, die die einzelnen Ventile, Pumpen und Sensorkammern verbindet, besteht aus Teflonschläuchen, die über Börtelverschraubungen miteinander verbunden werden. Ebenso sind alle Ventiltile, die mit den Analyt- bzw. Pufferströmen in Kontakt kommen, aus Teflon gearbeitet. Der Innendurchmesser des Schlauchsystems sowie der Ventile beträgt 0,5 bis 0,7 mm.

D.1.1 Pumpen

Bei der Puffer- sowie der Analytpumpe handelt es sich um Peristaltik-Schlauchpumpen. Der Pumpkopf ist bei beiden Pumpen mit je acht Rollen ausgestattet, wodurch eine nahezu pulsfreie Förderung von Flüssigkeiten erreicht wird (d.h. Pulsation hoher Frequenz und geringer Amplitude). Aufgrund des langen Pumpenkopfes mit vier Snap-In-Minikassetten können parallel vier verschiedene Pumpenschläuche eingelegt werden. Durch die Wahl des Schlauchdurchmessers kann die Fördermenge variiert und durch den Spannhebel der Anpreß- bzw. Saugdruck eingestellt werden.

Bei der fixen Pumpe handelt es sich um eine Schlauchpumpe mit konstanter Drehzahl, die bei gleichbleibender Fließrate arbeitet. Verschiedene Fließraten sind nur durch Schlauchwechsel erzielbar. Die fixe Pumpe dient der Befüllung der Probenschleifen.

Die variable Pumpe ermöglicht aufgrund der am Gehäuse einstellbaren Pumpendrehzahl flexible Fließraten, die je nach verwendetem Pumpenschlauch Fördermengen von 10 µl/min bis 10 ml/min ermöglicht. Abbildung D-1 zeigt die unterschiedlichen Förderraten bei den verschiedenen Pumpleistungen für zwei verschiedene Standardpumpenschläuche. In Tabelle D-1 sind verschiedene Pumpenschläuche aufgelistet, die bei MAFIA-Messungen zum Einsatz kamen.

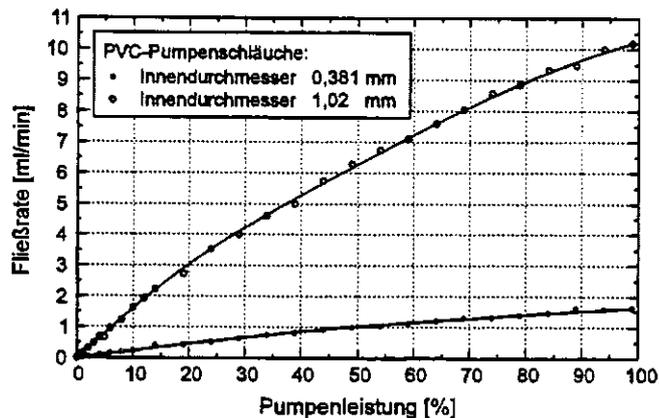


Abb. D-1: Förderraten bei verschiedenen Pumpleistungen für zwei Pumpenschläuche

Farbcodierung	Innen-durchmesser [mm]	Außen-durchmesser [mm]	Wandstärke [mm]	Bestellnummer
orange/schwarz	0,127	2,007	0,940	38-0005
orange/rot	0,191	2,032	0,921	38-0010
orange/grün	0,381	2,209	0,914	38-0020
weiß	1,016	2,692	0,838	38-0040

Tab. D-1: Verwendete PVC-Pumpenschläuche (Spetec)

D.1.2 Injektionsventile

Die Injektionsventile bestehen aus 4-Wegeventilen, bei denen die sechs Anschlüsse jeweils paarweise miteinander verbunden werden (siehe Abbildung D-2). Dabei werden die Eingänge 1 und 4 für die Probenschleife und die Eingänge 2 und 3 für die Befüllung der Probenschleife verwendet. Die Eingänge 5 und 6 sind an den kontinuierlich fließenden Pufferstrom angeschlossen. In Ausgangsstellung sind Analyt- und Pufferstrom getrennt, was eine Befüllung der Probenschleife ermöglicht. Wird das Ventil umgeschaltet, so wird der Inhalt der Probenschleife durch die Eingänge 6 und 1 sowie 4 und 5 in den Pufferstrom injiziert. Der Schaltvorgang erfolgt totvolumenfrei, ohne Einschlüsse von Luftblasen und ohne Druckschwankungen mit einer Umschaltzeit von 250 ms.

Alle von Flüssigkeit benetzten Ventiltteile sind aus Teflon gefertigt und somit chemisch inert.

Durch die Anschlußbelegung der Ventile werden alle Ventilkänäle innerhalb eines Schaltzyklus' durch den kontinuierlichen Pufferstrom gespült.

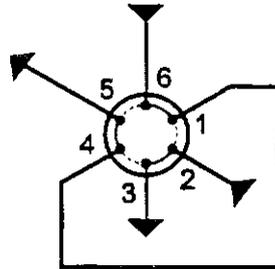


Abb. D-2: Schematische Darstellung der Anschlußbelegung eines Injektionsventils

D.1.3 Selektionsventil

Das Selektionsventil besteht aus sechs Eingängen, die je nach Ventilstellung mit dem gemeinsamen Ausgang verbunden sind (siehe Abbildung D-3). Die Eingänge 1 bis 5 sind jeweils mit dem Eingang 3 der Injektionsventile verbunden. Das Ventil erlaubt die Auswahl von je einem der verschiedenen Eingangskanäle. Dadurch können die fünf Probenschleifen durch eine gemeinsame Analytpumpe befüllt werden, indem der Analyt über das Selektionsventil durch die Schleife angesaugt wird. Die nicht benutzten Wege sind dann blockiert. Wie bei den Injektionsventilen sind auch hier die Elemente, die mit dem Analyten bzw. Puffer in Verbindung kommen, aus Teflon.

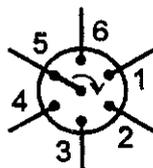


Abb. D-3: Schematische Darstellung der Anschlußbelegung des Selektionsventils

D.1.4 Gehäuse

Das Gehäuse, das die einzelnen Komponenten aufnimmt, ist ein 2-stöckiges 19-Zoll-Gehäuse aus eloxiertem Aluminium. Jede Komponente wurde als Einschubkarte realisiert, wobei alle Module durch einen gemeinsamen 50-poligen Bus kontaktiert werden. Dadurch sind die Ventile in beliebiger Kombination im Gehäuse platzierbar und können der jeweiligen Anwendung angepaßt aufgebaut werden.

Zusätzlich enthält das Gehäuse ein Schaltnetzteil, die Sensorelektronik der OFW-Bauelemente und deren Spannungsversorgung, eine Drucker-Schnittstellenkarte und einen Lüfter, der die Sensorelektronik thermostatisiert.

D.2 ELEKTRONIK

Die Entwicklung der Elektronik erfolgte im Rahmen einer dieser Arbeit angegliederten Praktikums der Fachhochschule Karlsruhe, Studiengang Sensorsystemtechnik, von Marco Wolf.

