

Charakterisierung von Poly(ethylenglykol)-Derivaten für den Einsatz in der markierungsfreien optischen Biosensorik

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Nina Schweizer
aus Böblingen

Tübingen
2012

Tag der mündlichen Qualifikation:

23.04.2012

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Günter Gauglitz

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Udo Weimar

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz danke ich sehr, dass er mir die Möglichkeit und Unterstützung gegeben hat mein Thema in einer offenen Arbeitsumgebung auszuführen. Außerdem danke ich Ihm für die Gelegenheiten, wertvollen Erfahrungen durch die Teilnahme an nationalen und europäischen Konferenzen und Workshops zu sammeln.

Bei Herrn Prof. Dr. Udo Weimar möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats bedanken.

Allen Kollegen des Arbeitskreises und Biometrics danke ich ganz herzlich für die großartige und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre und Gemeinschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ein großes Dankeschön geht an Stefanie Jäger, die schon seit vielen Jahren mir immer eine gute Freundin ist und Markus Ehni für die vielen nützlichen Anregungen und informativen Gespräche.

Sabrina Rau danke ich für ihr stets offenes Ohr und hilfreichen Hinterfragungen.

Bei den Herren Goran Markovic und Florian Pröll bedanke ich mich für ihre allseits bereite fachliche Unterstützung und die fruchtbaren und humorvollen Diskussionen innerhalb und außerhalb der Arbeitszeiten.

Ich danke allen Projektpartner und Fördere des Landesschwerpunktprojektes: Moleküle auf mikro- und nanostrukturierten Oberflächen – Wechselwirkungen, Erkennung, Funktion, sowie des Minigradiertenkollegs: Einblicke in die Bakterien-Material-Wechselwirkung.

Ein Dank gilt auch den ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises, insbesondere Micheal Kumpf für die Einarbeitung in das Thema Oberflächencharakterisierung dentaler Implantate und Einführung in die Reflektometrische Interferenzspektroskopie. Jochen Mehne danke ich für die Einführung in die Schichtpräparation und den vielen freundschaftlichen Gesprächen.

1 Inhalt

1	<i>Inhalt</i>	1
2	<i>Einleitung und Zielsetzung</i>	3
3	<i>Theorie</i>	6
3.1	Optische Grundlagen	6
3.1.1	Reflexion und Brechung	6
3.1.2	Reflexion und Interferenz an einer dünnen Schicht	8
3.2	Reflektometrische Interferenzspektroskopie	10
3.2.1	Messprinzip	10
3.3	Rasterkraftmikroskopie	11
3.3.1	Lennard-Jones-Potential	11
3.3.2	Abbildungsmethoden	12
3.4	Biochemische Grundlagen	17
3.4.1	Antikörper	17
3.5	Biopolymere für optische Biosensoren	19
3.5.1	Dextran	19
3.5.2	Poly(ethylenglykol) (PEG)	20
3.5.3	Zusammenfassung	21
3.6	Biomolekulare Wechselwirkung	22
3.6.1	Reaktion in heterogener Phase	23
4	<i>Materialien und Methoden</i>	25
4.1	Material und Geräte	25
4.2	Methoden	28
4.2.1	Oberflächenmodifizierung	28
4.2.2	Aufbau und Auswertungsmethode der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie	34
4.2.3	Bestimmung des Kontaktwinkels am liegenden Tropfen	37
4.2.4	Aufbau des Rasterkraftmikroskops (AFM)	38
5	<i>Ergebnisse</i>	40
5.1	Charakterisierung von 8-arm-PEG und 4-arm-PEG	42
5.1.1	Präparation der sensitiven Schichten	42
5.1.2	Kontaktwinkel	43
5.1.3	AFM	44
5.1.4	RiFS	49
5.1.5	Zusammenfassung und Fazit	53
5.2	Charakterisierung von Di-Epoxid-PEG und Di-NHS-PEG	54
5.2.1	Präparation der sensitiven Schichten	54
5.2.2	Kontaktwinkel	55
5.2.3	AFM	56
5.2.4	RiFS	58

5.2.5	Zusammenfassung und Fazit	66
5.3	Charakterisierung und Vergleich von Silan-PEG und DA-PEG-2000	69
5.3.1	Präparation der sensitiven Schichten.....	69
5.3.2	Kontaktwinkel	71
5.3.3	AFM	72
5.3.4	RlFS	74
5.3.5	Zusammenfassung und Fazit	79
5.4	AFM-Aufnahmen von Biopolymeren im wässrigen Medium	80
5.4.1	Vergleich von Diamino-PEG mit verschiedenen Molekulargewichten und Aminodextran.....	80
5.4.2	Zusammenfassung und Fazit	85
6	Zusammenfassung und Ausblick	86
7	Literatur.....	90
8	Anhang	94
8.1	Abkürzungen	94
8.2	Veröffentlichungen	97
8.2.1	Vorträge	97
8.2.2	Poster	97
8.2.3	Publikation	98
8.3	Akademische Lehrer	99

2 Einleitung und Zielsetzung

Das Einsatzgebiet von Biosensoren ist groß und reicht von medizinischen Anwendungen über Umweltanalytik, Nahrungsmittelkontrolle bis zur chemischen Industrie, wie z.B. on-line process-monitoring [1-4]. Was ist ein Biosensor? Laut IUPAC ist ein Biosensor eine Vorrichtung, die mit Hilfe von Enzymen, Immunsystemen, Organellen oder ganzen Zellen chemische Verbindungen detektieren kann. Durch biochemische Wechselwirkung wird ein thermisches, elektrisches oder optisches Signal erzeugt. Ein Biosensor besteht also aus zwei Komponenten. Die eine Komponente beinhaltet die biologische Erkennungsstruktur, den Liganden. Dieser bindet spezifisch an ein Analytmolekül bzw. reagiert mit diesem. Die zweite Komponente ist das Signalumwandlungselement, der Transducer [5]. Der Fokus in dieser Arbeit liegt auf den optischen Sensoren. Diese können in zwei Kategorien eingeteilt werden. Das sind einmal Sensoren mit indirekter Erkennung, wie zum Beispiel Fluoreszenz basierte Methoden und zum zweiten markierungsfreie Sensoren. Bei einem markierungsfreien Sensorsystem erzeugt die biologische Wechselwirkung eine Änderung der optischen Eigenschaft, wie z.B. die Änderung des Brechungsindex. Bei der indirekten Detektion benötigt man ein zweites Element, einen Marker. Dies kann ein Enzym sein, ein fluoreszenzmarkierter Antikörper oder ein Fluorophor selbst [4;6;7]. Zur Auslesung des Signals kommen Photodioden oder Spektrometer zum Einsatz. Bei der markierungsfreien Detektion sind die auf der Evaneszenzfeld-Technik basierenden Methoden wie z.B. Surface Plasmon Resonance (SPR) oder Gitterkoppler zu nennen [8-13]. Eine weitere markierungsfreie optische Detektionsmethode stellt die Interferometrie dar. Diese Methode findet Anwendung in Geräten wie die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS) [14;15]. Eine Kombination aus beiden Detektionstechniken stellen Lichtleiter-Interferometer da, wie zum Beispiel das Mach-Zehnder-Interferometer. Das Evaneszenzfeld reicht in das äußere Substrat, wo sich der Brechungsindex bei der Reaktion an der sensitiven Schicht ändert. Diese Änderung des Brechungsindexes kann gemessen werden durch die Detektion der Überlagerung von Licht eines Referenzleitarms mit dem des sensitiven Arms. Die nach Zusammenführung beider Arme austretende Lichtintensität variiert in Abhängigkeit vom Brechungsindex der sensitiven Schicht [16].

Um ein spezifisches Signal zu erhalten muss der Ligand auch spezifisch mit dem Analyten in Wechselwirkung treten. Daher sind die wichtigsten Charakteristika eines Liganden die Affinität und die Selektivität. Im Bereich der Immunosensorik werden meistens Antikörper als Erkennungsstruktur verwendet. Antikörper sind hoch selektiv und besitzen eine hohe Affinität zum Antigen[7;17]. Als Ligand können auch Aptamere, Peptide, Rezeptoren und molekular geprägte Polymere (MIP) verwendet werden [2;18-21]. Zusätzlich zur Auswahl der Detektionsmethode und der Erkennungsstruktur spielt die richtige Immobilisierung des Biomoleküls an die Sensoroberfläche eine zentrale Rolle. Das Biomolekül sollte möglichst stabil an die Oberfläche gebunden sein, da die Sensoroberfläche oft im flüssigen und auch fließenden Medium eingesetzt wird. Der Ligand sollte so auf die Oberfläche immobilisiert werden, dass der Analyt räumlich die Möglichkeit hat mit dem Ligand in Wechselwirkung zu treten. Desweiteren sollte die Immobilisierung die Selektivität und die Aktivität des Liganden nicht beeinträchtigen. Zusätzlich zu den obig genannten Kriterien stellt die unspezifische Proteinadsorption bei direkt optischen Biosensoren ein großes Problem dar. Ein Biosensor kann in unterschiedlichsten Medien verwendet werden (Wasser, Puffer, Milch, Blut, etc.)[1;4;7]. Da man markierungsfrei arbeitet, wird jede Wechselwirkung mit der Sensoroberfläche detektiert. Die Oberfläche muss also chemisch so modifiziert werden, dass schlussendlich nur

spezifische und keine unspezifischen Wechselwirkungen stattfinden [22]. Daher ist es notwendig, dass die Sensoroberfläche vollständig und möglichst homogen mit einer „Schutzschicht“ bedeckt ist [23-25].

Je nach Fragestellung und Art des Liganden muss die Sensoroberfläche individuell angepasst werden. Es muss eine Oberfläche geschaffen werden an die der Ligand gut immobilisiert werden kann. Die Problematik besteht in der Art der Funktionalisierung des Liganden. Je nach funktioneller Gruppe (Carboxyl-, Amino-, Thiol-, etc.) muss die Sensoroberfläche dafür modifiziert werden [26]. Um funktionelle Gruppen für die Ligandenimmobilisierung zu erhalten, haben sich im Arbeitskreis Gauglitz zwei Biopolymere etabliert: Aminodextran (AMD), ein wasserlösliches Hydrogel, das durch die hohe Anzahl an Aminogruppen eine hohe Ligandenbeladung erzeugt. Desweiteren Diamino-Poly(ethylenglykol) (DA-PEG), welches einen Polymer-Rasen auf der Sensoroberfläche bildet [23;25]. Die Anzahl an funktionellen Gruppen ist auf PEG geringer; jedoch ist dies bei kinetischen Fragestellungen auch gewünscht. Beide Polymere schirmen die Oberfläche gut vor unspezifischer Proteinadsorption ab. Jedoch ist die unspezifische Wechselwirkung auf AMD geringfügig höher als auf DA-PEG [27]. Durch die Aminofunktionalisierung der beiden Biopolymere können Liganden mit Carboxylgruppen leicht über Peptidchemie angebunden werden. Aufwendiger und zeitintensiver wird es allerdings mit Liganden, die zum Beispiel ebenfalls Aminogruppen vorweisen. Die Aminogruppen des Biopolymers müssen zu Carboxylgruppen umfunktionalisiert werden. Diese wiederum müssen über NHS/DIC-Chemie aktiviert werden, damit schlussendlich der Ligand kovalent angebunden werden kann [26].

Betrachtet man die genannten Punkte, wird klar, dass die Funktionsfähigkeit eines Biosensors stark von der Qualität der sensitiven Schicht abhängt. Diese beinhaltet nicht nur die Erkennungsstruktur sondern auch ein funktionalisiertes Polymer, welches die wichtige Aufgabe besitzt die Oberfläche vor unspezifischer Wechselwirkung abzuschirmen und den Liganden an die Sensoroberfläche zu immobilisieren. Abhängig von der zu immobilisierenden Erkennungsstruktur kann die Präparation über mehrere Tage andauern. Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass es zu nicht kontrollierbaren Unregelmäßigkeiten in der sensitiven Schicht kommen kann. Eine große Herausforderung stellt somit die Reproduzierbarkeit und Stabilität der Sensoroberflächen dar. Nur mit der Voraussetzung, dass jeder Sensor eine vergleichbare sensitive Oberfläche besitzt ist eine aussagekräftige biomolekulare Interaktionsanalyse möglich. Durch die Verwendung von heterogen modifizierten PEG-Derivaten, wie z.B. Silan-Amino-PEG kann man die Anzahl der Präparationsschritte verringern und somit eine gleichbleibende und reproduzierbare Herstellung der sensitiven Sensoroberfläche gewährleisten. Das Repertoire an Oberflächenmodifizierungsstrategien kann durch die Verwendung von homogenfunktionalisierten PEG-Derivaten, wie Di-Epoxid-PEG und Di-NHS-PEG erweitert werden. Um zu AMD vergleichbare Oberflächenbeladungen zu erhalten werden Mehrarm-PEG-Derivate getestet. Zusätzlich wird geprüft, ob durch die Verwendung von anderen Lösungsmitteln die Präparation vereinfacht und damit reproduzierbarer gemacht werden kann. Diese verschiedenen Biopolymere werden auf die oben genannten Kriterien hin systematisch untersucht und charakterisiert. Dazu werden die gefertigten Transducer mittels der markierungsfreien, optischen reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIFS) auf ihre Selektivität zum Analyten, sowie auf die Effektivität der unspezifischen Proteinabschirmung hin geprüft. Als Modellsysteme dienen zum einen das Antigen/Antikörper-Wechselwirkungssystem Testosteron/Anti-Testosteron und zum anderen das BSA/Anti-BSA-Wechselwirkungssystem. Der Grund für die Verwendung beider Systeme liegt in der unterschiedlichen Funktionalisierung des jeweiligen Antigens. Das verwendete Testosteronderivat besitzt eine Carboxylgruppe. Das BSA besitzt dagegen Aminogruppen über die es kovalent an die Oberfläche angebunden werden kann. Das zuvor zu immobilisierende Biopolymer

muss dementsprechend angepasst bzw. gewählt werden. Die unspezifische Proteinwechselwirkung wird mittels des Protein Ovalbumin (OVA) getestet. Verglichen werden die neu verwendeten PEG-Derivate jeweils mit den bereits etablierten Biopolymeren AMD, Diamino-PEG und Dicarboxy-PEG. Desweiteren werden die Sensoroberflächen mittels Kontaktwinkelmessungen charakterisiert. Die Verwendung der Rasterkraftmikroskopie (engl. Atomic Force Microscopy-AFM) dient dazu Aussagen über die Homogenität der Biopolymerschicht treffen zu können.

3 Theorie

In diesem Kapitel werden die physikalischen, chemischen und biochemischen Grundlagen erklärt, die die Basis bilden für die im experimentellen Teil dargelegten Messungen.

3.1 Optische Grundlagen

3.1.1 Reflexion und Brechung

Die Lichtgeschwindigkeit in einem Medium wird durch den Brechungsindex n charakterisiert. Er ist definiert als das Verhältnis der Lichtgeschwindigkeit im Vakuum c und derjenigen im betreffenden Medium c_m :

$$n = \frac{c}{c_m} \quad \text{Formel 1}$$

Trifft Licht auf eine Grenzfläche zwei verschiedener Medien (z.B. Luft/Glas) wird ein Teil des Lichtstrahls reflektiert und ein Teil transmittiert. Der Winkel θ_e zwischen dem einfallenden Strahl und der Normalen ist gleich dem Winkel zwischen Normalen und dem reflektierten Strahl, dem Reflexionswinkels θ_r (siehe Abbildung 1):

$$\theta_e = \theta_r \quad \text{Formel 2}$$

Dieses Reflexionsgesetz gilt für alle Arten von Wellen. Der transmittierte Teil des Strahls ändert durch den Eintritt in das zweite Medium seine Ausbreitungsrichtung. Diese Richtungsänderung wird Brechung genannt. Die Frequenz des Lichts bleibt beim Durchgang von einem Medium ins andere erhalten. Jedoch ändern sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit und damit die Wellenlänge. Gelangt eine Lichtwelle mit der Wellenlänge λ und der Frequenz ν vom Vakuum in ein Medium mit dem Brechungsindex n , so ist seine Wellenlänge λ' im Medium:

$$\lambda' = \frac{\lambda}{n} \quad \text{Formel 3}$$

Tritt die Lichtwelle von einem optisch dünneren Medium in ein optisch dichteres Medium ein, wird der Strahl zur Normalen hingebrochen, d.h. der Brechungswinkel θ_b ist kleiner als der Einfallswinkel θ_e (siehe Abbildung 1). Verläuft der Strahl in umgekehrter Richtung, dann wird der austretende Strahl von der Normalen weg gebrochen, und der Brechungswinkel ist größer als der Einfallswinkel.

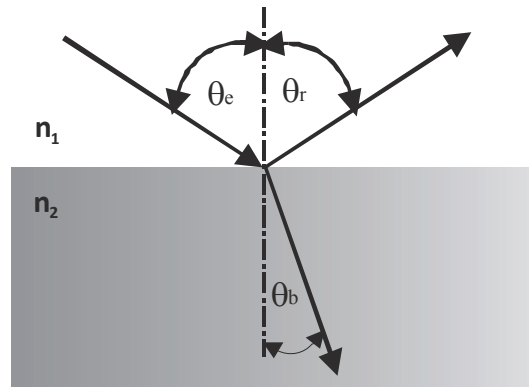


Abbildung 1: Reflexion und Brechung einer Lichtwelle an einer Phasengrenze in ein optisch dichteres Medium

Der Zusammenhang zwischen Brechungsindizes n_1 und n_2 sowie der Einfallswinkel θ_e und der Brechungswinkel θ_b , lassen sich mit dem Gesetz von Snellius beschreiben:

$$n_1 \cdot \sin \theta_e = n_2 \cdot \sin \theta_b \tag{Formel 4}$$

Für den Spezialfall des senkrechten Einfalls ($\theta_e = \theta_r = 0^\circ$) ist die Intensität I des reflektierten Strahls,

$$I = \left(\frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2} \right)^2 \cdot I_0 \tag{Formel 5}$$

mit I_0 als Intensität des einfallenden Strahls.

Die Grundlage zur Beschreibung der Reflexion sind die Maxwell'schen Gleichungen. Der Anteil der reflektierten Strahlung ist abhängig vom Einfallswinkel und den Brechungsindizes. Die Fresnelschen Gleichungen beschreiben den Zusammenhang zwischen dem Reflektivitätskoeffizienten r und dem Schwingungszustand des elektrischen Feldes relativ zur Einfallsebene:

$$r_{\perp} = \frac{E_{\perp r}}{E_{\perp e}} = \frac{n_2 \cdot \cos \theta_b - n_1 \cdot \cos \theta_e}{n_2 \cdot \cos \theta_b + n_1 \cdot \cos \theta_e} \tag{Formel 6}$$

$$r_{\parallel} = \frac{E_{\parallel r}}{E_{\parallel e}} = \frac{n_1 \cdot \cos \theta_b - n_2 \cdot \cos \theta_e}{n_1 \cdot \cos \theta_b + n_2 \cdot \cos \theta_e} \tag{Formel 7}$$

mit E als elektrischer Feldvektor.

Diese Formeln gelten jedoch nur für linear polarisiertes Licht. Man unterscheidet zwischen zwei Fällen. Im ersten Fall liegt das elektrische Feld senkrecht zur Einfallsebene, im zweiten Fall steht das elektrische Feld parallel zur Einfallsebene (siehe Abbildung 2) [28;29].

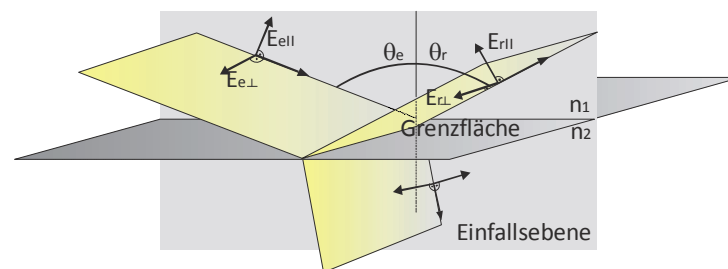


Abbildung 2: Reflexion und Transmission an einer Grenzfläche mit E als elektrischer Feldvektor

3.1.2 Reflexion und Interferenz an einer dünnen Schicht

Reflexion an dünnen, planparallelen Schichten führt zur Mehrfachreflexion und zur Interferenz der reflektierten Teilstrahlen. Als dünne Schicht bezeichnet man ein Medium das eine Dicke im Bereich der Wellenlänge des Lichtes besitzt. Randbedingungen für Interferenz sind zum einen die vollständige Kohärenz des reflektierten Lichts sowie das Vorhandensein von ideal transparenten Schichten, d.h. an dieser Schicht finden keine Streuung und keine Absorption statt. Löschen sich die reflektierten Wellen aus, spricht man von destruktiver Interferenz. Verstärken sich die Amplituden, so spricht man von konstruktiver Interferenz.

Wie die Mehrfachreflexion in einem Schichtsystem stattfindet soll anhand der Abbildung 3 beschrieben werden. Die Schicht hat die Dicke d und einen Brechungsindex n_1 . Sie befindet sich zwischen zwei Medien mit den Brechungsindices n_0 und n_2 . Unter senkrechtem Lichteinfall gilt für die Reflektivität R :

$$R = r^2 = \left(\frac{n_2 - n_1}{n_2 + n_1} \right)^2 \quad \text{Formel 8}$$

mit r als Reflektivitätskoeffizient.

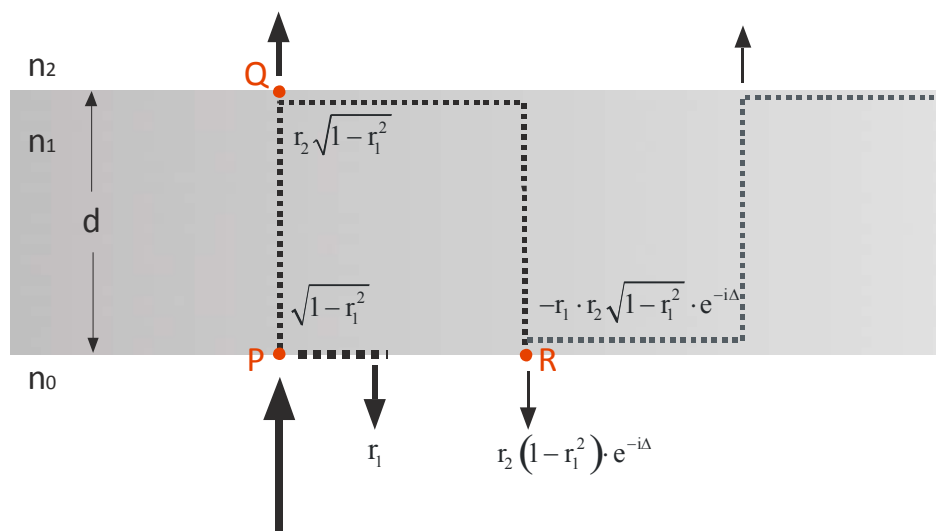


Abbildung 3: Schematischer Verlauf der Mehrfachreflexion an einer dünnen Schicht bei senkrechtem Lichteinfall

Trifft nun ein Lichtstrahl mit der Amplitude 1 am Punkt P auf die dünne Schicht wird er teilweise reflektiert. Der reflektierte Anteil beträgt:

$$r_1 = \frac{n_0 - n_1}{n_0 + n_1} \quad \text{Formel 9}$$

Es wird eine Welle mit der Amplitude $\sqrt{1-r_1^2}$ in die optisch dünnere Schicht transmittiert. Diese trifft in Punkt Q auf die gegenüberliegende Phasengrenze und wird dort wiederum teilweise reflektiert. Allerdings nur mit einem Anteil von:

$$r_2 = \frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2} \quad \text{Formel 10}$$

In der dünnen Schicht läuft somit eine Welle mit der Amplitude $r_2\sqrt{1-r_1^2}$ zurück. Sie trifft am Punkt R wieder auf die erste Phasengrenze, wo ihr Anteil $r_1 \cdot r_2\sqrt{1-r_1^2} \cdot e^{-i\Delta}$ reflektiert wird. In das ursprüngliche Medium wird eine Welle mit der Amplitude $r_2(1-r_1^2)$ transmittiert. Im Vergleich zu der in P reflektierten Welle hat sie die dünne Schicht zwei Mal durchlaufen und weist nun einen Gangunterschied von $2 \cdot n_1 \cdot d$ auf. Ihre Phase ist nun

$$\Delta = \frac{4 \cdot \pi \cdot n_1 \cdot d}{\lambda} \quad \text{Formel 11}$$

Für die Berechnung der Intensität, die sich bei der Überlagerung der Teilwellen ergibt wird zunächst die komplexe Amplitude der beiden Teilwellen addiert:

$$r_1 + r_2(1-r_1^2) \cdot e^{-i\Delta} \quad \text{Formel 12}$$

Alle weiteren reflektierten Teilstrahlen werden ebenfalls nach Amplitude und Phase addiert, um die resultierende Welle zu erhalten. Die erhaltene Reihe lässt sich wie folgt formulieren:

$$r_1 + \sum_{i=0}^{i=\infty} a \cdot q^i \quad \text{Formel 13}$$

Mit $a = r_2(1-r_1^2) \cdot e^{-i\Delta}$ und $q = -r_1 \cdot e^{-i\Delta}$.

Somit ergibt sich die Reflektivität des Systems nach der Multiplikation dieser Summe mit ihrer komplex Konjugierten [30]:

$$R = |r \cdot e^{i\epsilon}|^2 = \frac{r_1^2 + r_2^2 + 2 \cdot r_1 \cdot r_2 \cdot \cos(\Delta)}{1 + r_1^2 \cdot r_2^2 + 2 \cdot r_1 \cdot r_2 \cdot \cos(\Delta)} \quad \text{Formel 14}$$

Unter der Voraussetzung, dass keine Phasensprünge auftreten ist die Intensität des reflektierten Lichtstrahls in Abhängigkeit von der Wellenlänge:

$$I_r = I_1 + I_2 + 2 \cdot \sqrt{I_1 \cdot I_2} \cos\left(\frac{4 \cdot \pi \cdot (n \cdot d)}{\lambda}\right) \quad \text{Formel 15}$$

Trägt man die Reflektivität gegen die Wellenlänge auf, dann ergeben sich abwechselnd Maxima und Minima. Das so erhaltene Interferenzspektrum ist abhängig von *der optischen Schichtdicke* $n \cdot d$. Diese lässt sich aus der Lage der Extrema im Interferenzspektrum bestimmen [31;32]. Bedingung für das Auftreten eines Maximum bzw Minimum ist gegeben durch:

$$m_{\max} = \frac{2 \cdot n \cdot d}{\lambda}, m_{\max} = 1, 2, 3, \dots \quad \text{Formel 16}$$

$$m_{\min} = \frac{2 \cdot n \cdot d}{\lambda}, m_{\min} = \frac{1}{2}, \frac{3}{2}, \frac{5}{2}, \dots \quad \text{Formel 17}$$

Um nun aus dem Reflexionsspektrum die optische Schichtdicke $n \cdot d$ bestimmen zu können, muss die Ordnungszahl m mindestens eines Extremums bekannt sein. Die Ordnungszahl eines Extrempunktes kann aus der Lage zweier Extrema λ_1 und λ_2 , sowie der Differenz ihrer Ordnungszahlen $m_1 - m_2 = \Delta m$ über folgende Gleichung berechnet werden.

$$m_1 = \frac{\lambda_2 \cdot \Delta m}{(\lambda_2 - \lambda_1)} \quad \text{Formel 18}$$

Dies gilt uneingeschränkt nur dann, wenn der Brechungsindex unabhängig von der Wellenlänge ist, d.h für dispersionsfreie Systeme [15;33-35].

3.2 Reflektometrische Interferenzspektroskopie

Die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS) ist eine direkt optische Detektionsmethode, die auf dem Prinzip der Mehrfachreflexion an dünnen Schichten beruht. Mit dieser Methode ist es möglich Wechselwirkungen an einer Oberfläche zeitaufgelöst und markierungsfrei zu beobachten [15;33;35].

3.2.1 Messprinzip

Beim Einstrahlen von Weißlicht ($I_0(\lambda)$) auf ein Mehrschichtsystem werden die Lichtstrahlen an den Phasengrenzen teilweise reflektiert ($I_{R1}(\lambda), I_{R2}(\lambda), I_{R3}(\lambda)$) und transmittiert ($I_T(\lambda)$). Durch Abschwächung bzw. Verstärkung der Amplituden der reflektierten Einzelstrahlen entsteht ein Interferenzmuster. Die Lage des Interferenzspektrums wird durch das Produkt aus Brechungsindex und physikalischer Schichtdicke (die optische Schichtdicke) des Mediums bestimmt (siehe Kapitel 3.1.2). Das Prinzip ist in Abbildung 4 dargestellt. Durch Wechselwirkungen zwischen der Probe und der Sensoroberfläche kommt es zur Änderung dieser optischen Schichtdicke. Die Wechselwirkung kann zum Beispiel die Anbindung von Molekülen an die Oberfläche sein oder das Quellen von einem auf der Oberfläche immobilisierten Polymer. Die Zunahme der optischen Schichtdicke bewirkt eine Veränderung bzw. Verschiebung des Interferenzspektrums zu höheren Wellenlängen. Durch Auftragung der Verschiebung eines Extremums gegen die Zeit erhält man ein sogenanntes Sensogramm, die eigentliche Bindungskurve.

