

Aufbau und Charakterisierung eines
miniaturisierten parallelen optischen
Detektionssystems zur Untersuchung
von Oligonukleotiden

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2004

Matthias Wegner

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Oktober 2004

Dekan: Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Gauglitz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Chassé

Eine Zivilisation gründet sich nicht auf den Gebrauch, den sie von ihren Erfindungen macht, sondern allein auf die Kraft, die sie zu diesen Erfindungen treibt.

ANTOINE DE SAINT-EXUPÉRY

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz danke ich für die breite und interdisziplinäre Aufgabe und die hervorragenden Arbeitsbedingungen. Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Chassé möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats bedanken.

Allen Kollegen der Bio- und der Chemogruppe danke ich für das ausgesprochen gute Arbeitsklima und ihre stete Hilfsbereitschaft. Besonders Herrn Dipl. chem. Dieter Fröhlich möchte ich für die unzähligen gemeinsamen Diskussionen, Messungen und theoretischen Betrachtungen danken. Herrn Dipl. biol. t.o. Günther Proll danke ich für Kontaktvermittlung zum ITO und Herrn Dipl. chem. Goran Markovic für seine Hilfe beim ArrayBoosterTM. Insbesondere bei Herrn CTA Jochen Mehne möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre bedanken.

Dem Institut für technische Optik (ITO, Stuttgart) danke ich für die Unterstützung am Stereomikroskop. Dem Naturwissenschaftlich-Medizinischen Institut (NMI, Reutlingen) und der Firma Advalytix AG (Brunnthal) danke ich für die Bereitstellung der ArrayBoosterTM. Den Firma L.O.T. Oriel GmbH & Co. KG (Darmstadt) und ProPhysics AG (Oerlikon, CH) danke ich für die freundliche Leihgabe der Hochleistungs-CCD-Detektoren. Der Firma ProLiquid GmbH (Überlingen) danke ich für die technische Umsetzung der temperierbaren RfS-Zelle.

Bei den Partnern des BMBF-Projektes **Gensensorik** möchte ich mich herzlich für die angenehme und konstruktive Zusammenarbeit bedanken, insbesondere bei Herrn Prof. Dr. Dietmar Blohm, der trotz der räumlichen Entfernung die Arbeit stets engagiert begleitete. Weiterhin Herrn Dr. Marin Gheorghe und Herrn Dr. Björn Henze vom Zentrum für angewandte Gensensorik (CAG, Bremen) für die intensiven gemeinsamen Mess- und Arbeits- und Gesprächszeiten. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für das Stipendium im Graduiertenkolleg „*Quantitative Analyse und Charakterisierung von biologisch und pharmazeutisch relevanten Stoffen*“ an der Universität Tübingen.

Mein Dank gilt auch meiner Familie: Helmut und Gisela Wegner, Kurt und Gertrud May, die mir das Studium der Chemie ermöglicht haben. Danke, ihr Lieben!

Viel Dank gilt den Menschen der Christengemeinde Arche und meinen Freunden. Ihr habt mir den Alltag mit eurer freundlichen und liebevollen Art bereichert.

Nicht zuletzt, sondern an allererster Stelle, danke ich besonders herzlich meiner Ehefrau Michaela. Ihre vielfältige Unterstützung half mir sehr, mich auf meine Arbeit zu konzentrieren ohne dabei den Bezug zur Realität zu verlieren.

Gott tut große Dinge, die nicht zu erforschen, und Wunder, die nicht zu zählen sind. HIOB 9,10

Danke!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Motivation der Arbeit	1
1.2	Zielsetzung und Gliederung	2
2	Theoretischer Teil	4
2.1	Biochemische Grundlagen	4
2.1.1	Desoxyribonukleinsäure (DNA)	4
2.2	Biomolekulare Erkennung	8
2.2.1	Gleichgewicht und Kinetik	8
2.2.2	Affinitätsreaktionen an Grenzflächen	8
2.3	Modifizierung von Oberflächen	13
2.3.1	Methoden zur Oligonukleotid-Immobilisierung	13
2.4	Grundlagen der Optik	16
2.4.1	Optik dünner Schichten	16
2.5	Grundlagen der Transporterscheinungen	19
2.5.1	Allgemeine Transportgleichung	19
2.5.2	Wärmeleitfähigkeit von Gasen	20
2.5.3	Wärmeleitfähigkeit von Metallen	20
2.5.4	Temperaturabhängigkeit der Diffusion in Flüssigkeiten	20
2.5.5	Temperaturabhängigkeit der Viskosität in Flüssigkeiten	21
2.5.6	Akustische Oberflächenwellen	21
2.6	Mathematische Grundlagen der Signalverarbeitung	22
2.6.1	Faltung kontinuierlicher Funktionen	22
2.6.2	Korrelation kontinuierlicher Funktionen	23
2.6.3	Korrelation diskreter Funktionen	24
2.6.4	Quanten- und Detektorrauschen	26

3	Material, Geräte und Methoden	33
3.1	Materialien	33
3.1.1	Chemikalien und Biochemikalien	33
3.1.2	Lösungen	34
3.2	Geräte	34
3.2.1	Aufbauten für Einzelplatz-Detektoren	34
3.2.2	Aufbauten für parallel miniaturisierte Detektoren	35
3.2.3	Laborgeräte	38
3.3	Methoden	41
3.3.1	Modifikation von Glastypoberflächen	41
3.3.2	Reflektometrische Interferenzspektroskopie	43
3.3.3	Protokoll der Auswertung der Affinitätskonstanten von Hybridisierungsreaktionen	48
3.3.4	Auswertealgorithmus der parallelen Bilddaten	48
4	Ergebnisse und Diskussion	52
4.1	Detektor	54
4.1.1	Kontrast vs. Detektivität	54
4.1.2	Vergleich verschiedener CCD-Detektoren	54
4.2	Lichtquelle	61
4.2.1	Helligkeit	61
4.2.2	Zeitliche und Örtliche Schwankungen	61
4.2.3	Referenzierung	67
4.3	Optischer Aufbau	71
4.3.1	Abbildungsmaßstab	71
4.3.2	Mechanik	73
4.3.3	Interferenzschicht	79
4.4	Polymer- und Bioschicht	115
4.4.1	Polymer	115
4.4.2	Oligonukleotide	135
5	Zusammenfassung und Ausblick	141
5.1	Zusammenfassung	141
5.2	Ausblick	144
6	Anhang	145
6.1	VirtuRIfS	145

6.1.1	Modelle und Randbedingungen	145
6.1.2	Programm	151
6.2	Zukünftige Fragestellungen	168
6.3	Abkürzungen	172
6.4	Akademische Lehrer	173
6.5	Lebenslauf	174

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Motivation der Arbeit

Seit der vollständigen Entschlüsselung des menschlichen Genoms im April 2003 hat für die Biotechnologie unwiederbringlich eine neue Ära begonnen, die sogenannte Post-Genom-Ära [55]. Mit der DNA-Diagnostik in der Genom-Ära kann ein direkter Nachweis von Krankheitserregern (Mikroorganismen oder Viren) erfolgen. Was eine Nachweiszeit von einigen Tagen benötigte, kann auf wenige Stunden reduziert werden, was auch dadurch bedingt ist, dass Mikroorganismen nicht mehr in Reinkulturen vermehrt werden müssen, sondern direkt anhand der spezifischen Nukleinsäuresequenz eines Krankheitserregers mit Hilfe einer Gensonde nachgewiesen werden können. Große Vorteile ergeben sich gerade bei solchen Infektionskrankheiten, bei denen der Nachweis über die Antikörperbildung bislang schwierig bzw. langwierig war, z.B. HIV (Aids), Hepatitis-B-Viren (Leberentzündung), *Mycobacterium tuberculosis* (Tuberkulose) ebenso wie *Mycoplasma pneumoniae* (Lungenentzündung) und andere Bakterien, welche über ihre DNA bzw. RNA diagnostiziert werden (GeneChip-Systeme, **Affimetrix** [2]). Trotz dieser Erfolge auf dem Gebiet der DNA-Diagnostik sind viele Nachweiskonzepte ungeeignet für eine analytische Anwendung, da die industrielle Forschung im Vergleich zur medizinischen noch sehr teuer ist. Oft fehlt es den Sensoren an der Selektivität bezüglich der Oligonukleotiden mit Punktmutationen, der Reproduzierbarkeit der Messergebnisse und der Sensor-Arrays [21], [51]. Daher spielen Forschungs- und Entwicklungsarbeiten auf dem Gebiet der DNA-Biosensorik trotz der angebrochenen Post-Genom Ära weiterhin eine wichtige Rolle bei der analytischen Erfassung von Nukleinsäuresequenzen [42], wie aktuelle Forschungen auf dem Gebiet der parallelen markierungsfreien Punktmutationsdetektion [19], [75], [52] zeigen.

Immobilisierungsstrategie	Nachweisassay	Detektionsmethode
Polymer, Trägersubstrat, Zeit, Diffusion, Elektrostatik, Sterik, Volumenreaktionen, Dichte	PCR, Hybridisierungsdauer, Ionenstärke, Temperatur, Katalysatoren, Sequenz, Länge, elektrisches Potential	Optik, Lichtquelle, Detektor, Elektrik, Dispersion

Tabelle 1.1: Einflussfaktoren auf die Eigenschaften eines Biosensors

1.2 Zielsetzung und Gliederung

Das Ziel des BMBF-Verbundprojekt **Gensensorik** war, den Nachweis von Sequenzen in eine analytisch und industriell verwertbare Form zu bringen. Dabei sollte ein sogenannter Gensensor für die Detektion pathogener Keime, Umweltanalytik und Forensik eingesetzt werden. Grundlage des Gensensor-Chips sind low-density Mikroarrays, die nicht mehr als ca. 1000 Rezeptorsequenzen zur Analytik bereithalten. Hierbei gliederte sich das Gesamtprojekt in die Bereiche Hardware, Software und Anwendung, wobei ein Schwerpunkt dieser Arbeit innerhalb des Teilprojekt zur Verbesserung und Miniaturisierung der Detektionseinheit liegt. Ein zweiter liegt im Verständnis der temperaturabhängigen Signale der Detektionseinheit, welche die temperaturabhängigen Oligonukleotidwechselwirkungen beinhalten.

Die DNA-Biosensoren heben sich in drei Hauptcharakteristika voneinander ab: der Immobilisierungsstrategie, der Detektionsmethode und dem Nachweisassay (siehe Tabelle 1.1). Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Informationstiefe eines Biosensor-Experimentes bezüglich der genauen Charakterisierung einer biomolekularen Wechselwirkung mit einer hohen Parallelität zu verbinden. Um dieses Ziel zu erreichen war es notwendig, alle Einzelkomponenten des Gesamtaufbaus zu analysieren (siehe Tab. 1.1), um zu verstehen, welche Komponente zu welchem Anteil die Signaltiefe beeinflusst. Da es den Biosensor-Messungen jedoch nicht an Informationsgehalt, sondern vielmehr an Parallelität fehlt, liegen die Schwerpunkte dieser Arbeit bei der Immobilisierungsstrategie und der Detektionsmethode.

Oft wird bei den derzeit verwendeten parallelen Biosensoren im Bereich der Nachweisassays die Signalverstärkung genutzt - sei es durch Probenvorbereitung (Polymerase Kettenreaktion, engl. *Polymerase Chain Reaction*; *PCR* [24]) oder durch Markierung der Zielsequenzen. In dieser Arbeit war die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS) als Detektionsmethode Ausgangspunkt für die Sequenzuntersuchungen. Der Vorteil dieser direkt optischen Methode liegt zum einen in der zeitaufgelösten Beobachtung einer biomolekularen Wechselwirkung (im

Vergleich zur statischen Endpunktbestimmung z.B. von Fluoreszenzintensitäten), zum anderen in der Markierungsfreiheit; dadurch fallen Probenvorbereitung und Markierung weg. Da sich RIfS für die parallel optische Detektion eignet, wie in früheren Messungen gezeigt werden konnte [39], ist diese Methode eine vielversprechende Wahl für die Entwicklung eines miniaturisierten, parallel optischen Biosensors. Ein weiteres Argument für RIfS ist der Umstand, dass es gegenwärtig noch keinen markierungsfreien parallelen DNA-Sensor am Markt gibt. Das kommerziell erhältliche Gerät mit ähnlicher Zielsetzung, wie das Biacore 3000 ist auf 8 Kanäle beschränkt und das FLEX-CHIP-System von HTS Biosystems [8] kann keine Moleküle unter 8000 Dalton Molekulargewicht detektieren, womit die zeitaufgelöste Analyse von Sequenzdaten erschwert wird, da bei länger-kettigen Molekülen elektrostatische Wechselwirkungen hinderlich wirken können [51], [59]. Nach DANZER [16] ist *Analytik ein Prozess, um Erkenntnisse und Informationen aus Signalen zu gewinnen, die durch molekulare Wechselwirkungen entstehen*. Analytisch ist die vorliegende Arbeit in zweifacher Hinsicht.

Ziel der Arbeit war es zum einen, den analytischen Prozess (Prozess A) in einem Gerät zu etablieren. Um jedoch diesen Prozess zu verstehen und effizient zu verbessern, ist es zum anderen notwendig, genau diesen ersten Prozess einem weiteren analytischen wissenschaftlichen Prozess (Prozess W) zu unterziehen. Ein Großteil dieser Arbeit wird sich mit dem Prozess W beschäftigen, wobei diesem Dokument der Prozess A als Strukturelement dient. In den einzelnen Kapiteln nimmt — bezüglich der analytischen Erkenntnis — die Informationstiefe ab, da wir aus rohen Daten (maximal enthaltene Information nach SHANNON [69]) zu Informationen über die molekularen Interaktionen gelangen. Geordnet sind die Kapitel nach der abnehmenden Informationstiefe, wie im Methodenteil 3.3 beschrieben.

Kapitel 2

Theoretischer Teil

Theorien sind Netze, in denen wir fangen, was wir „die Welt“ nennen; mit ihnen machen wir die Welt unserem Verstand zugänglich, erklären und meistern sie. Dabei bemühen wir uns, die Maschen des Netzes kleiner und kleiner zu machen.

KARL R. POPPER

2.1 Biochemische Grundlagen

2.1.1 Desoxyribonukleinsäure (DNA)

2.1.1.1 Funktion der Desoxyribonukleinsäure

Chromosomen, die Träger des Erbguts, sind aus DNA aufgebaut bzw. enthalten DNA als wesentlichen Bestandteil (bei höher entwickelten Lebewesen sind die Chromosomen etwas kompliziertere Einheiten, die neben DNA noch spezifische Proteine enthalten). Die DNA besitzt vor allem zwei Funktionen: erstens die Weitergabe der Erbanlagen auf die Nachkommen und zweitens die Anweisung zur Biosynthese bestimmter Proteine. Die Basen-Sequenzen der DNA beinhalten die Informationen für die Leistungen einer Zelle, welche über die Biosynthese der Enzyme und anderer Proteine verwirklicht werden. Einzelne Abschnitte auf der DNA enthalten die genetischen Informationen für die Ausbildung bestimmter Eigenschaften und Merkmale eines Organismus. Diese Elementar-Einheiten werden Erbfaktoren oder Gene genannt.

2.1.1.2 Primär- und Sekundärstruktur der Desoxyribonukleinsäure

Bei der DNA sind jeweils zwei gegenläufige, im Uhrzeigersinn schraubenartig umeinander geschlungene Moleküle über Wasserstoffbrücken-Bindungen der Basen zu einer Doppelspirale verknüpft. Diese Doppelspiralen lassen sich in vier Klassen unterteilen. A-Form, B-DNA (WATSON-

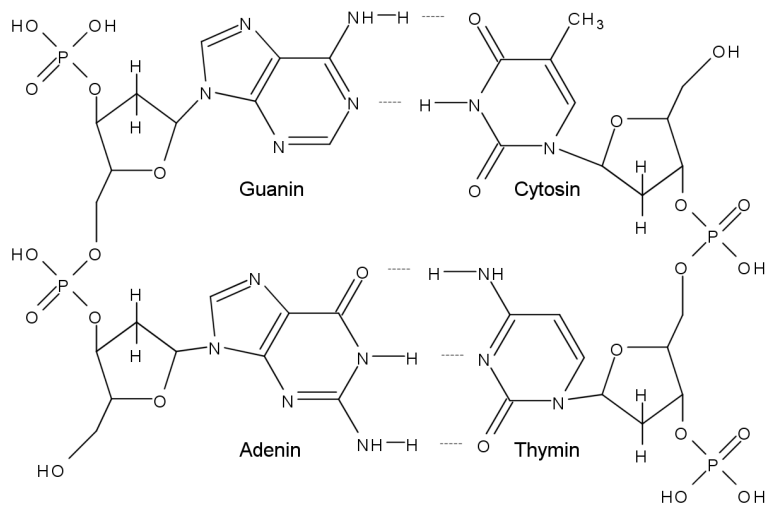


Abbildung 2.1: Wasserstoffbrückenbindung zwischen Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin nach CRICK [77].

CRICK-DNA), Z-DNA und W-DNA [17]. Von diesen vier Konformationen hat die B-Form die biologisch größte Relevanz. Die Ausbildung der Wasserstoffbrücken-Bindungen ist möglich, da die Purin- und Pyrimidin-Derivate der beiden DNA-Stränge der Doppelhelix-Achse zugewandt sind. Die Basen werden durch die hydrophilen Polyester-Strukturen, welche die gute Löslichkeit bedingen, gegen das Lösungsmittel abgeschirmt. Die Basenpaar-Bildung erfolgt spezifisch: Wasserstoffbrücken-Bindungen entstehen jeweils nur zwischen Adenin und Thymin sowie zwischen Guanin und Cytosin (Abbildung 2.1). Für die Basenpaarung beträgt ΔG zwischen Guanin und Cytosin -10 kJ/mol , zwischen Adenin und Thymin -5 kJ/mol [1].

2.1.1.3 Denaturierung der Desoxyribonukleinsäure-Doppelhelix

Unter Denaturierung versteht man die Aufspaltung der relativ instabilen DNA in Einzelstränge. Sie kann durch bestimmte Chemikalien oder durch Erwärmen der wässrigen Lösung erreicht werden [47].

Trennung des DNA-Stranges durch Chemikalien

Hierzu eignen sich besonders Substanzen, die Wasserstoffbrücken-Bindungen lösen, wie z.B. Harnstoff (Wasserstoffbrückenakzeptor). Der strangtrennende Einfluss von Säuren beruht auf einer Störung des Ladungszustandes der Makromoleküle, insbesondere ihrer Phosphorsäurereste. Im sauren Medium werden die N-Funktionen der Basen protoniert.

Im alkalischen Medium ($pH \geq 10$) werden die normalerweise ungeladenen Basen von der Keto- in die Enolform überführt [26]. Durch die Deprotonierung liegen die Basenenolate in geladener

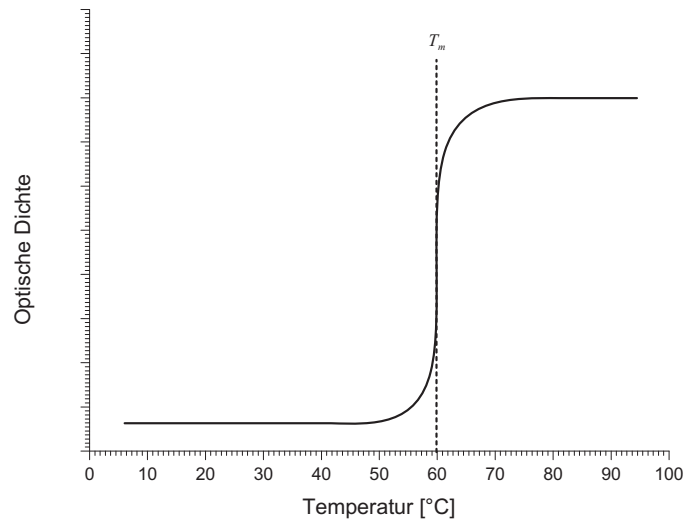


Abbildung 2.2: DNA-Schmelzkurve zur Ermittlung des Temperatur-Bereichs der Denaturierung.

Form vor. Die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen ist nicht mehr möglich, die Helixstruktur löst sich durch Entwinden der Stränge auf.

Trennung des DNA-Stranges durch Erwärmen

Bei Erwärmung der DNA-Lösung kommt es zu einem Zusammenbruch der Doppelhelix unter Freisetzung der Einzelstränge. Da diese Denaturierung in einem relativ engen Temperaturbereich erfolgt, bezeichnet man den Vorgang auch als „Schmelzen“ der DNA. Durch die Aufhebung der Basen-Paarung nimmt die UV-Absorption bei der Strangtrennung beträchtlich zu (Hyperchromie), so dass der Prozess spektrophotometrisch verfolgt werden kann. Abbildung 2.2 zeigt eine typische DNA-Schmelzkurve, deren Wendepunkt die Schmelztemperatur T_m markiert. Die Schmelztemperatur hängt von allen Faktoren ab, welche die Stabilität der DNA-Doppelhelix beeinflussen, wie z.B. *pH*-Wert und Ionen-Stärke der Lösungen, sowie vom Gehalt der betreffenden DNA an dem Basenpaar Guanin-Cytosin (Bindungsstärke Guanin-Cytosin ist größer als bei Adenin-Thymin). Bei Basenfehlstellen an einem der beiden Stränge ändert sich der Schmelzpunkt der DNA. Man kann ohne weiteres Oligonukleotide mit einer Basenfehlstelle durch ihr Hybridisierungsverhalten (Schmelzpunkt, Dissoziations- und Assoziationskonstante) an das Fänger-Oligonukleotid voneinander unterscheiden.

Die einfachste Formel zur Berechnung des Schmelzpunktes ist nach RYCHLIK [65]

$$T_m = 4\text{ °C} \times (\text{Anzahl der Guaninbasen und Cytosinbasen im Oligonukleotid}) + 2\text{ °C} \times (\text{Anzahl der Adeninbasen und Thyminbasen im Oligonukleotid}). \quad (2.1)$$

Diese Formel ist gültig für Oligomere mit weniger als 14 Basen und setzt voraus, dass die Reaktion in Lösungen mit 50 mM einwertigen Kationen durchgeführt wird. Für längere Oligonukleotide gilt die Formel

$$T_m = 64.9\text{ °C} + 41\text{ °C} \times (\text{Anzahl der Guaninbasen und Cytosinbasen im Oligonukleotid} - 16.4)/N \quad (2.2)$$

wobei N die Anzahl der Basen des Oligomers ist. Will man die Salzkonzentration in Lösung berücksichtigen, so folgt nach RYCHLIK [65], SAMBROOK [66] und MUELLER [48]

$$T_m = 81.5\text{ °C} + 16.6\text{ °C} \times \log([\text{Na}^+] + [\text{K}^+]) + 0.41\text{ °C} \times (\%GC) - 675/N \quad (2.3)$$

wobei N die Zahl Nukleotide im Oligomer ist und %GC den Prozent-Anteil der Guaninbasen und Cytosinbasen im Oligonukleotid darstellt.

2.1.1.4 Darstellung der Desoxyribonukleinsäure

Durch Anwendung der sogenannten Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*; PCR) oder ähnlicher Verfahren kann die Detektierbarkeit eines Nukleinsäurestranges deutlich gesteigert werden [24]. Hierbei dienen bekannte Nukleotidsequenzen doppelsträngiger, mikrobieller Genome als Vorlage für sogenannte Primer (synthetische Oligonukleotide), die sich nach Trennung der beiden DNA-Stränge durch Hitzedenaturierung an die komplementären Basen der mikrobiellen DNA anlagern. Am 3'-Ende der Primer beginnt eine zugegebene hitzestabile DNA-Polymerase die Synthese weiterer komplementärer DNA. Dieser Vorgang wird nach einer vorgegebenen Zeit unterbrochen und die entstandenen doppelsträngigen Produkte aus langer Original-DNA und neu synthetisiertem Bruchstück werden erneut getrennt. Wiederum lagern sich die im Überschuß vorhandenen Primer an die entsprechenden komplementären DNA-Sequenzen an, der Vorgang beginnt erneut, bis theoretisch etwa nach 20 Zyklen eine millionenfache Vermehrung (Amplifikation) stattgefunden hat [30].

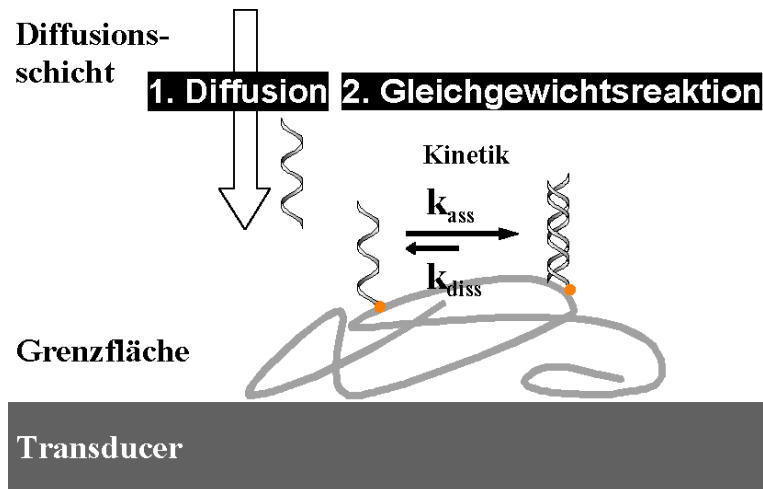


Abbildung 2.3: Vorgänge der Affinitätsreaktion an der Oberfläche.

2.2 Biomolekulare Erkennung

2.2.1 Gleichgewicht und Kinetik

2.2.2 Affinitätsreaktionen an Grenzflächen

Die Affinitätsreaktion an einer Grenzfläche kann als Folgereaktion betrachtet werden. Zuerst findet die Diffusion zur Oberfläche statt, anschließend die Bindungsreaktion an den immobilisierten Liganden (Abbildung 2.3). Beide Schritte können beobachtet werden, geschwindigkeitsbestimmend ist der langsamere Schritt. Je nach Grenzfall misst man nur die Diffusion an die Oberfläche (1. Schritt in Abb. 2.3) oder nur die Bindung an den immobilisierten Bindungspartner (2. Schritt in Abb. 2.3):

- Im ersten Grenzfall, bei dem die diffusionslimitierte Bindung geschwindigkeitsbestimmend ist, dient die Oberfläche mit immobilisiertem Rezeptor als Sonde zur Konzentrationsbestimmung des Substrats.
- Für den zweiten Grenzfall gilt: Ist die Bindung an die auf der Oberfläche immobilisierten Rezeptoren der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, so kann man die Kinetik dieser Bindung messen. Aus dieser Messkurve lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten und die Bindungskonstanten bestimmen.

2.2.2.1 Wechselwirkungskinetik an der Oberfläche

Ermittlung der Bindungskonstanten

Als Modell wird von einer Gleichgewichtsreaktion zwischen Substrat S und immobilisierten Rezeptor R_{immob} ausgegangen,



wobei die Bildungsgeschwindigkeit des Komplexes sich zusammensetzt aus folgenden Termen

$$\frac{d[SR]_{immob}}{dt} = k_a[S][R]_{immob} - k_d[SR]_{immob} \quad (2.5)$$

mit der Assoziationskonstanten k_a und der Dissoziationskonstanten k_d . Daraus ergibt sich mit $[R]_{immob} = [R]_{0,immob} - [SR]_{immob}$

$$\frac{d[SR]_{immob}}{dt} = k_a[S] ([R]_{0,immob} - [SR]_{immob}) - k_d[SR]_{immob}, \quad (2.6)$$

wobei $[R]_{0,immob}$ die Ausgangskonzentration an immobilisiertem Ligand zum Zeitpunkt $t = 0$ darstellt. Das ermittelte Signal Γ der Oberflächenbeladung ist proportional zur Bildung des Rezeptor-Ligand-Komplexes $[SR]_{immob}$ an der Oberfläche; das maximale Signal Γ_{max} ist proportional zur Oberflächenkonzentration an aktivem Ligand $[R]_{0,immob}$ auf der Oberfläche. Die Gleichung lässt sich also umwandeln zu

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = k_a[S]_0\Gamma_{max} - (k_a[S]_0 + k_d)\Gamma(t), \quad (2.7)$$

wobei $d\Gamma/dt$ die Rate der Substrat-Rezeptor-Komplex-Bildung und $[S]_0$ die Konzentration der Komponente im Volumen sind. Löst man Gleichung 2.7 unter der Annahme, dass die Konzentration $[S]_0$ sich nicht ändert - also im Durchfluss oder Rühren - so ergibt sich eine Kinetik *pseudo-erster* Ordnung mit der konzentrationsabhängigen Ratenkonstanten¹ $k_{obs} = k_a[S]_0 + k_d$

$$\Gamma(t) = \Gamma_{GG} (1 - e^{-k_{obs}t}). \quad (2.8)$$

Schreibt man Gleichung 2.8 mit dem Zusammenhang $K = k_a/k_d$ um, so ergibt sich für die Gleichgewichtsbeladung analog einer LANGMUIRSchen Adsorptionsisothermen

$$\Gamma_{GG} = \Gamma_{max} \frac{K[S]_0}{1 + K[S]_0}. \quad (2.9)$$

¹Die Definition von k_{obs} ergibt sich aus der Tatsache, dass $d\Gamma(t)/dt$ gegen $\Gamma(t)$ aufgetragen die Steigung k_{obs} ergibt, wie Gleichung 2.7 zeigt.

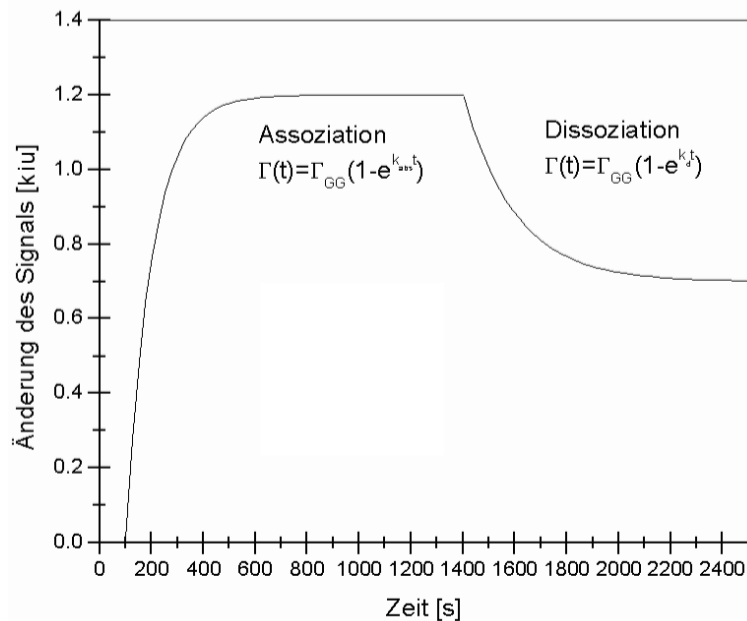


Abbildung 2.4: Funktionen, die experimentell ermittelte Bindungskurven der Oberflächenkinetik beschreiben.

Die Gleichgewichtsbeladung hängt also von der Bindungskonstanten K , der Konzentration $[S]_0$ und der Bindungskapazität der Oberfläche Γ_{max} ab.

Ermittlung der Gleichgewichtskonstanten

Um Assoziations- und Dissoziationskonstanten der Oberflächenkinetik zu bestimmen, muss der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Bindung an die Oberfläche sein, d.h. entweder muss genügend Substrat vorliegen oder die Anzahl der Rezeptoren an der Oberfläche muss gering sein, damit sich keine Reaktion durch einen Konzentrationsgradienten ergibt. Zur Auswertung muss k_a und k_d aus der konzentrationsabhängigen Ratenkonstanten k_{obs} bestimmt werden. Die Konzentration des Rezeptors an der Oberfläche und die Konzentration des Substrats in Lösung gehen als Faktoren in die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation mit ein; es handelt sich also um eine Kinetik zweiter Ordnung. Diese kann jedoch für Systeme unter Durchflussbedingungen als Kinetik *pseudo-erster* Ordnung angenommen werden, da die Konzentration des Substrats als konstant betrachtet wird. Durch Anpassen der exponentiellen Funktion der Kinetik nach Gleichung 2.8 pseudo-erster Ordnung an die experimentell ermittelte Kurve (Abbildung 2.4) erhält man die konzentrationsabhängigen Ratenkonstanten k_{obs} . Nach $k_{obs} = k_a[S]_0 + k_d$ kann durch Auftragung einzelner Konzentrationen gegen k_{obs} über lineare Regression die Steigung der Geraden (k_a) und der Achsenabschnitt (k_d) bestimmt werden. Die Konstanten k_{obs} und Γ_{GG} können

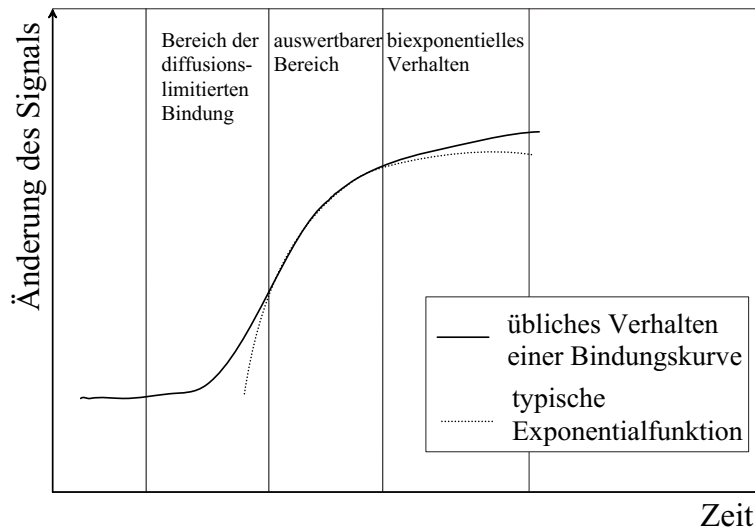


Abbildung 2.5: Auswertbarer Bereich der Assoziation bei einer Kinetikbindungskurve.

aus der Kurvenanpassung an die experimentellen Kurven ermittelt werden [54]. Nach HÄNEL [32] ist die korrekte Auswahl des auswertbaren Bereiches bei der Anpassung entscheidend, denn nicht der gesamte Bereich der Assoziation eignet sich für die Auswertung (Abbildung 2.5). Nur der mittlere Abschnitt im experimentell ermittelten Graph ist sinnvoll auswertbar, da im Anfangsbereich diffusionslimitierte Bindung vorherrscht, d.h. der Transport zur Oberfläche der langsamste Schritt ist. Im hinteren Kurvenbereich zeigt die Kurve ein bixponentielles Verhalten, das Substrat bindet hier sichtbar auch an schlechter zugängliche Bindungsstellen und eine andere Assoziationsratenkonstante überlagert die zu untersuchende. Die Dissoziationskonstante k_d ist aus der Assoziationsphase der Bindungskurve extrapolierbar, jedoch ist eine ermittelte Konstante aus den Dissoziationskurven genauer. Nach Gleichung

$$\Gamma(t) = \Gamma_{GG} e^{-k_d t} \quad (2.10)$$

ist im exponentiellen Abfall der Dissoziation nur noch eine Zeitkonstante ausschlaggebend. Zu beachten ist jedoch, dass eine Rückbindung bereits dissoziierter Teilchen an die Oberfläche den Wert verfälschen kann. Eine völlig korrekte Aussage kann über k_d nur dann gemacht werden, wenn die Rückbindung - zum Beispiel durch kompetitive Binder - vollständig verhindert wird.

2.2.2.2 Diffusionslimitierte Bindung an die Oberfläche

Im Grenzfall der diffusionslimitierten Bindung von freiem Substrat mit dem immobilisierten Rezeptor gilt bei einer gerührten Lösung oder im Fluss das 1. FICKSche Gesetz

$$\frac{dn}{dt} = -D \frac{dn}{dx} = -D \frac{c_0 - c}{\delta}, \quad (2.11)$$

welches besagt, dass der Massentransport dn/dt an die Oberfläche direkt dem Konzentrationsgradienten dn/dx proportional ist, wenn von einer konstanten NERNSTschen Diffusionsschicht δ ausgegangen wird. Geht man davon aus, dass das Substrat sofort mit der Oberfläche reagiert, wenn es dort angelangt ist, dann gilt auch

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = \frac{D}{\delta} [S]_0. \quad (2.12)$$

Das bedeutet einen linearen Anstieg der Oberflächenbeladung, wobei die Steigung vom Diffusionskoeffizienten und von der Dicke der Diffusionsschicht und damit von der Flussrate abhängt. Da die Hybridisierungsreaktion an einer Oberfläche stets schlechter ist als in Lösung [59], ist zu klären, wie diese Signale verstärkt werden können. Tabelle 1.1 zeigt diverse Einflüsse auf die Eigenschaften eines Sensor-Arrays. Betrachtet man Signaldynamiken² unterschiedlicher Biosensoren, so befinden sich diese im Bereich von $10^0 - 10^8$. Je nach Art der Markierung der zu detektierenden Moleküle ist eine Signalverbesserung zwischen $10^0 - 10^5$ möglich. Der Erfahrung nach erbringt eine Verbesserung der Oberflächenchemie eine maximale Signalverstärkung zwischen $10^0 - 10^2$. Damit ist es logisch zuerst die entsprechende Methodik eines Sensors zu wählen bzw. zu verbessern, bevor man versucht die messbaren Signale über Marker zu verstärken und schließlich über Oberflächenchemie zu erhöhen.

Affinitätstitration

Bestimmt man die Gleichgewichtskonzentration von Substrat und Rezeptor, so kann man in flüssiger Phase die Affinitätskonstante der Wechselwirkung ermitteln. Die Festphasendetektion bietet die Möglichkeit, die spezifische Bindung einer der freien Komponenten an einer Oberfläche nachzuweisen. Detektiert man die Bindung des Substrats am immobilisierten Rezeptor, lässt sich dadurch die Konzentration des freien Substrats bestimmen [22]. Der Affinitätstitration liegt ein sog. Bindungshemmtest zugrunde. Ist die Bindungsrate der Konzentration an freien Substratmolekülen direkt proportional, so sind die Bindungskurven linear und ihre Steigung ist ein Maß für die Konzentration an Substrat (Abbildung 2.6). Aus dem Massenwirkungsgesetz

²Dynamischer Bereich des Signals. Bezogen auf den Detektor ist die Signaldynamik die Anzahl der unterscheidbaren Helligkeitsstufen, der Kontrast. In der Informationstechnologie wird die Signaldynamik in Dezibel dB angegeben, z.B. hat ein Magnetband einen Dynamischen Bereich von 55 dB .

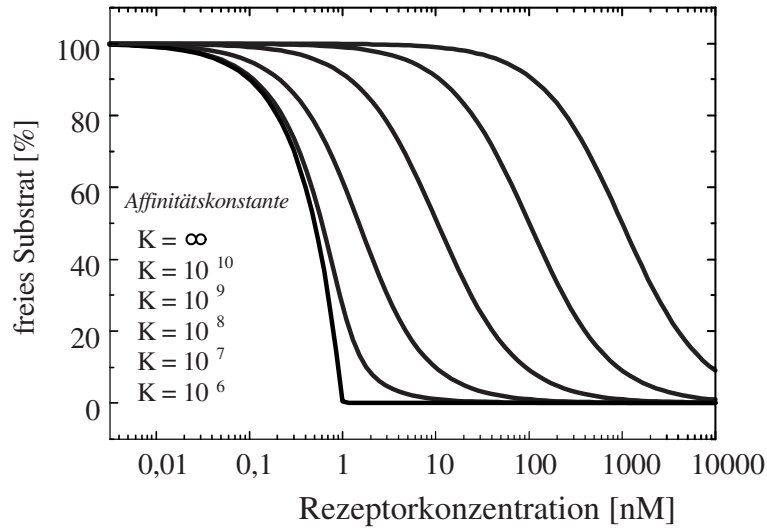


Abbildung 2.6: Konzentration des freien Substrats in Abhängigkeit der Rezeptorkonzentration bei verschiedenen Bindungskonstanten mit der Substratkonzentration $[S]_0 = 1 \text{ nM}$.

der Gleichgewichtsreaktion

$$K = \frac{[SR]}{[S][R]} = \frac{[SR]}{([R]_0 - [SR])([S]_0 - [SR])} \quad (2.13)$$

ergibt sich über eine quadratische Gleichung als einzig sinnvolle Lösung für die Konzentration an einwertigem Substrat mit freien Bindungsstellen mit $[S]_{bind} = [R]_0 - [SR]$

$$[S]_{bind} = \frac{[S]_0 - [R]_0 - \frac{1}{K}}{2} - \sqrt{\frac{([S]_0 + [R]_0 + \frac{1}{K})^2}{4} - [S]_0[R]_0}. \quad (2.14)$$

Aus dieser Gleichung ergibt sich, dass die Konzentration an freiem Substrat nur von der Ausgangskonzentration $[S]_0$ und $[R]_0$ sowie von K abhängt.

2.3 Modifizierung von Oberflächen

2.3.1 Methoden zur Oligonukleotid-Immobilisierung

Immobilisierungsstrategien kann man prinzipiell in zwei Bereiche klassifizieren [6]. Einen, in dem Oligonukleotide in situ immobilisiert und einen anderen in dem funktionalisierte Oligonukleotide kovalent an die Oberfläche gebunden werden. Abbildung 2.7 stellt die Klassifizierung grafisch dar.

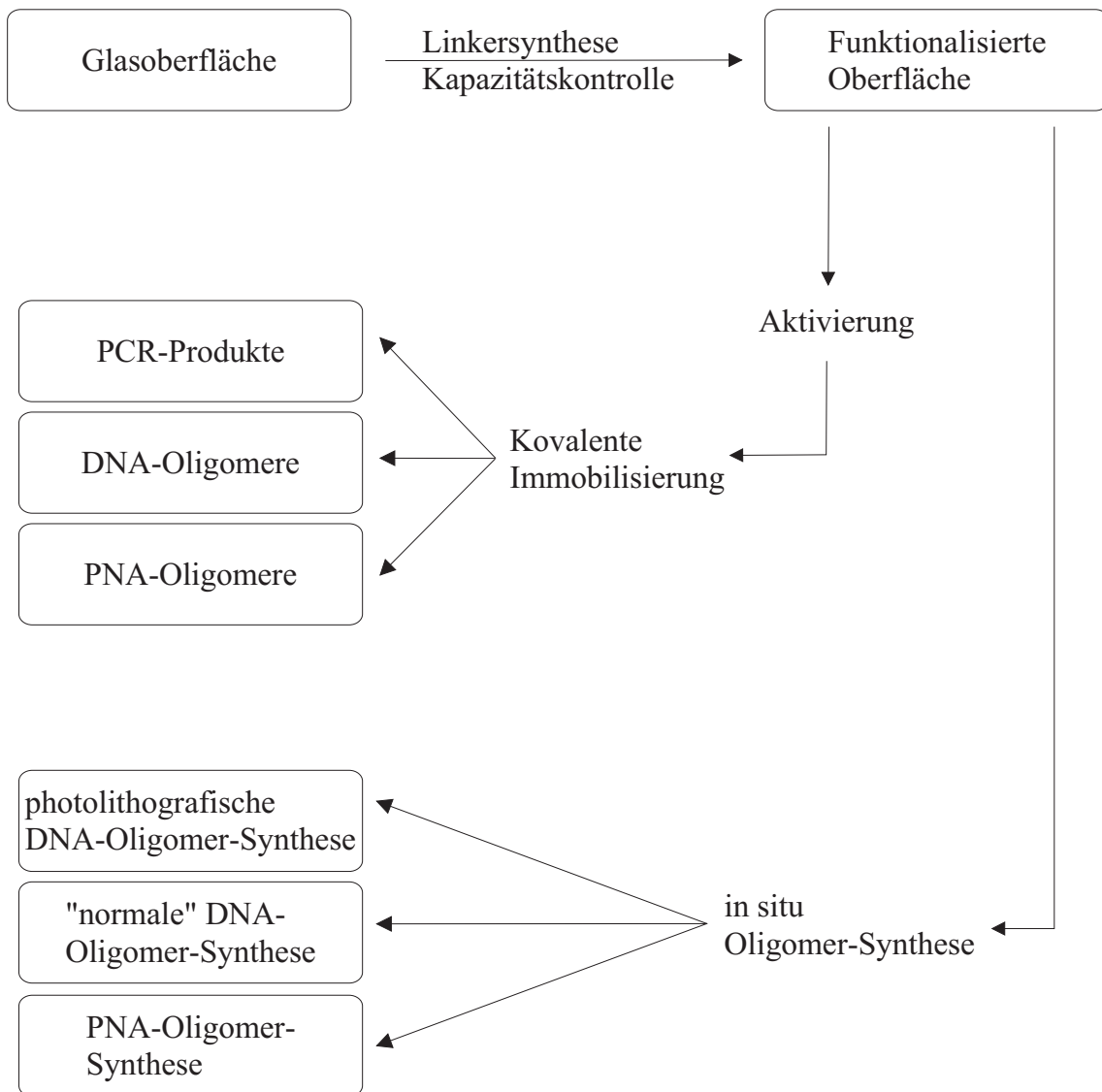


Abbildung 2.7: Mögliche Strategien zur Immobilisierung von Oligonukleotiden [6].

2.3.1.1 Oligonukleotidsynthese in situ

Die Firma Affymetrix hat ein Verfahren entwickelt, mit dem man in situ Oligonukleotidsynthese für *high-density arrays* [4] betreiben kann. Dazu nutzt sie lichtempfindliche Schutzgruppen bei der Oligonukleotidsynthese. Diese werden selektiv entschützt, indem die zu schützenden Basen mit einer photolithographisch erzeugten Maske belegt werden. Um jeweils bei allen Positionen die Oligonukleotide um eine Base zu verlängern, werden vier Masken und entsprechend die Umsetzung mit den vier jeweiligen Basen benötigt.

2.3.1.2 Immobilisierung von vorsynthetisierten Oligonukleotiden

In allen Fällen dieser Art der Immobilisierung werden Oligonukleotide mit Linkermolekülen versehen. Die gängigsten sind:

- Amino-, Carboxy-, oder Thiolgruppen.
- Kopplung des Oligonukleotides mit einem Silan [41].
- Biotin als Anker für immobilisiertes Streptavidin.
- Immobilisierung durch Copolymerisation [63].

Für diese Arbeit wurden zur kovalenten Immobilisierung ausschließlich 5'-Aminofunktionalisierte Oligonukleotide benutzt. Diese reagierten mit entsprechend funktionalisierten, bereits immobilisierten Polymeren [57]. Zur Immobilisierung eignen sich besonders Polymere, da sie mit unterschiedlich funktionellen Gruppen darstellbar sind und sie die Glasoberfläche durch ihre räumliche Ausdehnung abschirmen. Dies verhindert unspezifische Wechselwirkungen mit der Oberfläche, z.B. durch Physisorption. Zur Anbindung des Polymers wird die Oberfläche mit Silan umgesetzt. Die dort freien Epoxidgruppen reagieren dann mit freien Aminogruppen des Polymers. Hauptsächlich werden zwei Polymere verwendet (Abbildung 2.8): Amino- oder Carboxymethyl-Dextran und Polyethylenglykol:

- Dextran zeichnet sich durch eine besonders gute Abschirmung der Oberfläche und eine hohe Polarität durch Hydratgruppen aus. Mit ihm wird eine hohe Beladungsdichte durch seine dreidimensionale komplexe Struktur erreicht.
- Polyethylenglykol weist geringere Beladungsdichten als Aminodextan auf, da es eine Monolage bildet, zeichnet sich jedoch im Vergleich zum Dextran durch eine bessere Abschirmung der Oberfläche aus. Die Oberfläche wird durch die senkrecht stehende Anordnung des Polymers nahezu vollständig abgeschirmt [58].

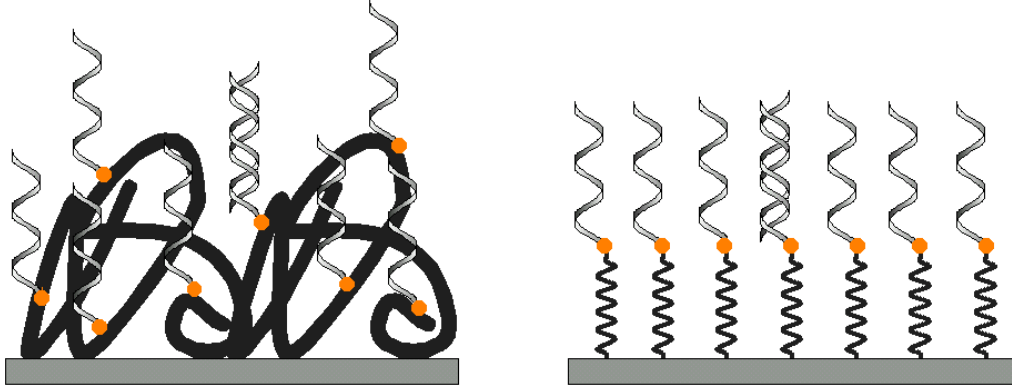


Abbildung 2.8: Vergleich der Polymere Dextran und Polyethylenglycol auf einer Oberfläche.

2.4 Grundlagen der Optik

2.4.1 Optik dünner Schichten

Betrachtet man dünne, planparallele Schichten, so tritt über kurze Distanzen, d.h. innerhalb der Kohärenzlänge auch kurzkohärenter Lichtquellen (thermische Strahler), Mehrfach-Reflexion auf [11]. Die Überlagerung zweier Wellen ergibt sich durch die vektorielle Addition der Feldstärken. Bei Strahlung mit wechselnder Phasenbeziehung oder unterschiedlicher Wellenlänge (inkohärentem Licht) mitteln sich die Überlagerungseffekte mit der Zeit, und es ergibt sich als Resultat die Summe der Teilstrahlintensitäten. Haben die Wellen diesselbe Wellenlänge und eine feste Phasenbeziehung, spricht man von kohärentem Licht, und es ergeben sich Interferenzeffekte, die auch im zeitlichen Mittel zu einer Intensitätsänderung führen können. Für die Reflexion an den Grenzflächen hinreichend dünner Schichten heißt dies, dass die resultierenden Teilstrahlen interferieren. Die Reflexionsvorgänge an einem einzelnen Film werden in Abbildung 2.9 schematisch dargestellt. Im folgenden werden für die Transmissions- und Reflexionskoeffizienten der elektrischen Feldstärken Kleinbuchstaben verwendet, wobei die Indizes jeweils die Koeffizienten der Grenzfläche zwischen den Medien beschreiben. Mathematisch wird dies beschrieben durch

$$r_{123} = r_{12} + t_{12}e^{i\beta}r_{23}e^{i\beta}t_{21} + t_{12}e^{i\beta}r_{23}e^{i\beta}r_{23}e^{i\beta}t_{21} + \dots \quad (2.15)$$

$$= r_{12} + \frac{t_{12}r_{23}t_{21}e^{2i\beta}}{1 - r_{12}r_{23}e^{2i\beta}} \quad (2.16)$$

$$t_{123} = \frac{t_{12}t_{23}t_{21}e^{i\beta}}{1 - r_{21}r_{23}e^{2i\beta}} \quad (2.17)$$

mit t_{123} für den Transmissionskoeffizienten der elektrischen Feldstärke und r_{123} für den Feldstärke-reflexionskoeffizient. Die Größe β charakterisiert den Phasenunterschied, den die Welle beim

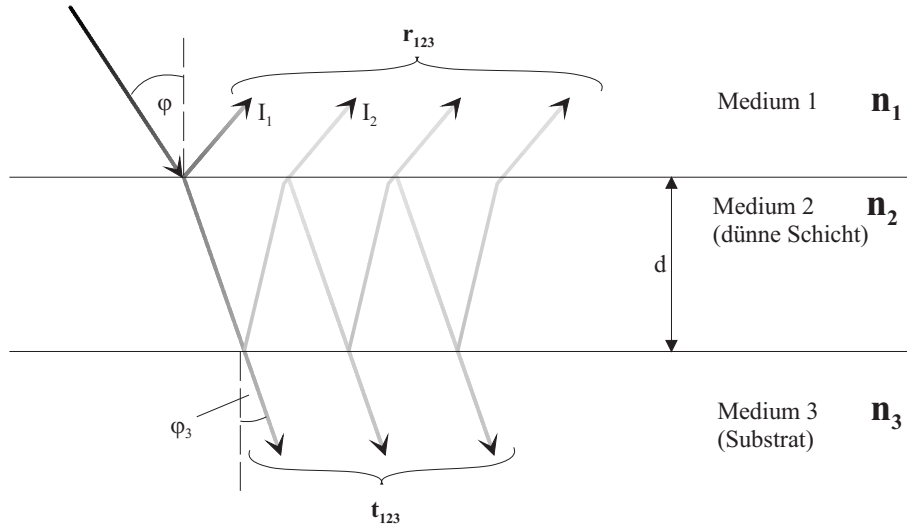


Abbildung 2.9: Dünne Schicht auf halbusendlichem Substrat.

einmaligen Schichtdurchlauf gegenüber ihrem Anfangswert erhält

$$\beta = 2\pi\nu d \sqrt{n_2^2 - \sin^2 \varphi}. \quad (2.18)$$

Bei absorbierenden Medien ist sie komplex. Bei geringer Reflektivität der beiden Grenzflächen vereinfacht sich die Beschreibung des Systems, da man für die Reflexion nur die ersten beiden reflektierten Teilstrahlen verwenden kann. Damit folgt dann für die Reflexion mit den reflektierten Intensitäten I_1 und I_2

$$I_R = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cdot \cos\left(\frac{4\pi n_2 d}{\lambda}\right). \quad (2.19)$$

Zur Behandlung von Mehrschichtsystemen finden sich weitere Verfahren in ANDERS [3], HEAVENS [28], KRAUS [40] und STENZEL [72]. Das Interferenzspektrum einer dünnen Schicht setzt sich zusammen aus der Interferenz der beiden Teilstrahlen, welche abwechselnd destruktiv und konstruktiv interferieren. Ein typisches Spektrum (Abbildung 2.10) weist alternierende Maxima und Minima auf. Für die Extremwerte im Interferenzspektrum gilt nach Gleichung 2.19, dass die Phasenverschiebung ein ganzzahliges Vielfaches von π sein muss. Damit folgt, falls kein Phasensprung auftritt, für das Auftreten eines Maximums

$$\frac{2nd}{\lambda} = 1, 2, 3, \dots \quad (2.20)$$

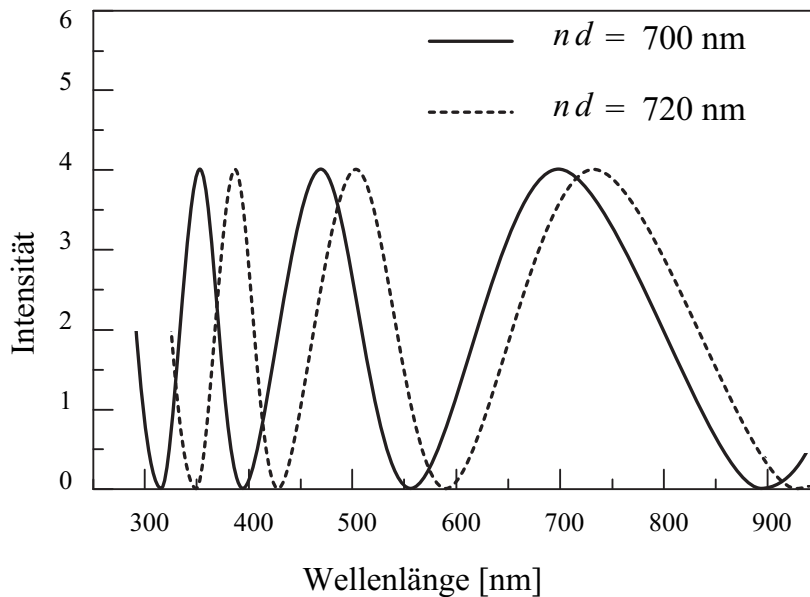


Abbildung 2.10: Reflexionsspektrum eines dünnen Films.

bzw. eines Minimums

$$\frac{2nd}{\lambda} = \frac{1}{2}, \frac{3}{2}, \frac{5}{2}, \dots \quad (2.21)$$

Bei einem Schichtsystem ohne Phasensprünge ergibt sich also das erste Minimum bei einem Wert des Quotienten von $\frac{1}{2}$. Das Ergebnis des Quotienten wird auch als Ordnungszahl m bezeichnet.

2.4.1.1 Bestimmung von Ordnungszahlen

Für benachbarte Extremwerte weist m einen Unterschied von $\frac{1}{2}$ auf. Damit kann die Ordnungszahl eines Extremwerts aus der Lage zweier Extremwerte und der Differenz ihrer Ordnungszahlen berechnet werden. Mit der Lage der Extremwerte λ_1 und λ_2 , sowie der Differenz der Ordnungszahlen $m_1 - m_2 = \Delta m$ ergibt sich für m_1 :

$$m_1 = \frac{\lambda_2 \cdot \Delta m}{\lambda_2 - \lambda_1} \quad (2.22)$$

Tatsächlich gilt Gleichung 2.22 nur für dispersionsfreie Systeme. Bei realen Systemen ist die Anwendbarkeit durch die Dispersion — d. h. die Änderung von n mit λ — eingeschränkt.

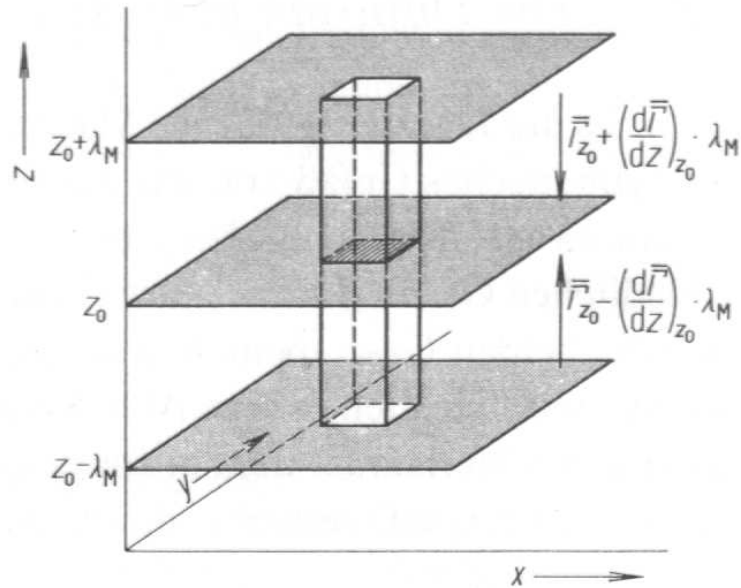


Abbildung 2.11: Beschreibung der allgemeinen Transportgleichung [78].

2.5 Grundlagen der Transporterscheinungen

2.5.1 Allgemeine Transportgleichung

Der Wärmetransport in Flüssigkeiten und Feststoffen spielt in dieser Arbeit eine große Rolle, da sich die Temperatur im Fließmittel und in den unterschiedlichen Materialien der Flusszelle ändert.

Allgemein beschreibt man einen Fluss in Richtung z des Gefälles von Transportgröße Γ durch die Ebene bei z_0 (Abbildung 2.11, Seite 19) durch folgende Gleichung

$$\vec{J}_\Gamma = -\frac{1}{2} \cdot {}^1N\bar{v}\lambda_M \left(\frac{d\bar{\Gamma}}{dz} \right)_{z_0}. \quad (2.23)$$

Das Minuszeichen berücksichtigt, dass der Fluss in Richtung des Gefälles von Γ erfolgt. 1N ist die Teilchenzahldichte, λ_M ist die mittlere freie Weglänge der Teilchen und \bar{v} ist ihre mittlere Geschwindigkeit.

2.5.2 Wärmeleitfähigkeit von Gasen

Wenden wir die allgemeine Transportgleichung auf die mittlere, durch ein Teilchen transportierte Energie \bar{U} an und ersetzen $\bar{U} = u/N_A$, so erhält man

$$\vec{J}_U = -\frac{1}{2} \cdot {}^1N\bar{v}\lambda_M \frac{1}{N_A} \left(\frac{du}{dz} \right)_{z_0}. \quad (2.24)$$

Daraus erhält man durch eine Einführung einer auf das Volumen bezogenen Wärmekapazität 1C_v

$$\vec{J}_U = -\frac{1}{2} \cdot {}^1C_v\bar{v}\lambda_M \left(\frac{dT}{dz} \right)_{z_0}, \quad (2.25)$$

bzw. den Wärmeleitfähigkeitskoeffizienten

$$\lambda = -\frac{1}{2} \cdot {}^1C_v\bar{v}\lambda_M. \quad (2.26)$$

Demnach ist der Wärmeleitfähigkeitskoeffizient direkt proportional zur Wärmekapazität pro Volumeneinheit, zur mittleren Teilchengeschwindigkeit \bar{v} und zur mittleren freien Weglänge [78].