D.2.1 Phasensteuerung des Schrittmotors

Die Schrittmotorsteuerung erfolgt über ein IC (UB54XX), das die Phasensteuerung des Schrittmotors übernimmt. Die interne Logikschaltung setzt die Information an den Eingängen (Clock, Direction, Halfstep und Output enable) in die entsprechende Phasensteuerung des 4-Phasen-Schrittmotors um. Das IC besitzt eine bipolare Ausgangsstufe, die direkt die Motorspannung von 12 Volt bei einem maximalen Ausgangsstrom von 1,2 A betreiben kann.

- Der *Clock-Eingang* gibt den Takt der Einzelschritte des Schrittmotors an. Der verwendete 7,5°-Motor benötigt also 48 Schritte für eine Umdrehung mit einer maximalen Taktfrequenz von 130 Hz. Daraus ergibt sich eine maximale Drehzahl von 2,7 Umdrehungen pro Sekunde.
- Das *Direction-Signal* gibt die Drehrichtung des Schrittmotors vor. Ist der Eingang auf HI gesetzt, werden die Phasen im Uhrzeigersinn angesteuert. Ist der Eingang auf LO gesetzt, werden die Phasen in umgekehrter Reihenfolge gesteuert.
- Im *Halfstep-Modus* werden die Phasen immer paarweise so angesteuert, daß der Schrittmotor Halbschritte ausführt. Dadurch halbieren sich sowohl die Drehgeschwindigkeit als auch das Drehmoment; die Schrittauflösung wird verdoppelt. Dieser Modus wird für die Ventilansteuerung nicht benutzt, weil in der Anwendung die Schaltgeschwindigkeit kritischer als das Schaltmoment ist.
- Das *Output enable-Signal* ist ein aktiv LO-Signal, das die Ausgangsstufe des IC's abschaltet. Dadurch kann der Motor auf zwei Wege abgeschaltet werden. Entweder durch Stoppen des Clock-Signals, dabei bleiben die zuletzt angesteuerten Phasen unter Spannung (Vorteil: großes Haltemoment) oder durch Abschalten der Ausgangsstufen (Vorteil: kein Ruhestrom). In der Ventilsteuerung wird das Output enable-Signal verwendet, um den Motor bei Erreichen der Ventilposition abzuschalten, weil die Ventile sich nicht aus ihrer Position bewegen.

D.2.2 Taktgenerator

Als Taktgenerator, der die Schrittgeschwindigkeit vorgibt, wurde ein analoger Timer IC (NE555) verwendet. Dieser IC wird in dieser Anwendung wie ein Inverter mit einem Schmitt-Trigger-Eingang und einem Logikausgang betrieben. Ist der Ausgang auf HI gesetzt, so wird über einen Widerstand ein Kondensator geladen. Erreicht die Kondensatorspannung die Triggerschwelle des Eingangs, so wird der Ausgang auf LO gesetzt. Der

Kondensator wird wieder über den Widerstand entladen, bis die untere Triggerschwelle erreicht wird und der Ausgang wieder auf HI gesetzt wird. Das Ausgangssignal entspricht somit einem Rechtecksignal mit einem Tastverhältnis von nahezu $\frac{1}{2}$ und einer Frequenz von $1/(2\pi RC)$.

D.2.3 Positionserkennung

Die Positionserkennung erfolgt über Mikroschalter, die an der Antriebswelle befestigt sind. Sie geben ein HI-Signal, wenn die jeweilige Endposition erreicht ist.

Wenn jedoch ein mechanischer Schalter geöffnet oder geschlossen wird, entsteht durch mechanische Schwingungen der Kontakte jeweils eine Kette von Impulsen. Logische Gatter reagieren auf solche Einzelimpulse sofort und können deshalb eine Schaltung in undefinierbare Zustände versetzen. Eine Abhilfemöglichkeit besteht in der Verwendung von quecksilberbenetzten Schaltkontakten, die jedoch sehr teuer sind. Ein einfaches Verfahren zur elektronischen Entprellung von mechanischen Kontakten besteht aus einem RS-Flip-Flop. Im Ruhezustand ist der Eingang $R = 0$ und $S = 1$, somit ist auch der Ausgang $X = 0$. Wird der Schalter betätigt, so prellt zuerst das Öffnen des Kontaktes R und später das Schließen des Kontaktes S. Durch das Flip-Flop wird aber am Ausgang X erst dann ein logisches HI angelegt, wenn am Eingang S eine negative Flanke auftritt. Dieser Zustand wird dann beibehalten. Das Gleiche geschieht in umgekehrter Reihenfolge, wenn der Schalter in seine Ruhelage zurückkehrt.

D.2.4 Fehlererkennung

Zur Fehlererkennung einzelner Ventile wurde ein Ventil-Bus-Signal eingeführt. Dieses Signal ist mit dem Output enable des Schrittmotors IC gekoppelt und zeigt somit immer an, wenn der Motor des Ventils läuft. Wenn ein Ventil nicht seine gewünschte Position erreicht, weil die Mechanik klemmt, Schalter nicht auslösen oder eine sonstige Störung vorliegt, so verbleibt dieses Signal in seinem busy-Zustand. Die Rückführung dieses Signals über die Druckerschnittstelle ermöglicht somit eine ständige Überwachung durch den Meßrechner, der die entsprechende Fehlerbehandlung aktiviert.

D.2.5 PC-Schnittstelle

Um die Verbindung des Programms mit der MAFIA herzustellen, wird die Centronics-Schnittstelle des PC's direkt über das Meßprogramm angesprochen.

Es können bis zu drei parallele Schnittstellen an den PC angeschlossen werden, da drei Bereiche im I/O-Adressraum des PC's für parallele Schnittstellen reserviert sind (siehe Tabelle D-2). Die jeweils erste Adressangabe in Tabelle D-2 wird im Folgenden als Basisadressen der Schnittstelle bezeichnet.

Port	Schnittstelle
3BCh - 3BFh	parallele Schnittstelle auf MDA-Karte
378h - 37Fh	1. parallele Schnittstelle
278h - 27Fh	2. parallele Schnittstelle

Tab. D-2: I/O-Ports der parallelen Schnittstelle

Die Verbindung der adressierten Ports erfolgt über einen 25-poligen Sub-D-Stecker, dessen Pins wie folgt belegt sind:

Computer-Pin	Leitungsname	Verwendung
1	/STROBE	Adresssignal 1
2	D0	Daten 0
3	D1	Daten 1
4	D2	Daten 2
5	D3	Daten 3
6	D4	Daten 4
7	D5	Daten 5
8	D6	Daten 6
9	D7	Daten 7
10	/ACK	Eingang 1
11	/BUSY	Eingang 2
12	PE	nicht verwendet
13	SLCT	nicht verwendet
14	/AUTO FEED	nicht verwendet
15	/ERROR	Eingang 3
16	/INIT	Adresssignal 2
17	SLCT IN	nicht verwendet
18-25	GND	Masse

Tab. D-3: Pinbelegung der Centronics-Schnittstelle

Allen MAFIA-Komponenten bzw. Funktionen wurden zwei Zustände zugewiesen, die sich direkt kodiert auf die entsprechenden Zustandsbits übertragen lassen.