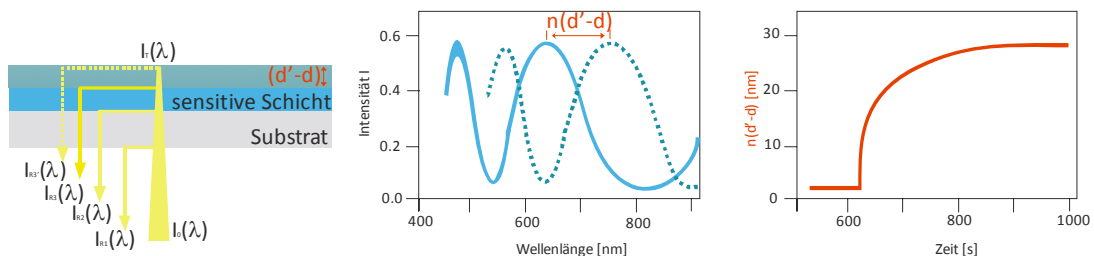


Abbildung 4: Prinzip von RIfS. Die reflektierten Teilstrahlen (links) interferieren miteinander und ergeben ein charakteristisches Interferenzspektrum (mitte). Durch die Wechselwirkung zwischen Probe und sensitiver Schicht kommt es zur Änderung der optischen Schichtdicke und man erhält ein Bindungssignal (rechts)

Der Glatransducer für die Reflektometrische Interferenzspektroskopie besteht aus mehreren Schichten. Die Grundlage ist eine 1 mm dickes Glassubstrat. Darauf folgt eine hochbrechende Schicht aus Ta_2O_5 mit einer Schichtdicke von 10 nm. Die letzte Schicht ist die Interferenzschicht, bestehend aus 330 nm SiO_2 . Als Referenz dient ein Glasplättchen ohne Interferenzschicht. Bevor man die eigentliche Messung starten kann muss man eine Referenz aufnehmen. Dazu wird das Referenzplättchen eingebaut und es wird eine Dunkelmessung und eine Referenzmessung aufgenommen und gespeichert. Anschließend kann der eigentliche Transducer (Interferenzglas) verwendet werden. Die gemessene Intensität $I_{mess}(\lambda)$ kann nun mit der zuvor abgespeicherten Referenzintensität $I_{ref}(\lambda)$ und der auf dem Dunkelstrom des Spektrometers beruhenden Intensität $I_d(\lambda)$ korrigiert werden:

$$I_{korr}(\lambda) = \frac{I_{mess}(\lambda) - I_d(\lambda)}{I_{ref}(\lambda) - I_d(\lambda)}$$

Formel 19

3.3 Rasterkraftmikroskopie

In dieser Arbeit wurde die Rasterkraftmikroskopie angewendet um die unterschiedlich präparierten Sensoroberflächen auf ihre Struktur und Rauigkeit hin zu untersuchen. Mit der Rasterkraftmikroskopie (engl. Atomic Force Microscopy-AFM) können lokale Eigenschaften von Oberflächen mit einer Auflösung in den Nanometerbereich bestimmt werden. Das Rasterkraftmikroskop ist eine Weiterentwicklung des Rastertunnelmikroskops. Bei der Rastertunnelmikroskopie wird eine feine Metallspitze soweit an eine zu untersuchende Oberfläche herangeführt bis ein abstandsempfindlicher Tunnelstrom einsetzt. Das rasterförmige Abtasten der elektrisch leitenden Probenoberfläche liefert ein dreidimensionales Bild mit bis zu atomarer Auflösung. Die Rasterkraftmikroskopie hat den methodischen Vorteil, dass damit auch elektrisch nichtleitende Proben untersucht werden können. Fährt man mit einer feinen Spitze an die Oberfläche heran, so wirkt in erster Näherung ein *Lennard-Jones-Potential* zwischen dem vordersten Atom der Spitze und dem Oberflächenatom, d.h. abstandsabhängig wirkt auf die Spitze in einem größeren Abstand zuerst eine anziehende, dann eine abstoßende Kraft [36-38].

3.3.1 Lennard-Jones-Potential

Bei der Annäherung zweier Teilchen wirken zuerst Attraktionskräfte, die sich proportional zu r^{-6} verhalten. Ab einer bestimmten Entfernung beginnt der repulsive Anteil zu überwiegen und steigt extrem schnell an. Der abstandsabhängige Verlauf des Lennard-Jones-Potential ist in Abbildung 5 gezeigt. Oft findet man eine Abhängigkeit der Abstoßung von r^{-12} . Die abstoßenden Kräfte kommen durch Pauli-Repulsion zustande. Bei den anziehenden Kräften handelt es sich vor allem um van-der-Waals-Kräfte, aber auch um permanente Dipol-Dipol-Wechselwirkungen. Addiert man die repulsiven und attraktiven Wechselwirkungen zusammen so erhält man das Lennard-Jones-Potential:

$$E_{pot}(r) = 4 \cdot \varepsilon \cdot \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad \text{Formel 20}$$

Mit E_{pot} : Lennard-Jones-Potential in Abhängigkeit vom Abstand r , ε : Tiefe des Potentialminimums und σ : Teilchendurchmesser.

Vor allem die repulsive Kraft ist also eine sehr empfindliche Abstandssonde und erlaubt die Detektion von Höhenunterschieden bis in den Sub-Pikometer-Bereich.

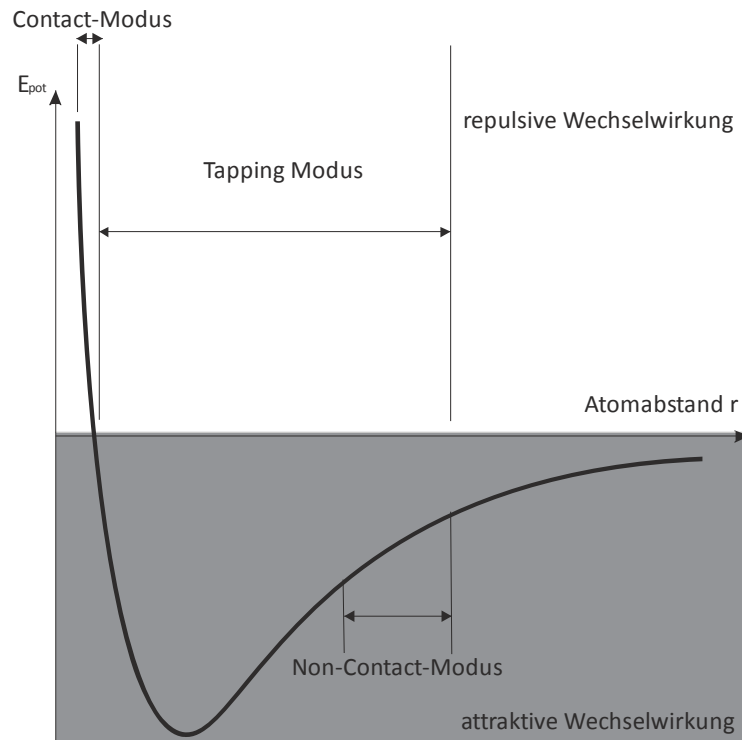


Abbildung 5: Lennard-Jones-Potential in Abhängigkeit des Abstandes zwischen Spitze und Probe sowie die Arbeitsbereiche der AFM-Modi

Das Lennard-Jones-Potential (Abbildung 5) stellt einen idealisierten Fall dar. Tatsächlich finden Wechselwirkungen zwischen vielen Atomen der Spitze und der Probenoberfläche statt. Auf Grund dessen ändert sich der Potentialverlauf für die attraktiven Van-der-Waals-Wechselwirkungen bei unterschiedlichen Wechselwirkungsgeometrien erheblich. Geht man von der einfachsten Annahme aus, dass die einzelnen Wechselwirkungsenergien zwischen zwei Atomen in zwei makroskopischen Körpern unabhängig voneinander sind und sich diese Paarpotentiale additiv zum gesamten Wechselwirkungspotential zusammensetzen (Hamaker-Näherung), ergibt sich für die Wechselwirkungsenergie zwischen einem Atom und einer planaren Oberfläche ein Van-der-Waals-Term

$E_{\text{pot}} \sim \frac{1}{r^3}$. Bei einer Wechselwirkungsgeometrie zwischen einer Kugel und einer planaren Oberfläche

ergibt sich theoretisch ein attraktiver Potentialterm von $E_{\text{pot}} \sim \frac{1}{r}$. Bei Messungen in Luft ist die

Probenoberfläche üblicherweise mit einem dünnen Wasserfilm bedeckt. Durch die daraus resultierenden Kapillarkräfte wird die gesamte anziehende Kraft größer. Durch Messungen in Vakuum oder unter Flüssigkeit können solche Adsorptionskräfte vermieden werden.

3.3.2 Abbildungsmethoden

Je nach zu untersuchende Oberfläche kann man verschiedene Abbildungsformen wählen. Im Kontakt-Modus ist die Spitze permanent mit der Oberfläche in Kontakt. Man erhält die höchst mögliche Auflösung. Im Tapping-Modus wird der Cantilever zur Schwingung angeregt und die Spitze berührt nur beim maximalen Ausschlag die Oberfläche. Dieser Modus ist besonders gut geeignet für weiche Proben.

Der dritte Modus ist der Nicht-Kontakt-Modus. Hierbei wird ebenfalls der Cantilever zur Schwingung angeregt, die Spitze berührt aber niemals die Oberfläche. Diese Methode ist für sehr empfindliche Proben geeignet.

3.3.2.1 Kontakt-Modus

In diesem Modus ist die Spitze im direkten Kontakt mit der Probenoberfläche. Man nähert sich soweit der Oberfläche bis die Cantileververbiegung den vorgegebenen Setpoint-Wert erreicht hat, d.h. bis eine bestimmte Kraft zwischen Probe und Spitze herrscht. Beim Rastern über die Probe verändert sich aufgrund von Topographieunterschieden die Verbiegung des Cantilevers. Im so genannten Constant-Force-Modus wird die Cantileververbiegung gleich wieder als Input der Feedbackschleife zugeführt. Die Abweichung vom Setpoint wird durch Höhenregelung des z-Piezoelementes, das über die Feedbackschleife gesteuert wird, ausgeglichen. So kann die Kraft zwischen Probe und Spitze gut kontrolliert werden. Die Rastergeschwindigkeit ist jedoch auf Grund der Nachregelzeit eingeschränkt. Eine weitere Abbildungsmöglichkeit ist der Constant-Height-Modus. Hierbei wird die Regelschleife ausgeschaltet und mit konstantem Abstand gemessen. Die Cantileververbiegung wird direkt in Abhängigkeit der x,y-Position aufgetragen. Bei sehr harten und gleichzeitig rauen Proben kann es zum Abbrechen der Spitze kommen. Bei Abbildung von weichen Proben ist der Constant-Height-Modus von großem Nachteil, da die Probe durch den direkten Kontakt mit der Spitze und den wechselnden Auflagekräften stark deformiert oder sogar zerstört werden kann. Für die Abbildung im atomaren Maßstab von atomar glatten Oberflächen wird oft der Constant-Height-Modus verwendet, da wegen der horizontalen Drift des Systems mit sehr hohen Rasterkraftgeschwindigkeiten gearbeitet werden muss. Die Cantileververbiegung und somit die Änderung der Auflagekraft bleibt bei solchen Proben sehr klein.

Kraft-Abstandskurve:

Zur Messung der Kraft-Abstandskurve wird der Cantilever ein- bzw. mehrmals mit definierter Kraft auf die Oberfläche gebracht und wieder entfernt. Dabei wird die auf den Cantilever wirkende Kraft (bzw. die Cantileververbiegung) in Abhängigkeit von der Spitzenposition aufgezeichnet. Der obige Teil in Abbildung 6 zeigt eine ideale Messung auf einer elastischen Probe. Dabei repräsentiert die schwarze Kurve den Annäherungsprozeß und die rote Kurve das Zurückziehen der Spitze. Im realen Experiment sind die Kraft-Abstandskurven sehr viel komplexer. Aus dem Verlauf der Kurven lassen sich Rückschlüsse auf die Eigenschaften des Materials und der Oberfläche gewinnen. Im unteren Teil der Abbildung 6 ist die Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe dargestellt, sowie deren Position in der Kraft-Abstandskurve (A-E).

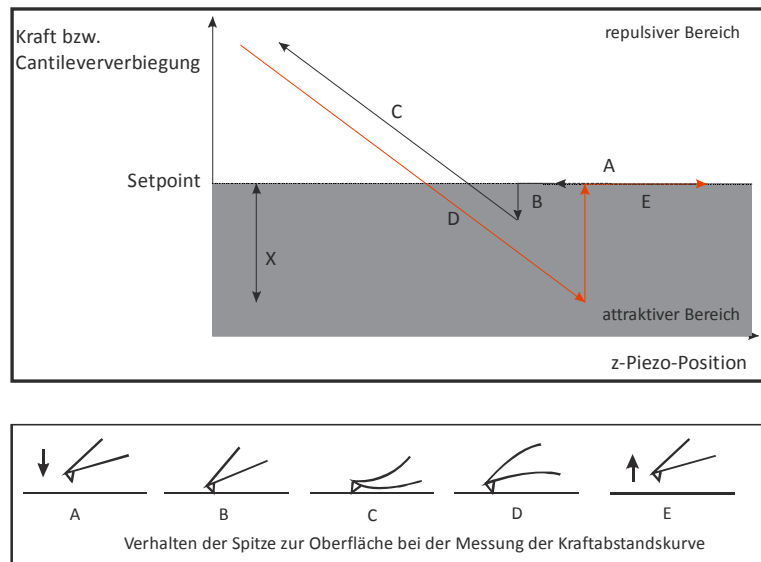


Abbildung 6: Kraftabstandskurve und schematische Darstellung des Verhaltens der Spitze bei der Annäherung an die Oberfläche im Kontakt-Modus

Zwei Kräfte sind so gut wie immer im Kontakt-Modus vorhanden. Zum einen die Kapillarkräfte, verursacht von einer dünnen Wasserschicht, die meistens die Probe bedeckt, und zum anderen unspezifische Van-der-Waals-Kräfte die zwischen Spitze und Probe herrschen. Diese Kräfte sind unter anderem verantwortlich für den Verlauf der Kurve (siehe Abbildung 6). Im Bereich A ist die Spitze noch weit weg von der Probenoberfläche. Das detektierte Signal entspricht dem Setpointsignal (Bereich A). Bei weiterem Annähern kommt es dann zum Sprung (jump to contact) im Kurvenverlauf, auf Grund von kurzweitreichenden Anziehungskräften (Bereich B). Anschließend steigt bei weiterer Annäherung der Spitze, die Kraft linear an (Bereich C). Nach maximaler Auslenkung des Piezoelementes fällt die Kurve genauso linear wieder ab (Bereich D). Die Spitze bleibt aber in Berührung mit der Oberfläche bis die Federkraft größer wird als die Adsorptionskräfte der Oberfläche (pull off). Bei weiterer Entfernung von der Probe bleibt die Kraft konstant und entspricht der Ausgangskraft (Bereich E). Die Gesamtkraft, die während der Messung im Kontakt-Modus auf die Probe ausgeübt wird, setzt sich additiv aus einer konstanten Kapillarkraft und der Kraft, die durch die Verbiegung des Cantilevers verursacht wird, zusammen. Die Auflagekraft F lässt sich somit über das Hooksche Gesetz berechnen.

$$F = k \cdot \Delta x$$

Formel 21

k entspricht der Federkonstante des Cantilevers und Δx die Differenz zwischen dem Setpoint und dem pull off [21].

Der Kontakt-Modus ist die einzige AFM-Technik mit der man „atomare Auflösung“ erreichen kann. Ein weiterer großer Vorteil ist die Möglichkeit mit relativ hohen Rastergeschwindigkeiten messen zu können. Sehr raue Proben mit extremer Topographie können im Kontakt-Modus am besten abgebildet werden.

Zu den oben genannten Kapillar- und Normalkräften können auch sehr hohe laterale Scherkräfte auftreten, die die Abbildung verzerren können. Die Kombination von starken Normalkräften und lateralen Scherkräften geht auf Kosten des Auflösungsvermögens. Des Weiteren kann es bei weichen Proben, wie biologischen Objekten oder Polymeren, zu Beschädigung der Probe kommen.

3.3.2.2 Nicht-Kontakt-Modus

Im Nicht-Kontakt-Modus wird der Cantilever über ein Piezoelement zur Schwingung angeregt. Die Schwingungsamplitude beträgt weniger als 10 nm. Die Spitze berührt dabei nie die Probenoberfläche, sondern oszilliert knapp über dem adsorbierten Flüssigkeitsfilm. Auf Grund von attraktiven Van-der-Waals-Wechselwirkungen kommt es zu abstandsabhängigen Dämpfung der Oszillation, was zu einer Erniedrigung der Resonanzfrequenz führt. Änderung der Amplitude, der Phase und der Frequenz werden detektiert und dazu verwendet den Abstand zwischen Probe und Spitze zu kontrollieren. Die Feedbackschleife regelt dazu das z-Piezoelement so nach, dass die vorgegebene Setpoint-Amplitude konstant bleibt. Somit erhält man eine Abbildung der Oberflächentopographie. Bei der kontaktfreien Methode wirken beim Scannen keine repulsiven Kräfte, was für die Abbildung von weichen Proben von Vorteil ist. Allerdings ist die laterale Auflösung wesentlich schlechter als im Kontakt-Modus. Um einen eventuellen Kontakt mit der Probenoberfläche zu vermeiden, wird eine hohe Anforderung an die Regelelektronik gestellt, was zusätzlich noch auf Kosten der Rastergeschwindigkeit geht. Die Anwendungsmöglichkeiten sind auf Grund dieser Nachteile stark eingeschränkt.

3.3.2.3 Tapping Modus

Im Tapping-Modus wird der Cantilever zur Schwingung nahe seiner Resonanzfrequenz angeregt. Je nachdem wie groß die zu detektierenden Höhenunterschiede auf der Probe sind, variieren die Schwingungsamplituden von 20 bis 100 nm. Jeweils im Amplitudenminimum einer Schwingung berührt die Spitze kurz die Probenoberfläche. Auf Grund der auftretenden Wechselwirkungen wird die Cantileveramplitude gedämpft. Diese Dämpfung ist charakteristisch für einen bestimmten Abstand zwischen Spitze und Oberfläche. Mittels der Feedbackschleife wird das z-Piezoelement so nachgeregelt, dass die vorgegebene Setpoint-Amplitude konstant gehalten wird. Durch Auftragung der Höhe des z-Piezoelementes in Abhängigkeit der lateralen Position erhält man ein dreidimensionales Bild der Oberflächentopographie. Durch die relativ kurze Berührungsdauer zwischen Spitze und Probe reduziert sich die laterale Reibung, die hauptsächlich für die Zerstörung der Probe verantwortlich ist auf ein Minimum. Nicht stark adsorbierte Proben können somit nicht mehr so leicht verschoben oder vom Substrat heruntergekratzt werden. So kann im Idealfall eine laterale Auflösung von 1 nm und eine Höhengauflösung von 0,01 nm erreicht werden. Der Tapping Modus eignet sich neben besonders empfindlichen Materialien vor allem für größere Scan-Bereiche mit drastischen Höhenunterschieden [39;40].

3.3.2.4 Bestimmung der Rauigkeit

Man kann mittels AFM die Rauigkeit einer abgerasterten Oberfläche bestimmen. Vereinfacht beschrieben ist die Rauigkeit die laterale und vertikale Ausdehnung von Strukturen auf der Oberfläche. Ein Parameter der eine Kenngröße für die Rauigkeit darstellt ist der sogenannte RMS-Wert (engl. Root mean square). Der RMS-Wert auch R_q -Wert genannt, ist die mittlere Standardabweichung der Topographie von der gemittelten Nullebene:

$$R_q = \sqrt{\frac{\sum_i (Z_i - \bar{Z})^2}{N}}$$

Formel 22

Die Variable Z_i ist die Höhenabweichung des i -ten Messwertes von der gemittelten Idealfäche (siehe Abbildung 7).

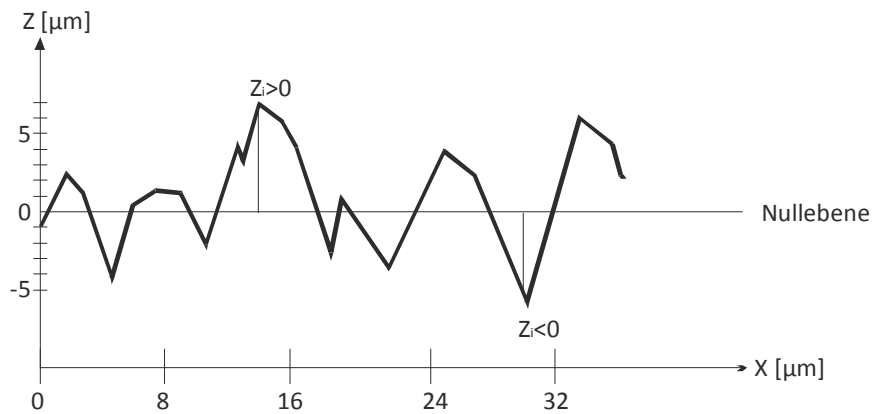


Abbildung 7: schematische Darstellung einer rauhen Oberfläche mit eingezeichneter Nullebene

Je größer der RMS-Wert desto größer ist die vertikale Rauigkeit einer Oberfläche. RMS-Werte können nur untereinander verglichen werden. Auch sollte der RMS-Wert nicht isoliert von der jeweiligen AFM-Aufnahme betrachtet werden, da sich die RMS-Werte zweier Proben ähneln aber die jeweiligen Oberflächentopographien stark voneinander abweichen können [41].

3.4 Biochemische Grundlagen

In dieser Arbeit wurden biomolekulare Wechselwirkungen detektiert und charakterisiert. Aus diesem Grund werden im kommenden Kapitel Biomoleküle und biochemische Wechselwirkungen erläutert.

3.4.1 Antikörper

Antikörper oder Immunglobuline (Ig) gehören zu den Y-förmigen Glycoproteinen, die an beiden Enden Antigene binden können. In Abbildung 8 ist die Struktur des wichtigsten Immunglobulins vom Typ G (IgG) dargestellt. Es ist ein 150 kDa schweres Tetramer und besteht aus zwei identischen schweren Ketten (H-Ketten) und zwei identischen leichten Ketten (L-Ketten). An beiden H-Ketten ist kovalent ein Oligosaccharid gebunden. Antikörper kommen als Membranproteine auf der Oberfläche von Lymphocyten und in gelöster Form im Blutplasma vor. Die IgGs werden durch die Proteinase Papain in zwei F_{ab} -Fragmente und ein F_c -Fragment gespalten. Die F_{ab} -Fragmente (antigen-binding) setzen sich aus einer L-Kette und dem N-terminalen Teil einer H-Kette zusammen. Dieses Ende ist hypervariabel und unterscheidet sich von Antikörper zu Antikörper. Es enthält das sogenannte Paratop, die Antigenbindungsstelle. Das Epitop des Antigens besteht im Allgemeinen aus 5-6 Aminosäure- bzw. Kohlenhydrat-Bausteinen und wird sehr spezifisch vom jeweiligen Antikörper erkannt und gebunden. Das F_c -Fragment (crystallizable) besteht aus dem C-terminalen Hälften der beiden H-Ketten. Dieser Abschnitt des IgGs dient der Bindung an die Zelloberflächen, der Interaktion mit dem Komplementsystem und ist beteiligt am Transport der Antikörper durch Zellen.

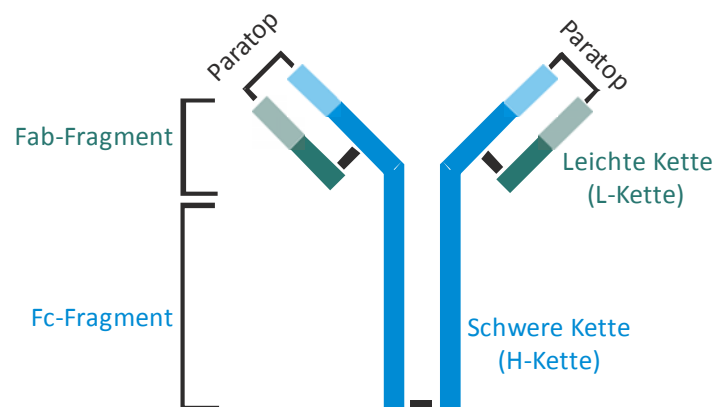


Abbildung 8: schematische Darstellung eines IgGs

Die Immunglobuline des Menschen werden in fünf Klassen eingeteilt. IgA (mit zwei Untergruppen), IgD, IgE, IgG (mit vier Untergruppen) und IgM. Bei Immunglobulinen handelt es sich um sekretorische Proteine. B-Zellen tragen Antikörper auf ihrer Zelloberfläche und können auch Antikörper ins Plasma abgeben. Diese Antikörper können Antigene spezifisch binden. Durch die Bindung an Antikörper werden extrazellulär vorkommende Viren und Bakterien für das Abwehrsystem als Fremdkörper markiert.

Die Gewinnung von Antikörper erfolgt klassischerweise über die Immunisierung von Tieren (im Speziellen von Mäusen, Kaninchen, Ziegen und Schafen). Das Versuchstier bildet nach der Injektion des Antigens Antikörper, die anschließend aus dem Blut extrahiert werden können. Diese sind polyklonal, d.h. sie binden mit unterschiedlicher Spezifität an verschiedene Epitope gleich bzw. verschiedener

Antigene. Antikörper welche nur ein einziges Epitop erkennen nennt man monoklonal. Diese erhält man durch die sogenannte Hybridoma-Technik (siehe Abbildung 9)[42].

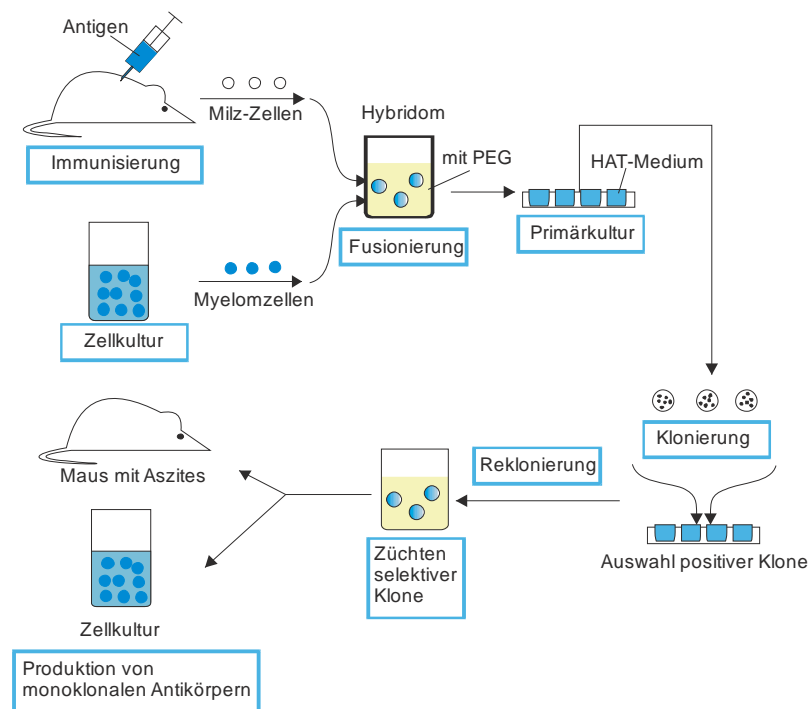


Abbildung 9: schematische Darstellung der Hybridoma-Technik zur Gewinnung monoklonaler Antikörper [42]

Zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern werden Lymphocyten aus der Milz einer immunisierten Maus isoliert und mit Mäuse-Tumorzellen fusioniert. Die Fusion der Zellen wird durch Zugabe von Poly(ethylenglykol) (PEG) unterstützt. Die entstandenen Zellhybride, sogenannte Hybridome, sind potentiell unsterblich und in der Lage Antikörper zu produzieren. Die Hybridoma-Zellen werden von den restlichen Zellen der Mischung getrennt und anschließend durch Klonieren vermehrt. Nach dem Testen der Klone auf gebildete Antikörper werden die positiven Kulturen ausgewählt und durch weiteres Klonieren selektioniert. Das Ergebnis sind Hybridome, die monoklonale Antikörper bilden [42].

3.5 Biopolymere für optische Biosensoren

Eine Sensoroberfläche sollte eine hohe Anzahl an aktiven Liganden, eine niedrige unspezifische Proteinadsorption, Langzeitstabilität und hohe chemische Widerstandsfähigkeit aufweisen. Im Bereich der optischen Sensorik spielen Trägermaterialien wie Siliziumoxid, Siliziumdioxid, Glas und Quartz eine wichtige Rolle. Das Hauptproblem bei dieser Art von Sensormaterial ist die hohe unspezifische Adsorption von Proteinen. Um dies zu verhindern und um funktionelle Biomoleküle an das Substrat zu binden ist es notwendig die Sensoroberfläche zu modifizieren. Die Oberfläche der Glastransducer können relativ einfach hydroxyliert werden (mittels Sauerstoffplasma, konzentrierte Säuren oder Basen). Diese Oberflächen-Hydroxylgruppen können mit der Methyl- bzw. Ethylgruppe eines Silans reagieren. Das andere Ende des Silans besitzt reaktive Reste (z.B. Epoxid- oder Aminogruppen), die wiederum mit Biomolekülen reagieren können [22]. Das gewünschte Biomolekül kann jetzt direkt an das Silan kovalent angebunden werden. Allerdings bilden Silane relativ unstrukturierte Oberflächen [43]. Die direkt angebotenen Biomoleküle sind ungerichtet auf der Oberfläche angeordnet. Dies hat den Nachteil, dass die Bindungsstellen für den Analyten nicht immer zugänglich sind und somit der Analyt auch nicht wechselwirken und detektiert werden kann. Hinzu kommt, dass die unspezifische Proteinresistenz durch eine Silanschicht nicht vollständig gewährleistet ist. Um dies zu sicherzustellen ist die kovalente Anbindung von funktionalisierten hydrophilen Polymeren notwendig. Im AK Gauglitz wurden mehrere Biopolymere auf diese Problemstellung hin getestet und charakterisiert. Dabei kristallisierten sich besonders zwei Biopolymere heraus, das Aminodextran (AMD) und das Diamino-Poly(ethylenglykol) (DA-PEG). Beide besitzen genügend funktionelle Gruppen für weitere Modifizierungen und schirmen die Oberfläche gut gegen unspezifische Proteinadsorption ab [23-25].