2.5.3 Wärmeleitfähigkeit von Metallen

Behandelt man die Elektronen im Metall als freies Gas, so kann man für die Beschreibung der Wärmeleitfähigkeit von Metallen Gleichung 2.26 heranziehen. Nach klassischer Gastheorie hätten die Elektronen eine molare Wärmekapazität von $\frac{3}{2}R$, d.h. 1C_v hätte einen Wert von $\frac{3}{2}k^1N$. Erweitert man nun Gleichung 2.26 mit \bar{v} und ersetzt λ_M mit der elektrischen Leitfähigkeit, so erhält man für die Wärmeleitfähigkeit λ der Metalle

$$\lambda = -\frac{6}{\pi} \frac{k^2 T^1}{m \bar{v}_t} N. \quad (2.27)$$

2.5.4 Temperaturabhängigkeit der Diffusion in Flüssigkeiten

In kondensierter Phase weist die Diffusion eine große Temperaturabhängigkeit auf. Maßgebend dafür sind Platzwechselforgänge. Sie erfordern eine Aktivierungsenergie, so dass sie durch eine der ARRHENIUSschen Gleichung entsprechenden Beziehung

$$D = D_0 e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (2.28)$$

beschrieben werden kann.

2.5.5 Temperaturabhängigkeit der Viskosität in Flüssigkeiten

Einem Molekül in Flüssigkeit muss eine bestimmte Aktivierungsenergie E_a/N_A zugeführt werden, damit es sich umgebende Moleküle abstoßen kann. Aus einer speziellen Aussage des BOLTZMANNschen e-Satzes ist bekannt [78], dass die Zahl der Moleküle, die eine Mindestenergie E_a/N_A besitzen, proportional zu $e^{-\frac{E_a}{RT}}$ ist. Deshalb ist die Fluidität ebenfalls diesem Ausdruck proportional. Der Viskositätskoeffizient ist der Kehrwert der Fluidität. Für die Viskosität ergibt sich somit folgende Gleichung

$$\eta = Ae^{-\frac{E_a}{RT}}. \quad (2.29)$$

2.5.6 Akustische Oberflächenwellen

2.5.6.1 Prinzip

Bei akustischen Oberflächenwellen (OFW, *surface acoustic waves*, SAW) handelt es sich um Schallwellen, die sich bevorzugt entlang von Festkörperoberflächen ausbreiten.

Für die Ausbreitung von akustischen Wellen in Festkörpern ist die Elastizität von entscheidender Bedeutung. Läuft eine akustische Welle durch einen Körper, so schwingt jeder Punkt um seine Ruhelage, wobei die Auslenkung des Punktes durch einen Verschiebungsvektor \vec{u}_i beschrieben werden kann. Durch die Bewegung der einzelnen Teilchen, die den Körper aufbauen, wird eine Verformung hervorgerufen. Aus dieser Verformung und den daraus resultierenden Rückstellkräften kann in Verbindung mit dem Verschiebungsvektor \vec{u}_i eine Wellendifferentialgleichung aufgestellt werden. Unter Berücksichtigung der Randbedingungen kann die Lösung dieser Wellengleichung die Ausbreitung einer akustischen Welle beschreiben.

Die Ausbildung von Oberflächenwellen beruht auf der Tatsache, dass Festkörper an ihrer Oberfläche geringere Rückstellkräfte aufweisen als im Inneren. Somit ist die Schallgeschwindigkeit an der Oberfläche geringer als innerhalb des Festkörpers. Die akustische Welle wird an der Oberfläche geführt. Die Eindringtiefe der Oberflächenwelle in das Material entspricht dabei ungefähr ihrer Wellenlänge und nimmt nach Innen hin exponentiell ab. Abbildung 2.12 zeigt die Oberflächenverzerrung, die durch eine Oberflächenwelle hervorgerufen wird.

2.5.6.2 Erzeugung von Oberflächenwellen

Zur Erzeugung von Oberflächenwellen verwendet man üblicherweise interdigitale Schallwandler (*interdigital transducer*, IDT, Abbildung 2.12), die aus zwei kammartig ineinander greifenden Metallelektroden bestehen. Diese Elektroden bestehen aus Aluminium oder Gold und werden über photolithographische Verfahren auf piezoelektrische Substrate aufgetragen. Das Anlegen eines elektrischen Wechselfeldes zwischen diesen Elektroden bewirkt eine Deformation des Kri-

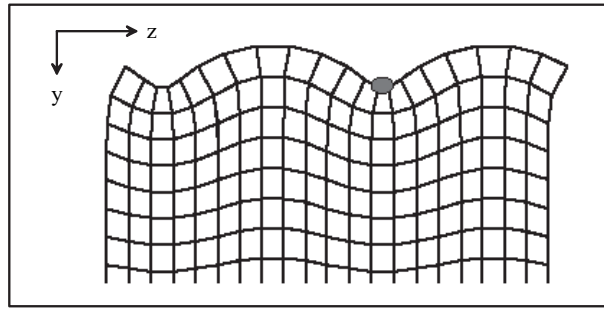


Abbildung 2.12: Oberflächenverzerrung einer sich in z -Richtung ausbreitenden Oberflächenwelle.

stalls unterhalb des IDT. Die Amplitude und Wellenlänge der OFW kann über die Transducer genau gesteuert werden. Im Fall der Resonanzbedingung

$$f = \frac{v_s}{\lambda} \quad (2.30)$$

überlagern sich diese Deformationen zu einer kohärenten Oberflächenwelle. v_s ist die Schallgeschwindigkeit eines bestimmten Kristallschnitts und λ die Wellenlänge, die durch die Periodizität des IDT vorgegeben wird. Ein zweiter IDT kann die Oberflächenwelle empfangen und wieder in ein elektrisches Signal zurückverwandeln. Diese Art von Signalverarbeitung im Hochfrequenzbereich (GHz -Bereich) wird vielfältig in der Kommunikationstechnik und in der chemischen Sensorik verwendet [81].

2.6 Mathematische Grundlagen der Signalverarbeitung

2.6.1 Faltung kontinuierlicher Funktionen

Die Faltung zweier eindimensionaler, kontinuierlicher Signale wird mathematisch durch folgende Definition beschrieben (siehe [12]):

$$y(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(\tau) h(t - \tau) d\tau = x(t) * h(t) \quad (2.31)$$

Die Funktion $y(t)$ wird als Faltungsprodukt der Funktionen $x(t)$ und $h(t)$ bezeichnet. Zur graphischen Auswertung werden die Funktionen $x(\$)$ und $h(\$)$ aus $x(t)$ und $h(t)$ gebildet, indem die Variable t durch $\$$ ersetzt wird. Die graphische Bestimmung des Faltungsintegrals wird durch folgende Schritte durchgeführt:

- *Spiegelung*: $h(-\$)$ erhält man durch Spiegeln von $h(\$)$ bezüglich der Ordinatenachse.

- *Verschiebung*: $h(t - \tau)$ wird durch Verschieben von $h(-\tau)$ um t gebildet.
- *Multiplikation*: Man multipliziert die Funktion $x(\tau)$ mit $h(t - \tau)$.
- *Integration*: Die Fläche unter dem Produkt $x(\tau)h(t - \tau)$ entspricht dem Faltungsintegral zum Zeitpunkt t .

2.6.2 Korrelation kontinuierlicher Funktionen

Die Korrelation zweier eindimensionaler, kontinuierlicher Funktionen ist nach OPPENHEIM [12] folgendermaßen definiert:

$$y(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(\tau) h(t + \tau) d\tau = x(t) \circ h(t) \quad (2.32)$$

Der Vergleich mit dem Faltungsintegral (Gleichung 2.31) zeigt, dass die beiden Ausdrücke in einem engen Zusammenhang zueinander stehen. Die graphische Auswertung der Faltung und der Korrelation wird in Abbildung 2.13 gezeigt. Der Unterschied zwischen beiden Funktionen besteht lediglich darin, dass bei der Berechnung der Korrelation keine Spiegelung von $h(\tau)$ erfolgt. Bild (a) zeigt die aus $x(t)$ und $h(t)$ gebildeten Funktionen $x(\tau)$ und $h(\tau)$. Die Multiplikation ist im Bild (b) dargestellt, wobei die schraffierte Fläche dem Faltungs- bzw. Korrelationsintegral zum Zeitpunkt t entspricht. Unterschieden wird die Korrelation in die Begriffe

- *Kreuzkorrelation*: Korrelation zweier getrennter Signale (z.B. $x(t)$ und $h(t)$).³ Die Werte der Kreuzkorrelation steigen mit der linearen Abhängigkeit der beiden Signale.
- *Autokorrelation*: Korrelation eines Signals mit sich selbst⁴. Die Autokorrelation gibt ein Maß für den inneren Zusammenhang eines Signals an.

Bei der normierten Korrelationsfunktion

$$c(i) = \frac{1}{\sqrt{E_x E_h}} x(t) h(t) \quad (2.33)$$

mit

$$E_x = \sum_{t=-\infty}^{+\infty} x^2(t)$$

$$E_h = \sum_{t=-\infty}^{+\infty} h^2(t)$$

wird um die Signalenergien E_x , E_h normiert, so dass die Korrelationsfunktion nur die Werte zwischen -1 und $+1$ annehmen kann. Wird von beiden Signalen der jeweilige Mittelwert

³Auch KKF für Kreuzkorrelationsfunktion genannt.

⁴Abtasten entfällt, wenn das Signal bereits in digitaler Form vorliegt.

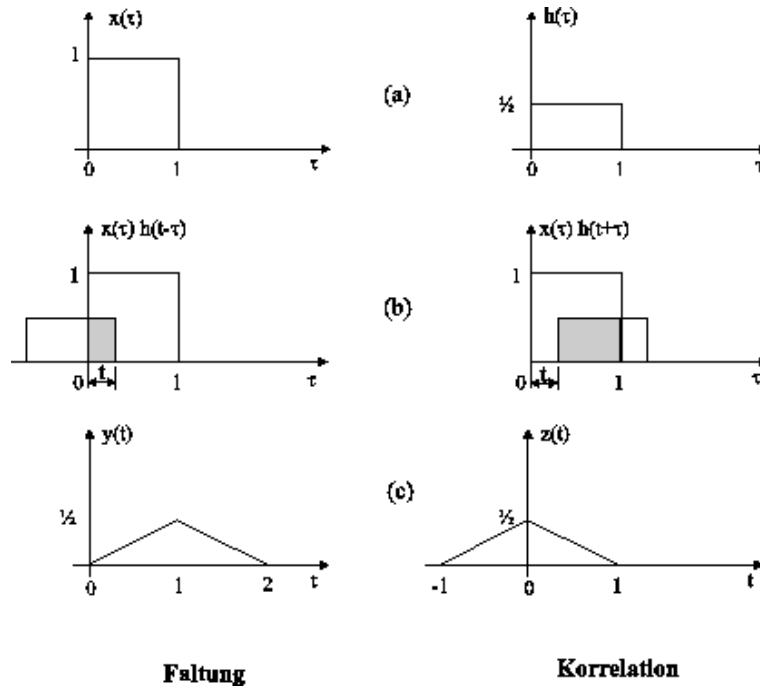


Abbildung 2.13: Vergleich Faltung und Korrelation.

(oder Erwartungswert) subtrahiert, so führt dies zu einer weiteren Normierung. Die aus diesen mittelwertfreien Signalen berechnete Korrelation wird auch Produktmomentenkorrelation genannt.

2.6.3 Korrelation diskreter Funktionen

Sind Signale zeitlich begrenzt, so werden die Funktionen $x(t)$ und $h(t)$ mit dem Intervall T abgetastet. Es wird angenommen, dass beide Abtastsignale periodisch sind mit der Periode N . Die diskrete Korrelation ist nur für periodische Funktionen definiert [12]:

$$z(kT) = \sum_{i=0}^{N-1} x(iT)h[(k+i)T] \quad (2.34)$$

Wenn die diskrete Korrelationsfunktion eine Approximation der kontinuierlichen Korrelationsfunktion liefern soll, muß die Periode N genügend groß gewählt werden, um den Überlappungseffekt zu vermeiden. Die Wahl der Periode N muß nach Gleichung 2.35 erfolgen:

$$N \geq P + Q - 1 \quad (2.35)$$

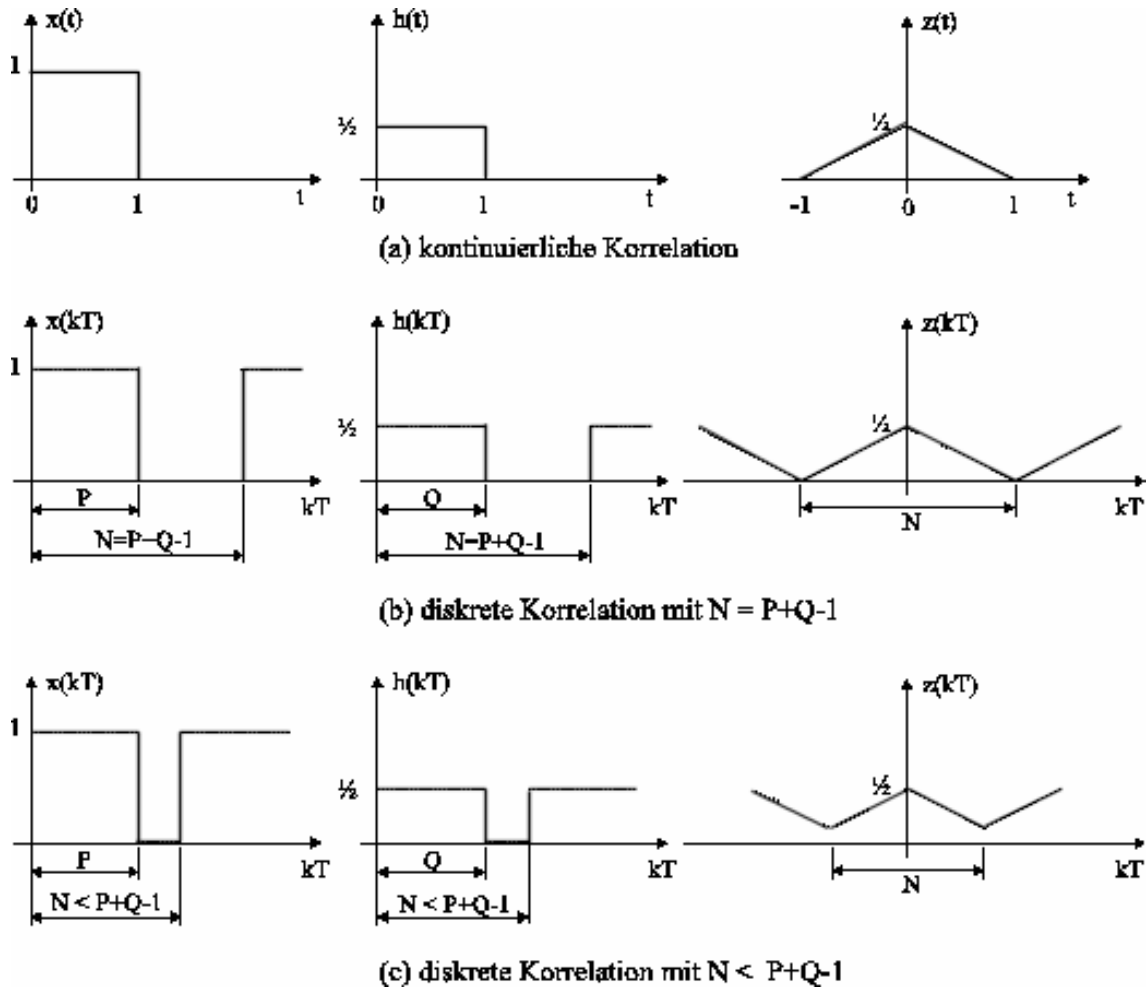


Abbildung 2.14: Vergleich von kontinuierlicher und diskreter Korrelation.

Abbildung 2.14 zeigt den Zusammenhang zwischen der kontinuierlichen und der diskreten Korrelation zweier zeitbegrenzter Signale. Der Überlappungseffekt, hervorgerufen durch eine zu kleine Periode N , ist in Bild (c) zu sehen. Für die Berechnung der normierten Kreuzkorrelationen aus diskreten Signalwerten, die mit jeweils T äquidistanten Messungen im Abstand N über die Stichprobenlänge vorliegen, kann die Schätzung nur an diskreten Stellen k vorgenommen werden und ist

$$\hat{c}_{xh}(k) = \left[\frac{1}{n-k-1} \sum_{t=1}^{n-k} (x_t - \bar{x})(h_{t+k} - \bar{h}) \right] \cdot \frac{1}{s_x \cdot s_h} \quad (2.36)$$

mit

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n x_i$$

$$\bar{h} = \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n h_i$$

$$s_x^2 = \sum_{t=1}^n (x_t - \bar{x})^2$$

$$s_h^2 = \sum_{t=1}^n (h_t - \bar{h})^2$$

wobei \bar{x} , \bar{h} der Mittelwert und s_x^2 , s_h^2 die Varianz der jeweiligen Messreihe ist.

2.6.4 Quanten- und Detektorrauschen

Systematisches und statistisches Rauschen. In jedem Signalniveau eines Detektors (unterhalb der Sättigung) ist neben einem eventuellen systematischen vor allem ein statistisches Rauschen vorhanden. Das statistische, auch fundamentale Rauschen genannt, rührt von der Partikelnatur von Licht und Materie her. Es kann, im Gegensatz zum systematischen Rauschen, durch keinen zusätzlichen Messaufwand (z.B. Referenzmessungen) beseitigt werden. Beim systematischen Rauschen ist im Gegensatz dazu das entsprechende Signalereignis mehr oder weniger offensichtlich mit einem anderen, äußeren Ereignis zeitlich korreliert und kann durch Referenzierung reduziert werden.

Umwandlungsprozesse. In der Regel durchläuft das Signal mehrere materielle Formen (Lichtquanten, elektrische Größen), bevor es beispielsweise durch einen AD-Wandler ausgewertet und dann *exakt* weiterverarbeitet werden kann. Mit jedem Umwandlungsprozess, bei dem das Signal eine Grenzfläche durchquert, wird sich das Signal um einen weiteren fundamentalen, d.h. statistischen Rauschbeitrag verschlechtern [35]. Deshalb wird im folgenden versucht, die Zusammenhänge näher zu erläutern, die am Ein- und Ausgang eines Detektors typischerweise auftreten.

2.6.4.1 Statistische Schwankungen am Detektoreingang

Die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Photon ein willkürlich herausgegriffenes Detektorelement (realisiert z.B. durch die *Pixel* eines CCD-Detektors) in der Bildebene trifft, sei P . Die Wahrscheinlichkeit, dass q von insgesamt N Photonen das Detektorelement treffen, ergibt sich nach der binomischen Formel zu:

$$P_q = \binom{N}{q} \cdot P^q \cdot (1 - P)^{N-q} = \frac{N!}{(N - q)!q!} \cdot P^q \cdot (1 - P)^{N-q}. \quad (2.37)$$

Die Zahl der auftreffenden Photonen folgt also der Binomialverteilung mit dem Mittelwert \bar{q} :

$$\bar{q} = \sum_{q=0}^N q \cdot P_q = N \cdot P \quad (2.38)$$

und der Varianz $\text{var } q$:

$$\text{var } q = \sum_{q=0}^N (q - \bar{q})^2 \cdot P_q = \bar{q} \quad (2.39)$$

Um die Wahrscheinlichkeit P zu bestimmen, mit der ein bestimmtes Detektorelement getroffen wird, ist eine große Anzahl N von Photonen nötig. Betrachtet man genügend kleine Detektorelemente, so ist die Wahrscheinlichkeit P für einen Treffer auf dieses Element ebenfalls sehr klein und die mittlere Anzahl $\bar{q} = N \cdot P$ der auftreffenden Photonen strebt gegen einen endlichen Grenzwert⁵. Unter diesen Voraussetzungen kann die Wahrscheinlichkeit P_q durch die Poissonverteilung

$$P_q \approx \frac{\bar{q}^q}{q!} e^{-\bar{q}} \quad (2.40)$$

angenähert werden. Dieses Verhalten der Photonen wird auch als *Photon-Shot-Noise* bezeichnet [60].

2.6.4.2 Statistische Schwankungen am Detektorausgang

In einem CCD-Halbleiterdetektor findet ein Umwandlungsprozess von einfallenden Photonen in ausgelöste Elektron-Loch-Paare statt. Man kann nicht davon ausgehen, dass eine definierte Anzahl Photonen q in immer genau dieselbe Menge Elektronen s umgesetzt wird. Nur im *Mittel* ist dieses Verhältnis, die sog. Quantenausbeute $QE = \frac{\bar{s}}{\bar{q}}$, konstant. Daher ist nicht nur die Zahl q der eintreffenden Photonen dem statistischen Rauschen unterworfen, sondern auch die Zahl der ausgelösten Elektronen s . Im folgenden wird versucht, eine Relation zwischen den mittleren Schwankungsamplituden von Ein- und Ausgang darzustellen.

Wenn die Zahl s der ausgelösten Ereignisse beim Auftreffen eines *einzelnen* Quants der Wahrscheinlichkeitsverteilung $w_1(s_1)$ folgt, und mehrere Quanten statistisch unabhängige Prozesse auslösen (keine Totzeit- oder Sättigungseffekte), so gilt mit \bar{s}_1 , der mittleren Zahl ausgelöster Elektronen bei $q = 1$ mit vernachlässigtem Untergrundsignal und der Varianz [31], [43]:

$$\bar{s} = \bar{s}_1 \cdot \bar{q} \quad ; \quad \text{var } s = \overline{(s - \bar{s})^2} = \bar{q} \cdot \text{var } s_1 + \bar{s}_1^2 \text{var } q \quad (2.41)$$

\bar{s}_1 kann dabei als mittlere Quantenausbeute interpretiert werden.

Die Verteilungsfunktion w_1 ist unter diesen Voraussetzungen kennzeichnend für den Detektor

⁵Das Detektorelement soll jedoch nicht zu klein sein, damit die mittlere Anzahl $\bar{q} = N \cdot P > 1$ bleibt.

und beschreibt seine *statistischen* Eigenschaften vollständig. Zu deren Herleitung werden die Wahrscheinlichkeit ε und zwei weitere Wahrscheinlichkeiten definiert: Die Wahrscheinlichkeit $P_{1 \rightarrow 1} = 1 - \varepsilon$, mit der der Detektor das einfallende Quant registriert, und $P_{1 \rightarrow 0} = \varepsilon$, mit der der Detektor das Quant „ignoriert“⁶. Der Index $X \rightarrow Y$ bezeichnet hierbei den Fall, dass X Photonen auftreffen, die dabei Y Elektronen auslösen. Der allgemeine Ausdruck $P_{k \rightarrow 0}$ ergibt sich aus der mehrfach wiederholten Ausführung von $P_{1 \rightarrow 0}$, also $P_{k \rightarrow 0} = P_{1 \rightarrow 0}^k$.

Gesucht ist die Wahrscheinlichkeit P_s^{aus} , mit der dieser Detektor s Ausgangsereignisse anzeigt, wenn er im Mittel von \bar{q} Quanten getroffen wurde und die Verteilung der einfallenden Quanten q durch die Poissonstatistik beschrieben wird. Zur Vereinfachung betrachten wir den Ansatz für die Wahrscheinlichkeit P_0^{aus} , mit der *kein* Ausgangssignal auftritt und P_1^{aus} , mit der *ein* Ausgangselektron auftritt. Analog wird mit P_n^{ein} die Wahrscheinlichkeit für das Auftreffen von n Quanten beschrieben und analog mit $P_{n \rightarrow 0}$ die Wahrscheinlichkeit, dass keines der n Quanten gezählt wird. Betrachtet man die Wahrscheinlichkeit P_0^{aus} , dass also kein Signal registriert wird, so werden die Einzelwahrscheinlichkeiten summiert, bei welcher überhaupt kein Photon auftritt (P_0^{ein}), bei welcher 1 Photon auftritt (P_1^{ein}) multipliziert mit der Wahrscheinlichkeit dass ein Photon *kein* Elektron auslöst ($P_{1 \rightarrow 0}$), bei welcher 2 Photonen auftreffen usw. Führt man diese Schritte analog für jede Zahl an Ausgangsereignissen s durch, so erhält man die diskrete Verteilung P_s^{aus} :

$$\begin{aligned}
P_0^{aus} &= P_0^{ein} + \sum_{n=1}^{\infty} P_n^{ein} \cdot P_{n \rightarrow 0} = P_0^{ein} + \sum_{n=1}^{\infty} P_n^{ein} \cdot P_{1 \rightarrow 0}^n \\
P_1^{aus} &= P_1^{ein} \cdot P_{1 \rightarrow 1} + \sum_{n=2}^{\infty} \binom{n}{0} P_n^{ein} \cdot P_{1 \rightarrow 0}^{n-1} \cdot P_{1 \rightarrow 1}^1 \\
&\vdots
\end{aligned} \tag{2.42}$$

$$\begin{aligned}
P_s^{aus} &= \sum_{n=s}^{\infty} \binom{n}{s} P_n^{ein} \cdot P_{1 \rightarrow 0}^{n-s} \cdot P_{1 \rightarrow 1}^s \\
&= \frac{((1 - \varepsilon) \bar{q})^s}{s!} \cdot e^{-\bar{q}} \sum_{n=s}^{\infty} \frac{n!}{(n - k)!} \cdot \frac{(\bar{q} \varepsilon)^{n-s}}{n!} \\
&= \frac{((1 - \varepsilon) \bar{q})^s}{s!} \cdot e^{-(1-\varepsilon)\bar{q}}
\end{aligned} \tag{2.43}$$

Vergleicht man dieses Ergebnis der Verteilung am Detektorausgang mit der Verteilung der einfallenden Photonen am Detektoreingang in Gl. 2.40, so erhält man wiederum eine Poisson-

⁶Die Fälle, in denen ein Ereignis mehrfach gezählt wird, also $P_{1 \rightarrow k}$ mit $k = 2, 3, \dots$, können aus Energieerhaltungsgründen außer Betracht gelassen werden.

verteilung mit Mittelwert und Varianz von Verteilung P_s^{aus} mit

$$\bar{s} = (1 - \varepsilon)\bar{q} \quad \text{und} \quad \text{var } s = \frac{\text{var } q}{1 - \varepsilon}. \quad (2.44)$$

Der Faktor $(1 - \varepsilon)$ kann im Vergleich mit Gl. 2.41 wiederum als die mittlere Einzelphotonenantwort (\bar{s}_1) interpretiert werden. Die Zahl der statistisch relevanten Ereignisse wird also um den Faktor $(1 - \varepsilon)$ reduziert, und das relative Rauschen am Ausgang wird um den Faktor $\sqrt{\frac{1}{1 - \varepsilon}}$ verstärkt.

Detection Quantum Efficiency (DQE). Während bei der QE die Ein- und Ausgangssignale in Relation gesetzt werden, werden bei der DQE die Schwankungen von Ein- und Ausgangssignal in Beziehung zueinander gesetzt.

Zunächst führt man das Signal-Rausch-Verhältnis $\text{SNR}_{id} = \frac{s}{\text{sdv } s} = \frac{q}{\text{sdv } q}$ für den Ausgang eines *idealen* Detektors ein; für den *realen* Detektor gilt analog (bezogen auf den *Eingang*) $\text{SNR}_{eq} = \frac{s}{\text{sdv } s} = \gamma \cdot \frac{q}{\text{sdv } q}$.

Die DQE, definiert durch den Quotienten der beiden quadrierten Signal-Rausch-Verhältnisse, ergibt sich dann nach HERMANN [31]:

$$DQE = \frac{\text{SNR}_{eq}^2}{\text{SNR}_{id}^2} = \gamma^2 \cdot \frac{\text{var } q}{\text{var } s} = \left(1 + \frac{\text{var } s_1}{\bar{s}_1^2}\right)^{-1} \leq 1 \quad (2.45)$$

Die DQE beschreibt die Abnahme der statistisch relevanten Ereignisse zwischen Ein- und Ausgang eines Detektors und steht mit ε durch $DQE = 1 - \varepsilon$ in Beziehung. Aus Gl. 2.45 folgt, dass das Verhältnis von Mittelwert und Schwankungsbreite der Einzelphotonenantwort minimal sein soll. Bezieht man den Untergrund s_B in $\text{var } s = \bar{q} \text{var } s_1 + \bar{s}_1^2 \text{var } q + \text{var } s_B$ mit ein, so erhält man [31]:

$$\begin{aligned} DQE &= \left(\left(1 + \frac{\text{var } s_1}{\bar{s}_1^2}\right) \cdot \left(1 + \frac{\text{var } s_B}{\bar{q}(\text{var } s_1 + \bar{s}_1^2)}\right) \right)^{-1} \\ &= DQE_{max} \cdot \left(1 + \frac{\text{var } s_B}{\bar{q}(\text{var } s_1 + \bar{s}_1^2)}\right)^{-1} \end{aligned} \quad (2.46)$$

Kleine Eingangssignale von \bar{q} führen zu einem ungünstig kleinen Wert der DQE, da sich dann der relativ hohe Untergrund s_B bemerkbar macht. Dies gilt ebenso für Signalwerte im Bereich der Sättigung, da hier γ gegen 0 geht.

Nur für den idealen Detektor gilt $DQE = 1$. Für den realen Detektor liegt sie unter 1. Für alle (Umwandlungs-) Prozesse, die ein fundamentales Rauschen beitragen, gelten die obigen

Überlegungen. Die gesamte DQE eines mehrstufigen Systems erhält man mit:

$$DQE_{ges} = \prod_{k=1}^N DQE_k \quad (2.47)$$

2.6.4.3 Weitere Rauschbeiträge eines CCD–Detektors.

Die oben angeführten Ausdrücke für die fundamentalen Schwankungen betreffen nur die Vorgänge innerhalb des Halbleiterdetektor-Kristalls. Je nach Aufbau des CCD–Detektors kommen noch folgende statistische Beiträge zum Gesamtrauschen hinzu, siehe z.B. [15]:

- **Ladungs-Transfer Rauschen.** Dieses Rauschen tritt auf beim Ladungstransfer aus der sensitiven Region in die Ausleseregister und ist stark von der jeweiligen Architektur des Chips abhängig.

$$\sigma_{CTE} = \sqrt{2 \cdot \eta_{CT} \cdot N_{Paket}} \quad (2.48)$$

mit η_{CT} als Ladungstransfer–Effizienz.

- **Trapping-Rauschen.** Dieses Rauschen wird durch die *Trapping Emissions* an Grenzfläche und innerhalb des Festkörpers erzeugt und ist vom jeweiligen Leitungstransport abhängig.

$$\sigma_T = \sqrt{M \cdot k \cdot T \cdot A_d \cdot N_{SS} \cdot \ln 2}, \quad (2.49)$$

wobei M die Gesamtzahl der Transferprozesse und N_{SS} die Gesamt-Zustandsdichte, gemittelt durch Grenzfläche und Volumen, ist. A_d ist die Pixelfläche.

- **Rauschen des Dunkelstroms.** Im Halbleiter tritt bei Temperaturen $T > 0 K$ ein thermisch generierter Dunkelstrom auf. Dieser Strom schwankt fundamental um seinen Mittelwert mit:

$$\sigma_d = \sqrt{\frac{J_d \cdot t_i \cdot A_d}{q_e}} \quad (2.50)$$

J_d : Stromdichte des Dunkelstroms, t_i : Integrationszeit und der Elementarladung q_e .

- **Thermodynamisches Rauschen.** Dieser Beitrag wird hervorgerufen durch die prinzipielle Ungenauigkeit, mit der das *Floating Gate* während des Umwandlungsvorgangs des Ladungspakets in einen Spannungswert geladen ist. Dies kann durch besondere Techniken⁷ reduziert werden.

$$\sigma_{KTC} = \sqrt{\frac{k \cdot T \cdot C_0}{q_e^2}} \quad (2.51)$$

⁷Durch *Correlated Double Sampling* [74] oder *Probability Density Function* [7].

mit der *Floating Gate*-Kapazität C_0 .

- **Verstärkerrauschen** des Verstärkers unmittelbar vor der Ausleseinheit.

$$\sigma_{Amp} = \sqrt{\frac{C_L^2}{q_e^2} \cdot \frac{8 \cdot kT \cdot \Delta f}{3 \cdot g_m}} \quad (2.52)$$

mit der Eingangskapazität C_L , der Bandbreite Δf und des Eingangsleitwerts g_m .

- **Quantisierungsrauschen.**

$$\sigma_{Quant} = \begin{cases} \frac{Q}{\sqrt{12}} \approx 0.29 \cdot Q & , \text{ falls } \sigma \geq \frac{Q}{2} \\ \frac{Q}{2} & \text{sonst.} \end{cases} \quad (2.53)$$

mit der Größe der Quantisierungsstufe Q [35].

2.6.4.4 Das Signal-Rausch-Verhältnis im Gesamtsystem

Das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) repräsentiert allgemein das Verhältnis $SNR = \frac{S}{\sigma}$ von Signal S und Rauschen σ . Das gesamte statistische Rauschen errechnet sich für den Fall, dass jeder Einzelbeitrag als normalverteilt angenommen werden kann, wie folgt:

$$\sigma_{ges} = \sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2 + \sigma_3^2 + \dots} \quad (2.54)$$

Je nach Herkunft unterscheiden sich die Signal-Rauschverhältnisse in ihren Charakteristiken abhängig von der Signalintensität. Dabei unterscheidet man zwischen dem *Poisson*-, dem *Flicker*- und dem *Grund-Rauschen* [35].

1. Das Poissonrauschen (auch *fundamentales*-, *Schottky*- oder *Quanten*-Rauschen) tritt immer dann auf, wenn ein Strom durch eine Grenzfläche fließt oder an ihr entsteht (s. Abschn. 2.6.4) und ist ein Resultat der Teilchennatur von Licht und elektrischer Ladung; es zeigt das Verhalten:

$$\sigma \propto \sqrt{S} \Leftrightarrow SNR \propto \sqrt{S} \quad (2.55)$$

2. Das Flicker-Rauschen (auch *nicht-fundamentales* Rauschen) wird nicht von fundamentalen Prinzipien abgeleitet, sondern kann nur empirisch festgestellt werden. Unter diesem Begriff werden alle Schwankungserscheinungen zusammengefaßt, die sich wie

$$\sigma \propto S \Leftrightarrow SNR = \text{const} \quad (2.56)$$

verhalten.

Typische Beispiele dafür sind Fluktuationen in der Transmission eines Messobjektes, Intensitätsschwankungen einer Lampe durch elektrische Störungen oder mechanische Instabilitäten in einem optischen Aufbau.

3. Das **Grundrauschen** ist immer mit gleicher Höhe unabhängig von der Signalintensität präsent (z.B. das Dunkelrauschen auf S. 30)

$$\sigma = \text{const} \Leftrightarrow \text{SNR} \propto S \quad (2.57)$$

Während das Rauschen nach **1.** durch keine Maßnahme als durch Erhöhung der eingesetzten Intensität (leistungsstärkere Lichtquelle, Optik mit höherem Licht-Durchsatz) reduziert werden kann, können die Rauschtypen nach **2.** und **3.** durch Geräteoptimierungen reduziert werden. Je nach Dominanz einer der Rauschtypen im Gesamtrauschen in Gleichung 2.54 unterscheidet man zwischen einem *poissonlimitierten* oder *nicht-poissonlimitierten* System. Im poissonlimitierten System sind die gerätetechnischen Rauschquellen (Typen **2.** und **3.**) soweit reduziert, dass sie sich nicht mehr oder kaum messbar auswirken gegenüber dem Rauschen nach Typ **1.** In den in Abschnitt 2.6.4.3 auf Seite 30 aufgeführten Rauschquellen sind all diejenigen von fundamentalem Charakter, in welchen unter der Wurzel ein dem Endsignal proportionaler Faktor auftritt: etwa das N_{Paket} in σ_{CTE} ; die übrigen machen sich als Grundrauschen oder Flicker-Rauschen bemerkbar. Das Rauschen eines Systems kann je nach Dominanz einer dieser Charakteristiken klassifiziert werden. Es wird allgemein bei der Entwicklung von Messsystemen die Poissonlimitierung angestrebt.

Kapitel 3

Material, Geräte und Methoden

Ein schlechter Plan materialisiert sich selten, ein perfekter nie.

ANDRZEJ MAJEWSKI

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

- Standard(bio)chemikalien stammten, sofern im folgenden nicht anders angegeben von Fa. Fluka Neu-Ulm; Fa. Merck, Darmstadt oder Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen.
- 3-Glycidyloxypropyl-trimethoxysilan (GOPTS) wurde von der Fa. Fluka, Neu-Ulm erworben.
- Diisopropylcarbodiimid (DIC) wurde von der Fa. Fluka, Neu-Ulm erworben.
- Aminodextran 260/10 (AMD), hergestellt nach PIEHLER [57], wurde von Herrn MEHNE bereitgestellt.
- Carboxymethyldextran (CMD), MW = 200000 *Da* und 1,4 Carboxyfunktionen / Dextranbaustein, wurde von Analytik Jena AG bereitgestellt.
- 2-Chlor-6-Isopropylamino-1,3,5-Triazin-2-(6'-amino)hexansäure (Atrazincapronsäure, ACA), hergestellt nach WELLER [80], wurde von Herrn Dr. STEMMLER [71] überlassen.
- Die Polyethylenglykole Diaminopolyethylenglykol DA-PEG und Dicarboxypolyethylenglykol DC-PEG wurden von der Firma Rapp Polymere, Tübingen, bezogen.
- (+)-Biotinhydrazid wurde von der Fa. Fluka, Neu-Ulm, bezogen.

- Interferenzschichten, bedampft mit 9,8 nm Nb₂O₅ und 330 nm SiO₂ auf *Corning1737* Glassubstrat wurden von Fa. Unaxis Balzers Ltd., Liechtenstein erworben.

3.1.2 Lösungen

- PBS = *phosphate buffered saline*, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung: 8,76 g (150 mmol) NaCl und 1,36 g (10 mmol) KH₂PO₄ wurden mit bidestilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt und mit 2 M KOH auf *pH* = 7,4 titriert.
- Piranha ist eine Mischung aus 60 Vol.-% H₂SO₄ (96%ig) und 40 Vol.-% H₂O₂ (30%ig).
- Hepes-Puffer besteht aus 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,005 Vol.-% Tween 20 eingestellt auf *pH* = 7,4.
- Als Regenerationslösung wurde entweder eine HCl-Lösung bei *pH* = 1,5 oder einem modifizierten Hepes-Puffer, welcher auf *pH* = 1,5 eingestellt wurde.

3.2 Geräte

3.2.1 Aufbauten für Einzelplatz-Detektoren

- Küvettenpektrometer Spekol 1100 (Analytik Jena AG), modifiziert nach SCHMITT [68] mit Polymerlichtleiter (PMMA), 1 mm Durchmesser mit 1 auf 2 Faserkoppler von MicroParts, Dortmund und 5 V/10 W Halogenlampe mit integriertem Reflektor (Oshino Lamps, Nürnberg).
- Hamilton Dilutor Microlab 541C und Ventilsteuerung MVP mit 1 – 8-Wege-Ventil von Hamilton Deutschland, Darmstadt.
- ASIA FIA und Autosampler von Ismatec, Wertheim-Mondfeld.
- ProLiquid RfS-Temperaturregler der Firma ProLiquid, Überlingen. Es enthält einen PID-Temperaturregler Typ 2132 (K-Type). Das Heizelement besteht aus einem Heizleiter des Materials 1NcAc05 mit dem Außendurchmesser 0.5mm. Das Stellglied ist ein Solid-State-Relais RSDA mit Gleichspannungsansteuerung und einer Sprungantwort < 10 ms. Der Heiztransformator hat folgende Parameter: Ringkern, 225 VA, 230 Volt, 2 × 18 Volt mit 6.25 A maximal. Der Aufbau ist Abbildung 3.5 auf Seite 44 zu entnehmen. Um eine korrekte Temperatur in der Messzelle zu gewährleisten, ist die Kallibration der Tabelle 3.2 auf Seite 44 zu berücksichtigen.

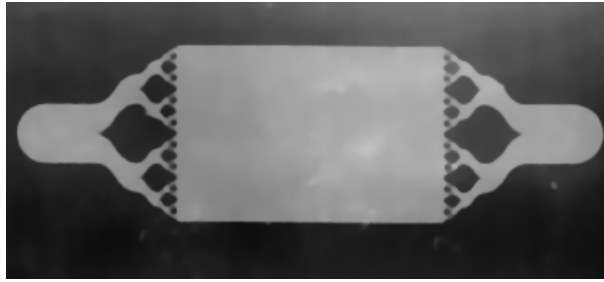


Abbildung 3.1: Unterseite der PDMS-Flußzelle.

- MMS-Diodenarray, Sonderserie mit Diodenarray von Hamamatsu 128 Pixel à $50 \times 2500 \mu m^2$, Carl-Zeiss, Oberkochen.

3.2.2 Aufbauten für parallel miniaturisierte Detektoren

3.2.2.1 MiniRIfS (1. Generation)

- Siehe Diplomarbeit M. SAUER [67].

3.2.2.2 MiniRIfS (2. Generation)

- Siehe Dissertation A. JUNG [39].
- Das Filterrad hat eine minimale Umdrehungszeit von $17,72 U/s$, was $2,53 s/Filter$ entspricht.

3.2.2.3 MiniRIfS (3. Generation)

- CCD-Kamera SensiCam, SuperVGA von der Firma PCO AG, Ser.Nr. 370 KL 1734 mit Hardwareboard 520 KP 1758.
- Schmale Bandpass Interferenz-Filter NT43-1xx von Edmund Optics der Wellenlänge $620 nm$, $656 nm$, $694 nm$, $730 nm$, $760 nm$, $800 nm$, $852 nm$.
- Optische Bänke, Linsen, Prismen usw. stammen von LINOS Photonics GmbH in Göttingen.
- Als Flußkammer wurde aus Polydimethylsiloxan (PDMS) vom Bremer Institut für Angewandte Strahlentechnik (BIAS) eine Zelle geformt [73]. Diese Zelle wurde im Rahmen des BMBF-Projektes **Gensensorik** produziert und stand mit der Flußkanaltiefe $100 pm$ bzw. $150 pm$ zur Verfügung (siehe Abbildung 3.1).

- Als Lichtquelle wurde das Standardmikroskoplampengehäuse HAL 100 mit Kollektorlinse (Brennweite 23,2 mm), Rückspiegel, Lampenfassung und Wärmeschutzfilter (Best.-Nr.: 447217 0000 000) mit Beistellnetzteil 12 V DC 100 W, stabilisiert (Best.-Nr.: 000000 1128 574) Halogenlampe 12 V 100 W [Sockelbezeichnung GY 6,35 bei Osram] (Best.-Nr.: 380079 9540 000) der Firma Zeiss AG in Göttingen genutzt.
- Unterschied zur 2. Generation:
 - Verdrehte Spiegelachse des Referenzstrahlenganges durch Dove-Prisma (Best.-Nr.: 330045) behoben.
 - Bei der 0°- (Interferenzspektrum mit einer SiO₂-Dicke von 600 nm s. Abb. 3.2) und 45°-Variante wurde der Referenzstrahlengang eliminiert. Schematisch ist der Simplex-Aufbau in Abbildung 3.6 und der 45°-Aufbau in Abbildung 3.7 dargestellt.
 - Das Filtrerrad ist vom Optischen Trägergerüst entkoppelt.

3.2.2.4 StereomikroskopRIfS (4. Generation)

- Als Basis dieses Gerätes wurde ein Stereomikroskop (Schematischer Aufbau siehe Abbildung 3.3; Quelle [13]) der Firma Leica Mikrosysteme GmbH genutzt:
 - Optikträger MZ 12,5 (Best.-Nr. 10 446 370)
 - Objektiv Planapochromat 0.63x (Best.-Nr. 10 447 051)
 - Mikroskopträger (Best.-Nr. 10 445 617)
 - Fokussiertrieb grob/feinmanuell, Säule 300 mm (Best.-Nr. 10 447 106)
 - Auffichtbasis (Best.-Nr. 10 445 631)
 - Video-/Fototubus HU (Best.-Nr. 10 446 174)
 - Video-/Fototubus A (Best.-Nr. 10 445 925)
 - Video-/Fotoobjektiv 1.0x (Best.-Nr. 10 445 930)
 - C-Mount-Adapter 1,0x (Best.-Nr. 11 541 006)
- Als Lichtquelle dienten Leuchtdioden und entsprechende Hochleistungsreflektoren der Bauserie LXHL-Lxxx von Luxeon. Geordert wurden diese bei der Firma Diana Electronics in Waiblingen. Diese LEDs haben nach Herstellerangaben eine Breite von 15 nm. Ermittelte Ansprechspannung und Integrationszeiten der LEDs sind in Tabelle 3.1 vermerkt.

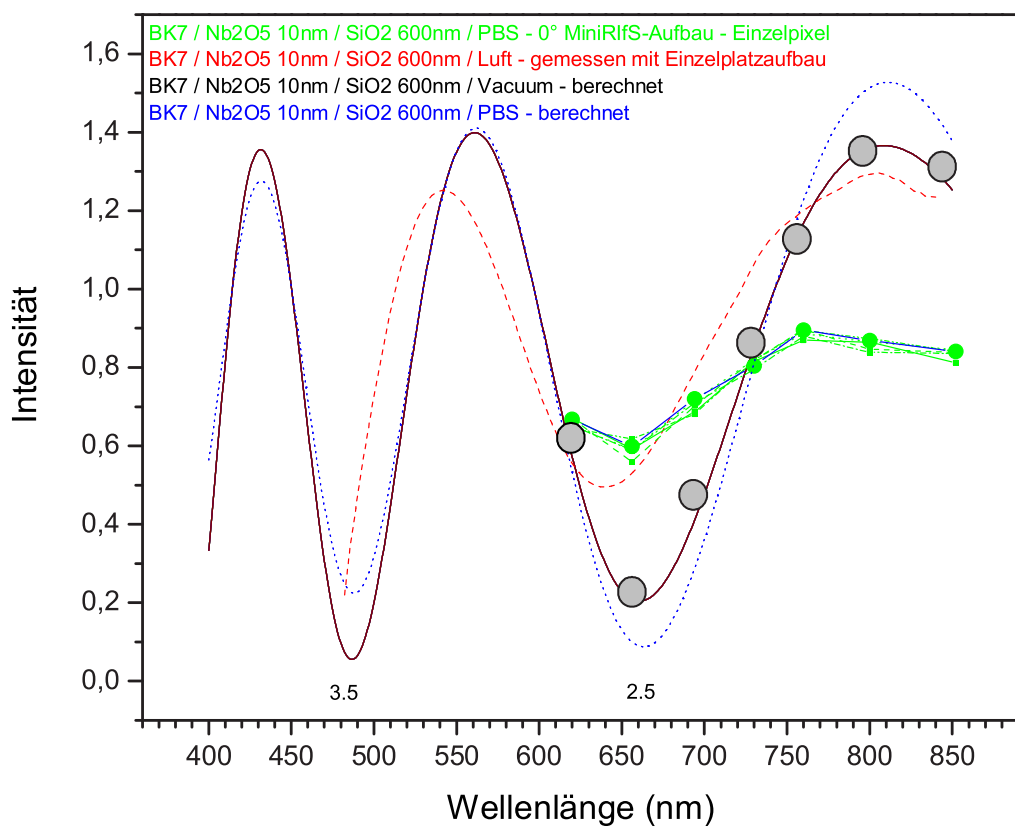


Abbildung 3.2: Interferenzspektrum des 0° MiniRIFS-Systems der 3. Generation. Standardabweichung des Rauschens $4,68 \pm 1,16 \%$ $_{100\%Signalhub,1 \times 1Pixel}$.

Wellenlänge [nm]	Leistung [W]	Spannung bei 10 mA	Spannung [V]	Strom [mA]	Integrationszeit [ms]
455	5	5,4 V	6,8	600	6
470	5	5,1 V	6,3	600	10
505	5	1,9 V	3,5	600	13
530	5	4,4 V	6,5	600	7
590	1	2,7 V	3,3	350	52
625	1	1,7 V	2,7	350	4

Tabelle 3.1: Ansprechspannung und Integrationszeit auf CCD-Chip der LEDs.

- Für die Lichteinkopplung wurde eine Sonderanfertigung der Firma Schott Glas (Abt. Fibre Optics) genutzt. Es wurde direkt in einen Strahlengang des Mikroskops eingekoppelt und kein optischer Koaxial-Anschluß verwendet. Der genutzte Lichtleiter war ungemischt, hatte einen Eingangsdurchmesser von 6 *mm* und einen Ausgangsdurchmesser von 15 *mm*.
- Im Vergleich zum Aufbau der 3.ten Generation wurde keine Monochromator verwendet, weshalb die LEDs als sequentielle Lichtquelle dienten. Aus diesem Grund wurde zwischen Lichtleitereinkopplung und LEDs ein Shutterrad angebracht, welches über eine Photodiode die Triggerschaltung der CCD-Kamera steuert. Die Möglichkeit den Strom der LEDs sequentiell zu schalten minimiert zwar den mechanischen Aufwand, sorgt aber optisch für eine Rotverschiebung der LEDs im Laufe der Zeit. Dies liegt an der thermischen Gleichgewichtseinstellung der LEDs. Da eine spektrale Stabilität einer mechanischen vorzuziehen ist, wurde das Shutterrad installiert.

3.2.3 Laborgeräte

- Verschiedene Kolbenhubpipetten von Eppendorf, Hamburg.
- *pH*-Meter CG 843 von Schott, Mainz.

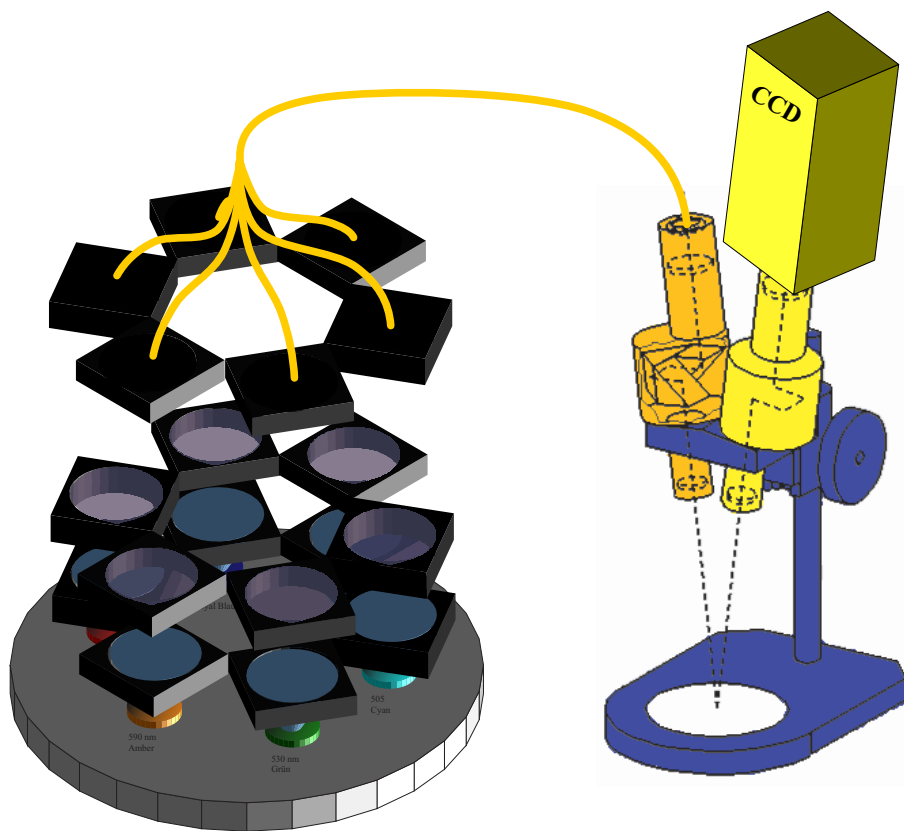


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau des Stereomikroskops.

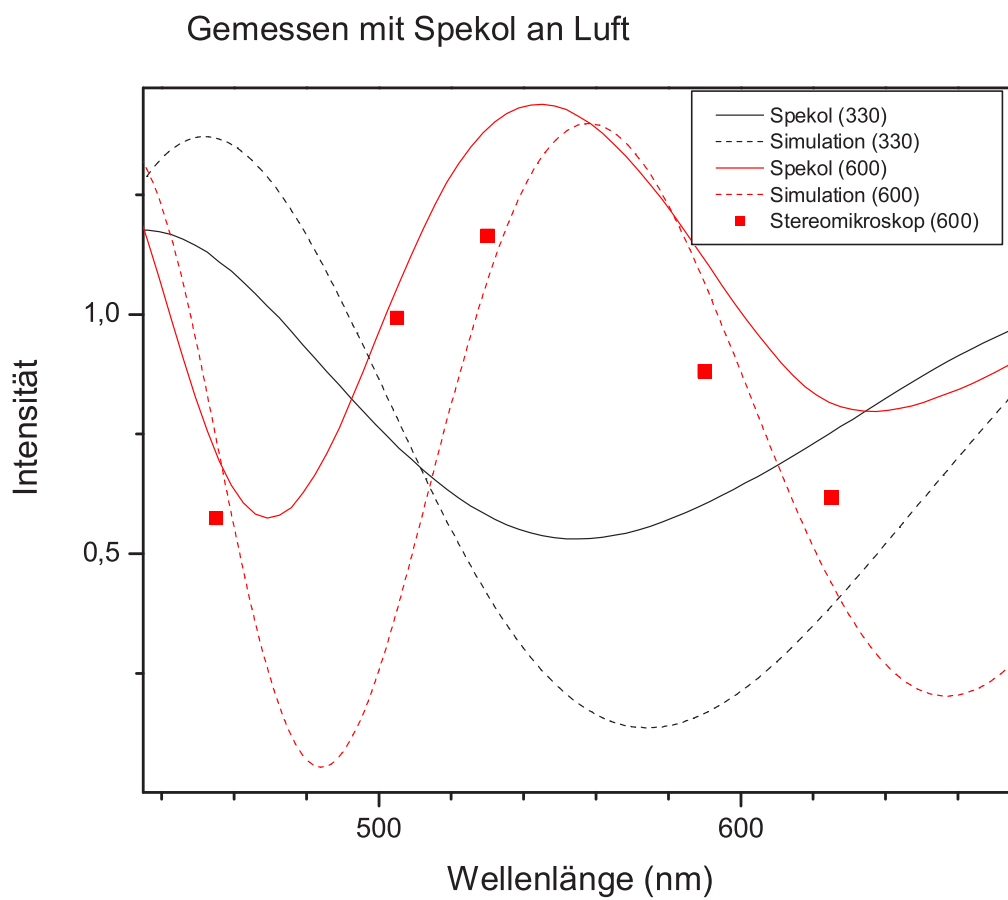


Abbildung 3.4: Interferenzspektrum des Stereomikroskop-Systems der 4. Generation. Standardabweichung des Rauschens $1,84 \pm 1,10\%$ Signalhub, 1x1Pixel.

3.3 Methoden

3.3.1 Modifikation von Glastypoberflächen

In dieser Arbeit wurden Transducer mit AMD-, CMD-, DA-PEG- und CMD/DA-PEG-Schichten sowie biotinylierte Varianten genutzt, welche nach folgenden Protokollen hergestellt wurden:

1. Reinigung und Aktivierung der SiO₂-Oberfläche

- Die Transducer werden 1 *min* in 6 *N* NaOH (oder KOH) eingelegt und anschließend mit bidestilliertem Wasser abgespült.
- Die Transducerchips werden im Anschluss 15 *min* mit frisch hergestelltem Piranha im Ultraschallbad behandelt, mit bidestilliertem Wasser gespült und mit Stickstoff trockengeblasen.

2. Silanisierung (wasserfrei)

- In einer leeren, trockenen Glaskammer werden auf einen mit Piranha aktivierten, trockenen Transducer 15 μL GOPTS pipettiert und mit einem zweiten Chip abgedeckt („Sandwich-Technik“).
- Nach einer Stunde Inkubationszeit in verschlossener Kammer werden die Transducerchips gut mit trockenem Aceton (Wassergehalt $\leq 0,1\%$) abgespült, wobei auf Rückstände von GOPTS geachtet werden muss und wegen Luftfeuchtigkeit zügig weiterverarbeitet werden sollte.

3. Umsetzung mit Polymer

- **AMD:** Auf ein mit GOPTS silanisierendem Transducerchip werden 15 – 20 μl Aminodextranlösung (10 *mg* AMD in 20 μl bidestilliertem Wasser) gegeben und wie bei der Silanisierung mit einem zweiten Transducerchip abgedeckt. Nach stehenlassen über Nacht in einer mit Wasserdampf gesättigter Kammer werden die Transducer gründlich mit bidestilliertem Wasser abgespült.
- **CMD:** Die Chips wurden mit unterschiedlich konzentrierten CMD-Lösungen umgesetzt. Die verwendeten Verdünnungen entsprachen 1 : x mit x = 3, 5 und 10, d.h. 1 *mg* CMD in x μL bidestilliertem Wasser. Auf die silanisierenden Transducer wurde 20 μL der jeweiligen CMD-Lösung pipettiert und wie bei der Silanisierung mit einem zweiten Chip abgedeckt. Nach Inkubationszeit von drei Stunden bzw. über Nacht in einer mit Wasserdampf gesättigter Kammer wurden die Transducerchips gründlich mit bidestilliertem Wasser gespült und mit Stickstoff trockengeblasen.

- **DA-PEG:** In einer offenen Schale wurde auf einen vorher mit GOPTS silanisierten Chip $20 \mu\text{L}$ einer DA-PEG-Lösung (4 mg DA-PEG in 1 mL Dichlormethan) pipetiert und anschließend in einen $70 \text{ }^\circ\text{C}$ warmen Ofen gegeben. Nach Inkubationszeit über Nacht wurden die Transducer gründlich mit bidestilliertem Wasser abgespült und mit Stickstoff getrocknet.

4. Umfunktionalisierung des Polymers

- Um aminofunktionalisierte Verbindungen zu immobilisieren, muß man die Aminofunktionen der Polymer-Schicht umfunktionalisieren. Dazu wird ein Transducerchip mit einer GA-Lösung (2 mg Glutarsäureanhydrid in $1 \mu\text{l}$ trockenem DMF) betropft, ein zweites Plättchen als Sandwich dazugegeben und mind. 6 h in einer mit DMF gesättigtem Glaskammer stehen gelassen.
- Nach Spülen der Plättchen mit DMF und bidestilliertem Wasser werden die trockenen Transducer mit einer NHS/DIC- Lösung (15 mg NHS in $100 \mu\text{l}$ trockenem DMF und $30 \mu\text{l}$ DIC) nach Sandwich-Verfahren umgesetzt.
- Nach mindestens 4 h in einer DMF-Dampf gesättigten Kammer werden die Transducer mit trockenem DMF, trockenem Aceton abgespült, im N_2 -Strom getrocknet und zügig weiterverarbeitet, jedoch ohne DIC.

5. Oligonukleotid-Anbindung

- Zur Probenvorbereitung wird DNA (25mer) der Konzentration 2 mg/mL in Wasser gelöst. Mit Carboxyl-Funktionen versehene Oberfläche ist zu diesem Zeitpunkt aktiviert mit NHS/DIC. Eine Pipette ist gespült und sauber. Die Mikrodrop-Anlage nach STEMMLER [71] hat eine eingestellte Temperatur von $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Das von ihm erstellte `TestPoint`-Programm wird gestartet und die Parameter $x=-11000$; $y=-600$ eingestellt, wobei bei den $13 \times 13 \text{ mm}^2$ Transducern $x=-10900$, $y=+400$ eingestellt wird. Die z-Achse wird manuell so weit bewegt, das die Pipette ca. 1 mm über dem Glas schwebt (z ca. 3000). Für Mikroskop-Slides ist $x=-17500$, $y=+21000$, $z=3000$ optimal, um dort einen Spot in die Mitte zu setzen.
- Zur Beschichten werden ca. $5 \mu\text{L}$ in die Pipette aufgezogen und nach *ccp*-Form getropft.
- Zum Aufbewahren nach DNA-Beschichtung können die Plättchen direkt eingefroren werden, bis sie benötigt werden.