Komponente	Zustand 1	Zustand 0
Injektionsventile	Analytbeprobung	Spülen
Selektionsventil-Port	Port selektieren	Port nicht selektieren
Pumpen	ein	aus
MAFIA-Modus	Standby	Power On

Tab. D-4: Schaltzustände der MAFIA-Komponenten

Dadurch sind insgesamt 13 Zustandsbits definiert, die mit 3 Registerlatches mit jeweils 8 Bit realisiert wurden. Die 8 Dateneingänge der Latches sind mit den Datenleitungen der Druckerschnittstelle verbunden und übernehmen den Bus-Zustand durch ein kodiertes Adresssignal.

/Strobe und /Init-Signal bilden zusammen die Adresskodierung der drei Latches.

Zustand	Zuordnung
[1,1]	keines der Latches angesprochen (default-Zustand beim Einschalten des Computers)
[1,0]	Latch der fünf Injektionsventile
[0,1]	Latch des Selektionsventils
[0,0]	Latch für die Pumpen und den MAFIA-Modus

Tab. D-5: Adresskodierung der Latches

Das Ansprechen des MAFIA erfolgt durch das Anlegen des Datenwortes (Basisadresse der Druckerschnittstelle) und darauffolgend das Anlegen des Adresssignals (Basisadresse +1 der Druckerschnittstelle). Wenn das Adresssignal gelöscht wird, so übernimmt das Latch die Daten und gibt diese an den MAFIA-internen Bus zur Steuerung der Ventile weiter.

/Acknowledge, /Busy und /Error-Signal sind die drei einzigen Signaleingänge der Centronics-Schnittstelle, deren Zustand immer direkt von der Software auslesbar ist (Basisadresse +2). Durch diese Eingänge können acht Signale der MAFIA kodiert an den Meßrechner zurückgeführt werden.

D.2.6 Sensorelektronik

Die Sensorelektronik besteht aus vier getrennten Oszillatorschaltkreisen für die OFW-Bauelemente, die in ihrer Resonanzfrequenz betrieben werden (siehe Kapitel 3.3.3). Bei der Elektronik besteht die Möglichkeit, zwei Bauelemente jeweils paarweise zu koppeln und die Differenzfrequenz auszuwerten (siehe Kapitel 4.2.2). Die empfindliche HF-Elektronik besitzt eine eigene Spannungsversorgung und einen separaten Lüfter, um einen möglichst geringen Temperaturdrift durch Eigenerwärmung zu erreichen.

D.2.7 Schaltpläne

D.2.7.1 Schaltplan der PC-Schnittstelle

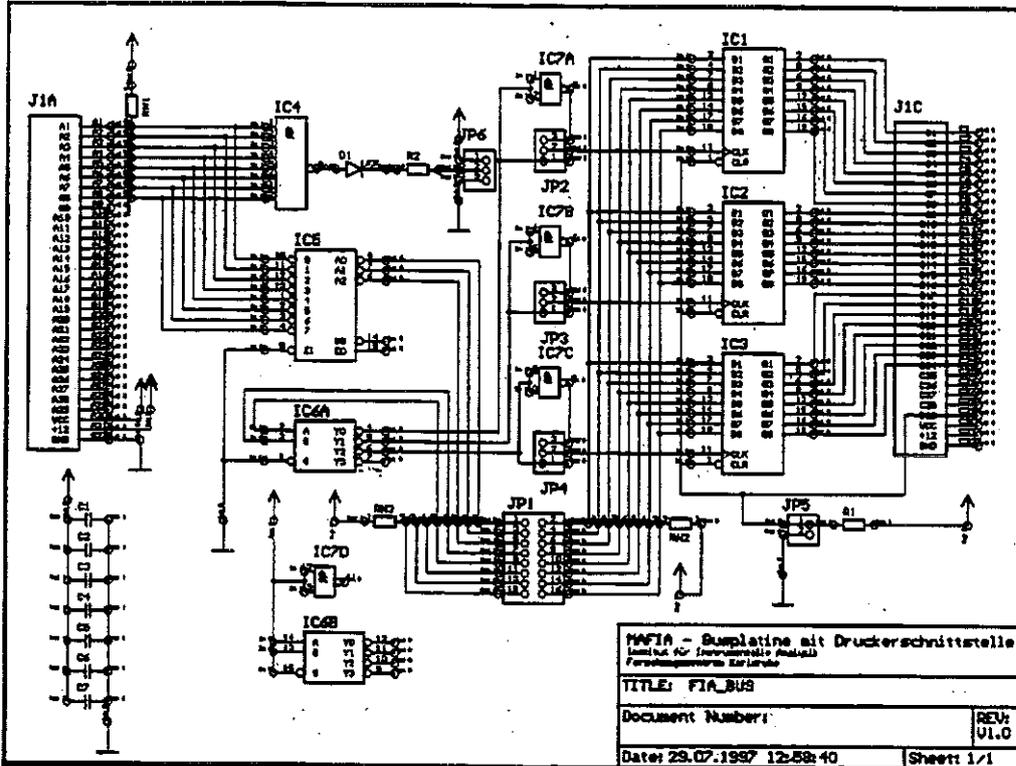


Abb. D-4: Schaltplan der PC-Schnittstelle

Name	Bezeichnung	Funktion
IC1	74273	Registerlatch 1 (Injektionsventile)
IC2	74273	Registerlatch 2 (Selektionsventil)
IC3	74273	Registerlatch 3 (Pumpen und MAFIA-Modus)
IC4	7430	8-fach Nand (zeigt MAFIA-busy an)
IC5	74148	8 zu 3 Kodierer (busy-Rückführung an Meßrechner)
IC6	74139	2 zu 4 Entkodierer (gibt Adresssignal der Latches)
IC7	7400	4 2-fach Nand (Inverter von Signalen)
J1	VG64	Busanschlußstecker
JP1		Druckeranschluß
JP2		invertiert Adresssignal von Latch 1
JP3		invertiert Adresssignal von Latch 2
JP4		invertiert Adresssignal von Latch 3
JP5		Tasteranschluß für Reset-Schalter
JP6		LED-Anschluß für MAFIA-busy-Signal