3.5.1 Dextran

Dextran ist ein hydrophiles, hochverzweigtes Polysaccharid. Die Glukoseuntereinheiten sind über 1,6-Verknüpfungen miteinander verbunden (siehe Abbildung 10).

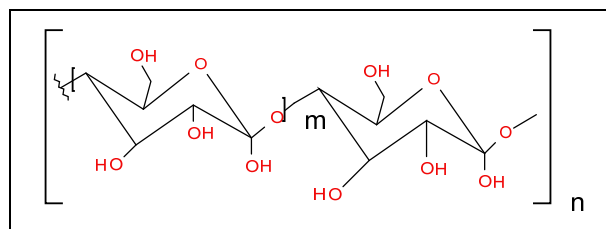


Abbildung 10: Strukturformel von Dextran

Das Hydrogel ist wasserlöslich, wobei die Löslichkeit von der molekularen Masse abhängt. Es bildet sich eine viskose Lösung. Auf Grund der hohen Anzahl an Hydroxylgruppen ist eine chemische Modifizierung einfach und ohne großen Verlust an der Hydrophilizität möglich. An die Oberfläche gebunden, bildet es selbst-organisierende Monolagen (engl. self-assembled monolayers - SAMs). In wässriger Lösung kann immobilisiertes Dextran eine Schichtdicke von bis zu 190 nm erreichen [44]. Die Proteinresistenz der Oberfläche ist dabei abhängig vom Molekulargewicht und Dichte der Dextranschicht [45]. Generell jedoch kann man sagen, dass die unspezifische Proteinanbindung an eine Oberfläche durch eine Dextranschicht deutlich reduziert wird. Dies verstärkt sich noch, mit zunehmender Schichtdicke und

Dichte. Die spezifische Wechselwirkung mit einer modifizierten Dextranschicht nimmt ebenfalls mit steigender Schichtdicke und Dichte zu [25]. Ellipsometrische Messungen haben ergeben, dass eine Aminodextranschicht mit einem Aminogruppenanteil von 40% an Luft eine Dichte von $5,3 \pm 0,4 \text{ ng/mm}^2$ und einen Brechungsindex von $1,52 \pm 0,02$ hat. Die Messungen in PBS-Puffer ergeben eine Schichtdicke von $28 \pm 8 \text{ nm}$ und einen Brechungsindex von $1,351 \pm 0,002$ [25;27]. Dabei wird die Anzahl an Bindungen zur Oberfläche durch die Konzentration an funktionellen Gruppen entlang des Polymers und der Anzahl an funktionellen Gruppen auf der Oberfläche beeinflusst. Das Molekulargewicht und die Konzentration der Polymerlösung beeinflusst die Oberflächenbeladung und Dichte der Dextranschicht.

3.5.2 Poly(ethylenglykol) (PEG)

Poly(ethylenglykol) (PEG) ist ein lineares, neutrales Polyether (siehe Abbildung 11). Es ist löslich in Wasser und in den meisten organischen Lösungsmitteln (Toluol, Methylenchlorid, Ethanol, Aceton). Es ist unlöslich in Ethylether und Hexan. Der C-O-C-Winkel der Oxyethylengruppe beträgt 110° . Dieser Winkel ist nahe dem vom Wasser (H-O-H-winkel: 104°). Diese Strukturähnlichkeit und die starken Wasserstoffbrückenbindungen zum Ethersauerstoff erklärt die gute Wasserlöslichkeit.

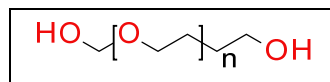


Abbildung 11: Molekularstruktur von Poly(ethylenglykol)

Der Begriff Poly(ethylenglykol) wird für Polyether mit einem Molekulargewicht kleiner als 20 kDa verwendet. Polyether mit höherem Molekulargewicht werden als Poly(ethylenoxid) PEO bezeichnet. PEG ist ungiftig und denaturiert keine aktiven Proteine oder Zellen. In biologischen Systemen induziert PEG die Zellfusion. Diese Eigenschaft wird für die Produktion von Hybridomen bzw. monoklonale Antikörpern genutzt (siehe Kapitel 3.4.1). Bei einem Molekulargewicht von unter 1000 Dalton ist PEG eine viskose, farblose Flüssigkeit. Bei höherem Molekulargewicht ist es ein wachsartiger, weißer Feststoff. Der Schmelzpunkt ist proportional zum Molekulargewicht und erreicht ein Plateau bei 67°C . PEG besitzt in Wasser einen Kristallisationspunkt (Cloud Point) bei ca. 100°C , d.h. bei höherer Temperatur kommt es zur Zwei-Phasenbildung. Der Cloud Point ist abhängig von der molekularen Masse, Konzentration und dem pH-Wert der Lösung [46].

Es kann chemisch modifiziert und an andere Moleküle oder Oberflächen angebunden werden. Angebunden an ein Molekül beeinflusst es dessen Chemie kaum, erhöht aber dessen Löslichkeit und Größe. Bezogen auf einen silanisierten Glastransducer beträgt die Oberflächenbelegung von einer 2 millimolaren DA-PEG-2000-Lösung $3,4 \text{ ng/mm}^2$ und von Dicarboxy-PEG-2000 $2,2 \text{ ng/mm}^2$ [23]. Gebundenes PEG (an Molekülen oder Oberflächen) besitzt die Eigenschaft andere große Moleküle abzustößeln. Die Ursache der Proteinabschirmung von PEG-Oberflächen ist noch nicht ganz geklärt. Ein wichtiger Punkt jedoch ist die starke Hydratisierung von PEG (2-3 Wassermoleküle pro PEG-Einheit) in wässriger Lösung.

Wenn ein Protein versucht mit der Oberfläche in Wechselwirkung zu treten, werden die PEG-Moleküle gegen die Oberfläche gedrückt. Es kommt zu einer ungünstigen, negativen Entropieänderung, verursacht durch die verringerte Bewegungsfreiheit der hydratisierten PEG-Ketten. Dieser entropische Effekt kann ausgeglichen werden, indem die eingelagerten Wassermoleküle entweichen, was jedoch

ebenso energetisch ungünstig ist (Enthalpieänderung). Die Effektivität der Proteinabschirmung steigt mit zunehmendem Molekulargewicht und Oberflächenbeladung und sinkt mit steigender Temperatur[46].

3.5.3 Zusammenfassung

In Abbildung 12 sind schematisch die Unterschiede der beiden Biopolymere dargestellt.

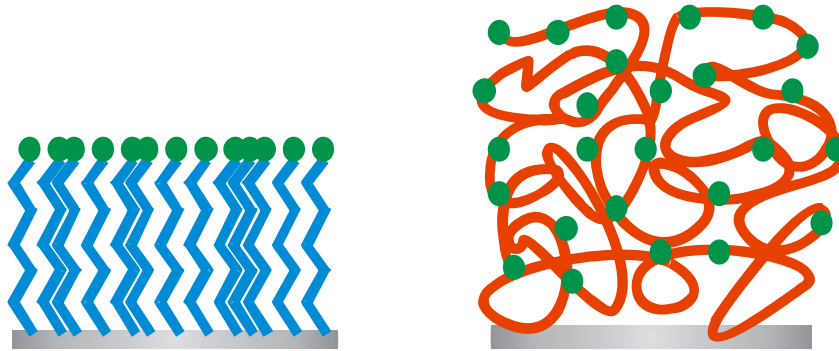


Abbildung 12: schematische Darstellung der Oberflächenstruktur von PEG (links) und AMD (rechts) mit funktionellen Gruppen (grüner Punkte)

Allgemein kann man sagen, dass PEG kovalent immobilisiert auf einem Glassubstrat einen Polymer-Rasen bildet, wohingegen das AMD hydrogelartige, dreidimensionale Strukturen bildet. Ein weiterer Unterschied ist die verschieden große Anzahl an funktionellen Gruppen. AMD bildet eine größere, voluminösere Oberfläche und kann dadurch mehr funktionelle Gruppen präsentieren als PEG. Was die Proteinabschirmung betrifft, sind beide Biopolymere geeignet [23;25;27].

3.6 Biomolekulare Wechselwirkung

Unter biomolekularer Wechselwirkung versteht man die Wechselwirkung zwischen Makromolekülen, wie Proteinen, Nucleinsäuren, Peptiden und eher niedermolekulare Liganden. Die relativ hohe Selektivität und Reversibilität solch einer Wechselwirkung liegt zum Teil an der nicht-kovalenten Bindung. Die attraktiven Kräfte zwischen Makromolekül und Ligand setzen sich aus Van-der-Waals- und elektrostatische Kräfte, sowie Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen zusammen. Alle Attraktionskräfte zeigen eine starke Abhängigkeit vom Abstand der wechselwirkenden Zentren. Daher findet eine effektive Wechselwirkung nur über einen Abstand von maximal 0,1 bis 0,3 nm statt. In Tabelle 1 sind die für die biomolekulare Wechselwirkung relevanten attraktiven Kräfte zusammengefasst.

Attraktive Kräfte	Energie [kJ/mol]	Abstandsabhängigkeit
Van-der Waals-Kräfte	0,4 – 4,0	d^{-6}
Ionische Wechselwirkungen	20	d^{-2}
Wasserstoffbrückenbindungen	12-30	d^{-6}
Hydrophobe Wechselwirkungen	< 40	-

Tabelle 1: Übersicht über die attraktiven Kräfte, ihre Energien und Abstandsabhängigkeiten

Die stark exergonische Rezeptor-Ligand-Bindung resultiert aus diesen kumulativen Kräften. Die freien Standardbildungsenthalpien von biologischen Affinitätsreaktionen liegen zwischen 20 und 80 kJ/mol. Die Gleichgewichtskonstanten, auch Affinitätskonstanten genannt, liegen damit im Bereich von 10^3 bis 10^{15} L/mol.

Zur Bestimmung der Affinität geht man von folgender Gleichgewichtsreaktion zwischen Makromolekül, hier Rezeptor genannt und Ligand aus:



Die Konzentration von Rezeptor [R], Ligand [L] und Rezeptor-Ligand-Komplex [RL] sind über das Massenwirkungsgesetz mit der Gleichgewichtskonstante K verknüpft:

$$K = \frac{[RL]}{[R] \cdot [L]} \quad \text{Formel 24}$$

Die Gleichgewichtskonstante K, auch Affinitätskonstante genannt, gibt Aufschluss über thermodynamische Eigenschaften der Wechselwirkung. Über die Reaktionsgeschwindigkeit lassen sich Rückschlüsse auf den Mechanismus der Affinitätsreaktion schließen.

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_a \cdot [R] \cdot [L] - k_d \cdot [RL] \quad \text{Formel 25}$$

mit k_a : Assoziationsratenkonstante und k_d : Dissoziationsratenkonstante

Die Affinitätskonstante K hängt wie folgt von der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante zusammen:

$$K = \frac{k_a}{k_d} \quad \text{Formel 26}$$

Für die Charakterisierung von biomolekularen Wechselwirkungen, die sogenannte biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA), gibt es unterschiedliche Herangehensweisen. Es kann die Wechselwirkung in

der heterogenen Phase, d.h. einer der beiden Wechselwirkungspartner ist immobilisiert detektiert werden. Die zweite Möglichkeit ist die Reaktion in homogener Phase, d.h. beide Reaktionspartner sind in der selben Phase gelöst[27;47].

In Tabelle 2 sind die Variablen und ihre Bedeutung zusammengefasst.

Variable	Erklärung
K	Gleichgewichts- bzw. Affinitätskonstante
k_a ; k_d	Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante
k_s	Scheinbare Ratenkonstante
$[R]$	Rezeptorkonzentration
$[L]$	Ligandkonzentration
$[RL]$	Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes
$[R_{\text{Fluss}}]$	Rezeptorkonzentration im Fluss
$[RL_{\text{max}}]$	Maximale Komplexkonzentration an der Oberfläche
$[RL_{\text{GG}}]$	Komplexkonzentration im Gleichgewicht

Tabelle 2: Variablen zur Beschreibung der Oberflächenkinetik

3.6.1 Reaktion in heterogener Phase

Bei der Detektion an Grenzflächen muss berücksichtigt werden, dass einer der Bindungspartner an der Oberfläche immobilisiert ist. Die Bindungskinetik an der Oberfläche setzt sich aus zwei Schritten zusammen. Der erste Schritt ist die Diffusion zur Oberfläche hin. Danach folgt die Wechselwirkung an der Oberfläche. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieser Folgereaktion wird detektiert.

In Abbildung 13 ist dies für die Anbindung eines Rezeptors R an einen immobilisierten Liganden L im Durchfluss, dargestellt.

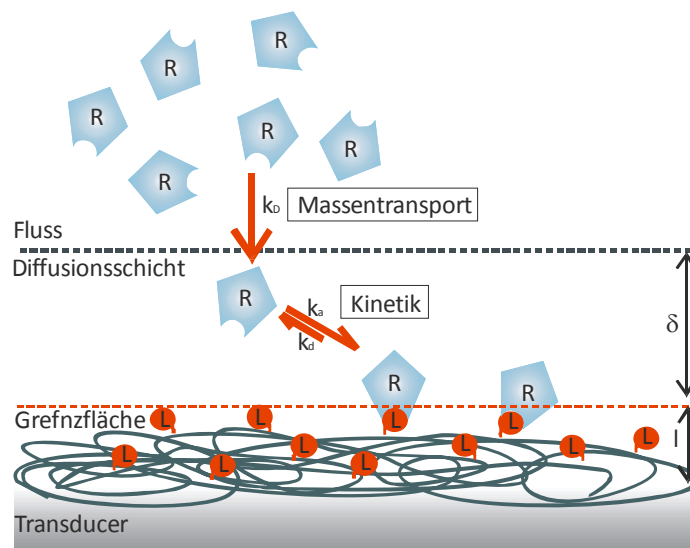


Abbildung 13: schematische Darstellung der Abläufe in der heterogenen Phase. Massentransport- bzw. kinetisch limitierte Komplexbildung an der Oberfläche

Der gelöste Rezeptor bindet unter einer charakteristischen Bindungskinetik an den Liganden. Dadurch tritt direkt an der Oberfläche eine Verarmung des Rezeptors auf, der durch Diffusion nachgeliefert wird. Bei hoher Rezeptorkonzentration und geringer Ligandenbeladung der Transduceroberfläche ist die Reaktion des freien Rezeptors mit dem Liganden der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Man spricht

von einer kinetisch kontrollierten Reaktion. Somit kann vereinfacht angenommen werden, dass die Rezeptorkonzentration im Fluss genauso groß ist, wie in der Diffusionsschicht. Die Bildung des Komplexes an der Oberfläche lässt sich mit folgender Geschwindigkeitsgleichung beschreiben:

$$\frac{d[\text{RL}]}{dt} = k_a [\text{R}_{\text{Fluss}}][\text{L}] - k_d [\text{RL}] = k_a [\text{R}_{\text{Fluss}}]([\text{RL}_{\text{max}}] - [\text{RL}]) - k_d [\text{RL}] \quad \text{Formel 27}$$

Da im Fluss gemessen wird, kann die Konzentration des Rezeptors im Fluss als konstant angenommen werden. Man erhält eine Kinetik pseudo-erster Ordnung. Durch Umformen und Integration der obigen Gleichung kommt man zu folgendem Ausdruck, der den zeitlichen Verlauf der Komplexbildung beschreibt:

$$[\text{RL}](t) = [\text{RL}_{\text{GG}}](1 - e^{-k_s t}) \quad \text{Formel 28}$$

mit einer Gleichgewichtsbeladung,

$$[\text{RL}_{\text{GG}}] = [\text{RL}_{\text{max}}] \frac{K [\text{R}_{\text{Fluss}}]}{1 + K [\text{R}_{\text{Fluss}}]} \quad \text{Formel 29}$$

welche die Komplexkonzentration im Gleichgewicht zwischen Lösung und Oberfläche beschreibt und der scheinbaren Ratenkonstanten,

$$k_s = k_a [\text{R}_{\text{Fluss}}] + k_d \quad \text{Formel 30}$$

welche die Steigung der Exponentialfunktion wiedergibt.

Die Gleichgewichtsbeladung sowie die Ratenkonstanten sind von der Rezeptorkonzentration im Fluss abhängig. Durch Messung verschiedener Rezeptorkonzentrationen, lassen sich Aussagen über die Stabilität und Bildungsgeschwindigkeit des Komplexes treffen [27;48]. Durch Erhöhung der Rezeptorkonzentration steigt auch die Bindungskurve bis eine Maximalbeladung erreicht wird. Danach ändert sich nur noch die Krümmung der Kurve, nicht aber die Höhe.

4 Materialien und Methoden

Im Folgenden werden die verwendeten Materialien und Geräte aufgelistet, sowie die unterschiedlichen Messmethoden erläutert. Desweiteren werden die verschiedenen Oberflächenfunktionalisierungsstrategien der Glastransducer beschrieben.

4.1 Material und Geräte

Sofern im Folgenden nicht anders angegeben wurden Standard(bio)chemikalien von der Fa. Fluka, Neu-Ulm, der Fa. Merck, Darmstadt, oder der Fa. SigmaAldrich, Deisenhofen bezogen.

Standardchemikalien	
GOPTS	3-Glycidylxypropyl-trimethoxysilan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
TBTU	2-(1H-Benotriazol-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluoniumtetrafluoroborat
DIPEA	N,N'-Diisopropylethylamin
OVA	Ovalbumin (Hühnereialbumin)
DCC	1,3-Dicyclohexylcarbodiimid
H₂SO₄	Schwefelsäure, 96%
H₂O₂	Wasserstoffperoxid, 30 %
Aceton	Aceton, getrocknet, max. 0,01 % Wasser
DCM	Dichlormethan
DMF	Dimethylformamid
Biotin	T-RSA-Biotin Konjugate und Polystreptavidin von Boehringer-Ingelheim, Mannheim, Deutschland
SA	Streptavidin
Testosteronoxim	Testosteron 3-(O-carboxymethyl)oxim
α-Testosteron	IgG, Acris Antibody GmbH, Hiddenhausen, Deutschland

Tabelle 3: Standardchemikalien und ihre verwendeten Abkürzungen

Lösungen	
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. Phosphate buffered saline): 8,76 g (150 mmol) NaCl, 1,36 g (50 mmol) KH ₂ PO ₄ in 1 L bidestilliertem Wasser, mit KOH auf pH = 7,4 titriert
SDS	Regenerationslösung bestehend aus 0,25 %iger Natriumlaurylsulfatlösung (engl. Sodium dodecyl sulfate), mit HCl auf pH = 2,5 titriert
Piranha	60 Vol % rauchende Schwefelsäure 40 Vol % Wasserstoffperoxidlösung werden gemischt und direkt weiter verwendet

Tabelle 4: Verwendete Puffer- und Regenerationslösungen

Biopolymere

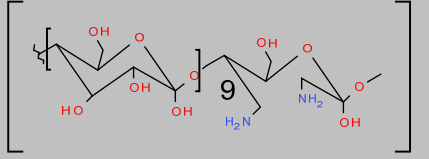
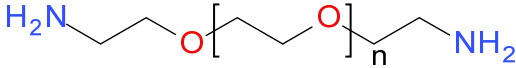
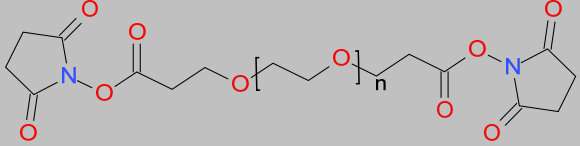
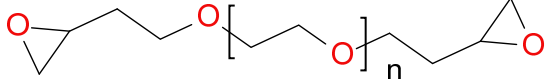
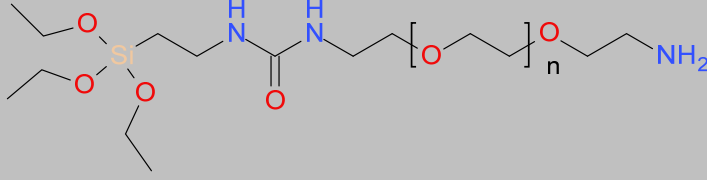
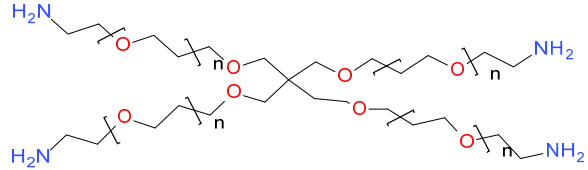
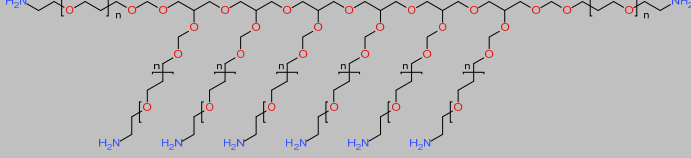
	<p>AMD Aminodextran (50%) MW: 100 kD (AMD), Innovent e.V., Technologieentwicklung Jena</p>
	<p>DA-PEG 2000 Diamino-Poly(ethylenglykol) MW: 2000 D, Fa. Rapp Polymere (Tübingen,D)</p>
	<p>Di-NHS-PEG Di-N-Hydroxysuccinimid- Poly(ethylenglykol) MW: 3400 D, Fa. Nanocs (New York, USA)</p>
	<p>Di-Epoxyd-PEG Di-Epoxyd-Poly(ethylenglykol), MW: 3400 D, Fa. Nanocs (New York, USA)</p>
	<p>Silan-Amino-PEG Silan-Amin-Poly(ethylenglykol), MW: 3400, Fa. Nanocs (New York, USA)</p>
	<p>4-arm-PEG, 4-arm-Amin-Poly(ethylenglykol), MW: 10000 D, Fa.: NOF-Europe Sunbright</p>
	<p>8-arm-PEG 8arm-Amin-Poly(ethylenglykol), MW:10000 D, Fa. Nanocs (New York, USA)</p>

Tabelle 5: Verwendete PEG-Derivate und Aminodextran

Material	
RfS-Transducer	Interferenzglas D263 beschichtet mit 10 nm Ta ₂ O ₅ und 330 nm SiO ₂ , Fa. Schott (Mainz, D)
AFM-Cantilver	Für AFM-Messungen an Luft wurden SuperSharpSilicon Cantilever des Typs SSS-NCH aus Siliziumnitrid verwendet, Fa. NanoandMore GmbH, Spilburg Für AFM-Messungen in Flüssigkeit wurden NP-S20/Sharpened Cantilever verwendet aus Silizium, Fa. Veeco Instruments Inc. Santa Barbara, USA.

Tabelle 6: Verwendete Materialien für RfS- und AFM-Messungen

Geräte	
RfS-Aufbau	Microlab 540B Zweispritzen-Dispensor, sowie ein Microlab MVP von der Fa. Hamilton Messtechnik GmbH, gekoppelt mit einem Autosampler, Fa. Ismatec (Wertheim-Mondfeld) Küvettenpektrometer SPEKOL 1100, Fa. Analytik Jena, Deutschland, modifiziert mit einem Polymerlichtleiter (PMMA), 1mm Durchmesser mit 1 auf 2 Faserkoppler, Fa KSV Instruments, Ltd. Helsinki, Finnland und einer 5V/10 W Halogenlampe mit integriertem Reflektor, Fa Oshino Lamps, Nürnberg, Deutschland
Kontaktwinkel	Kontakwinkelmessgerät Cam200, Fa. KSV Instruments, Ltd. Helsinki, Finnland SPM-Gerät, Fa Veeco Instrument Inc, Seriennummer: NS3a-1612 MMAFM-2/794, Santa Barbara, USA
AFM-Aufbau	AS-130V Scanner (JV Scanner) der Fa. Veeco Instruments Inc., Santa Barbara, USA Flusszelle Typ MTFML für Tapping Mode in Flüssigkeit, Fa. Veeco Instruments Inc., Santa Barbara, USA

Tabelle 7: Verwendete Geräte und ihre einzelnen Bauteile

4.2 Methoden

4.2.1 Oberflächenmodifizierung

Das folgende Kapitel beinhaltet, die Präparation und Modifizierung der sensitiven Schicht eines optischen Biosensors für den Einsatz in der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie. Das Ziel der Präparation ist die kovalente Immobilisierung der Erkennungsstruktur und die Abschirmung vor unspezifischer Wechselwirkung. Zum besseren Verständnis sind die einzelnen Präparationsschritte in Abbildung 14 zusammengefasst.

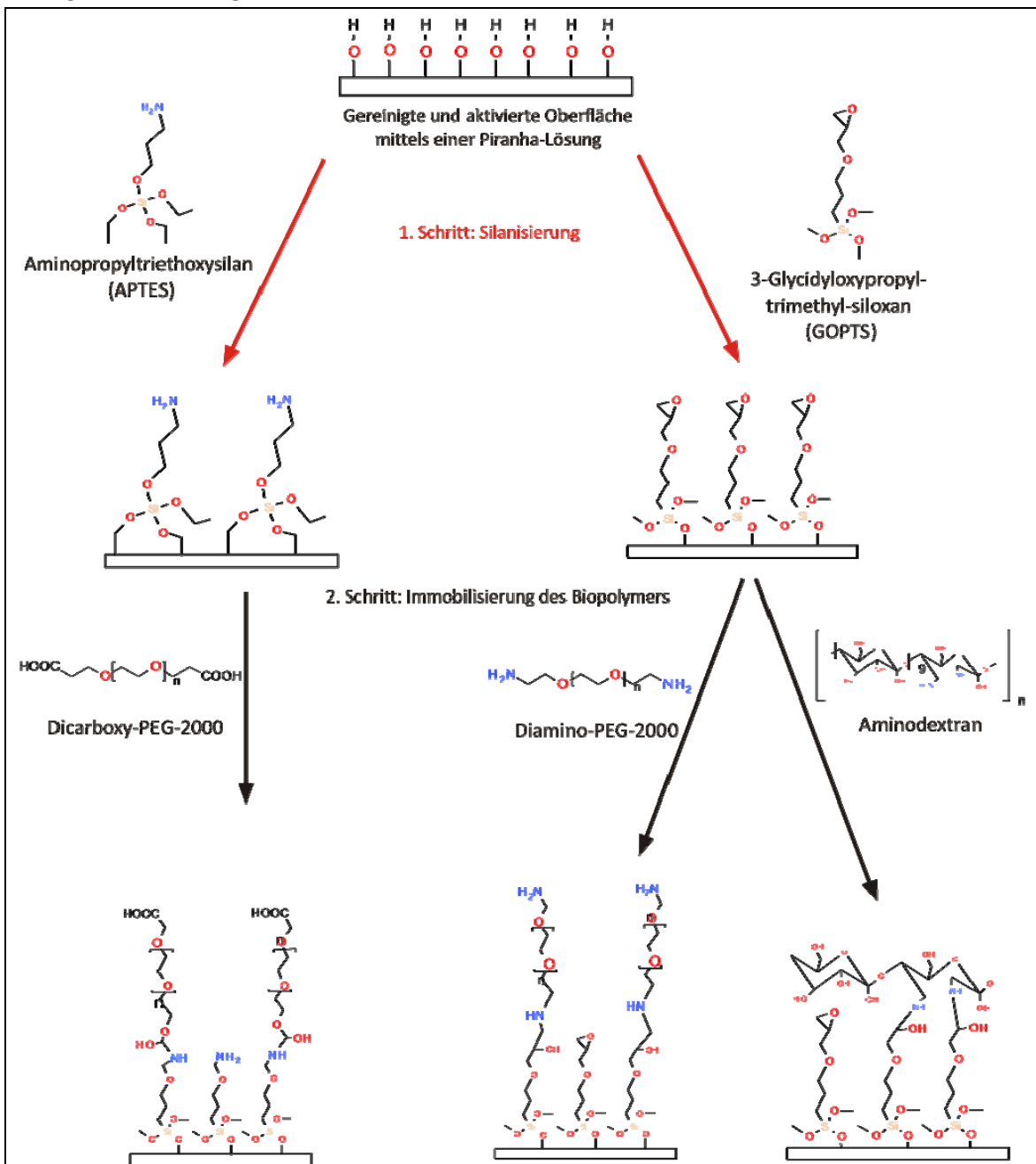


Abbildung 14: Schematischer Ablauf der Oberflächenmodifizierung der Transducer. Es beginnt mit der Aktivierung der SiO_2 -Oberfläche, gefolgt vom Silanisierungsschritt. Der weitere Schritt beinhaltet die Immobilisierung des Biopolymers.