6. Biotinylierung

- **Aktivierung der Oberfläche:** Auf einen Transducer mit carboxyfunctionalisierter Oberfläche wurden in einer mit DMF-Dampf gesättigten Kammer 10 μL einer Lösung von NHS/DIC in trockenem DMF (7,5 mg NHS und 12,6 μL DIC in 37,4 μL DMF [Wassergehalt $\leq 0,1\%$]) pipettiert und ein zweiter Chip als Sandwich daraufgegeben. Nach einer Inkubationszeit von mindestens vier Stunden wurden die Chips mit trockenem DMF und trockenem Aceton gespült, mit Stickstoff trockengeblasen und zügig weiterverarbeitet.
- **Umsetzung mit Biotinhydrazid:** In einer mit DMSO-Dampf gesättigten Kammer wurden 10 μL einer Biotinhydrazid/DMSO-Suspension (1 mg Biotinhydrazid in 10 μL DMSO) auf einen aktivierten Transducer gegeben und mit einem weiteren abgedeckt. Nach Reaktion über Nacht folgte die Spülung der Transducer mit bidestilliertem Wasser und die Trocknung im N_2 -Strom.

7. Schichtsystem DA-PEG/CMD

- Auf einen mit DA-PEG beschichteten Transducer wurden in einer mit Wasserdampf gesättigten Kammer 15 μL einer CMD-Lösung (Verdünnungen 1:5) pipettiert und anschließend auf den Tropfen eine Spatelspitze EDC zur Aktivierung der Carboxylfunktionen des Dextrans gegeben.
- Nach Inkubation über Nacht wurden die Transducer mit bidestilliertem Wasser abgospült und mit Stickstoff trockengeblasen.

3.3.2 Reflektometrische Interferenzspektroskopie

3.3.2.1 Aufbau Einzelplatzgerät

Schematisch ist der Aufbau eines temperierten RIFS-Systems in Abbildung 3.5 dargestellt. Der Temperaturfühler misst die Temperatur der RIFS-Zelle an der Flußzellenrückwand, welche durch die Heizspule auf Soll-Temperatur gebracht wird. Durch den Abstand zwischen Flußkanal und Temperaturfühler müssen die Temperaturwerte wie in Tabelle 3.2 entsprechend korrigiert werden. Der weitere apparative Aufbau ist C. HÄNEL [33] zu entnehmen.

3.3.2.2 Aufbau paralleles Gerät

Der MiniRIFS-Aufbau (Simplex) ist schematisch in Abbildung 3.6 dargestellt. Bei dieser Apparatur wurde darauf geachtet, alle möglichen Störeinflüsse durch zusätzliche optische Komponenten zu vermeiden, weshalb sie mit der minimal nötigen Anzahl optischer Bauteile realisiert wurde. Deshalb war es nötig, das RIFS-Schichtsystem unter dem Einfallswinkel von 0° zu nutzen, da

Soll °C	Ist °C
30	30
40	40,7
50	51,2
60	61,5

Tabelle 3.2: Kalibration der zweiseitigen Peek-Zelle.

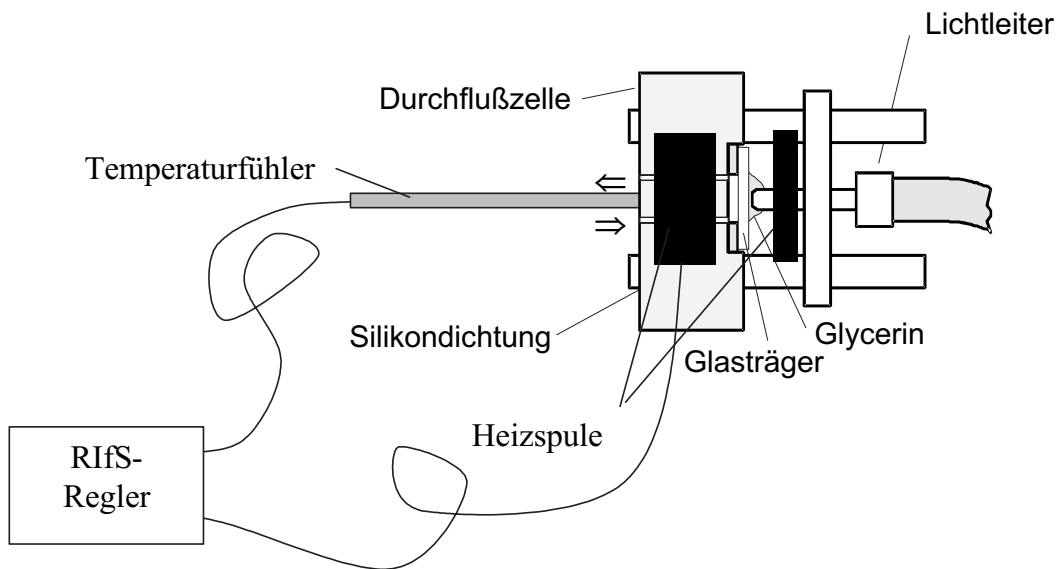


Abbildung 3.5: Schematischer Aufbau zur Durchführung von RfS am Einzelplatz in einem Flußsystem.

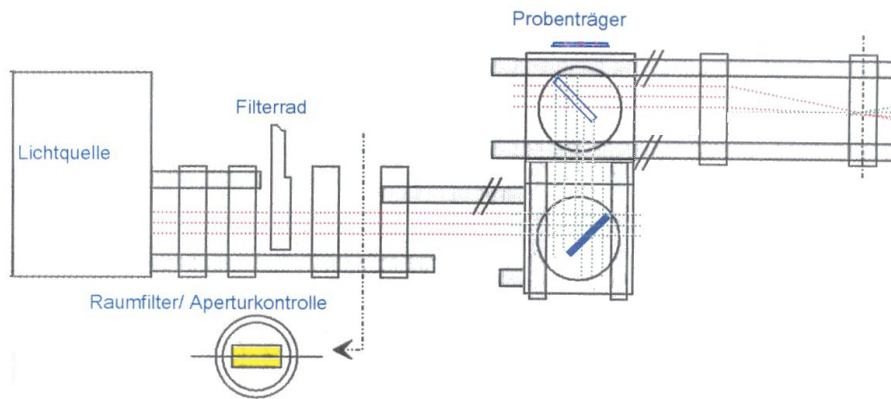


Abbildung 3.6: Schematischer Aufbau des Simplex-RIfS-Gerätes (0°-MiniRIfS).

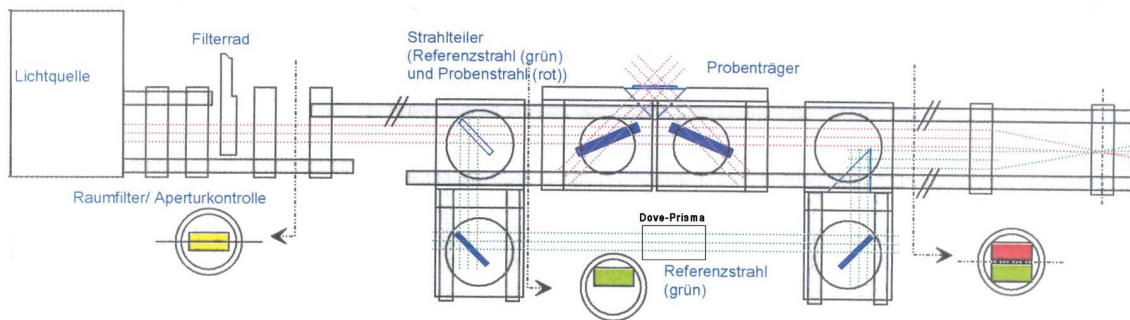


Abbildung 3.7: Schematischer Aufbau des 45°-MiniRIfS-Gerätes.

ein anderer Einfallswinkel mindestens zwei Spiegel und ein Prisma mehr erfordern würde.

Der MiniRIfS-Aufbau der 3.ten Generation ist schematisch in Abbildung 3.7 dargestellt. Die Unflexibilität der **Screening**-Auswertesoftware erlaubte keine Änderung der Referenzbildanordnung, weshalb eine korrekte Referenzierung nach Aufbau von Herrn JUNG eine Drehung des Referenzbildes erforderte. Ohne diese fehlt eine Drehung im Referenzstrahlengang, weshalb ein Dove-Prisma in den Strahlengang eingebracht wurde. Weitere Informationen zu den jeweiligen Referenzierungsstrategien der MiniRIfS-Aufbauten sind dem Abschnitt 4.2.3 zu entnehmen.

Die optischen Komponenten eines parallelen Aufbaus sind systematisch durch den Zusammenhang in Abbildung 3.8 verbunden. Eine genaue Erläuterung dieser Skizze folgt in Kapitel 4 (Seite 52).

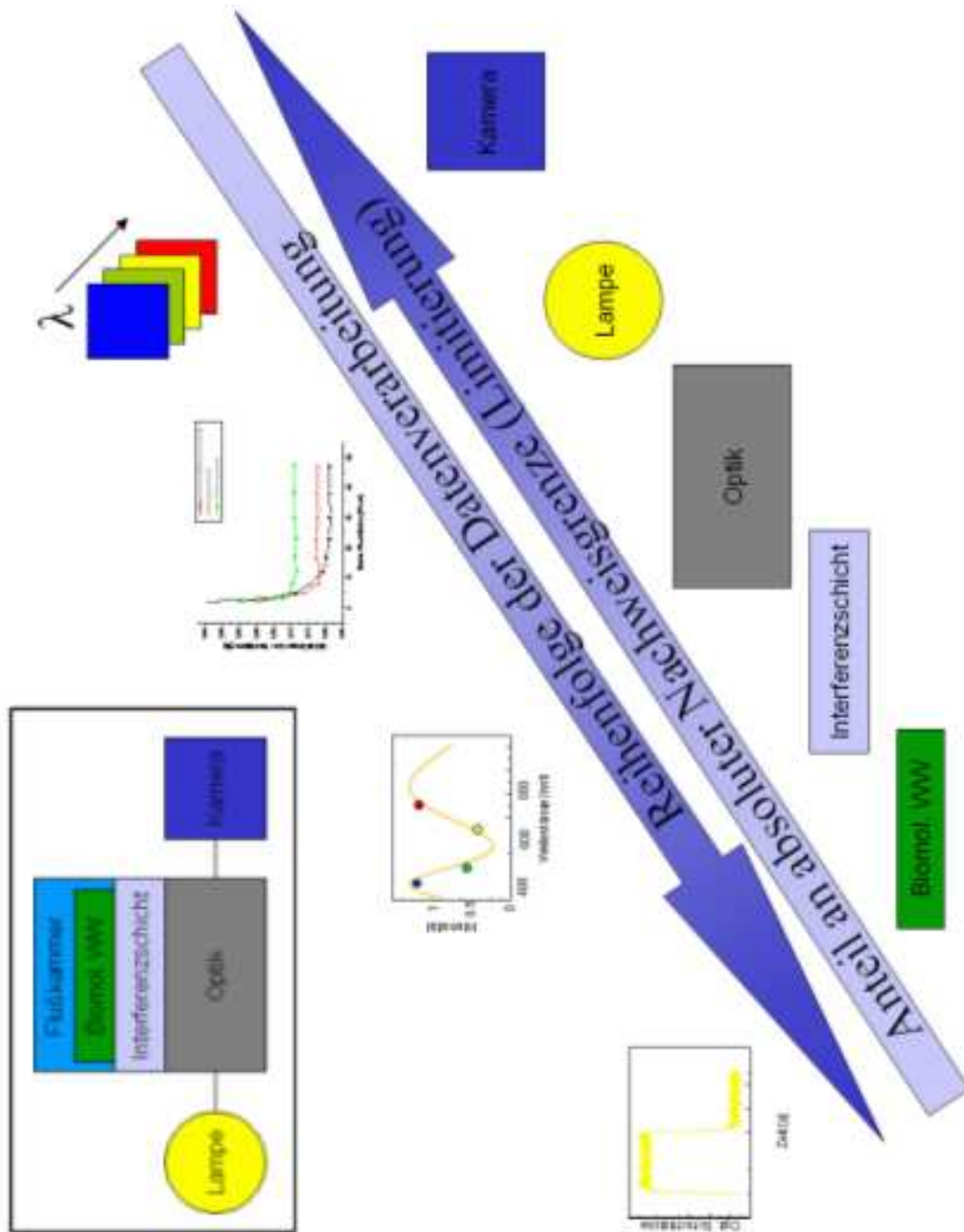


Abbildung 3.8: Schematischer Zusammenhang zwischen Anteil der Nachweisgrenze der Messapparatur und der Datenverarbeitungsreihenfolge

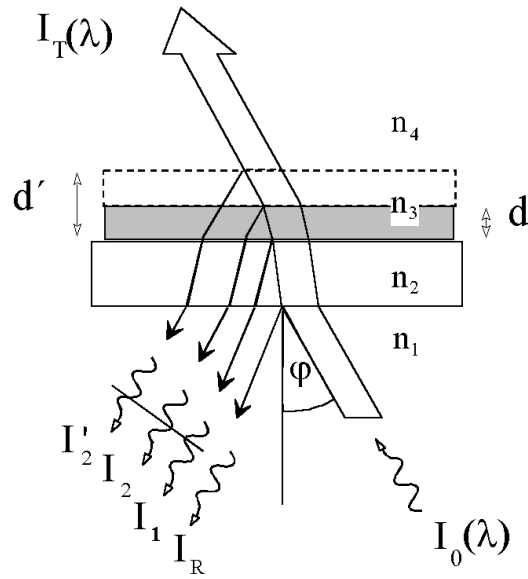


Abbildung 3.9: Teilstrahlen der Reflexion, welche das Interferenzspektrum erzeugen.

3.3.2.3 Messung

Zur Spektrenerfassung und zur Ansteuerung der Fließinjektionsanalyse (FIA) bzw. des Dilutors wurde das Programm **Measure** von KRAUS [40] verwendet. Als üblichen Zeitabstand zwischen den Meßpunkten wurde 5 s, als Integrationszeit 90 % der Sättigung des Detektors gewählt. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurden je nach Integrationszeit jeweils so viele Spektren aufsummiert, wie in 90 % dieses Zeitintervalls möglich war.

3.3.2.4 Auswertung

Die Interferenzspektren (aufgenommen am Einzelplatz) $I_K(\lambda)$ wurden aus den Reflexionsspektren $I(\lambda)$ (Abbildung 3.9) durch Korrektur mit dem Dunkelsignal $I_Z(\lambda)$ und dem Referenzsignal $I_R(\lambda)$ ermittelt:

$$I_K(\lambda) = \frac{I(\lambda) - I_Z(\lambda)}{I_R(\lambda) - I_Z(\lambda)} \quad (3.1)$$

Die korrigierten Spektren wurden mit dem Programm **Ifz** von BRECHT [11] und KRAUS [40] ausgewertet. **Ifz** führt eine Parabelanpassung an ein ausgewähltes Extremum durch. Bei allen Einzelplatzmessungen wurde das Minimum der Ordnung $m = 1.5$ herangezogen und aus der Lage dieses Extremums durch Multiplikation mit dem Faktor 0.75 aus Gleichung 2.21 die optische Schichtdicke der Interferenzschicht berechnet.

Bei Interferenzspektren (aufgenommen am miniaturisierten parallelen System) wird oft nur der

Quotient gebildet:

$$I_K(\lambda) = \frac{I(\lambda)}{I_R(\lambda)} \quad (3.2)$$

Grund dafür ist der geringe Wert des Dunkelrauschen, der bei ca. 1 % der Kameradynamik liegt (siehe auch Abb. 4.3). Durch die Quotientenbildung entsteht dadurch eine relative Verschiebung des Interferenzsignal um ± 2 %. Da bei den zeitabhängigen Messungen jedoch der Fehler in der Zeitskala von entscheidender Bedeutung ist, spielt die Berücksichtigung des Dunkelrauschens eine untergeordnete Bedeutung bei der Interferenzspektrenberechnung.

3.3.3 Protokoll der Auswertung der Affinitätskonstanten von Hybridisierungsreaktionen

Zur Auswertung der Affinitätskonstanten benötigt man die Krümmung der Assoziations- bzw. Dissoziationskurve. Die Belegung ist von Transducer zu Transducer unterschiedlich und nimmt nach der Regeneration mit HCl ab. Um die Kurven trotz verschiedener Belegung vergleichen zu können, wurden die Spektren auf 100 % Belegung normiert.

1. Probenvorbereitung für Messung: Konzentrationsreihe erstellen durch Verdünnung einer Lösung von $10 \mu\text{l/ml}$ um ein zehnfaches bis zu einer Lösung von 1 ng/ml . Zu jeder Probe mit $250 \mu\text{l}$ muß eine Probe der Konzentration $10 \mu\text{l/ml}$ mit $250 \mu\text{l}$ vorhanden sein, damit man die Schichtbelegungsabnahme herausreferenzieren kann. Als Nebeneffekt kann man aus diesen Daten noch die zeitliche Abnahme der Belegung auswerten.
2. Messung und Erstellung des Diagramms 3.10.
3. Anpassung von Funktionen an Messkurven: k_{obs} und k_d werden über Anpassungs-Funktionen aus der Krümmung der Assoziationskurven bestimmt.
4. Auftragung der Ergebnisse und Berechnung von K : Trägt man die Ratenkonstante gegen die Konzentration auf nach $k_{obs} = k_a[S]_0 + k_d$, so erhält man aus der Steigung k_a und aus dem Achsenabschnitt k_d (2. Möglichkeit k_d zu bestimmen, jedoch ungenauer, das Achsenabschnitt stärker schwankt als Steigung, also k_a). Nun kann man mit $K = k_a/k_d$ die Affinitätskonstante ausrechnen.

3.3.4 Auswertalgorithmus der parallelen Bilddaten

Zur Datenverarbeitung der Bilddaten wurden diverse Java-Klassen genutzt (siehe beigelegte CD), die verschiedene Referenzierungsstrategien und Datenformate (ASCII, JPG, BMP) verarbeiten konnten. Im folgenden wird mit Java- und Pseudo-Code die Routine erläutert. Zur

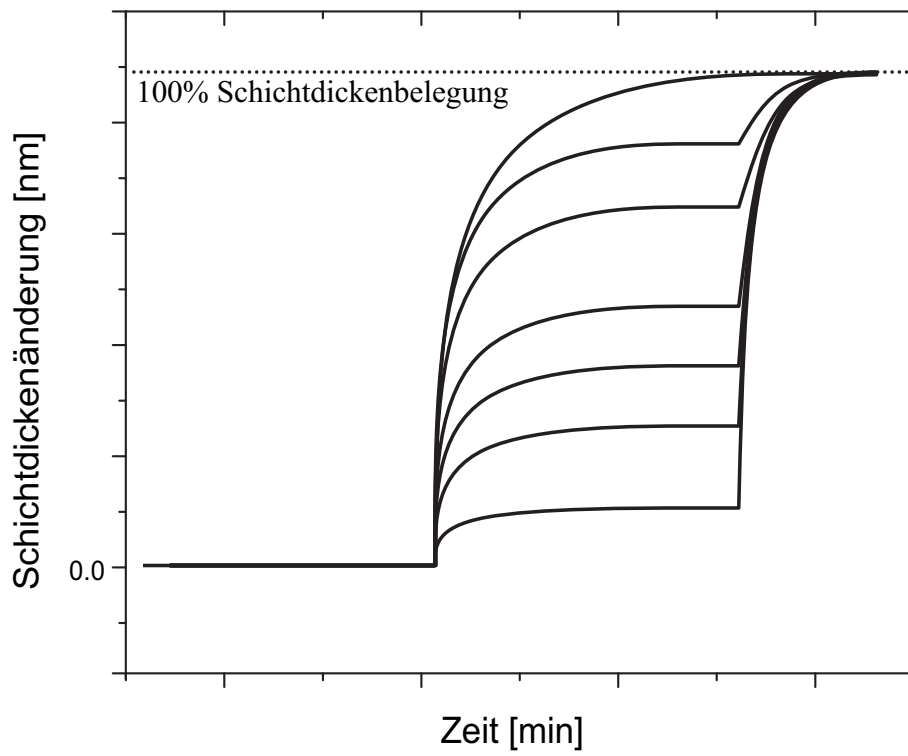


Abbildung 3.10: Beispielhafte Bindungskurve auf 100 % Schichtdickenbelegung normiert.

Datenauswertung der Interferenzspektren wurde die Schnittstelle `JMatLink` [38] verwendet, die es ermöglicht mittels Java [36] auf MatLab [45] zuzugreifen. Die Bildauswertung ist analog nach ROTHMUND ([64], Abschnitt 3.2.6.3, Seite 70) realisiert.

```
// Definition der Spot- und Referenz-Koordinaten,
// der Spotanzahl und der Spotgröße
int x.spot;
int y.spot;
int x.referenz;
int y.referenz;

// Definition (der Anzahl) der Wellenlängen
int wellenlaengen;

// Einlesen der Bilddaten in Java
spektren = load();

// Initialisierung der Matlab-Schnittstelle
int engineNumber = 0;
JMatLink matlab = new JMatLink();
engineNumber = matlab.engOpenSingleUse();

for (int i=0; i<spotanzahl; i++){
    for (int ii=0; ii<zeitpunkte; ii++){

        spektrum = spektren[i][ii];

        // Übergabe des ausgewählten Spektrums an Position i, ii
        matlab.engPutArray(engineNumber, "spektrum", spektrum);

        // Beschreibung des MatLab-Algorithmus im Pseudo-Code
        ispektrum = InterpolationSpektrum(spektrum);
        wspektrum = UmrechnungWellenzahl(ispektrum);
        extrema = Polynomanpassung(wspektrum);
        ordnung = BestimmungOrdnungCosFunktion(wspektrum);

        // Übergabe der Werte an Java durch Schnittstelle
```

```
        ordnung = matlab.engGetScalar(engineNumber, "ordnung");
        extrema = matlab.engGetScalar(engineNumber, "extrema");
    }
}

// Ausgabe der Optischen Schichtdicken pro Zeitpunkt in Datei
save();
```

Kapitel 4

Ergebnisse und Diskussion

Der Mut, über Zusammenhänge zu reden, die man nicht vollständig kennt, über Tatsachen zu berichten, die man nicht vollständig beobachtet hat, Vorgänge zu schildern, über die man nicht ganz Zuverlässiges wissen kann, kurz: Dinge zu sagen, von denen sich höchstens beweisen lässt, dass sie falsch sind - dieser Mut ist die Voraussetzung aller Produktivität ...

EGON FRIEDEL

Wie in der Einleitung (Kapitel 1.2, S. 2) bereits erwähnt, wird in dieser Arbeit versucht das gesamte parallele Detektionssystem zu analysieren. Die Systemeigenschaften werden durch signalerzeugende, signalumwandelnde, signalmessende (siehe Kapitel 3.2) und durch signalverarbeitende (siehe Kapitel 3.3) Elemente bestimmt. Die folgenden Kapitel sind nach der analytischen Erkenntnis geordnet, wie im Methodenteil (Kapitel 3.3.2.2, S. 43) beschrieben. Im folgenden wird erläutert, welches Element der Detektionseinheit welche Informationstiefe beinhaltet. Als Informationsträger dienen dem analytischen Signal die Sonden der spektroskopischen Methode (Licht), die Elektronen (CCD, A/D-Wandler) und der daraus erzeugte Datenstrom (Bild-, Spektren-, Affinitätsinformationen).

Die wichtigste Information der molekularen Wechselwirkung steckt in der Wechselwirkung an sich. Diese entzieht sich jedoch dem Auge des Betrachters, weshalb mit Hilfe des Detektionssystems vielerlei Umwandlungen stattfinden, bis diese Wechselwirkung erfasst werden kann. Die erste Detektion der Wechselwirkung findet durch die CCD-Kamera statt, weil diese die spektroskopischen Sonden erfasst. Insofern ist die CCD-Kamera unser erstes Fenster, das uns den Blick auf die Wechselwirkung ermöglicht. In den erfassten Bilddaten der CCD-Kamera sind alle Informationen der Wechselwirkung, der Lampe, der Optik, usw. enthalten (Abschnitt 4.1, S. 54). Nun gilt es aus diesen die relevanten Informationen herauszuarbeiten, um zu einer analytischen Erkenntnis zu gelangen. Die Informationstiefe ist bei der CCD-Kamera am größten, da

hier die Umwandlung aller Sonden- in Ladungsinformationen stattfindet.

Da die Sonden von der Lichtquelle (Abschnitt 4.2, S. 61) ausgesendet werden und die ganze Detektionseinheit durchlaufen, hat die Lichtquelle einen nicht unerheblichen Einfluss an der Gesamtinformation. Aus diesem Grund steht die Lampe an zweiter Stelle, denn wenn die Lampeninformation nicht aus der Gesamtinformation entfernt wird, so verschwinden die Wechselwirkungsinformationen unter dem Lampensignal.

Drittens beeinflusst alles zwischen Lampe und Detektor das Gesamtsignal. In all diesen Informationen ist die Wechselwirkungsinformation enthalten. Wenn die Kamera- und die Lampeninformation aus der Gesamtinformation entfernt sind, ist die übrige enthaltene Information die des optischen Aufbaus inklusive der spektralen Information (Abschnitt 4.3, S. 71) und der Auswertung (Abschnitt 4.3.3.3, S. 83). Da das Informationspaket des optischen Aufbaus zum Zeitpunkt dieser Arbeit den größten Einfluß auf die Extraktion der Wechselwirkungsinformation hatte, sollte das wichtigste Anliegen zukünftiger Arbeiten sein, genau diese Information wissenschaftlich kritisch zu untersuchen.

Sind alle vorhergehenden Elemente aus der Gesamtinformation entfernt, so bleibt das übrig was das Ziel der gesamten Arbeit ist, nämlich die Information über (bio)molekulare Wechselwirkungen an sich (Abschnitt 4.4, S. 115).

4.1 Detektor

4.1.1 Kontrast vs. Detektivität

Bei herkömmlichen CCD-Detektoren liegt die Aufmerksamkeit oft bei höherer lateraler Auflösung. Die Auflösung ist ein Maß für die vertikale und horizontale Dichte eines digitalen Bildes. Das Maß wird in Bildpunkten bzw. Pixel angegeben. Je höher die Auflösung für ein Bild ist, desto besser ist dessen optischer Eindruck. Der Trend der CCD-Entwicklung ist Miniaturisierung und Detektivitätssteigerung, so dass sich einzelne Photonen nachweisen lassen, jedoch sinkt dadurch der Kontrast der Kamera. Analog zum chemischen Photofilm geht mit steigender Empfindlichkeit¹ die Auflösung des Films zurück, da die lichtempfindlichen Kristalle immer größer werden und am Ende als sogenanntes Korn auch auf dem Foto sichtbar werden können. Höher empfindliche Filme haben eine schlechtere Farbtreue und Einbußen beim Kontrastumfang. Fluoreszenzbasierte Messmethoden haben den Vorteil, dass die Sensoren eine hohe Detektivität und damit geringe Nachweisgrenze besitzen, was ihre Parallelisierung und Miniaturisierung [53] erlaubt. Aus diesem Grund wird bei CCD-Herstellern und Biosensor-Anwendern bei CCDs nach größerer Detektivität gestrebt.

Jedoch benötigen gerade die markierungsfreien Methoden wie SPR oder RIfS nicht in erster Linie eine geringe Photonen-Nachweisgrenze, sondern einen großen dynamischen Bereich. Bis zur 3. Generation des parallelen RIfS-Sensors wurde fälschlicherweise davon ausgegangen, dass mit der Verbesserung der CCD-Detektivität (nicht Empfindlichkeit) auch eine Verbesserung der biomolekularen Nachweisgrenze (Empfindlichkeit) einhergeht. Wie bereits im theoretische Teil dieser Arbeit (Abschnitt 2.6.4.4, S. 31) erläutert und im folgenden Abschnitt begründet, ist der CCD-Detektor poisson-limitiert, was zur Folge hat, dass der Kontrast einer CCD Kamera von entscheidender Bedeutung für RIfS ist.

Fazit:

- Der Kontrast einer CCD-Kamera ist bei RIfS-Messungen von höherer Bedeutung als die Detektivität.

4.1.2 Vergleich verschiedener CCD-Detektoren

Eine Analyse der Daten von CCD-Chips verschiedener Hersteller zeigt den linearen Zusammenhang zwischen der Elektronenkapazität pro Pixel und der Pixelfläche (Abbildung 4.1). Er

¹Nach der IUPAC ist die Detektivität eines Sensors durch $D = \frac{\text{spektraleEmpfindlichkeit}}{\text{normierteRauschspannung}}$ definiert. Allgemein wird nach der ISO 12232 in der Photographie, also bei Photofilmen und CCD-Detektoren, aus historischen Gründen aber von Empfindlichkeit gesprochen. Für die Empfindlichkeit eines Sensors gilt nach der IUPAC jedoch $E = \frac{\text{Signaländerung}}{\text{Konzentrationsänderung}}$. In dieser Arbeit werden die Definitionen der IUPAC genutzt.

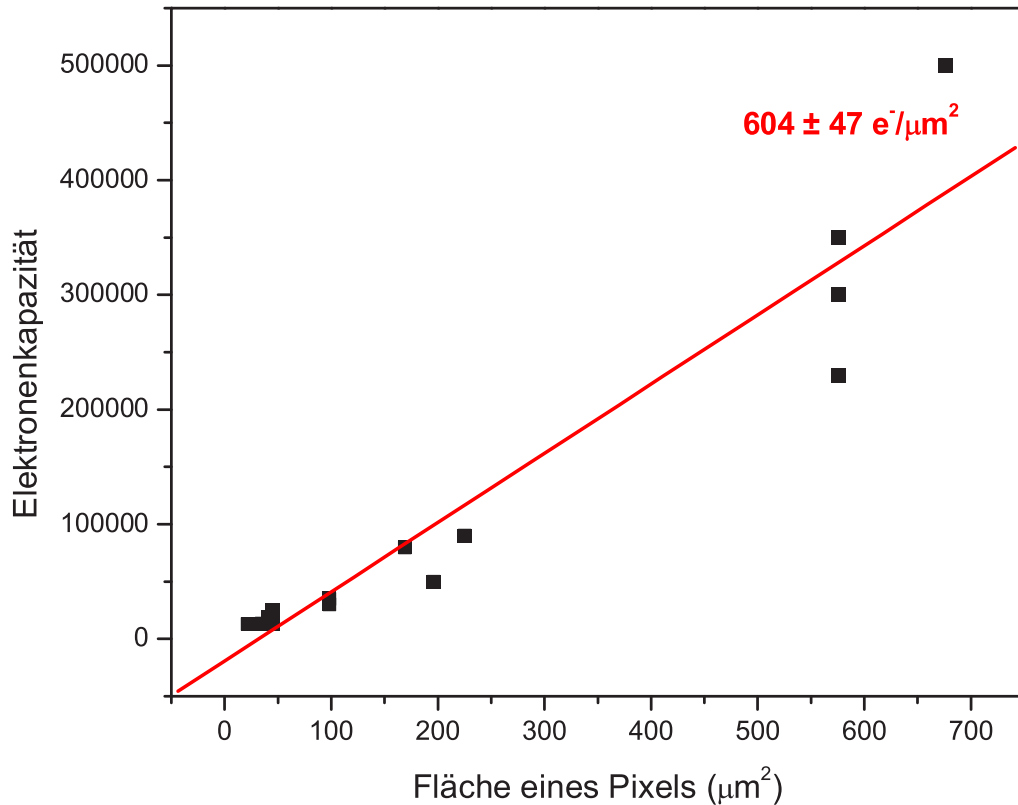


Abbildung 4.1: Abhängigkeit der Elektronenkapazität eines Pixels von seiner physikalischen Fläche.

liegt bei ca. $600 \pm 50 \text{ Elektronen}/\mu\text{m}^2$. Die maximal größte Pixelfläche ist $26 \times 26 \mu\text{m}^2$ auf einem „Back Illuminated Chip“ der Firma Jobin-Yvon. Um so größer die Fläche eines Chips, desto größer die Elektronenkapazität. Im folgenden wurde eine Abschätzung gemacht, welche CCD-Kamera am besten für das parallele RIFS-Setup geeignet ist. Vorab wurde in einem einfachen Modell abgeschätzt, welche Verbesserung durch eine CCD-Kamera im Vergleich zur vorliegenden CCD-Kamera erreicht werden kann, indem die Breite der Poisson-Verteilung der Elektronen miteinander verglichen wurden. Dieser Wert lässt sich aus der *Full Well Capacity* des Einzelpixels eines CCD-Detektors berechnen. Diese Abschätzung ist in Tabelle 4.1 dargestellt.

Die Poisson-Verteilung eines Signals ist unabhängig von der Integrationszeit der CCD-Kamera (Abbildung 4.2; die Erzeugung von Elektronen durch Photonen im Pixel ist ein Zufallsprozess).

FullWellCapacity	FramesPerSecond						
	1	10	100	625	1000	10000	100000
10000	-	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>22</i>	71
20000	-	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>8</i>	<i>10</i>	<i>32</i>	100
30000	-	1	<i>4</i>	<i>10</i>	<i>12</i>	39	122
40000	-	<i>1</i>	<i>4</i>	<i>11</i>	<i>14</i>	45	141
50000	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>5</i>	<i>13</i>	<i>16</i>	50	158
60000	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>5</i>	<i>14</i>	<i>17</i>	55	173
70000	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>6</i>	<i>15</i>	<i>19</i>	59	187
80000	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>6</i>	<i>16</i>	20	63	200
90000	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>7</i>	<i>17</i>	21	67	212
100000	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>7</i>	<i>18</i>	22	71	224
150000	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>9</i>	<i>22</i>	27	87	274
200000	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>10</i>	<i>25</i>	32	100	316
250000	<i>1</i>	<i>4</i>	<i>11</i>	<i>28</i>	35	112	354
300000	<i>1</i>	<i>4</i>	<i>12</i>	<i>31</i>	39	122	387
350000	<i>1</i>	<i>4</i>	<i>13</i>	33	42	132	418
400000	<i>1</i>	<i>4</i>	<i>14</i>	35	45	141	447
450000	<i>2</i>	<i>5</i>	<i>15</i>	38	47	150	474
500000	<i>2</i>	<i>5</i>	<i>16</i>	40	50	158	500
550000	<i>2</i>	<i>5</i>	<i>17</i>	41	52	166	524
600000	<i>2</i>	<i>5</i>	<i>17</i>	43	55	173	548
650000	<i>2</i>	<i>6</i>	18	45	57	180	570
700000	<i>2</i>	6	19	47	59	187	592

Tabelle 4.1: Verbesserung der Poisson-Verteilung durch CCD-Chips im Vergleich zur SVGA PCO Kamera (25000 *FWC*; 8 *FPS*). Technisch existierende CCDs sind kursiv dargestellt. Getestete CCDs sind fett gedruckt.

Der kleine Anteil des Flicker-Rauschens kann nicht von fundamentalen Prinzipien abgeleitet werden, sondern nur empirisch festgestellt werden. Typische Beispiele dafür sind Fluktuationen in der Transmission eines Messobjektes, Intensitätsschwankungen einer Lampe durch elektrische Störungen oder mechanische Instabilitäten eines optischen Aufbaus, d.h. nur durch Referenzierung kann dieser kleine Anteil eliminiert werden. Liegen die ermittelten Daten über $m = \frac{1}{2}$, so kann dies z.B. auf zu geringe Dynamik der Kamera [*bit*] zurückgeführt werden [ROTHMUND [64], S. 133]. Dies ist bei der PCO-Kamera nicht der Fall. Dezibel² gibt das Verhältnis zweier Größen logarithmiert in einer uneigentlichen Einheit an. Eine Aufsummierung von Pixeln in einem Bild bringt zwar eine statistische Verbesserung, limitiert jedoch die örtliche Auflösung. Eine Aufsummierung von Einzelpixeln über mehrere Bilder (siehe Spalten der Tabelle 4.1) bringt des Weiteren eine statistische Verbesserung, limitiert jedoch die zeitliche Auflösung mit der dynamische Phänomene beobachtet werden können. Technisch ist diese Verbesserung durch die Framerate der CCD-Kamera beschränkt. In Tabelle 4.1 liegt der nicht-kursive Bereich jenseits des technischen Horizonts von CCDs. Momentan existieren nach aktuellen Datenblättern nur Kameras oberhalb dieses Bereiches.

Zu Vergleichsmessungen wurden zwei am Markt erhältliche Detektoren getestet, die jeweils in einem Kriterium über hervorragende Spezifikationen verfügen. Die Geräte wurden freundlicherweise von dem Firmen L.O.T.-Oriol GmbH & Co. KG, Darmstadt und ProPhysics AG, Oerlikon zur Verfügung gestellt:

- **Spektrograph von LOT; gekoppelt mit einem 2-dimensionalen Diodenarray (Spezifikation Datenpunkte und FWC):** Die Dioden hatten eine Full Well Capacity von 700.000 Elektronen und es konnten pro Arrayzeile 100 Wellenlängen aufgenommen werden. Diese Dioden sollte aufgrund der hohen FWC ein geringeres Poisson-Rauschen erzeugen und außerdem sollten die Interferenzspektren mit 100 Dioden genauer auswertbar sein als beim Standardaufbau mit 7 Filtern (= 7 Wellenlängen) pro Interferenzspektrum (Faktor 6; siehe Tabelle 4.1; unten links).
- **HiSpeed-CCD-Kamera von ProPhysics (Spezifikation Geschwindigkeitsfaktor):** Sie konnte 2.000 *Bilder pro Sekunde* aufnehmen und ihre Full Well Capacity betrug 80.000 *Elektronen*. Durch die Aufsummierung von 2000 *Frames* (Messzeit eine Sekunde) sollte eine signifikante Reduzierung des Poisson- Rauschen möglich sein (Faktor 20), da durch die Summe der Bilder einen schärferer Mittelwert erhältlich ist (siehe Tabelle 4.1; Mitte rechts).

²Das Dezibel (Einheitenzeichen: *dB*) ist der zehnte Teil eines Bels (benannt nach Alexander Graham Bell). Es findet Verwendung in der Akustik (z.B.: Schalldruckpegel), der Hochfrequenztechnik als Teil der Nachrichtentechnik, der Nachrichtentechnik (z.B.: *SNR*) und der Automatisierungstechnik. Mit ihm lassen sich Signalpegel, Verstärkungen, Dämpfungen, ... vergleichen.

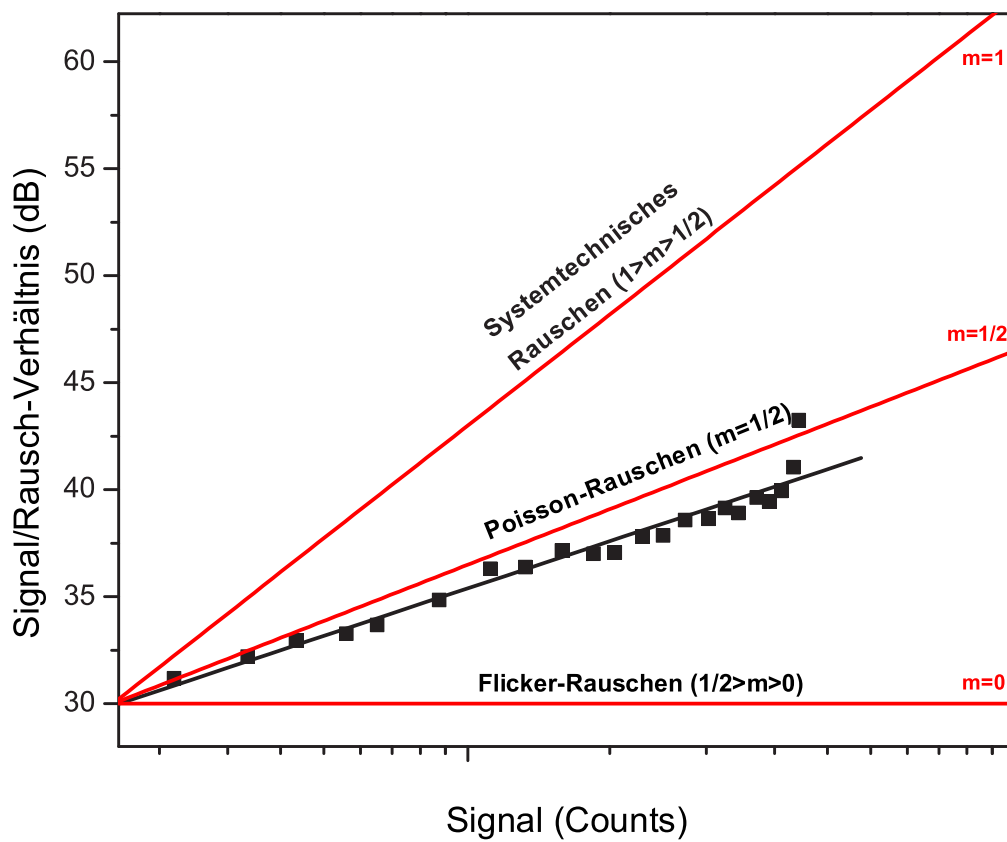


Abbildung 4.2: Signal/Rausch-Verhältnis der SVGA-Kamera von PCO.

Beide Geräte erreichten nicht die erwarteten theoretischen Grenzen:

- Beim LOT-Spektrographen hatte das Signal trotz maximaler FWC ein Spektrenrauschen von fast einem Prozent (der Poisson-Anteil betrug nur 0,12 %). Daraus läßt sich schließen, dass bei diesem Gerät nicht das Quantenrauschen, sondern andere Rausch-Faktoren, wie z.B. Dunkelrauschen dominierend und damit limitierend sind.
- Die HCC-Kamera von ProPhysics kann zwar sehr viele Bilder pro Zeiteinheit aufnehmen (2000 Bilder pro Sekunde mit 256×1024 *Pixel* Auflösung entsprachen 512 *MB Daten pro Sekunde*), war jedoch durch den schnellen A/D-Wandler auf 8 *bit* Dynamik beschränkt. Daraus läßt sich schließen, dass das Quantisierungsrauschen des A/D-Wandlers allein 0,4 % zum Signalrauschen beiträgt. Wird das Intensitätsrauschen der aufgenommenen Bilder in Abhängigkeit der Kantenlänge eines Auswertefeldes (Spot) dargestellt (siehe im Vgl. Abbildung 4.13, S. 66), so erreicht diese Kamera minimal ein Intensitätsrauschen von 0,02 %. Dies entspricht nur annähernd den theoretischen Erwartungen aus Tabelle 4.1. Trotz der Verbesserung um den Faktor 2 im Vergleich zur PCO-Kamera, ist diese Kamera aber ungeeignet, da sie für eine Sekunde Messzeit anschließend trotz modernster Übertragungstechnik (FireWire) zehn Minuten Datenübertragungszeit zum PC benötigt und die Auswertung dieser Datenmenge ebenfalls beträchtlich mehr Zeit in Anspruch nimmt.

Abgesehen von den hier erwähnten High-End-Detektoren wurden noch eine WebCam von Philips, eine Digitalkamera der universitären Medienabteilung und die bei ROTHMUND erwähnt 8-*bit* Dalsa-Kamera vermessen. Die erhaltenen Ergebnisse erlauben es jedoch bei weitem nicht, diese CCDs für eine analytische Anwendung zu nutzen. Sie werden daher nicht weiter erläutert.

Wie in Abbildung 4.3 und 4.4 dargestellt, beträgt das Dunkelrauschen der SuperVGA-Kamera von PCO nur 0,05 % (2-3 *Counts*). Da das Quantenrauschen der PCO einen errechneten Wert von 0,63 % hat, liegt das Dunkelrauschen eine Größenordnung unter dem Quantenrauschen, wodurch das Dunkelrauschen keinen Einfluß auf das Signalrauschen beiträgt. Rechnerisch läßt sich das thermale Dunkelrauschen durch ZMUIDZINAS [85] beschreiben.

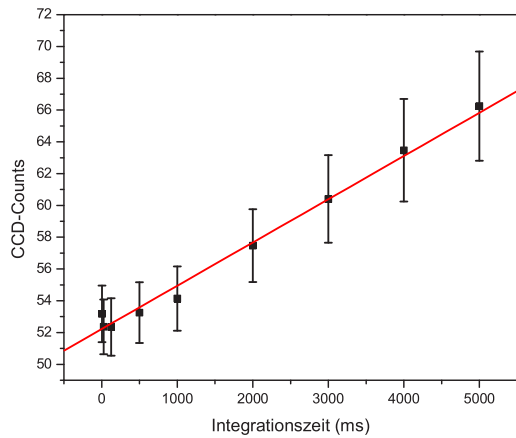


Abbildung 4.3: Dunkelstrom der SVGA-Kamera von PCO.

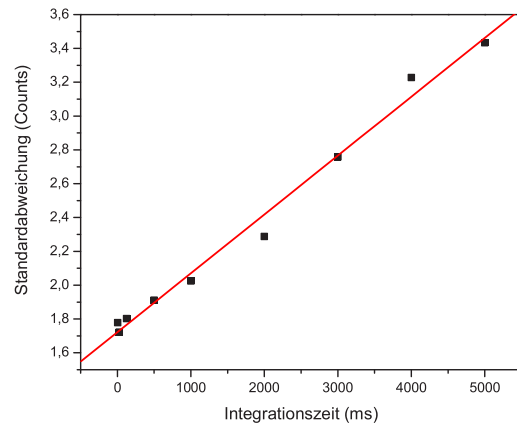


Abbildung 4.4: Dunkelrauschen der SVGA-Kamera von PCO.

Fazit:

- Entscheidend für eine CCD-Kamera, die für RIFS geeignet ist, ist die Elektronenkapazität (FWC), die Bildmessrate (FPS) und die Dynamik (bit) der Kamera. Je höher diese Werte, desto besser der Detektor.
- Sowohl die HCC-Kamera, als auch der Spektrograph versprechen theoretisch eine geringeres Rauschen. Die in einem Fall praktisch erzielte Verbesserung rechtfertigt jedoch nicht die zusätzlichen Kosten.
- Die PCO Kamera hat ein Dunkelrauschen, das eine Größenordnung unter dem Quantenrauschen liegt. Für ungekühlte System, wie z.B. den Spektrograph, kann das Dunkelrauschen höher sein.
- Das Quantenrauschen ist limitierend für alle CCD-Detektoren. Verbesserungen sind maximal noch über Laser MARTE [44] möglich. Sowohl das Quantenrauschen [35], als auch das Dunkelstromrauschen [85] lassen sich theoretisch berechnen.

4.2 Lichtquelle

4.2.1 Helligkeit

Wie bereits in Kapitel 4.1.2 erwähnt ist die Poisson-Verteilung eines Pixels unabhängig von der Intensität, also der Helligkeit einer Lampe. Werden die Kamerabilder bei unterschiedlicher Lampenhelligkeit dargestellt, bis die volle Kameraynamik erreicht ist, so ist kein Unterschied in den Kamerafehlern (Abbildung 4.5) ersichtlich. Da die Bildausleuchtung für dieses Experiment so gewählt wurde, dass in der Mitte die Kamera voll ausgeleuchtet wird und im Randbereich keine Photonen auf den Detektor fallen, hat der Fehler die Verteilung. Der in Abbildung 4.5 aufgetragene Bildfehler ist für alle Helligkeiten identisch. Daraus folgt, dass die Lampe ihre Charakteristik nicht nennenswert ändert in Abhängigkeit des Stroms. Es ist keine Kreuzkorrelation messbar, da das Bild um Null schwankt, wie Abbildung 4.6 zeigt. Dazu wurden jeweils zwei nebeneinanderliegende Pixel des Bildes ausgewählt und diese zeitlich beobachtet. SAUER zog in seiner Diplomarbeit den Schluss, dass eine 1 % Intensitätsschwankung normal und limitierend für eine Halogenlampe sei. Unter Berücksichtigung der Quantenlimitierung und einem Detektor mit einer FWC von ca. 10000 errechnet sich ein Fehler von 1 %. Es deutet alles darauf hin, dass der Fehler allein durch die CCD verursacht wird, da sich der Fehler weder durch die Lampenintensität, noch durch verschiedene Lampen verändert. Alternativ wurde an das parallele System eine Lampe des Spekol-Systems angebracht und diverse Lampen von Osram getestet (50-100 W, matt-klar).

Fazit:

- Die Lampenhelligkeit hat keinen Einfluß auf das Bildrauschen. Es ist keine Korrelation zwischen Lampenhelligkeit und Bildrauschen messbar.

4.2.2 Zeitliche und Örtliche Schwankungen

4.2.2.1 Zeitliche Schwankung

Zeitliche Faktoren können Netzfrequenzen, thermische Schwankungen der Lampe oder der CCD-Kamera, und ähnliches sein. Bestimmt wird dieser Faktor durch die sogenannte Kreuzkorrelation (siehe Abschnitt 2.6.2, S. 23), welche die Gemeinsamkeiten in der Zeit von zwei örtlich getrennten Pixeln ermittelt. Korrelieren z.B. zwei nebeneinander liegende Pixel miteinander, so ergibt dies einen positiven Betrag. Je höher der Betrag, desto höher die Korrelation, wie im folgenden am Beispiel einer Alufolie (Abb. 4.7) und eines Papiers (Abb. 4.8) gezeigt wird. Ist die Kreuzkorrelation um Null verteilt, so wird klar, dass keinerlei Abhängigkeiten existieren zwischen Pixel und Nebapixel. Daraus folgt, dass das optische System zeitlich stabil ist.

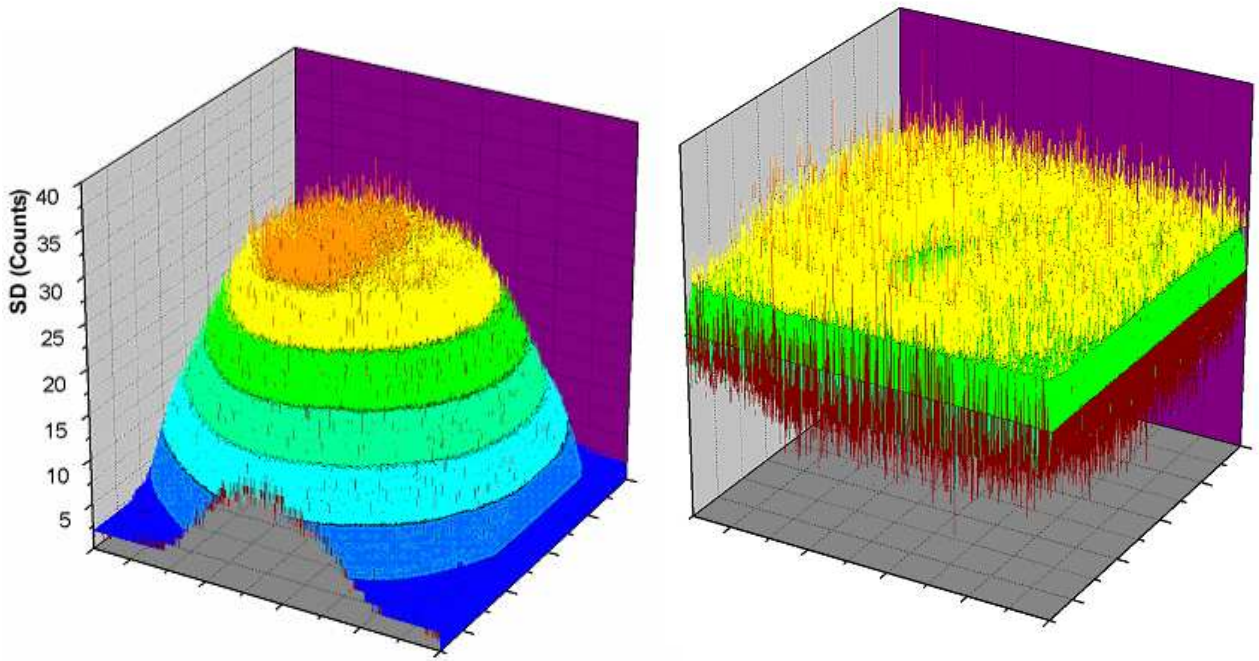


Abbildung 4.5: Standardabweichung des Bildes bei voller Ausnutzung der Dynamik.

Abbildung 4.6: Kreuzkorrelation nebeneinanderliegender Pixel eines Aufnahmebildes der SVGA PCO-Kamera.

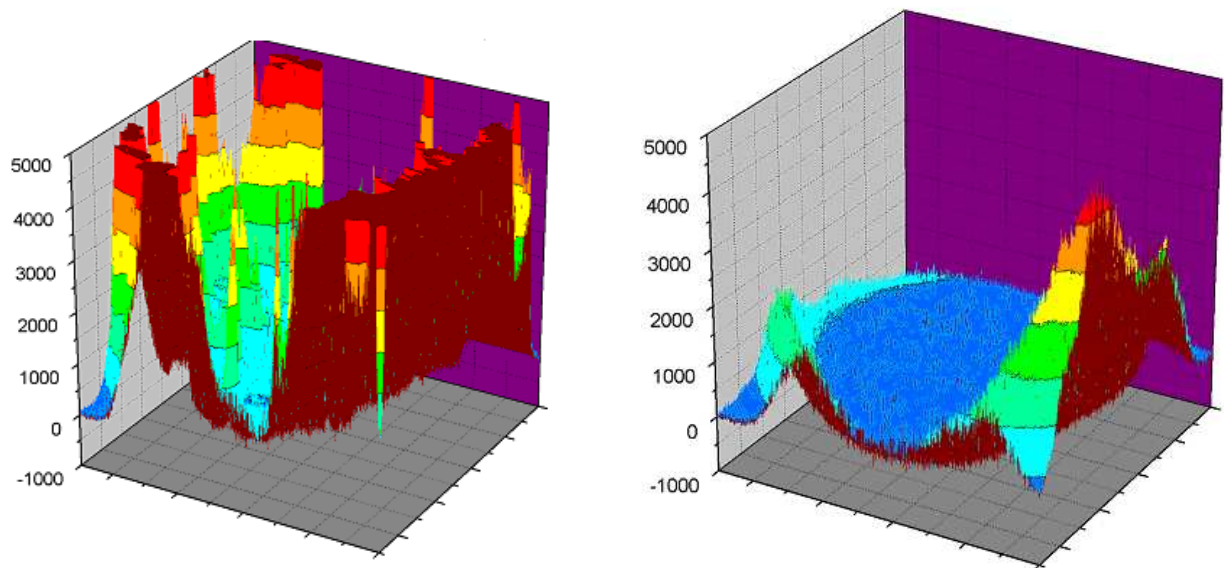


Abbildung 4.7: Starke Kreuzkorrelation nebeneinanderliegender Pixel (Streuung durch Alufolie) eines Aufnahmebildes der SVGA PCO-Kamera.

Abbildung 4.8: Schwache Kreuzkorrelation nebeneinanderliegender Pixel (Streuung durch Papier) eines Aufnahmebildes der SVGA PCO-Kamera.

Zusätzlich ist in Abbildung 4.5 die Standardabweichung des Intensitätssignals aufgetragen [in *Counts*], welche zeigen soll, dass ein Fehler im Signal vorhanden ist, diese Fehler aber nicht korrelieren. Das schließt jeglichen zeitlichen systematischen Fehler aus, der durch das optische System auftreten könnte, da sonst Korrelationen sichtbar wären.

Fazit:

- Im Messbild (unreferenziert) sind keine zeitlichen Schwankungen messbar, woraus geschlossen werden muß, dass weder die Lampe, noch das optische System, noch der Detektor einen systematischen Fehler aufweisen.

4.2.2.2 Örtliche Schwankung

Um zu verstehen, wie sich das Rauschen des Kamerasignals auf die Interferenzspektren und damit auf die Schichtdicke auswirken wird, wurde ein Simulationsprogramm geschrieben. Mit ihm lässt sich mit Hilfe weniger Parameter die inhomogene Ausleuchtung durch die Glühwendel, einzelne Staubflusen, die bei dem offenen optischen Aufbau unvermeidlich sind, und das Rauschen der Pixelwerte simulieren. Die Darstellung (Abbildung 4.9; links) zeigt beispielhaft ein simuliertes Kamerabild in 3D, daneben ist der Mittelwert über 21 Bilder gezeigt. Wie theoretisch erwartet nimmt die Standardabweichung in erster Näherung mit der Wurzel der Signalintensität zu. Die Abbildung 4.14 zeigt die Standardabweichung der Mittelwerte unterschiedlich großer Meßflecken (Spots). Laut Theorie sollte sie mit dem Kehrwert der Wurzel aus der Pixelanzahl abnehmen. Die durchgezogene Linie gibt diesen Verlauf wieder. Auf Grund der örtlichen Inhomogenitäten im Intensitätssignal weichen die simulierten Ergebnisse vom Idealen Bild ab, am stärksten, wie zu erwarten war, die Werte ohne Referenzierung (Rauten), dann die Werte mit einer festen Referenz, mit der alle Zeitpunkte verrechnet wurden (Quadrate, Offline) und schließlich am nächsten zur theoretischen Kurve die Werte, bei denen die Referenz vom gleichen Zeitpunkt stammt, wie die „Mess“-werte (Dreiecke, Online). Zur Definition der Online- und Offline-Strategien siehe Kapitel 4.2.3. Echte Messwerte zeigen genau das gleiche Verhalten: die relativen Standardabweichungen der Mittelwerte verschieden großer Meßflecken ohne Referenz (\circ) oder die Referenzwerte selbst (Δ), liegen deutlich über den Werten, die sich bei Verrechnung mit der Referenz (\square) ergeben. Aus der Gegenüberstellung dieser relativen Standardabweichungen (% Rauschen, Abb. 4.13) und den berechneten Standardabweichungen der Schichtdicken (Abb. 4.12) ergibt sich der Zusammenhang $2562 \text{ } iu_{\delta}$ (Definition in Abschnitt 4.3.3.1) Schichtdickenrauschen pro Prozent Messwertrauschen (Messung gegen Luft). Es ergibt sich, dass sich ab 20×20 Pixeln das Meßsignal bei 0,1 % Rauschen einpendelt. Dieser Wert konnte durch statistische Maßnahmen nicht verringert werden, so dass er dem Flicker-Rauschen (Abbildung

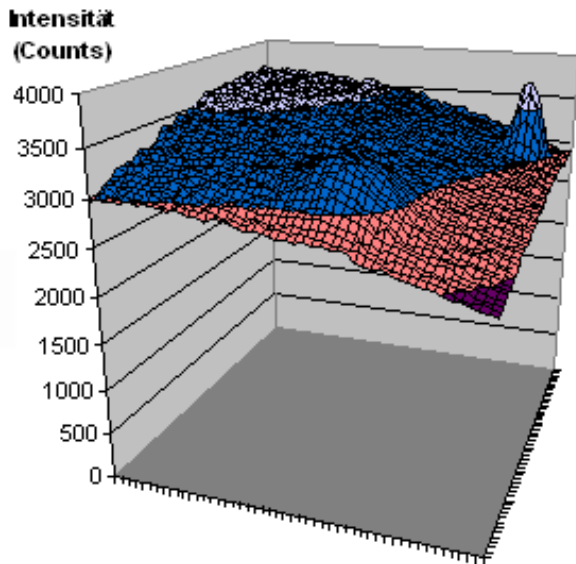


Abbildung 4.9: Simuliertes normalverauschtes Bild einer 12-bit Kamera.

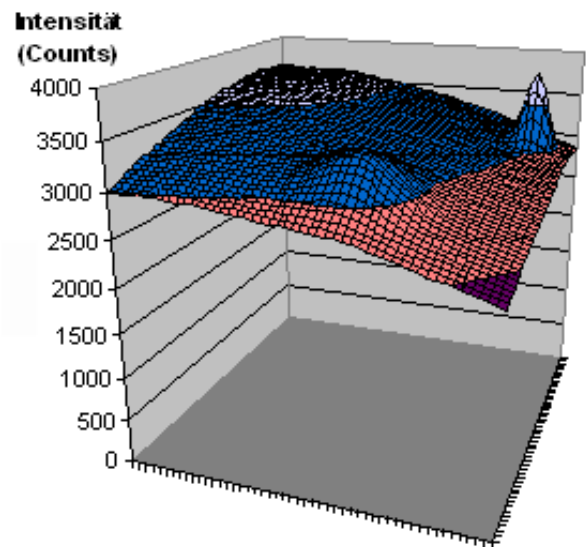


Abbildung 4.10: Mittelwert eines simulierten normalverauschtes Bildes einer 12-bit Kamera.