Tab. D-6: Legende zum Schaltplan der PC-Schnittstelle

D.2.7.2 Schaltplan der Injektionsventile

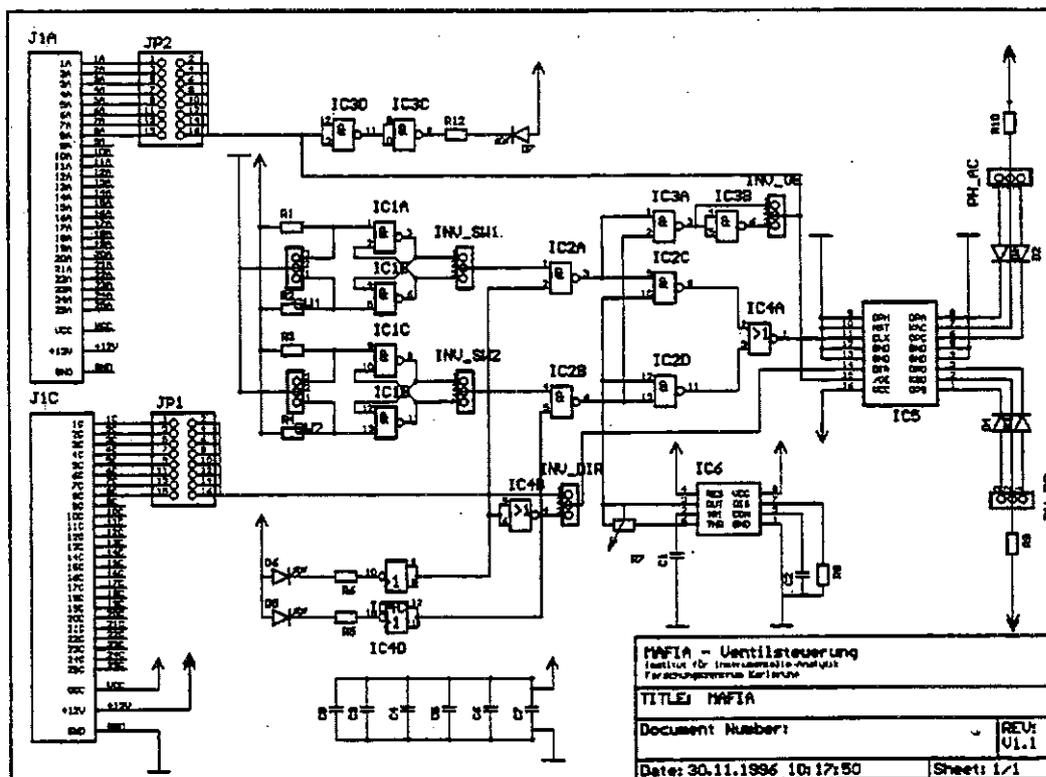


Abb. D-5: Schaltplan der Injektionsventile

Name	Bezeichnung	Funktion
IC1	7400	4 2-fach Nand
IC2	7400	4 2-fach Nand
IC3	7400	4 2-fach Nand
IC4	NE555	Timer IC
IC5	5804	Schrittmotoren IC
INV_DIR		invertiert das Richtungssignal
INV_OE		invertiert das Output enable von IC5
INV_SW1		invertiert Schaltereingang
INV_SW2		invertiert Schaltereingang
J1		MAFIA-Busanschluß
JP1		Kodierschalter Ventilnummer Eingang (Direction-Signal)
JP2		Kodierschalter Ventilnummer Ausgang (busy-Signal)
PH_AC		Motoranschluß Phasen a und c
PH_BD		Motoranschluß Phasen b und d
SW1		Mikroschalteranschluß
SW2		Mikroschalteranschluß

Tab. D-7: Legende zum Schaltplan der Injektionsventile

D.2.7.3 Schaltplan des Selektionsventils

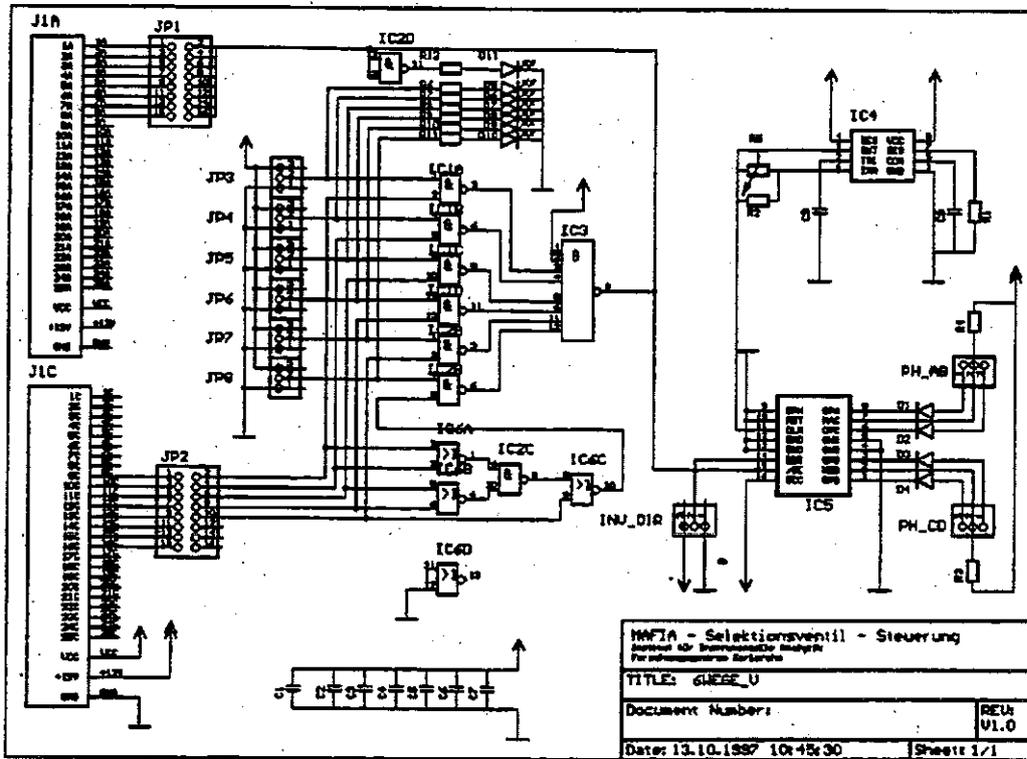


Abb. D-6: Schaltplan des Selektionsventils

Name	Bezeichnung	Funktion
IC1	7400	4 2-fach Nand
IC2	7400	4 2-fach Nand
IC3	7430	8-fach Nand
IC4	NE555	Timer IC
IC5	5804	Schrittmotoren IC
IC6	7402	4 2-fach Nand
J1	VG53	MAFIA-Bus-Anschluß
JP1		Kodierschalter Portnummer Eingang
JP2		Kodierschalter Ventilnummer Ausgang (busy-Signal)
JP3		Schalteranschluß Port 1
JP4		Schalteranschluß Port 2
JP5		Schalteranschluß Port 3
JP6		Schalteranschluß Port 4
JP7		Schalteranschluß Port 5
JP8		Schalteranschluß Port 6
INV_DIR		invertiert Direction-Signal
PH_AC		Motorenanschluß Phasen a und c
PH_BD		Motorenanschluß Phasen b und d

Tab. D-8: Legende zum Schaltplan des Selektionsventils

D.3 SOFTWARE

Die Entwicklung der Software erfolgte im Rahmen eines dieser Arbeit angegliederten Praktikums der Fachhochschule Karlsruhe, Studiengang Sensorsystemtechnik, von Markus Langenbacher.

Die Software hat die Aufgabe den sequentiellen Ablauf der Beprobung mit der MAFIA zu steuern, Meßdaten über eine GPIB-Schnittstelle einzulesen, graphisch darzustellen und zu speichern. Die Software wurde wegen der Komplexität in der Darstellung und der Programmierung der Schnittstellen mit der LabWindows-Entwicklungsumgebung programmiert.