Bevor man kovalent auf einer Glassubstratoberfläche Moleküle anbinden kann muss diese SiO_2 -Oberfläche gereinigt und aktiviert werden. Das Ziel dieser Aktivierung ist die Bildung von Hydroxylgruppen auf der Oberfläche, siehe Kapitel 4.2.1.1. An diese Hydroxylgruppen wird ein Silan gebunden. Dieses Silan kann verschiedene funktionelle Endgruppen besitzen. In dieser Arbeit ist ein Epoxid-Silan und ein Aminosilan verwendet worden. Die genaue Beschreibung der Silanisierung ist in Kapitel 4.2.1.2 beschrieben. Anschließend wird das Biopolymer kovalent angebunden. Handelt es sich um ein aminofunktionalisiertes Polymer wird zuvor eine Epoxid-Silan-Schicht präpariert. Bei einem carboxylfunktionalisiertem Polymer wird das Aminosilan verwendet [49]. Je nach gewünschter Ligandbeladungsdichte der Sensoroberfläche kann man zwischen AMD und DA-PEG-2000 wählen. Die Anbindung der beiden Biopolymere werden in Kapitel 4.2.1.3 und Kapitel 4.2.1.4 beschrieben. Anschließend kommt es zur kovalenten Immobilisierung des Liganden. Hierbei gibt es verschiedene Präparationswege. Je nach dem was für eine funktionelle Gruppe der Ligand besitzt muss gegebenenfalls das Biopolymer umfunktionalisiert werden. Die verschiedenen Möglichkeiten sind in den Kapiteln 4.2.1.5 bis 4.2.1.8 beschrieben [22;27].

4.2.1.1 Aktivierung von Interferenzglas

Zur Reinigung werden die Glastransducer für eine Minute in eine 6 M KOH-Lösung gelegt und anschließend mit bidestilliertem Wasser abgespült. Zur Aktivierung der SiO_2 -Oberfläche werden die Glastransducer in eine Piranha genannte Lösung (60 % Vol. konzentrierte Schwefelsäure und 40 Vol % Wasserstoffperoxidlösung (30%ig) gelegt und 15 Minuten ins Ultraschallbad gegeben. Danach werden die Transducer mit bidestilliertem Wasser gespült und sofort weiter verarbeitet.

4.2.1.2 Silanisierung

Auf die gereinigte und aktivierte Oberfläche gibt man einen Tropfen (ca. 15 μL) 3-Glycidylpropyltrimethylsiloxan (GOPTS) und legt einen zweiten Transducer darauf, man spricht auch von „sandwichen“. Die so behandelten Transducer werden für eine Stunde in eine Glaskammer gelegt. Die GOPTS-Moleküle binden kovalent über die Methoxy-Gruppe an die Transduceroberfläche (siehe Abbildung 15). Die Transducer werden mit Aceton abgespült und mit Stickstoff trocken geblasen. Danach sollte der Transducer zügig weiter verarbeitet werden, um eine Hydrolyse der Epoxidgruppen zu verhindern.

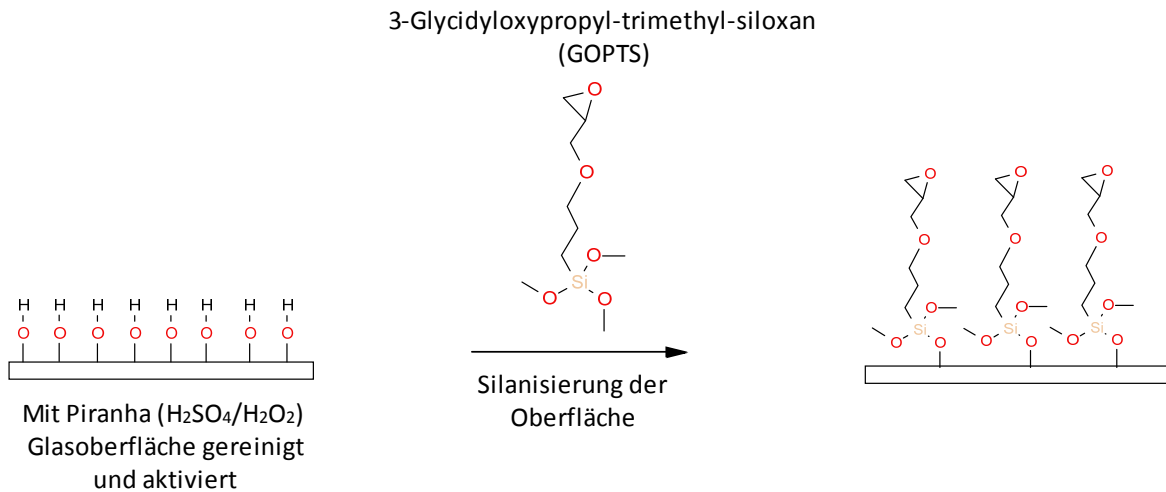


Abbildung 15: Aktivierung und Silanisierung der Oberfläche mit GOPTS

Wenn Epoxidendgruppen für die weitere Verarbeitung ungünstig sind, kann auch Aminosilan verwendet werden. In dieser Arbeit wurde das Aminopropyltriethoxysilan (APTES) verwendet (siehe Abbildung 16) [49]. Auf die gereinigte und aktivierte Glasoberfläche wird ein Tropfen (ca. 15 μL) einer Lösung aus 5% APTES, 5% Wasser und 90% Ethanol gegeben und mit einem zweiten Transducer gedeckelt. Nach einer Stunde Lagerung in einer mit Ethanol Dampf gesättigten Kammer werden die Transducer mit Ethanol abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Danach ruhen die Chips 5 Minuten bei 110 $^\circ\text{C}$. Die mit Aminosilan präparierten Plättchen sind dann mehrere Tage haltbar.

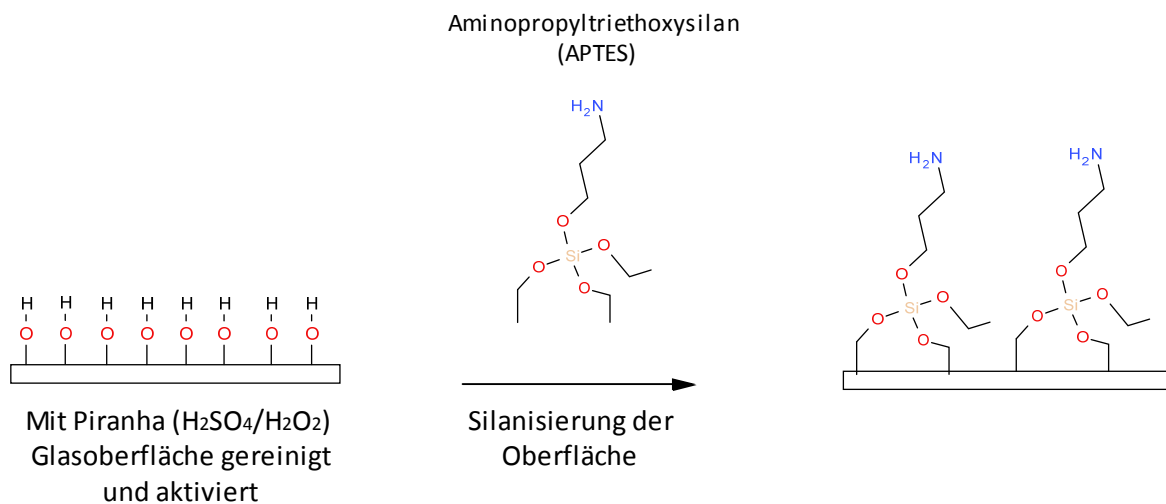


Abbildung 16: Aktivierung und Silanisierung der Oberfläche mit APTES

An das Silan-Derivat wird nun ein Biopolymer kovalent angebunden. Beim Epoxid-Silan muss das Biopolymer entweder aminofunktionalisiert oder carboxylfunktionalisiert sein. Die gängig verwendeten Biopolymere besitzen Aminogruppen, wie z. B. Aminodextran (AMD) und Diamino-Poly(ethylen glykol) (DA-PEG).

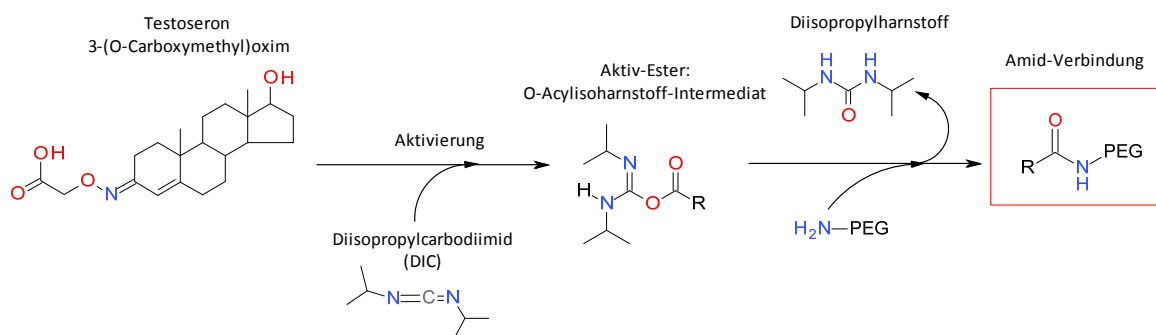
4.2.1.3 Aminodextran (AMD)

Welches Biopolymer verwendet wird hängt stark davon ab, welche Oberflächenbedingungen gewünscht sind. Auch die Größe des Liganden sowie der zu detektierende Analyt spielen eine Rolle. Im Folgenden werden einige Möglichkeiten der Umfunktionalisierung von Endgruppen und der Ankupplung von Liganden beschrieben.

4.2.1.5 Kupplung eines Liganden mit Carboxylgruppe (z.B. Testosteron 3-(O-carboxymethyl)oxim (Testosteronoxim))

4.2.1.6

Man gibt pro Transducerpaar einen Tropfen (ca. 10-15 μL) einer Lösung aus Testosteron 3-(O-carboxymehtyl)oxim (1 mg), Diisopropylcarbodiimid (DIC) (1,5 μL) und DMF (10 μL) auf den Transducer (siehe Abbildung 19). Das Transducerpaar wird 6 Stunden in einer mit DMF-Dampf gesättigten Kammer gelagert. Danach wird es mit DMF und bidestilliertem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.



Ab

Abbildung 19: Amidbindung von Testosteron-3-(carboxymethyl)oxim mittels Diisopropylcarbodiimid (DIC) an Amino-PEG

Da das Testosteron an sich nicht kovalent an die Oberfläche gebunden werden kann ohne dass es seine Funktionalität verliert, wird das obig beschriebene Testosteron-Derivat verwendet.

4.2.1.7 Umfunktionalisierung einer Aminogruppe des Polymers zur Carboxylgruppe

Hierzu wird eine Lösung aus Glutarsäureanhydrid (GA) und trockenem DMF auf den Transducer gegeben und mit einem weiteren Transducer gedeckelt. Das Transducerpärchen wird 6 Stunden in eine mit DMF-Dampf gesättigte Kammer gestellt und anschließend mit DMF und bidestillierten Wasser gespült (siehe Abbildung 20). Danach wird der Transducer im Stickstoffstrom getrocknet.

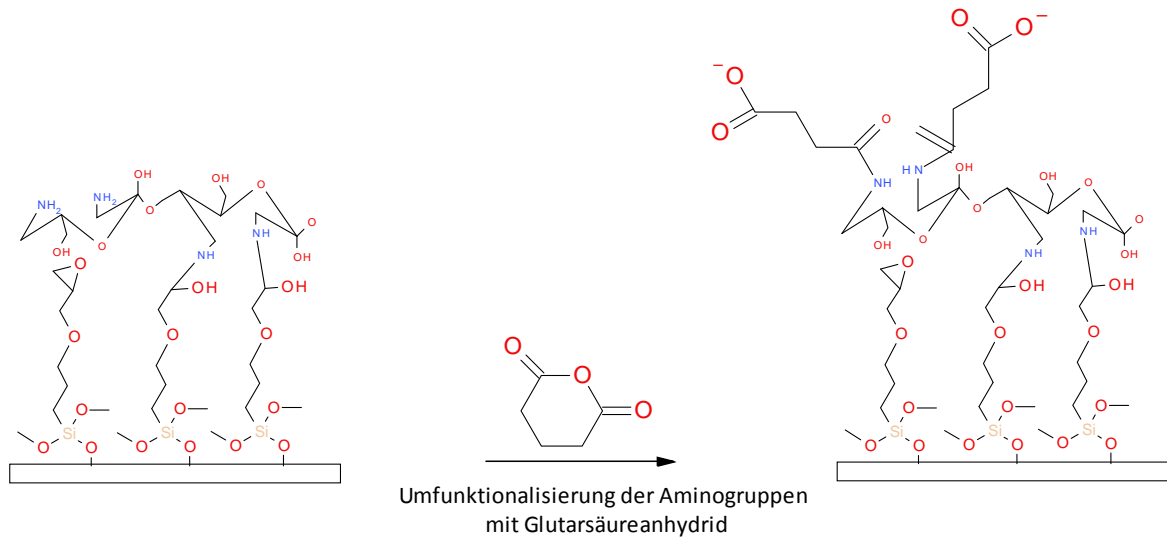


Abbildung 20: Umfunktionalisierung mit Glutarsäureanhydrid (GA) am Beispiel AMD

4.2.1.8 Aktivierung von Carboxylgruppen

Zur Immobilisierung von aminofunktionalisierten Liganden werden die carboxylfunktionalisierten Oberflächen über Erzeugung von Aktiv-Ester-Gruppen aktiviert (siehe Abbildung 21). Hierzu gibt man eine Aktivierlösung aus NHS, Diisopropylcarbodiimid (DIC) und DMF auf den Transducer (7,5 mg NHS in 50 μL DMF und 2,4 μL DIC). Die Inkubationszeit in der mit DMF-Dampf gesättigten Kammer beträgt 4 Stunden. Danach wird der Transducer mit DMF und gegebenenfalls mit trockenem Aceton gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Da die Aktiv-Ester-Gruppen hydrolyseempfindlich sind empfiehlt sich ein zügiges Weiterverarbeiten der Transducer.

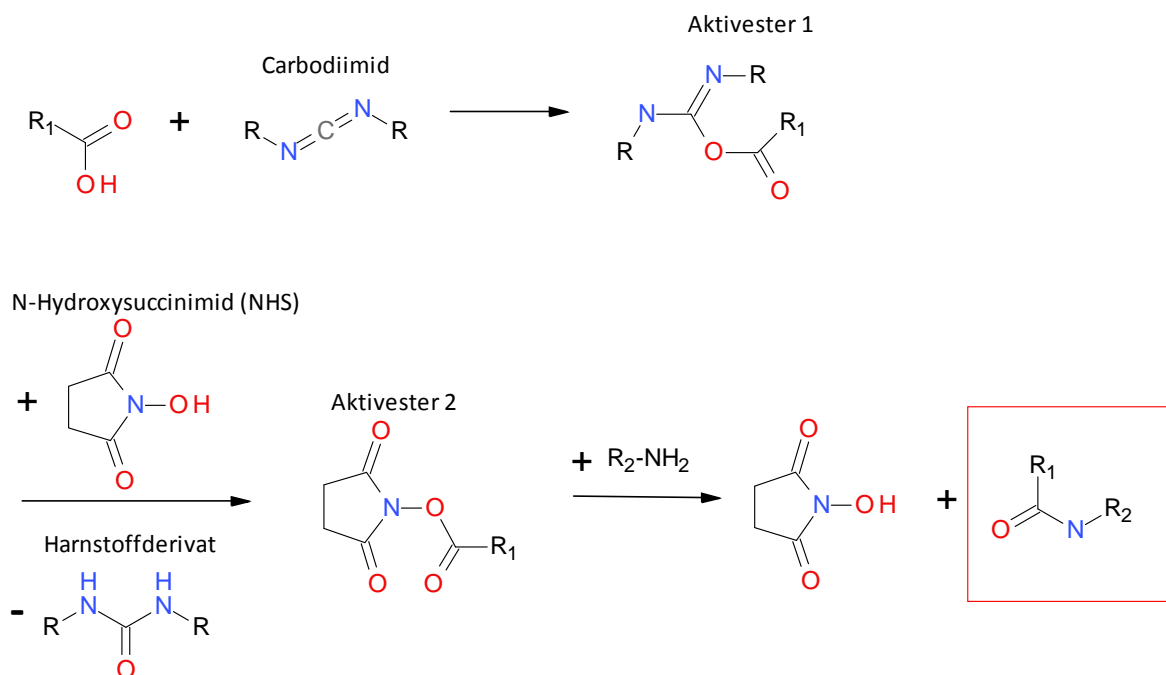


Abbildung 21: Aktivierung einer Carboxylgruppe mit NHS/DIC über Bildung eines Aktivesters mit anschließender Amidbildung

4.2.2 Aufbau und Auswertungsmethode der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie

Das Licht einer Halogenlampe wird über eine Faseroptik senkrecht auf den Transducer geführt. Das reflektierte Licht wird in derselben Faserleitung gesammelt und gelangt über einen Y-Koppler ins Diodenzeilenspektrometer. Der Aufbau ist schematisch in Abbildung 22 zu sehen.

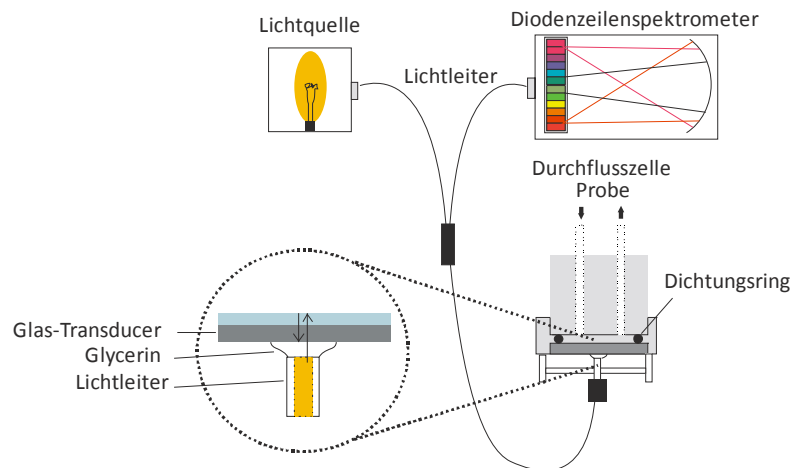


Abbildung 22: Aufbau der optischen Komponenten einer RIFS-Anlage. Der Y-Lichtleiter führt vom Transducer zur Lichtquelle und zum Diodenzeilenspektrometer

Um einen Brechungsindexsprung und störende Reflektivitäten zu verhindern, die zwischen den Phasengrenzen Lichtleiter, Luft und Transducer auftreten können, gibt man einen Tropfen Glycerin zwischen Lichtleiter und Glas-Transducer [15;27].

Zur kinetischen Charakterisierung der detektierten Wechselwirkung ist es notwendig im Fluss zu messen. Hierzu wird die Fließinjektionsanalyse (FIA) verwendet. Der Aufbau beinhaltet einen Zweispritz-Dispenser und ein Mehr-Wege-Ventil (siehe Abbildung 23). Je nach gewünschtem Probenvolumen sind die Spritzenvolumina zu wählen. Sie reichen von 10 μL bis 100 μL . Mittels des Mehr-Wege-Ventils ist es möglich unterschiedliche Analyselösungen wie Puffer, Probe oder Regenerationslösung über den Sensor hintereinander pumpen zu können. Der Vorteil dieses Aufbaus besteht in der Möglichkeit mit geringen Probenvolumina zu arbeiten, sowie genaue Fließgeschwindigkeiten einzustellen. Für Mehrfachmessungen ist es möglich eine Autosampler anzuschließen [30].

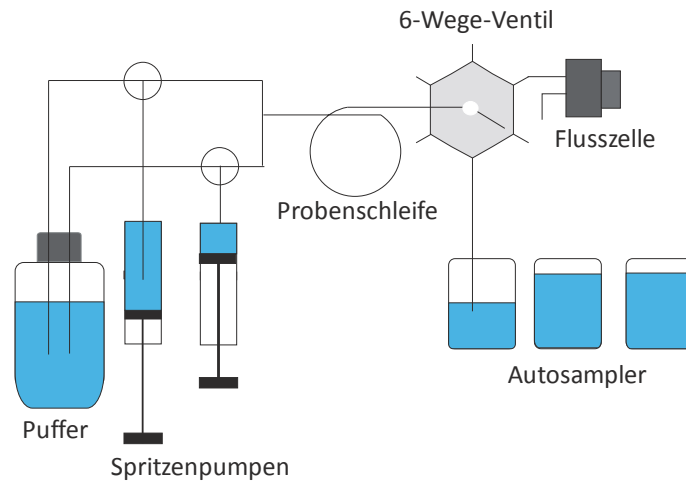


Abbildung 23: systematischer Darstellung des Zweispritz-Dispensorsystems von Hamilton mit Autosampler, Flusszelle und 6-Wege-Ventil

Zur Steuerung der Pumpanlagen und zur Erfassung der Interferenzspektren wurde das Programm MEASURE von G. Kraus verwendet. Die Integrationszeit wurde so variiert, dass 90 % der Sättigung des Detektors erreicht wurde. Zur Beobachtung der Bindungsereignisse genügt es alle 5 Sekunden ein Spektrum aufzunehmen. Um eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses zu erreichen, werden so viele Spektren zu einem Gesamtspektrum, dem Reflexionsspektrum, aufsummiert, wie in 90 % des Zeitintervalls möglich sind [50].

Das Programm IFZ von A. Brecht und G. Kraus wurde zur online Auswertung der Spektren verwendet. Die gemessenen Reflexionsspektren werden mit dem Dunkelsignal, das auf dem Dunkelstrom des Spektrometers beruht, und dem Referenzsignal nach Formel 19 korrigiert und ergeben so die Interferenzspektren. Das IFZ-Programm passt eine Parabel an ein ausgewähltes Extremum des korrigierten Interferenzspektrums an und misst die Verschiebung [35;50;51].

Eine Messung setzt sich aus folgenden Sequenzen zusammen:

Zuerst wird 300 μL PBS-Puffer über die Sensoroberfläche mit einer Geschwindigkeit von 1 $\mu\text{L/s}$ gepumpt. Anschließend wird die Probe mit einer Geschwindigkeit von 0,5 $\mu\text{L/s}$ injiziert. Das Probenvolumen beträgt 190 μL . Danach wird wieder 200 μL PBS-Puffer mit einer Geschwindigkeit von 1 $\mu\text{L/s}$ über den Sensor gegeben. Je nach Wechselwirkungspartner kann die optische Schichtdicke in dieser Zeit abnehmen. Darauf folgt die Regenerationphase. Dafür wird 200 μL einer 0,5 %igen SDS-Lösung mit einem pH-Wert von 2 injiziert. Dabei kommt es zu starken Brechungsindexsprüngen. Anschließend wird die Sensoroberfläche mit PBS-Puffer gespült. Das Messsignal kommt dann wieder auf der Grundlinie bzw. Baseline an. Der daraus resultierende Signalverlauf ist in Abbildung 24 zu sehen.

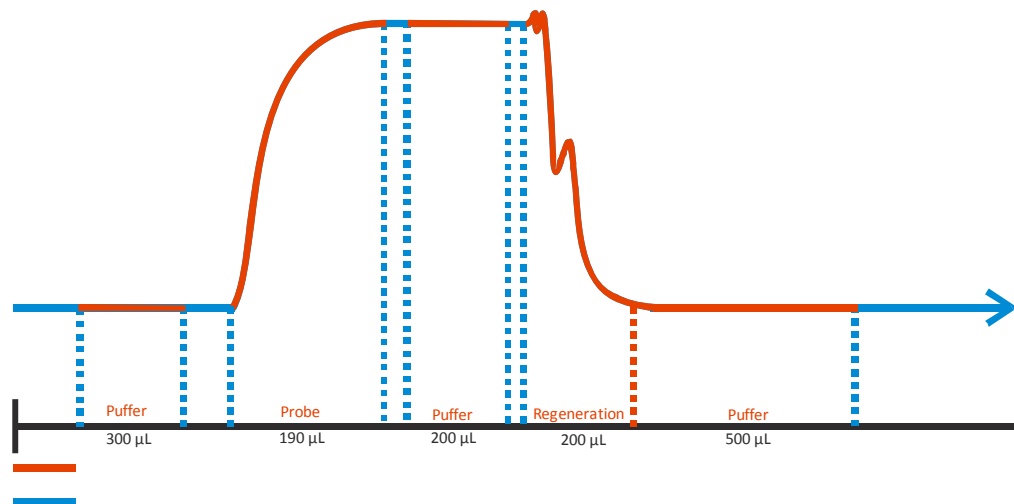


Abbildung 24: schematische Darstellung des Signalverlaufs einer vollständigen Messung

Die rote Linie bedeutet, dass in dieser Zeit über die Sensoroberfläche entweder Probe oder PBS-Puffer oder eine Regenerationslösung gepumpt wird. Während der blauen Phase wird die Probe bzw. die Regenerationslösung in die Probenschleife gezogen. In dieser Zeit fließt kein Fluss über die Sensoroberfläche. Diese Unterbrechungen sind unterschiedlich lang, da mit verschiedenen Pumpgeschwindigkeiten gearbeitet wird. Die zu untersuchende Probe wird langsamer in die Probenschleife aufgezogen, als zum Beispiel die Regenerationslösung.

4.2.3 Bestimmung des Kontaktwinkels am liegenden Tropfen

Zur Bestimmung der Oberflächenpolarität dient die Kontaktwinkelmessung. Hierzu gibt man einen Flüssigkeitstropfen auf die zu charakterisierende Oberfläche. Über die Größe des Kontaktwinkels zwischen Festkörper und der an den Tropfen angelegte Tangente kann man Rückschlüsse über die Polarität ziehen.

Abbildung 25 zeigt den prinzipiellen Geräteaufbau zur Messung des Kontaktwinkels. Mittels einer Spritze wird ein definierter Tropfen auf die Probenoberfläche gegeben. Mit einem beweglichen Tisch kann die Probenlage so eingerichtet werden, dass man ein scharfes, vollständiges Bild des liegenden Tropfens erhält. Anhand des mit der Kamera aufgenommenen Bildes wird der Kontaktwinkel des Tropfens bestimmt.

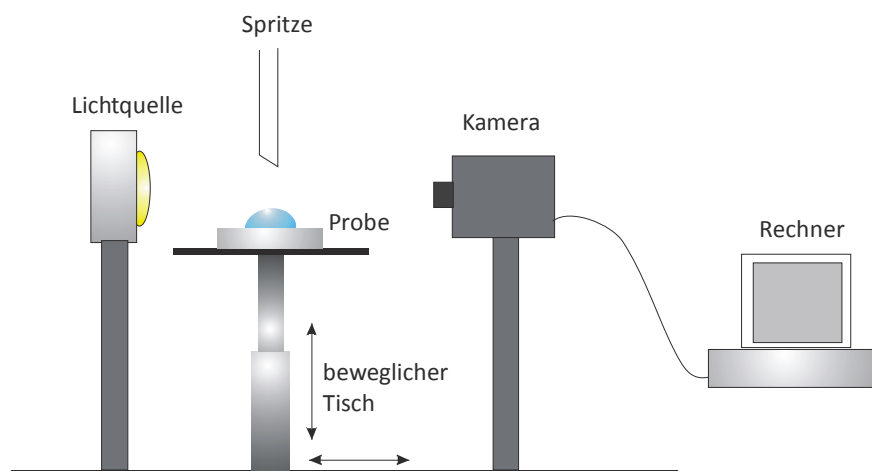


Abbildung 25: Prinzipieller Geräteaufbau zur Messung des Kontaktwinkels

Der Kontaktwinkel θ wird über die Oberflächenspannungsvektoren $\vec{\sigma}_{sg}$, $\vec{\sigma}_{lg}$, $\vec{\sigma}_{sl}$ am Grenzpunkt der drei Phasen fest, flüssig, gasförmig beschrieben (siehe Abbildung 26).

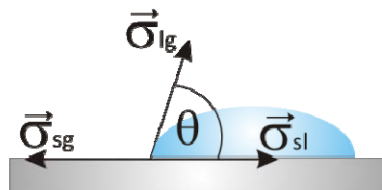


Abbildung 26: Kontaktwinkel eines Tropfens auf einer planen Oberfläche

Es lässt sich über ein Kräfteparallelogramm die Young-Gleichung ableiten:

$$\vec{\sigma}_{sg} = \vec{\sigma}_{sl} + \vec{\sigma}_{lg} \cdot \cos \theta \quad \text{Formel 31}$$

Oder

$$\vec{\sigma}_{sg} - \vec{\sigma}_{sl} = \vec{\sigma}_{lg} \cdot \cos \theta \quad \text{Formel 32}$$

Die Differenz $\vec{\sigma}_{sg} - \vec{\sigma}_{sl}$ nennt man auch Benetzungsspannung σ_B :

$$\sigma_B = \vec{\sigma}_{lg} \cdot \cos \theta \quad \text{Formel 33}$$

Beim sogenannten Young-Laplace-Fitting wird die gesamte Tropfenkontur ausgewertet. Bei dieser Methode wird berücksichtigt, dass die Form des Tropfens durch das Eigengewicht verformt wird. Nach der Anpassung der Young-Laplace-Gleichung wird der Kontaktwinkel als Steigung der Konturlinie im Dreiphasenkontaktpunkt ermittelt [52].

4.2.4 Aufbau des Rasterkraftmikroskops (AFM)

Bei der Rasterkraftmikroskopie wird die Kraft gemessen, die zwischen einer scharfen Spitze und der Probenoberfläche herrscht. Die Spitze ist am Ende einer Blattfeder (Cantilever) lokalisiert. Der Cantilever ist mit einem Substrat verbunden, das in eine Halterung eingesetzt wird. Die Halterung ist über elektrische Goldkontakte mit dem z-Element des Scanners verbunden, welches die Auslenkung der AFM-Spitze in vertikaler Richtung steuert. Der Scanner besteht aus einer Piezokeramik, die für das Rastern in x-y-z-Richtung verantwortlich ist. Die piezoelektrischen Kristalle können sich in Gegenwart eines Spannungsgradienten ausdehnen oder zusammen ziehen. Der Scanner ist so konzipiert, dass die einzelnen voneinander unabhängigen Piezoelektroden für die x,y- Richtung und z-Richtung in einem zylindrischen Piezo vereint sind und die Probe präzise in drei Dimensionen bewegt werden kann. Abbildung 27 zeigt den Aufbau eines Rasterkraftmikroskops. Der Scanbereich des in dieser Arbeit verwendeten Scanners (J-Scanner) beträgt $125 \times 125 \mu\text{m}$ in x,y-Richtung und $5 \mu\text{m}$ in z-Richtung.