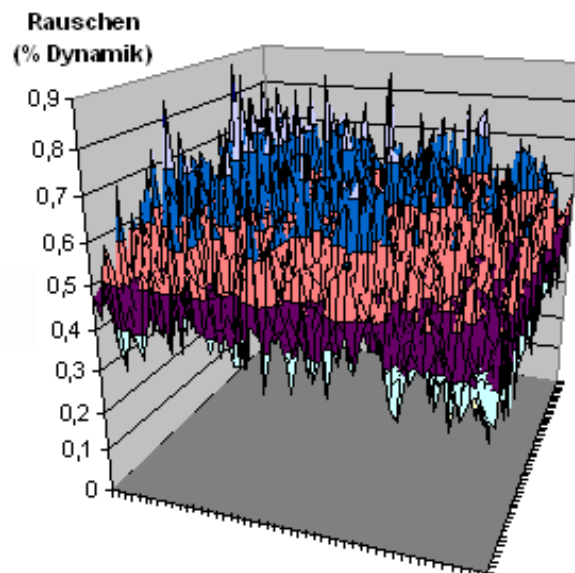


Abbildung 4.11: Standardabweichung eines simulierten normalverauschtes Bild einer 12-bit Kamera. Zum Vergleich mit einem experimentell ermittelten Bild siehe Abbildung 4.5.

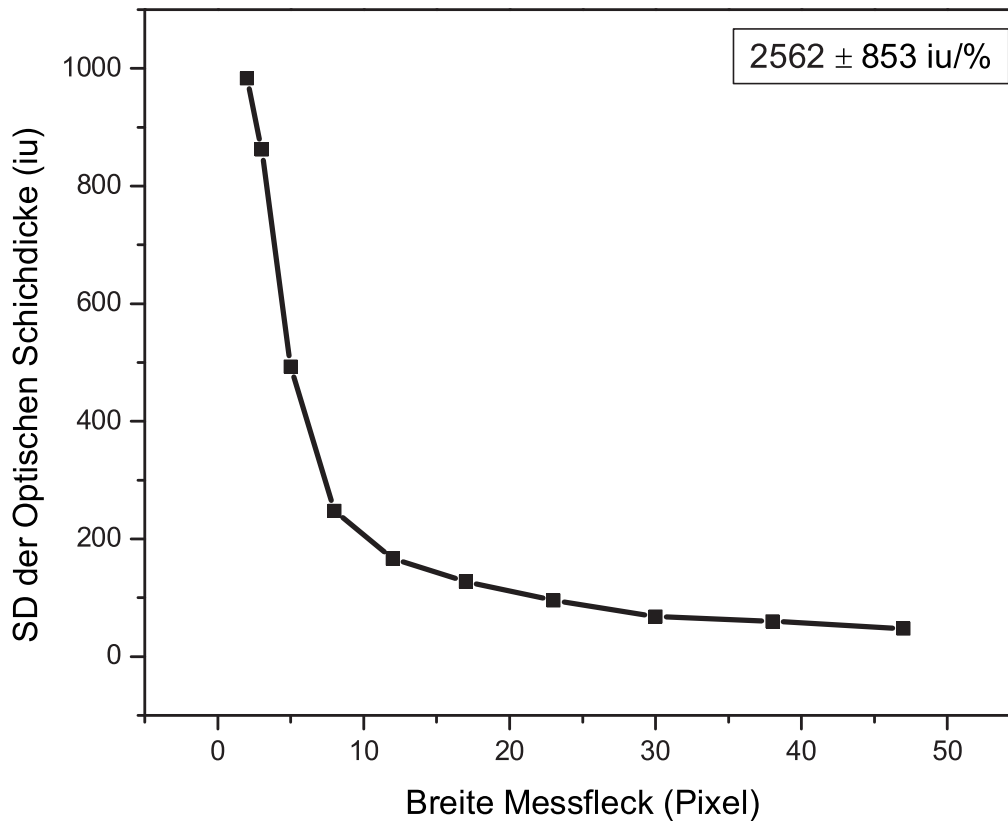


Abbildung 4.12: Optischen Schichtdickenrauschen in Abhängigkeit der Kantenlänge eines Spots.

4.13) zugeordnet werden kann. Wie Abschnitt 2.6.4.4 erläutert kann die Intensitätsschwankung der Lampe durch Flicker-Rauschen beschrieben werden. Wie in Abbildung 4.2 sichtbar, wurde ein gewisser (wenn auch nicht großer) Anteil Flicker-Rauschen gemessen, wodurch das 0,1 %ige Intensitätsrauschen diesem zugeordnet werden kann. D.h. nun lässt sich quantifiziert ermitteln, zu wieviel Prozent die Intensität schwankt und wie groß der Umrechnungsfaktor von Intensitätsrauschen zu optischem Schichtdickenrauschen ist.

Unsere Lampe schwankt mit ca. 0,1 %; Wir stellten keine Kreuzkorrelation mit der SVGA-Kamera von PCO fest, also keine zeitliche Schwankung, weil das Flickerrauschen im Verhältnis zum Quantenrauschen zu gering ist.

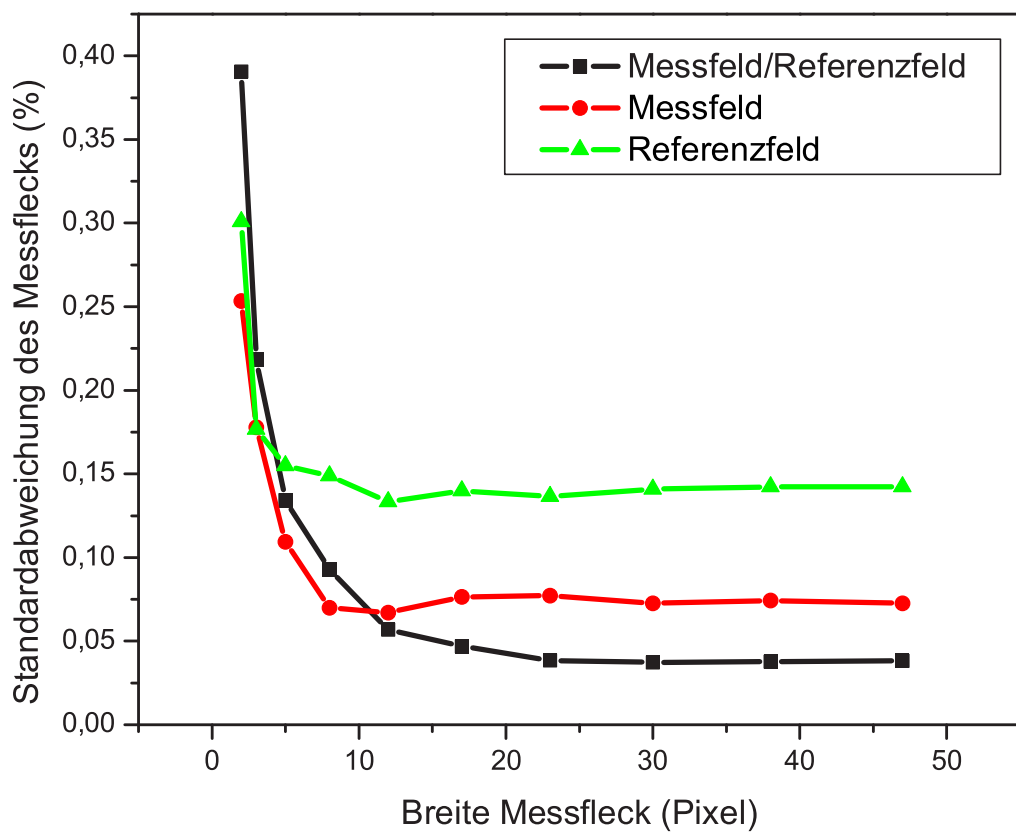


Abbildung 4.13: Intenität des Bildrauschens in Abhängigkeit der Kantenlänge eines Spots.

Fazit:

- Durch eine theoretische Abschätzung können sowohl zeitliche, als auch örtliche Schwankungen eines Bildes erfasst und verstanden werden. Diese Abschätzung stimmt mit realen Messungen überein.
- Verschiedene Referenzierungsmöglichkeiten können quantitativ und qualitativ verstanden und evaluiert werden.
- Trotz der in Abschnitt 4.2.2.1 nicht gemessenen zeitlichen Schwankung, zeigt sich durch ein referenzierendes Messprinzip, dass die Lampe eine zeitliche Schwankung mit 0,1 % der Kameradynamik verursacht.

4.2.3 Referenzierung

Nach ROTHMUND [64] haben die eingesetzten Referenzierungsmethoden zwei Ziele: Erstens das durch Geräte- und Lampencharakteristiken verzerrte Reflexionsspektrum zu korrigieren und damit so nahe wie möglich an das wirkliche Reflexionsspektrum anzunähern und zweitens die laufenden Schwankungen des Signals zu korrigieren. Die für das parallele Detektionssystem in Frage kommenden Methoden zur Gewinnung eines Referenzsignals (d.h. Referenzbild) neben dem Meßsignal sind in Abbildung 4.15 schematisch dargestellt. Allen Methoden ist gemeinsam, dass versucht wird, möglichst alle Stationen des Gerätes zu durchlaufen. Umso mehr Stationen durchlaufen werden, umso besser die Referenzierung. Gemeinsam ist auch die Auswertung (Quotientenbildung von dunkelkorrigierten Meß- und Referenzbildern).

Methode A: Dies ist die einfachste und am schnellsten zu realisierende Methode. Hier wird im zeitlichen Wechsel ein Referenzbild und ein Meßbild aufgenommen, entweder abwechselnd Referenz- und Meßbild oder einmalig Referenz- und kontinuierliche Meßbilder. Sowohl Referenz- als auch Meßbild werden über den gleichen Weg von der Lichtquelle zur Kamera geführt. Diese Methode wird als Offline-Referenzierung bezeichnet.

Methode B: Diese Zweibild-Referenzierung (Online-Referenzierung) ist in der Lage, sowohl zeitliche Fluktuationen als auch spektrale Verzerrungen zu korrigieren. Wird eine pixelgenaue Zuordnung von Meß- und Referenzbild erreicht, erhält man eine exakt orts- und zeitgleiche Referenzierung, unter Verlust der Hälfte der Meßfläche. Dies führt theoretisch zu einem um den Faktor $\sqrt{2}$ erhöhten Schichtdickenrauschen gegenüber dem unreferenzierten Bild, da die Hälfte aller Pixel des CCD-Chips für das Referenzbild zur Verfügung gestellt werden müssen. Allerdings referenziert diese Methode zeitliche Schwankungen heraus, die durch Methode A

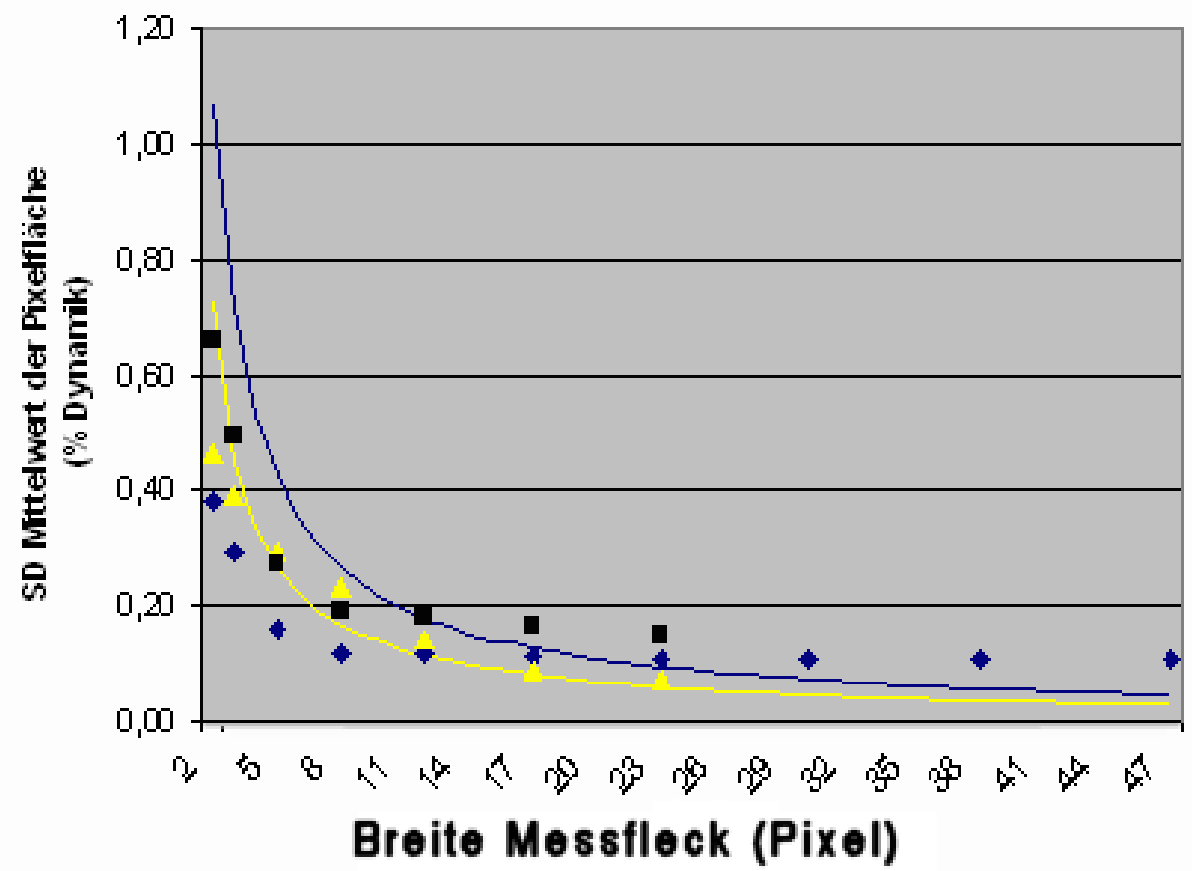


Abbildung 4.14: Unterschiedliche Referenzierungsmethoden (simuliert) einer 12-bit Kamera. Offline □; Online △

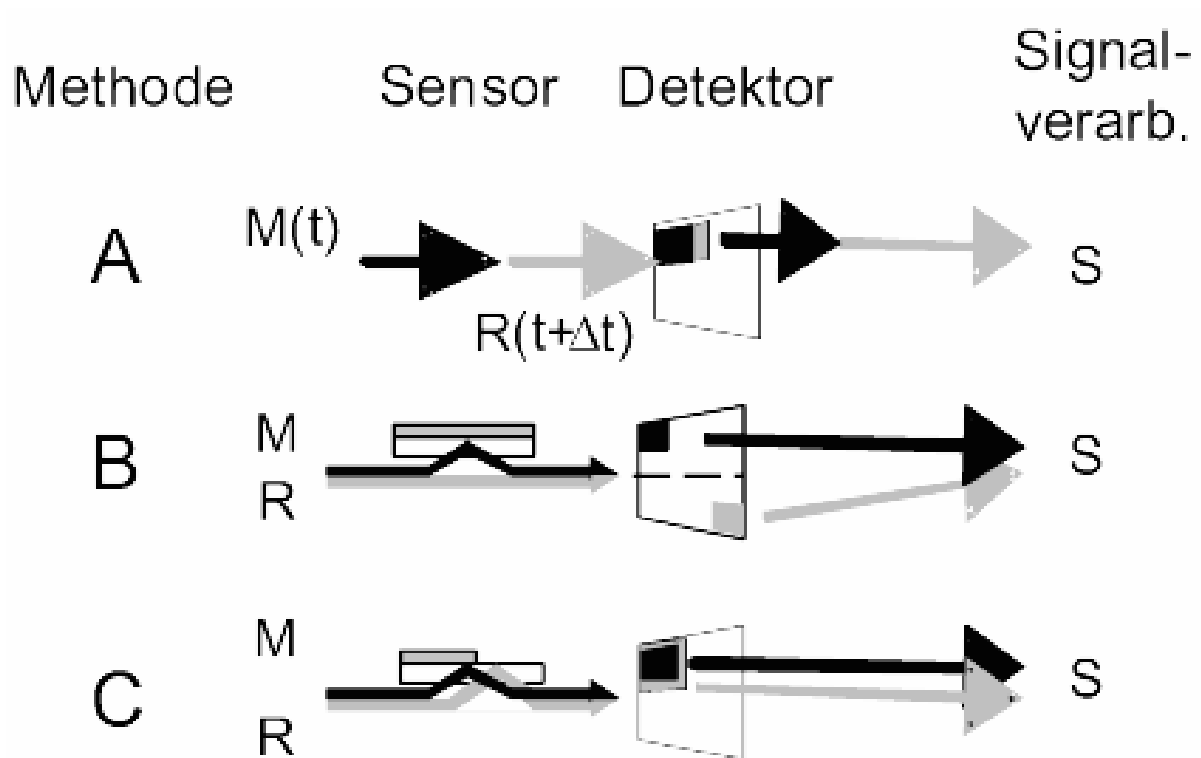


Abbildung 4.15: Verschiedene Referenzierungsmethoden schematisch im Vergleich. M (schwarzer Pfeil) und R (grauer Pfeil) stehen für Meß- und Referenzsignal. S ist das Gesamtsignal, erzeugt durch Quotientenbildung.

nicht erfasst werden können.

Methode C: Diese Methode nützt den zwischen den Wells liegenden Dichtungsbereich als Referenzierungsfläche. Damit ist eine fast ortsgenaue Referenzierung und eine exakt zeitgleiche Referenzierung möglich.

Durch zeitliche und örtliche Schwankungen ist eine Referenzierung unumgänglich, weshalb das Verständnis aus Abschnitt 4.2.2 einen tieferen Einblick in Referenzierungsstrategien liefert. Daraus folgt:

Fazit:

- Prinzipiell ist jede Art der Referenzierung hilfreich, um das Meßbild zu verbessern. Dazu ist es nicht notwendig sämtliche optischen Komponenten des Meßgerätes zu durchlaufen, jedoch steigt die Güte der Referenzierung mit der Anzahl der durchlaufenen Stationen.
- Die zweitbeste Möglichkeit der Referenzierung ist die Offline-Referenzierung. Durch sie werden zwar örtliche Effekte referenziert, aber zeitliche Effekte nur begrenzt berücksichtigt. Wie auch ROTHMUND [64] feststellte, liegt die Grenze der statistischen Verbesserung bei ca. 20×20 Pixeln (siehe Abb. 4.14). Die Ursache dieser Grenze liegt in der zeitlichen Schwankung der Lampe begründet (siehe Abschnitt 4.2).
- Die beste Möglichkeit der Referenzierung ist die Methode B (Abb. 4.15), da sie auch die zeitlichen Schwankungen eines Meßbildes referenzieren kann. Durch sie folgen größer werdende Bildflächen der erwarteten statistischen Verbesserung bis zu einer Grenze bei 50×50 Pixel. Diese Grenze ist durch die technische Grenze der CCD-Herstellung und die meßtechnische Realisierung einer optischen Apparatur bedingt. Um wirklich parallele Bilddaten zu erhalten, mit mindestens 400 Messpunkten pro Meßbild, existiert momentan keine CCD-Kamera die mehr als 50×50 Pixel pro Messpunkt zur Verfügung stellen kann. Als technischen Horizont wird eine Grenze von $0,02 \%$ Intenitätsrauschen bei 50×50 Pixel gemessen (siehe Abbildung 4.13).

4.3 Optischer Aufbau

4.3.1 Abbildungsmaßstab

Nach BIRKERT ([9], S. 77) und A. JUNG [39] sollte eine Miniaturisierung zu einer Verbesserung eines parallelen RIFS-Systems führen, da sich das Pixel:Well-Verhältnis verbessert. Dies trifft jedoch nur bei einem reproduzierbaren Signal der Oberflächenbeladung pro Well zu (siehe Glg. 2.8, S. 9). Umso inhomogener die Glasoberfläche mit Polymer beladen ist, desto größer ist die Abweichung der Beladung. Wird auf den gleichen CCD-Detektor eine kleinere Glasfläche abgebildet, so steigt pro Kamerabild die Homogenität, wodurch das Signal der maximalen Beladung pro Well reproduzierbarer wird. Diese Verbesserung ist also nur chemisch bedingt. Da aber das Quantenrauschen des Einzelpixels den CCD-Detektor limitiert und das Bild unterschiedlich homogen ausgeleuchtet ist, muß untersucht werden, ob eine Änderung des Abbildungsmaßstabes den optischen Fehler verbessert. Aus diesem Grund wurde im MiniRIFS-System der 3.ten Generation der Abbildungsmaßstab variiert. Eine scharfe Abbildung wurde durch die Verschiebung der CCD-Kamera und des letzten Achromats im Strahlengang realisiert. Gemessen wurden anschließend pro Bild das Intensitätsrauschen verschieden großer Bildflächen. Werden diese Rausch-Werte analog Abbildung 4.13 aufgetragen, so folgen diese dem Verlauf der Funktion $a/\sqrt{Pixel * Pixel}$. Zur Vereinfachung der Angabe wird die Einheit *PPS* (*pixel per spot*) definiert. Die Funktion ist somit a/\sqrt{PPS} . Wird aus diesem Datensatz pro Abbildungsmaßstab der Faktor a ermittelt, so wird ein kameraunabhängiges Maß (unabhängig der Poisson-Limitierung) für das Bildrauschen erhalten. Wird dieser Hyperbelfaktor a in Abhängigkeit des Abbildungsmaßstabes ($Pixel/mm^2$) aufgetragen, ergibt sich kein nennenswerter Zusammenhang, woraus sich eine Unabhängigkeit des Rauschens vom Abbildungsmaßstab ergibt (siehe Abbildung 4.16). Der Faktor a aller Abbildungsmaßstäbe (normiert auf Signalprozent) liegt bei $0,93 \pm 0,12 \%$. Da dieser konstant ist, sagt dies zwei Dinge aus: Erstens ist der Abbildungsmaßstab unwichtig für das grundlegende Rauschen, und zweitens ist die Ausleuchtung hinreichend gut, da der a -Wert sich nicht im Maße der Abbildung ändert (keine Proportionalität), sondern immer gleich bleibt.

Fazit:

- Das Detektorrauschen ist unabhängig vom Abbildungsmaßstab.
- Die Reproduzierbarkeit des Signals der maximalen Beladung ist abhängig vom Abbildungsmaßstab.

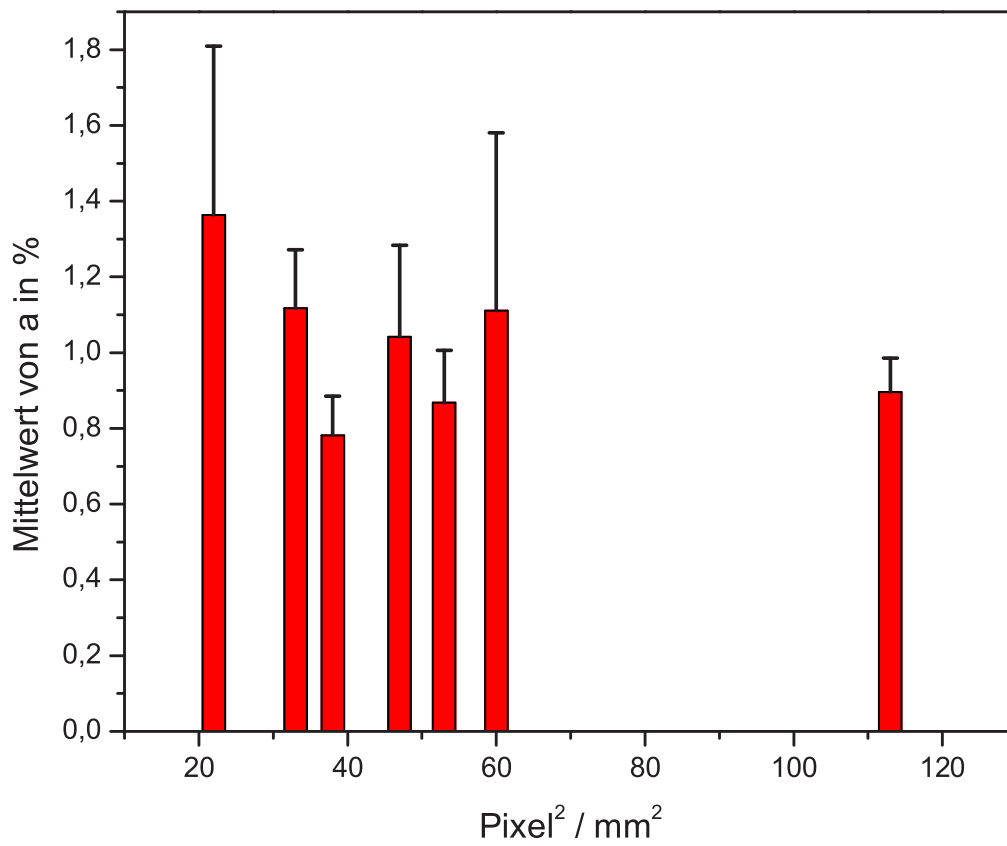


Abbildung 4.16: Kameraunabhängiger Hyperbelfaktor a (normiert auf Signalprozent) in Abhängigkeit des Abbildungsmaßstabes.

4.3.2 Mechanik

4.3.2.1 Interferenzfilter

JUNG [39] vermutete, daß die Limitierung des parallelen Systems (3. Generation) durch die mechanische Kopplung des Filtrrades an die optische Bank hervorgerufen wird. Er postulierte, dass durch die Start- und Stop-Vorgänge des Schrittmotors des Filtrrades die optische Bank zu Vibrationen angeregt wird, so dass eventuell Resonanzen entstehen. Um dies zu prüfen wurde das Filtrrad entkoppelt. Dabei stellte sich heraus, dass kein Einfluss auf das Signalrauschen durch die Entkopplung auftrat. Allerdings wird durch eine leichte Verkippung der Filter im Filtrrad der Strahlengang verzerrt. Dadurch variiert die Bildpositionen von Filter zu Filter, was bedingt, dass pro Spektrum nicht der gleiche örtliche Messfleck abgebildet wird, und somit ein Fehler in der Referenzierung auftritt.

ROTHMUND ([64]; S. 110) stellte am Interferenzfilter der Wellenlänge 672 nm ein RMS-Rauschen von 13 pm fest, wobei unklar bleibt, wie er bei einem quantenlimitierten Detektor, einer schwankenden Lichtquelle diese geringe Änderung genau dem Filter zuordnen konnte. Da Interferenzfilter typischerweise eine Breite von 10 nm besitzen, ist dieser Fehler sehr klein. Aus diesem Grund wurde eine theoretische Abschätzung berechnet, die den Fehler in der Wellenlängenskala eines Interferenzspektrum mit dem Rauschen der optischen Schichtdicke korreliert (Abbildung 4.18). Natürlich kann ein CCD-Detektor nur in der Intensitätsskala detektieren. Angenommen wurde daher ein linearer Zusammenhang des Fehlers in Abszissen- und Ordinaten-Abschnitt. Um dies zu erreichen wurde eine normalverteilte Rauschfunktion in `VirtuRiFS` implementiert, welche in der horizontalen Ebene des Interferenzspektrum variabel den Rauschanteil erhöhen kann (Abbildung 4.17). Daraus ergab sich ein Faktor von $0,02546 \text{ } iu_{\alpha}/\text{pm}$ bei der Annahme gleichverteilten Rauschens.

Fazit:

- Das optische Schichtdickenrauschen wird nicht durch mechanische Kopplung des Filtrrades an die optische Bank verursacht.
- Das optische Schichtdickenrauschen pro Wellenlängenrauschen im Interferenzspektrum beträgt $0,02546 \text{ } iu_{\alpha}/\text{pm}$.

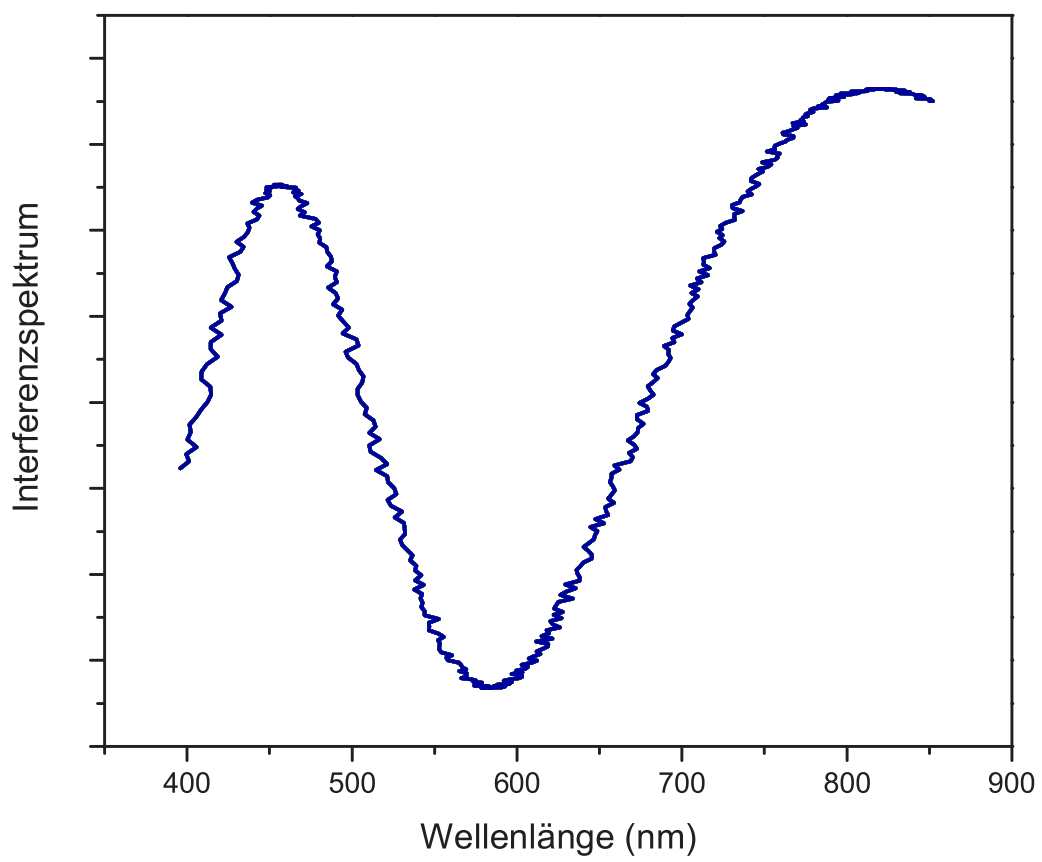


Abbildung 4.17: Wellenlängenverraushtes Interferenzspektrum.

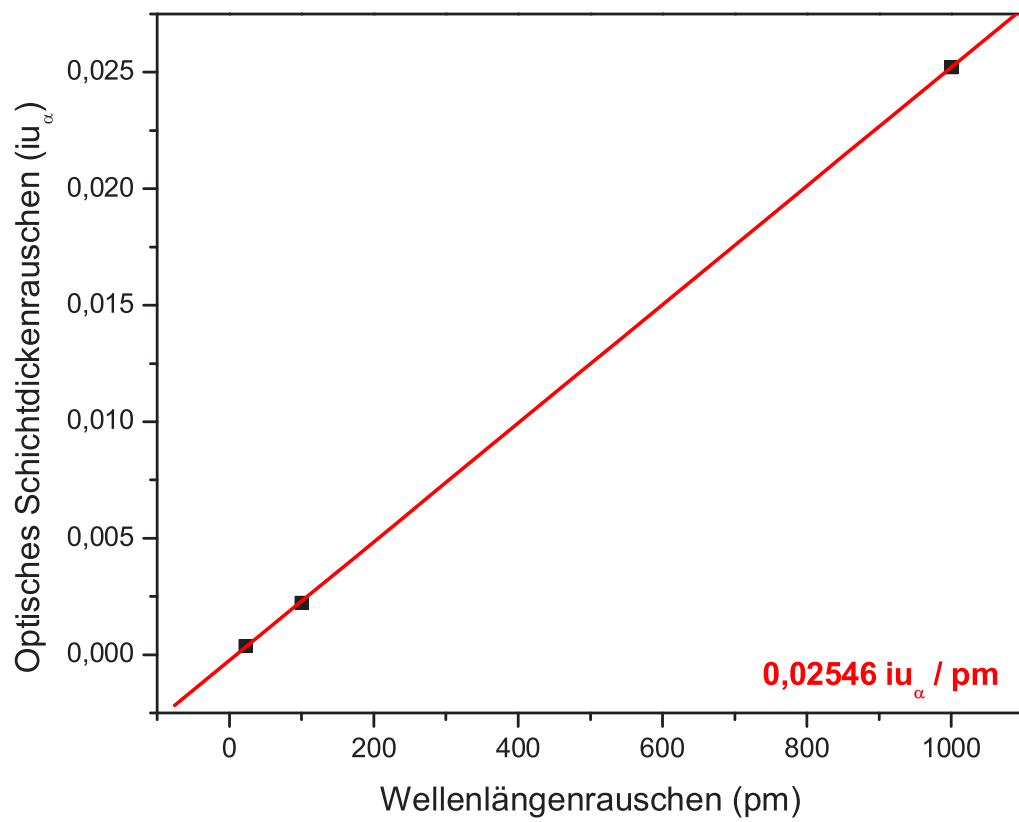


Abbildung 4.18: Optisches Schichtdickenrauschen pro normalverteiltes Wellenlängenrauschen.

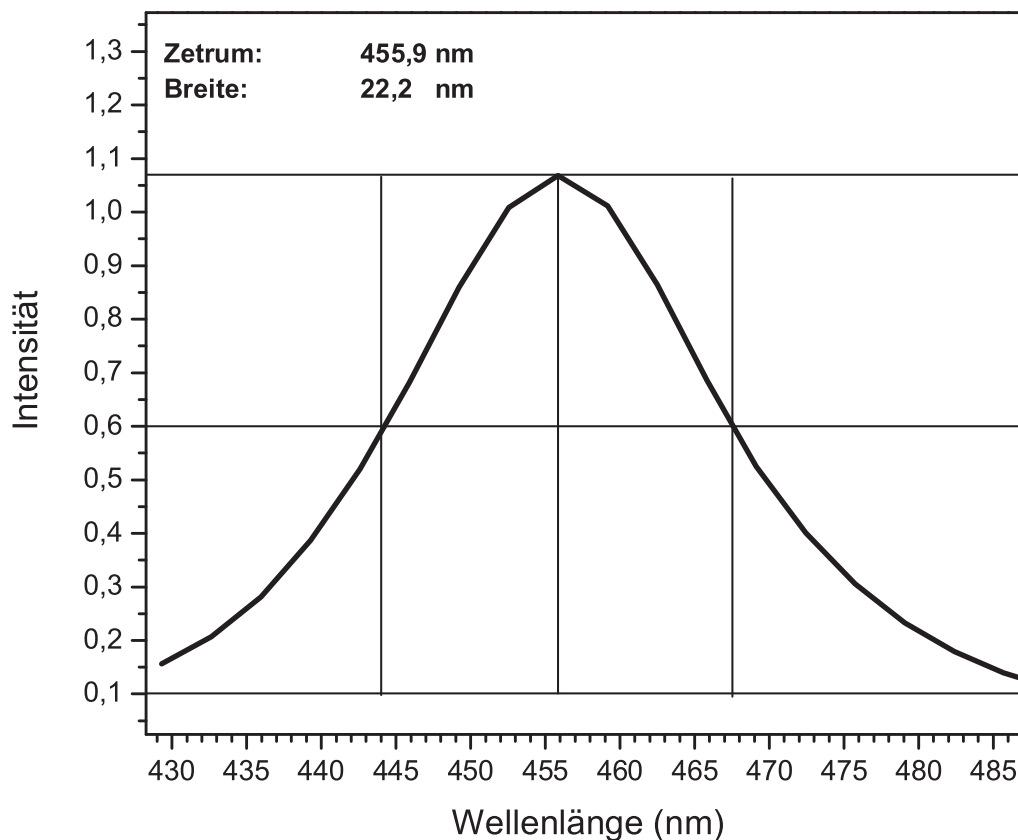


Abbildung 4.19: Spektrales Intensitätsmuster der LED der technisch angegebenen Wellenlänge 455 nm.

4.3.2.2 Leuchtdioden

Die Leuchtdioden von Luxeon haben im Gegensatz zu den Interferenzfiltern eine größere spektrale Breite zwischen 10 – 15 nm. Für die Diode mit 455 nm ermittelt sich die Breite von $11,1 \pm 0,1$ nm (Abbildung 4.19).

4.3.2.3 Stereomikroskop-Aufbau

4.3.2.3.1 Verbesserung im Vergleich zum MiniRfS-System der 3. Generation

Ein quantitatives Maß für das parallele System, unabhängig der Pixelanzahl, der Elektronenkapazität (der CCD) und der Lampe (der Referenzierung) liefern die in Tabelle 4.5, S. 102 ermittelten Werte. Wären diese Faktoren unveränderlich und limitierend für ein paralleles RfS-System, so könnte es nur noch durch statistische Aufsummierung der Intensitäten in der

Zeitskala verbessert werden. Dies ist einer der Gründe, warum der LED-Ansatz für ein neues paralleles System gewählt wurde. Das MiniRIfS-System der 3. Generation benötigt mindestens 18 s für eine Filterradumdrehung, wenn keine zeitliche Verzögerung zwischen den Filterpositionen vorliegt. Wird ein zeitliches Ausschwingen für jede Filterposition berücksichtigt, dauert die Umdrehung ca. 20 – 30 s. Für biomolekulare Messungen ist dies durchaus noch akzeptabel, da diese bis zur Gleichgewichtseinstellung im Bereich von 10 – 30 min liegen.

Mit Hilfe der LEDs ist es jedoch möglich ein Spektrum mit sechs Wellenlängen innerhalb einer Sekunde aufzunehmen. Wie in Tabelle 3.1 (S. 38) beschrieben, liegen die Integrationszeiten der SVGA-Kamera von PCO zwischen 4 – 60 ms pro Leuchtdiode. Prinzipiell wäre es also sogar möglich innerhalb einer Sekunde 2-10 Spektren aufzunehmen, wenn eine Kamera diese schnellen Bildaufnahmen erlaubt. Die SVGA-Kamera von PCO kann maximal 8 FPS aufnehmen, weshalb nur die Aufnahme eines Spektrums pro Sekunde möglich ist. Eine Ausnutzung dieses Geschwindigkeitsvorteil sollte das Systemrauschen über zeitliche Mittelwertbildung um dem Faktor $\sqrt{30} = 5,5$ verbessern.

Jedoch wurde der Stereomikroskop-Ansatz noch aus einem zweiten Grund gewählt: Die Optik des Mikroskopes wurde speziell für ein Auflichtsystem gerechnet und die Linsen wurden exakt für dieses System geschliffen. In jedem anderen optischen Aufbau würden die Linsen einen optischen Fehler erzeugen, da sie nicht auf das Zentrum hin optimiert wurden, sondern auf zwei nichtzentrische Strahlengänge. Hinzu kommt die geschlossene kompakte Anordnung der optischen Komponenten. Das optische System ist – im Gegensatz zum offenen Lins-Aufbau – keinen weiteren Störeinflüssen ausgesetzt wie Fehlstrahlung, Staubpartikeln, usw. Die Bildausleuchtung des Stereomikroskops ist sehr homogen, was ein weiteres Maß für die optische Verbesserung darstellt. Aus diesem Grund ist auch der systemspezifische Faktor in Tabelle 4.5 um einen Faktor 5 besser als der des 0°-RIfS-Aufbaus der 3. Generation.

Fazit:

- Der MiniRIfS-Aufbau der 4. Generation (mit Stereomikroskop) liefert zeitlich eine Verbesserung um den Faktor 5,5 und optisch eine Verbesserung um den Faktor 5, d.h. dieses System liefert eine Verbesserung um den Faktor 25.

4.3.2.3.2 Experimentelle Daten

Aufgenommen wurden pro LED jeweils 100 CCD-Bilder, wobei das CCD-Bild zur einen Hälfte aus Mess- und zur anderen Hälfte aus Referenzfeld bestand. Anschließend wurde aus dem ersten Bild pro LED ein Spektrum ermittelt, bis 100 Spektren pro Messpunkt erhalten wurden. Diese wurden `MatLab` zur Berechnung des Extremums übergeben. Hierdurch konnte dann von diesen 100 Zeitpunkten das Rauschen der Optischen Schichtdicke der Extremas berechnet

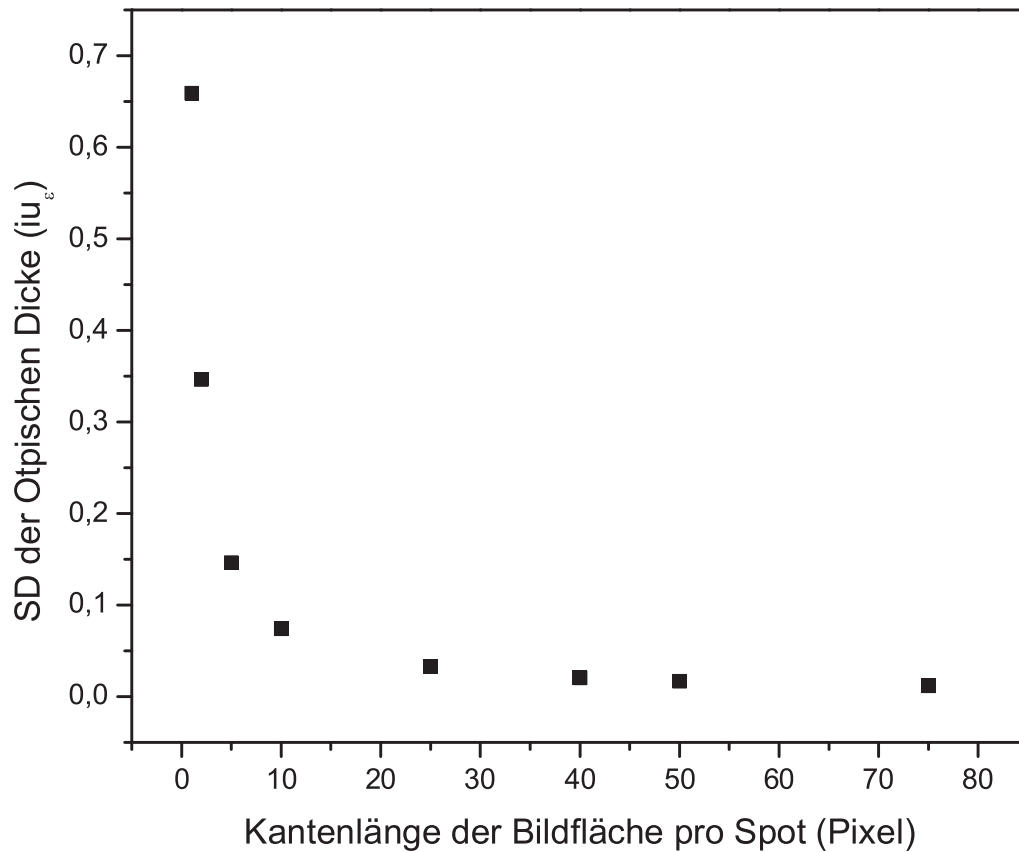


Abbildung 4.20: Optisches Schichtdickenrauschen in Abhängigkeit der Wurzel der Pixel pro Spot.

werden (siehe Abbildung 4.20). Ermittelt wurde der Faktor $772 \pm 79 \text{ } iu_\epsilon/\%$, indem der jeweilige Schichtdickenfehler mit dem entsprechenden Wert \sqrt{PPS} multipliziert wurde und dann der Mittelwert all dieser Werte gebildet wurde.

Fazit:

- Das Optische Schichtdickenrauschen pro Intensitätsrauschen beträgt $772 \pm 79 \text{ } iu_\epsilon/\%$, wobei als Superstrat Luft vorherrschte, d.h. bei Messungen in Lösung verdoppelt sich dieser Faktor.

4.3.3 Interferenzschicht

4.3.3.1 Interferenzeinheit

Durch eine Vielzahl von Diskussionen mit Kollegen und Besuchern in der Arbeitsgruppe GAUGLITZ stellte sich immer wieder Verwirrung ein, bei der Erklärung, was die optische Schichtdicke ist und welche Einheit sie besitzt. Der Punkt war, dass die Optische Schichtdickeneinheit nm oder pm keine absolute Einheit ist und sehr wenig mit einer physikalischen Längeneinheit zu tun hat. Nach NAHM [50] entspricht die Optische Schichtdicke per Definition für ein Einschichtsystem dem Produkt $n \times d$. Für diesen Spezialfall stimmt die Bezeichnung einer Maßeinheit, wenn durch den Brechungsindex der Schicht dividiert wird ($n \times d/n = d$). Wie auch im Anhang (Siehe Kapitel 6.1.1) beschrieben, gelten für die RfS-Theorie spezielle Randbedingungen. Desweiteren ist in dem Definitionsmodell von RfS die Dispersion der Einzelmedien nicht berücksichtigt (siehe Glg. 2.22, S. 18). Aus diesem Grund ist es selbst bei einfacheren Mehrschichtsystemen nicht mehr sinnvoll eine Längeneinheit in m anzugeben. Es ist sowohl irreführend, als auch falsch. Die optische Schichtdicke ist zwar eine Einheit, die mit einer physikalischen Längengröße korreliert werden kann (für kleine Schichtdickenänderungen), aber nicht korrelieren muß. Eine Begründung stellt z.B. folgende physikalische Schichtdickenänderung des Polymers AMD in Abbildung 4.21 dar, da eine lineare Korrelation nur begrenzt gegeben ist. In folgender Abbildung wurden verschiedene Schichtsysteme simuliert, bei denen die Polymerschicht von 0–90 nm variiert wurde.

Daraus läßt sich schließen, das eine Korrelation der Optischen Schichtdicke mit physikalischen Schichtdaten wie Brechungsindex bzw. Schichtdicke nur durch theoretische Abschätzung oder ellipsometrische Messdaten erlaubt ist.

Im vorhergehenden Abschnitt wurde die Absolutheit der Optischen Schichtdicke in Frage gestellt. Im folgenden wenden wir uns der Relativität der Einheit zu. Die Frage ist ob zwei Systeme mit unterschiedlichem Schichtaufbau oder Einstrahlwinkel untereinander vergleichbar sind. Deshalb wurden unterschiedliche Systeme simuliert und das Interferenzspektrum unterschiedlich verrauscht. Diese Simulation gibt zwar keine Auskunft über die relative Änderung der Optischen Schichtdicke pro physikalischer Schichtdickenänderung, liefert dafür aber den Einfluss des Rauschens auf Interferenzspektren. Dadurch kann z.B. das Detektorrauschen eines RfS-Aufbaus mit dem eines anderen RfS-Aufbaus verglichen werden (siehe Abbildung 4.23).

In Tabelle 4.2 werden die in der Arbeitsgruppe GAUGLITZ bekannten parallelen RfS-Systeme zusammengefasst. Durch die in Tabelle 4.3 (S. 84) ermittelten iu -Umrechnungsfaktoren, wird das relative pm -Rauschen der verschiedenen Systeme auf das Schichtsystem α mit dem Einheit iu_α normiert. Daraus wird ersichtlich, dass sich alle Fehlerwerte der Optischen Schichtdicke in

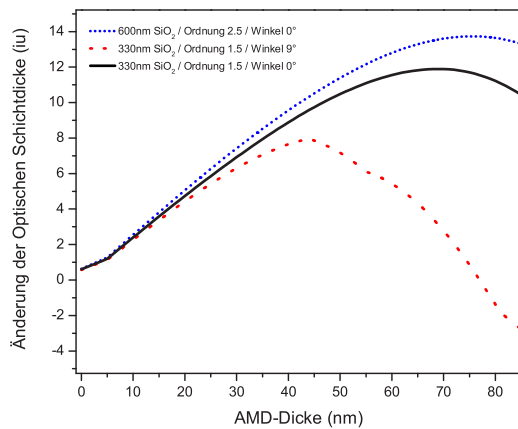


Abbildung 4.21: Änderung der optischen Schichtdicke in Abhängigkeit der Polymerschichtdicke (AMD). Anfangssteigung $222 iu/nm$.

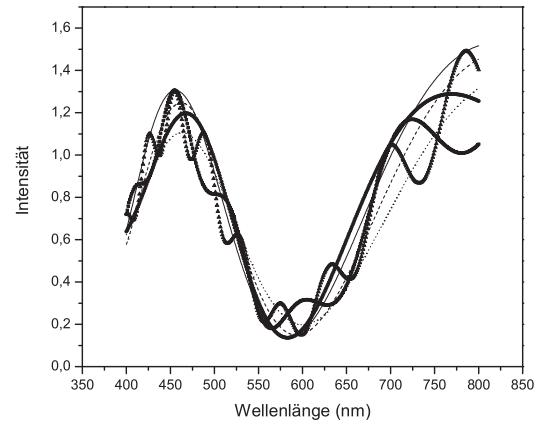


Abbildung 4.22: Interferenzspektren mit einer AMD-Dicke von 30, 60, 200, 1000, 2000 nm .

der gleichen Größenordnung wiederfinden. Die optische Schichtdicke des am Einzelplatz gemessenen Schichtsystems α lässt sich mit der ursprünglichen Einheit über $iu_\alpha = 1000 \cdot nm$ umrechnen.

Fazit:

- Die optische Schichtdickenänderung hängt von sehr vielen Parametern ab, weshalb eine relative Einheit iu eingeführt wurde, die keine Verwechslung mit einer wirklichen physikalischen Größe (wie Längeneinheit pm) zulässt. Die optische Schichtdicke ist abhängig von:
 - dem Einstrahlwinkel des Lichtes in das Schichtsystem
 - dem Brechungsindex und der Schichtdicke jeder einzelnen Teilschicht inklusive Sub- und Superstrat
 - der Beladung der Oberfläche mit aktiven Bindungsstellen
 - dem Polymer auf der Oberfläche
 - dem zu untersuchenden Molekül und dem Puffer, da bei einer biomolekularen Wechselwirkung nicht immer exakt erklärbar ist, wann eine Polymerschicht anschwillt und wie sich der Brechungsindex dieser Schicht bei Einlagerung der bindenden Moleküle verändert. Es ist durchaus möglich, dass trotz molekularer Wechselwirkung eine negative Bindungskurve oder keine Bindungskurve auftritt (siehe HAAKE [27]).

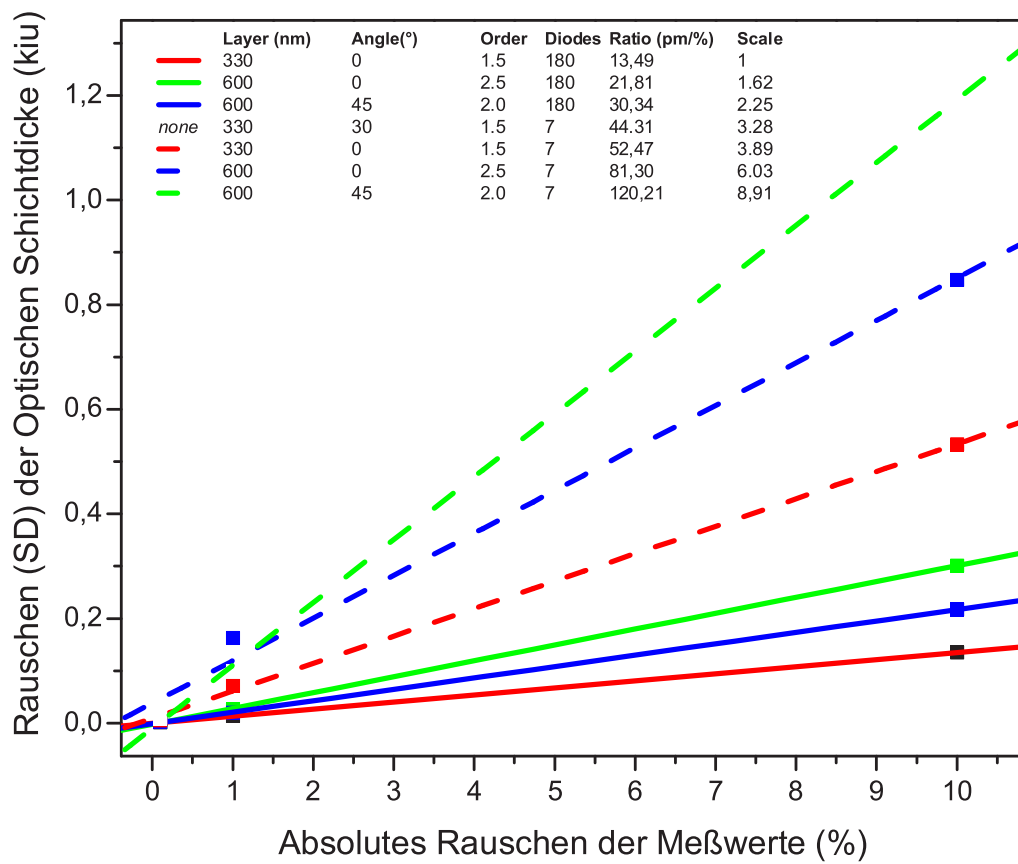


Abbildung 4.23: Optisches Schichtdickenrauschen in Abhängigkeit vom Interferenzspektrumrauschen. Das Schichtsystem mit dem Einstrahlwinkel 30° wurde nicht im Diagramm aufgetragen (*none*).

Aufbau	Demonstrator	Librarian	3. Generation (45°)	3. Generation (0°)
SiO ₂ -Schicht	330 nm	330 nm	600 nm	600 nm
Referenzierung	Simultan; Keilplatte (ROTHMUND [64], S.81)	Simultan; Keil- platte (BIRKERT [9], S.33)	Simultan; Be- amsplitting (SAUER [67]; JUNG [39])	Sequentiell
Einstrahlwinkel	30	30	45	0
RMS-Rauschen der Opt. Dicke	7 – 35 pm	20-40 pm	60-350 pm	60-250 pm
RMS-Rauschen der Opt. Dicke	2 - 12 iu_α	7-13 iu_α	7-39 iu_α	10-41 iu_α

Tabelle 4.2: Vergleich verschiedener paralleler RIFS-Systeme.

- Werden diese Parameter für ein RfS-System bei einer Messung oder Simulation nicht angegeben, sind die Messwerte wissenschaftlich nicht vergleichbar mit anderen RfS-Systemen. Um verschiedenen Systeme untereinander vergleichen zu können ist die Korrelation zwischen den Einzelsystemen zu ermitteln, da sonst ein Vergleich nicht möglich ist.

4.3.3.2 Interferenzsysteme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Interferenzschichtsysteme analysiert und genutzt. Durch die grosse Vielzahl der eingehenden Variablen in ein Schichtsystem wurde eine Klassifizierung genutzt, um schnell das entsprechende System anzugeben (Tabelle 4.3). Die neu eingeführte Optische Schichtdickeneinheit iu_x trägt aus diesem Grund im Index immer das entsprechende Schichtsystem um die Interferenzeinheit dem Schichtsystem zuordnen zu können. Wie bereits im vorherigen Abschnitt 4.3.3.1 erläutert, ist die Optische Schichtdickeneinheit stets relativ, weshalb zusätzlich zur Schichtsystemklassifizierung in Tabelle 4.3 die Umrechnungsfaktoren für das Schichtdickenrauschen und die Signale der Gleichgewichtsbeladung zusammengefasst sind, die in diversen Kapiteln dieser Arbeit abgeleitet wurden.

4.3.3.3 Interferenzspektrum

4.3.3.3.1 Ordnung

Nach KRAUS [40] wird die Ordnung eines Extremwerts eines Interferenzspektrums wie in Kapitel 2.4.1.1 bestimmt. Der Nachteil dieser Methode ist, dass die Wellenlängen zweier benachbarter Extremas benötigt werden, um die Ordnung eines Extremums zu bestimmen. Um die Ordnung aus nur einem Extremum zu bestimmen, ist entweder eine detailgetreue Schichtsimulation oder ein hinreichend genaues Modell erforderlich. Im Folgenden wird eine vom Einschichtsystem abgeleitete *Cosinus*-Anpassungsfunktion (Abbildung 4.24) dargestellt, welche hinreichend genau die entsprechende Ordnung eines Extremums liefert.

$$y = A * \cos((xExtrema * m * 2 * \pi)/x) + yOffset$$

Die Parameter der Funktion werden so lange variiert, bis sich die Ordnung m mit halbzahligen Werten einstellt. Durch die Dispersion der Teilschichten treten Verzerrungen im Interferenzspektrum auf. Da die \cos -Funktion eine idealisierte Funktion ist, passt sich diese nicht exakt an reale Interferenzspektren an. Aus diesem Grund wurde ein Algorithmus entworfen, der alle Extrema eines Interferenzspektrums findet und die \cos -Funktion mit einer einhüllenden Glättungsfunktion modifiziert (4.25). So kann im Gegensatz zum Algorithmus von KRAUS auch

System	α	β	δ	γ	ϵ	σ
Einstrahlwinkel	0°	0°	0°	45°	9°	30°
Glas	Schott D263	Corning 1737	Corning 1737	Corning 1737	Corning 1737	Schott D263
hochbrechende Interferenzschicht	10 nm Ta ₂ O ₅	9,7 nm Nb ₂ O ₅	9,7 nm Nb ₂ O ₅	9,7 nm Nb ₂ O ₅	9,7 nm Nb ₂ O ₅	10 nm Ta ₂ O ₅
SiO₂	330 nm	330 nm	600 nm	600 nm	600 nm	330 nm
Polymer	30 nm	30 nm	30 nm	30 nm	30 nm	30 nm
Ordnung	1,5	1,5	2,5	1,5	3	1,5
Signalhub	theor.	theor.	theor.	theor.	theor.	theor.
Datenpunkte Kurvenanpassung	180	180	7	7	6	7
Dynamik	14 bit	14 bit	12 bit	12 bit	12 bit	12 bit
$\dot{i}u_\alpha$-Rauschfaktor	1	< 0,955 $\frac{\dot{i}u_\alpha}{\dot{i}u_\beta}$	< 1/6 $\frac{\dot{i}u_\alpha}{\dot{i}u_\delta}$	< 1/9 $\frac{\dot{i}u_\alpha}{\dot{i}u_\gamma}$	-	< 1/3 $\frac{\dot{i}u_\alpha}{\dot{i}u_\sigma}$
$\dot{i}u_\alpha$-Faktor für Maximalbeladung	1	1 $\frac{\dot{i}u_\alpha}{\dot{i}u_\beta}$	0,87 $\frac{\dot{i}u_\alpha}{\dot{i}u_\delta}$	1,37 $\frac{\dot{i}u_\alpha}{\dot{i}u_\gamma}$	-	-
S/R-Verhältnis	< 2000 (600)	< 1910 (573)	< 383 (120)	< 162 (49)	-	-

Tabelle 4.3: Einteilung der Interferenzschichtsysteme in Gruppen. Die Angabe *theor.* bedeutet, daß der Signalhub in Abhängigkeit vom Gesamtsystem jeweils theoretisch berechnet wurde. Er wurde aus dem reflektierten Anteil des Lichts ermittelt und nicht auf 100 % normiert. Für die Berechnung der S/R-Verhältnisse wurde eine optimale Maximalbeladung von 2000 $\dot{i}u_\alpha$ angenommen. In Klammer wird das Verhältnis mit einer angenommenen Maximalbeladung von 600 $\dot{i}u_\alpha$ angegeben.