D.3.1 Hardware-Anforderungen

Folgende Hardwarekomponenten sind zum Messen mit dem Programm MAFIA.BAS notwendig:

- PC (mind. 468, 40 MHz, 8 MB, DOS 6.22, GPIB-Schnittstelle)
- HF-Zähler (über GPIB-Schnittstelle mit PC verbunden)
- HF-Scanner (über GPIB-Schnittstelle mit PC verbunden)
- MAFIA (mit Oszillatorelektroniken)

D.3.2 Bedienungselemente

Die Abbildungen D-7 bis D-10 zeigen die Fenster, die beim Ausführen des Programms je nach Programmstatus erscheinen. In den Tabellen werden alle auf der Bildschirmoberfläche befindlichen Textfelder und Editiermöglichkeiten zeilenweise von links nach rechts beschrieben.

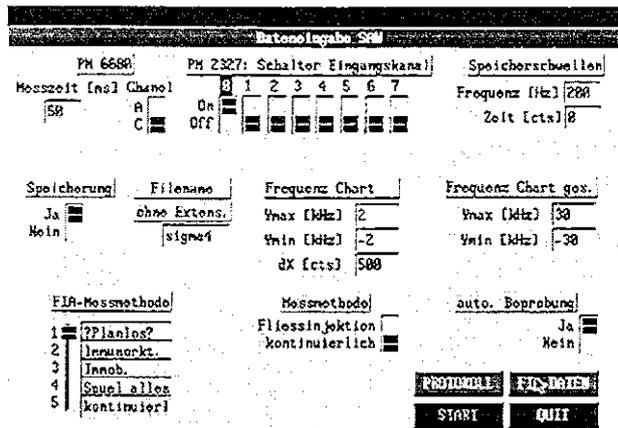


Abb. D-7: Fenster beim Starten der Software (hPanel)

Element	Funktion
Meßzeit	Einstellen des Abtastintervalls (hier z.B. werden alle 50 ms die Oszillatorfrequenzen der Sensoren mit dem HF-Zähler gemessen)
Channel	Wahl des Eingangskanals des HF-Zählers (bei Frequenzen > 225 MHz immer Kanal C)
Schalter Eingangskanal	Eingabe der für die Messung verwendeten Eingangskanäle; Kanäle, an denen keine Sensoren angeschlossen sind, müssen auf Schalterstellung OFF stehen
Speicherschwelle	Festlegen der Speicherschwellen (Bsp.: Bei dieser Einstellung wird jeder zehnte der auf dem Bildschirm dargestellten Datenpunkte gespeichert. Falls die Frequenzänderung zum vorherigen Datenpunkt größer als 200 Hz ist, wird ebenfalls gespeichert.) Die Angabe von Speicherschwellen ist bei lange andauernden Messungen notwendig, um die Datenmenge der gespeicherten Meßwerte zu reduzieren.
Speicherung	Angabe, ob die Meßdaten gespeichert werden sollen
Filename	Angabe des Filenamens (Erweiterung .dat wird automatisch beim Speichern angehängt)
Frequenz Chart / Chart ges.	Achsenkalierung der graphischen Ausgabe (Strip-Charts) der gemessenen Daten
Meßmethode	Wahlschalter zwischen Fließinjektion oder kontinuierlicher Beprobungsmethode
Auto. Beprobung	Wahlschalter für automatische Beprobung
FIA-Daten	öffnet das FIA-Daten-Fenster (fPanel)
Protokoll	öffnet das Protokollfenster (pPanel)
Start	öffnet das Meßfenster (kPanel), bewirkt das Einlesen der vom Benutzer eingegebenen Daten und die Konfiguration der Peripherie
Quit	Deinitialisierung der angeschlossenen Geräte und Beendigung des Meßprogramms

Tab. D-9: Textfelder und Editiermöglichkeiten zum hPanel

Schritt	Ventil Nr.	Beprobungszeit(min)	Spülzeit(min)	Vorlauf (min)	Zyklenzahl	Gesamtzeit(min)
1:	1	0.7	2.0	1	2	28.0
2:	2	0.7	2.0			
3:	3	0.7	2.0			
4:	4	0.7	2.0			
5:	5	0.7	2.0			
6:	0	0.0	0			
7:	0	0.0	0			
8:	0	0.0	0			
9:	0	0.0	0			
10:	0	0.0	0			

Befüllzeit (min)	Analyt	Pumpgeschwindigkeit
Ventil 1:	.7 Analyt 1	5
Ventil 2:	.7 Analyt 2	5
Ventil 3:	.7 Analyt 3	5
Ventil 4:	.7 Analyt 4	5
Ventil 5:	.7 Analyt 5	5
Spülloesung:	0 Puffer	

Abb. D-8: Fenster zur Eingabe des Programmablaufs (fPanel)

Element	Funktion
Schritt 1 bis Schritt 10	Reihenfolge der Schaltung der Injektionsventile bei automatischer Beprobung (Die Beprobungszeiten werden automatisch aus den angegebenen Befüllzeiten und der Pumpgeschwindigkeit berechnet. Die Spülzeiten werden manuell eingegeben.)
Vorlauf	Spülzeit vor der ersten Beprobung
Zyklenzahl	Anzahl der zu wiederholenden Zyklen
Gesamtzeit	Gesamtzeit der Messung (wird automatisch berechnet)
Methode Speichern?	Angabe, ob und unter welchem Namen die Daten gespeichert werden
Ventil 1 bis Ventil 5	Eintrag der Befüllzeit der Probenschleife und des verwendeten Analyten
Pumpgeschwindigkeit	Eintrag der an der variablen Pumpe eingestellten Pumpgeschwindigkeit (die Werte gehen in die Berechnung der Beprobungszeiten mit ein)
Aktualisieren	Aktualisierung der Beprobungszeiten und Kontrolle auf mögliche Fehleinträge
Weiter	Beenden der FIA-Daten-Routine und Abspeichern der Daten

Tab. D-10: Textfelder und Editiermöglichkeiten zum fPanel

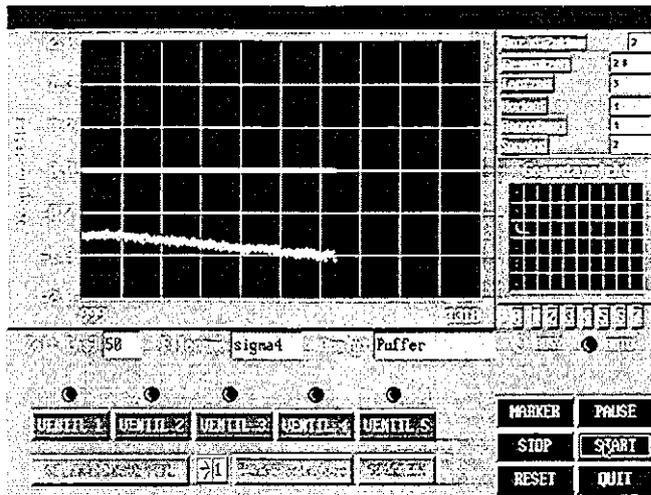


Abb. D-9: Fenster bei einer Messung (kPanel)