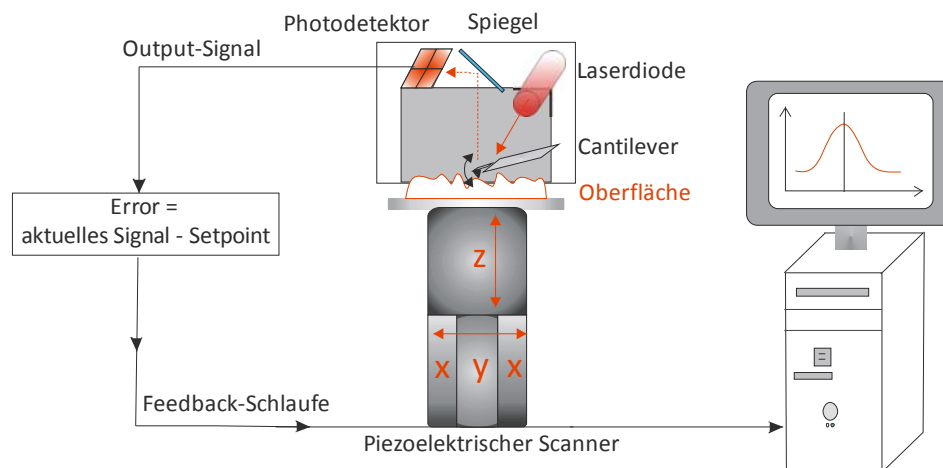


Abbildung 27: Systematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops (AFM)

Die durch die Wechselwirkung zwischen der Spitze und der Oberfläche verursachte Verbiegung des Cantilevers wird durch eine optische Methode detektiert. Ein Laserstrahl wird auf die Rückseite des Cantilevers fokussiert. Der reflektierende Laserstrahl gelangt über einen Ablenkspiegel in einen Photodetektor. Dieser ist in 4 Segmente unterteilt. Im Detektor wird die Lichtintensität in den einzelnen Segmenten verglichen, was für die jeweilige Cantilverbiegung zu einem ganz bestimmten Ausgangssignal führt. Bei einer vierteilten Photodiode kann sowohl die vertikale als auch die horizontale Verbiegung des Cantilevers detektiert werden. Mit dem Ausgang des Photodetektors ist eine Feedbackschleife verbunden, die über die Kontrollelektronik während des Rasterns das z-Piezoelement in der Höhe nachregelt. Durch Auftragung der absoluten z-Position entlang der Rasterrichtung erhält man ein dreidimensionales Bild der Probenoberfläche [38].

4.2.4.1 Messaufbau für Aufnahmen in Flüssigkeit

Verschiedene Materialien verhalten sich in flüssiger Phase anders als an Luft. Biopolymere zum Beispiel wechselwirken mit der Flüssigkeit und quellen. Um eine repräsentative Darstellung der Polymeroberfläche zu erhalten ist es von Vorteil im flüssigen Medium messen zu können. Aufnahmen mittels Rasterkraftmikroskopie in flüssiger Phase können im Kontakt-Modus sowie im Tapping-Modus durchgeführt werden. Für die Vermessung von weichen Proben zieht man den Tapping-Modus jedoch vor. Der Aufbau des Rasterkraftmikroskops muss für Aufnahmen in Flüssigkeit variiert werden. Statt der üblichen Cantilverhalterung verwendet man eine Flusszelle mit integrierten Halterung, sowie Zu- und Ablaufkanälen (siehe Abbildung 28).

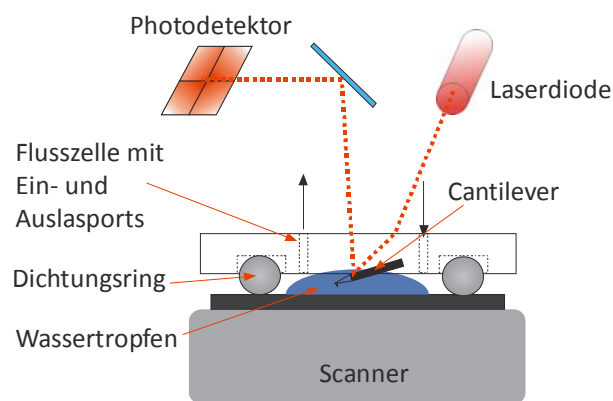


Abbildung 28: schematische Darstellung einer Messung im Tropfen. Die Halterung des Cantilevers ist in der Flusszelle integriert. Der Cantilever befindet sich während der Messung vollständig im Tropfen. Bei der Verwendung eines Dichtungsringes können die Ein- und Auslassports zum Zufügen von Flüssigkeit verwendet werden.

Das Fassungsvermögen der Flusszelle beträgt etwa 100 μL . Die Lücke zwischen Probe und Flusszelle kann mit einem flexiblen Silikonring abgedichtet werden. Dieser Dichtungsring ist aber nicht immer zuverlässig. Um Beschädigungen des Piezoscanners durch eventuelles Eindringen von Flüssigkeit zu vermeiden, wird alternativ in einem Flüssigkeitstropfen von ca. 30 μL gemessen (siehe Abbildung 28). Für den Tapping Modus in Flüssigkeit werden bevorzugt V-förmige Silizium-Nitrid-Cantilever verwendet. Die Einstellung der optimalen Schwingungsfrequenz ist bei Messungen in flüssiger Phase schwieriger als in Luft. Im Gegensatz zum Tapping Modus an Luft erhält man hier mehrere Maxima. Empirische Erfahrungswerte zeigen, dass mit einer relativ niedrigen Frequenz im Bereich von 30 bis 35 kHz die besten Meßergebnisse erzielt werden [53], [54].

5 Ergebnisse

Die im folgenden Kapitel beschriebenen Oberflächenmodifikationen werden für den Einsatz in der direkt optischen Biosensorik entwickelt und auf folgende Parameter hin untersucht und charakterisiert:

- Homogene Bedeckung
- Polarität der unterschiedlich funktionalisierten Biopolymere
- Spezifische Wechselwirkung
- Regenerierbarkeit und Stabilität
- Unspezifische Adsorption an die Sensoroberfläche

Die Messbedingungen werden so gewählt, dass grundlegende Aussagen über die Eigenschaften der sensitiven Schicht gemacht werden können. Um zu gewährleisten, dass die detektierten Wechselwirkungen nur durch die verwendeten Biopolymere beeinflusst werden, werden als Wechselwirkungssysteme etablierte Modellsysteme verwendet und die Messungen findet in Puffer (PBS) statt [55;56]. Der erste Schritt beinhaltet die Immobilisierung des Polymers. Dabei wird die Reaktionsdauer variiert und verschiedenen Lösungsmittel getestet. Um festzustellen ob eine homogene Bedeckung der Oberfläche gewährleistet ist werden vor und nach der kovalenten Anbindung AFM-Aufnahmen durchgeführt und die Rauigkeit der Oberfläche bestimmt. Die PEG-Derivate besitzen verschiedene funktionelle Endgruppen. Um festzustellen in wie weit die Endgruppen nach der Immobilisierung noch aktiv sind wird unter anderem der Kontaktwinkel von Wasser auf den jeweiligen Oberflächen vermessen. Nach Aufbringung des Polymers wird der gewünschte Ligand kovalent immobilisiert. Je nachdem welche funktionelle Gruppe der Ligand besitzt muss das PEG-Derivat umfunktionalisiert oder zuvor ein anderes PEG-Derivat ausgewählt werden. Ob die Immobilisierung des Liganden erfolgreich ist und spezifische mit dem Analyt wechselwirkt wird mittels RfS ermittelt. Dazu werden 3-5 unterschiedliche Analytkonzentrationen über den Sensor gegeben. Die Wechselwirkung zwischen Analyt und immobilisierten Liganden wird zeitaufgelöst detektiert. Da es sich bei dem Wechselwirkungspaar um Testosteron/Anti-Testosteron bzw. BSA/Anti-BSA handelt besteht die Möglichkeit die Oberfläche mit einer 0,5 %-igen SDS-Lösung zu regenerieren. Dadurch sind Mehrfachmessungen auf einem Transducer möglich und es können Aussagen über die Stabilität bzw. Robustheit der sensitiven Schicht gemacht werden. Die effektive Abschirmung der Oberfläche vor unspezifischer Adsorption wird mit dem indifferenten Protein Ovalbumin (OVA) getestet.

Die verwendeten PEG-Derivate bieten unterschiedliche Immobilisierungsmöglichkeiten. An das immobilisierte Diamino-PEG-2000 kann gut ein Carboxylfunktionalisierter Ligand, wie Testosteronoxim angebunden werden. Um ein aminofunktionalisierten Liganden wie BSA kovalent zu immobilisieren muss zuvor jedoch die Aminogruppe des DA-PEG-2000 zu Carboxylgruppe umfunktionalisiert werden. Das gleiche gilt für das Aminodextran, 4-arm- und 8-arm-Amino-PEG. Verwendet man hingegen Di-NHS-PEG oder Dicarboxyl-PEG-2000 ist es möglich das BSA direkt zu immobilisieren. Bei der Verwendung von Di-Epoxid-PEG ist man flexibler was die funktionelle Gruppe des Liganden betrifft. Man kann Testosteronoxim sowie BSA ohne Zwischenschritte anbinden. Silan-Amino-PEG bietet den Vorteil, dass der Silanisierungsschritt, der bei der kovalenten Anbindung der obigen PEG-Derivaten auf das Glassubstrat notwendig ist, wegfällt.

In der folgenden Liste sind die in dieser Arbeit verwendeten Biopolymer aufgelistet, sowie deren Abkürzungen.

Vollständiger Name	Abkürzung
Diamino-Poly(ethylenglykol); MW 2000	DA-PEG-2000
Dicarboxyl-Poly(ethylenglykol); MW 2000	DC-PEG-2000
Aminodextran (50%)	AMD
4-arm-Amino-Poly(ethylenglykol); MW 10 000	4-arm-PEG
8-arm-Amino-Poly(ethylenglykol) MW 10 000	8-arm-PEG
Di-Epoxid-Poly(ethylenglykol); MW 3400	Di-Epoxi-PEG
Di-N-Hydroxysuccinimid-Poly(ethylenglykol); MW 3400	Di-NHS-PEG
Silan-Amino-Poly(ethylenglykol); MW 3400	Silan-PEG

Tabelle 8: Abkürzungsliste der verwendeten PEG-Derivate

5.1 Charakterisierung von 8-arm-PEG und 4-arm-PEG

Es werden im folgenden Kapitel 4-arm-PEG und 8-arm-PEG als Grundlage für die sensitive Sensorschicht verwendet. Mit steigender Anzahl an PEG-Armen sollte sich auch die Menge an Aminogruppen erhöhen. Dies hat direkten Einfluss auf die Beladungsdichte der Sensoroberfläche. Verglichen werden die Mehrarm-PEGs mit Aminodextran.

5.1.1 Präparation der sensitiven Schichten

Wie im Kapitel 4.2.1 beschrieben wurden die Glastransducer mit Piranha-Lösung gereinigt und mit GOPTS umgesetzt. 8-arm- bzw. 4-arm-PEG (siehe Abbildung 29) wurden im ersten Versuch in DCM gelöst und auf die silanisierte Oberfläche aufgebracht. Es wurde hierzu eine 2 millimolare PEG-Lösung verwendet, die jeweils frisch kurz vor dem Präparationsschritt hergestellt wurde.

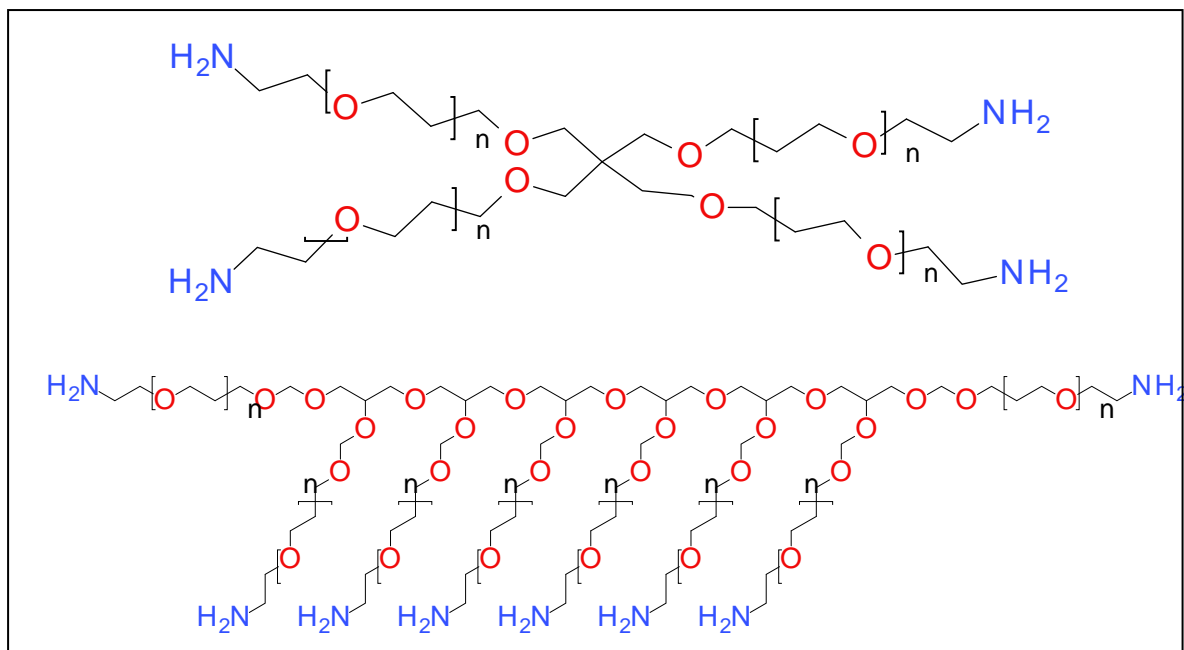


Abbildung 29: 4-arm-PEG (oben), 8-arm-PEG (unten)

Danach wurden die Glastransducer bei 70°C im Ofen über Nacht gelagert. Auf die gleiche Art werden auch PEG-Filme aus linearem DA-PEG-2000 hergestellt. (siehe Kapitel 4.2.1 und 5.3.1).

Für eine zweite Charge wurde das jeweilige Mehrarm-PEG in Wasser gelöst. Die Konzentration der PEG/Wasser-Lösung betrug jeweils zwei Millimol. Anschließend wurde die PEG-Lösung auf die Transducer getropft und diese dann mit einem weiteren Transducer gedeckelt. Die Transducerpaare wurden bei Raumtemperatur über Nacht in einer mit Wasserdampf gesättigt Kammer gelagert. Anschließend wurden sie mit Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Die kovalente Anbindung des Liganden Testosteronoxim wurde wie im Kapitel 4.2.1 beschrieben durchgeführt (siehe Kupplung eines Liganden mit Carboxylgruppe). Die Herstellung der vollständigen sensitiven Schicht betrug 20 Stunden.

5.1.2 Kontaktwinkel

Für die Kontaktwinkelmessungen wurden pro Transducer zwei Wassertropfen ($\approx 5 \mu\text{L}$) auf die Oberfläche gegeben und vermessen. Es wurden jeweils 3 Transducer pro Biopolymer vermessen. Aus den ermittelten Werten wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Alle Messungen wurden unter Reinraumbedingungen durchgeführt. In Abbildung 30 sind die Messungen als Säulendiagramm dargestellt.

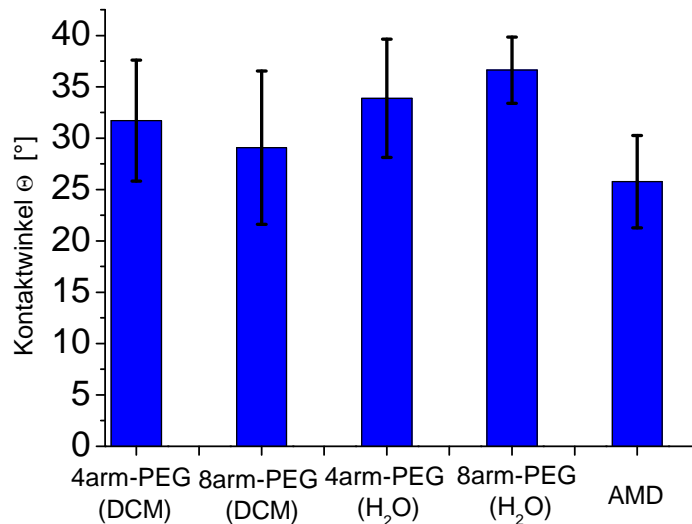


Abbildung 30: Kontaktwinkel gemessen auf unmodifizierten 4arm-, 8-arm-PEG gelöst in DCM bzw. Wasser und unmodifizierten AMD gelöst in Wasser

Alle Kontaktwinkelmessungen wurden jeweils auf den unmodifizierten Polymeroberflächen durchgeführt. In Tabelle 9 sind die genauen Werte der einzelnen Polymeroberflächen zusammengefasst.

Oberfläche	Kontaktwinkel Θ [°]
4-arm-PEG (DCM)	32 ± 6
8-arm-PEG (DCM)	29 ± 8
4-arm-PEG (H ₂ O)	34 ± 6
8-arm-PEG (H ₂ O)	37 ± 3
AMD (H ₂ O)	26 ± 5

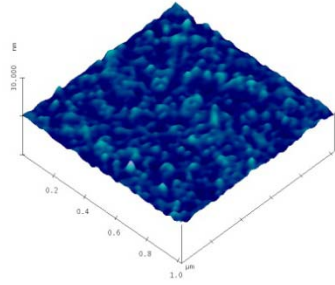
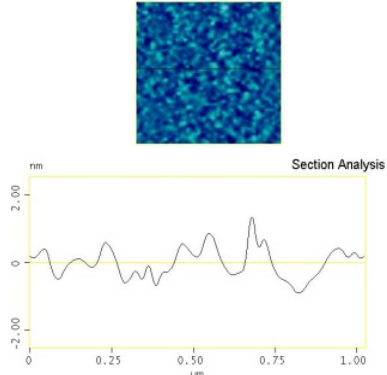
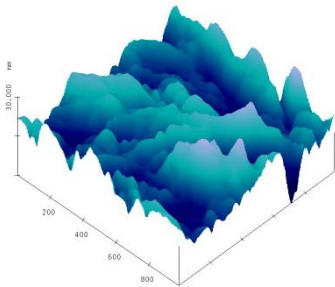
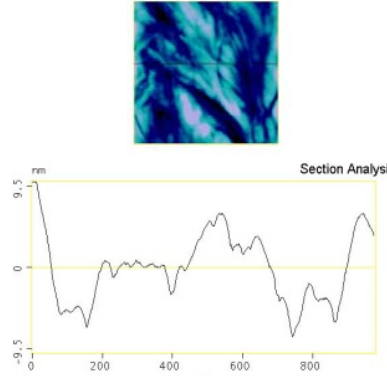
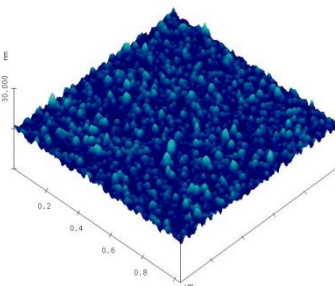
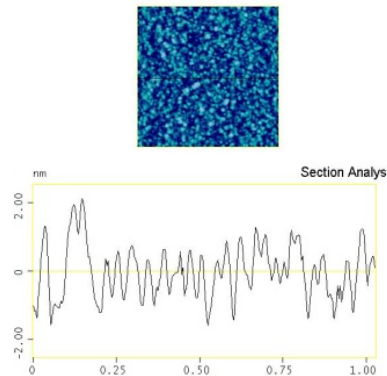
Tabelle 9: Kontaktwinkelmessungen auf unmodifizierten 4-arm-, 8-arm-PEG gelöst in DCM bzw. Wasser und unmodifizierten AMD gelöst in Wasser

Die Standardabweichungen sind bei allen Messungen relativ hoch. Trotzdem kann man eine Tendenz erkennen. Aminodextran weist den kleinsten Kontaktwinkel auf. Dies ist nicht ungewöhnlich, denn AMD ist hydrophiler als Poly(ethylenglykol) (Diamino-PEG-2000 besitzt einen Kontaktwinkel von $30^\circ \pm 1$ [23]). Vergleicht man die Mehrarm-PEGs untereinander sieht man, dass sich die ähnlichen Oberflächenszusammensetzungen in der Oberflächenpolarität widerspiegeln. Die Kontaktwinkel der Mehrarm-PEG befinden sich alle im gleichen Größenordnungsbereich.

5.1.3 AFM

5.1.3.1 Einfluss der Lösungsmittel Wasser und DCM auf die PEG-Schichttopographie

Die AFM-Vermessungen sind in Luft und im Tapping-Modus aufgenommen worden. Tabelle 10 zeigt AFM-Aufnahmen von noch unmodifizierten 4-arm- und 8-arm-PEG die auf unterschiedlicher Weise präpariert worden sind (siehe Kapitel 5.1.1). Die erste Spalte beinhaltet die Bezeichnung des Polymerderivats und das jeweilig Lösungsmittel, welches zur Herstellung der Polymerschicht verwendet wurde. In der zweiten Spalte ist die Oberfläche dreidimensional dargestellt. Die Aufnahmen zeigen einen Scanbereich von $1 \mu\text{m}^2$ und eine Höhenskala von 30 nm. In der letzten Spalte sieht man die Oberfläche von oben und einen Querschnitt mit einer Auflösung von 5 nm.

Polymer	3D	Querschnitt
4-arm-PEG (H₂O)		
4-arm-PEG (DCM)		
8-arm-PEG (H₂O)		

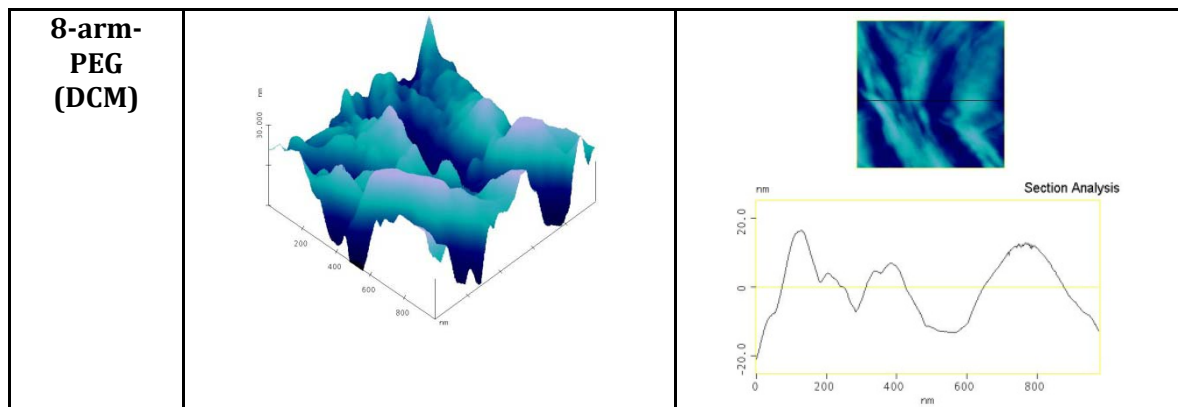


Tabelle 10: AFM-Aufnahmen ($1\mu\text{m}^2$) von unmodifizierten 4-arm- und 8-arm-PEG hergestellt mit den Lösungsmittel DCM und Wasser

Was man anhand der Kontaktwinkelmessungen noch nicht erkennen konnte zeigen jedoch die AFM-Aufnahmen. Sie machen deutlich, dass die Oberflächentopographie der Mehrarm-PEG-Filme stark davon abhängt, wie die 4-arm- bzw. 8-arm-PEG-Derivate auf das Glassubstrat aufgebracht werden. Bei der Verwendung der wässrigen Lösung von 4-arm- bzw. 8-arm-PEG erhält man jeweils einen homogenen PEG-Film. Die Rauigkeit spielt sich in einem Bereich von 2 nm ab. Die Transduceroberflächen sind nach der Beschichtung mit dem jeweiligen Mehrarm-PEG weiterhin klar und transparent. Vergleicht man dies mit den Mehrarm-PEG-Derivaten gelöst in DCM, so sieht man deutliche Unterschiede. Die 4-arm-PEG und 8-arm-PEG-Schichten bilden einen Polymerfilm der sogar mit dem bloßen Auge sichtbar war. Die Substratoberfläche war trübe. Eine Erklärungsmöglichkeit liegt in der hohen Flüchtigkeit des Lösungsmittels DCM. Ein Großteil des Lösungsmittels kann sich verflüchtigt haben bevor es zu einer gleichmäßigen Verteilung des gelösten Polymers auf dem Glastransducer kommt. Die AFM-Aufnahmen zeigen eine stark verworfene Oberfläche. Im Querschnitt wird auch deutlich, dass die Oberflächentopographie tiefe, breite „Gräben“ aufweist. Noch deutlicher wird dieser Unterschied beim Vergleich der RMS-Werte der einzelnen Mehrarm-PEG-Oberflächen. In Tabelle 11 und in Abbildung 31 sind RMS-Werte von 4-arm- und 8-arm-PEG gelöst in Wasser und in DCM aufgetragen. Hierzu wurden AFM-Aufnahmen von verschiedenen Transducern aus unterschiedlichen Chargen verwendet. Der Scanbereich betrug jeweils $1\mu\text{m}^2$.

Oberfläche	RMS-Wert [nm]
4-arm-PEG (DCM)	12.76 ± 5.00
8-arm-PEG (DCM)	18.98 ± 2.03
4-arm-PEG (H_2O)	0.77 ± 0.08
8-arm-PEG (H_2O)	1.21 ± 0.17

Tabelle 11: Rauigkeit der 4-arm- und 8-arm-PEG-Oberflächen in den beiden Lösungsmitteln DCM und Wasser

Die verschiedenen Präparationsarten bzw. das veränderte Lösungsmittel beeinflusst eindeutig die Schichtentwicklung. Die Rauigkeit von 4-arm- und 8-arm-PEG gelöst in DCM liegt um ein zehnfaches höher als die Rauigkeit von 4-arm- und 8-arm-PEG gelöst in Wasser. Die Mehrarm-PEG-Derivate im gleichen Lösungsmittel liegen jeweils im gleichen Größenordnungsbereich. Die RMS-Werte sind beide Mal bei 8-arm-PEG höher als bei 4-arm-PEG.

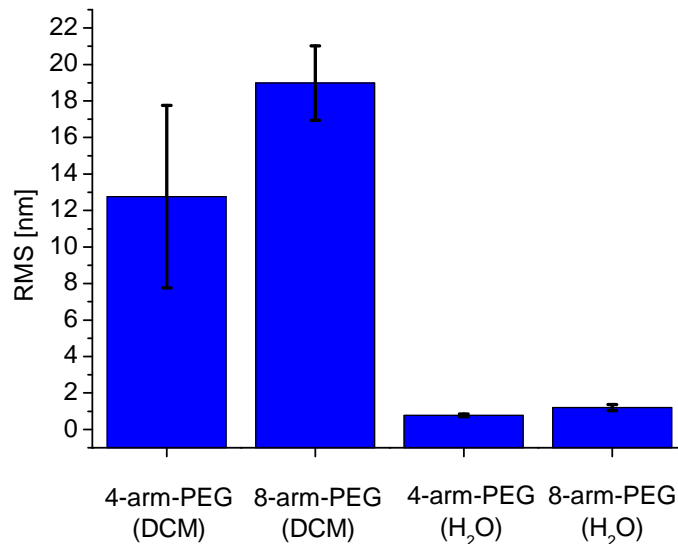


Abbildung 31: RMS-Werte von 4-arm- und 8-arm-PEG-Oberflächen jeweils gelöst in DCM und von 4arm- und 8-arm-PEG-Oberflächen gelöst in Wasser

Die Standardabweichung des RMS-Wertes von 4-arm-PEG gelöst in DCM ist ungewöhnlich hoch (ca. 10 nm). Dies kann daran liegen, dass Innerhalb der abgerasterten Fläche (hier $10 \mu\text{m}^2$) sehr starke Schwankungen in der Oberflächentopographie auftreten. Innerhalb des Polymerfilms wechseln sich gleichmäßige Flächen mit tiefen Gräben und Höhen ab. Die AFM-Aufnahmen zeigen, dass die Präparation von Mehrarm-PEG-Schichten mit DCM als Lösungsmittel nicht geeignet ist um homogene sensitive Schichten zu erhalten. Aus diesem Grund wurden für die weiteren AFM und RfS-Messungen Mehrarm-PEG-Schichten verwendet, die mit Wasser präpariert wurden.

5.1.3.2 Vergleich zwischen 4-arm-, 8-arm-PEG und AMD (gelöst in Wasser)

Tabelle 12 zeigt AFM-Aufnahmen von unmodifizierten Mehrarm-PEG- und AMD-Schichten. Der Scanbereich beträgt bei allen $1 \mu\text{m}^2$. Die erste Spalte beinhaltet die Polymerbezeichnung und das jeweilige Lösungsmittel, in dem die Schicht hergestellt wurde. Die zweite Spalte zeigt die jeweilige Oberfläche von oben. Der Balken rechts davon zeigt die Höhenskala an. Der höchste Wert ist hellblau gefärbt und beträgt 15 nm. Die dritte Spalte ist eine dreidimensionale Darstellung des gleichen Scanbereiches. In der letzten Spalte sieht man ein Querschnitt der Oberfläche. Die Auflösung beträgt 5 nm. Die letzte Zeile zeigt eine AFM-Aufnahme des puren Glassubstrates.