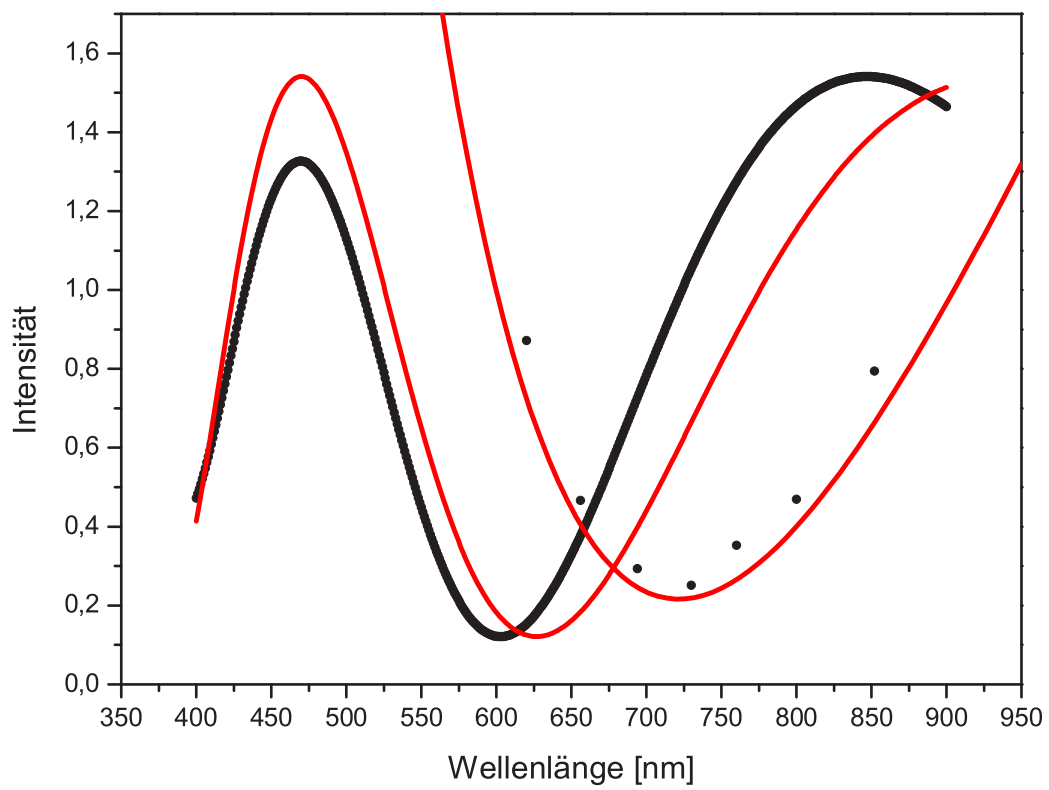


Abbildung 4.24: Interferenzspektrum eines Einzelplatzgerätes und des MiniRIfS-Aufbaus der 3. Generation mit angepasster Funktion.

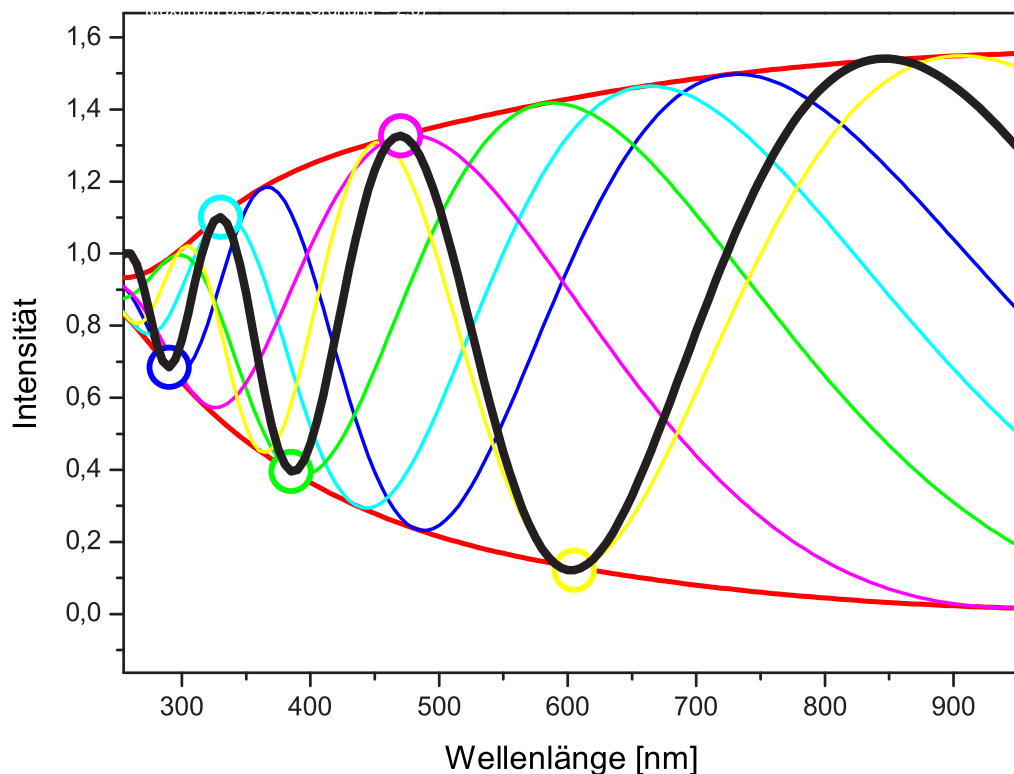


Abbildung 4.25: Durch Dispersion verzerrte Interferenzspektren und darauf abgebildete cos-Anpassungsfunktionen.

die Ordnung von Extremas in dispersionsverzerrten Interferenzmustern bestimmt werden, ohne daß ein zweites Extremum bekannt sein muß.

Es ist entscheidend, die Ordnung bei der Berechnung der Optischen Schichtdicke zu kennen, wobei die Opt. Schichtdicke nach KRAUS per Definition unabhängig der Ordnung sein sollte. Durch die Dispersion der Teilschichten weicht die Realität jedoch vom Idealmodell ab. Aus diesem Grund sind ausgewertete Optische Schichtdicken bei unterschiedlichen Ordnungen nicht identisch (Abbildung 4.27). Die Steigung pro Ordnung nach linearer Anpassung in Abbildung 4.26 hat den Wert $0,26445 \Delta i u_{\alpha} / \text{Ordnung}$. Als Schichtsystem wurde BK7-Glas mit 10 nm Ta_2O_5 und 330 nm SiO_2 angenommen, wobei auf diesem Schichtsystem die Polymerdicke von $6 - 20 \text{ nm}$ AMD variiert wurde. Als Superstrat wurde PBS angenommen. Die lineare Anpassung ist sicherlich eine Näherung, da durch die Dispersion ein evtl. periodisches Muster in

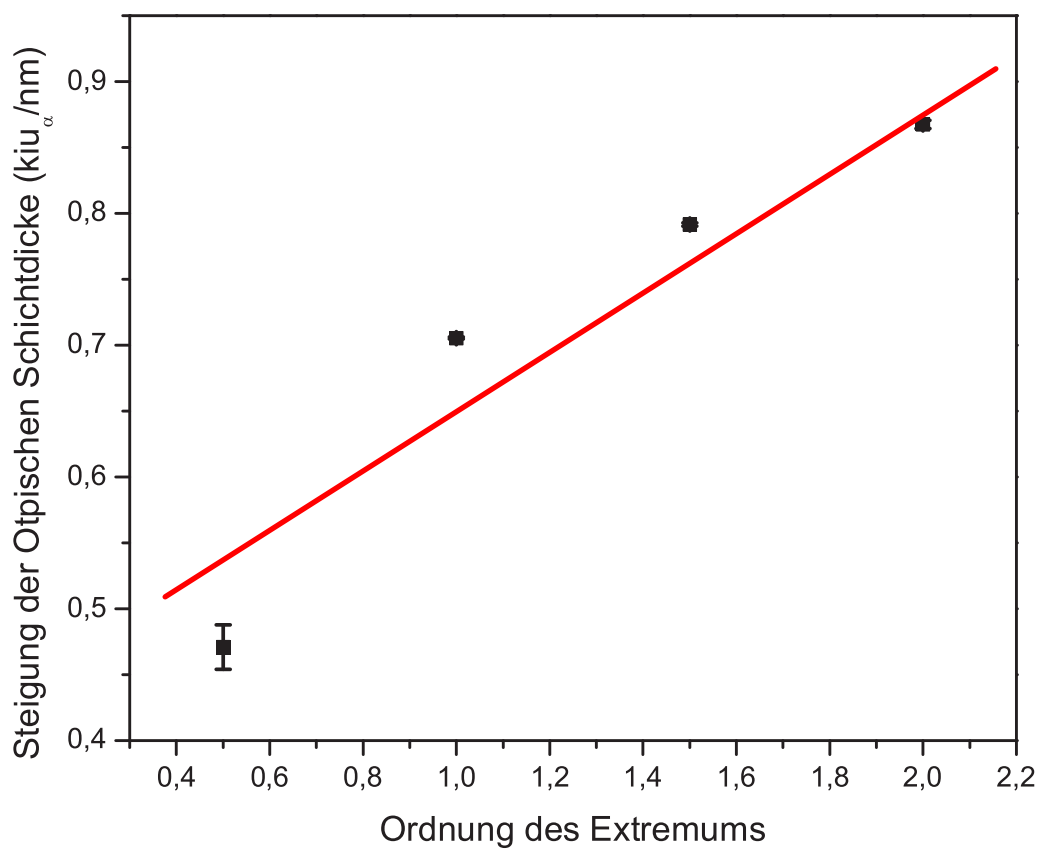


Abbildung 4.26: Steigung der Optischen Schichtdicke bei verschiedenen Ordnungen.

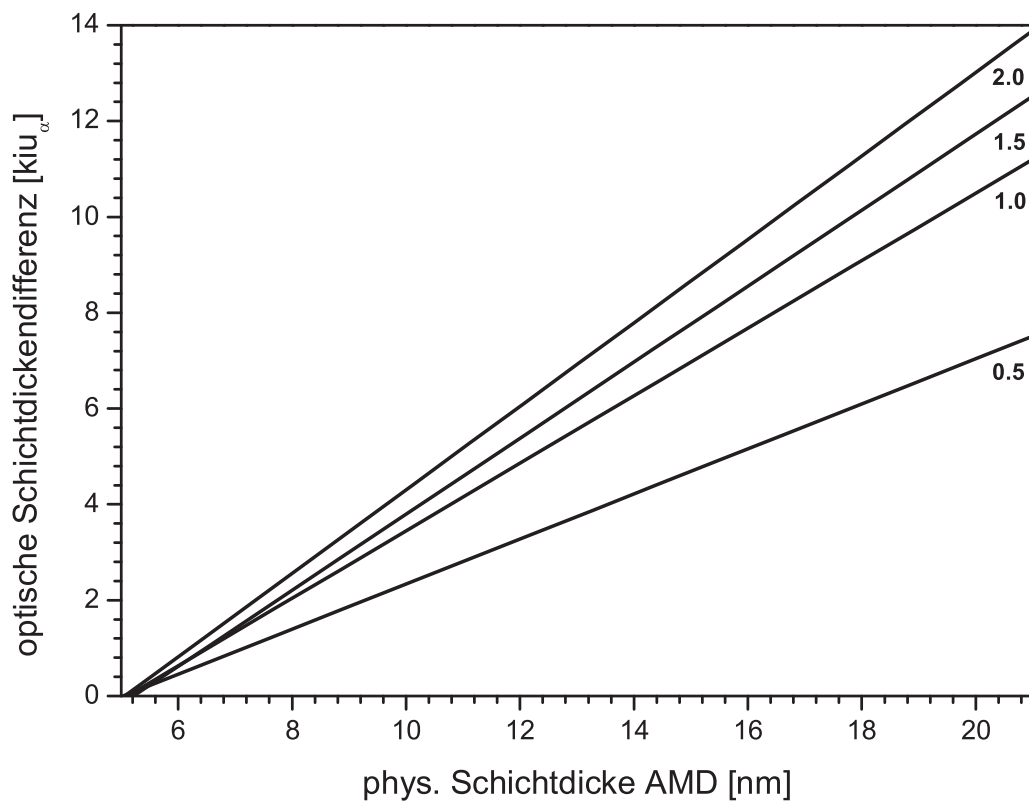


Abbildung 4.27: Optische Schichtdickenänderung bei unterschiedlichen Ordnungen.

Abhängigkeit der Ordnung möglich ist. Diese Näherung genügt aber als schnelle Abschätzung für die Umrechnung bereits gemessener Optischer Schichtdicken.

Fazit:

- Durch eine modifizierte cos-Anpassungsfunktion ist es möglich, von Extrema mit und ohne Nachbarextremum die Ordnung zu bestimmen.
- Durch ein Variation der cos-Funktion mit einer Spline-Glättungsfunktion ist es möglich, dispersionsverzerrte Interferenzspektren anzupassen.
- Die Steigung der Optischen Schichtdicke pro Ordnung beträgt $0,26445 \Delta i u_{\alpha} / \text{Ordnung}$.

4.3.3.3.2 Glättung

Der größere Fehler der optischen Schichtdicke bei parallelen RIFS-Messungen im Vergleich zu Einzelplatzgeräten ist unter anderem durch die geringe Anzahl der zur Verfügung stehenden Wellenlängen zur Interferenzspektrenbeschreibung zu erklären. Ein Ansatz um diese statistische Verschlechterung zu verbessern, ist die Glättung des Interferenzspektrums mittels Glättungsalgorithmen. Als Glättungsfunktionen wurde Spline und B-Spline verwendet. Ein Spline ist ein Begriff aus der numerischen Mathematik und bezeichnet ein stückweises Polynom, das stetig ist. Sind die einzelnen Polynome alle linear, so nennt man den Spline linear, analog gibt es quadratische, kubische usw. Splines³. Wie auch der Raum der Polynome ist der Raum der stückweisen Polynome ein Vektorraum und hat eine Basis. Im Kontext numerischer Verfahren, wo Splines häufig eingesetzt werden, ist die Wahl der Basis entscheidend für eventuelle Rundungsfehler und damit für die praktische Einsetzbarkeit. Eine bestimmte Basis hat sich hier als am besten geeignet herausgestellt: sie ist numerisch stabil und erlaubt die Berechnung von Werten der Spline-Funktion mittels einer Drei-Term-Rekursion. Splines, die in dieser Basis dargestellt werden, nennt man B-Splines. Sie werden vor allem zur Interpolation von Funktionen benutzt [18], [10]. Da bei der Optischen Schichtdickenberechnung in erster Linie eine spektrale Änderung verfolgt wird, sollte der Fehler durch eine Polynomannpassung an die Datenpunkte minimiert werden. Diese Verbesserung liegt zwischen 4 – 6%.

Die stetigen Eigenschaften der Spline-Funktionen erlauben es auch, Ableitungen der Interferenzspektren zu bilden (implementiert in `VirtuRIFS`), wodurch z.B. die Randpunkte der auszuwertenden Extremas durch die Wendepunkte der Interferenzspektren angegeben werden können. Würde die Auswertung auf die Wendepunkte des Interferenzspektrums normiert werden, so hätte dies den Vorteil, dass im Spektrum selbst eine konstante Größe enthalten wäre, welche die verschiedenen Auswertestrategien vereinheitlicht.

Fazit:

- Eine B-Spline Glättungsfunktion verbessert die Auswertung eines Interferenzspektrums mit 7 Datenpunkten um maximal 4 – 6 %.
- Die Wendepunkte links und rechts eines Extremums dienen als implizite Größe eines Interferenzspektrums. Die Wendepunkte müssen nicht die beste Wahl bezüglich der Auswertestrategie sein, sind jedoch ein absoluter Bezugspunkt, der zur Normierung herangezogen werden kann.

³Der Begriff stammt aus dem Schiffbau: eine lange dünne Latte, die an einzelnen Punkten durch Nägel fixiert wird, biegt sich genau wie ein kubischer Spline.

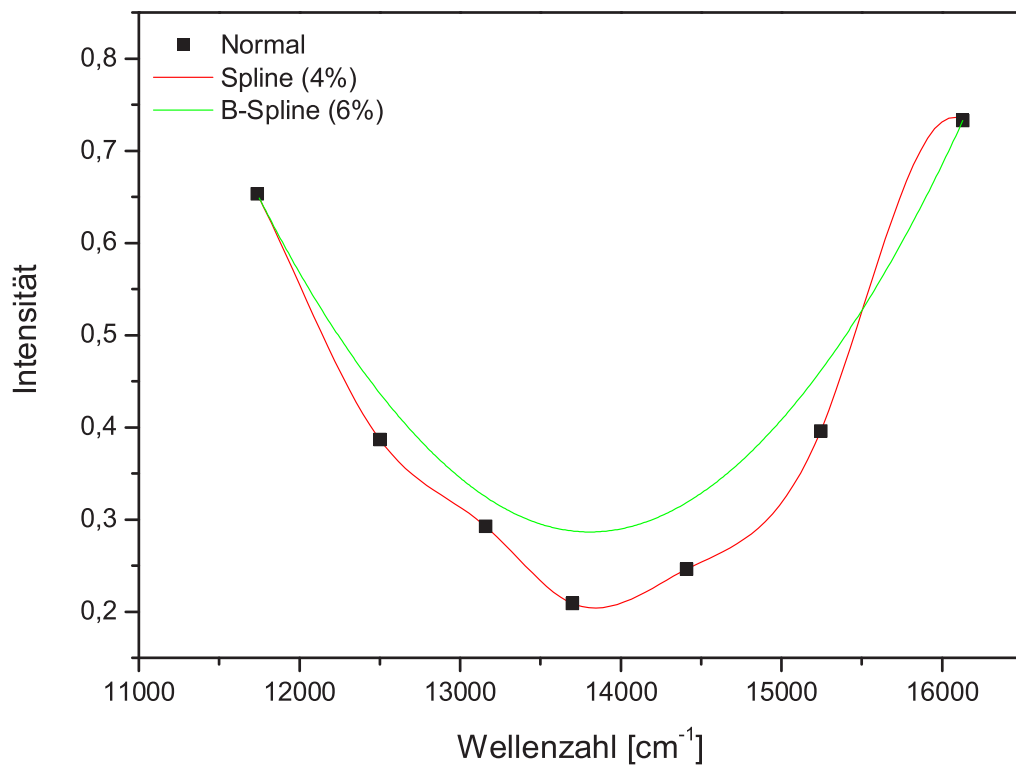


Abbildung 4.28: Verschiedene Glättungsfunktionen angewendet auf ein Interferenzspektrum.

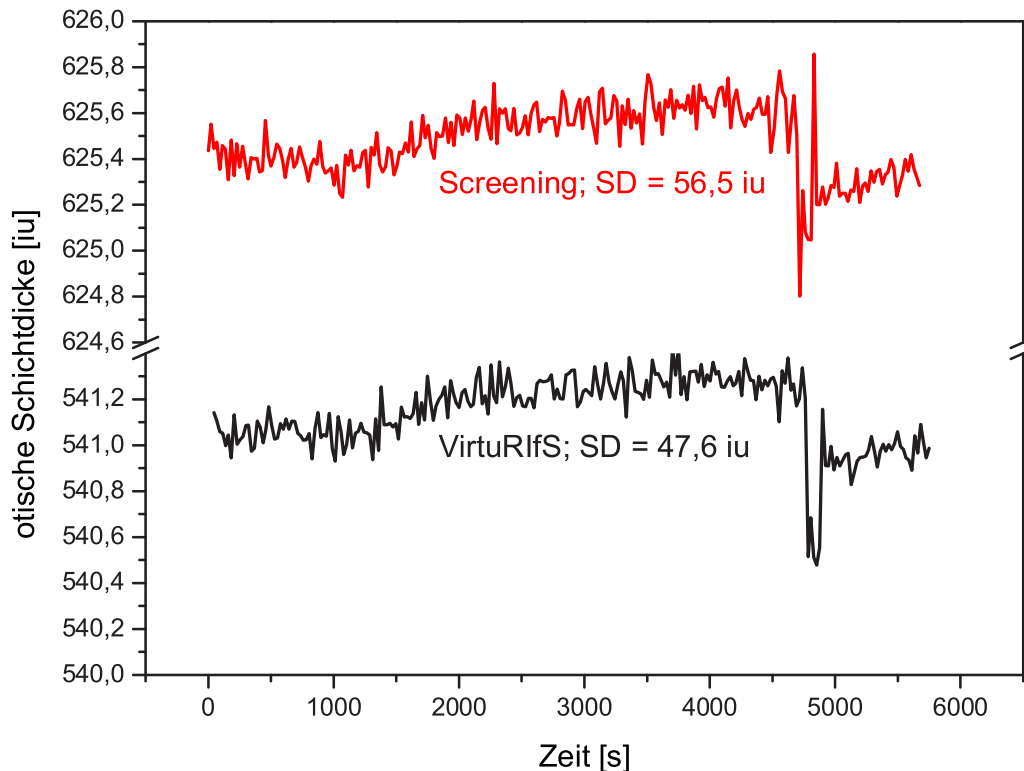


Abbildung 4.29: Vergleich der Auswertung von Interferenzspektren mittels Screening und VirtuRIfS.

4.3.3.3 Vergleich zu anderen Auswertungen

Durch das BMBF-Projekt Librarian wurde der Gruppe GAUGLITZ die Steuer- und Auswertesoftware **Screening** zur Verfügung gestellt. Der Vorteil dieser Software ist die Echtzeitauswertung paralleler Reflexionsspektren (nicht Interferenzspektren). Der Nachteil ist, dass weder die Referenzbildanordnung, die Ansteuerung des Filtrerrades, noch die Rohdatenauswertung verändert werden kann, da die Quelldateien nicht zur Verfügung stehen. Auch ist eine Extraktion der Rohdaten nicht möglich, wodurch eine Analyse der Meßdaten und eine Modifikation des Meßsystems entfällt. Aus diesem Grund wurde die Auswertung von **Screening**-Messdaten (referenziert; keine Rohdaten) mit dem Programm **VirtuRIfS** realisiert. Ein Vorteil der **VirtuRIfS**-Software ist auch der Vergleich mit gleichen Auswertelgorithmen wie sie in der **Ifz**-Software von KRAUS implementiert sind. Da die Auswertung unter anderem von der Anzahl der Datenpunkte und der Anpassungsfunktion abhängt, sind die beiden Auswerteprogramme im Rahmen

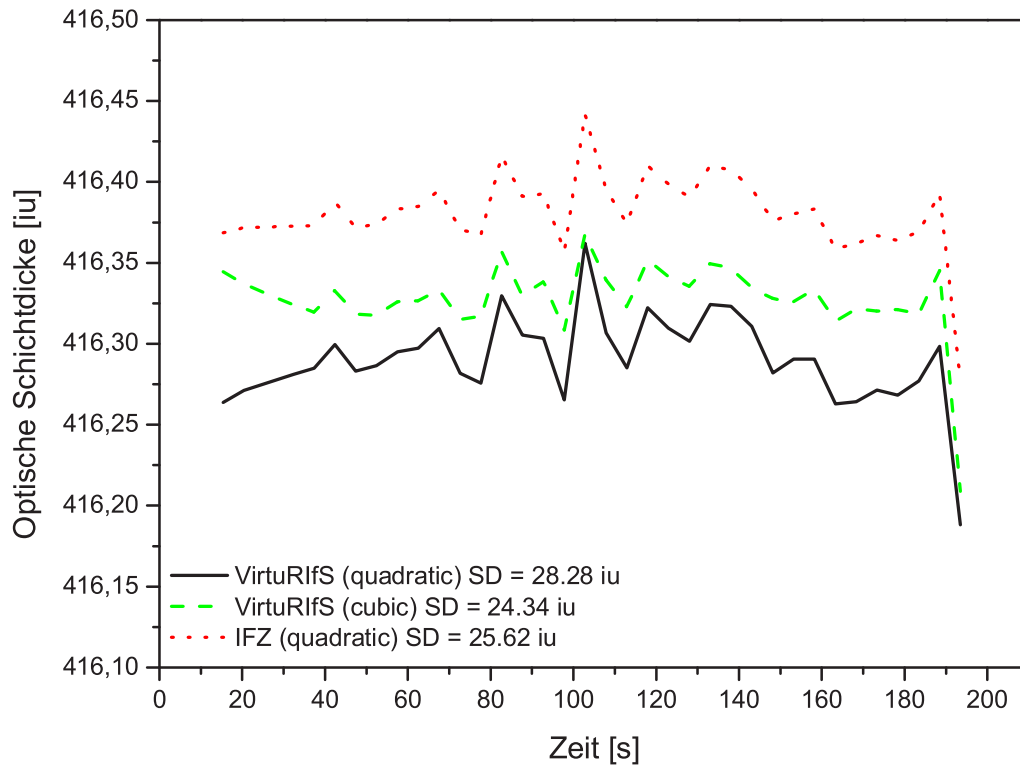


Abbildung 4.30: Vergleich der Auswertung von Interferenzspektren mittels Ifz und VirtuRIfS.

dieser Abhängigkeiten vergleichbar.

Dasselbe gilt für den Vergleich der VirtuRIfS- zur Screening-Software (Abbildung 4.29)⁴.

Der Unterschied im Offset der beiden Programme liegt an einem internen Skalierungsfaktor der Screening-Software. Normiert man beide Signal, so sind sie deckungsgleich.

Die Ergebnisse von VirtuRIfS sind mit der Auswertesoftware Ifz vergleichbar, wie der Abbildung 4.30 entnommen werden kann. Der Rauschunterschied der Optischen Schichtdicke bei gleicher Anpassungsfunktion liegt in der Bestimmung der Randwerte der Anpassungsfunktion begründet. Bei Ifz werden die Ränder manuell gesetzt, bei VirtuRIfS automatisch bestimmt. Weitere Informationen zu den Anpassungsfunktionen sind Abschnitt 4.3.3.4 zu entnehmen.

⁴Abbildung 4.29 nutzt einen Datensatz von Herrn JUNG [39].

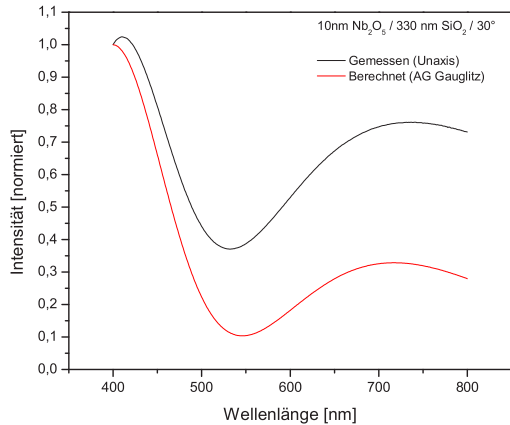


Abbildung 4.31: Reflexionsspektren eines Schichtsystems mit Nb_2O_5 .

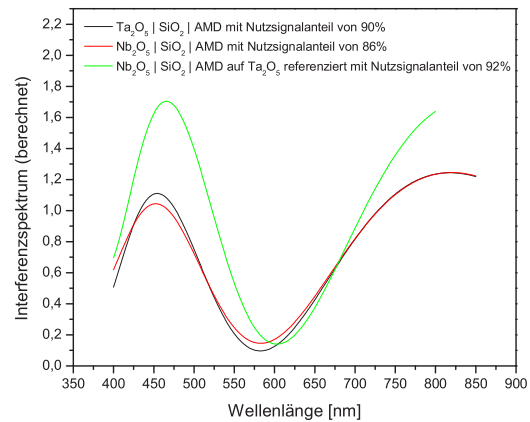


Abbildung 4.32: Berechnete Interferenzspektren eines Schichtsystems mit Nb_2O_5 .

Fazit:

- Sowohl die Auswertesoftware **Screening**, als auch **Ifz** können durch die Software **VirtuRIFs** ersetzt werden.

4.3.3.3.4 Signalhub

Bis zum Jahr 2001 wurde das Interferenzglas ($\text{BK7} / \text{Ta}_2\text{O}_5 / \text{SiO}_2$) von der Firma Schott bezogen. Schott stellte die Produktion ein, weshalb ein anderer Produzent für Interferenzschichten gesucht werden musste, der hochkompakte Beschichtungen realisieren konnte. Die Firma Unaxis Balzers Ltd. konnte anstatt Ta_2O_5 nur Nb_2O_5 als hochbrechende Schicht realisieren, weshalb die Interferenzschichtsysteme von Schott und Unaxis zuerst miteinander verglichen werden mussten.

Da das Ergebnis der Auswertung eines Interferenzspektrum durch die Detektionseinheit limitiert wird, ist ein gemessenes Interferenzmuster mit kleinerem Signalhub schlechter durch eine Polynomfunktion anzupassen als eine mit größerem Signalhub. Daraus folgt für ein Schichtsystem mit kleinerem Signalhub eine Erhöhung des optischen Schichtdickenrauschens. Durch Simulation errechnet sich der Unterschied der Nb_2O_5 -Schicht zu 4,5 % schlechterem Signalhub im Vergleich zu Ta_2O_5 -Schicht (siehe Abb. 4.32). Bei beiden wurde eine daraufliegende SiO_2 -Schicht von 330 nm und ein darüber wässriges Medium angenommen.

Durch Simulation läßt sich ein linearer Zusammenhang zwischen dem Signalhub und dem Rauschen der Optischen Schichtdicke berechnen (Abbildung 4.33). Angenommen wurde ein

Intensitätsrauschen von 1 % und ein 14 *bit*-Detektor⁵. Daraus ergibt sich eine Verbesserung des Optischen Schichtdickenrauschens mit zunehmendem Signalhub von $43 \cdot iu_\alpha - 0,145 \cdot iu_\alpha / \%$ bei einem Interferenzspektrenrauschen von 1 %_{bit}. Bei einem kleineren Hubunterschied von 4,5 % wäre der Fehler der Optischen Schichtdicke um $0,6525 iu_\alpha$ schlechter. Gemessene Spektren eines Einzelplatzsystems mit quantenlimitiertem Detektor besitzen nach MEHLMANN [46] ein Rauschen von 0,08 bis 1,3 %. Gemessen wurde an verschiedenen RIFS-Einzelplatzgeräten eine Optische Schichtdickendifferenz der beiden Schichttypen zwischen 0,21 und $0,77 iu_\alpha$, was mit dem Fehler von 0,0522 bis $0,848 iu_\alpha$ genau der Theorie entspricht.

Nach BRECHT ist der Signalhub die Differenz der Intensitäten zwischen zwei Extrema. Er ging von Spektren ohne Dispersion aus. Dadurch war es nicht notwendig für den Hub die beiden Extrema anzugeben. Durch die Dispersion der Einzelschichten ist das Interferenzspektrum intensitätsverzerrt, weshalb eine genaue Angabe der Extrema (oder der Ordnungen des Schichtsystems) notwendig ist.

Fazit:

- Das Schichtsystem (BK7 / Ta₂O₅ / SiO₂) von Schott ist im Vergleich zum System (Corning 1737 / Nb₂O₅ / SiO₂) von Unaxis 4,5 % besser im Interferenzsignalhub und somit 0,6 % besser im Optischen Schichtdickenrauschen.
- Um so kleiner der Signalhub eines Interferenzspektrum, desto größer ist das optische Schichtdickenrauschen. Aus theoretischen Abschätzungen ergibt sich eine Korrelation von $43 \cdot iu_\alpha - 0,145 \cdot iu_\alpha / \%$ _{bit}.

⁵Angabe notwendig, da VirtuRIFS Intensitätswerte in Abhängigkeit der Kamera-*bit* quantisieren kann (siehe Abschnitt 6.1.2.2, S. 162).

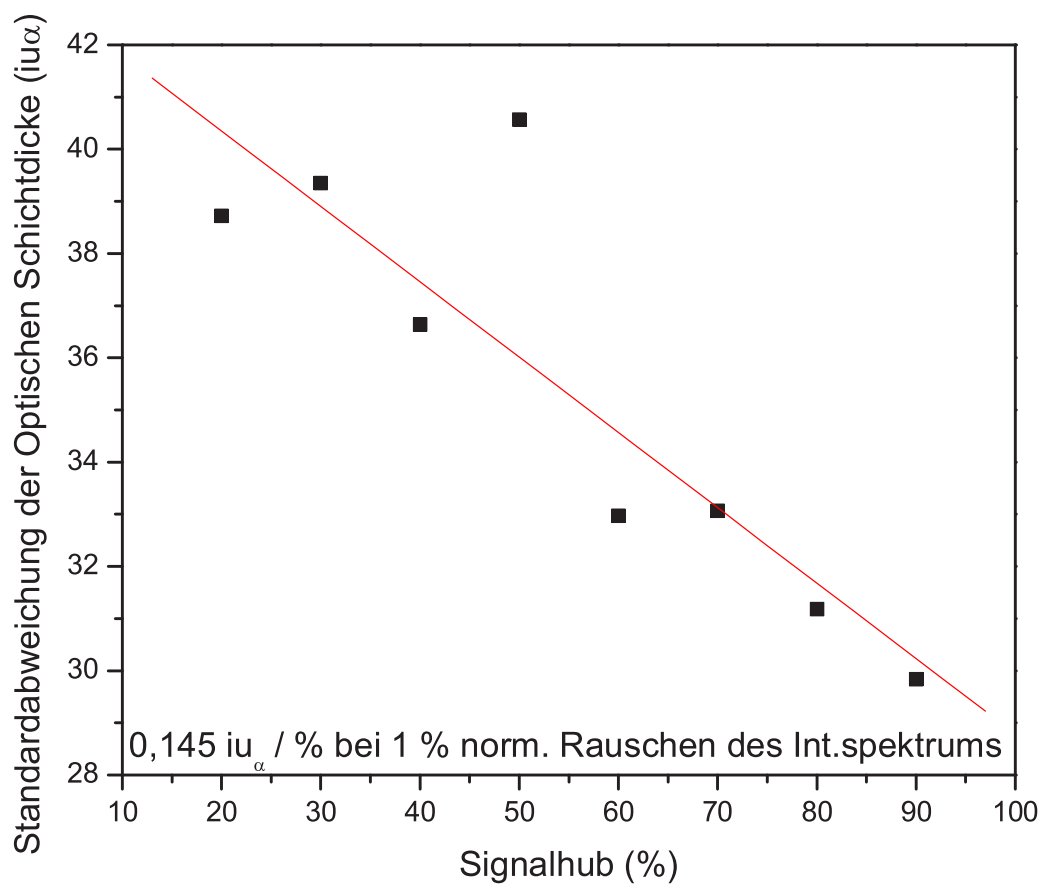


Abbildung 4.33: Optisches Schichtdickenrauschen in Abhängigkeit vom Interferenzsignalhub.

4.3.3.4 Wellenlängenabhängige RIfS

4.3.3.4.1 Gleichgewichtsbeladung

Wie in Abschnitt 4.3.3.1 beschrieben ist die Optische Schichtdicke eine relative Einheit, die für jedes Schicht- und Messsystem variiert. Dies betrifft nicht nur das Schichtdickenrauschen, sondern auch die Bindungskurven von molekularen Wechselwirkungen an der Oberfläche. Um einen Einblick in die Bindungscharakteristik von Oligonukleotid-Wechselwirkungen in unterschiedlichen RIfS-Systemen zu erhalten, wurde die Bindung von Oligonukleotiden an die Oberfläche simuliert, woraus verständlich wird, wie diese Systeme miteinander korrelieren (Abbildung 4.34). Um diesen Vorgang quantitativ nachvollziehen, wurde je ein Schichtsystem α , δ und γ deklariert, auf denen mit Hilfe des Modells nach SIGMUNDSSON [70] eine Oligonukleotidwechselwirkung simuliert wurde. Aus dieser folgt, dass beim MiniRIfS-Systems der 3.ten Generation und 0° Einstrahlwinkel bei gleicher physikalischer Schichtänderung (d.h. gleicher Oberflächenbeladung) das Signal der Gleichgewichtsbeladung höher erscheint. Bei 45° niedriger.

Fazit:

- Durch Simulation ist eine Beschreibung der Signale der Gleichgewichtsbeladung von biomolekularen Wechselwirkungen möglich. Dazu ist jedoch die Kenntnis aller Parameter notwendig, die eine theoretische Beschreibung der Oberflächenbeladung ermöglichen.
- Das RIfS-System δ mit einem Einstrahlwinkel von 45° hat ein schlechteres Signal bei Gleichgewichtsbeladung im Vergleich zum Einzelplatzsystem. Erschwerend kommt hinzu, daß bei diesem auch die Rauschwerte fast $10\times$ höher sind (siehe Tabelle 4.3), wodurch das Aufnehmen einer Wechselwirkungskurve bei kleinen Molekülen schwierig wird.

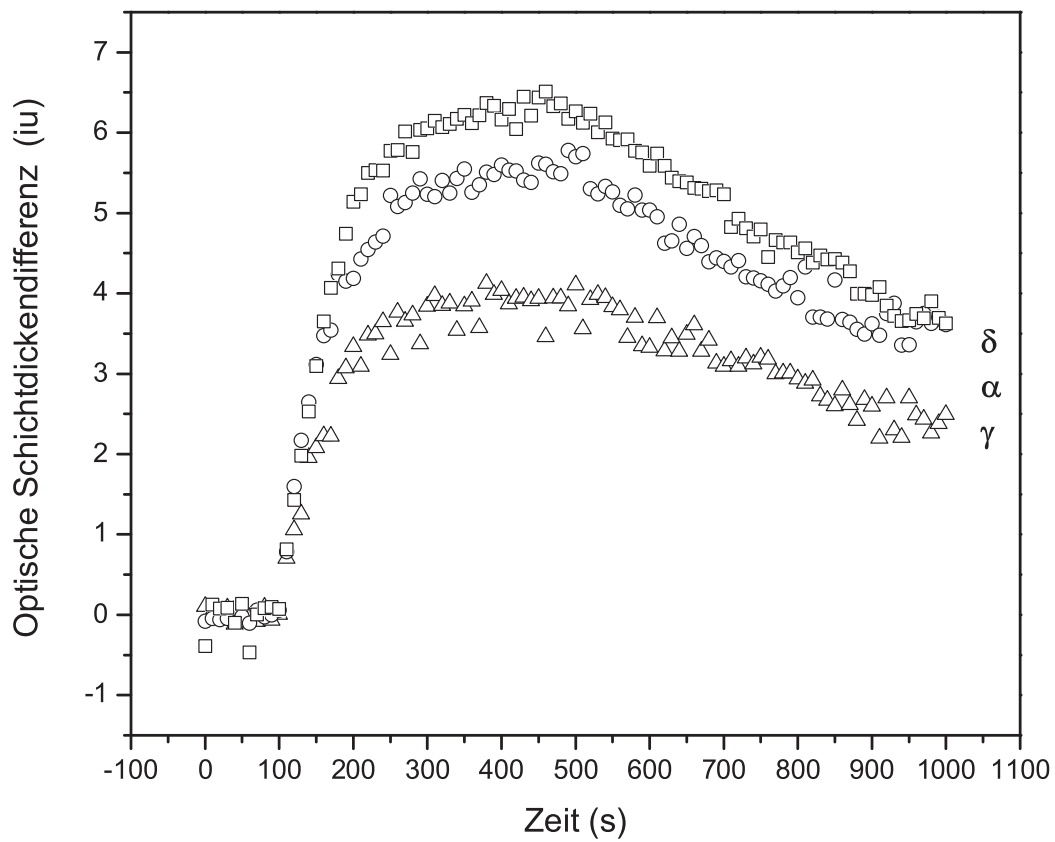


Abbildung 4.34: Schichtsimulation einer molekularen Bindung bei Einstrahlwinkel 0° und einer phys. Schichtdicke von SiO_2 330 nm (\circ); 0° , 600 nm (\square); 45° , 600 nm (\triangle). Die Interferenzspektren rauschen gleichverteilt mit 1 %.

4.3.3.4.2 Theoretische Nachweisgrenze

Detektor

Zur theoretischen Abschätzung, wo die Grenzen der RIfS-Methodik liegen, wurden die Eckdaten verschiedener CCD-Detektoren, wie Bildaufnahmezeit FPS , Poisson-Verteilung der Intensitätswerte \sqrt{FWC} , und Pixelanzahl pro Spot PPS verrechnet. Um die so erhaltenen Rauschwerte der Interferenzspektren in Rauschen der Optischen Schichtdicke umzurechnen, wurde ein experimentell ermittelter Faktor des 0° -Systems der 3. Generation (Abbildung 4.12, S. 65) verwendet. Diese Abschätzungen sind in Tabelle 4.4 dargestellt. Da bei einer Online-Referenzierung die Bildfläche des Detektors halbiert werden muss, ist das effektive Messfeld nur halb so groß wie die CCD-Gesamtfläche. Durch die Angabe der benötigten Messpunkte (Spots) wird ausgerechnet, wie viele Pixel pro Messpunkt zur Verfügung stehen. Ist die Elektronenkapazität eines Pixels bekannt, lässt sich über die Poisson-Verteilung des Pixelrauschens das Rauschen für den Messpunkt berechnen. Dieses Intensitätsrauschen kann durch den Umrechnungsfaktor auf ein Optisches Schichtdickenrauschen umgerechnet werden. Daraus ergibt sich ein Rauschen der Optischen Schichtdicke von 40-70 $iu/Spot$. Eine Bestätigung der Richtigkeit dieser Rechnung ist die Rauschgrenze von 2 iu_α des Spekol-Detektors. HAAKE [27] wies in seiner Arbeit dem Detektor die Limitierung der RIfS-Technologie zu, konnte jedoch keine zufriedenstellende Begründung für diese Limitierung geben. Die Beschreibung der Quantenlimitierung durch die Poisson-Verteilung liefert eine hinreichend genau Beschreibung der Detektorgrenze. Ein weiterer wissenschaftlicher Beweis ist durch die gute Übereinstimmung der Bilddaten mit der Bildsimulation (Abschnitt 4.2.2) gegeben.

Beachtet werden sollte, dass zu dem an Luft gemessenen Umrechnungsfaktor $iu/\%$ einen Faktor 2 multipliziert werden muß, um eine Beschreibung der Limitierung in Lösung zu erhalten. Die Verschlechterung der Nachweisgrenze wird durch den Brechungsindexunterschied des Superstrats von 1,0 (Luft) nach 1,33 (wässrige Lösung) verursacht. Die in Abbildung 4.35 unterste Kurve ist durch die Annahme eines normalverteilten Rauschens auf dem Interferenzspektrum des Systems δ berechnet worden. Die zweitunterste Kurve ist durch die Abschätzung nach der Parabelfunktion in Abbildung 4.36 berechnet. Diese Abschätzung ist das berechnete „worst case scenario“, da sich ein normalverteiltes Rauschen auf dem Interferenzspektrum wieder mittelt. Ein Vergleich dieser beiden Modelle zeigt, daß das „worst case scenario“ um einen Faktor 5 schlechter ist als eine realistische Annahme. Wird die in Abschnitt 4.3.3.4 (S. 102) hergeleitete Näherungsfunktion genutzt und werden die in Abschnitt 3.2 ermittelten Rauschfaktoren pro Signaldynamik der Meßgeräte berücksichtigt, so lassen sich die Umrechnungsfaktoren berechnen. Aus diesen Abschätzungen ergibt sich für das MiniRIfS-Gerät der 3. Generation bei Annahme des „worst case“ ein Rauschen von $\Delta iu_\delta \cdot 4,68 \pm 1,16 \% = 5870 \pm 1450 iu_\delta$. Für das Gerät der

Daten						
Kamera [<i>Name</i>]	SVGA PCO	Roper HTS	VGA PCO	HCC	Spekol	
Pixel des CCD [#]	1310720	1447680	307200	262144	1	
Full Well Capacity (<i>FWC</i>) [<i>Elektronen</i>]	25000	16000	35000	80000	4E+08	
Bildrate (<i>FPS</i>) [<i>Frames/Second</i>]	8	10	30	2048	50	
Messpunkte oder Spots [#]	400	400	400	400	1	
Opt. Schichtdickenrauschen / Intensitätsrauschen [<i>iu_s</i> /%]	5870 ± 1450	5870 ± 1450	5870 ± 1450	5870 ± 1450	5870 ± 1450	
Berechnung						
Effektive Bildfläche Messfeld und Referenzfeld [<i>Pixel</i>]	655360	723840	153600	131072	1	
Anzahl Pixel / Spot (<i>PPS</i>) [<i>Pixel/Spot</i>]	1638	1810	384	328	1	
Kantenlänge des Spots [<i>Pixel</i>]	40	43	20	18	1	
Poisson-Verteilung eines Pixels [%]	0,6325	0,7906	0,5345	0,3536	0,0050	
Poisson-Verteilung eines Pixels / $\sqrt{\text{Pixel} * \text{Pixel}}$ [%]	0,0156	0,0186	0,0273	0,0195	0,0050	
Poisson-Verteilung eines Pixels / $(\sqrt{\text{Pixel} * \text{Pixel}} * \sqrt{\text{FPS}})$ [%]	0,0055	0,0059	0,0050	0,0004	0,0007	
Theoretisches Opt. Schichtdickenrauschen [<i>iu</i>]						
Poisson [<i>Rauschen/Pixel</i>]	3713 ± 917	4641 ± 1146	3138 ± 775	2075 ± 513	29 ± 7	
Poisson, Binning [<i>Rauschen/Pixelfläche</i>]	92 ± 23	109 ± 27	160 ± 40	115 ± 28	29 ± 7	
Poisson, Binning, FPS [<i>Rauschen/(Pixelfläche * FPS)</i>]	35 ± 8	29 ± 9	3 ± 7	1, 1 ± 0, 6	4 ± 1	

Tabelle 4.4: Theoretische Rauschgrenze des unter Berücksichtigung aller eingehenden Faktoren.

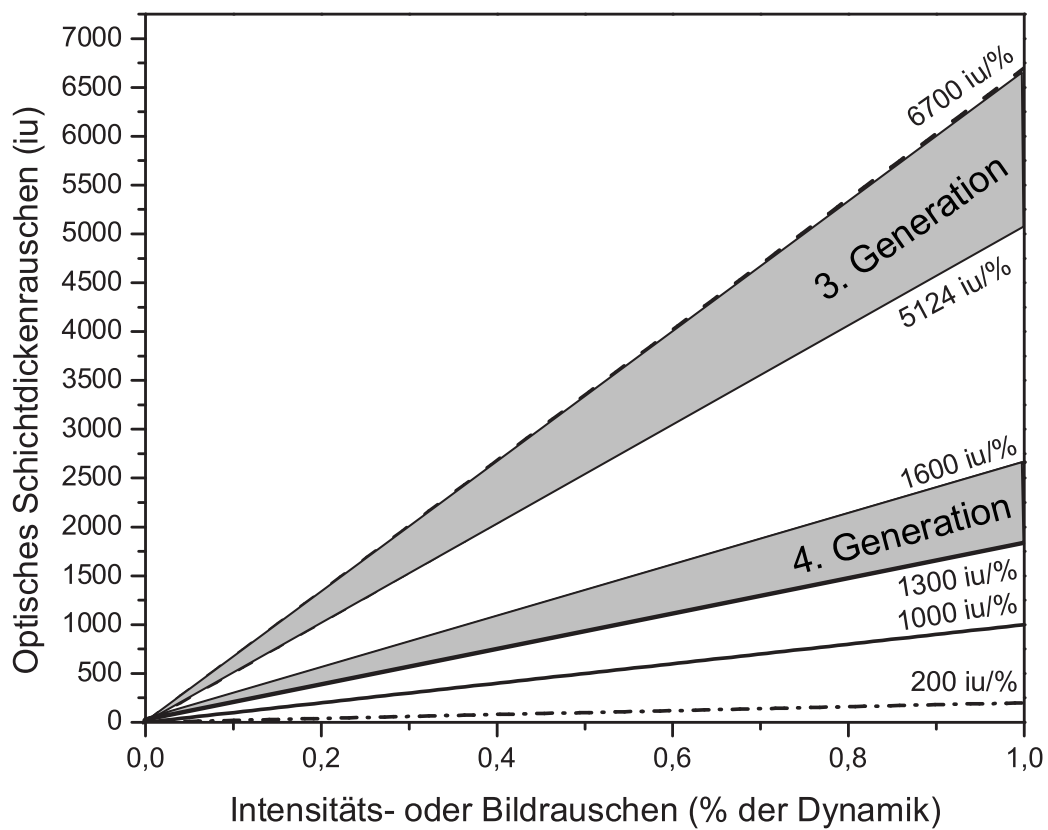


Abbildung 4.35: Umrechnungsfaktoren zwischen der Optischen Schichtdicke und dem Bildrauschen. Die beiden unteren Kurven sind simulativ, die oberen zwei experimentell ermittelt.

4.ten Generation ein Rauschen von $\Delta iu_\epsilon \cdot 1,84 \pm 1,1 \% = 2760 \pm 1650 iu_\epsilon$. Ein Vergleich dieser Faktoren mit den experimentell Bestimmten in Abbildung 4.35 ergibt eine gute Übereinstimmung der Näherungsfunktion mit experimentell bestimmten Daten. Eine Vorhersage, welches Rauschen der Optischen Schichtdicke durch das Rauschen im Interferenzspektrum hervorgerufen wird, ist möglich.

Fazit:

- Durch Quantenrauschen des Einzelpixels eines CCD-Detektors ist die Limitierung für die RIFS durch eine CCD-Kamera quantitativ beschreibbar.
- Eine Abweichung von der Theorie liegt nicht an der Poisson-Statistik (wellenlängenunabhängig), sondern ist durch Effekte wie Dispersion, Absorption und Signaldynamik begründet.
- Der Umrechnungsfaktor $iu/\%$ liefert ein empirisches Maß für die Abweichung vom theoretischen Limit wie in Abbildung 4.35 gezeigt. Der Vorteil dieses Faktors ist seine Unabhängigkeit vom Detektor, der Lampe und der Spotgröße. Er ist ein absolutes Maß für das Rauschen pro Kamera bzw. Signaldynamik bzw. den Auswertalgorithmus.
- Anhand des einfachen Näherungsmodell einer Parabelfunktion läßt sich vorhersagen, dass pro Prozent Rauschen in Bezug auf die Signaldynamik der Umrechnungsfaktor um $1000iu/\%$ steigt. Dieser Faktor ist prinzipiell $5\times$ schlechter als eine exakte Simulation.
- Für das 0° -Gerät der 3.ten Generation ergibt sich ein Bereich des Umrechnungsfaktors von $5870 \pm 1450 iu_\delta$. Für das der 4.ten Generation ein Bereich von $2760 \pm 1650 iu_\epsilon$.
- Die Berechnung des Bereichs der möglichen Umrechnungsfaktoren der experimentellen Signaldynamiken (siehe Abbildung 3.2 und 3.4) mit Hilfe des „worst case scenarion“-Modells läßt eine gute Übereinstimmung mit real gemessenen Faktoren erkennen. Daraus muß geschlossen werden, dass bei maximaler Verbesserung der Signaldynamik auf 100 % Kameradynamik höchstens eine Verbesserung um den Faktor 5 eintritt. Dies ist jedoch physikalisch nicht realisierbar, weshalb eine maximale Verbesserung um den Faktor 3 bei gleichem prozentualen Signaldynamikrauschen erreicht werden kann, da die real gemessene Signaldynamik im Vergleich zur theoretischen immer unter 60 % liegt.

	0°-3.Gen. (B)	Spekol (A)	9°-4.Gen. (C)
FWC	25000	$4,00E + 08$	25000
FPS	1	50	1
Ermittelter Um- rechnungsfaktor	$6700 iu_{\delta}/\%$	$1000 iu_{\alpha}/\%$	$1600 iu_{\epsilon}/\%$
Gerechnet auf iu_{α}	$750 iu_{\alpha}/\%$	$1000 iu_{\alpha}/\%$	-

Tabelle 4.5: Einteilung der Detektoren in Klassen.

Detektorklassifizierung

Analog dem Abschnitt 4.3.3.2 sind nicht nur die Interferenzschichtsysteme, sondern auch die Detektoren bei der Optischen Schichtdickeneinheit mit anzugeben, damit die Ergebnisse reproduzierbar zurückverfolgt werden können. Aus diesem Grund werden in diesem Abschnitt die Detektoren in Klassen eingeteilt mit deren charakteristischen Parametern (siehe Tabelle 4.5). Damit diese Angabe (vor allem bei 2-dimensionalen Detektoren) korrekt ist, ist die Angabe der *Pixel/Spot (PPS)* und der *Frames/Second (FPS)* notwendig. Eine vollständige Angabe der Optischen Schichtdicke wird dann wie folgt angegeben: $iu_{\alpha,A(1,50)}$, wobei A das Messgerät angibt und die Faktoren 1, 50 die *PPS* und die *FPS*. In dieser Arbeit wurden die Schichtsystem α, β grundsätzlich mit dem System $A(1,50)$ vermessen, weshalb die Optische Schichtdicke immer nur mit iu_{α} bzw. iu_{β} bezeichnet wird. Die Schichtsysteme δ und γ wurden mit dem Messgerät $B(1,1)$ vermessen, wodurch deren Angabe der Optischen Schichtdicke mit iu_{δ} bzw. iu_{γ} indexiert wird. Für ϵ -Schichten wurde das Gerät $C(1,1)$ genutzt.

Anpassungsfunktion

In dem Programm **VirtuRIfS** wurden drei verschiedene Anpassungsfunktionen realisiert, eine zweiten, eine dritten und eine vierten Grades. Um jedoch die Funktion an das Interferenzspektrum anzupassen, ist der Bereich festzulegen, indem die Funktion angepasst werden soll. Dazu wurden vier verschiedene Algorithmen zur Randwertbestimmung implementiert, die im Anhang beschrieben sind. Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss der Fehler der Meßwerte in der Intensitätsskala auf die Position der Extrema in der Wellenlängenskala hat. Aus diesem Grund wurde anhand einer einfachen Parabelfunktion eine Funktion abgeleitet, die ein Maß dafür liefert. Die Funktion ergibt aus Abbildung 4.36 zu $m(p, h, b) = pb/2h$. Sie gilt für den Fall, daß für die Anpassung nur Meßwerte bis zum halben Signalhub (h) berücksichtigt werden. Dadurch wird gleichzeitig die Breite des auszuwertenden Bereichs (b) festgelegt. Diese Funktion berücksichtigt nicht den unterschiedlichen Versatz im Scheitelpunkt bei $h \pm \frac{p}{2}$. Angenommen

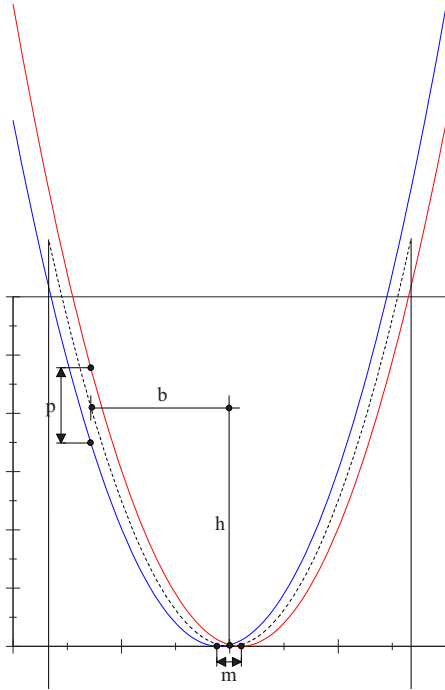


Abbildung 4.36: Abschätzung des Fehlers durch die parabolförmige Anpassungsfunktion.

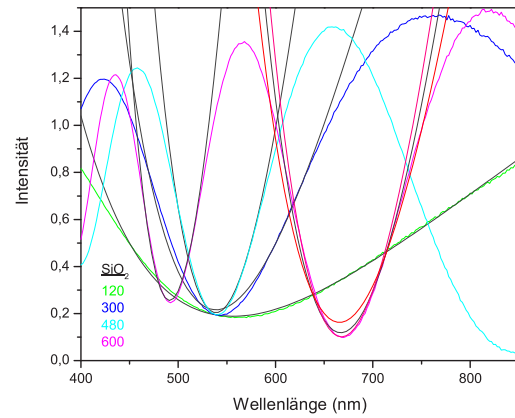


Abbildung 4.37: Anpassungsfunktionen verschiedener Parabeln an Extrema.

wurde, dass der Versatz $\mp \frac{m}{2}$ ist, was jedoch nur eine Näherung ist. Aus diesem Grund gilt diese Gleichung nur für $h \gg p$. Hat ein Interferenzspektrum mit 100 % Signalhub ein Rauschen $p = 1 \%$, so ist die Höhe $h = 50 \%$. Die Breite von RIFS-Spektren des Schichtsystems α liegt zwischen $b = 90 - 130 \text{ nm}$. Nimmt man für $b = 100 \text{ nm}$ an, so ist der Fehler $m = 1000 \text{ pm}$. Wird dieser anschließend mit der entsprechenden Ordnung nach Gleichung 2.20 bzw. 2.21 (S. 17) verrechnet, wird der Fehler der Optischen Schichtdicke in *iu* durch den Fehler p in Prozent erhalten.

Desweiteren sollte untersucht werden, wie die Breite b einer Parabelfunktion den Fehler der Anpassung beeinflusst. Aus diesem Grund wurden Schichtsysteme mit 120, 300, 480 und 600 nm der SiO_2 -Schichtdicke (Abbildung 4.37) durchgerechnet. An diese Interferenzspektren wurde anschließend die parabolförmige bzw. kubische Funktion angelegt, um deren Korrelationskoeffizienten zu bestimmen (Abbildung 4.39). Eine Analyse des Ergebnisses dieser Abschätzung ergibt keinen Zusammenhang zwischen der Breite einer Parabel und dem Korrelationskoeffizienten der Anpassung.

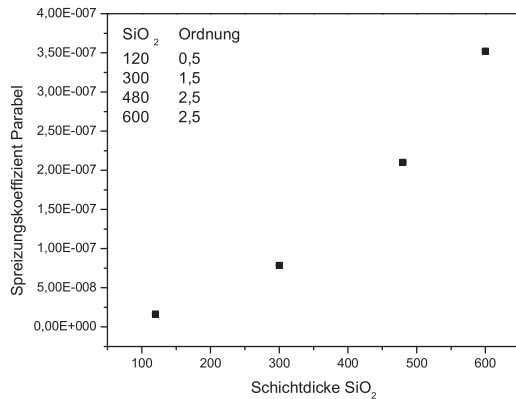


Abbildung 4.38: Spreizungskoeffizient der parabelförmigen Anpassungsfunktion in Abhängigkeit der physikalischen SiO₂-Schicht.

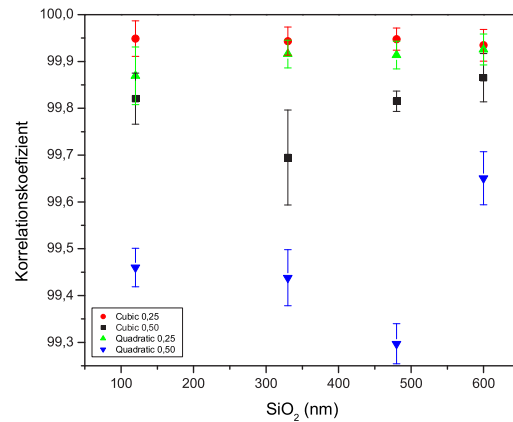


Abbildung 4.39: Korrelationskoeffizient verschiedener Anpassungsfunktionen an das Interferenzspektrum.

Fazit:

- Polynomanspassungen höheren Grades liefern kleinere Fehler der Optischen Schichtdicke.
- Die Parabelbreite hat keinen ersichtlichen Einfluß auf die Güte der Anpassung, so lange die Quantisierung des Detektors (Kameradynamik) vernachlässigt werden kann. Vermutlich liegt die Streuung an der zunehmenden Anzahl der Datenpunkte pro Parabelbreite.
- Die einfache Näherungsformel $m(p, h, b) = pb/2h$ erlaubt für $p \ll h$ eine Abschätzung des Fehlers durch die Anpassungsalgorithmen. Nach dieser Formel sollte bei gleicher Höhe, gleichem Fehler mit zunehmender Breite der Fehler direkt proportional sein.