Element	Funktion
Ventil 1 bis Ventil 5	Schalten der Ventile bei manueller Beprobung
Selektionsventil	Schalten des Selektionsventils bei manueller Beprobung
Pumpe ein / aus	Ein- bzw. Ausschalten der fixen Pumpe zum Befüllen der Probenschleifen bei manueller Beprobung
Spülen	Ventil 1 bis Ventil 5 in Grundstellung bringen
Marker	Setzen eines Markers (wird sowohl auf dem Bildschirm, als auch im Datenfeld mit den gespeicherten Meßdaten gesetzt)
Pause	Automatische Beprobung unterbrechen
Stop	Anhalten des Meßprogramms und Rückkehr zum hPanel
Reset	Anhalten des Meßprogramms, Rückkehr zum hPanel und Deinitialisierung der Geräte
Start	Starten der Messung bzw. Pause beenden
Quit	Verlassen des Meßprogramms

Tab. D-11: Textfelder und Editiermöglichkeiten zum kPanel

Die übrigen Eintragungen werden automatisch beim Aufruf dieses Fensters (kPanel) vorgenommen, dienen der Kontrolle des Meßprogramms und können daher nicht editiert werden.

Protokoll			
Dateiname:	SCHNITZ	Datum:	2. 2. 1997
Modus:	auto	Methode:	??Planins?
Nr.	dB	Beschichtung	Bemerkungen
Kanal1			
Kanal2			
Kanal3			
Kanal4			
Kanal5			
Kanal6			
Kanal7			
Kanal8			
Pufferlösung:	Puffer	Füllzeit	Pumpgeschw.
Analyt 1:	Analyt 1	0.30	10
Analyt 2:	Analyt 2	0.30	10
Analyt 3:	Analyt 3	0.30	10
Analyt 4:	Analyt 4	0.30	10
Analyt 5:	Analyt 5	0.30	10
			Zykluszahl: 3
			Gesamtzeit: 22
			((WEITER))
Bemerkung: Nicole Barie			

Abb. D-10: Fenster zum Anlegen eines Meßprotokolls (pPanel)

Element	Funktion
Dateiname	wird automatisch beim Aufruf des Protokollfensters eingetragen
Datum	wird automatisch beim Aufruf des Protokollfensters eingetragen
Modus	Angabe, ob die Messung automatisch oder manuell erfolgt (wird automatisch beim Aufruf des Protokollfensters eingetragen)
Tabelle	Eintrag sensorspezifischer Daten für maximal acht Bauteile (Seriennummer, Dämpfung, Beschichtung und gegebenenfalls Bemerkungen zum Sensor)
Pufferlösung	pufferspezifische Daten
Füllzeit	Eintrag der benötigten Füllzeit der Probenschleifen
Pumpgeschwindigkeit	an der Pufferpumpe eingestellte Pumpgeschwindigkeit
Analyt 1 bis Analyt 5	verwendete Analyte
Bemerkungen	Bemerkungen zur Messung (80 Zeichen möglich)
Zahl der Zyklen	Anzahl der Meßzyklen (wird automatisch beim Aufruf des Protokollfensters eingetragen)
Gesamtzeit	Gesamtdauer der Messung (wird automatisch beim Aufruf des Protokollfensters eingetragen)
Weiter	Verlassen der Protokollroutine (die eingetragenen Daten werden beim Verlassen der Routine mit Hilfe der SavePanelState-Anweisung gespeichert und stehen beim nächsten Aufruf des Protokollfensters wieder zur Verfügung)

Tab. D-12: Textfelder und Editiermöglichkeiten zum pPanel

D.3.3 Programmablauf

Nach Starten des Programms MAFIA.bas erscheint zuerst das hPanel. Hier können alle Einstellungen für die folgende Messung vorgenommen werden.

Die für die FIA-Messung benötigten Daten werden durch Betätigen des FIADATEN-Buttons in einem zweiten Fenster (fPanel) eingetragen. Hier werden automatisch die Daten der zuvor vom Anwender im hPanel gewählte Beprobungsmethode angezeigt. Dadurch ist es möglich, einen in einer früheren Messung festgelegten Beprobungsablauf zu wiederholen, ohne die Beprobungsdaten nochmals einzugeben. Der Programmstart ist erst möglich, nachdem dieses Fenster geöffnet wurde, um neue Daten einzutragen oder schon bestehende Beprobungsabläufe zu nutzen. Nach dem Editieren der FIA-Daten und Betätigen des AKTUALISIEREN-Buttons werden die Daten rechnerisch auf mögliche Fehleingaben kontrolliert und den jeweiligen Variablen zugewiesen. Bei einer fehlerhaften Eingabe erscheint eine Meldung, die den Anwender auf das Berichtigen der Daten hinweist. Daraufhin kann das fPanel durch Betätigen des WEITER-Buttons verlassen werden. Das Programm kehrt zurück zum hPanel, von dem aus nun die Möglichkeit besteht, ein Meßprotokoll anzulegen oder das Meßprogramm zu starten.

Das Meßprotokoll (optional) muß vor Beginn der Messung angelegt werden. Es wird nach Verlassen der Protokollebene mit Hilfe der Funktion SavePanelstate als ASCII-File abgespeichert und erhält den Namen <Dateiname>.pro. Nach Verlassen des Protokollfensters gelangt man über den START-Button zum eigentlichen Meßfenster (kPanel), von dem aus die Messung gestartet werden kann.

Die Messung läuft nach Betätigen des START-Buttons bis zum Ablauf der angezeigten Gesamtzeit oder einer durch den Benutzer initiierten Programmunterbrechung. Die ermittelten Meßdaten werden automatisch (alle 2000 Meßwerte) unter dem Namen <Dateiname>.dat als ASCII-File abgespeichert. Da die gemessenen Werte die Frequenzänderung des jeweiligen Sensors zur zuerst gemessenen Frequenz darstellen, wird zusätzlich diese erstgemessene Frequenz eines jeden Sensors als Kommentar im Kopf des Datenfiles abgespeichert. Dies ist insofern hilfreich, da somit bei der späteren Auswertung der Meßdaten eine Aussage über die tatsächliche Oszillatorfrequenz während der Messung getroffen werden kann. Zusätzlich werden die wichtigsten Daten, wie z.B. der Dateiname, das Datum und die Meßdauer im Kopf des Datenfiles abgelegt.

Hat der Anwender beim Programmstart (hPanel) die Option "manuell Beprobieren" gewählt, so können die fünf Injektionsventile, das Selektionsventil und die Pumpe zum Befüllen der Injektionsventile manuell über den Bildschirm mit Hilfe der Maus betätigt werden. Beim Betätigen der Ventile wird dabei in der Markerspalte des Datenfiles die jeweilige Ventilnummer automatisch eingetragen, wodurch die Möglichkeit gegeben ist, anhand des Meßdatenfiles die Anwenderaktionen nachzuvollziehen.