Allgemein kann man sagen, dass alle drei Sensoroberflächen homogen mit dem jeweiligen Polymer beschichtet sind. Im Gegensatz zu den Mehrarm-PEG-Oberflächen bildet die AMD-Oberfläche eine wolkenartigere, diffuse Oberfläche. 4-arm- und 8-arm-PEG sehen sich strukturell ähnlich. Vergleicht man die Querschnitte, ist die 8-arm-PEG-Oberfläche etwas rauer als die 4-arm-PEG-Oberfläche. Der pure Glastransducer an sich zeigt auch schon eine nicht ganz plane Oberflächentopographie.

Polymer	Hight	3D	Querschnitt
4-arm-PEG (H₂O)			
8-arm-PEG (H₂O)			
AMD (H₂O)			
Glasssubstrat			

Tabelle 12: AFM-Aufnahmen (5 μm^2 , Farbskala 15 nm) von 4arm-, 8-arm-PEG und AMD, sowie das Glassubstrat

Die RMS-Werte der vier Oberflächen, dargestellt in Abbildung 32 bestätigen die obigen Annahmen.

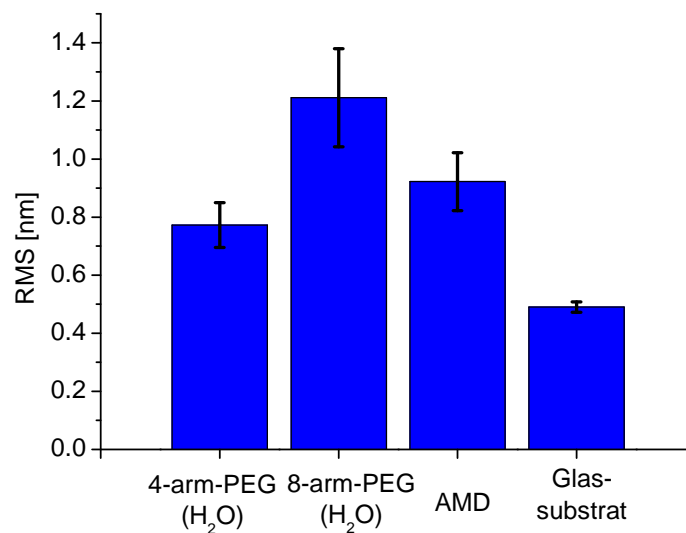


Abbildung 32: RMS-Werte von 4-arm-, 8-arm-PEG und AMD-Oberflächen gelöst in Wasser und Rms-Wert vom reinen Glassubstrat

Am homogensten ist die reine Glasoberfläche mit einem RMS-Wert von 0,49 nm. Durch die Beschichtung mit einem Biopolymer erhöht sich die Rauigkeit. So zeigt eine 4-arm-PEG-Oberfläche eine Rauigkeit von 0,77 nm und AMD eine Rauigkeit von 0,92 nm. Die höchste Zunahme sieht man bei 8-arm-PEG mit 1,21 nm. Die RMS-Werte sind noch mal in Tabelle 13 zusammengefasst.

Oberfläche	RMS-Wert [nm]
4-arm-PEG (H ₂ O)	0.77 ± 0.08
8-arm-PEG (H ₂ O)	1.21 ± 0.17
AMD	0.92 ± 0.10
Glassubstrat	0.49 ± 0.02

Tabelle 13: Rms-Werte der einzelnen unmodifizierten Biopolymeroberflächen, 4-arm-PEG, 8-arm-PEG und AMD, sowie das pure Glassubstrat

Die AFM-Aufnahmen machen deutlich, dass die 4-arm-PEG und 8-arm-PEG-Schichten präpariert in Wasser das Glassubstrat gleichmäßig und homogen bedecken. Die RMS-Werte zeigen eine Abstufung der einzelnen Biopolymerschichten. Angefangen beim reinen Glassubstrat über 4-arm-PEG und AMD bis zum 8-arm-PEG.

5.1.4 RfS

Um die unterschiedlichen Oberflächen vergleichen zu können, wurden alle drei Oberflächen auf die gleiche Weise funktionalisiert. Als Modellsystem diente das schon bekannte Antigen/Antikörpersystem Testosteronoxim/Anti-Testosteron. Das Antigen Testosteron an sich kann nicht direkt an eine Oberfläche kovalent immobilisiert werden, da es hierzu keine funktionelle Gruppe besitzt. Daher wird ein Testosteron-Derivat verwendet, das zusätzlich eine Carboxylgruppe aufweist. Dieses Testosteronoxim wird kovalent an das aminofunktionalisierte Biopolymer gebunden (siehe Kapitel 4.2.1.5). Vorherige Messungen haben schon gezeigt, dass die Affinität zum Antikörper durch den funktionellen Rest am Testosteron-Derivates nicht beeinflusst wird [55;56].

Auf den so präparierten Glassensoren wurden RfS-Messungen mit dem entsprechenden Antikörper durchgeführt. Zudem wurde mittels Ovalbumin geprüft, ob die Biopolymerschicht die Oberfläche vor unspezifischer Adsorption abschirmt. Alle Messungen wurden mit dem RfS-Aufbau, wie im Kapitel 4.2.2 beschrieben durchgeführt. In der Abbildung 33, Abbildung 34 und Abbildung 35 sieht man die RfS-Messungen auf den drei unterschiedlichen Oberflächen.

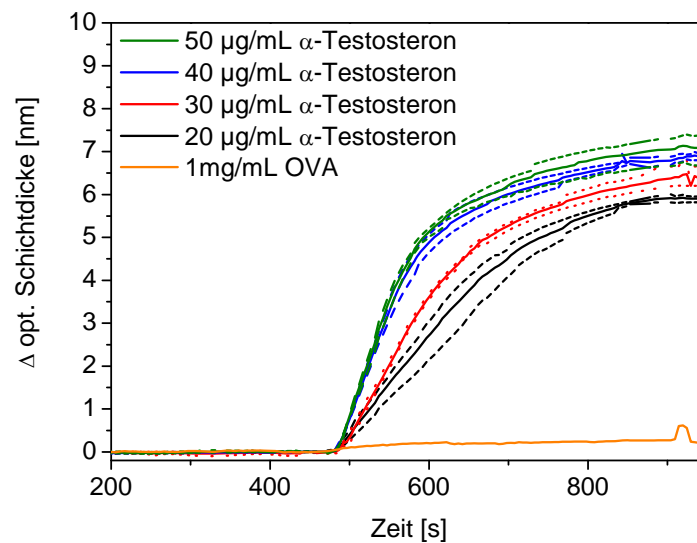


Abbildung 33: RfS-Messung von 4 Anti-Testosteron-Konzentrationen, sowie 1mg/mL OVA auf 4-arm-PEG gelöst in Wasser modifiziert mit Testosteronoxim.

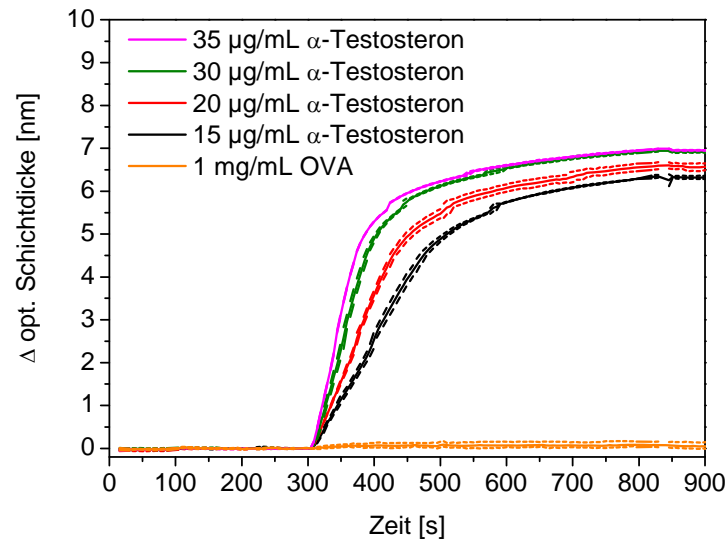


Abbildung 34: RfS-Messungen von 4 Anti-Testosteronkonzentrationen, sowie 1 mg/mL OVA auf 8-arm-PEG gelöst in Wasser modifiziert mit Testosteronoxim

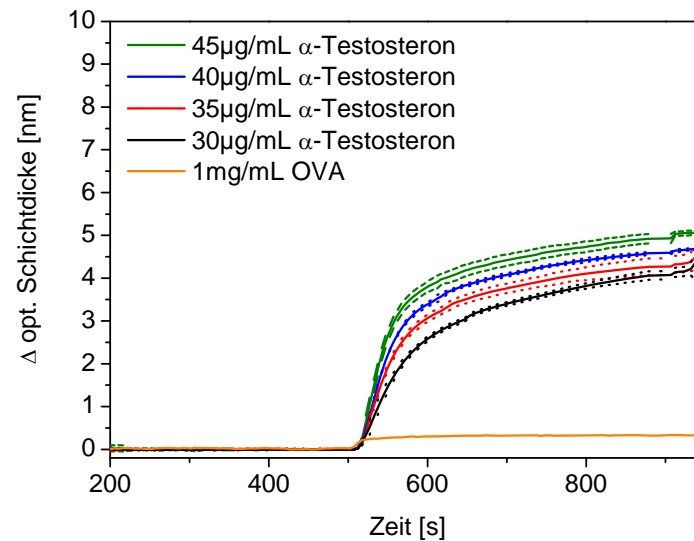


Abbildung 35: RfS-Messungen von 4 Anti-Testosteronkonzentrationen, sowie 1 mg/mL OVA auf AMD modifiziert mit Testosteronoxim

Die Bindungskurven des Anti-Testosterons wurden dreifach bestimmt. Aufgetragen ist der Mittelwert. Die gestrichelten Linien sind die jeweiligen Bindungskurven zuzüglich bzw. abzüglich der Standardabweichung. Um festzustellen bei welcher Antikörperkonzentration man die Maximalbeladung der jeweiligen sensitiven Oberfläche erreicht wurden verschiedene Konzentrationsbereich gewählt. Um jedoch den jeweiligen Bindungsverlauf und die Gleichgewichtsbeladung vergleichen zu können wurde bei allen die Bindung von einer Konzentration von 30 µg/mL Anti-Testosteron gemessen.

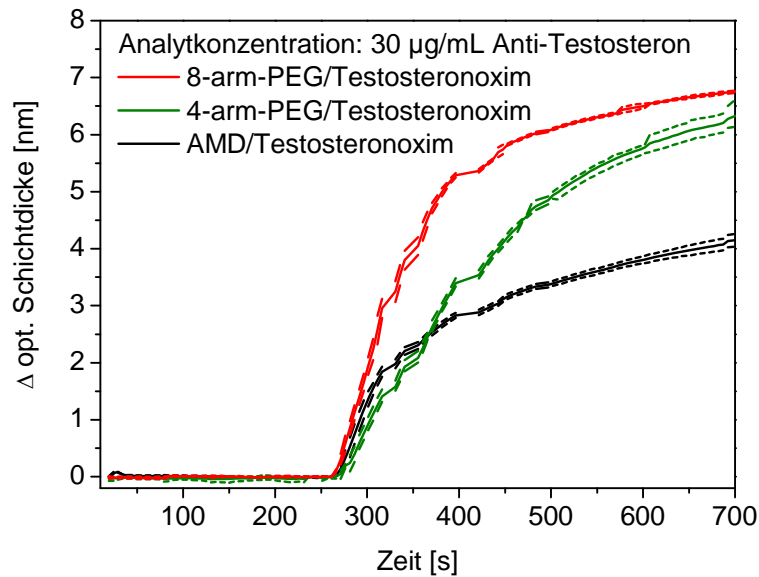


Abbildung 36: Bindungssignale von 30 µg/mL Anti-Testosteron auf 8-arm-PEG/Testosteronoxim, 4-arm-PEG/Testosteronoxim und AMD/Testosteronoxim.

In Abbildung 36 sieht man das unterschiedliche Bindungsverhalten auf den drei modifizierten Biopolymeroberflächen. Die höchste optische Schichtdickenänderung erkennt man auf 8-arm-PEG (rote Kurve). Dies und die hohe Steigung am Anfang weist auf eine gute Zugänglichkeit zum immobilisierten Liganden hin. Auf 4-Arm-PEG (grüne Kurve) erhält man ein ähnlich hohes Signal, jedoch ist der Kurvenverlauf flacher. Das geringste Signal erhält man auf AMD (schwarze Kurve). Jedoch ist hier die Anfangssteigung ähnlich groß, wie auf 8-arm-PEG.

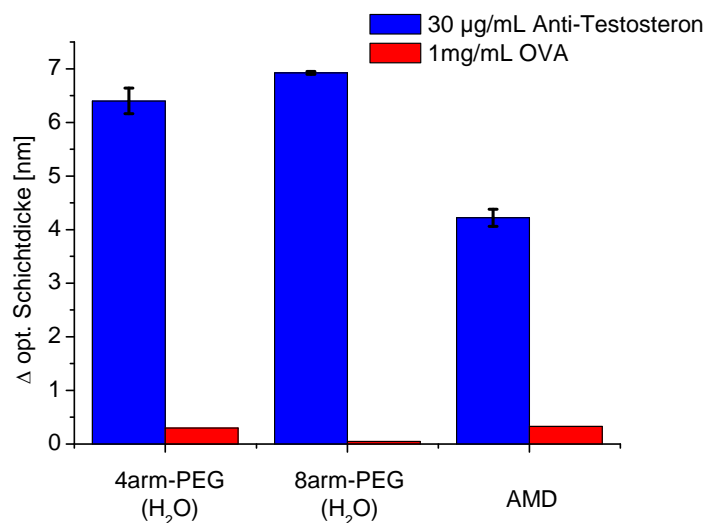


Abbildung 37: Säulendiagramm der Antikörperbeladung und unspezifischer Beladung (unten) auf 8-arm-PEG/Testosteron, 4-arm-PEG/Testosteron und AMD/Testosteron

In Abbildung 37 und Tabelle 14 sind die spezifische Wechselwirkung von 30 µg/mL Antikörper und die unspezifische Adsorption von 1 mg/mL OVA auf den einzelnen Oberflächen zusammengefasst. Auf 4-arm-PEG- und 8-arm-PEG-Oberflächen erhält man die höchsten Bindungssignale. Die unspezifische Adsorption von OVA ist auf 8-arm-PEG am geringsten. Die AMD-Oberfläche zeigt die geringste optische Schichtdickenänderung mit 6,2 nm bei 30 µg/mL Antikörper aber die höchste unspezifische Wechselwirkung mit OVA.

Polymer	30 µg/mL Anti-Testosteron [nm]	1mg/mL OVA [nm]
4-arm-PEG (H ₂ O)	6,40 ± 0,24	0,30
8-arm-PEG (H ₂ O)	6,93 ± 0,03	0,05
AMD	3,96 ± 0,20	0,33

Tabelle 14: Oberflächenbeladung von Anti-Testosteron und unspezifische Wechselwirkung von Ovalbumin auf 4arm-, 8arm-PEG- und AMD-Oberflächen jeweils modifiziert mit Tesotsteronoxim

Eine mögliche Erklärung könnte in der hydrogelartigen Struktur des Dextrans liegen. Die immobilisierten Liganden sind für den Analyten nicht so leicht zugänglich. Da die Probe im stetigen Fluss über den Sensor gegeben wird, erreicht der Analyt den eventuell verdeckten Liganden nicht innerhalb der Messzeitspanne.

5.1.5 Zusammenfassung und Fazit

Die Präparation von 4-arm-PEG- und 8-arm-PEG-Schichten wurde auf zwei unterschiedlichen Arten durchgeführt. Einmal wurden 2mM des jeweiligen Mehrarm-PEG-Derivates gelöst in DCM auf die silanierte Oberfläche getropft und bei 70°C über Nacht gelagert. Das andere Mal wurde eine 2 millimolare wässrige Lösung hergestellt und auf den silanierten Transducer gegeben. Die gedeckelten Glassubstrate wurden in einer Wasserdampfkammer über Nacht gelagert. Das letztgenannte Verfahren wurde auch für die Herstellung der AMD-Schichten angewendet.

Trotz der relativ hohen Standardabweichungen der Kontaktwinkelmessungen lässt sich eine Tendenz erkennen. Aminodextran weist den niedrigsten Wert mit 25,76° auf und ist somit am hydrophilsten.

Die AFM-Aufnahmen zeigen, dass 4-arm- und 8-arm-PEG gelöst in Wasser deutlich homogener Schichten ergeben, als die Mehrarm-PEG-Derivate gelöst in DCM. Die mit DCM präparierten Schichten sind trübe und sehr inhomogen. Transducer die mit AMD, 4-arm- und 8-arm-PEG gelöst in Wasser modifiziert worden sind, zeigen eine gleichmäßige Bedeckung. Daher wurden alle weiteren Messungen mit den in Wasser präparierten Schichten unternommen. Die unterschiedlichen molekularen Strukturen und Eigenschaften von AMD und Mehrarm-PEG spiegeln sich auch in der Oberflächentopographie wieder. Im Vergleich zwischen 4-arm- und 8-arm-PEG erkennt man, dass das eher sternförmige 4-arm-PEG-Molekül eine einheitlichere Oberfläche, als das stark verzweigte, langkettige 8-arm-PEG bildet.

Die RMS-Werte der Biopolymerschichten sind alle höher als der Wert von der puren Glassubstratoberfläche (0,49 nm). Die 8-arm-PEG-Oberfläche weist mit 1,21 nm dabei den höchsten Wert auf. Für die RfS-Messungen wurden alle Polymeroberflächen mit dem Liganden Testosteronoxim modifiziert. Hierzu wurden die aminofunktionalisierten Biopolymere mit dem Liganden mittels DIC/NHS-Chemie umgesetzt. Es wurden jeweils drei Messungen pro Konzentration durchgeführt. Insgesamt wurden Bindungskurven von 4 Antikörperkonzentration pro Chip aufgenommen. Des Weiteren wurden die Oberflächen auf unspezifische Adsorption getestet. Hierzu wurde jeweils 1mg/mL OVA vermessen. Die höchste Oberflächenbeladung findet man auf 8-arm-PEG (6,93 nm; 30 µg/mL Antikörper), gefolgt von 4-arm-PEG mit 6,4 nm. Die niedrigste unspezifische Wechselwirkung findet man bei dem mit 8-arm-PEG modifizierten Sensor (0,047nm; 1mg/mL OVA).

Die obigen Ergebnisse zeigen:

- Wasser ist ein geeignetes Lösungsmittel um 4-arm- und 8-arm-PEG auf den silanierten Glastransducer zu immobilisieren
- Die mit Wasser präparierten Mehrarm-PEG-Oberflächen bilden eine homogen bedeckte Sensoroberfläche
- Mehrarm-PEG-Oberflächen sind robust und regenerierbar und sind somit für Mehrfachmessungen geeignet
- 8-arm-PEG ist für kinetisch kontrollierte Messungen sehr gut geeignet und zeigt eine geringe unspezifische Wechselwirkung

5.2 Charakterisierung von Di-Epoxid-PEG und Di-NHS-PEG

PEG-Derivate sind mit unterschiedlichen funktionellen Endgruppen erhältlich. Dadurch ergeben sich neue präparative Möglichkeiten, um Liganden auf die Sensoroberfläche zu immobilisieren. Bei der Verwendung von DA-PEG-2000 für die sensitive Schichtherstellung muss je nach zu immobilisierenden Liganden die Aminoendgruppe in einem mehrstufigen Prozess umfunktionalisiert werden. Dies ist zum Teil sehr zeitintensiv und man hat keine direkte Kontrolle über die Effektivität der einzelnen Reaktionsschritte. An Di-Epoxid-PEG-Oberflächen kann der Ligand über seine Carboxyl- oder Aminogruppen direkt angebunden werden. Es entfällt der Umwandlungsschritt, sowie die Aktivierung der PEG-Oberfläche (siehe auch Kapitel 4.2.1). Bei der Verwendung von Di-NHS-PEG entfällt ebenfalls die Umfunktionalisierung und der Ligand kann direkt kovalent angebunden werden. Im folgenden Kapitel wird die Präparation der Di-Epoxid- und Di-NHS-PEG-Schicht beschrieben. Desweiteren werden die PEG-Schichten mittels Kontaktwinkelmessungen und AFM-Aufnahmen charakterisiert. Anhand der Modellsysteme Testosteronoxim/Anti-Testosteron und BSA/Anti-BSA sowie mittels Ovalbumin als unspezifischen Analyten, werden die modifizierten PEG-Schichten auf ihre Selektivität, Abschirmung von unspezifischer Wechselwirkung und Regenerierbarkeit untersucht. Die Ergebnisse werden am mit Messungen auf DA-PEG-2000 verglichen.

5.2.1 Präparation der sensitiven Schichten

5.2.1.1 Immobilisierung von Di-Epoxid-PEG

Zur Immobilisierung von Di-Epoxid-PEG wurde der Glastransducer mit einer Piranha-Lösung gereinigt und aktiviert, sowie mit einem Aminosilan (APTES) beschichtet. Der genaue Vorgang wird in Kapitel 4.2.1 beschrieben. Das Di-Epoxid-PEG hat ein Molekulargewicht von 3400 Dalton (siehe Abbildung 38). 2 Millimol des Di-Epoxid-PEGs wurden in DMSO gelöst und auf den silanisierten Glastransducer getropft. Die Transducer werden als Sandwich in einer mit DMSO gesättigten Kammer gelagert.

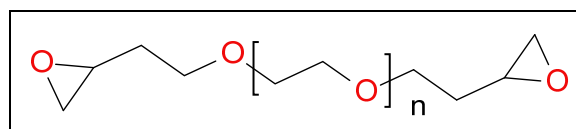


Abbildung 38: Strukturformel von Di-Epoxid-PEG; Mw: 3400

Es wurden zwei Chargen von Di-Epoxid-PEG-Transducer hergestellt. In der ersten Charge durfte die Di-Epoxid-PEG/DMSO-Lösung nur eine Stunde auf die Silanschicht wirken. In der zweiten Charge wurde diese Reaktionszeit auf 12 Stunden erhöht. Die so modifizierten Transducer wurden mit DMSO gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend wurde jeweils ein Teil der Chargen mit Testosteronoxim, der andere Teil mit BSA umgesetzt (Siehe Kapitel 4.2.1).

5.2.1.2 Immobilisierung von Di-NHS-PEG

Zur kovalenten Anbindung von Di-NHS-PEG wurden die Glastransducer ebenfalls mit Piranha gereinigt und mit einem Aminosilan (APTES) modifiziert (siehe Kapitel 4.2.1). Di-NHS-PEG besitzt ein Molekulargewicht von 3400 Dalton (Abbildung 39). 2 Millimol des Di-NHS-PEGs wurden in DMSO gelöst und auf den silanisierten Glastransducer gegeben. Die gedeckelten Glaschips wurden in einer mit DMSO gesättigten Dampfkammer gelagert. Die Reaktion wurde jeweils nach einer Stunde und nach 12 Stunden beendet. Die Transducer wurden danach mit DMSO gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend wurden die verschiedenen Di-NHS-PEG-Oberflächen mit BSA wie im Kapitel 4.2.1 beschrieben umgesetzt.

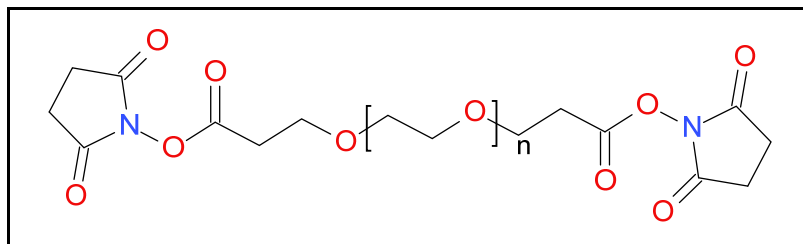


Abbildung 39: Strukturformel von Di-NHS-PEG, Mw: 3400

5.2.2 Kontaktwinkel

Die Kontaktwinkelmessungen wurden unter Reinraumbedingungen durchgeführt. Es wurde pro Sensor jeweils zwei 5 μ L große Wassertropfen vermessen. In Abbildung 40 sind die Werte als Säulendiagramm dargestellt. Die Kontaktwinkelmessungen wurden alle auf den unmodifizierten Di-Epoxid- bzw. Di-NHS-PEG-Derivat-Oberflächen durchgeführt.

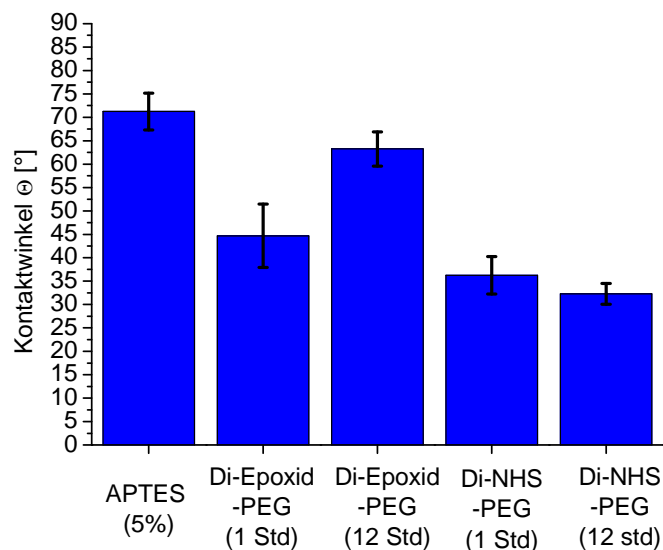


Abbildung 40: Kontaktwinkel von APTES, Di-Epoxid-PEG und Di-NHS-PEG-Oberflächen mit variierten Reaktionszeiten

Die Aminosilanoberfläche ist mit einem Kontaktwinkel von 71° am hydrophobsten. Vergleicht man die Reaktionszeiten der beiden Di-Epoxid-PEG-Oberflächen, sieht man deutliche Unterschiede. Lässt man das Di-Epoxid-PEG über Nacht reagieren, ist der Kontaktwinkel deutlich größer als auf der Di-Epoxid-PEG-Oberfläche mit einer Stunde Reaktionszeit. Dies ist verwunderlich. Man kann sich vorstellen, dass im Laufe der 12 Stunden die Epoxidgruppen mit der Luftfeuchtigkeit hydrolysieren. Es bilden sich Hydroxylgruppen. Dies würde aber eine Erhöhung der Polarität bedeuten und der Kontaktwinkel müsste kleiner werden. Dies ist nicht der Fall, sondern im Gegenteil die Oberfläche wird hydrophober. Eine mögliche Erklärung besteht in der Annahme, dass die gebildeten Hydroxylgruppen mit den noch vorhandenen Epoxidgruppen unter Bildung von Ether weiter reagieren.

Auf den mit Di-NHS-PEG modifizierten Oberflächen ändert sich die Polarität mit der Zeit kaum. Ob nach einer Stunde oder 12 Stunden Reaktionszeit, die Oberflächen bleiben ähnlich hydrophil. Die Daten sind in Tabelle 15 noch mal zusammengefasst.

Oberfläche	Kontaktwinkel Θ [°]
APTES (5%)	71 ± 4
Di-Epoxid-PEG (1 Std)	45 ± 7
Di-Epoxid-PEG (12 Std)	63 ± 4
Di-NHS-PEG (1 Std)	36 ± 4
Di-NHS-PEG (12 Std)	32 ± 2

Tabelle 15: Kontaktwinkel von APTES, Di-Epoxid-PEG- und Di-NHS-PEG-Oberflächen mit verschiedenen Reaktionszeiten

5.2.3 AFM

In Tabelle 16 sind die AFM-Messungen von APTES, Di-Epoxid- und Di-NHS-PEG zusammengefasst. Der Scanbereich beträgt jeweils 1 μm^2 mit einer Höhenskala von 30 nm. Die erste Spalte beinhaltet die Schichtbezeichnung und die Dauer der Präparation der jeweiligen Polymerschicht. In der zweiten Spalte ist die Oberfläche dreidimensional dargestellt. In der letzten Spalte der Tabelle 16 ist nochmals ein Querschnitt der Oberfläche abgebildet mit einer Auflösung von 5 nm. Die AFM-Aufnahmen zeigen die Polymer-Oberflächen bevor sie mit dem jeweiligen Liganden umgesetzt worden sind.