4.3.3.5 Winkelabhängige RIFS

Ein alternative Möglichkeit um ein Dünnschichtsystem zeitlich zu beobachten ist, neben der spektralen, die winkelabhängige Beobachtung. Der Vorteil des Lasers als Lichtquelle ist die schmalere Quantenverteilung nach Lorentz im Wellenlängenbereich. Ein Laser ist eine stabile und exakte Lichtquelle im Vergleich zu einer Weißlichtquelle. Ein Nachteil für die Messungen ist der höhere optische Aufwand der Justage. Für die folgende theoretische Abschätzung wurde ein Schichtsystem aus 10 nm Nb₂O₅ und 600 nm SiO₂ + 30 nm AMD zugrundegelegt. Die zeitliche Änderung der AMD-Schichtdicke wurde mit +30 nm in phosphatgepufferter Kochsalzlösung angenommen. Ein Laser der Meßwellenlänge 615 nm, ein gleichverteiltes Spektrenrauschen von 5 % bei einer Signaldynamik von 14 bit und einem Winkelbereich von 0 – 50°

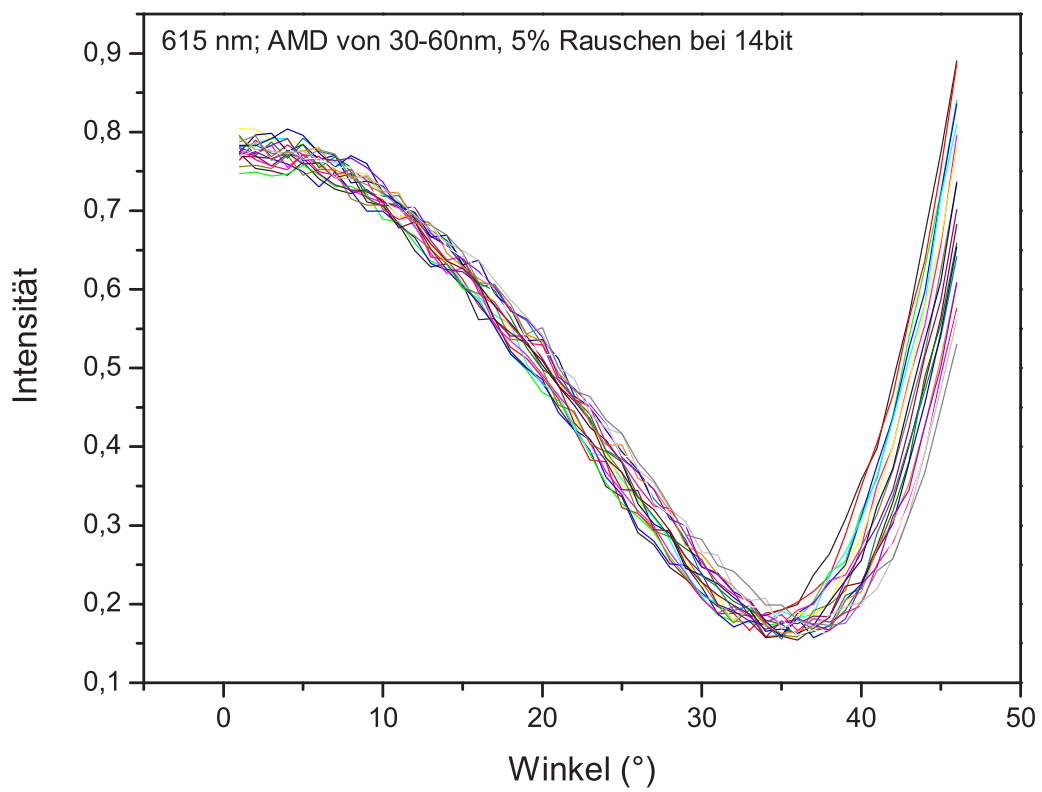


Abbildung 4.40: Interferenzspektren in Abhängigkeit des Einstrahlwinkels.

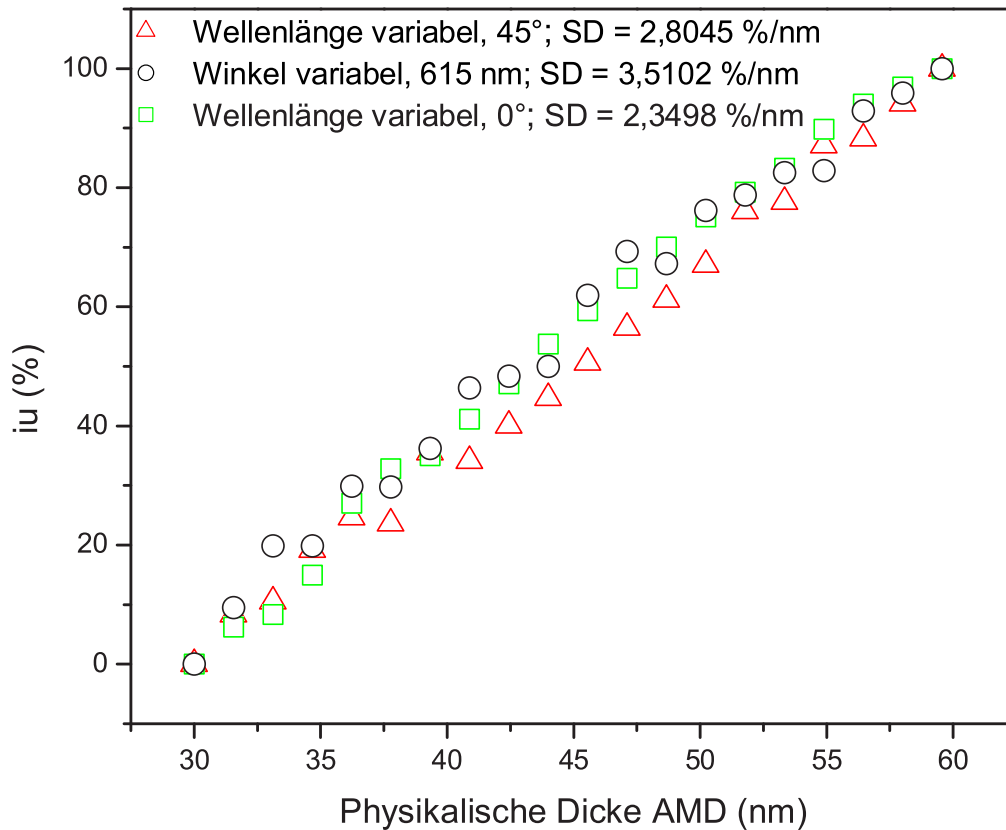


Abbildung 4.41: Änderung der relativen optischen Schichtdicke (iu in %) in Abhängigkeit von der AMD-Schichtdicke.

(Abbildung 4.40). Alle physikalischen Eigenschaften der Teilschichten sind im Kapitel 6.1.2.2 aufgeführt. Im Modell wurde für alle Teilschichten ein konstanter Brechungsindex angenommen. Wie bereits in Kapitel 4.3.3.4 erläutert, ist die RfS-Signalhöhe abhängig vom Einfallswinkel des Lichts in das Schichtsystem und vom Schichtsystem selbst. Strahlt man in dieses Schichtsystem bei 0° ein, beträgt die Änderung $222 \text{ } iu_\alpha$ pro nm AMD-Quellung (siehe auch Abbildung 4.21, S. 80). Bei 45° ist sie $533 \text{ } iu_\delta/\text{nm}$, d.h. die Dynamik des Signals der Optischen Schichtdicke einer gleichen bindenden Wechselwirkung würde $3\times$ kleiner als am Einzelplatzgerät erscheinen. Bei einer Winkelabhängigen RfS-Messung mit Licht der Wellenlänge 615 nm verschiebt sich der Extremwert um $3,5^\circ$ bei einer Schichtänderung von 30 nm . Um die verschiedenen Signaländerungen miteinander vergleichen zu können, wurde sie auf 100% normiert. Der Fehler

der einzelnen Änderungen wird durch die Standardabweichung der linearen Regression angegeben (siehe Abbildung 4.41). Daraus ergibt sich, dass eine winkelabhängige Messung im Vergleich zur wellenlängenabhängigen eine geringere Nachweisgrenze hat, da das Rauschen bei gleicher physikalischer Schichtänderung um mehr als 25 % größer ist.

Fazit:

- Ein winkelabhängiges RIfS-System bringt keine Verbesserung im Vergleich zu einem Wellenlängenabhängigen.
- Wie in Kapitel 6.1.2.2 bereits erwähnt sind Mess- oder Simulationskurven nicht vergleichbar ohne Angabe aller notwendigen optischen und schichtspezifischen Eigenschaften und einer entsprechenden Korrelationsfunktion.

4.3.3.6 Temperaturabhängige RIfS

Da je nach Messgerät und Assay die Referenzierungsstrategie gewählt werden muß, ist zu ermitteln, welchen Einfluß die Referenzierungsstrategie bei temperaturabhängigen RIfS-Messungen auf die Signale der Optischen Schichtdicke hat. Dazu wurde ermittelt ob sich ein gemessenes Referenzspektrum auf Referenzspektren verschiedener Temperaturen beziehen lässt. HANSMARTIN HAAKE untersuchte in seiner Dissertation ([27]; Seite 95) die limitierenden Parameter des Einzelplatzsystems A. Zum einen ermittelte er für das Diodenzeilenspektrometer einen konzertierten⁶ Drift, welcher keinen Einfluß auf das RIfS-Signal hat. Er wies die Limitierung des Detektors dem Dunkelstromrauschen zu. Zum anderen detektierte er eine spektrale Änderung im Laufe der Zeit, welche er der Lampe zuwies. In dieser Arbeit wurden diese Thesen geprüft und werden im folgenden weiter erläutert. HAAKE detektierte eine Änderung der Referenzspektren in Abhängigkeit der Zeit (analog Abbildung 4.42). Jedoch wies er diesen Effekt der Lichtquelle zu. Er vermutete einen spektralen Drift für Lichtquellen (jeweils Abnahme in Abhängigkeit der Zeit und der Wellenlänge). Als einfaches Modell addierte er auf Referenzspektren eine Gerade mit temperaturabhängiger Steigung, wodurch er eine Verschiebung des Minimums nach kleinen Wellenlängen (Blauverschiebung) wahrnahm (siehe Abbildung 4.44). Die in dieser Arbeit gemessenen in Abbildung 4.42 dargestellten Spektren sind jedoch nicht durch einen Lampendrift, sondern durch eine Temperaturänderung entstanden. Ermittelt man die Steigung der Kurven und skaliert so ein einziges Spektrum mit dieser Geradengleichung als „Multiplikationsfaktor“, so ergeben sich in Abbildung 4.43 dargestellte Interferenzspektren. Diese nach Ifz mit einer Parabelfunktion ausgewertet, zeigen eine Abnahme der optischen Schichtdicke mit der

⁶Eine konzertierte Aktion ist eine aufeinander abgestimmte Aktion zur Zusammenarbeit bei entgegengesetzten Interessen [76], d.h. die Dioden zeigen unabhängig voneinander alle den gleichen Drift

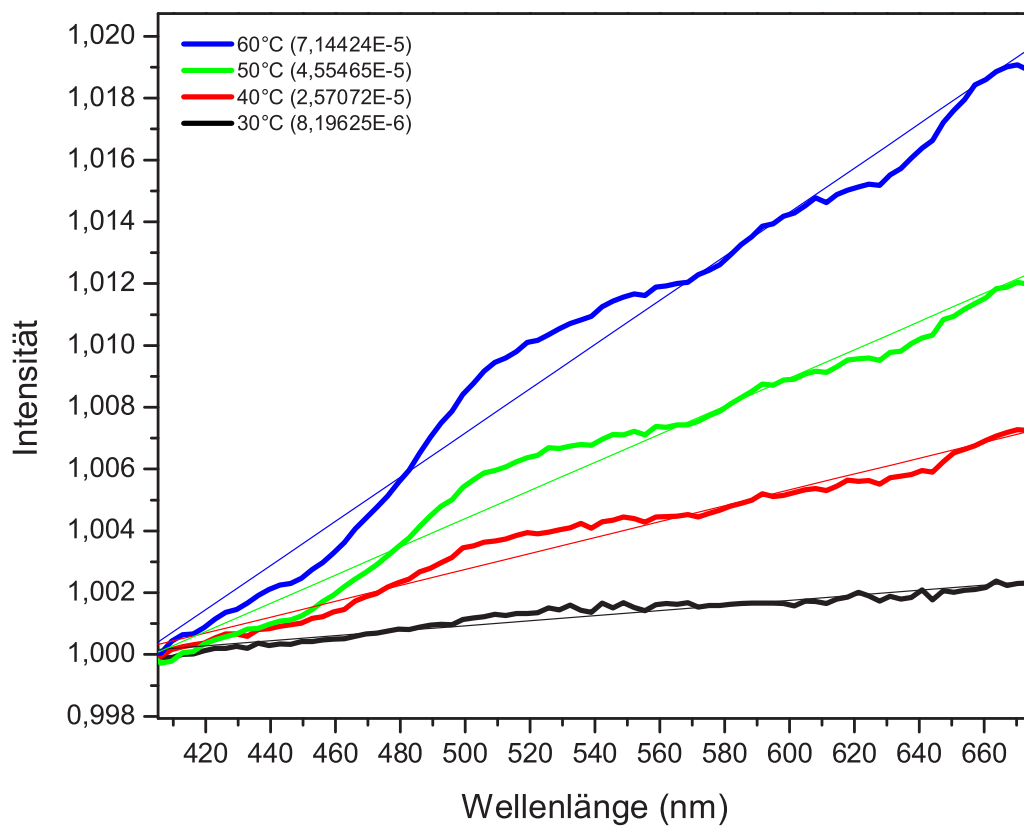


Abbildung 4.42: RfS-Referenzspektren bei verschiedenen Temperaturen bezogen auf das Referenzspektrum bei 30 °C.

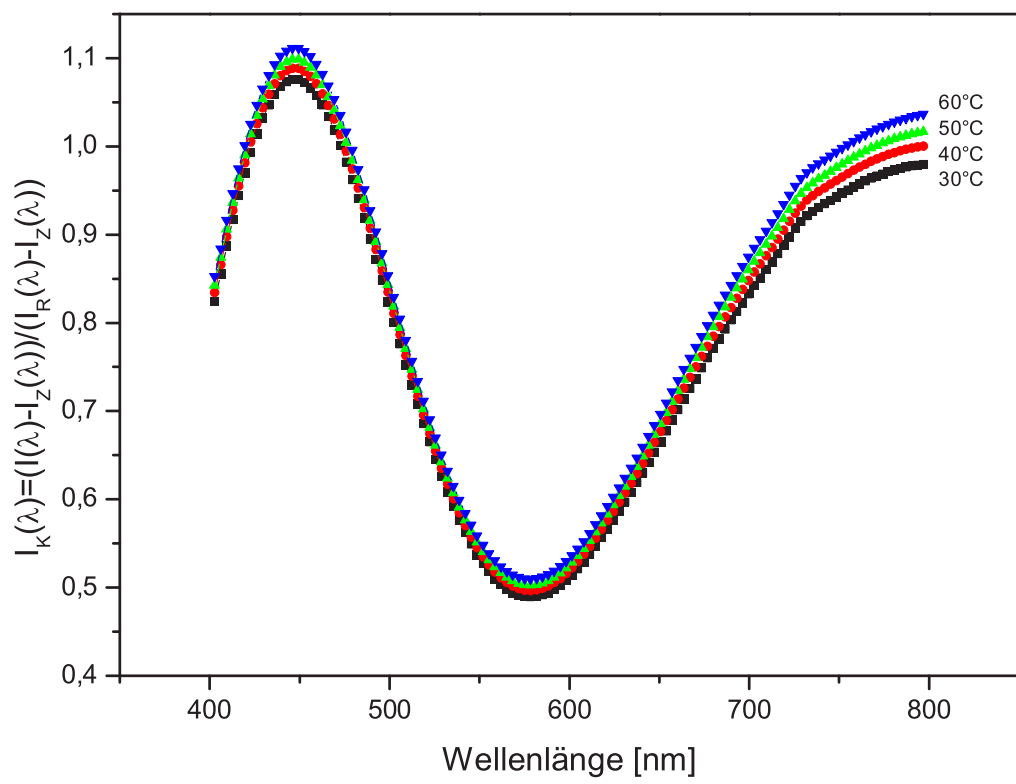


Abbildung 4.43: Intensitätskorrigiertes Interferenzspektrum durch Temperatureffekt.

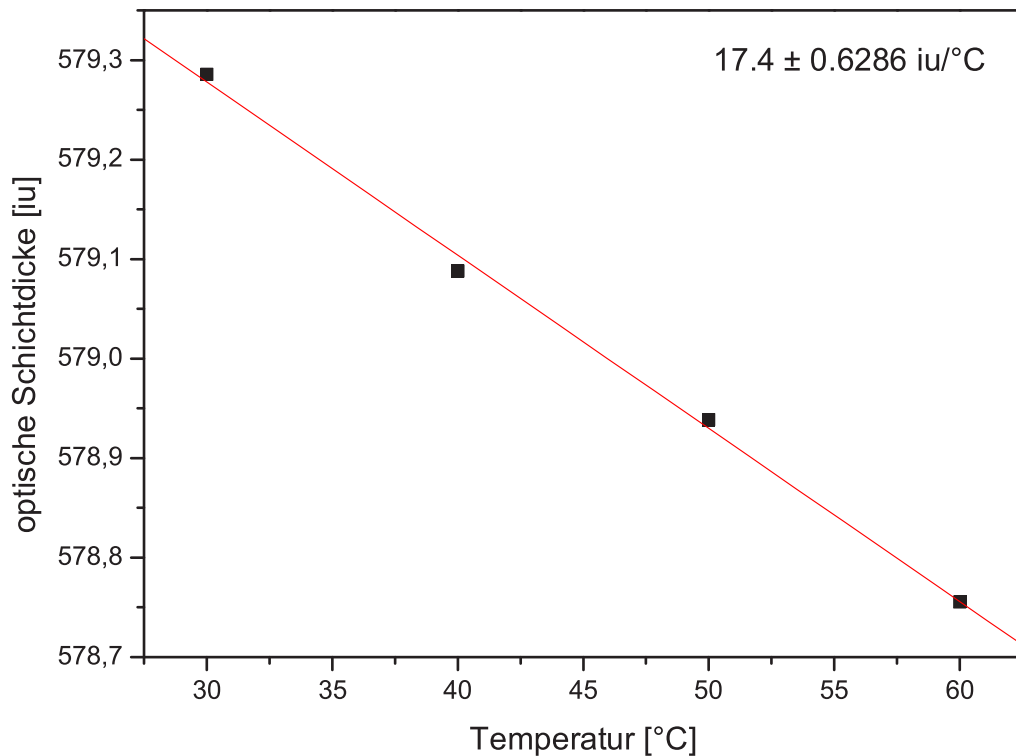


Abbildung 4.44: Änderung der optischen Schichtdicke in Abhängigkeit der Temperatur.

Temperatur. Diese Abnahme liegt genau in demselben Bereich, wie die zuvor postulierte optische Schichtdickenabnahme mit dem Polymer, d.h. die Aussage in der Diplomarbeit WEGNER [79], dass die optische Schichtdicke mit der Temperatur sinkt, ist nicht auf einen Brechungsindexeffekt oder eine Änderung der physikalische Schichtdicke des Polymers zurückzuführen. Diese Abnahme beruht auf der Intensitätsveränderung des Interferenzspektrums. Errechnet man das Interferenzmuster mit sich änderndem Brechungsindex des Superstrats, so folgt eine zunehmende Reflektivität mit der Temperatur analog der Abbildung 4.42. Daraus folgt, dass die Intensitätszunahme des Spektrums durch den abnehmenden Brechungsindex des Superstrats hervorgerufen wird. Durch die theoretische Beschreibung der temperaturabhängigen Brechungsindexabnahme nach CHO [14] läßt sich die optische Schichtdicke mit dem absoluten Brechungsindex des Superstrats korrelieren (siehe Abbildung 4.45). Erhitzt man die Flußzelle des RIFS-Systems α , so folgen die Optischen Schichtdicken dem in Abbildung 4.46 dargestellten Verlauf. Es gibt einen abnehmenden und einen zunehmenden Anteil in der Optischen Dicke. Of-

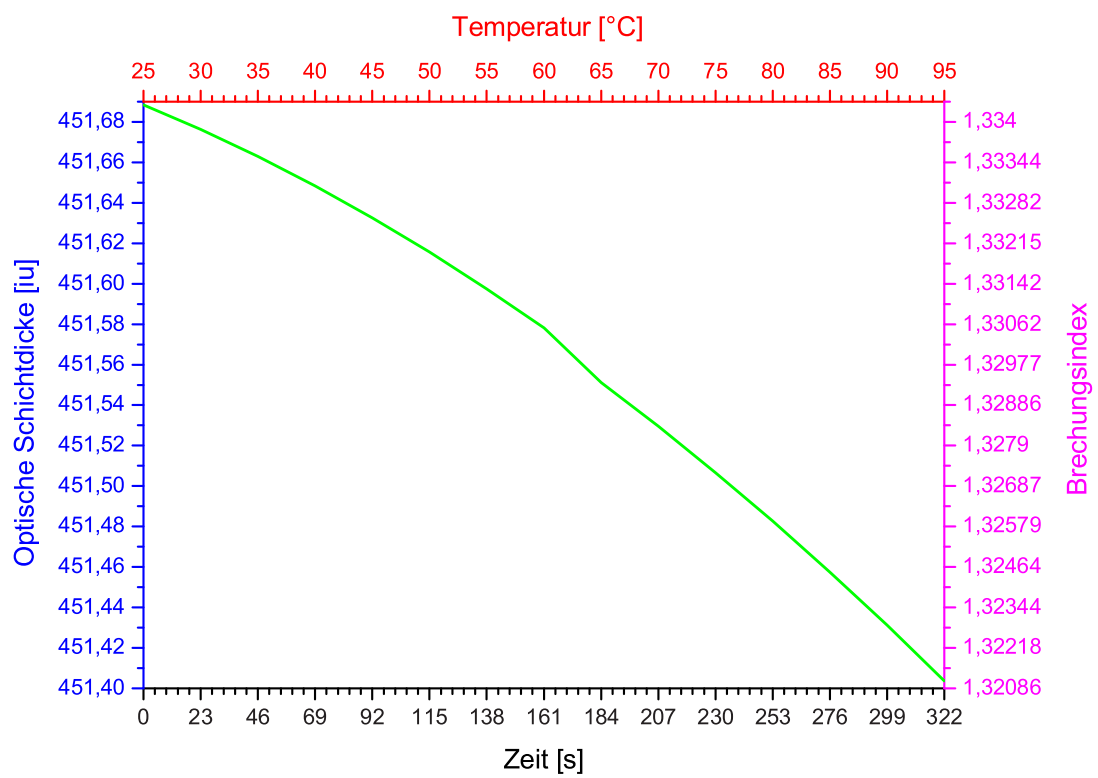


Abbildung 4.45: Temperaturabhängiger Brechungsindex des Superstrats.

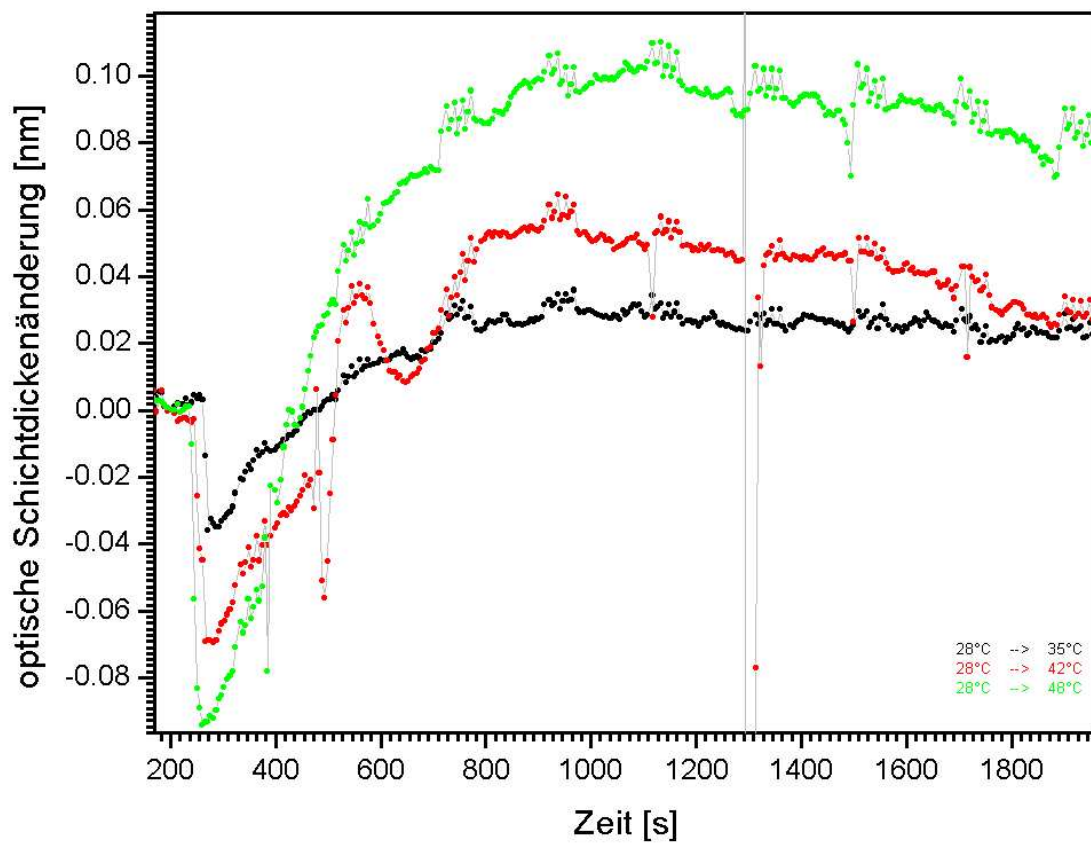


Abbildung 4.46: Schichtdickenänderung eines Amino-PEG-Transducers bei verschiedenen Temperaturänderungen.

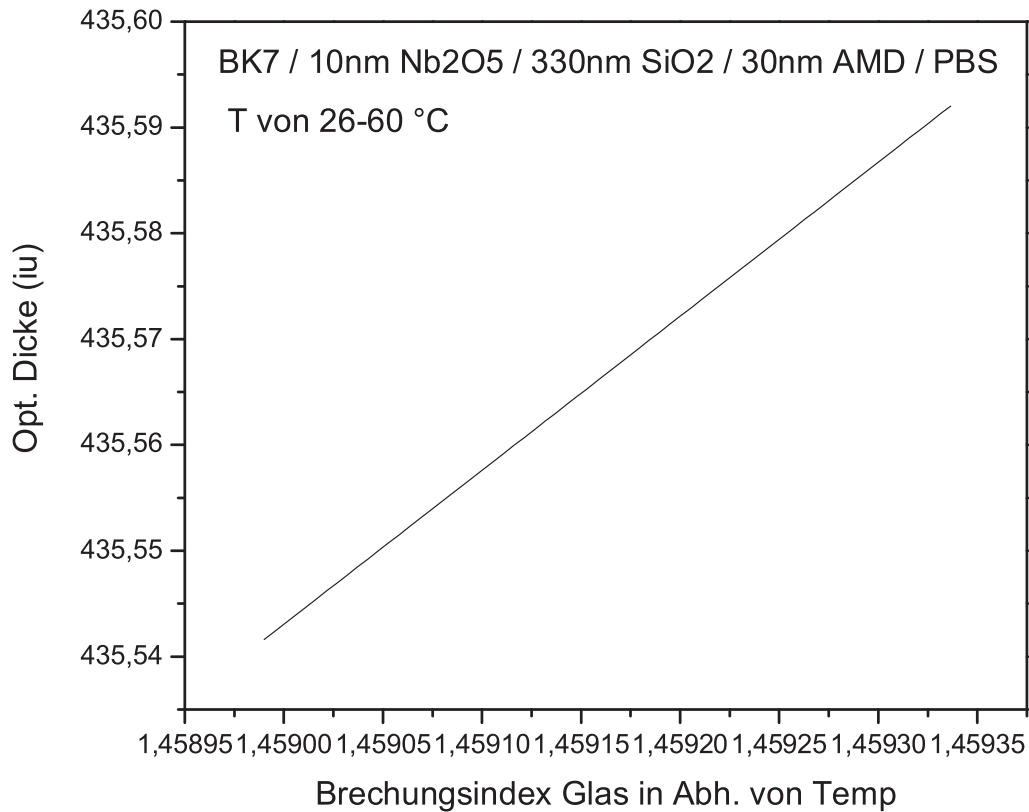


Abbildung 4.47: Temperaturabhängiger Brechungsindex von Glas nach WRAY [83].

fensichtlich liegt der anfänglich schnell abnehmende Anteil in der Brechungsindexänderung des Superstrats begründet. Jedoch müssen noch die Faktoren gefunden werden, die den Anstieg der Optischen Schichtdicke in Abhängigkeit der Temperatur erklären. Eine Erklärung ist vermutlich eine langsam zunehmende Brechungsindexänderung und Ausdehnung des Glas-Transducers bzw. eine Dämpfungsänderung des Lichtleiters. Die Änderung des Brechungsindexes ist in Abbildung 4.47 dargestellt.

Fazit:

- Der konzertierte Drift der Diodenzeile kann auf einen ansteigenden Dunkelstrom zurückgeführt werden. Dieser hat keinen Einfluß auf den Signaldrift der Optischen Schichtdicke.
- Das Diodenzeilenspektrometer wird nicht durch das Dunkelstromrauschen, sondern durch das Poisson-Rauschen limitiert.
- Die spektrale Änderung der Interferenzspektren, welche einen Signaldrift in der Optischen Schichtdicke verursacht, wird nicht durch eine spektrale Änderung der Lichtquelle verursacht. Die spektrale Änderung wird durch eine Brechungsindexänderung des Superstrats hervorgerufen. Diese Änderung wird durch eine Temperaturänderung induziert. HAAKE detektierte keine spektrale Änderung der Lichtquelle, sondern eine Temperaturerhöhung in der Meßzelle über mehrere Stunden.
- Die optische Schichtdicke nimmt schnell mit Zunahme der Temperatur ab. Als Ursache konnte eine Intensitätszunahme im Interferenzspektrum festgestellt werden, welche durch den abnehmenden Brechungsindex des Superstrats hervorgerufen wird.
- Die langsame Zunahme der Optischen Schichtdicke wird vermutlich hauptsächlich durch die Dämpfung des Lichtleiters verursacht. Ein weiterer Faktor ist die Brechungsindexzunahme und die Ausdehnung des Glas-Transducers.

4.4 Polymer- und Bioschicht

4.4.1 Polymer

4.4.1.1 Reproduzierbarkeit

In den vorherigen Kapiteln wurde die Optische Schichtdickeneinheit (und damit die Interferenzschichten) derart definiert, dass die Randparameter für wiederholbare Messungen angegeben sind (Abschnitt 4.3.3.2). Anschließend wurden die Optischen Meßgeräte benannt um gleiches zu gewährleisten (Abschnitt 4.3.3.4).

Im folgenden wird versucht, charakteristische Variablen für Polymerflächen anzugeben, damit mit diesen reproduzierbare, d.h. wiederholbare Messungen durchgeführt werden können.

- **Homogenität:** Von einer homogen beschichteten Oberfläche (zweidimensional) spricht man, wenn keine Inselbildung durch statische Effekte oder Polarisierungseffekte auftritt.
- **Unspezifität:** An einen mit einem spezifischen Rezeptor belegten Biosensor sollte im Idealfall aus einem Ligandgemisch nur der dazugehörige spezifische Ligand binden. Ist dies der Fall, so spricht man von spezifischer Wechselwirkung, ansonsten von unspezifischer.
- **Beladungsdichte:** Die Anzahl der Rezeptoren pro Oberfläche wird als Beladungsdichte bezeichnet. Dieser Faktor hängt offensichtlich mit der Homogenität zusammen.
- **Maximalbeladung:** Die Maximalbeladung gibt an, wie viele Liganden maximal an die Oberflächenrezeptoren anbinden können. Man spricht hier auch von der Anzahl der aktiven Bindungsstellen, die einen Beitrag zur Maximalbeladung leisten.
- **Stabilität gegenüber pH-Wert, Salzkonzentrationen, Lösungsmitteln:** Da ein Biosensor per Definition mehrere Messungen durchführen muss, ist es notwendig die Stabilität des Sensors gegenüber Umwelteinflüssen zu kennen.

Im folgenden wurde versucht, mit RIfS ein paar der oben genannten Faktoren zu ermitteln, damit die zu beschichtenden Transducer in Zukunft⁷ reproduzierbare Messergebnisse liefern können, wenn ein und dieselbe molekulare Wechselwirkung vorherrscht. Aus diesem Grund wurde ein Autosampler derart modifiziert, dass er Dutzende von Transducer automatisch vermessen kann (Abbildung 4.48). Anstatt den Autosampler zur Probenzufuhr für die Messung zu verwenden, wurden die Probenhalter für die Eppendorf-Cups durch RIfS-Messzellen ersetzt.

⁷ von Transduktion (*engl.* Übersetzung), wodurch molekulare Informationen in elektronische übersetzt werden.

Der Arm zur Probenaufnahme wurde durch einen gefederten Lichtleiterarm ersetzt. Vermessen wurden mit PEG und AMD beschichtete Glas-Transducer an Luft und in Pufferlösung. Je nach Art der Messung wurden verschiedene Zellen genutzt.

4.4.1.2 Aminodextran (AMD)

Zur Untersuchung der Polymerdicke von beschichteten Transducern wurden 20 Transducer vor und nach der Polymerbeschichtung vermessen. Beschichtet wurde nach dem Protokoll in Abschnitt 3.3. Die Werte der Optischen Schichtdicke vor der Beschichtung wurden gleich Null gesetzt. Nach der Polymerbeschichtung wurden die Transducer mit bidestilliertem Wasser abgespült bzw. im Ultraschallbad gereinigt. Ein Teil der Transducer wurde nachträglich im Ofen bei 70 °C getrocknet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.49 dargestellt.

Nach der Korrelation von physikalischer und optischer Schichtdicke (oD) durch den Faktor $222 \text{ } iu_{\alpha}/nm$ (Abbildung 4.21) und der gemessenen oD-Änderung von 4000 – 8000 iu_{α} errechnet sich eine physikalische Dicke der AMD-Schicht von 18 – 36 nm in Lösung. Nach HEHL [29] haben AMD-Schichten eine Dicke von $35,92 \pm 6,22 \text{ nm}$. Der Nachteil von RIFS ist momentan der Fehler der Optischen Schichtdicke von 1000 iu_{α} , der durch die Matching-Flüssigkeit Glycerin verursacht wird. Die absolute Optische Schichtdicke kann nicht reproduzierbar erhalten werden, da vermutlich durch Ein- und Ausbau der Transducer in die Zelle die Matching-Flüssigkeit unterschiedliche Dicken erzeugt. Jedoch könnte auch eine Verkippung ein und desselben Transducers beim wiederholten Ein- und Ausbauen eine Ursachen sein. Doch unabhängig von der Ursache ist dieser Effekt mit diesem großen Fehler reproduzierbar. Dadurch ist eine reproduzierbare Detektion absoluter Optischer Schichtdicken von unspezifischen Wechselwirkungen von Ovalbumin mit dem Polymer nicht möglich, da dieses Signal immer $< 1000 \text{ } iu_{\alpha}$ ist.

Nach Polymerbeschichtung des Transducers wurde auf der Oberfläche Biotin immobilisiert. An dieses wurde anschließend Streptavidin angebunden. In Abbildung 4.50 wurde die Korrelation zwischen AMD-Dicke und der Maximalbeladung der Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung dargestellt. Aus dieser läßt sich ermitteln, dass die Optische Schichtdicke $iu_{\alpha,Streptavidin} = A + B \cdot iu_{\alpha,AMD}$. Der Faktor $A = 5,52 \pm 1,0$ ist, Faktor $B = 0,68 \pm 0,28$. Über diese Gleichung läßt sich anhand der experimentell bestimmten Polymerdicke extrapolieren, wie hoch der Anteil an aktiven Rezeptoren ist.

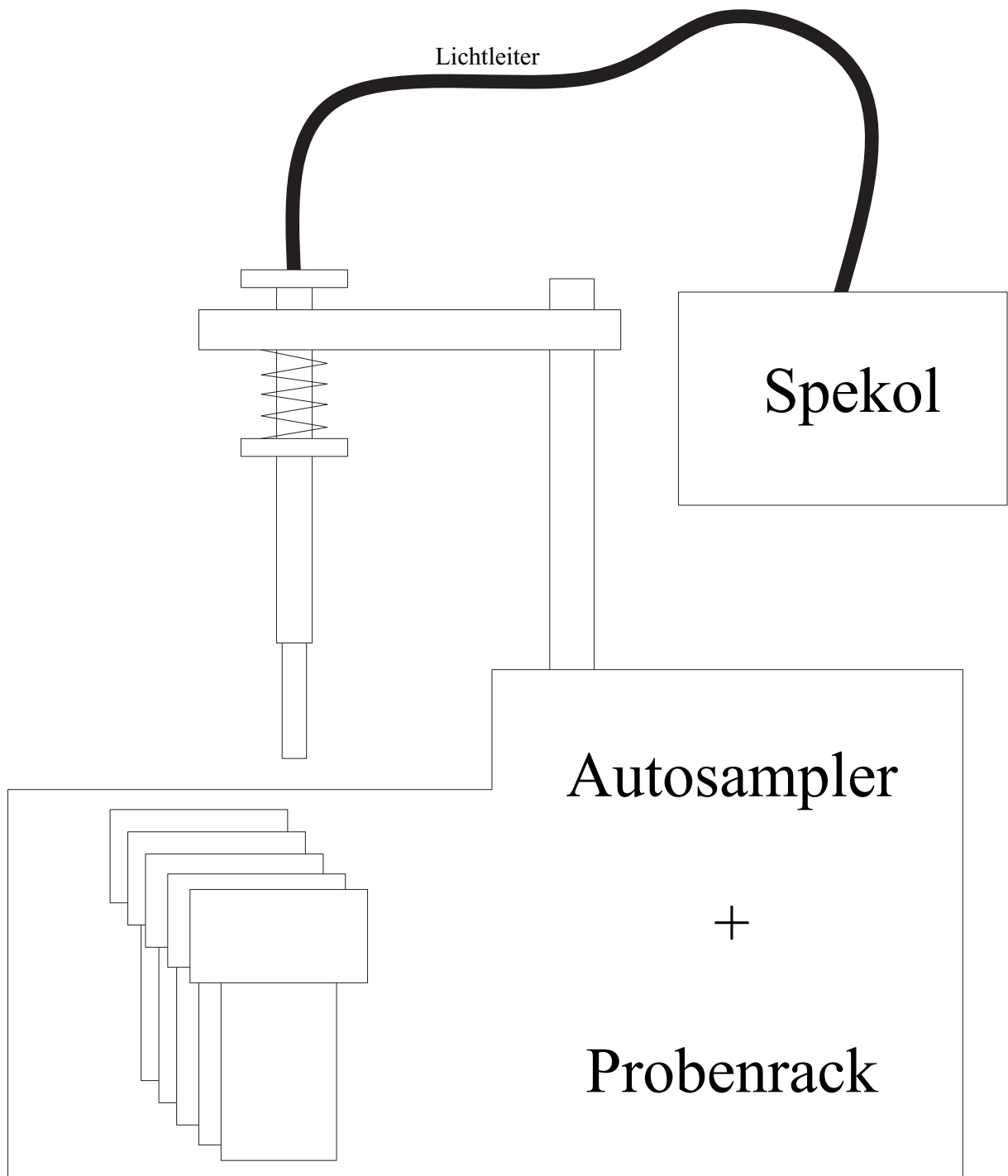


Abbildung 4.48: Skizzierte Darstellung des automatisierten Schichtvermessungssystems.

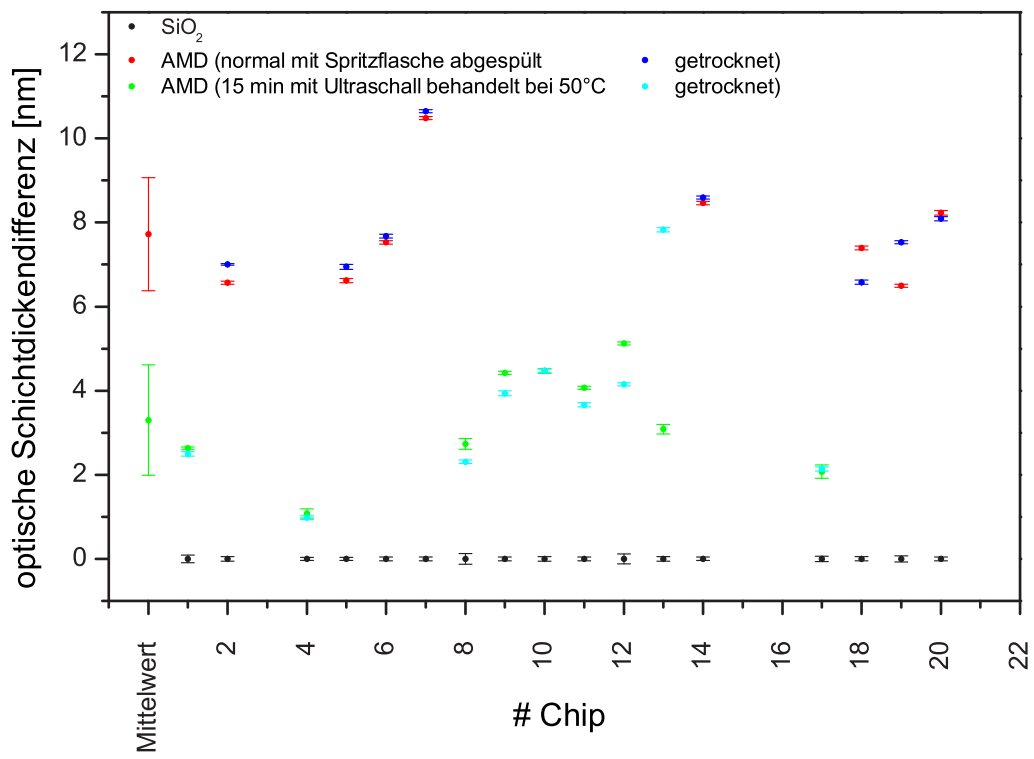


Abbildung 4.49: Optische Schichtdickenänderung durch Polymerbeschichtung von Glas mit AMD.

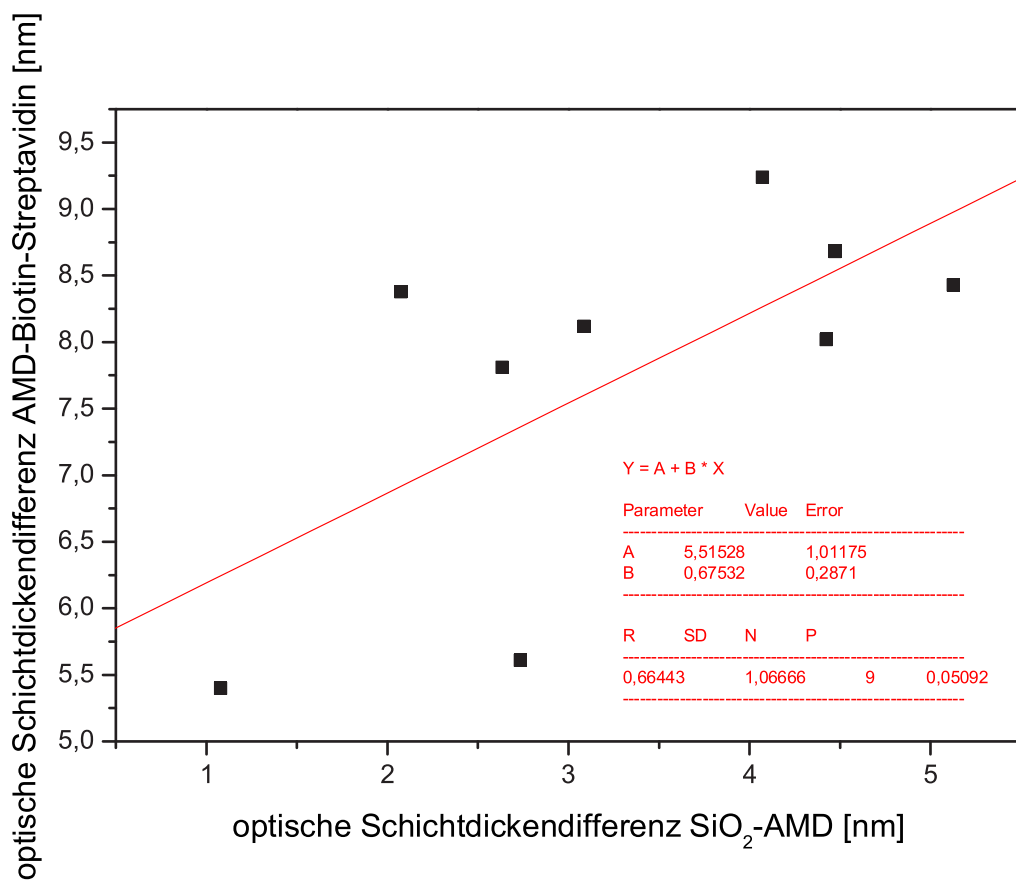


Abbildung 4.50: Korrelation des Biotin-Streptavidin-Signals mit der Polymerbeladung von AMD auf Glas.

Fazit:

- Die physikalische Schichtdicke des Polymers AMD läßt sich durch die Optische Schichtdickenänderung ermitteln. Die Polymerdicke zwischen 18 – 36 nm wird durch Ellipsometriedaten bestätigt.
- Um so höher die Polymerdicke von AMD (in Lösung), desto größer die Maximalbeladung der Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung. Die Korrelation ist beschreibbar durch die Geradengleichung $iu_{\alpha,Streptavidin} = 5,52 + 0,68 \cdot iu_{\alpha,AMD}$.
- Matching-Flüssigkeit bzw. Glasverkipfung liefert einen Fehler in der absoluten Optischen Schichtdicke von $\pm 1000 iu_{\alpha}$. Aus diesem Grund ist es nicht möglich die unspezifische Bindung von Ovalbumin an Polymer zu detektieren, da der Fehler durch wiederholtes Ein- und Ausbauen größer ist als das Bindungssignal von Ovalbumin.

4.4.1.3 Polyethylenglykol (PEG)

Analog dem vorherigen Abschnitt wurden Transducer mit PEG belegt. Die Dicke der PEG-Schicht errechnet sich zu 9 – 27 nm. Nach MUTSCHLER [49] haben PEG-Schichten eine Dicke von $xy \pm xy$ nm. Die Untersuchungen sind in Abbildung 4.51 und 4.52 dargestellt. Aus dieser läßt sich ermitteln, das die Optische Schichtdicke $iu_{\alpha,Streptavidin} = A - B \cdot iu_{\alpha,PEG}$. Der Faktor $A = 2,66 \pm 0,27$ ist, Faktor $B = 0,39 \pm 1,0$.

Im Gegensatz zum AMD, nimmt die Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung mit zunehmender PEG-Beladung des Transducers ab. Bindet man an biotinyliertes PEG Anti-Biotin-Antikörper bzw. Streptavidin, so erkennt man bei beiden Wechselwirkungen eine Korrelation untereinander. Diese läßt sich beschreiben durch die Gleichung $iu_{\alpha,Anti-Biotin} = A + B \cdot iu_{\alpha,Streptavidin}$. Der Faktor $A = 1,7 \pm 0,45$ ist, Faktor $B = 1,19 \pm 0,27$.

Fazit:

- Die physikalische Schichtdicke des Polymers PEG läßt sich durch die Optische Schichtdickenänderung ermitteln. Die Polymerdicke zwischen 9 – 27 nm wird durch Ellipsometriedaten bestätigt.
- Je höher die Polymerdicke von PEG (in Lösung), desto geringer die Maximalbeladung der Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung. Die Korrelation ist beschreibbar durch die Geradengleichung $iu_{\alpha,Streptavidin} = 2,66 + 0,39 \cdot iu_{\alpha,PEG}$.
- Die Anti-Biotin-Bindung läßt sich beschreiben durch die Gleichung $iu_{\alpha,Anti-Biotin} = 1,7 + 1,19 \cdot iu_{\alpha,Streptavidin}$.

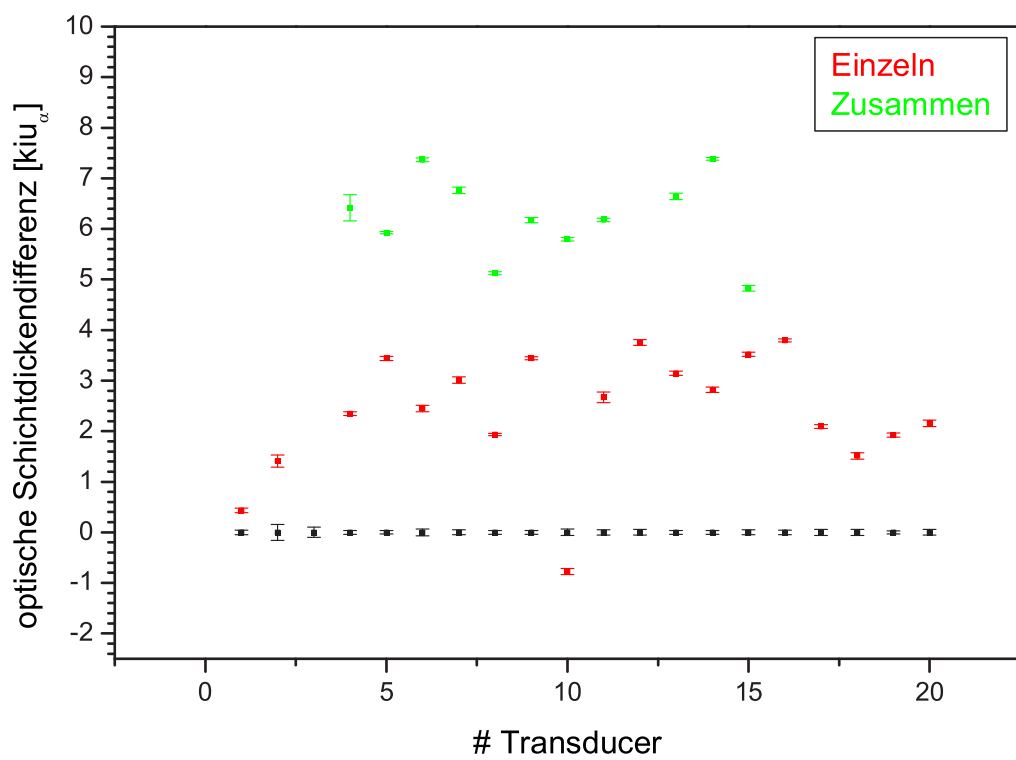


Abbildung 4.51: Optische Schichtdickenänderung durch Polymerbeschichtung von Glas mit PEG.

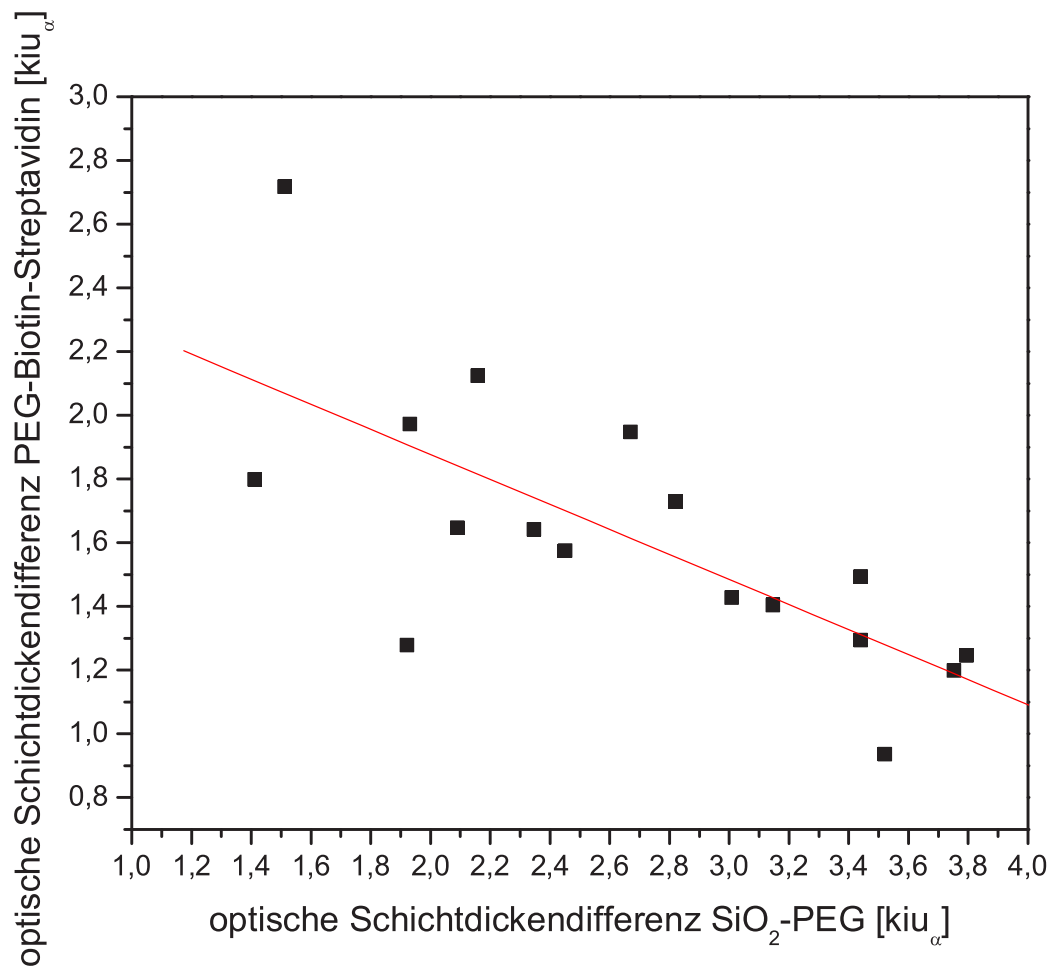


Abbildung 4.52: Korrelation des Biotin-Streptavidin-Signals mit der Polymerbeladung von PEG auf Glas.

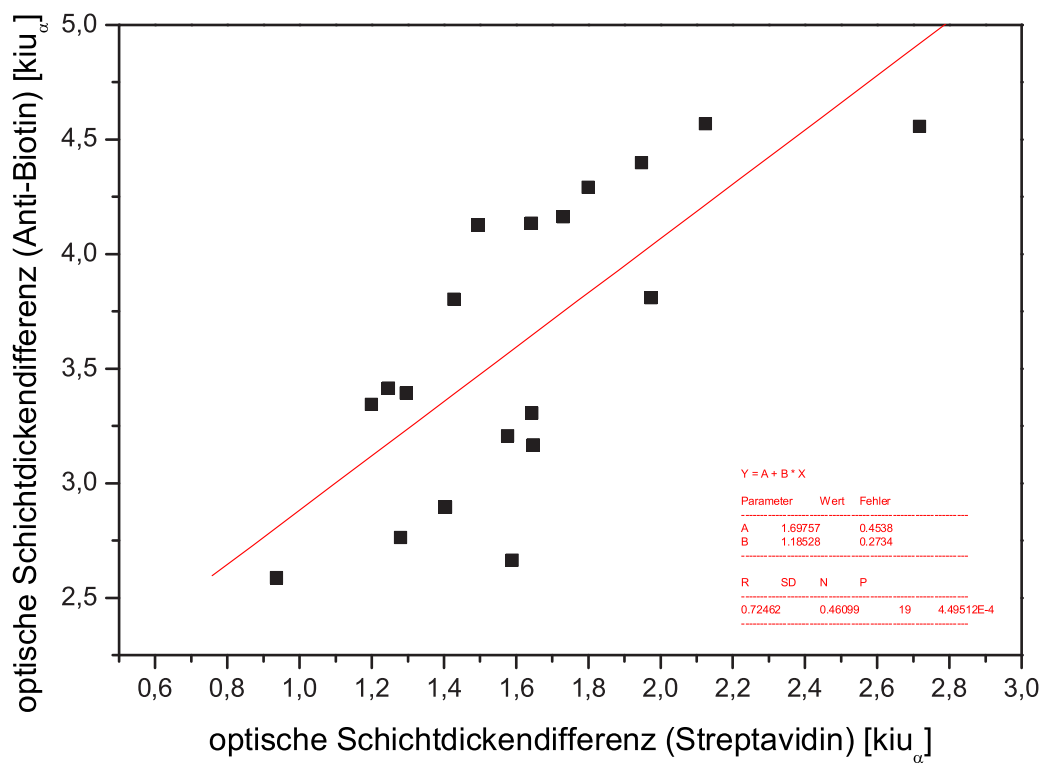


Abbildung 4.53: oD-Signal Anti-Biotin in Abh. vom Streptavidin-Signal.

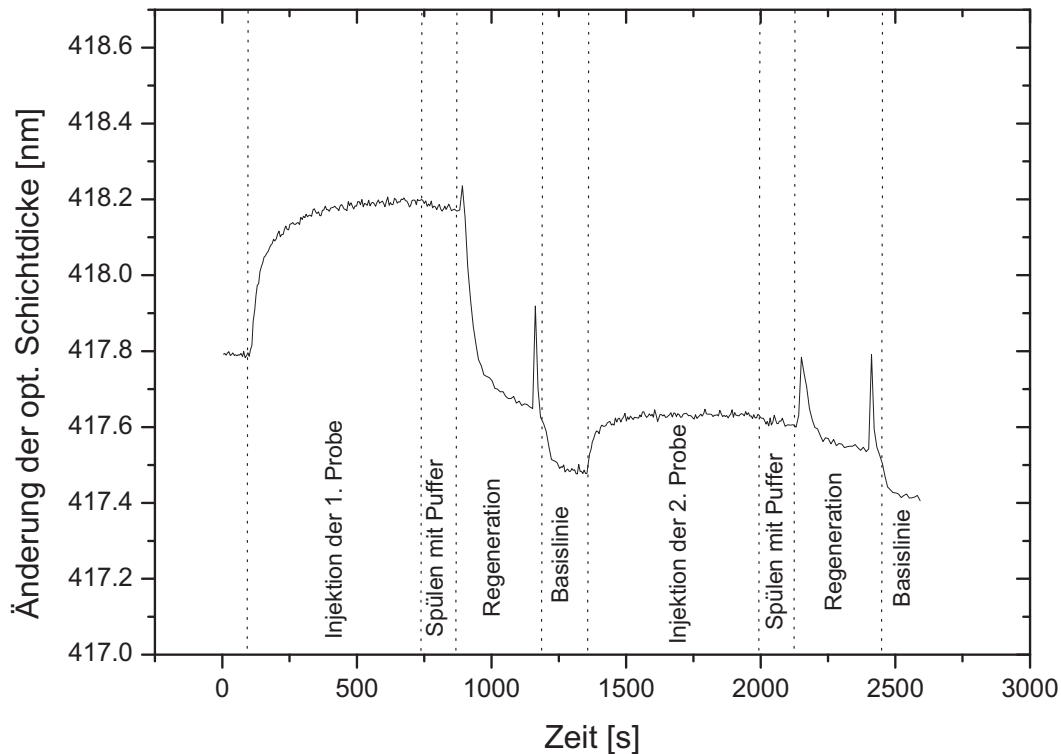


Abbildung 4.54: Prinzipieller Ablauf einer Messung mit zwei Zyklen.

4.4.1.4 Carboxymethyldextran (CMD)

4.4.1.4.1 Unspezifität

Die Unspezifität der mit CMD modifizierten Oberflächen wurde mittels RfS über die Gleichgewichtsbeladung bei Adsorption des Proteins Ovalbumin (OVA; 1 mg/mL) gemessen. Die Messungen liefen in zwei Zyklen ab, bestehend aus Adsorption des Proteins mit anschließender Regeneration je Zyklus. Da die Oberfläche erst nach dem ersten Regenerationsschritt sauber und frei von anderen eventuell adsorbierten Molekülen war, wurde die zweite Bindungskurve für die Auswertung herangezogen. Der prinzipielle Ablauf einer Messung ist in Abbildung 4.54 gezeigt. Es sollten unterschiedliche CMD-Schichttypen untersucht werden, die sich in ihrer Präparation durch Variierung folgender Parameter unterscheiden:

- Reaktionszeit der Polymerlösung mit der silanisierten Oberfläche
- Konzentration der Polymerlösung

Verdünnung	Mittelwert [$iu_{\delta,180}$]
CMD 1:10	52 ± 45
CMD 1:5	101 ± 43
CMD 1:3	86 ± 64

Tabelle 4.6: Mittelwerte der unspezifischen Bindung der verschiedenen Verdünnungen bei Reaktionszeit von drei Stunden.

- Durchmischung der Polymerlösung während der Inkubation

Es wurden Reaktionszeiten von drei Stunden und über Nacht ($\simeq 18$ Stunden), sowie Polymerverdünnungen $1 : x$ mit $x = 3, 5, \text{ und } 10$ (1 mg CMD in $x \mu\text{L}$ bidestilliertem Wasser) untersucht. Die Parameter für die Durchmischung sind in Tabelle 4.8 wiedergegeben.

Die beschichteten, trockenen Transducer wurden in das RfS-Gerät eingebaut und vor jeder Messung mindestens 10 min mit Puffer gespült, um eine Equilibrierung der Schicht im PBS-Medium zu bewirken. Anschließend wurde das jeweilige Charakterisierungsprogramm über die Software `Measure` ausgeführt.