Eine weitere Option stellt die PAUSE-Taste dar, mit Hilfe derer der Anwender das Meßprogramm jederzeit unterbrechen kann. Diese Meßpause wird durch ein Blinken der roten Auto-LED angezeigt. Das Meßprogramm wird nach Betätigung des START-Buttons fortgesetzt, wobei die Gesamtmeßdauer um die Pausenzeit erhöht und daher der weitere Verlauf der Messung nicht beeinflusst wird.

D.3.3.1 Steuerung des zeitlichen Beprobungsablaufs

Zur Steuerung des zeitlichen Beprobungsablaufs wird die Systemzeit des PC's verwendet. Hierbei ist es möglich, die fünf Injektionsventile in beliebiger Reihenfolge (maximal zehn Einzelschritte) nacheinander anzusprechen (siehe Abbildung D-11). Solch ein Beprobungszyklus kann bis zu 99 mal wiederholt werden. Zu Beginn der automatischen Beprobung befindet sich die Ventilsteuerung im Status Vorlauf. Von hier aus ist es nur möglich in den Status Sample zu gelangen, usw. Folgende fünf Stati der Ventilsteuerung sind möglich:

1. *Vorlauf:*

Dieser Status wird nur zu Beginn der automatischen Beprobung eingenommen. Als Vorlaufzeit wird die Zeit bezeichnet, für die die Sensoren zu Beginn der Messung mit Spüllösung beprobt werden.

2. *Sample:*

In diesem Status wird bei gegebener Zeit das Selektionsventil angesteuert, welches das Befüllen der Probenschleifen mit dem dafür vorgesehenen Analyten ermöglicht.

3. *Postsample:*

Nach Ansteuerung des Selektionsventils wird der Status Postsample aktiviert. Nun kann nach der Sample-Zeit die fixe Pumpe zum Befüllen der ausgewählten Probenschleife eingeschaltet werden.

4. *Beprobten:*

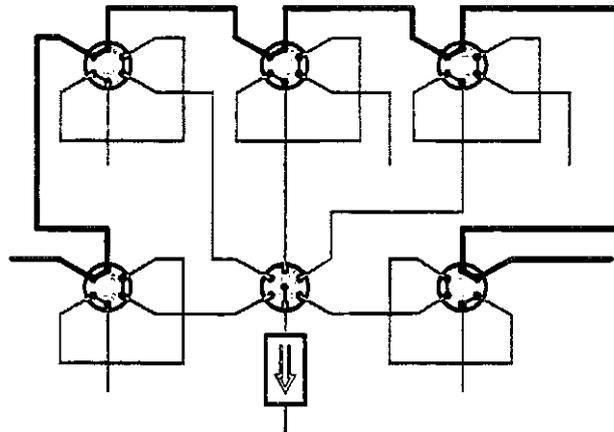
Nach Starten der fixen Pumpe gelangt das Programm in den Status Beprobten, d.h. nach Ablauf der Befüllungszeit der Probenschleife wird die fixe Pumpe ausgeschaltet und das Injektionsventil angesteuert.

5. *Spülen:*

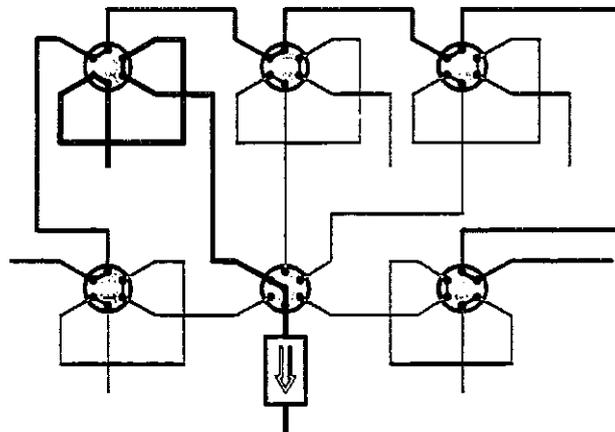
Im Status Spülen wird nach Ablauf der Beprobungszeit das Injektionsventil zurückgeschaltet. Danach befindet sich das Programm wieder im Status Sample und der gleiche Vorgang kann bis zum Ablauf der Gesamtzeit der Beprobungsmethode wiederholt werden.

Zu diesem Ablauf kommt schließlich noch die Berechnung der aktuellen Zeiten, zu denen eine Signalausgabe stattfinden soll.

Spülen der Ventile
und Sensorkammern



Befüllen einer
Probenschleife



Injektion des Analyten
(Beprobung)

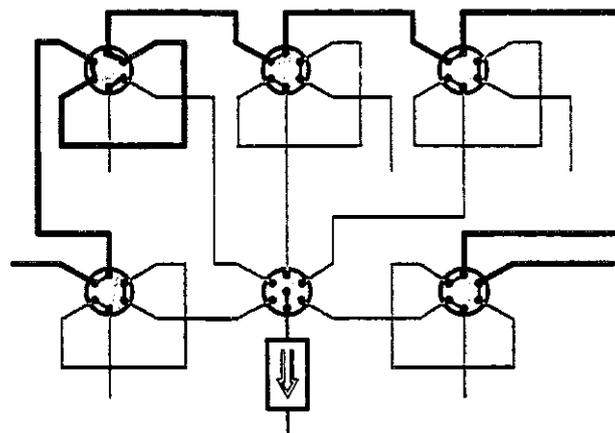


Abb. D-11: Schematische Darstellung der Grundfunktionen der MAFIA

E Programm zur Berechnung von Love-Wellen

Das Programm zur Berechnung von Phasengeschwindigkeit und Sensitivität von Love-Wellen in Abhängigkeit von der Schichtdicke ist nachfolgend abgedruckt.

```

dim shared sens#(400), normierth#(400), vphase#(400)
dim shared mul#, mu2#, Vn#, Vs1#, Vs2#, h#, omega#, beta1#, beta2#
dim shared term1#, term2#, i%, j%, schichtdicke#(400), rho1#, rho2#
dim shared quotv1#, quotv2#, omv1#, omv2#, pi#, lambda#, k#, term3#, term4#

pi#=3.1415927
lambda#=10,8
f#=380000000

rem Vn#   Phasengeschwindigkeit der Love-Welle in m/s
rem Vs1#  Schallgeschwindigkeit im Substrat LiTaO3 in m/s
Vs1#=4160
rem Vs2#  Schallgeschwindigkeit in der wellenführenden Schicht in m/s
Vs2#=2850

rem omega# Kreisfrequenz in Hz
omega#=2*pi*f#

mul#=9.40000000000
mu2#=3.12000000000

rem rho1#, rho2# Dichten von Substrat bzw. wellenführender Schicht
rho1#=7450
rho2#=2650

for i%= 0 to 400
h#=((10-0.01)/400*i%+0.01)*1e-6
call vschleife
term3#=(cos(beta2#*h#*pi#/180))*(sin(beta2#*h#*pi#/180))/(beta2#*h#)
term4#=(rho1#/rho2#)/(beta1#*h#)*0.5*(1+cos(2*beta2#*h#*pi#/180))
k#=1/((h#/lambda#)*(1+term3#+term4#))
sens#(i%)=-k#/(rho2#*lambda#)
print schichtdicke#(i%), normierth#(i%), vphase#(i%), sens#(i%)
next

SUB vschleife
for j%=1 to 1309
Vn#=2850+j%
quotv1#=Vn#^2/Vs1#^2
quotv2#=Vn#^2/Vs2#^2
rem berechnung der hilfsterme
beta1#=(omega#^2/Vn#^2-omega#^2/Vs1#^2)^0.5
beta2#=(omega#^2/Vs2#^2-omega#^2/Vn#^2)^0.5
rem linke seite der dispersionsgleichung
term1#=(beta2#*h#)
rem rechte seite der dispersionsgleichung
term2#=ATN((mul#/mu2#)*((1-quotv1#)/(quotv2#-1))^0.5)
if ABS(term1#-term2#)<0.01 then
vphase#(i%)=Vn#
schichtdicke#(i%)=h#*1e6
normierth#(i%)=h#*1e8/lambda#
exit sub
endif
next
end sub