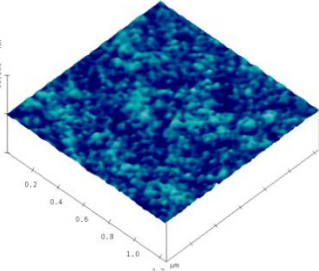
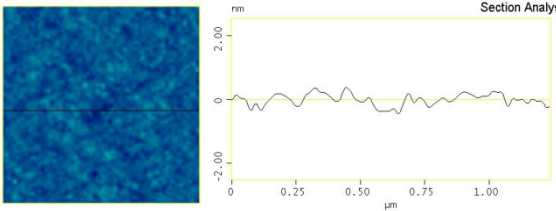
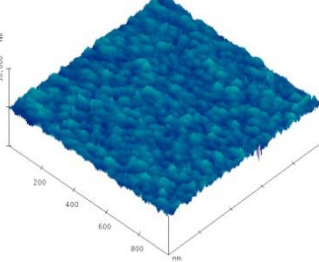
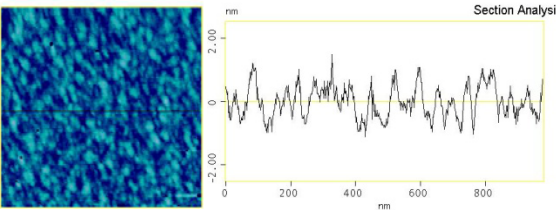
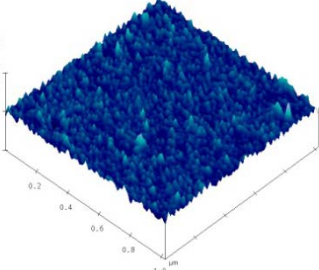
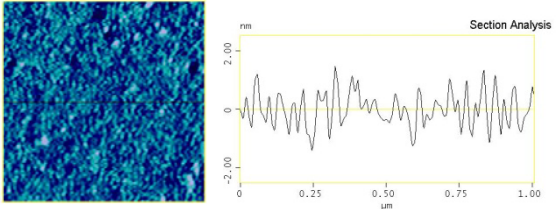
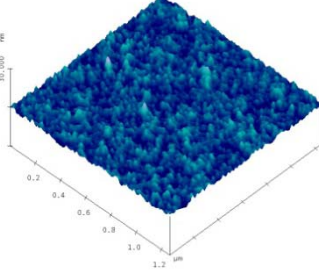
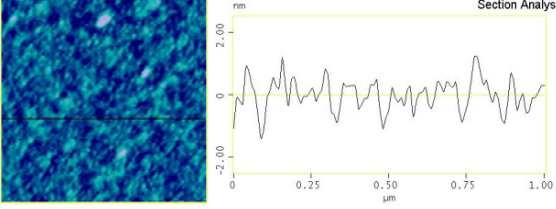
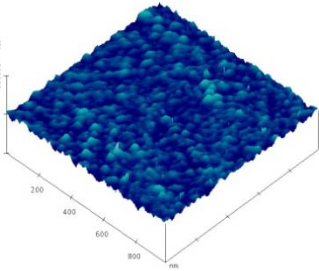
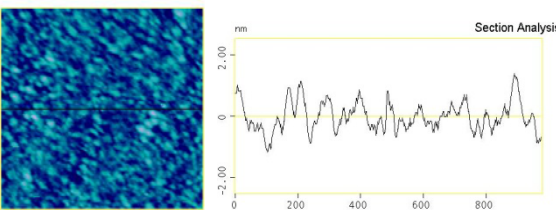
Polymer	3D	Querschnitt
APTES (5%)		
Di-Epoxid-PEG (1 Std)		
Di-Epoxid-PEG (12 Std)		
Di-NHS-PEG (1 Std)		
Di-NHS-PEG (12 Std)		

Tabelle 16: AFM-Aufnahmen ($1 \mu\text{m}^2$, 30 nm) von APTES-, Di-Epoxid-PEG- und Di-NHS-PEG-Oberflächen mit unterschiedlichen Reaktionszeiten

Alle Oberflächenaufnahmen zeigen eine einheitliche Bedeckung des Transducers. Am homogensten mit einer Rauigkeit von 0,3 nm ist die Aminosilan-Schicht. Vergleicht man die Di-Epoxid-PEG-Schicht (1 Std) mit Di-Epoxid-PEG (12 Std) sieht man geringfügige strukturelle Unterschiede. Die Di-Epoxid-PEG-Schicht (12 Std) zeigt eine höhere Rauigkeit (ca. 1 nm) im Gegensatz zu Di-Epoxid-PEG (1 Std) mit einem Rms-Wert von 0,7nm. Die Oberflächentopographien von beiden Di-NHS-PEG-Oberflächen sind nahezu identisch. Eine Übersicht der Rms-Werte zeigt das folgende Säulendiagramm (Abbildung 41)

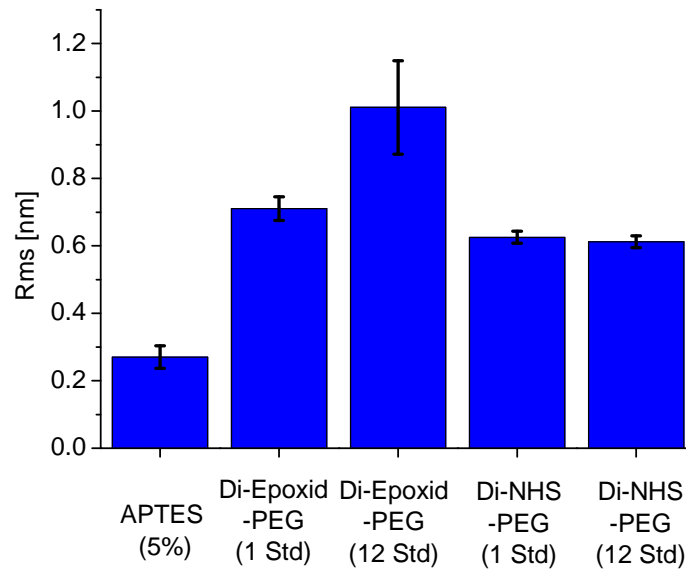


Abbildung 41: RMS-Werte von APTES-, Di-Epoxid-PEG und Di-NHS-PEG-Oberflächen

Oberfläche	RMS-Wert [nm]
APTES	0.27 ± 0.03
Di-Epoxid-PEG (1 Std)	0.71 ± 0.035
Di-Epoxid-PEG (12 Std)	1.01 ± 0.14
Di-NHS-PEG (1 Std)	0.63 ± 0.018
Di-NHS-PEG (12 Std)	0.61 ± 0.018

Tabelle 17: RMS-Werte von APTES, Di-Epoxid und Di-NHS-PEG mit unterschiedlichen Reaktionszeiten

und die Tabelle 17. Zusammenfassend kann man sagen, dass der erste Beschichtungsschritt mit Aminosilan (APTES) eine homogene Bedeckung der Glassubstratoberfläche ergibt. Die Reaktionsdauer von einer Stunde bei der Modifizierung mit Di-Epoxid-PEG ist ausreichend um eine gleichmäßige PEG-Schicht zu erzeugen, die noch genügend funktionelle aktive Epoxidgruppen aufweist (siehe Kontaktwinkelmessungen). Im Gegensatz dazu sind die Di-NHS-PEG-Oberflächen stabiler.

5.2.4 RfS

Alle RfS-Messungen wurden mit dem Hamilton-Aufbau wie im Kapitel 4.2.2 beschrieben durchgeführt. Im Folgenden werden die Messungen auf unterschiedlich modifizierten Di-Epoxid-PEG und Di-NHS-PEG-Oberflächen gezeigt. Di-Epoxid-PEG wurde sowohl mit Testosteronoxim umgesetzt als auch mit BSA modifiziert. BSA wurde auch auf Di-NHS-PEG kovalent angebunden. Verglichen werden neben den variierenden Reaktionszeiten noch die Abschirmung von unspezifischer Adsorption mit Ovalbumin, sowie die spezifische Wechselwirkung des jeweiligen Antikörpers mit dem immobilisierten Antigen. Alle Antikörperkonzentrationen wurden dreifach gemessen. Aufgetragen sind jeweils der Mittelwert der drei Bindungskurven und die Standardabweichungen.

5.2.4.1 Di-Epoxid-PEG

RfS-Messungen von Testosteronoxim/Anti-Testosteron auf Di-Epoxid-PEG

In Abbildung 42 und Abbildung 43 sind die gemessenen Bindungskurven dargestellt.

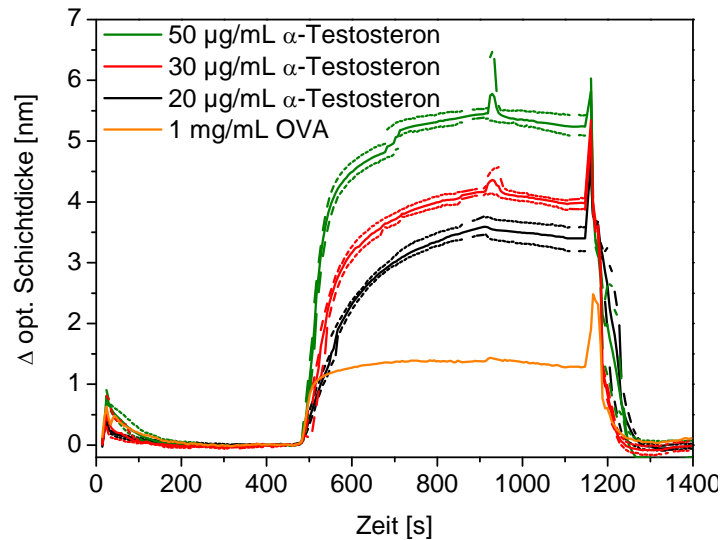


Abbildung 42: RfS-Messungen von Anti-Testosteron auf Di-Epoxid-PEG/Testosteron (1 Stunde)

Das obige Diagramm zeigt die Messungen auf Di-Epoxid-PEG/Testosteronoxim mit der Reaktionsdauer von 1 Stunde. Das untere Diagramm zeigt die Messungen mit der Reaktionsdauer von 12 Stunden.

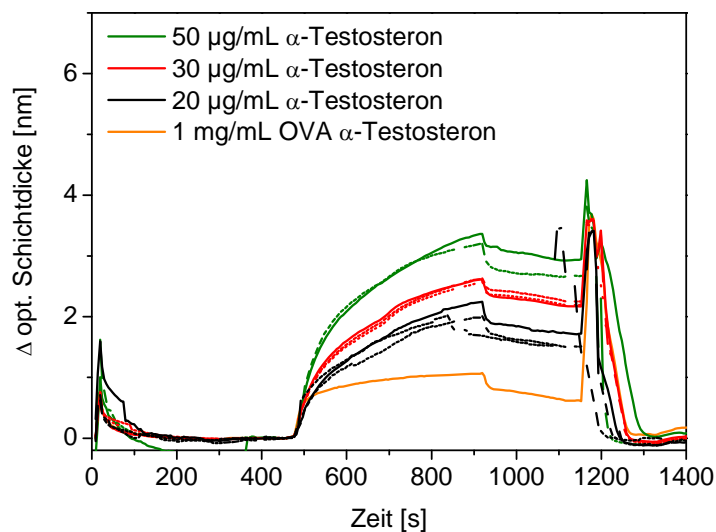


Abbildung 43: RfS-Messungen auf von Anti-Testosteron auf Di-Epoxid-PEG/Testosteron (12 Stunden).

Auf beiden Di-Epoxid-PEG-Oberflächen sieht man eine relativ hohe unspezifische Wechselwirkung mit OVA (orangene Linie). Allerdings sieht man auch deutliche Unterschiede in der spezifischen Analytanbindung. Die Bindungskurven unterscheiden sich in ihrer Form und in der opt.

Schichtdickenänderung. Auf der Di-Epoxid-PEG-Oberfläche (1 Stunden) gehen die Bindungskurven von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in eine Sättigung. Im Gegensatz dazu steigen die Bindungskurven bei allen Antikörperkonzentrationen auf Di-Epoxid-PEG (12 Stunden) stetig an ohne in eine Sättigung zu kommen. Auch die Dissoziation (ab 900 Sekunden) ist auf Di-Epoxid-PEG (12 Stunden) höher.

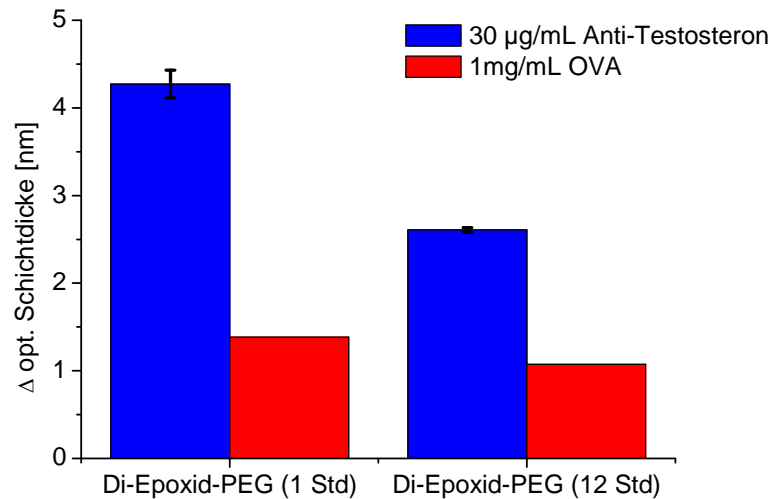


Abbildung 44: Bindungssignal von 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Antikörper bzw 1 mg/mL OVA auf Di-Epoxid-PEG/Testosteronoxim

Betrachtet man das Säulendiagramm in Abbildung 44 und in Tabelle 18 wird nochmal deutlich, dass die spezifische Anbindung des Antikörpers auf Di-Epoxid-PEG (1 Stunde) höher ist, als auf Di-Epoxid-PEG (12 Stunden). Dies zeigt, dass durch die längere Reaktionszeit die Funktionalität der Epoxid-Oberfläche vermindert wird. Die unspezifische Wechselwirkung von OVA auf Di-Epoxid-PEG (12 Stunden) ist verhältnismäßig hoch.

Oberflächen	30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Anti-Testosteron [nm]	1 mg/mL OVA [nm]
Di-Epoxid-PEG/Testosteron (1 Std)	4.27 ± 0.16	1.39
Di-Epoxid-PEG/Testosteron (12 Std)	2.61 ± 0.03	1.08

Tabelle 18: Bindungssignale von 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Anti-Testosteron und 1 mg/mL OVA auf Di-Epoxid-PEG/Testosteron-Oberflächen

RIfS-Messungen von BSA/Anti-BSA auf Di-Epoxid-PEG

Es wurde BSA kovalent an das Di-Epoxid-PEG über eine Aminogruppe immobilisiert. In Abbildung 45 und Abbildung 46 sieht man RIfS-Messungen von Anti-BSA sowie OVA auf Di-Epoxid-PEG/BSA. Variiert wurden auch hier die Reaktionszeiten zur Immobilisierung des Di-Epoxid-PEG (1 Stunde und 12 Stunden). Die Konzentration des Antikörpers betrug bei beiden Oberflächen 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

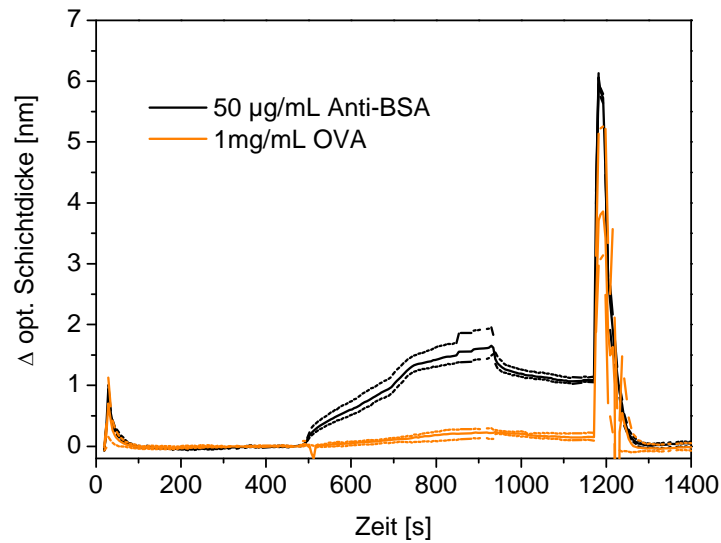


Abbildung 45: RfS-Messungen von Anti-BSA und OVA auf Di-Epoxid-PEG/BSA (1 Stunde)

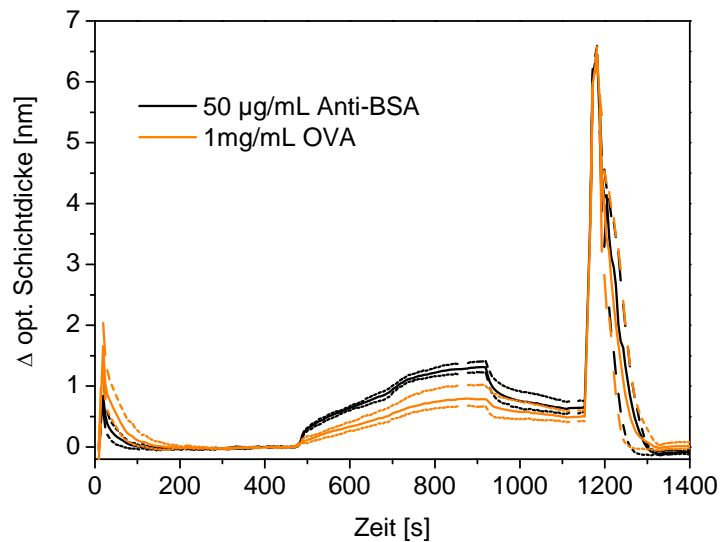


Abbildung 46: RfS-Messung von Anti-BSA und OVA auf Di-Epoxid-PEG/BSA (12 Stunden)

Die Bindungskurven von Anti-BSA unterscheiden sich grundsätzlich von dem Bindungsverlauf des Anti-Testosterons. Trotz der relativ hohen Antikörperkonzentration von 50 µg/mL erhält man keine vollständige Sättigung der Oberfläche. Das Bindungsverhalten ist für das BSA/Anti-BSA-System bei der gewählten Konzentration üblich und es können anhand der detektierten Wechselwirkungen folgende Aussagen getroffen werden. Die spezifische Anbindung des Antikörpers führt auf Di-Epoxid-PEG (1 Stunde) zu einem höheren Bindungssignal als auf Di-Epoxid-PEG (12 Stunden). Die Abschirmung vor unspezifischer Adsorption ist auf dem PEG mit 1 Stunde Reaktionszeit besser, als auf Di-Epoxid-PEG (12 Stunden). Das Säulendiagramm in Abbildung 47 macht dies auch noch mal deutlicher.

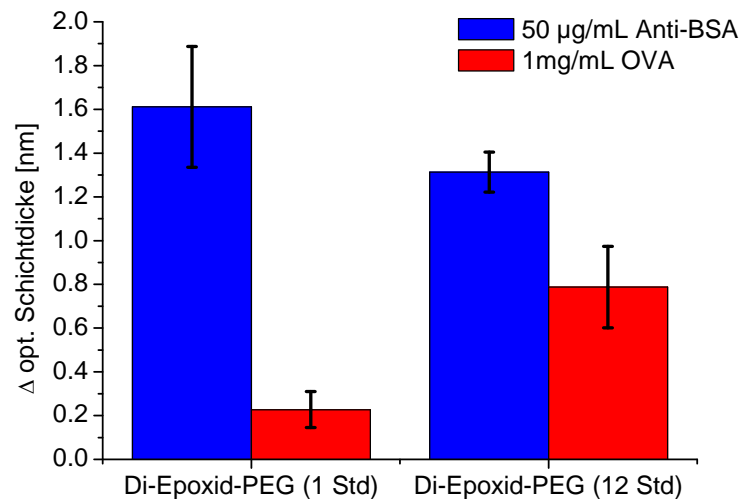


Abbildung 47: Bindungssignale von 50 µg/mL Anti-BSA und 1mg/mL OVA auf Di-Epoxyd-PEG

Die unspezifische Wechselwirkung von OVA (rot) mit 0,8 nm ist auf Di-Epoxyd-PEG (12 Stunden) deutliche höher. In Tabelle 19 sind die Bindungssignale von 50 µg/mL Anti-BSA, sowie 1 mg/mL OVA auf den unterschiedlich lang präparierten Di-Epoxyd-PEG/BSA-Oberflächen zusammengefasst.

Oberflächen	50 µg/mL Anti-BSA [nm]	1 mg/mL OVA [nm]
Di-Epoxyd-PEG/BSA (1 Std)	1.61 ± 0.28	0.23 ± 0.08
Di-Epoxyd-PEG/BSA (12 Std)	1.31 ± 0.09	0.79 ± 0.19

Tabelle 19: Bindungssignal von 50 µg/mL Anti-BSA und 1mg/mL OVA auf Di-Epoxyd-Peg/BSA-Oberflächen

Mit Di-Epoxyd-PEG (1 Stunde) erzielt man mit beiden Modifikationsarten (Testosteronoxim und BSA) bessere Ergebnisse. Die spezifische Anbindung des Analyten ist höher als auf Di-Epoxyd-PEG (12 Stunden). Die unspezifische Wechselwirkung von OVA ist jedoch bei allen Oberflächen relativ hoch, wobei auch hier das Di-Epoxyd-PEG (12 Stunden) tendenziell schlechter ausfällt. Vergleicht man alle Di-Epoxyd-Oberflächen mit den unterschiedlichen Reaktionszeiten und Modifizierungsarten stellt man fest, dass die Abschirmung vor unspezifischer Wechselwirkung sehr unterschiedlich ist. Dies deutet auf eine qualitativ schlechte Reproduzierbarkeit der Oberflächenpräparation hin.

5.2.4.2 Di-NHS-PEG

RfS-Messungen von BSA/Anti-BSA auf Di-NHS-PEG

Zur Herstellung von Di-NHS-PEG-Schichten wurden zwei Reaktionszeiten getestet. Auch hier ließ man das PEG-Derivat entweder eine Stunde mit dem Aminosilan reagieren oder 12 Stunden. Danach wurden beide PEG-Oberflächen mit BSA umgesetzt. In Abbildung 48 und Abbildung 49 sieht man die RfS-Messungen von Anti-BSA auf den zwei unterschiedlichen Di-NHS-PEG-Oberflächen.

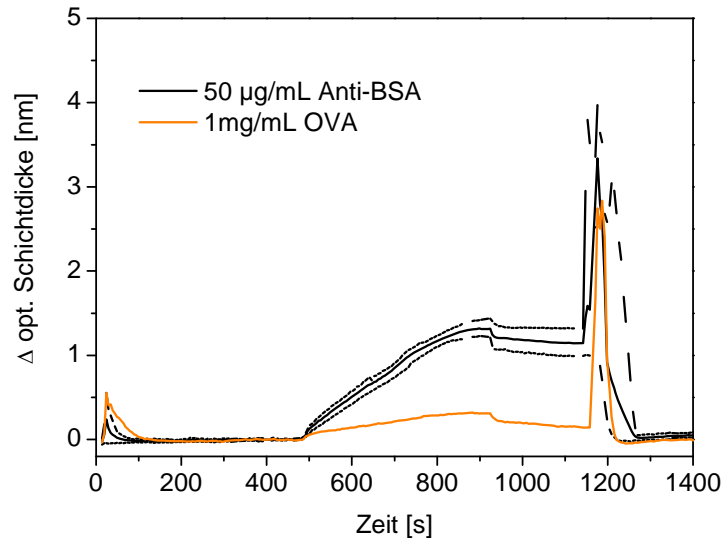


Abbildung 48: RifS-Messungen von Anti-BSA auf Di-NHS-PEG/BSA (1 Stunde)

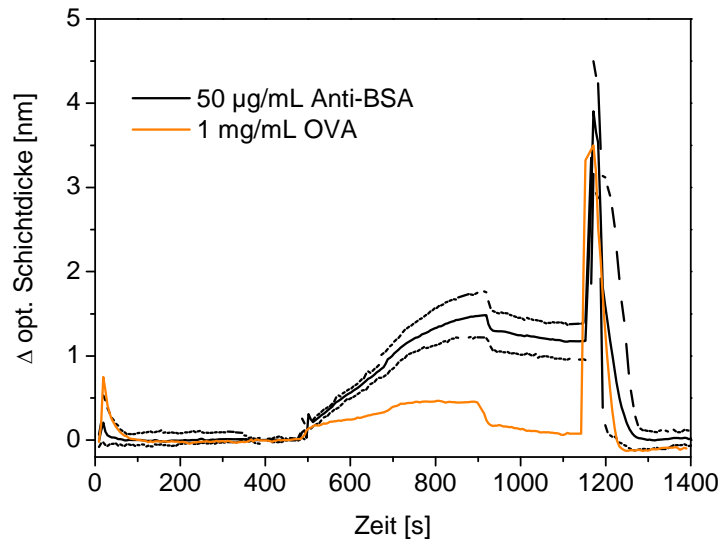


Abbildung 49: RifS-Messung von Anti-BSA auf Di-NHS-PEG/BSA (12 Stunden)

Die optische Schichtdickenänderung von 50 μ g/mL Anti-BSA ist auf Di-NHS-PEG (1 Stunde) geringfügig kleiner als auf Di-NHS-PEG (12 Stunden). Dafür ist auch die unspezifische Wechselwirkung von OVA geringer. In Abbildung 50 sind die Bindungssignale von Anti-BSA und OVA auf Di-NHS-PEG als Säulendiagramm dargestellt.

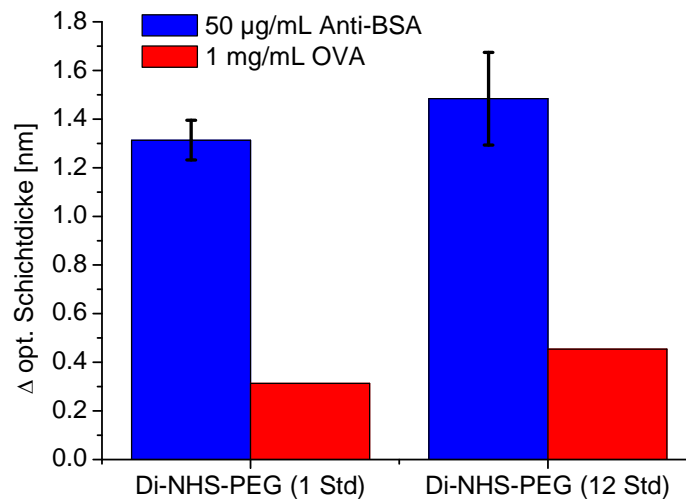


Abbildung 50: Bindungssignale von 50 µg/mL Anti-BSA und 1mg/mL OVA auf Di-NHS-PEG/BSA

Das Bindungssignal von Anti-BSA auf Di-NHS-PEG (12 Stunden) ist um ca 0,2 nm höher als auf Di-NHS-PEG (1 Stunde). Allerdings sind auch die Standardabweichung und die unspezifische Adsorption höher. In Tabelle 20 sind die Werte der spezifischen Anti-BSA-Anbindung, sowie die unspezifische Adsorption von OVA zusammengefasst.

Oberflächen	50 µg/mL Anti-BSA [nm]	1 mg/mL OVA [nm]
Di-NHS-PEG/BSA (1 Std)	1.31 ± 0.082	0.31
Di-NHS-PEG/BSA (12 Std)	1.48 ± 0.19	0.45

Tabelle 20: Bindungssignal von 50 µg/mL Anti-BSA und 1mg/mL OVA auf Di-NHS-PEG/BSA-Oberflächen

5.2.4.3 Vergleich von DA-PEG-2000/GA/BSA, Di-NHS-PEG/BSA und DC-PEG-2000/BSA

Welche Immobilisierungsstrategie gewählt wird ist immer davon abhängig was für funktionelle Gruppen der anzubindende Ligand besitzt. Im Falle von BSA ist es eine Aminogruppe. Dazu muss die Aminogruppe des DA-PEG-2000 zu einer Carboxylgruppe umfunktionalisiert werden. Anschließend wird über einen Aktivester das BSA kovalent angebunden. Die einzelnen Modifizierungsschritte sind in Kapitel 4.2.1 beschrieben. Um diese relativ aufwändige Funktionalisierung der sensitiven Schichten zu vereinfachen, wurden PEG-Derivate verwendet, die schon eine Carboxylgruppe bzw. NHS-Endgruppe aufweisen. In Abbildung 51 sind die RfS-Messungen von allen drei PEG-Derivaten abgebildet.

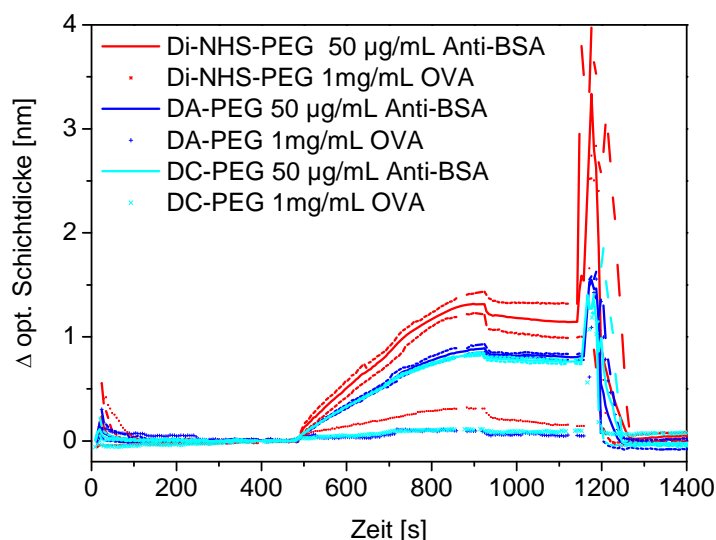


Abbildung 51: RfS-Messung von 50 µg/mL Anti-BSA und 1 mg/mL OVA auf DA-PEG-2000/GA/BSA, DC-PEG-2000/BSA und Di-NHS-PEG/BSA-Oberflächen

In Tabelle 21 sind die maximalen Bindungssignale von 50 µg/mL Anti-BSA und 1 mg/mL OVA auf den unterschiedlich modifizierten PEG-Derivaten zusammengefasst.