Konzentration und Reaktionszeit

Durch Variation der Konzentration und Reaktionszeit bei der Präparation der Transducer sollte ein optimales Protokoll für die Beschichtung erstellt werden. Dabei sollten die Oberflächen möglichst geringe unspezifische Adsorption von OVA sowie eine gute Reproduzierbarkeit zeigen. Hierfür wurde eine kurze Reaktionszeit von drei Stunden einer langen gegenübergestellt, und durch die drei Verdünnungen der beiden Inkubationszeiten die Unspezifität geprüft. Für jeden Oberflächentyp wurden acht Transducer der Größe $1,2 \times 1,2 \times 0,1 \text{ cm}^3$ präpariert und vermessen.

Inkubation über 3 Stunden

Die geringste unspezifische Adsorption von OVA zeigte sich für die Verdünnung 1:10, die größte für die Verdünnung 1:5. Die Reproduzierbarkeit der Oberflächen war relativ schlecht, erkennbar an den hohen Standardabweichungen. Anhand dieser hohen Fehlerbreiten war keine Gesetzmäßigkeit in der Qualität der Beschichtungen erkennbar. Tabelle 4.6 zeigt die Zahlenwerte der unspezifischen Adsorption.

Inkubation über Nacht

Die über Nacht hergestellten CMD-Schichten zeigten eine signifikante Verbesserung der Unspe-

Verdünnung	Mittelwert [$iu_{\delta,180}$]
CMD 1:10	43 ± 29
CMD 1:5	44 ± 16
CMD 1:3	44 ± 34

Tabelle 4.7: Mittelwert der verschiedenen Verdünnungen bei Reaktionszeit über Nacht.

zifität und der Reproduzierbarkeit. Deutlich erkennbar ist die fast gleiche, geringe Unspezifität von weniger als 50 *pm* für alle drei Verdünnungen. Die Konzentrationsunterschiede in den untersuchten Verdünnungen bewirkten somit kaum einen Effekt auf die Adsorption von OVA. Gegenüber einer Reaktionszeit von drei Stunden zeigten diese Schichten eine Verbesserung um den Faktor 1,5 für die Unspezifität, eine Verbesserung um den Faktor zwei für die Reproduzierbarkeit. Für die Beschichtung der Transducer schien die Verdünnung 1:5 am besten geeignet zu sein, da sie sich von den anderen beiden in einer deutlich besseren Standardabweichung unterschied.

Mischung während Inkubation

Bei den bisher hergestellten CMD-Oberflächen befand sich die Polymerlösung während der Reaktion mit der silanisierten Oberfläche in Ruhe. Hierbei gelangten die Polymermoleküle in der Lösung nur durch Diffusion an die Oberfläche, um dort mit den Epoxy-Funktionen des Silans zu reagieren. Wie sich gezeigt hatte, sollte die Reaktion mindestens über Nacht verlaufen, da die Oberflächen sonst durch das Polymer nicht ausreichend genug abgeschirmt werden.

Mit Hilfe des ArrayBoostersTM sollte untersucht werden, ob sich durch Mischen der Polymerlösung die Inkubationszeit ohne Verschlechterung der Unspezifität herabsetzen ließ. Es wurden ausschließlich Polymerlösungen mit der Verdünnung 1:5 verwendet. Der ArrayBoosterTM lässt sich in folgenden Parametern variieren:

- Dauer der Inkubation
- Temperatur in der Inkubationszelle
- Schwingungsfrequenzen der Transducer-Elektroden
- Schwächung der Schwingungsamplitude, d. h. die Stärke der Durchmischung
- Misch- und Ruheintervalle innerhalb der Inkubationszeit

In Tabelle 4.8 sind die Parameter der jeweiligen Beschichtungsreihen angegeben.

	t [h]	Att [db]	m [s]	r [s]
R1				
Silanisierung	1	8	30	0
Umsetzung mit Polymer	2	8	30	0
R2				
Silanisierung	1	3	30	0
Umsetzung mit Polymer	1	3	30	0
R3				
Silanisierung	1	3	20	10
Umsetzung mit Polymer	1	3	20	10

Tabelle 4.8: Parameter der Beschichtungsreihen.

t ist hierbei die Dauer der Inkubation, **Att** die Schwächung der Schwingungsamplitude, **m** die Dauer des Mischintervalls und **r** die Dauer des Ruheintervalls. Die Schwingungsfrequenzen der beiden Transducer– Elektroden ($\nu_1 = 146 \text{ MHz}$, $\nu_2 = 157 \text{ MHz}$) und die Temperatur in der Zelle ($T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$) wurden nicht variiert.

Da die Transducer der Größe $1,2 \times 1,2 \times 0,1 \text{ cm}^3$ mit dem ArrayBoosterTM nicht kompatibel waren, wurden je Beschichtungsreihe vier Transducer mit jeweiliger Größe von $7,5 \times 2,5 \times 0,1 \text{ cm}^3$ verarbeitet. Um eine Bewertung der so hergestellten Slides vornehmen zu können, wurden diese mit manuell beschichteten Slides derselben Größe bezüglich ihrer Unspezifität verglichen. Die manuell angefertigten Oberflächen wurden nach dem Protokoll aus Abschnitt 3.3 hergestellt, die Inkubationszeit betrug jedoch bei der Umsetzung mit Polymer nur eine Stunde. Mit dem ArrayBoosterTM ließ sich die Inkubationszeit der Polymerlösung herabsetzen, ohne daß eine erhöhte unspezifische Adsorption beobachtet wurde. Eine Verringerung der Amplitudenschwächung von 8 dB auf 3 dB , d. h. eine stärkere Mischung der Polymerlösung, bewirkte eine Verbesserung der Unspezifität um den Faktor vier. Ein Wechsel zwischen Misch- und Ruhe–Intervallen während der Inkubation war sowohl für die Unspezifität als auch für die Reproduzierbarkeit der Schichten förderlich (Tabelle 4.9).

Reihe	Mittelwert [$iu_{\delta,180}$]
M	412 ± 168
R1	97 ± 31
R2	23 ± 37
R3	17 ± 19

Tabelle 4.9: Mittelwerte der unspezifischen Bindungen der im ArrayBoosterTM hergestellten CMD-Schichten.

Fazit:

- Bei Reaktionszeiten von drei Stunden wiesen die CMD-Schichten schlechte Unspezifitäten auf.
- Bei Reaktionszeiten über Nacht erhielt man für alle drei Konzentrationen gute Unspezifitäten, desweiteren zeigte die Verdünnung von 1 mg CMD in 5 μL eine um den Faktor zwei bessere Reproduzierbarkeit gegenüber den anderen beiden Verdünnungen.
- Eine Erhöhung der Inkubationszeit wirkte sich positiv auf die Unspezifität der Schichten aus.
- Das Protokoll der Wahl für CMD-Beschichtungen sind eine Reaktionszeit über Nacht und eine Verdünnung von 1 mg CMD in 5 μL .
- Bei der Verwendung des ArrayBoostersTM bewirkten sowohl eine Erhöhung der Schwingungsamplitude als auch ein Wechsel zwischen Misch- und Ruheintervallen eine Verbesserung der Unspezifität der Oberflächen im Vergleich zu manuell gefertigten Schichten.

4.4.1.4.2 Maximalbeladung der CMD-Oberflächen

Die Maximalbeladung, und damit ein Maß für die Anzahl an aktiven Bindungsstellen, wurde über das System Biotin/Streptavidin ermittelt. Hierfür wurden die CMD-Oberflächen (Verdünnung 1:5) biotinyliert. Die Transducer wurden während einer Messung zuerst mit Regenerationslösung gespült, dann mit OVA ($c = 1 \text{ mg/mL}$) auf Unspezifität geprüft und anschließend mit Streptavidin ($c = 50 \text{ }\mu\text{g/mL}$) die Maximalbeladung getestet. Es wurden acht Transducer vermessen. Ein prinzipieller Ablauf ist in Abbildung 4.55 gezeigt.

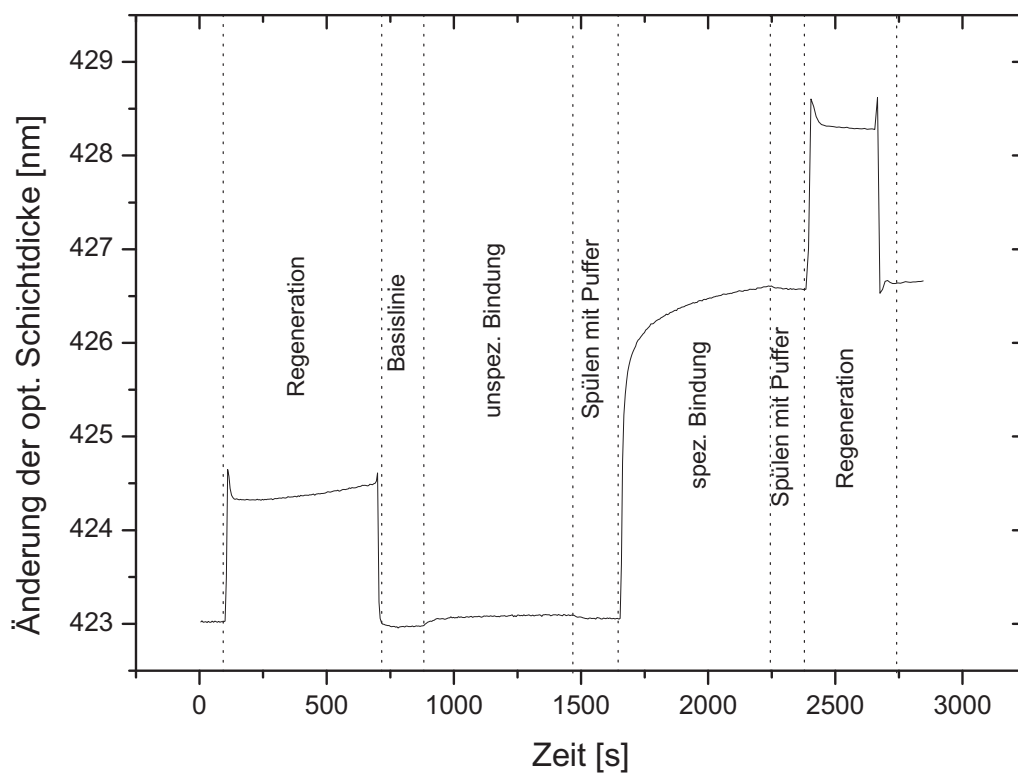


Abbildung 4.55: Prinzipieller Ablauf einer Messung auf Maximalbeladung.

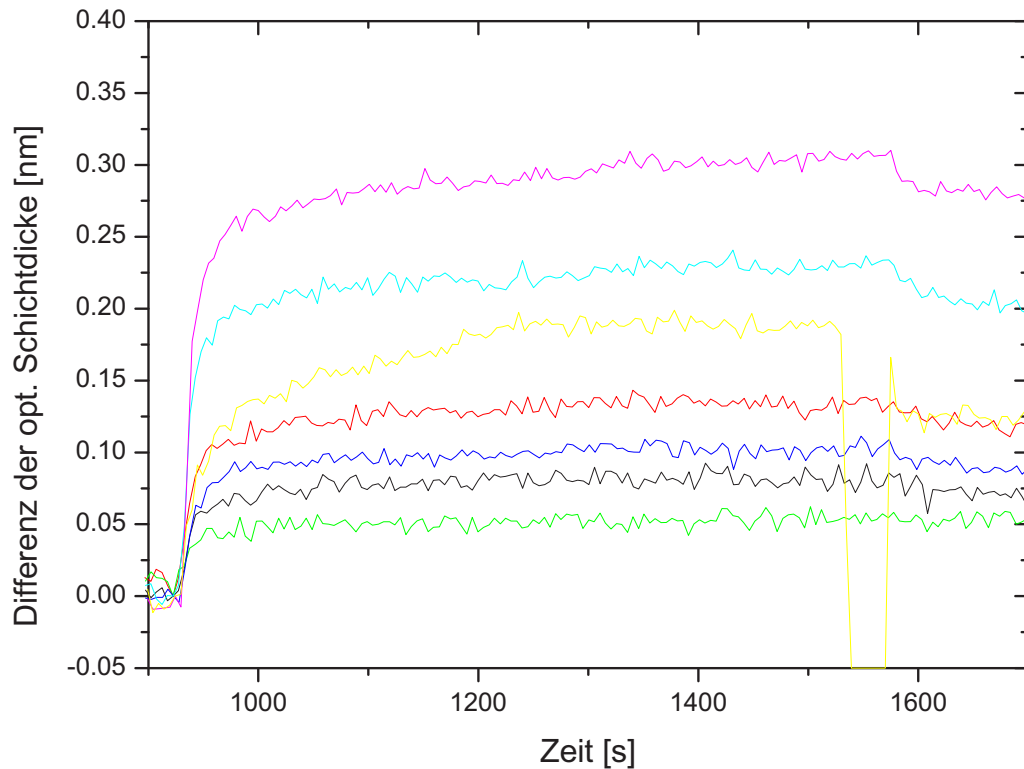


Abbildung 4.56: Unspezifität der biotinylierten CMD-Oberflächen.

Unspezifität der biotinylierten Oberflächen

Die CMD-Oberflächen zeigten nach der Umsetzung mit Biotinhydrazid eine erhöhte unspezifische Bindung gegenüber den nicht-biotinylierten Schichten. Dies kann bei hohem Funktionalisierungsgrad der Oberfläche vorkommen. Dabei geht das Protein entweder unspezifische Wechselwirkungen mit der Biotin-Gruppe ein, die umgesetzten Carboxylgruppen stoßen durch die verlorengegangenen negativen Ladungen die Protein-Moleküle weniger ab, oder die Anordnung des Polymers auf der Oberfläche hat sich mit dem Reaktionsschritt verändert, wodurch das Substrat wieder in Kontakt mit der OVA-Lösung treten konnte [56]. Die Bindungskurven von 1 mg/mL OVA sind in Abbildung 4.56 gezeigt. Für die unspezifische Bindung von OVA ergab sich ein Mittelwert von $158 \pm 90 \text{ pm}$. Im Vergleich zu den nicht-biotinylierten Oberflächen bedeutete dies eine um den Faktor drei höhere unspezifische Bindung.

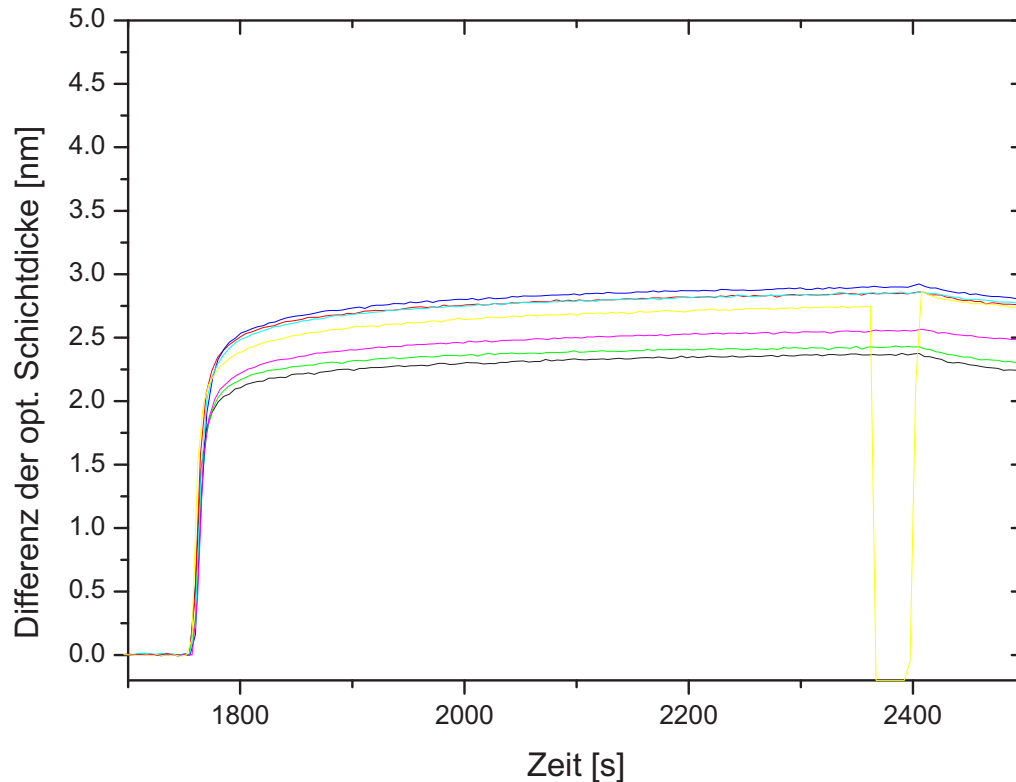


Abbildung 4.57: Maximalbeladung der CMD-Oberflächen.

Maximalbeladung der biotinylierten Oberflächen

Die Bindungskurven von $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ Streptavidin an das biotinylierte CMD sind in Abbildung 4.57 dargestellt. Der Mittelwert für die spezifische Bindung betrug $2649 \pm 218 \text{ pm}$. Im Vergleich hierzu zeigten biotinylierte Aminodextran(AMD)-Schichten bei spezifischer Bindung von $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ Streptavidin eine Schichtdickenzunahme von 12 bis 18 nm [9].

Durchmischung

Die mit dem ArrayBoosterTM hergestellten CMD-Schichten wurden ebenfalls auf Maximalbeladung geprüft. Nach Biotinylierung über das Protokoll aus Abschnitt 3.3 wurde wieder mit $1 \text{ mg}/\text{mL}$ OVA die unspezifische, mit $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ Streptavidin die spezifische Bindung gemessen. Aus diesen Abbildungen und der Tabelle 4.10 ist ersichtlich, dass die manuell gefertigten Schichten eine große unspezifische Adsorption, aber auch ein hohes Gleichgewichtssignal für

Reihe	Unspezifität [$iu_{\delta,180}$]	GG-Beladung [$iu_{\delta,180}$]
Manuell	419 ± 17	3177 ± 92
R2	66 ± 2	2817 ± 43
R3	118 ± 91	2533 ± 386

Tabelle 4.10: Mittelwerte der unspezifischen und spezifischen Bindungen nach Biotinylierung der im ArrayBoosterTM hergestellten Oberflächen.

die spezifische Bindung zeigen. Im Gegensatz hierzu findet man bei mit dem ArrayBoosterTM hergestellten Oberflächen eine geringere unspezifische Bindung von OVA sowie ein niedrigeres Gleichgewichtssignal für die Bindung von Streptavidin an das immobilisierte Biotin. Es ist zu vermuten, dass mehr Carboxyl-Funktionen des Polymers durch Mischen der Lösung mit den Epoxy-Gruppen der silanisierten Oberfläche reagieren und das Substrat dadurch besser abschirmen. Somit bleiben aber weniger aktive Bindungsstellen für die Umsetzung mit Biotinhydrazid frei, was dann den Verlust an Signalstärke bei spezifischer Bindung bewirkt.

Wie aussagekräftig diese Ergebnisse sind, ist aufgrund von nur zwei Messungen je Reihe fraglich. Ein Trend ist jedoch erkennbar.

Fazit:

- Nach Biotinylierung der CMD-Oberflächen wiesen diese Schichten eine um den Faktor drei schlechtere Unspezifität auf.
- Die höhere unspezifische Adsorption des Proteins konnte entweder von der Wechselwirkung mit den eingeführten Biotingruppen oder von Wechselwirkungen mit dem Substrat herrühren. Bei der Aktivierung der Oberfläche und Umsetzung mit Biotinhydrazid wurde eventuell die Konformation der immobilisierten Polymere verändert und dadurch ein Teil der Oberfläche freigelegt.
- Beschichtungen im ArrayBoosterTM führten, im Vergleich zur manuellen Verarbeitung, zu einer Erniedrigung sowohl der unspezifischen als auch der spezifischen Bindung. Bei Mischung der Polymerlösung während der Inkubation konnten mehr Carboxyl-Funktionen des Polymers an die Oberfläche binden. Damit standen für die Umsetzung mit Biotinhydrazid weniger aktive Bindungsstellen zur Verfügung.

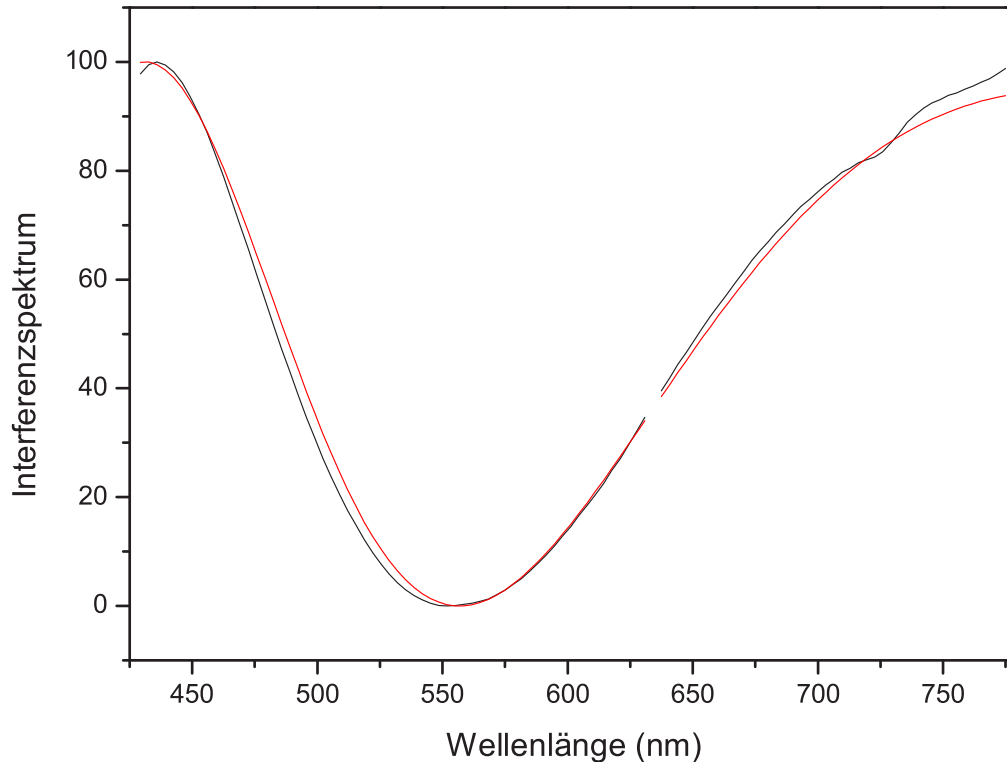


Abbildung 4.58: An experimentelle Daten angepasstes simuliertes Interferenzspektrum.

4.4.1.5 Schichtanalyse

Um von einer optischen Schichtdickenänderung auf eine physikalische Schichtänderung zu schließen, wurde – analog zur Ellipsometrie – ein Anpassungsalgorithmus programmiert der sich iterativ mit einem simulierten Interferenzspektrum an experimentell ermittelte Spektren anpasst. Als Versuch wurde von Schichtsystemen α (siehe Abschnitt 4.3.3.2) an Luft Interferenzspektren aufgenommen und diese dem Algorithmus übergeben. Als Ergebnis folgten Daten wie in Tabelle 4.11 dargestellt. Die etwas niedrigere Dicke des SiO_2 rührt von der mehrfachen Behandlung des Glasplättchens mit Piranha her.

Fazit:

- Der interaktive Anpassungsalgorithmus von VirtuRIfS liefert Ergebnisse, die eine reproduzierbare Schichtsystemanalyse gewährleistet.

	Mittelwert (nm)	SD (nm)
SiO2.thickness	320,04067	1,66161
AMD.thickness	3,43733	2,00414
SiO2.n	1,41403	0,02628
AMD.n	1,6037	0,0064

Tabelle 4.11: Ermittelte physikalische Parameter des Anpassungsalgorithmus.

4.4.2 Oligonukleotide

4.4.2.1 Hybridisierung

4.4.2.1.1 Parallel aufgenommene Hybridisierungskurven

Bis dato wurden keine Affinitätskonstanten von Oligonukleotidwechselwirkungen mit Hilfe eines parallelen RIFs-Setups ermittelt. SAUER [67] ermittelte Affinitätskonstanten für Oligonukleotidwechselwirkungen am Einzelplatz. JUNG [39] hat Messungen am parallelen System durchgeführt, aber nur qualitative Ergebnisse erhalten. Er beschichtete die Detektionsfläche ganzflächig mit den Rezeptormolekülen. Er verwendete kein Spotting-Protokoll. Desweiteren nutzte er keine Flußzelle für diese Messungen. Die folgende Messung wird die qualitative Messung von gespotteten Oligonukleotid Arrays im Fluß zeigen (siehe 4.59). Diese Messungen wurden reproduzierbar mit dem Detektionsgerät der 3. Generation aufgenommen. Abbildung 4.59 zeigt die Bindungskurve eines Spots. Allerdings ist wie bei JUNG eine sehr hohe Ligand-Konzentration mit $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ eingesetzt worden, die zwar eine spezifische Wechselwirkung identifiziert, eine konzentrationsabhängige Messreihe zur Bestimmung kinetischer Ratenkonstanten aber unmöglich macht. Die Konzentration des immobilisierten Rezeptors ist in Abschnitt 3.3 angegeben. Wie man der Abbildung entnehmen kann ist das SNR-Verhältnis maximal $SNR = 5 - 6$. Insofern ist eine quantitative Bestimmung der Ratenkonstanten nicht möglich, da das $SNR > 30$ sein sollte. Unabhängig von den Eigenschaften der Meßapparatur gilt es die Immobilisierungsparameter zu optimieren, damit auch Affinitätskonstanten aufgenommen werden können. Eine möglichst hohe maximale Beladung unterstützt dieses Vorhaben. Momentan zeigen Spots des Durchmessers 150 bis 250 μm eine schlechtere Beladung als ein Spot von 2 mm Durchmesser. Dies erschwert eine Signalaufnahme der Wechselwirkung in dem großen Rauschen der Meßapparatur.

Anzunehmen wäre, dass mit steigender Kettenlänge der DNA-Fragmente die Anzahl der Dipole im Molekül steigt. Dadurch sollte die Wechselwirkung mit den Sonden (Photonen) und somit die Signalehöhe der Optischen Schichtdicke steigen. Wie NEFF [51] jedoch zeigen konnte, ist

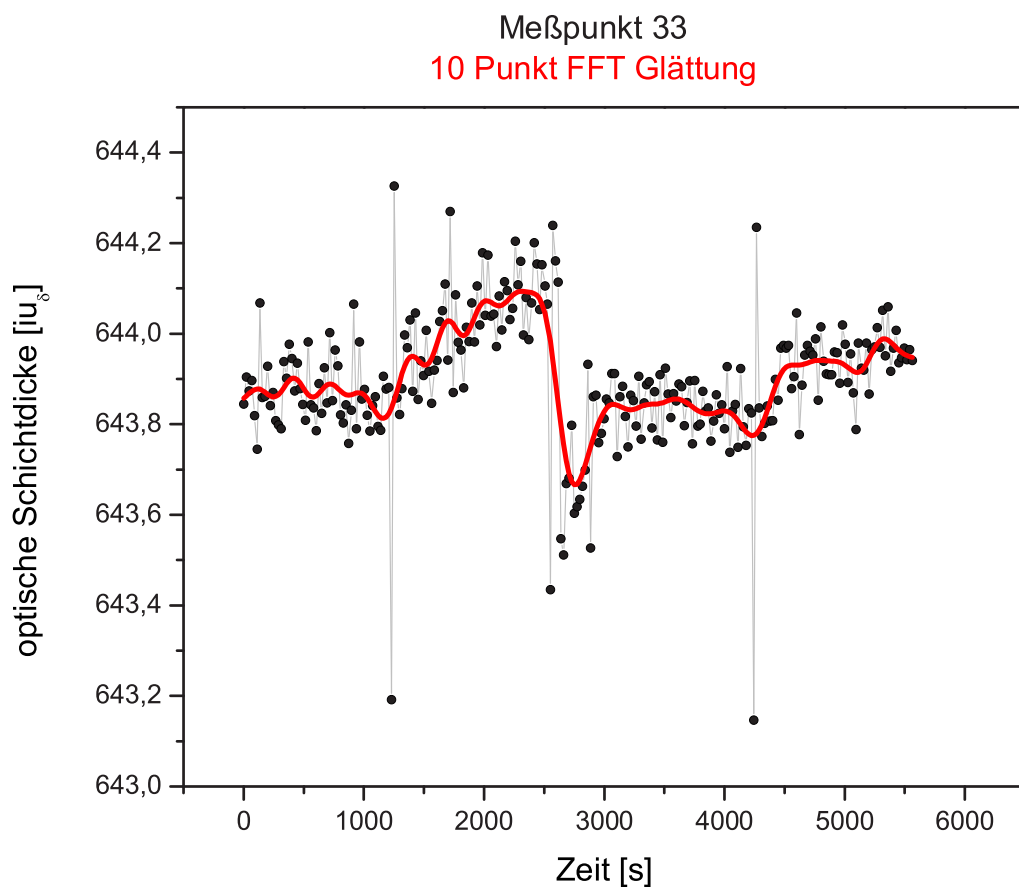


Abbildung 4.59: Spezifische DNA-Bindung eines 45mers ($10\mu L/mL$) an immobilisiertes 24mer. Zu sehen sind die Phasen: Puffer, Anbindung, Regeneration, Puffer, Anbindung.

der Zusammenhang zwischen DNA-Kettenlänge und RIfS-Signal nicht linear, weshalb das Vermessen unterschiedlicher DNA-Fragmente erschwert ist, besonders in Realproben.

Fazit:

- Qualitativ, spezifisch und reproduzierbar sind Oligonukleotid-Wechselwirkungen mit Hilfe des miniaturisierten, parallelen Geräts der 3.ten Generation im Fluß detektierbar. Das SNR ist kleiner 6 bei eingesetztem Oligonukleotid (45mer) der Konzentration $10 \mu g/mL$.

4.4.2.1.2 Auswertung der Ratenkonstanten

Nach SIGMUNDSSON [70] kann eine kinetische Bindungskurve zur Bestimmung der massentransportlimitierten Ratenkonstanten herangezogen werden. Die im Anhang ab Seite 164 angegebenen Parameter sind notwendig, um eine Bindungskurve durch Simulationsrechnungen vollständig zu beschreiben. Durch das Brechungsindexinkrement und den RIfS-Signal / Gamma Quotienten ist es möglich eine massentransportkontrollierte Wechselwirkung aus optischen Schichtdickensignalen zu ermitteln.

In Abbildung 4.60 werden simulierte Bindungskurven dargestellt.

Fazit:

- Ein in `VirtuRIfS` implementierter Anpassungsalgorithmus kann eine massentransportkontrollierte Bindungskurve an Bindungskurven der Optischen Schichtdicke angleichen. Er ermöglicht sowohl die Bestimmung von Raten, als auch von Diffusionskonstanten.
- Kennt man das Brechungsinkrement der zu bindenden Komponente, läßt sich die physikalische Dicke während der molekularen Wechselwirkung bestimmen.

4.4.2.2 Schmelzkurven

Während meiner Diplomarbeit [79] wurden diverse temperierbare Flußzellen genutzt und untersucht. Eine Zelle nutzte als Flußzelle das Material Polyetheretherketon (PEEK) und eine andere eloxiertes Aluminium (ALU). Beide besaßen nur eine einseitige Heizspirale wodurch immer ein Temperaturgradient von oder zur Normalen der Transduceroberfläche vorherrschte. Dadurch stimmten die eingestellten Temperaturwerte am Regler, welcher seinen Temperatursensor auf der Flußzellenrückseite hatte, nicht mit den real vorherrschenden Temperaturen in der Flußzelle überein. Aus diesen zwei Gründen wurde die in dieser Arbeit genutzte zweiseitig temperierbare Zelle entwickelt. Alle in der Diplomarbeit angegebenen Temperaturwerte (in Diagrammen) beziehen sich auf die jeweilige Temperatur, die auf der Transducer-Rückseite gemessen wurde. Die „wirkliche“ Temperatur an der Transduceroberfläche liegt somit zwischen der

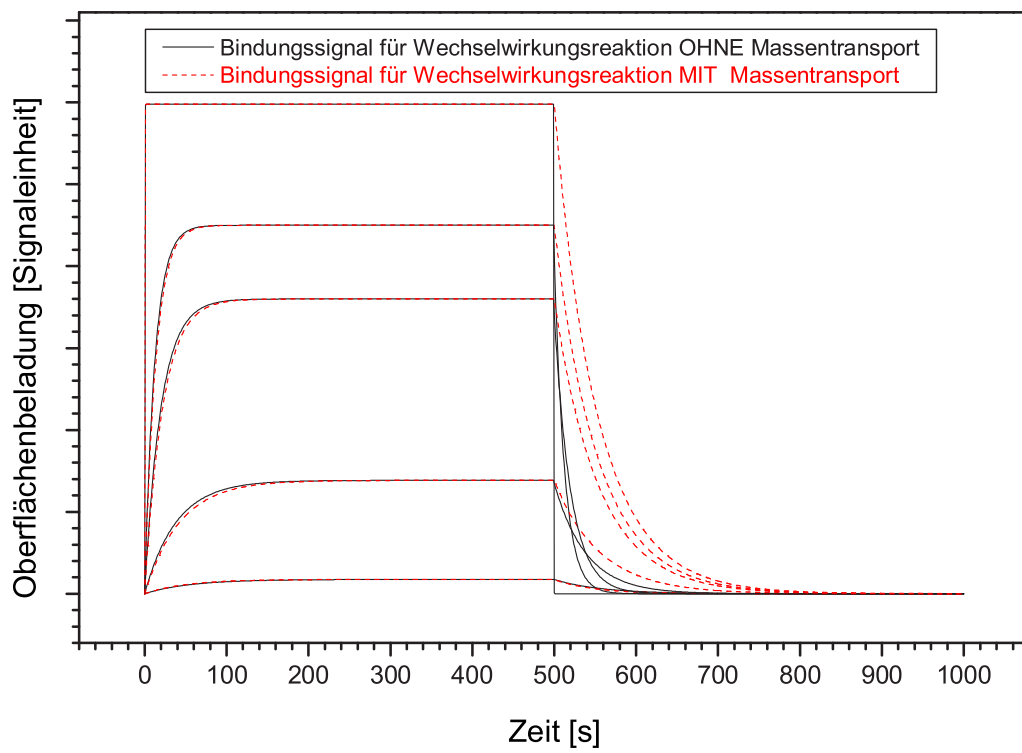


Abbildung 4.60: Simulierte massentransportkontrollierte Bindungskurven.

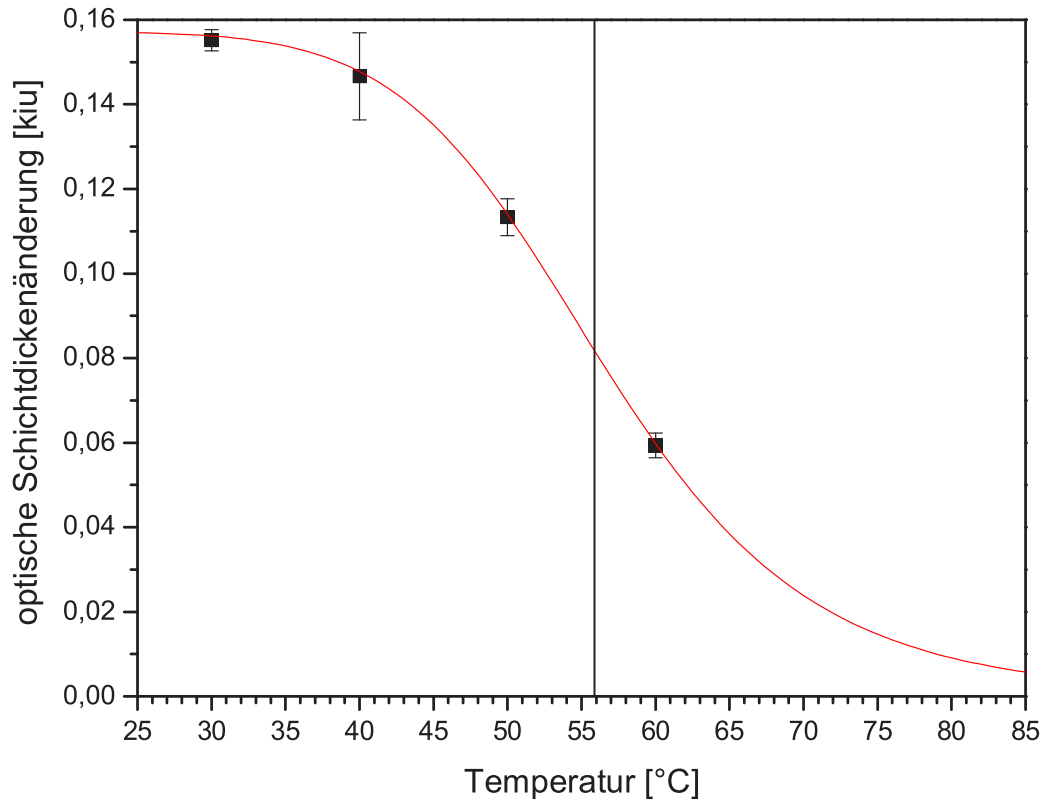


Abbildung 4.61: Aufgenommen Schmelzkurve des OIA4-OIA3-Doppelstrangsystems mit berechnetem Schmelzpunkt nach Glg. 2.2

gemessenen Temperatur auf der Rückseite und der Eingestellten des Reglers. Spätere Schmelzpunktberechnung vom Doppelstrang OIA4-OIA3 zeigte, dass diese Angaben nicht korrekt sind. Die Ergebnisse sind korrekter, wenn sie auf die Temperaturwerte des Reglers bezogen werden (Abbildung 4.61). Somit müssen die Diagramme immer mit den Tabellen 4.1 bzw. 4.2 in der Diplomarbeit korrigiert werden. Dies gilt speziell für die Werte, welche mit der Aluminium-Zelle gemessen wurden. Bei der PEEK-Zelle ist diese Umrechnung nicht ganz korrekt, da diese nachgewiesen keine 100%ige Wärmeübertragung zur Oberfläche gewährleistet.

Der berechnete Schmelzpunkt stimmt nur mit den experimentell bestimmten Werten überein, wenn die Reglertemperatur als Temperatur auf der Transduceroberfläche angenommen wird. Die Interpretation in der Diplomarbeit, dass sich in der PEEK-Zelle die Transduceroberfläche nicht richtig erwärmt, sollte richtig sein, denn ein Temperaturgradient sollte das Gleichgewicht

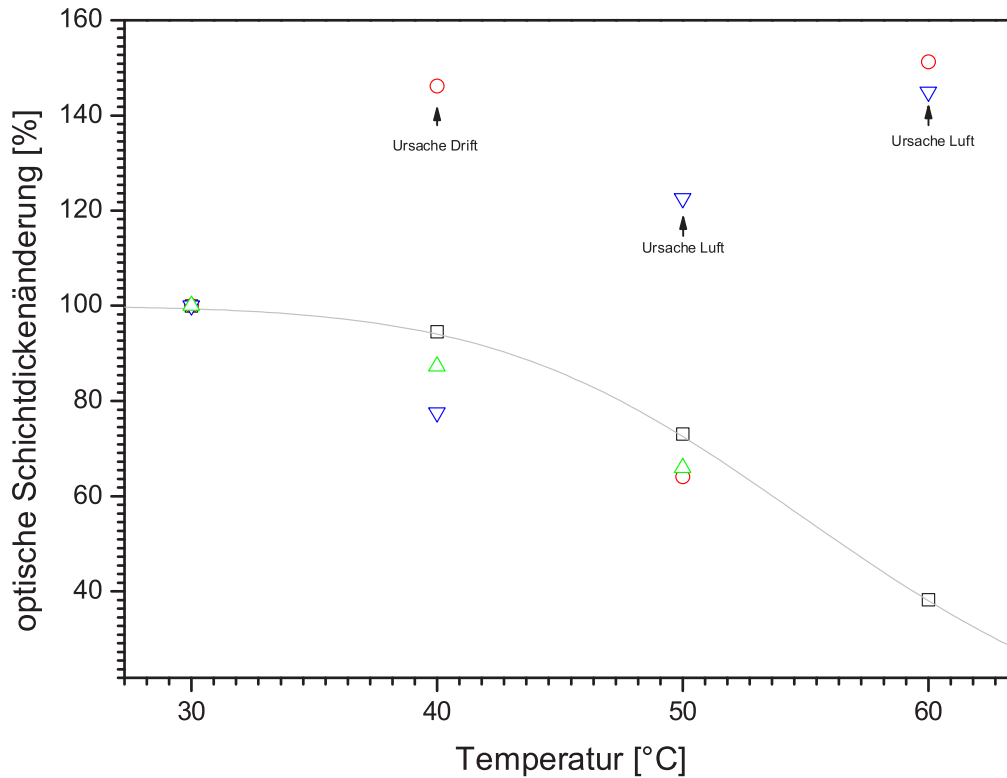


Abbildung 4.62: Oberflächenbeladungskorrigierte Hybridisierungskurve des OIA4-OIA3-Systems.

der Hybridisierung verschieben. Eine Zunahme der Belegung mit der Temperatur macht nur dann Sinn, wenn weniger Teilchen (durch Gradient) wegdiffundieren können als hindiffundieren und allein die Diffusion die DNA auf die Oberfläche transportiert. Dadurch wird mit höherer Temperatur mehr auf die Oberfläche getragen (stärkere Diffusion). Es kann keine diffusionsfreie DNA-DNA-Wechselwirkung beobachtet werden, welche genau entgegengesetztes Ergebnis liefern sollte. Diagramm 4.62 ist noch einmal der Beweis, dass nicht nur die Abnahme der Belegungsichte der Oberfläche gemessen wurde, da bei den hier vorkommenden Messungen auf Maximalbelegung normiert wurde (siehe Abschnitt 3.3.3).

Kapitel 5

Zusammenfassung und Ausblick

„Would you tell me, please, which way I ought to go from here ?“

„That depends a good deal on where you want to get to“ , said the Cat.

„I don´t much care where ...“, said Alice.

„Then it doesn´t matter which way you go“,said the Cat.

„So long as I get somewhere“, Alice added as an explanation.

„Oh, you´re sure to do that“, said the Cat. „If you only walk long enough.“

LEWIS CARROLL

5.1 Zusammenfassung

Mit Hilfe der RfS sollte ein Gensensor realisiert werden. In dieser Arbeit wurden die Einschränkungen dieses parallelen Detektionssystems qualitativ und quantitativ analysiert. Die signalerzeugenden (Lichtquelle), signalumwandelnden (Transducer und Polymeroberfläche), signalmessenden (CCD-Detektor) und signalverarbeitenden (Datenverarbeitung und Algorithmen) Komponenten des parallelen Systems wurden untersucht. Hierzu wurden Messungen am Einkanalssystem und verschiedenen parallelen Detektionssystemen durchgeführt. Die Reproduzierbarkeit der Oberflächenchemie wurde analysiert und verbessert. Schließlich wurden technische Änderungen an RfS- Systemen entwickelt, die erstens temperaturabhängige Messungen und zweitens, die markierungsfreien Messungen von Hybridisierungsvorgängen auf Mikroarrays ermöglichen. Zusammenfassend erweist sich die RfS als paralleles Detektionssystem für die Betrachtung von Oligonukleotidwechselwirkungen als zukunftssträftig. Im Einzelnen wurden im Verlaufe dieser Arbeit folgende Ergebnisse erzielt: Ein CCD-Detektor wird durch die Elektronenkapazität des Einzelpixels, die Dynamik und Bildmessrate limitiert. Beschreiben läßt sich diese Limitierung durch die Poisson-Verteilung. Ein Vergleich der theoretischen Grenze von

CCD- Detektoren mit ihrer experimentellen Grenze ergibt, daß sich die theoretischen Grenzen bei High-End CCD-Kameras nicht erreichen lassen. Als kleinste Poisson- Verteilung ergibt sich pro Pixel ein Rauschen von $0,5 \pm 0,15 \text{ \%}_{bit}$.

Die als Weisslichtquelle genutzte Hal100 von Zeiss zeigt ein zeitliches Rauschen von $0,1 \pm 0,1 \text{ \%}_{bit}$. Dieser Wert führt dazu, daß durch Offline-Referenzierung bei einer Pixelsummierung von mehr als $20 \times 20 \text{ Pixel}$ keine Verbesserung des Ergebnisses erreicht wird. Unterschritten wird dieser Grenzwert nur durch Online-Referenzierung. Geht man jedoch von der gegebenen Bildauflösung der SVGA PCO Kameras aus, so ergibt sich eine maximale Pixelanzahl pro Messpunkt von $50 \times 50 \text{ Pixel}$ wenn man mindestens 400 parallele Meßpunkte (Spots) aufnehmen möchte. Beide Referenzierungsstrategien sind mit Hilfe einer zeitlichen und örtlichen Bildfehlersimulation qualitativ und quantitativ verstehbar.

Jedoch ist das Bildrauschen unabhängig von der Spotgröße, d.h. des Abbildungsmaßstabes. Eine Verbesserung des Intensitätsrauschen pro Spot ist nur durch Pixelbinning oder zeitliche Aufsummierung möglich.

Der in dieser Arbeit aufgebaute parallele RfS-Sensor liefert ein $25\times$ besseres Ergebnis (Rauschen) als der vorhergehende MiniRfS-Aufbau nach JUNG. Ein Faktor 5 kommt durch die bessere Bildhomogenität (optische Verbesserung) und die größere Signaldynamik zustande, ein weiterer Faktor 5 durch die höhere Meßgeschwindigkeit und die zeitliche Aufsummierung der 30 Einzelspektren (zeitliche Verbesserung).

Die Optische Schichtdicke ist abhängig vom physikalischen Schichtsystem, Einstrahlwinkel und dem Meßsystem. Aus diesem Grund wurde die Optische Schichtdickeneinheit *iu* (*interference unit*) definiert, die eine exakte Angabe aller eingehenden Parameter erlaubt. Dadurch ist es möglich, die Fehler der entsprechenden Systeme auf eine vergleichbare Basis zu stellen.

Durch eine Korrelation zwischen Bildrauschen und Optischem Schichtdickenrauschen läßt sich ein absolutes Maß für die Detektionsgüte eines parallelen Systems angeben. Für das Stereomikroskop-System ist dieser Faktor $1540 \pm 160 \text{ iu}_\epsilon / \text{ \%}_{bit}$, wobei das Signalrauschen/Signaldynamik $1,84 \pm 1,10 \text{ \%}_{100\% \text{ Signaldynamik}, 1 \times 1 \text{ Pixel}}$ beträgt. Für das System δ und ϵ errechnet sich ein minimaler Umrechnungsfaktor von $200 \text{ iu}_{\delta,\epsilon} / \text{ \%}_{bit}$.

Zur Auswertung der Interferenzspektren in Optische Schichtdickenspektren wurde eine modifizierte cos-Funktion entwickelt, mit deren Hilfe es möglich ist, die Ordnung von Extremas in dispersionsverzerrten Interferenzspektren ohne Nebenextrema zu bestimmen. Das Optische Schichtdickenrauschen nimmt mit abnehmendem Nutzsignalanteil ab. Für das System α ist die Korrelation $43 \cdot \text{iu}_\alpha - 0,145 \cdot \text{iu}_\alpha / \text{ \%}$ bei einem Intensitätsrauschen von 1 \%_{bit} .

Als alternatives Detektionssystem wurde ein winkelabhängiges RfS-System durchgerechnet, um eine Verbesserung zu erzielen. Jedoch zeigt eine Winkelabhängigkeit schlechtere Schichtdickensignale, weshalb es sich nicht für ein paralleles Detektionssystem eignet.

In Abhängigkeit der Temperatur gibt es Faktoren, die eine Zunahme und eine Abnahme der Optischen Schichtdicke bewirken. Die optische Schichtdicke nimmt schnell mit Zunahme der Temperatur ab. Als Ursache konnte eine Intensitätszunahme im Interferenzspektrum festgestellt werden, welche durch den abnehmenden Brechnugsindex des Superstrats hervorgerufen wird. Die langsame Zunahme der Optischen Schichtdicke wird vermutlich hauptsächlich durch die Dämpfung des Lichtleiters verursacht. Ein weiterer Faktor ist die Brechungsindexzunahme und die Ausdehnung der Schichten des Glas-Transducers.

Die physikalische Schichtdicke des Polymers AMD läßt sich durch die Optische Schichtdickenänderung ermitteln. Die Polmerdicke zwischen $18 - 36 \text{ nm}$ wird durch Ellipsometriedaten bestätigt. Für PEG ergibt sich ein Wert zwischen $9 - 27 \text{ nm}$.

Zur Verbesserung der Polymerhomogenität auf der Oberfläche wurde der ArrayBooster der Firma Advalytix genutzt. Die Homogenität verbesserte die Unspezifität um einen Faktor 3-4. Desweiteren reduziert es die Reaktionszeit der Polymerbeschichtung von 8 Stunden auf 1 Stunde.

5.2 Ausblick

Mit dem Marktauftritt des markierungsfreien Detektionssystems **BIAffinity** der Analytik Jena AG in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. GAUGLITZ erhält die Reflektometrische Interferenzspektroskopie Einzug in die industrielle und universitäre Anwendung. Es ist zu erwarten, dass sich dieses Detektionsprinzip auch auf den Biochip-Markt ausdehnt. Die markierungsfreie Biochip-Detektion von Oligonukleotiden ist eine Hürde für jedes biomolekulare Detektionsverfahren, da diese mit ihrem Molekulargewicht auch nur kleine Signale gegenüber großen Molekülen liefert. Mit Hilfe der in dieser Arbeit neu konzipierten parallelen Detektionseinheit stellt sich bei idealer Oberflächenchemie (optimale Maximalbelastung) ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis > 300 ein, wenn im 30 s Abstand Spektren aufintegriert werden. Mit einer schnelleren CCD-Kamera kann dies noch bis zu einem $SNR > 1000$ gesteigert werden. Alle anderen am Markt existierenden markierungsfreien parallelen Detektionssysteme nutzen die Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) als Prinzip. Der FlexChipTM der Firma HTS Biosystems [8] nutzt Grating-Coupled Surface Plasmon Resonance (GCSPR) und als Nachweisgrenze wird für dieses System ein Molekulargewicht von 8000 Dalton angegeben. Die Firma Applied Biosystems bietet das Gerät „8500 Affinity Chip Analyzer“ an. Beide Systeme geben 400 Spots als obere Grenze an. Die Firma GenTel verspricht, Ende 2004 ein weiteres auf SPR beruhendes Chip-System auf den Markt zu bringen [23]. RIFs eröffnet ein robustes Detektionssystem für miniaturisierte Chip-Anwendungen mit dem sich Moleküle unter 8000 Dalton detektieren lassen. Dies eröffnet sowohl für die Oligonukleotid-Analytik, als auch für die parallele Proteinanalytik ein weites analytisches Gebiet. Auch im Bereich therapeutisch oder diagnostisch einzusetzender Biomoleküle, wie Antikörpern oder antikörperähnlicher Affinitätsbindern, ist das Potenzial der markierungsfreien Mikroarrays offensichtlich [34]. Sobald in hohem Durchsatz Bindemoleküle unter gleichzeitiger Affinitätsbestimmung detektiert werden können, kann die Entwicklungsdauer solcher Moleküle beträchtlich gesenkt werden. Wie NEFF [51] feststellte sind besonders bei markierungsfreien Methoden die spezifischen Wechselwirkungen in Realproben problematisch. Weitere Untersuchungen auf dem Gebiet neuer spezifischer Oberflächen erlauben solche Messungen [5]. Auch durch eine Aufreinigung oder Amplifikation der Proben kann diese Methodik vielversprechend das dünn besiedelte Gebiet der markierungsfreien biomolekularen Wechselwirkungsanalytik erweitern.

Kapitel 6

Anhang

6.1 VirtuRIfS

6.1.1 Modelle und Randbedingungen

Im Folgenden werden zwei grundlegende Modellrechnungen für Interferenzschichtsysteme dargestellt, wobei nur das erste der beiden Modelle im Programm VirtuRIfS realisiert wurde. Für das zweite Modell wurden programmieretechnisch schon alle Grundsteine gelegt, insofern steht einer Implementierung des Algorithmus nichts mehr im Wege. Beide Modelle wurden mit einer neuen Nomenklatur versehen, damit sie verglichen werden können und übersichtlich bleiben. Im Gegensatz zum ersten Modell, kann man mit Hilfe des Zweiten die Absorption der Interferenzschichten berücksichtigen.

6.1.1.1 Modell nach Fowles über Transfer-Matrixrechnung

Folgende Randbedingungen gelten für das Vielschichtmodell nach FOWLES:

- Parallele Strahlen
- Vollständige Koheränz des (reflektierten) Lichtes
- Ideal transparente homogen isotrope Schichten planparallele Schichten (keine Streuung)
- Absorption wird nicht berücksichtigt

Nach FOWLES [20] ist für jede Schicht m der Brechungsindex n_m und die physikalische Schichtdicke d_m bekannt. Für jede Interferenzschicht existiert eine Überführungsmatrix der Schichten $m - 1$ bis 1

$$M_{m-1} = \begin{bmatrix} \cos kd_{m-1} & -\frac{i}{n_{m-1}} \sin kd_{m-1} \\ -in_{m-1} \sin kd_{m-1} & \cos kd_{m-1} \end{bmatrix}$$

mit dem Wellenvektor $k = 2\pi/\lambda$ und $m \geq 3$. Die Schicht m ist das Substrat (im allgemeinen Glas) und die Schicht 0 das Superstrat (im allgemeinen Pufferlösung). Es gilt

$$\begin{bmatrix} 1 \\ n_m \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 1 \\ -n_m \end{bmatrix} r = M \begin{bmatrix} 1 \\ n_0 \end{bmatrix} t$$

mit

$$M = M_{m-1}M_{m-2} \dots M_1 = \begin{bmatrix} A & B \\ C & D \end{bmatrix}.$$

Löst man obere Gleichung für den Reflexions- und Transmissionskoeffizienten r und t auf, so resultiert

$$r = \frac{An_m + Bn_0n_m - C - Dn_0}{An_m + Bn_0n_m + C + Dn_0} \quad (6.1)$$

$$t = \frac{2n_m}{An_m + Bn_0n_m + C + Dn_0}. \quad (6.2)$$

Da diese Gleichung aber nur für senkrechten Lichteinfall gilt, muß man M_{m-1} für beliebige Einstrahlwinkel erweitern um

$$M_{m-1,TE} = \begin{bmatrix} \cos \beta_{m-1} & -\frac{i}{p_{m-1,TE}} \sin \beta_{m-1} \\ -ip_{m-1,TE} \sin \beta_{m-1} & \cos \beta_{m-1} \end{bmatrix}$$

bzw.

$$M_{m-1,TM} = \begin{bmatrix} \cos \beta_{m-1} & -\frac{i}{p_{m-1,TM}} \sin \beta_{m-1} \\ -ip_{m-1,TM} \sin \beta_{m-1} & \cos \beta_{m-1} \end{bmatrix}$$

mit

$$\beta_{m-1} = k_{m-1} \cdot d_{m-1} \cdot n_{m-1} \cdot \cos \alpha_{m-1} \text{ und}$$

$$p_{m-1,TE} = n_{m-1} \cdot \cos \alpha_{m-1} \text{ bzw.}$$

$$p_{m-1,TM} = n_{m-1} / \cos \alpha_{m-1},$$

wobei α der Winkel zwischen dem *Fortpflanzungsmedium der Welle* im $m - 1$ -ten Medium und der Normalen der Grenzfläche $m - 1$ ist. In der Berechnung von β wird der Faktor n zusätzlich für die Ausbreitungsänderung des Wellenvektors im Medium berücksichtigt. Der Winkel α_{m-1} kann nach Gleichung 6.13 berechnet werden. Kürzt man die Variablen in M_{m-1} durch

$$\begin{aligned} a_{m-1} &= \cos \beta_{m-1}, \\ b_{m-1} &= -i/p_{m-1} \sin \beta_{m-1}, \\ c_{m-1} &= -ip_{m-1} \sin \beta_{m-1} \text{ und} \\ d_{m-1} &= \cos \beta_{m-1} \text{ ab,} \end{aligned}$$

so folgt für ein Dreischichtsystem (mit einer Interferenzschicht) $m, m - 1, 0$ mit Substrat, Interferenzschicht und Superstrat für M :

$$M = M_{m-1,TE} = \begin{bmatrix} a_{m-1} & b_{m-1,TE} \\ c_{m-1,TE} & d_{m-1} \end{bmatrix}$$

bzw.

$$M = M_{m-1,TM} = \begin{bmatrix} a_{m-1} & b_{m-1,TM} \\ c_{m-1,TM} & d_{m-1} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A & B \\ C & D \end{bmatrix}.$$

Für ein Vierschichtsystem (mit zwei Interferenzschichten) $m, m - 1, m - 2, 0$ mit $m = 3$ gilt:

$$M = M_{m-1} \cdot M_{m-2} = \begin{bmatrix} A & B \\ C & D \end{bmatrix}$$

mit

$$A = a_{m-1} \cdot a_{m-2} + b_{m-1} \cdot c_{m-2}$$

$$B = a_{m-1} \cdot b_{m-2} + b_{m-1} \cdot d_{m-2}$$

$$C = c_{m-1} \cdot a_{m-2} + d_{m-1} \cdot c_{m-2}$$

$$D = c_{m-1} \cdot b_{m-2} + d_{m-1} \cdot d_{m-2}$$

Für ein Fünfschichtsystem (mit drei Interferenzschichten) $m, m - 1, m - 2, m - 3, 0$ mit $m = 4$ gilt:

$$M = M_{m-1} \cdot M_{m-2} \cdot M_{m-3} = \begin{bmatrix} A & B \\ C & D \end{bmatrix}$$

mit

$$A = (a_{m-1} \cdot a_{m-2} + b_{m-1} \cdot c_{m-2}) \cdot a_{m-3} + (a_{m-1} \cdot b_{m-2} + b_{m-1} \cdot d_{m-2}) \cdot c_{m-3}$$

$$B = (a_{m-1} \cdot a_{m-2} + b_{m-1} \cdot c_{m-2}) \cdot b_{m-3} + (a_{m-1} \cdot b_{m-2} + b_{m-1} \cdot d_{m-2}) \cdot d_{m-3}$$

$$C = (c_{m-1} \cdot a_{m-2} + d_{m-1} \cdot c_{m-2}) \cdot a_{m-3} + (c_{m-1} \cdot b_{m-2} + d_{m-1} \cdot d_{m-2}) \cdot c_{m-3}$$

$$D = (c_{m-1} \cdot a_{m-2} + d_{m-1} \cdot c_{m-2}) \cdot b_{m-3} + (c_{m-1} \cdot b_{m-2} + d_{m-1} \cdot d_{m-2}) \cdot d_{m-3}$$

6.1.1.2 Modell nach Wolter über Rekursionrechnung

Folgende Randbedingungen gelten für das Vielschichtmodell in Abbildung 6.1 nach WOLTER:

- Parallele Strahlen
- Vollständige Koheränz des (reflektierten) Lichtes
- Ideal transparente homogen isotrope Schichten planparallele Schichten (keine Streuung)

Nach WOLTER [82] läßt sich der Reflexions- und Transmissionskoeffizient für eines Schichtsystems mit m Schichten der Dicke d_m durch folgende Rekursionsformel berechnen mit $m \geq 1$:

$$r_m = \frac{(g_m - g_{m-1}) \cdot e^{(h_{m-1} - d_{m-1})} + (g_m + g_{m-1}) \cdot r_{m-1} \cdot e^{(-h_{m-1} - d_{m-1})}}{(g_m + g_{m-1}) \cdot e^{(h_{m-1} - d_{m-1})} + (g_m - g_{m-1}) \cdot r_{m-1} \cdot e^{(-h_{m-1} - d_{m-1})}} \quad (6.3)$$

$$t_m = \frac{2 \cdot g_m \cdot t_{m-1}}{(g_m + g_{m-1}) \cdot e^{(h_{m-1} - d_{m-1})} + (g_m - g_{m-1}) \cdot r_{m-1} \cdot e^{(-h_{m-1} - d_{m-1})}}. \quad (6.4)$$

Es gelten

$$g_{m,TE} = \frac{\hat{n}_m \cdot \cos \alpha_m}{\mu_m} \quad (6.5)$$

$$g_{m,TM} = \frac{\mu_m \cdot \cos \alpha_m}{\hat{n}_m} \quad (6.6)$$

mit $r_0 = 0$ und $t_0 = 1$, wobei α_m der Winkel zwischen dem *Fortpflanzungsmedium der Welle* im m -ten Medium und der Normalen der Grenzfläche m . Desweiteren gilt

$$h_m = i \cdot \omega \cdot \frac{\hat{n}_m}{c} \cdot \cos \alpha_m \quad (6.7)$$

mit $i = \sqrt{-1}$ und $\omega = 2\pi\nu = 2\pi\frac{c}{\lambda}$, wobei μ_m die magnetische Permeabilität des Mediums m widerspiegelt. Diese kann Näherungsweise $\mu_m \approx 1$ für transparente Medien. Für den komplexen

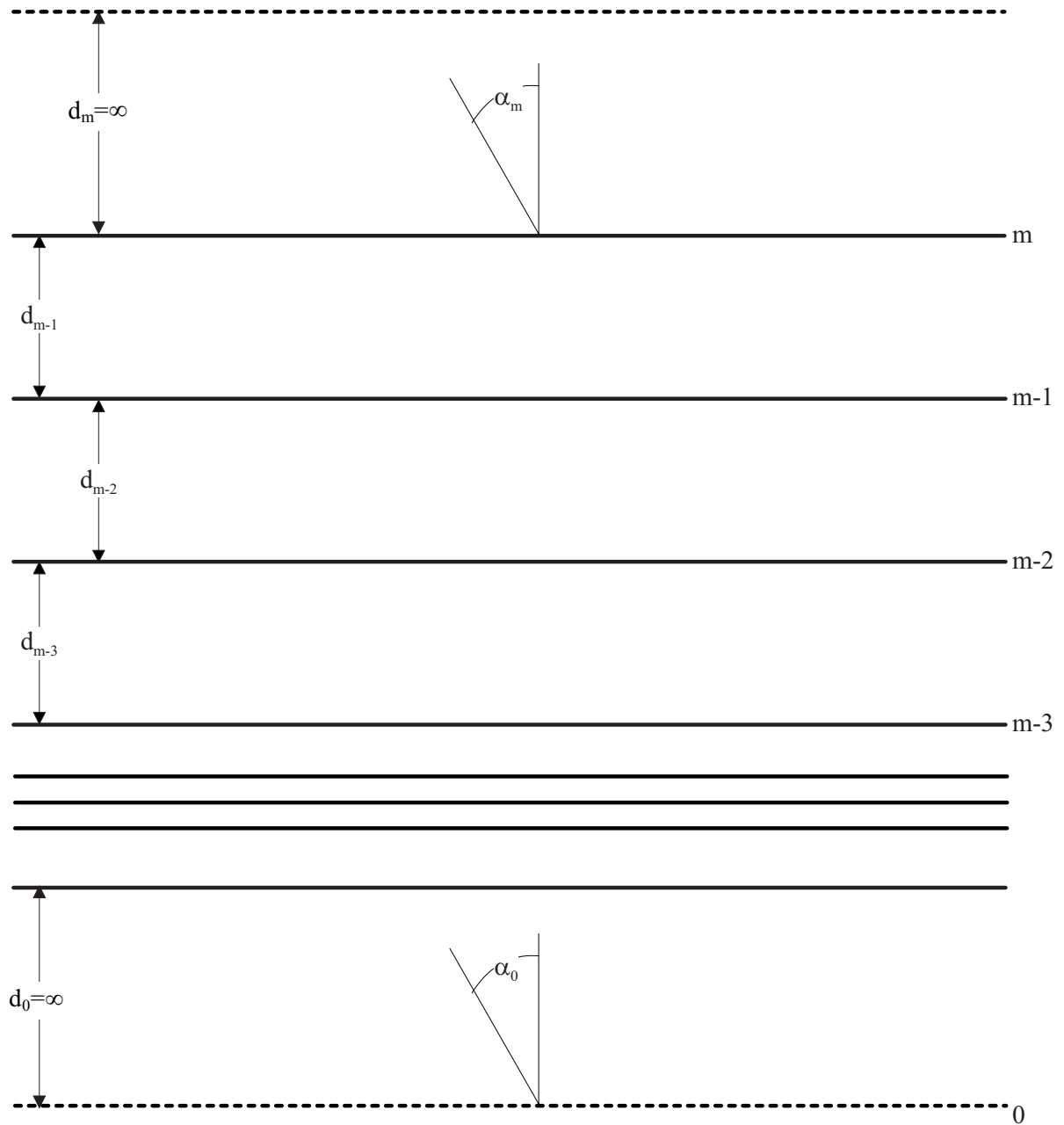


Abbildung 6.1: Schichtmodell mit beliebig vielen Schichten, wobei Schicht m das Substrat (im allgemeinen Glas) darstellt und Schicht 0 das Superstrat (im allgemeinen Pufferlösung)

Brechungsindex \hat{n}_m gilt

$$\hat{n}_m = n_m - i \cdot k_m \quad (6.8)$$

mit dem Brechungsindexrealteil n_m und dem Absorptionskoeffizienten (Brechungsindeximaginärteil) k_m des Mediums m . Für die Reflexion bzw. Transmission ergibt sich dann:

$$R = \frac{R_{TM} + R_{TE}}{2} = r^2 = \frac{r_{TE}^2 + r_{TM}^2}{2} \quad (6.9)$$

$$T = \frac{T_{TM} + T_{TE}}{2} = t^2 = \frac{t_{TE}^2 + t_{TM}^2}{2}. \quad (6.10)$$

Weitere Zusatzgleichungen sind für $n_m(\lambda)$ und $k_m(\lambda)$ nach CAUCHY

$$n_m = A_m + \frac{B_m}{\lambda^2} + \frac{C_m}{\lambda^4} \quad (6.11)$$

und

$$k_m = D_m + \frac{E_m}{\lambda} + \frac{F_m}{\lambda^3}. \quad (6.12)$$

Alle α_m von m Medien können aus dem Einstrahlwinkel α_m berechnet werden mit

$$\alpha_{m-1} = \arcsin \left(\frac{n_m}{n_{m-1}} \cdot \sin \alpha_m \right). \quad (6.13)$$

6.1.2 Programm

6.1.2.1 Ziele

Simulation von Vielschichtsystemen

- bei variablem Einstrahlwinkel
- mit wählbarer automatischer Variation des Einstrahlwinkels, Brechungsindizes oder der physikalische Dicken zweier Schichten
- mit variablen Funktionsparser (JEP, [37]) für Brechungsindex, Einstrahlwinkel, Schichtdicke
- mit unterschiedlicher Anzahl von Dioden/Filtern
- in beliebiger Komplexität durch automatisierten Batch-Modus
- inklusive der Annahme einer molekularen Bindung auf eine Oberfläche mit variablen physikalischen Parametern, wie Flußrate, Flußzellenparametern, Rückbindungsgrad, Assoziations- und Dissoziationskonstante, ...