```

F Isoelektrische Punkte von Biomolekülen

Die isoelektrischen Punkte (pI) verschiedener Biomoleküle sind in Tabelle F-1 aufgeführt [gia80, löf93, joh91]

Protein	pI
Aldolase	8,2-8,6
Apotransferrin	5,9
Catalase	5,8
Chymotrypsinogen A	9,6
Hämoglobin	7,0
Human Serum Albumin	4,7
IgG (anti- β 2 μ -Globulin)	6-8
IgG1 (anti- α -Fetoprotein)	6,8-7,4
Lysozym	> 10
Myoglobin	6,9-7,4
Ovalbumin	4,5
Pepsin	3,0
Protein A	5,1
Ribonuclease A	9,3

Tab. F-1: Isoelektrische Punkte verschiedener Biomoleküle

G Halbwertszeiten der verwendeten radioaktiven Isotope

Die Halbwertszeiten der in dieser Arbeit verwendeten radioaktiven Isotope sind in Tabelle G-1 zusammengestellt.

Isotop	Halbwertszeit
^3H	12,26 Jahre
^{14}C	5760 Jahre
^{35}S	87,2 Tage

Tab. G-1: Halbwertszeiten der verwendeten radioaktiven Isotope

H Abkürzungen und Symbole

H.1 ABKÜRZUNGEN

36YX.LT	Schnitt des verwendeten Substratmaterials (36° rotated Y-cut X-propagating LiTaO ₃)
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
APM	akustische Plattenmode (acoustic plate mode)
APTES	Aminopropyltriethoxysilan
BAW	bulk acoustic wave
bD	biotinyliertes Dextran
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
BSB	Biologischer Sauerstoffbedarf
CC	CoCoating
CMD	carboxymethyliertes Dextran
Da	Dalton
DIC	differentieller Interferenzkontrast
DK	Dielektrizitätskonstante
dpm	Zerfälle pro Minute (decomposition per minute)
EDC	N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure (ethylenediamine tetraacetic acid)
ELISA	Enzym-Immunoassay (enzyme-linked immunosorbent assay)
ENA-78	epithelial neutrophil-activating protein-78
FIA	Fließinjektionsanalyse
FPW	flexural plate waves
FTIR-PAS	FT-IR Photoakustische Spektroskopie
GC	Gaschromatographie
GOD	Glucoseoxidase
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HF	Hochfrequenz
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
HPSW	horizontal polarisierte Scherwelle (horizontal polarized shear waves)
IDT	interdigitaler Transducer
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IL-8	Interleukin-8
kDa	Kilodalton
LC	Layer-Coating
LW	Love-Welle
LW-Bauelement	akustisches Oberflächenwellen-Bauelement, basierend auf Love-Wellen
MAFIA	Multianalyt-Fließinjektionsanalyse
MW	Molekulargewicht
NG	Nachweisgrenze
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OFW	Oberflächenwelle
PBMA	Polymethacrylsäurebutylester

PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
pI	isoelektrischer Punkt
PMMA	Polymethylmethacrylat
POD	Peroxidase
QCM	Schwingquarz (quartz-crystal microbalance)
RIA	Radioimmunoassay
RT	Raumtemperatur
RW	Rayleighwelle
SH-APM	horizontal polarisierte akustische Plattenmode (shear horizontal acoustic plate mode)
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (surface plasmon resonance)
SSBW	oberflächenstreifende Volumenwelle (surface skimming bulk wave)
STW	transversale Oberflächenwelle (surface transverse wave)
T-BSA	TRIMID-modifiziertes BSA
TRIMID	3-Trifluoromethyl-3-(m-isothiocyano-phenyl)-diazirin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett

H.2 SYMBOLE

A	beladene Fläche [m]
c	Analytkonzentration [mol/l]
C	mechanischer Elastizitätstensor [Pa]
C_{steif}	piezoelektrisch versteifter Elastizitätstensor [Pa]
C_0	ursprüngliche Konzentration der unvermischten Probe [mol/l]
C_{max}	Konzentration des Teils der dispergierten Probenzone, der beim Signalmaximum den Detektor durchläuft [mol/l]
D	Dispersionskoeffizient
D_f	axialer Diffusionskoeffizient [m ² /s]
E	Sensitivität bzw. Empfindlichkeit
f	Resonanzfrequenz des Oszillators (gestörter Fall) [Hz]
f_0	Grundfrequenz des Oszillators [Hz]
F	Strömungsgeschwindigkeit [m/s]
h	Schichtdicke der wellenführenden Schicht [h]
h_0	maximale Schichtdicke für monomode operation [m]
H_0	Sensorsignal, das die unvermischte Probe erzeugt
H_{max}	Sensorsignal, das die dispergierte Probe am Signalmaximum erzeugt
K	piezoelektrischer Kopplungsfaktor
k_1, k_2	Materialkonstanten des piezoelektrischen Kristalls
L_R	Transportstrecke vom Injektionsort zum Detektor [m]
m	Massebelegung der Oberfläche [m]
M_r	Molekulargewicht [kg/mol]
R	Regressionskoeffizient
S_V	Probenvolumen [m ³]

t	Zeit [s]
T	absolute Temperatur des Substrats [K]
U_i	Spannung
v_0	Schallgeschwindigkeit der ungestörten Oberflächenwelle [m/s]
v_L	transversal akustische Schallgeschwindigkeit der wellenführenden Schicht [m/s]
v^{piezo}	Schallgeschwindigkeit im piezoelektrischen Medium [m/s]
v_S	transversal akustische Schallgeschwindigkeit des Substrats [m/s]
ε	Dielektrizitätskonstante [F/m]
η	Viskosität [kg/ms]
λ	Wellenlänge [m]
$\mu_{S,L}$	Schermodule von Substrat bzw. wellenführender Schicht
$\rho_{S,L}$	Dichte des Substrates bzw. der wellenführenden Schicht [kg/m ³]
σ	Standardabweichung
τ	Zeitkonstante [s]
ω	Kreisfrequenz [s ⁻¹]
Δf	Verschiebung der Resonanzfrequenz [Hz]
ΔM	Massezunahme durch Beladung mit Analyt [kg]
Δv	Änderung der OFW-Schallgeschwindigkeit [m/s]