Flexiblere Auswertung als sie in dem bisher existierenden Programm Ifz [40] existierte

- durch Einlesen von Ifz- und Measure-Files im binären und ASCII-Format
- durch Einlesen von Screening-Files des Librarian-Gerätes
- durch automatisches Einlesen beliebig vieler Rohdaten-Files
- mit verschiedenen Algorithmen zur Bestimmung der Ordnung und der Randparameter des Extremums
- durch mögliche quadratische, kubische oder quartäre Anpassungsfunktion zur Bestimmung des Extremums
- durch iterative Anpassung eines Vielschichtsystems an das Interferenzspektrum zur Bestimmung der Schichteigenschaften
- durch automatische Bestimmung von Assoziations- und Dissoziationskonstante aus einer Bindungskurve, sowohl mit als auch ohne Massentransport

Bearbeitung von eingelesenen oder simulierten Spektren

- durch Wahl der auszuwertenden Spektren aus allen vorhandenen Rohspektren

- durch Glättungsalgorithmen (Spline, B-Spline)
- durch Rauschalgorithmen mit Normalverteilung in Abszissen- und Ordinatenabschnitt

6.1.2.2 Parameter

Alle Eingabeparameter sind in der Datei `virturifs.properties` enthalten. Zu beachten ist, dass die von `VirtuRIfS` eingelesene Parameter-Datei im Verzeichnis `classes` enthalten ist. Im Verzeichnis `source` existiert die Datei nur als Sicherungskopie.

Optische Schichtdickenspektren an/aus

Syntax:

`system.input.spectra.interference.optthickness.file = Boolean`

Parameter:

Boolean wird `true` gesetzt, wenn Dateien geladen werden sollen, ansonsten `false`.

Beschreibung: Laderoutine optischer Schichtdickenspektren ein- oder ausschalten, egal ob Dateien im IFZ- oder Screening-Format (*.csv) vorhanden sind, da dieses erkannt wird.

Optische Schichtdickendateien

Syntax:

`system.input.spectra.interference.optthickness.file.Dateinummer.name = Dateiname`

Parameter:

Dateinummer muss fortlaufend gesetzt sein (Startwert = 1).

Dateiname gibt den Namen der Datei an, wobei dies in der Form `ifz.dat` oder `dir/ifz.001` geschehen kann.

Beschreibung:

Angabe der einzelnen Dateien zum Einlesen. Diese Routine ersetzt das umständliche Excel-Makro `ifz.xls` [siehe beigelegte CD], da mit `VirtuRIfS` die Dateien automatisch im Stapelverarbeitungsmodus eingelesen, verarbeitet und ausgegeben werden. Das Excel-Makro transformiert die von `Ifz` ausgegebenen Dateien in zwei Daten-Spalten um, die manuell in `Origin` kopiert werden müssen. `VirtuRIfS` liest die `Ifz`-Dateien ein, verarbeitet sie und liefert ein `Ascii`-Format, das direkt von `Origin` (via mehrfachen `Ascii-Import`) importiert werden kann.

Interferenzspektren an/aus

Syntax:

```
system.input.spectra.interference.file = Boolean
```

Parameter:

Boolean wird `true` gesetzt, wenn Dateien geladen werden sollen, ansonsten `false`.

Beschreibung: Laderoutine der Interferenzspektren ein- oder ausschalten, egal ob Measure-Dateien binär oder als ASCII vorliegen.

Interferenzspektren als Dateien

Syntax:

```
system.input.spectra.interference.file.Dateinummer.name = Dateiname
```

Parameter:

Dateinummer muss fortlaufend gesetzt sein (Startwert = 1).

Dateiname gibt den Namen der Datei an, wobei dies in der Form `measure.dat` oder `dir/measure.001` geschehen kann.

Beschreibung:

Angabe der einzelnen Dateien zum Einlesen. Diese Routine ersetzt das Programm `ifz.exe` [siehe beigelegte CD], da mit `VirtuRIfS` die Dateien automatisch im Stapelverarbeitungsmodus eingelesen, verarbeitet und ausgegeben werden.

Zeitlicher Auswertebereich der Interferenzspektren festlegen

Syntax:

```
system.input.spectra.interference.file.calculate.all = Boolean
```

Parameter:

Boolean wird `true` gesetzt, wenn alle Zeitpunkte der gemessenen Interferenzspektren ausgewertet werden sollen. Wird dieser Wert `false` gesetzt, so muß mit den weiteren Parametern das `.begin = Startspektrum` und das `.end = Endspektrum` gesetzt werden.

Beschreibung:

Festlegung welcher Bereich der Interferenzspektren zur Auswertung herangezogen werden soll. Dies ist vor allem hilfreich, wenn reproduzierbar beim ersten Zeitpunkt eine Luftblase das Interferenzmuster stört.

Dateiausgabe

Syntax:

```
system.output.spectra.interference.file = Boolean  
system.output.spectra.interference.file.origin = Boolean  
system.output.spectra.interference.file.report = Boolean  
system.output.spectra.interference.file.optthickness.file = Boolean  
system.output.spectra.interference.file.optthickness.file.origin = Boolean
```

Parameter:

Boolean wird `true` gesetzt, wenn diese Datei ausgegeben werden soll, ansonsten `false`.

Beschreibung:

Der Parameter `.file` wird gesetzt um Interferenzspektrum im ASCII-Measure-Format auszugeben. Dies kann genutzt werden um mehrere binäre Measure-Dateien in ASCII umzuwandeln. Der Parameter `.file.origin` gibt das Interferenzspektrum in einem ASCII-Format aus, das direkt von `Origin` importiert werden kann.

Der Parameter `.file.report` gibt einen dokumentierte Report aus, der von jedem einzelnen angepassten Interferenzspektrum die entsprechende Anpassungsfunktion, den Auswertebereich der Zeit- und Datenpunkte enthält. Zu Beginn des Reports ist eine Übersicht enthalten, welche Algorithmen mit welchen Parametern genutzt wurden.

Der Parameter `.file.optthickness.file` wird gesetzt um Optische Schichtdickenspektren im ASCII-Ifz-Format auszugeben.

Der Parameter `.file.optthickness.file.origin` gibt das Optische Schichtdickenspektrum in einem ASCII-Format aus, das direkt von `Origin` importiert werden kann.

Spektrenzeit

Syntax:

```
system.spectra.time.begin = BeginTime
```

```
system.spectra.time.end = EndTime  
system.spectra.time.step = StepTime
```

Parameter:

BeginTime setzt den Startwert der Zeit.

EndTime setzt den Endwert der Zeit.

EndTime setzt die Schrittweite der Zeit.

Beschreibung:

Spektrendateien des Programmes **Screening** enthalten keine Information über den zeitlichen Abstand zwischen den Spektren. Aus diesem Grund muss dieser hier angegeben werden. Desweiteren werden diese drei Variablen genutzt um die Zeitwerte für simulierte Spektren bereitzustellen. Alle Werte werden in Sekunden angegeben.

Interferenzfilter

Syntax:

```
system.spectra.interference.filters = Filter1, Filter2, ...
```

Parameter:

Filter definiert die Filterwellenlänge in *nm* und die Reihenfolge der Filter.

Beschreibung:

Ebenso wie die Zeitwerte werden im **Screening**-File nicht die Filter angegeben. Aus diesem Grund müssen die Wellenlängen der Filter angegeben werden, damit das Spektrum richtig an den Auswertalgorithmus übergeben werden kann.

Ordnung des Interferenzspektrums

Syntax:

```
system.spectra.interference.order = Function  
system.spectra.interference.order.moreasone.all = Boolean  
system.spectra.interference.order.moreasone.define = OrderValue  
system.spectra.interference.manual.order = OrderValueManual  
system.spectra.interference.manual.begin = Begin  
system.spectra.interference.manual.end = End
```

```
system.spectra.interference.manual.fix = Fix
```

Parameter:

Function setzt den Algorithmus zur Bestimmung der Ordnung. Wird `automatic.doubleOrder` angegeben, wird versucht die Ordnung nach KRAUS zu bestimmen. Bei `automatic.cosFunction` wird eine B-Spline-verzerrte cos-Funktion an das Interferenzspektrum angepasst um die Ordnung eines Extremas zu bestimmen.

Boolean wird nur berücksichtigt, wenn *Function* `automatic.` gesetzt wird. Ist er `true` gesetzt, so werden alle Extremas des Interferenzspektrums ausgewertet. Ist er `false` gesetzt, dann wird nur das Extrema ausgewertet, das bei *OrderValue* angegeben wurde.

OrderValueManual wird nur berücksichtigt, wenn *Function* `manual.` gesetzt wird. Dieser Wert definiert die Ordnung des Extremas im Bereich von *.begin* bis *.end*, wobei angegeben werden ob der Bereich in der Wellenlängenskala (*.extrema*) oder der Optischen Schichtdickenskala (*.optThickness*) angegeben wird.

Fix wird nur berücksichtigt, wenn *Function* `manual.fix` gesetzt wird. Ist dies der Fall, so wird der Suchbereich des Extremums (in *nm*) exakt angegeben.

Beschreibung:

Komplexer Auswertalgorithmus zur Bestimmung der Ordnung von Interferenzspektrenextremas.

Anpassungsfunktion

Syntax:

```
system.spectra.interference.regression.model = Algorithm
```

```
system.spectra.interference.minimum.method = Method
```

Parameter:

Algorithm gibt den Grad des Polynoms im Anpassungsalgorithmus an. Möglich ist `quadratic`, `cubic` und `quartic`.

Method legt fest, ob die Polynomannpassungsfunktion über die differenzierten Lösungen ausgerechnet werden soll (`equation`), oder iterativ (`iterativ`). Der iterative Ansatz ist deutlich langsamer als die Lösung über Gleichungen. Der Nachteil beim Lösen des Polynoms 4.ten Grades ist, das er Hilfsalgorithmen benötigt um die dritte Wurzel zu ziehen, wodurch die Lösungen über die Gleichungen bereits dem endlichen Fehler der `Double`-Werte unterliegt.

Beschreibung:

Legt die Polynomannpassungsfunktion des Typs $y(x) = a + bx + cx^2 + dx^3 + ex^4$ fest, um das Extrema exakt zu bestimmen.

Randpunkte des Anpassungsalgorithmus

Syntax:

```
system.spectra.interference.regression.borders = Algorithm  
system.spectra.interference.äquatorial.horizon = Horizon  
system.spectra.interference.setborder.points = BorderPoints  
system.spectra.interference.extrema.point.all = Boolean  
system.spectra.interference.extrema.point.smooth = SmoothFunction  
system.spectra.interference.extrema.point.definition = PointDefinition  
system.spectra.interference.extrema.point.limit = Limit
```

Parameter:

Algorithm gibt an, wie die Eckpunkte des Extremums bestimmt werden sollen:

äquatorial legt einen Äquator durch das Interferenzspektrum. Der Wert *Horizon* legt fest ob er sich in der Mitte (0.5), oberhalb (0.5-1) oder unterhalb (0-0.5) des Spektrums befinden soll. Die Schnittpunkte des Interferenzspektrums mit dem Äquator liefern die Eckpunkte.

inflection ermittelt die Wendepunkte im Interferenzspektrum. Diese liefern die Eckpunkte des Extremums.

setborder erlaubt es die Punkte links und rechts des Extremums festzulegen.

fullspectra nutzt das gesamte Interferenzspektrum für die Anpassungsfunktion. Dies ist nur sinnvoll, wenn sich nur ein einziges Extremum innerhalb des Spektrums befindet.

Beschreibung:

Algorithmus zur Randwertsbestimmung für die Anpassungsfunktion.

Nutzsignal

Syntax:

```
system.spectra.interference.usefullpartofsignal = Boolean  
system.spectra.interference.usefullpartofsignal.define = Value
```

Parameter:

Boolean definiert ob der Nutzsignalanteil des Interferenzspektrums geändert werden soll.

Value gibt den zu definierenden Wert in Prozent Signaldynamik an, auf den das Interferenzspektrum skaliert werden soll.

Beschreibung:

Verändert den Nutzsignalanteil des Interferenzspektrums.

Sub-Substrat annehmen

Syntax:

```
system.layer.subsubstrat = Boolean
```

Parameter:

Boolean wird `true` gesetzt, wenn vor dem halbunendlichen Substrat eine weitere halbunendliche Schicht angenommen werden soll, ansonsten `false`.

Beschreibung:

Das Modell nach WOLTER berücksichtigt vor und nach dem Dünnschichtsystem ein halbunendliches Medium. Um jedoch den Einfallswinkel in das Substrat zu bestimmen verlangt das Modell die Annahme eines Sub-Substrats. Mit dieser Variable kann diese Annahme ein- bzw. ausgeschaltet werden.

Reihenfolge des Schichtsystems

Syntax:

```
system.layer.order = SubSubstrat, Substrat, Layer1, Layer2, ..., Superstrat
```

Parameter:

Layer gibt die Reihenfolge der definierten Schichten an.

Beschreibung:

Der pro Schicht definierte Name wird hier angegeben um die Reihenfolge des Schichtsystems vom Sub-Substrat zum Superstrat festzulegen.

Festlegung der Referenzschicht

Syntax:

`system.layer.reference = Layer`

Parameter:

Layer gibt die Referenzschicht an.

Beschreibung:

Die Referenzschicht ist eine Schicht des gesamten Schichtsystems. Diese wird hier angegeben mit dem entsprechend definierten Schichtnamen.

Festlegung der Parameter pro Schicht

Syntax:

`system.layer.x.name = Layername`
`system.layer.x.note = Note`
`system.layer.x.literature = Literature`
`system.layer.x.cauchy.A = Cauchyparameter.A`
`system.layer.x.cauchy.B = Cauchyparameter.B`
`system.layer.x.cauchy.C = Cauchyparameter.C`
`system.layer.x.cauchy.D = Cauchyparameter.D`
`system.layer.x.cauchy.E = Cauchyparameter.E`
`system.layer.x.cauchy.F = Cauchyparameter.F`
`system.layer.x.thickness = Layerthickness`

Parameter:

Layername setzt den Namen des Schichtnamens fest.

Note legt eine Notiz zur Schicht ab.

Literature legt die Literaturquelle der Schicht fest.

Cauchyparameter.A legt den Cauchyparameter A fest.

Cauchyparameter.B legt den Cauchyparameter B fest.

Cauchyparameter.C legt den Cauchyparameter C fest.

Cauchyparameter.D legt den Cauchyparameter D (beschreibt Absorption) fest.

Cauchyparameter.E legt den Cauchyparameter E (beschreibt Absorption) fest.

Cauchyparameter.F legt den Cauchyparameter F (beschreibt Absorption) fest.

Layerthickness legt Dicke der Schicht fest.

x ist eine fortlaufende Zählvariable, die pro eingetragener (nicht genutzter) Schicht um eins

erhöht wird.

Beschreibung:

Legt die Parameter einer einzelnen Schicht fest.

Einstrahlwinkel

Syntax:

```
system.angleOfIncidence = Angle
```

Parameter:

Angle gibt den Einstrahlwinkel in das Schichtsystem an.

Beschreibung:

Legt den Einstrahlwinkel des Lichts fest, das durch das Schichtsystem strahlt.

Definition des Spektrums

Syntax:

```
system.spectra.begin = BeginSpectra
```

```
system.spectra.end = EndSpectra
```

```
system.spectra.step = StepWidth
```

Parameter:

BeginSpectra gibt die Anfangswellenlänge des Interferenzspektrums an.

EndSpectra gibt die Endwellenlänge des Interferenzspektrums an.

StepWidth gibt die Schrittweite des Interferenzspektrums an.

Beschreibung:

Legt die Parameter des Interferenzspektrums an.

Normalverteiltes Intensitätsrauschen

Syntax:

```
system.spectra.noise.y = Boolean
```

```
system.spectra.noise.y.value = NoiseValue
```


Parameter:

Boolean wird **true** gesetzt, wenn Rauschen auf Spektrum addiert werden soll, ansonsten **false**.
Noise Value setzt den Faktor des normalverteilten Rauschens.

Beschreibung:

Fügt normalverteiltes Rauschen (Intensitätsskala) zum Reflexions- und Referenzspektrum hinzu, wobei der Rauschfaktor in % auf die Signaldynamik des Detektors angegeben wird.

Gleichverteiltes Intensitätsrauschen

Syntax:

```
system.spectra.interference.noise.y = Boolean  
system.spectra.interference.noise.y.value = Noise Value
```

Parameter:

Boolean wird **true** gesetzt, wenn Rauschen auf Spektrum addiert werden soll, ansonsten **false**.
Noise Value setzt den Faktor des gleichverteilten Rauschens.

Beschreibung:

Fügt gleichverteiltes Rauschen (Intensitätsskala) zum Reflexions- und Referenzspektrum hinzu, wobei der Rauschfaktor in % auf die Signaldynamik des Detektors angegeben wird.

Glättung Interferenzspektrum

Syntax:

```
system.spectra.interference.smooth.y = Boolean
```

Parameter:

Boolean wird **true** gesetzt, wenn B-Spline-Glättung des Gesamtspektrums aktiv gesetzt werden soll, ansonsten **false**.

Beschreibung:

Glättet das gesamte Interferenzspektrum bevor es dem Auswertalgorithmus übergeben wird.

Gleichverteiltes Filterrauschen

Syntax:

```
system.spectra.noise.x = Boolean  
system.spectra.noise.x.value = NoiseValue
```

Parameter:

Boolean gibt den Einstrahlwinkel in das Schichtsystem an.
NoiseValue setzt den Faktor des gleichverteilten Rauschens.

Beschreibung:

Fügt gleichverteiltes Rauschen (Wellenlängenskala) zum Interferenzspektrum hinzu, wobei der Rauschfaktor in *nm* angegeben wird. Jedoch darf `system.spectra.step` nicht kleiner gesetzt sein als der Rauschfaktor.

Dynamischer Bereich

Syntax:

```
system.spectra.dynamicRange.value = DynamicValue
```

Parameter:

DynamicValue gibt die Anzahl der Rasterpunkte des Detektors an.

Beschreibung:

Legt den dynamischen Bereich des Detektors fest, wobei die Anzahl der Rasterpunkte angegeben werden. Kennt man die *bit* des CCD-Detektors, muß die Anzahl der Rasterpunkte durch 2^{bit} ausgerechnet werden.

Variable Schichtparameter

Syntax:

```
system.change.x.status = Boolean  
system.change.x.parameter = Layername.Parameter  
system.change.x.value.begin = BeginValue  
system.change.x.value.end = EndValue  
system.change.x.parameter(value) = Funktion
```

Parameter:

Boolean wird `true` gesetzt, wenn die Schicht *Layername* variiert werden soll.

Layername.Parameter setzt den variablen Parameter der Schicht *Layername*. Als *Parameter* kann `refractionIndex`, `thickness` oder `bindingCurve` gesetzt werden. Als spezielle Möglichkeit kann *Layername.Parameter* gleich `angleOfIncidence` gesetzt werden, wenn der Einfallswinkel variiert werden soll.

BeginValue setzt den Anfangswert der Laufvariable.

EndValue setzt den Endwert der Laufvariable.

Funktion definiert die Parserfunktion mit der Laufvariable `value`.

Beschreibung:

Setzen der Parserfunktion zur Modifikation des Schichtsystemparameters. Ein Beispiel ist die Parserfunktion $1.335917 - 4.74605E-5*value - 1.16824E-6*(value*value)$ als Funktion des Brechungsindex von PBS ($pH = 7,4$) in Abh. der Temperatur [°C]. Der Parameter `x` kann 1 oder 2 gesetzt werden. Weitere Funktionsparameter, wie z.B. `cos`, `log`, usw. sind der Dokumentation `index.html` des Funktionsparsers JEP im Verzeichnis `/doc/HTML/packages/jep` zu entnehmen.

Anpassung von Interferenzspektren

Syntax:

```
system.fit.status = Boolean
```

Parameter:

Boolean wird `true` gesetzt, wenn an die Interferenzspektren ein simuliertes Spektrum angepasst werden soll.

Beschreibung:

Setzt den generellen Anpassungsalgorithmus aktiv.

Setzen der Anpassungsgrenzen der einzelnen Schichtparameter

Syntax:

```
system.fit.x.status = Boolean  
system.fit.x.parameter = Layername.Parameter  
system.fit.x.value.begin = BeginValue
```

```
system.fit.x.value.end = EndValue
```

Parameter:

Boolean wird `true` gesetzt, falls der gesetzte Schichtparameter variiert werden soll.

Layername.Parameter setzt den variablen Parameter der Schicht *Layername*. Als *Parameter* kann `refractionIndex` oder `thickness` gesetzt werden.

BeginValue setzt den Anfangswert der Laufvariable.

EndValue setzt den Endwert der Laufvariable.

Beschreibung:

Definiert den variablen Bereich des Schichtsystemparameters der dem iterativ arbeitenden Anpassungsalgorithmus übergeben wird. Der Parameter `x` kann maximal 4 gesetzt werden.

Anpassung der simulierten Bindungskurve an die optische Schichtdickenänderung

Syntax:

```
system.bindingcurve.fit = Boolean
```

Parameter:

Boolean wird `true` gesetzt, wenn an die Optische Schichtdickenänderung eine simulierte Bindungskurve angepasst werden soll.

Beschreibung:

Setzt den generellen Anpassungsalgorithmus aktiv.

Anpassung der simulierten Assoziationsbindungskurve an die optische Schichtdickenänderung

Syntax:

```
system.bindingcurve.fit.assoziolation = Boolean
```

Parameter:

Boolean wird `true` gesetzt, wenn an die Optische Schichtdickenänderung eine simulierte Assoziationskurve angepasst werden soll.

Beschreibung:

Setzt den generellen Anpassungsalgorithmus an die Assoziationskurve aktiv.

Setzen der Zeitwerte der Wechselwirkungsfunktion

Syntax:

```
system.bindingcurve.fit.automatic = Boolean  
system.bindingcurve.fit.manual.assoziation.begin = BeginValueAss  
system.bindingcurve.fit.manual.dissoziation.begin = BeginValueDiss  
system.bindingcurve.fit.manual.dissoziation.end = EndValueDiss
```

Parameter:

Boolean wird `true` gesetzt, wenn die Zeitwerte der Bindungskurve automatisch erfasst werden sollen.

BeginValueAss setzt den Startwert der Assoziationskurve.

BeginValueDiss setzt den Endwert der Assoziations- und den Startwert der Dissoziationskurve.

EndValueDiss setzt den Endwert der Dissoziationskurve.

Beschreibung:

Legt die Zeitparameter der Bindungskurve fest.

Parameter der Anpassungsfunktion für die Bindungskurve

Syntax:

```
system.bindingcurve.parameter.flowrate = Flowrate  
system.bindingcurve.parameter.areaofdetection.begin = BeginArea  
system.bindingcurve.parameter.areaofdetection.end = EndArea  
system.bindingcurve.parameter.flowchamber.height = ChamberHeight  
system.bindingcurve.parameter.flowchamber.width = ChamberWidth  
system.bindingcurve.parameter.flowchamber.length = ChamberLength  
system.bindingcurve.parameter.masstransport = Boolean  
system.bindingcurve.parameter.signaltogamma = SignalGamma  
system.bindingcurve.parameter.diffusioncoefficient = DiffCoef  
system.bindingcurve.parameter.concentration = Conc  
system.bindingcurve.parameter.molecularweight = MolWeight  
system.bindingcurve.parameter.rateconstant.assoziation = RateAss  
system.bindingcurve.parameter.rateconstant.dissoziation = RateDiss
```

```
system.bindingcurve.parameter.gammamax = GammaMax  
system.bindingcurve.parameter.backbindingfactor = BackFactor  
system.bindingcurve.dissoziation.beginAfterStartAss = DissStart  
system.bindingcurve.parameter.refractionindexincrement = nIncrement
```

Parameter:

Flowrate setzt den Wert der Flußrate in $\mu L/s$.

BeginArea setzt den Beginn der Detektionsfläche in der Flußzelle in mm .

EndArea setzt das Ende der Detektionsfläche in der Flußzelle in mm .

ChamberHeight setzt die Höhe der Flußzelle in mm .

ChamberWidth setzt die Breite der Flußzelle in mm .

ChamberLength setzt die Länge der Flußzelle in mm .

Boolean wird `true` gesetzt, wenn der Massentransport berücksichtigt werden soll.

SignalGamma setzt den Korrelationsfaktor zwischen Bindungssignal und Oberflächenbeladung in $iu \cdot mm^2/g$.

DiffCoef setzt den Diffusionskoeffizient im Superstrat m^2/s .

Conc setzt die Konzentration des zu Untersuchenden in Lösung in mol/L .

MolWeight setzt das Molekulargewicht des Substrats in g/mol .

RateAss setzt die Assoziationskonstante in $L/(mol \cdot s)$.

RateDiss setzt die Dissoziationskonstante in s^{-1} .

GammaMax setzt die Stoffmenge des Substrats / Fläche in mol/mm^2 .

BackFactor setzt den Rückbindungsgrad.

DissStart setzt den Startwert der simulierten Dissoziationskurve fest.

nIncrement setzt das Brechungsindexinkrement in nL/g . Dieses wird experimentell ermittelt, indem der Brechungsindex in Abhängigkeit der Konzentration in g/mm^3 aufgetragen wird. Aus der Steigung erfolgt direkt das Brechungsindexinkrement.

Beschreibung:

Setzt die Parameter der Bindungskurvensimulation nach SIGMUNDSSON [70]. Eine weitere theoretische Beschreibung ist in GLASER [25] beschrieben.

6.1.2.3 Report

Ist die Boolean-Variablen des Berichts-Modus `true` gesetzt, werden alle Parameter ausgegeben, die im `.properties`-File gesetzt wurden. Weiterhin wird jedoch pro Zeitpunkt der Regressionsbereich ausgegeben und die Anzahl der ausgewerteten bzw. vorhandenen Datenpunkte im Regressionsbereich.

Als nächstes wird die Regressionsfunktion ausgegeben mit dem entsprechenden Korrelationskoeffizienten.

Erkennt das Programm mehrere Extrema, wird der Nutzsignalanteil angegeben zwischen diesen Extremas. Ein Beispiel ist im folgenden angegeben:

```
Time[s]=0.0
```

```
-----  
Area of Regression:
```

```
614.0 < 671.0 < 733.0 (points = 7 of 123)
```

```
Function of Regression:
```

```
y = 85.3839 -0.0114*x + 3.8039E-7*x^2 (correlation[%] = 99.9183)
```

```
Optical Thickness:
```

```
834.4907 {= order(2.5) * extrema(667.5925) / 2 }
```

```
Usefull Part of Signal:
```

```
0.0 % (between 0.0 and 0.0; order=2.5)  
-----
```

6.1.2.4 Ausgabe

VirtuRIfS kann Ifz-, Measure- und Origin-kompatible ASCII-Dateien erstellen. Die ASCII-Dateien enthalten sowohl Spektren-, als auch Optische Schichtdickeninformationen.

6.2 Zukünftige Fragestellungen

GOPTS/PEG auf Glas

Mit Verweis auf den Artikel von PURSCH [61] zeigt sich, dass eine Untersuchung möglich ist, wie das Siloxan an die Oberfläche bindet. Eine Monoschicht liegt nur dann vor, wenn diese wie in Abbildung 1 nach T2-T3 vernetzt sind. Ansonsten ist es keine Monoschicht. Untersuchen kann man mit Hilfe der Festkörper-NMR auch die Winkelung und die Beweglichkeit von Alkylketten (und somit auch von PEG-Ketten). Bei zukünftigen Untersuchungen wäre interessant, wie GOPTS auf die SiO₂-Oberfläche gebunden ist (siehe Artikel von M. HEROLD [62]). Danach sollte vermessen werden, wie PEG bei unterschiedlichen Temperaturen vorliegt (linear („trans“ in Fischer-Projektion), verknotet („gauche“ in Fischer-Projektion)). Bei langen Ketten (wie in dieser Arbeit genutztem PEG) tritt vermutlich Verknotung mit höherer Temperatur auf. Zu messen wäre die Signaländerung der Optischen Schichtdicke durch die temperaturabhängige Polymerveränderung. Weiterhin auch die Änderung der Wechselwirkung mit aufgebrachtem Biomolekül oder Verknotung des Polymers, da „aktives“ Biomolekül im Polymer versinkt?

Veränderte Lichtleitereigenschaften durch Luftfeuchtigkeit oder Temperatur

Laut Hersteller absorbieren die Polymerlichtleiter Wasser aus der Luft, d.h. sie sind Sensoren für Luftfeuchtigkeit. Wenn es abends ein Gewitter gibt und morgens referenziert wurde, so driftet das System ! Es sollte unbedingt geklärt werden, wie sich das RfS-Spektrum im Laufe der Luftfeuchtigkeit des Lichtleiters ändert. Auch steigt mit der Temperatur die Dämpfung des Lichtleiters, d.h. eine Wellenlänge von z.B. 660 nm wird durch die Dämpfung (Temperaturerhöhung) als 670-680 nm gemessen ! Unsere Standard-Lichtleiter sind bis 85°C reversibel Temperaturstabil (laut Hersteller), d.h. sie gehen dadurch nicht kaputt. Es ist notwendig zu messen wie sich die Lichtintensität und das Spektrum (Wellenlänge) in Abhängigkeit der Temperatur und der Luftfeuchtigkeit ändert. Dies ist evtl. mit Spiegel (besser SiO₂-Wafer) am Ende des Lichtleiters zu messen. Am besten mit Abstand von Temperatur, damit die Spiegelreflexion temp.unabh. bleibt.

Hydrophilie von PDMS

Gespräche mit M. ENZELBERGER ergaben eine Lösung bzgl. der Dichtigkeit der Flußzelle, wenn man die PDMS-Zelle hydrophilisiert. Dazu muß man die Zelle in einer Lösung Wasser:HCl im Verhältnis 1 : 1000 bei 60 – 70 °C 30 min kochen. Dann sollte sie 2 mal mit Ethanol gewaschen

werden. Das bricht die SiO-Bindungen auf und erzeugt eine hydrophile Oberfläche. Quellen für dieses Protokoll finden sich in den Gruppen QUAKE vom Caltech und WHITESIDES von Harvard. Eine Ausgründung der Gruppe QUAKE ist die Firma Fluidyme.

Oberflächen-Imaging mit RIfS

Wie in Abschnitt 4.4.1.5 beschrieben, lassen sich aus Interferenzspektren die physikalischen Eigenschaften von Teilschichten errechnen. Es wäre theoretisch möglich diese Eigenschaften von einer ganzen Fläche zu erfassen. Diese kann auch in zeitlichen Änderungen erfasst werden, d.h. kinetische Reaktion könnten beobachtet werden. Wenn das gemessene Spektrum so gewählt werden kann, das wenige spektrale Punkte einer Kurvenanpassung genügen, ist ein RIfS-Imaging-System zur Detektion von physikalischen Schichtkonstanten (d, n) orts aufgelöst möglich (siehe dazu auch YATSENKO [84]).

Radiokalibrierung

Um eine Bindungskurve einer Optischen Schichtdickenänderung absolut mit der molekularen Konzentration der Rezeptoren auf der Oberfläche zu korrelieren muß das Signal der Optischen Schichtdicke über radioaktive Messungen mit der vorhandenen Konzentration kalibriert werden. Da für Protein-Messungen I^{125} mit einer Halbwertszeit 60 d genutzt werden muß und für Oligonukleotid-Messungen P^{32} mit einer Halbwertszeit 14,3 d , ist eine quantitative Meßreihe erforderlich, die es erlaubt sowohl RIfS- als auch radioaktive Signale eines Transducers zu vermessen. HÄNEL [33] stellte eine erste Kalibrierung mit einer Biotin-Streptavidin-Bindung her. Allerdings war bei ihren Messungen die Oberflächenbeladung inhomogen. Für korrekte Ergebnisse muß ein entsprechendes Meßprotokoll erstellt werden.

RIfS-SAW-Kopplung

Die Technologie der Interdigitalstrukturen zur Erzeugung akustischer Oberflächenwellen könnte sowohl zur Verringerung der Diffusionsgrenzschicht an Oberflächen, als auch zur Interferenzspektrenerzeugung dienen. Würden diese Schichten mit Trägerpolymer beschichtet werden, hätte man neben einer Online-Kontrolle für Advalytix-Systeme auch noch eine markierungsfreie Meßmethodik, die die Ermittlung kinetischer Wechselwirkungsparameter an dieser neuen Grenzschicht erlaubt. Erste Messungen in Lösung ergaben mit dem in Abbildung 6.2 gezeigten Interferenzspektrum ein Optisches Schichtdickenrauschen von 20 $\mu\text{m}_{Advalytix}$.

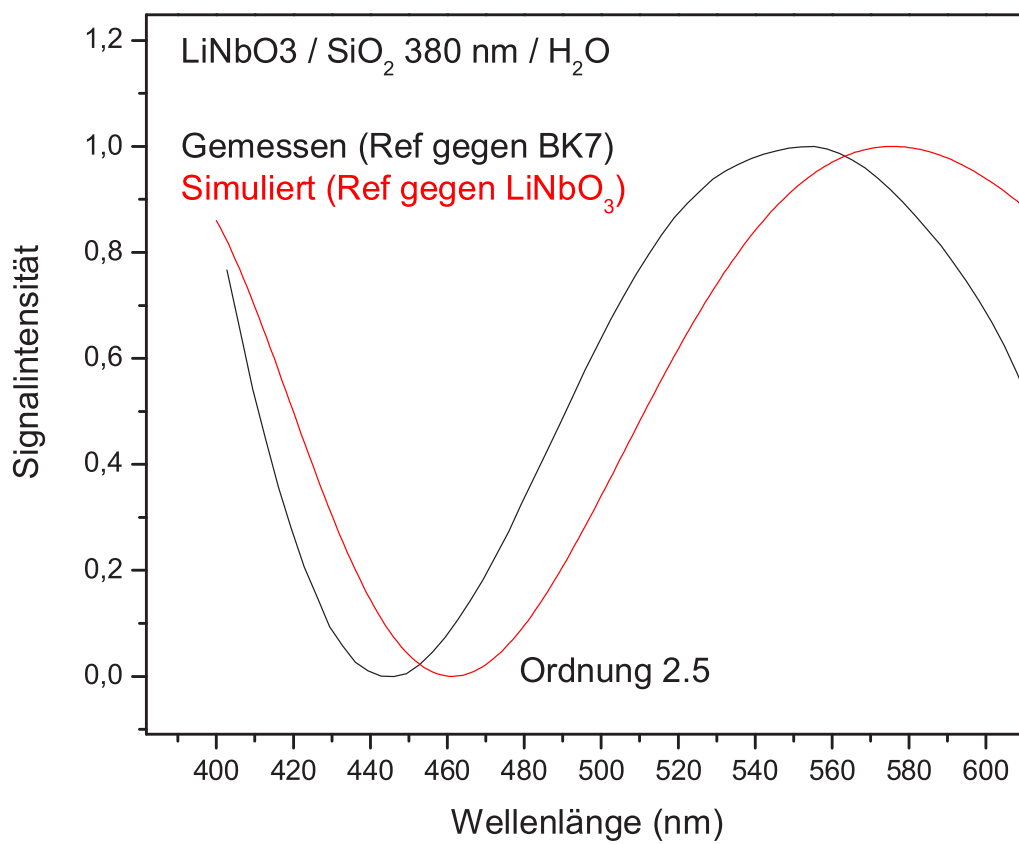


Abbildung 6.2: Interferenzspektren eines transparenten LiNbO₃-Interdigitaltransducers.

RIfS-Fluoreszenz-Kopplung

Der Stereomikroskop-Aufbau könnte über eine zusätzlich Lichtleitereinkopplung mit einer Laserlichtquelle verbunden werden. Dadurch würden RIfS- und Fluoreszenzintensitäten korreliert werden können. Als Detektor würde ein und dieselbe CCD dienen.

Oberflächenchemie

- Die Bindung von Proteinen an der Oberfläche ist Abhängig vom pH -Wert. Um eine quantitative Aussage über die Unspezifität einer Oberfläche machen zu können ist die pH -Abhängigkeit zu ermitteln: Wie verhält sich die unspezifische Wechselwirkung von Ovalbumin (OVA) gegenüber der polymerbeschichteten Transduceroberfläche in Abhängigkeit des pH -Wertes?
- Ein neu in eine Flußkammer eingebrachter Transducer zeigt bei der ersten Testung gegenüber Ovalbumin ein stets höheres Signal als bei jeder weiteren: Wie korreliert die erste und zweite Anbindung von Ovalbumin miteinander? Korrelieren diese miteinander? Ist eine dritte Anbindung im Vergleich zur Zweiten reproduzierbar?
- Was macht die Unspezifität aus - die funktionelle Gruppe oder nicht abgeschirmtes Siliziumdioxid? Wie sieht die Unspezifität einer aminofunktionalisierten Polymers im Vergleich zu einem carboxyfunktionalisierten aus?

6.3 Abkürzungen

AMD	Aminodextran
CCD	<i>charged coupled device</i> , Ladungsgekoppelte Einheit
CMD	Carboxymethyldextran
DA-PEG	Diamino-Polyethylenglykol
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMF	N,N-Dimethylformamid
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
FIA	Fließinjektionsanalyse
GOPTS	3-Glycidylxypropyl-trimethoxysilan
NHS	N-Hydroxy-succinimid
ISO	International Organization for Standardization
OIA3	Oligonukleotid, 3' - CCT TAC TAC ATC CAA CAT CGC AA - 5'
OIA4	Oligonukleotid, 5' - GGA ATG ATG TAG GTT GTA GCG - 3'
OVA	Ovalbumin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEEK	Polyetheretherketon
PEG	Polyethylenglykol
RIfS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
SAW	<i>surface acoustic wave</i> , akustische Oberflächenwelle
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat solution</i> , Natriumlaurylsulfatlösung
SPR	<i>surface plasmon resonance</i> , Oberflächenplasmonenresonanz
VirtuRIfS	RIfS-Simulation und -Auswertung der Programmiersprache Java

6.4 Akademische Lehrer

K. ALBERT, E. BAYER[†], D. CHRISTEN, H. ECKSTEIN, G. GAUGLITZ, W. GÖPEL[†], P. GRATHWOHL, G. HÄFELINGER, M. HANACK, V. HOFFMANN, W. JÄGER, G. JUNG, M. KAUFMANN, K.-A. KOVAR, D. KRUG, N. KUHN, H. LIEBICH, E. LINDNER, M.E. MAIER, H. A. MAYER, H.-J. MEYER, U. NAGEL, H. OBERHAMMER, D. OELKRUG, H. POMMER, V. SCHURIG, E. SCHWEDA, F. F. SEELIG, J. STRÄHLE, A. ZELL, K.-P. ZELLER, C. ZIEGLER

6.5 Lebenslauf

Name	Matthias Leo Wegner
Geburtsdatum	1. Juli 1974
Geburtsort	VS-Schwenningen
Familienstand	verheiratet seit 05. August 2000 mit Michaela geb. Mertens, geb. am 02. August 1977 in Köln
08/81 - 07/91	Besuch der Grund- und Realschule in VS-Schwenningen
08/91 - 07/94	Allg. Hochschulreife am Tech. Gymnasium in VS-Schwenningen
08/94 - 09/95	Zivildienst im Krankenhaus Spaichingen
10/95 - 08/01	Diplomstudium der Chemie mit Nebenfach Informatik in Tübingen Titel: <i>„Einsatz von temperaturabhängigen RfS-Messungen zur Untersuchung der Hybridisierung von Oligonukleotiden“</i>
09/01 - 09/04	Promotion am Institut für physikalische und theoretische Chemie (IPTC) Titel: <i>„Aufbau und Charakterisierung eines miniaturisierten parallelen optischen Detektionssystems zur Untersuchung von Oligonukleotiden“</i>

Literaturverzeichnis

- [1] ACKERMANN, T.: *Physikalische Biochemie: Grundlagen der physikalisch-chemischen Analyse biologischer Prozesse*. Springer; Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1992.
- [2] AFFYMETRIX. <http://www.affymetrix.com/>.
- [3] ANDERS, H.: *Dünne Schichten für die Optik*. Wissenschaftlicher Verlag, Stuttgart, 1965.
- [4] ANDERSON, R. A., X. S. SU, G. J. BOGDAN und J. FENTON: *A miniature integrated device for automated multistep genetic assays*. *Nucleic Acids Research*, 28:E60–e67, 2000.
- [5] ANGENENDT, P., J. GLÖKLER, J. SOBEK, H. LEHRACH und D. J. CAHILL: *Next generation of protein microarray support materials: E for protein and antibody microarray applications*. *Journal of Chromatography A*, 1009:97–104, 2003.
- [6] BEIER, M. und J. D. HOHEISEL: *Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA microchips*. *Nucleic Acids Research*, 9(27):1970–1977, 1999.
- [7] BIALKOWSKI, S. E.: *Data Analysis in the Shot Noise Limit*. American Chemical Society, 61:2479–2489, 1989.
- [8] BIOSYSTEMS, H. <http://www.htsbiosystems.com/>.
- [9] BIRKERT, O.: *Markierungsfreies Hochdurchsatzscreening mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie*. Doktorarbeit, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2001.
- [10] BOOR, C. DE: *A practical Guide to Splines*. Springer Verlag, New York, 1997.
- [11] BRECHT, A.: *Interferenzspektroskopische Untersuchungen von Affinitätsreaktionen*. Doktorarbeit, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1993.

- [12] BRIGHAM, E. O.: *FFT - Schnelle Fourier-Transformation*. Oldenbourg Verlag München, Wien, 1987.
- [13] CARBONI, G. http://www.funsci.com/fun3_en/uster/uster.htm, 1997.
- [14] CHO et al.: *Mixture model description of the T-,p- dependence of the refractive index of water..* J. Chem. Phys., 114(7):3011–3016, 2001. Calculation of the refraction index of water.
- [15] DALSA INC.: *Dalsa Data Book*, 1996.
- [16] DANZER, K.: *Institut für Anorganische und Analytische Chemie (IAAC)*. <http://www2.uni-jena.de/chemie/institute/ac/danzer/start.html>.
- [17] DICKERSON, R. E.: *DNA Structure from A to Z - Methods in Enzymology*. 1992.
- [18] FARIN, G.: *Curves and Surfaces for CAGD*. Academic Press, San Diego, 1997.
- [19] FERIOTTO, G., G. BREVEGLIERI, A. FINOTTI, S. GARDENGI, and R. GAMBARI: *Real-time multiplex analysis of four betathalassemia mutations employing surface plasmon resonance and biosensor technology*. Laboratory Investigation, pp. 1–8, 2004.
- [20] FOWLES, G. R.: *Introduction to modern optics*. Dover Publications Inc., New York, 2 ed., 1975.
- [21] FREDRICKSON, H. L., E. J. PERKINS, T. S. BRIDGES, R. J. TONUCCI, J. K. FLEMING, and A. NAGEL: *Towards enviromental toxicogenomics - development of a flow-through, high-density DNA hybridization array and its application to ecotoxicity assessment*. Sci. Total. Environ., 274:137–149, 2001.
- [22] FRIGUET, B., A. F. CHAFFOTTE, L. DJAVADI-OHANIANCE, and M. E. GOLDBERG: *Measurements of the true affinity constant in solution of analyte-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay*. J. Immunol. Meth., (77):305–319, 1985.
- [23] GENTEL. <http://www.gentelbiosurfaces.com/>.
- [24] GIBBS, R. A.: *Dna amplification by the polymerase chain reaction*. Anal. Chem., 13(62):1202–1214, 1990. Zusammenfassung der Geschichte von PCR, den Grundregeln der Methode, usw.
- [25] GLASER, R. W.: *Antigen-Antibody Binding and Mass Transport by Convection and Diffusion to a Surface: A Two-Dimensional Computer Model of Binding and Dissociation Kinetics*. Analytical Biochemistry, 213:152–161, 1993.

- [26] GUTHRIE, C.: *Messenger RNA splicing in yeast: clues to why the spliceosome is a ribonucleoprotein*. Science, 253:157–163, 1991.
- [27] HAAKE, H.-M.: *Monitoring von Festphasensynthesen und biospezifische Detektion in der HPLC mit Reflektometrischer Interferenzspektroskopie*. PhD thesis, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen, 2000.
- [28] HEAVENS, O. S.: *Optical properties of thin solid films*. William Clowes and Son, London, 1955.
- [29] HEHL, K.: *Untersuchung dünner polymerer Filme und deren Wechselwirkung mit Analyten mit spektraler Ellipsometrie*. PhD thesis, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1998.
- [30] HEIZMANN, W. R., P. C. DÖLLER, S. KROPP, and S. BLEICH: *Kurzlehrbuch: Medizinische Mikrobiologie und Immunologie*. Stuttgart; New York: Schattauer, 1999.
- [31] HERMANN, K.-H. and D. KRAHL: *Electron image recording in conventional electron microscopy*. Advances in Optical and Electron Microscopy, 9:1–64, 1984.
- [32] HÄNEL, C.: *Vergleichende Charakterisierung eines Prototypen zur Detektion biomolekularer Wechselwirkungen mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie*. Master's thesis, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1999.
- [33] HÄNEL, C.: *Parameteroptimierung für zwei Verfahren zur markierungsfreien Analyse biomolekularer Wechselwirkungen*. PhD thesis, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2003.
- [34] HOMOLA, J.: *Present and future of surface plasmon resonance biosensors*. Anal. Bioanal. Chem., p. 528–539, 2003.
- [35] INGLE, J. D. and S. R. CROUCH: *Spectrochemical Analysis*. Prentice–Hall International Editions, London, 1988.
- [36] JAVA. <http://java.sun.com/>.
- [37] JEP. <http://sourceforge.net/projects/jeplite/>.
- [38] JMATLINK. <http://www.held-mueller.de/JMatLink/>.
- [39] JUNG, A.: *Parallele, markierungsfreie Detektion biomolekularer Wechselwirkungen an Mikroarrays*. PhD thesis, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2003.

- [40] KRAUS, G.: *Reflektometrisch-interferometrische Bestimmung organischer Verbindungen*. PhD thesis, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1993.
- [41] KUMAR, A., O. LARSSON, D. PARODI, and Z. LIANG: *Silanized nucleic acids: a general platform for dna immobilisation*. *Nucleic Acids Research*, 14(28):e71, 2000.
- [42] MALICKA, J., I. GRZYCZYNSKI, ZYGMUNT GRZYCZYNSKI, and J. R. LAKOWICZ: *Use of surface plasmon-coupled emission to measure dna hybridization*. *Journal of Biomolecular Screening*, 9(3):208–215, 2004.
- [43] MANDEL, L.: *Image fluctuations in cascade intensifiers*. *Br. J. Appl. Phys.*, 10:233–234, 1959.
- [44] MARTE, M.: *Light at the quantum limit*. *Physik in unserer Zeit*, 26(4), 1995.
- [45] MATLAB. <http://www.mathworks.com/products/matlab/>.
- [46] MEHLMANN, M.: *Einsatz optischer Biosensoren für die Protein- und Fermentationsanalyse*. PhD thesis, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2003.
- [47] MUELLER, O.: *Grundlagen der Biochemie - 1. Biochemische Reaktionen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1977.
- [48] MUELLER, P. R. et al.: *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley and Sons, New York, 1993.
- [49] MUTSCHLER, T.: *XYZ*. PhD thesis, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2004.
- [50] NAHM, W.: *Weißlichtinterferenz an dünnen Schichten*. PhD thesis, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1992.
- [51] NEFF, P.: *Anwendung markierungsfreier Detektion von PCR-Produkten zum Nachweis von Single Nucleotid Polymorphisms*. Master's thesis, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2002.
- [52] NIKITIN, P., M. VALEIKO, and B. GORSHKOV: *New direct optical biosensors for multi-analyte detection*. *Sens. Actuat.*, 90:46, 2003.

- [53] OLDENBURG, K., J. ZHANG, T. CHEN, A. MAFFIA, K. BLOM, and A. COMBS: *Assay miniaturization for ultra-high throughput screening of combinatorial and discrete compound libraries: a 9600-well (0.2 microliter) assay system*. J. Biomol. Screen., p. 313, 1996.
- [54] O'SHANNESY, D. J., M. BRIGHAM-BURKE, K. K. SONESON, and P. HENSLEY: *Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: Use of nonlinear least squares analysis methods*. Analytical Biochemistry, 212:457–468, 1993.
- [55] PENISSI, E.: *Human genome: Reaching their goal early, sequencing labs celebrate*. Science, (300):409, April 2003.
- [56] PIEHLER, J., A. BRECHT, G. GAUGLITZ, C. MAUL, M. ZERLIN, and S. GRABLEY: *Label-free monitoring of dna-ligand interactions*. Anal. Biochem., 249:94 – 102, 1997.
- [57] PIEHLER, J., A. BRECHT, K. E. GECKELER, and G. GAUGLITZ: *Surface modification for direct immunoprobes*. Biosens. and Bioelectron., 6/7(11):579–590, 1996.
- [58] PIEHLER, J., A. BRECHT, B. LIEDBERG, R. VALIOKAS, and G. GAUGLITZ: *A high-density poly(ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces*. Biosensors and Bioelectronics, 15:473–481, 2000.
- [59] PIVIDORI, M. I., A. MERKOCI, and S. ALEGRET: *Classical dot-blot format implemented as an amperometric hybridisation sensor*. Biosens. Bioelectron., 16:1133–1142, 2001.
- [60] PRASAD, S.: *Theoretical sensitivity limits in optical interferometric imaging*. In GMTRO, A. F., P. S. IDELL, and I. J. L. HAIE (eds.): *Digital Image Synthesis and Inverse Optics*, vol. 1351, pp. 674–688. The International Society for Optical Engineering, 1990.
- [61] PURSCH: *unbekannt*. J. Am. Chem. Soc., 21(13), 1999.
- [62] RAITZA, M., M. HEROLD, A. ELLWANGER, G. GAUGLITZ, and K. ALBERT: *Solid-state nmr and ellipsometric investigations of c30 chains bonded to sio2 surfaces*. Macromol. Chem. Phys., 201(7):825–829, 1999.
- [63] REHMANN, F. N. et al.: *Immobilization of acrylamide-modified oligonucleotides by copolymerisation*. Nucleic Acids Research, 2(27):649–655, 1999.
- [64] ROTHMUND, M.: *Aufbau und Charakterisierung eines hochparallelen optischen Screeningsystems zur pharmakologischen Wirkstoffsuche*. PhD thesis, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1999.

- [65] RYCHLIK, W. and R. E. RHOADS: *A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of dna..* Nucl. Acid. Res., 21(17):8543–51, 1989.
- [66] SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH., and T. MANIATIS: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual..* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [67] SAUER, M.: *Optische Detektion von Bindungsvorgängen an mikrostrukturierten Probenträgern.* Master's thesis, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1998.
- [68] SCHMITT, H.-M., A. BRECHT, J. PIEHLER, and G. GAUGLITZ: *An integrated system for optical biomolecular interaction analysis.* Biosens. Bioelectron., 12:219–233, 1997.
- [69] SHANNON, C. E.: *A mathematical theory of communication.* Bell System Technical Journal, 27(379-423), 1948.
- [70] SIGMUNDSSON, K., G. MASSON, R. RICE, N. BEAUCHEMIN, and B. ÖBRINK: *Determination of active concentrations and association and dissociation rate constants of interacting biomolecules: An analytical solution to the theory for kinetic and mass transport limitations in biosensor technology and its experimental verification.* Journal of American Chemical Society, 2002.
- [71] STEMMLER, I.: *Miniaturisierte Affinitätsanalytik - Ortsaufgelöste Oberflächenmodifikation, Assays und Detektion.* PhD thesis, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1999.
- [72] STENZEL, O.: *Das Dünnschichtspektrum.* Akademie Verlag, Berlin, 1996.
- [73] STEPHEN, A., T. LINIENKAMP, S. METEV, and G. SEPOLD: *Laser-assisted chemical micromachining of metals and alloys.* RIKEN Review, 43:56–62, 2002.
- [74] SWEEDLER, J., K. RATZLAFF, and M. DENTON: *Charge-Transfer-Devices in Spectroscopy.* VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1993.
- [75] ULBER, R., J. FRERICHS, and S. BEUTEL: *Optical sensor systems for bioprocess monitoring.* Anal. Bioanal., 376:342–348, 2003.
- [76] WAHRIG: *Wahrig Fremdwörterlexikon.* Bertelsmann Lexikon Verlag, 2004.
- [77] WATSON, J. D. and F. H. C. CRICK: *Molecular structure of nucleic acids.* Nature, 171:737–738, 1953.

- [78] WEDLER, G.: *Lehrbuch zur Physikalischen Chemie*. Weinheim: Wiley-VCH, 1997.
- [79] WEGNER, M.: *Einsatz von temperaturabhängigen RfS-Messungen zur Untersuchung der Hybridisierung von Oligonukleotiden*. Master's thesis, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2001.
- [80] WELLER, M.: *Strukturelle und kinetische Untersuchungen zur Entwicklung und Optimierung von Hapten-Enzymimmunoassays (ELISAs) am Beispiel der Bestimmung von Triazinherbiziden*. PhD thesis, TU München, 1992.
- [81] WIXFORTH, A.: *Nano-Beben auf dem Chip: Akustische Oberflächenwellen als Photonen-Förderband*. Phys.Bl., 54:649–653, 1998.
- [82] WOLTER, H.: *Handbuch der Physik - Grundlagen der Optik*, Bd. XXIV, Kap. Optik dünner Schichten, S. 461–554. Springer-Verlag, Berlin, 1957.
- [83] WRAY, J. H. und J. T. NEU: *Refractive Index of Several Glasses as a Function of Wavelength and Temperature*. Journal of the optical Society of America, 59(6), 1969.
- [84] YATSENKO, L. P., M. LOEFFLER, B. W. SHORE und K. BERGMANN: *Interferometric Analysis of Nanostructured Surface Profiles: Correcting Material-Dependent Phase Shifts*. Applied Optics, 43(16):3241–3250, 2004.
- [85] ZMUIDZINAS, J.: *Thermal noise and correlations in photon detection*. Applied Optics, 42(25):4969–5008, 2003.