Oberfläche	50 µg/mL Anti-BSA [nm]	1 mg/mL OVA [nm]
Di-NHS-PEG/BSA	1.32 ± 0.10	0.31
DA-PEG-2000/GA/BSA	0.89 ± 0.04	0.09
DC-PEG-2000/BSA	0.84 ± 0.02	0.11

Tabelle 21: Bindungssignal von 50 µg/mL Anti-BSA und 1 mg/mL OVA auf Di-NHS-PEG/BSA, DA-PEG-2000/GA/BSA und DC-PEG-2000/BSA

Die Anti-BSA-Anbindung auf DA-PEG-2000/GA/BSA und DC-PEG-2000/BSA sind nahezu identisch. Die unspezifische Wechselwirkung von OVA ist ebenfalls auf beiden Oberflächen gering. Die spezifische Wechselwirkung des Antikörpers auf Di-NHS-PEG/BSA ist jedoch um ca. 0,4 nm höher als auf den DA-PEG-2000/GA/BSA und DC-PEG-2000/BSA. Allerdings ist auch die unspezifische OVA-Anbindung doppelt so hoch (siehe Abbildung 52).

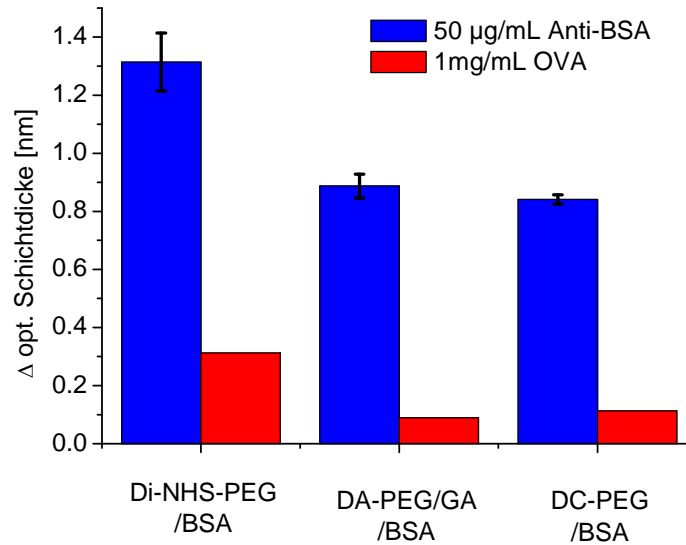


Abbildung 52: Bindungssignal von 50 µg/mL Anti-BSA und 1mg/mL OVA auf Di-NHS-PEG/BSA, DA-PEG/GA/BSA und DC-PEG/BSA

Zusammenfassend kann man sagen, dass man im Bezug auf DA-PEG-2000, man mit DC-PEG-2000 eine vergleichbare sensitive Schicht herstellen kann. Ein weiterer Vorteil liegt in der Vereinfachung der Präparation. Durch die Verwendung von Carboxyl-PEG fällt der Umfunktionalisierungsschritt mit Glutarsäureanhydrid weg. Dies ergibt eine Zeitersparnis von 6 Stunden.

Mittels Di-NHS-PEG fallen alle modifizierenden Zwischenschritte weg. Auf die Di-NHS-PEG-Schicht kann direkt BSA kovalent über die Aminogruppe angebunden werden. Desweiteren ist die spezifische Anbindung von Anti-BSA höher als auf den zwei anderen PEG-Oberflächen. Allerdings gilt das auch für die unspezifische Anbindung von OVA.

5.2.5 Zusammenfassung und Fazit

In diesem Kapitel wurden zwei PEG-Derivate (Di-Epoxid-PEG und Di-NHS-PEG) auf ihrer Schichtbildung und Modifikationsfähigkeit hin getestet. Dafür wurde die Reaktionsdauer der PEG-Derivate variiert (1 Stunde und 12 Stunden). Des Weiteren wurde die Di-Epoxid-PEG-Oberfläche mit einem Liganden mit Carboxylgruppe (Testosteronoxim) sowie mit einem aminofunktionalisierten Liganden (BSA) umgesetzt. Das Di NHS-PEG wurde ebenfalls mit BSA funktionalisiert. Die unterschiedlich funktionalisierten PEG-Oberflächen wurden mittels entsprechenden Antikörpern auf ihre Spezifität hin untersucht. Die Abschirmung vor unspezifischer Adsorption wurde mittels Ovalbumin getestet.

Die Kontaktwinkelmessungen zeigen, dass die Epoxid-Oberfläche mit einer Reaktionszeit von 12 Stunden deutliche hydrophober ist als die Epoxid-Oberfläche nach einer Stunde. Dies spricht dafür, dass die Epoxid-Endgruppen mit der Zeit abreagieren und eine relativ hydrophobe Oberfläche gebildet wird. Die NHS-Engruppen sind im Vergleich dazu relativ stabil. Die Kontaktwinkel von Di-NHS-PEG (1 Stunde) und (12 Stunden) sind nahezu gleich.

Die AFM-Messungen zeigen, dass die Transduceroberflächen von Di-Epoxid- und Di-NHS-PEG-gleichmäßig bedeckt werden. Vergleicht man die Rauigkeit der Oberflächen sieht man, dass die Aminosilanoberfläche mit einem RMS-Wert von 0,3 nm am homogensten und die Di-Epoxid-PEG

Oberflächen (12 Stunden) mit einem RMS-Wert von ca 1,1 nm am inhomogensten ist. Die Oberflächentopographie und RMS-Werte von beiden Di-NHS-PEG-Oberflächen (1 Stunde und 12 Stunden) sind nahezu identisch.

Vergleicht man die RfS-Messungen von Anti-Testosteron auf Di-Epoxid-PEG/Testosteronoxim sieht man deutliche Unterschiede in der spezifischen Wechselwirkung des Antikörpers. Die Epoxid-Oberfläche mit einer Reaktionszeit von einer Stunde zeigt deutlich höhere spezifische Bindungssignale als die Epoxid-Oberfläche, die 12 Stunden gelagert wurde. Ungünstiger Weise ist die unspezifische Adsorption auf beiden Oberflächen relativ hoch. Auch bei der Modifizierung mit BSA sieht man ein höheres spezifisches Bindungssignal auf Di-Epoxid-PEG (1 Stunde). Die Qualität der Abschirmung von unspezifischer Adsorption schwankt sehr stark auf den Di-Epoxid-PEG-Oberflächen.

Die RfS-Messungen von Anti-BSA auf Di-NHS-PEG/BSA bestätigen die schon durch die Kontaktwinkelmessungen und AFM-Messungen ermittelten Ergebnisse. Die spezifische Wechselwirkung des Antikörpers auf Di-NHS-PEG/BSA ist auf beiden Oberflächen, ob 1 Stunde oder 12 Stunden Reaktionsdauer, nahezu gleich. Die unspezifische Anbindung ist auf beiden relativ gering.

In Tabelle 22 sind die unterschiedlichen Präparationsschritte mit den entsprechenden Zeiten zusammengefasst.

Oberfläche	Silanisierung	PEG-Immobilisierung	Umfunktionalisierung	Aktivierung	BSA-Anbindung	Gesamtdauer
DA-PEG-2000/GA/BSA	1 Stunde	12 Stunden	6 Stunden	4 Stunden	6 Stunden	29 Stunden
DC-PEG-2000/BSA	1 Stunde	12 Stunden	-	4 Stunden	6 Stunden	23 Stunden
Di-Epox-PEG/BSA	1 Stunde	1 Stunde	-	-	6 Stunden	8 Stunden
Di-NHS-PEG/BSA	1 Stunde	1 Stunde	-	-	6 Stunden	8 Stunden

Tabelle 22: Zusammenfassung der Präparationsschritte und Herstellungsdauer der sensitiven Schichten

Der Silanisierungsschritt ist für alle sensitiven Schichten gleich. Bei der Immobilisierung des PEG-Derivates kommt es stark darauf an, welche funktionelle Endgruppe das PEG besitzt. Bei Di-Epoxid- und Di-NHS-PEG ist eine Stunde für die kovalente Anbindung an das Silan ausreichend um eine homogene und reaktive Oberfläche zu erhalten. Bei der Verwendung von Di-Epoxid-PEG ist es sogar besser nach einer Stunde Immobilisierungsdauer die Oberfläche zügig weiter zu verarbeiten, damit noch genügend aktive Epoxidgruppen für die Umsetzung mit dem Liganden übrig sind. Die NHS-Endgruppen sind dahingegen stabiler. Im Vergleich mit einer DA-PEG2000/GA/BSA-Oberfläche (Herstellungsdauer: 29 Stunden) verkürzt sich die Herstellungszeit mittels Di-Epoxid-PEG um 21 Stunden. Bei Verwendung von DA-PEG-2000 muss die Umfunktionalisierung der Aminogruppen zu Carboxylgruppen, die Aktivierung der Carboxylgruppen noch zusätzlich mit einbezogen werden. Gleichwertige Ergebnisse erzielt man auch mit DC-PEG-2000/BSA. Allerdings ist auch hier die Aktivierung mit zu berücksichtigen. Die Herstellungsdauer einer vergleichbaren sensitiven Oberfläche mittels Di-Epoxid-PEG bzw. Di-NHS-PEG beträgt nur 8 Stunden.

Immobilisiert man einen Liganden mit Carboxylgruppe (Bsp. Testosteronoxim) entfällt die Umfunktionalisierung und Aktivierung der Amino-PEG-Schicht.

5.3 Charakterisierung und Vergleich von Silan-PEG und DA-PEG-2000

Wie schon im vorangegangenen Kapitel erläutert, soll auch der Einsatz von Silan-PEG die Funktionalisierung der Sensoroberfläche vereinfachen und verkürzen, ohne dabei die gewünschten Eigenschaften der sensitiven Schicht zu verlieren. Durch die Verwendung von Silan-PEG, entfällt der Präparationsschritt mit einem Silan-Derivat (siehe 4.2.1.2). Die Silan-PEG-Lösung kann direkt auf das gereinigte Glassubstrat aufgebracht werden.

Verglichen werden die Ergebnisse mit RfS-Messungen auf dem Referenzsystem DA-PEG-2000/Testosteronoxim. Desweiteren soll gezeigt werden, dass die Präparation von DA-PEG-2000-Schichten durch die Verwendung eines anderen Lösungsmittels vereinfacht werden kann.

5.3.1 Präparation der sensitiven Schichten

Silan-PEG hat ein Molekulargewicht von 3400 Dalton (siehe Abbildung 53). Zur Immobilisierung von Silan-PEG löste man 2 Millimol des PEG-Derivates in DMSO. Die PEG/DMSO-Lösung wurde für 1 Stunde geschüttelt (Rütteltisch). Es bildet sich eine gallertartige Lösung. Danach wurde das Silan-PEG einen mit Piranha gereinigten Glastransducer getropft und mit einem zweiten Transducer gedeckelt. Die Reaktionszeit variierte zwischen 1 Stunde, 4 Stunden und 12 Stunden. Während dieser Zeit wurden die Transducer in einer mit DMSO-Dampf gesättigten Kammer gelagert. Danach wurden die Glaschips mit DMSO abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend wurden sie mit Testosteronoxim umgesetzt. In Abbildung 53 sind die Strukturformeln von Silan-PEG und DA-PEG-2000 dargestellt.

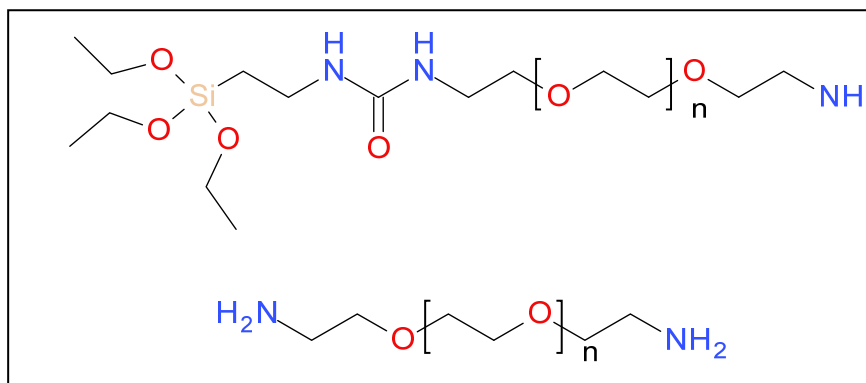


Abbildung 53: Silan-PEG, Mw 3400 (oben) und DA-PEG-2000, Mw 2000 (unten)

Die GOPTS/DA-PEG-2000-Filme wurden wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben hergestellt und ebenso mit Testosteronoxim umgesetzt. Grundsätzlich wird DA-PEG-2000 in Dichlormethan (DCM) gelöst und auf den Glastransducer getropft. Das DA-PEG-2000 wird bei 70°C über Nacht auf die Oberfläche aufgeschmolzen. DCM ist bei Raumtemperatur sehr flüchtig. Es kann passieren, dass bei der Aufbringung der PEG/DCM-Lösung die Transducer nicht zügig genug in den Ofen gelegt werden und das PEG-Derivat keine homogene Schicht auf der Glasoberfläche bildet. Die Glastransducer können trübe werden und für weitere Verwendungen unbrauchbar sein. Desweiteren ist DCM gesundheitsgefährdend und es besteht der Verdacht auf krebserzeugende Wirkung. Um diese Gefahren zu vermeiden, wurde in

dieser Arbeit noch ein anderes Lösungsmittel getestet. 2 Millimol des DA-PEG-2000 wurde in Wasser gelöst. Die mit GOPTS silanisierten Glaschips wurden mit der PEG/Wasser-Lösung benetzt und aufeinander gelegt. Die Glastransducer wurden über Nacht in einer mit Wasserdampf gesättigten Kammer gelagert. Die Umsetzung der PEG-Oberfläche mit Testosteronoxim wurde wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben durchgeführt. In Tabelle 23 ist zusammengefasst welche Parameter zur Herstellung der PEG-Filme variiert worden sind.

PEG-Derivat	Lösungsmittel	Reaktionsdauer
Silan-PEG	DMSO	1 Stunde
Silan-PEG	DMSO	4 Stunden
Silan-PEG	DMSO	12 Stunden
DA-PEG-2000	DCM, 70°C	12 Stunden
DA-PEG-2000	H ₂ O, Raumtemperatur	12 Stunden

Tabelle 23: Zusammenfassung der einzelnen Lösungsmittel und jeweiligen Reaktionsdauer der Beschichtung

5.3.2 Kontaktwinkel

Die Kontaktwinkelmessungen wurden unter Reinraumatmosfera durchgeführt. Pro Transducer wurden 2 bis 3 Wassertropfen (5 μL) vermessen. In Abbildung 54 und in Tabelle 24 sind die Kontaktwinkel der jeweiligen Oberflächen als Säulendiagramm und tabellarisch zusammengefasst. Außer Silan-PEG (1 Stunde), das einen Kontaktwinkel von $26,7^\circ$ aufweist, liegen die Kontaktwinkel aller PEG-Oberflächen im gleichen Größenordnungsbereich um die 30° . Durch die ähnliche Zusammensetzung von der Silan-PEG-Schicht und der GOPTS/DA-PEG-2000-Schicht ergeben sich auch ähnlich hydrophile Oberflächen.

Oberfläche	Kontaktwinkel Θ [°]
Silan-PEG (1 Std)	27 ± 3
Silan-PEG (4 Std)	33 ± 9
Silan-PEG (12 Std)	33 ± 6
GOPTS	31 ± 2
GOPTS/DA-PEG (DCM)	33 ± 3
GOPTS/DA-PEG (H ₂ O)	29 ± 3

Tabelle 24: Kontaktwinkel von Silan-PEG- und GOPTS/DA-PEG-Oberflächen

Auch die Kontaktwinkel von DA-PEG-2000 (DCM) und DA-PEG-2000 (H₂O) liegen nahe beieinander. Dies lässt vermuten, dass das Lösungsmittel in diesem Fall keinen großen Einfluss auf die Oberflächenpolarität der PEG-Schichten nimmt.

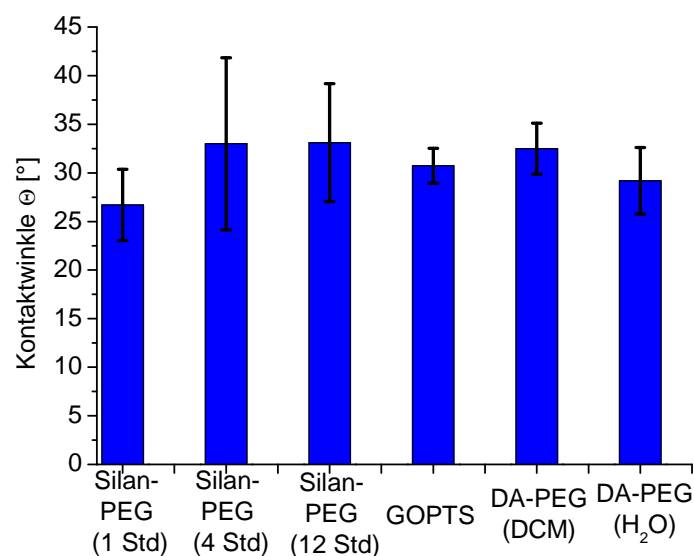


Abbildung 54: Kontaktwinkel auf den unmodifizierten Silan-PEG-Derivaten, DA-PEG-2000 und GOPTS

5.3.3 AFM

In der Tabelle 25 sind die AFM-Aufnahmen der unterschiedlich präparierten Silan-PEG-Schichten, sowie die der DA-PEG-2000-Schichten zusammengefasst. Die PEG-Oberflächen sind noch unmodifiziert.

Polymer	3D	Querschnitt
Silan-PEG (1 Std)		
Silan-PEG (4 Std)		
Silan-PEG (12 Std)		
DA-PEG- 2000 (DCM)		
DA-PEG- 2000 (H2O)		

Tabelle 25: AFM-Aufnahmen von Silan-PEG und DA-PEG-2000, Höhenskala 15 nm (3D) und 5 nm (Querschnitt)

Alle verwendeten PEG-Lösungen erzeugen eine gleichmäßige Bedeckung der Transduceroberflächen. Die Querschnittsdarstellungen (letzte Spalte) zeigen jedoch geringfügige Unterschiede. Die Silan-PEG-Oberfläche (12 Stunden) hat eine höhere Rauigkeit als die Silan-PEG-Schichten mit kürzerer Reaktionsdauer. Einen größeren Unterschied sieht man zwischen den Silan-PEG und den DA-PEG-2000-Oberflächen. Beide, DA-PEG (DCM) und DA-PEG-2000 (H₂O) zeigen eine unruhige Oberfläche. Anhand der AFM-Aufnahmen der Silan-PEG-Oberflächen lässt sich die Tendenz erkennen, dass mit zunehmender Reaktionszeit die Oberfläche ebenfalls inhomogener wird. Die Topographien der DA-PEG-2000-Schichten (DCM und H₂O) sind sich recht ähnlich. Dies zeigt, dass trotz der Verwendung von Wasser als Lösungsmittel die Oberflächenhomogenität vergleichbar ist mit der von DA-PEG-2000 (DCM). Dies zeigen auch die ermittelten RMS-Werte. Die Rauigkeit der Silan-PEG-Oberflächen sind deutlich geringer, als die der DA-PEG-2000-Oberflächen. In Abbildung 55 und Tabelle 26 sind die RMS-Werte als Säulendiagramm und tabellarisch zusammengefasst.

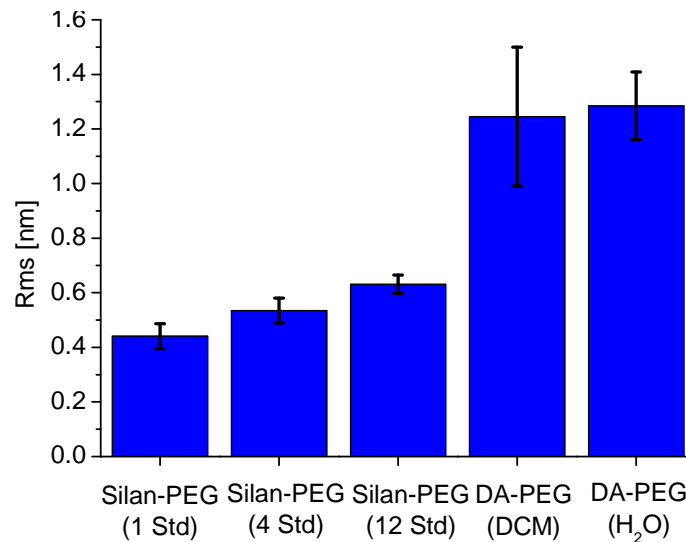


Abbildung 55: Rms-Werte von Silan-PEG und DA-PEG-2000

Oberflächen	Rms-Wert [nm]
Silan-PEG (1 Std)	0.44 ± 0.05
Silan-PEG (4 Std)	0.53 ± 0.04
Silan-PEG (12 Std)	0.63 ± 0.03
DA-PEG (DCM)	1.25 ± 0.26
DA-PEG (H ₂ O)	1.29 ± 0.12

Tabelle 26: Rauigkeiten von Silan-PEG- und DA-PEG-Oberflächen

Zusammenfassend kann man sagen, dass mit steigender Reaktionsdauer die Silan-PEG-Oberflächen leicht inhomogener werden und die Rauigkeit zunimmt. Die unterschiedlich präparierten DA-PEG-2000 Oberflächen sind sich untereinander topographisch ähnlich. Allerdings sind sie deutlich rauer als die Silan-PEG-Oberflächen. Ihre RMS-Werte sind doppelt so hoch und auch die AFM-Aufnahmen zeigen unruhige und relativ inhomogene Oberflächen.

5.3.4 RfS

Alle RfS-Messungen wurden mit dem Hamilton-Aufbau wie im Kapitel 4.2.2 beschrieben durchgeführt. Zuerst wird der Einfluss der Reaktionszeit auf die sensitive Silan-PEG-Schicht untersucht. Desweiteren wird getestet in wie weit das Lösungsmittel die DA-PEG-2000-Schicht beeinflusst. Alle Silan-PEG-Oberflächen und DA-PEG2000-Oberflächen wurden mit Testosteronoxim umgesetzt. Jede Antikörperkonzentration wurde dreifach vermessen. Die unspezifische Wechselwirkung wurde mittels OVA getestet.

5.3.4.1 Silan-PEG/Testosteronoxim: Vergleich der Reaktionszeiten

In Abbildung 56, Abbildung 57 und Abbildung 58 sieht man die RfS-Messungen von Anti-Testosteron auf den unterschiedlich präparierten Silan-PEG-Schichten.

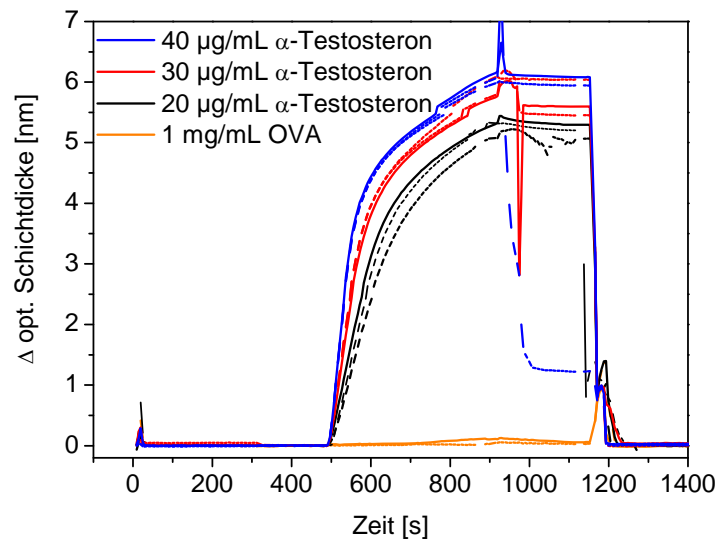


Abbildung 56: RfS-Messung von 3 Anti-Testosteronkonzentrationen (Dreifachbestimmung) und 1 mg/mL OVA auf Silan-PEG/Testosteronoxim (1 Stunde)

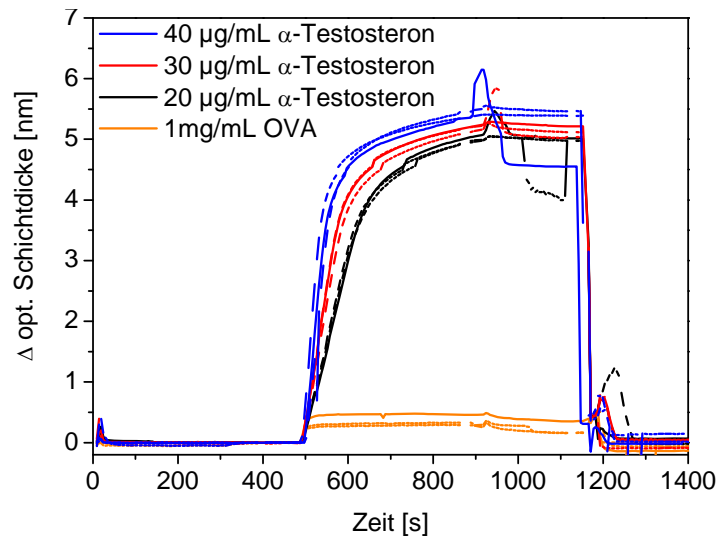


Abbildung 57: RfS-Messungen von 3 Anti-Testosteronkonzentrationen (Dreifachbestimmung) und 1 mg/mL OVA auf Silan-PEG/Testosteronoxim (4 Stunden)

Einzelne Signalverläufe auf den Silan-PEG (1 Stunde) und (4 Stunden) weisen Unregelmäßigkeiten in Form von kurzzeitigen Signalspitzen am Ende der Injektion auf. Dies liegt im Messprogramm begründet. Um eine Vermischung von Probe und Puffer zu vermeiden, wird die aufgezugene Probe durch 30 μL großen Luftblasen am Anfang und am Ende vor dem sich ebenfalls im Probenschlauch befindlichen Puffer getrennt. Bei einer zu lang gewählten Injektionszeit wird am Ende noch zusätzlich ein Teil dieser Trennungsluftblase in die Flusszelle injiziert. Dies führt zu einem Brechungsindexsprung, der sich als Peak im Signalverlauf zeigt. Da die Luftblase jedoch das eigentliche Bindungsereignis nicht beeinflusst, wurden diese Messungen zur Auswertung mit herangezogen.

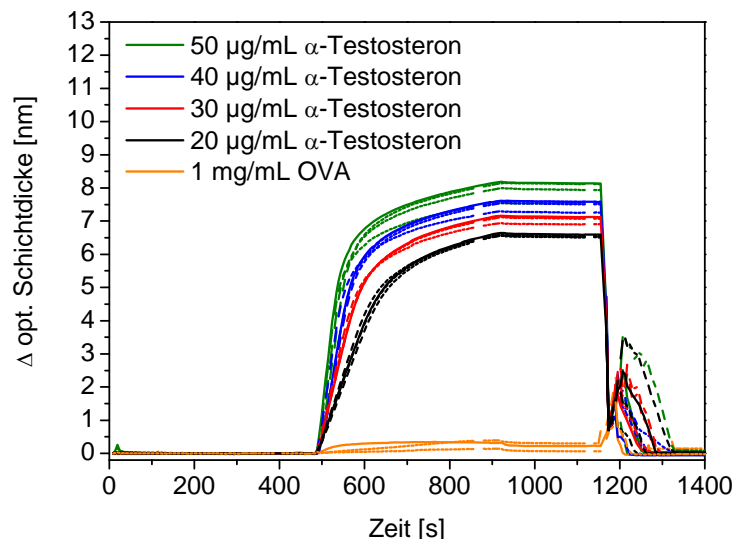


Abbildung 58: RfS-Messungen von 4 Anti-Testosteronkonzentrationen (Dreifachbestimmung) und 1 mg/mL OVA auf Silan-PEG/Testosteron (12 Stunden)

Die Bindungssignale unterscheiden sich zum einen in der Signalthöhe und in ihrer Form. Die detektierten Bindungskurven auf Silan-PEG (1 Stunde) gehen im Gegensatz zu Silan-PEG (4 Stunden) und (12 Stunden)

in keine Sättigung. Die besten Bindungssignale erhält man auf Silan-PEG (12 Stunden). Hier war es auch mögliche eine weitere Antikörperkonzentration zu vermessen. Die Regenerierbarkeit ist bei allen Silan-PEG-Oberflächen gewährleistet.

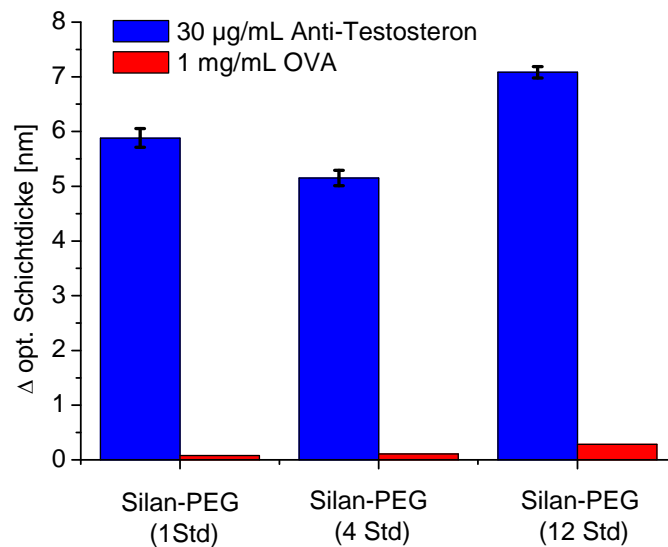


Abbildung 59: Bindungssignale von 30 µg/mL Anti-Testosteron auf Silan-PEG 1 Stunde, 4 Stunden und 12 Stunden

Das Säulendiagramm in Abbildung 59 und die Tabelle 27 zeigen die Signalhöhen von 30 µg/mL Anti-Testosteron und 1mg/mL OVA auf den verschiedenen Silan-PEG-Oberflächen. Hier erkennt man, dass die unspezifische Wechselwirkung mit steigender Immobilisierungsdauer zunimmt. Jedoch ist das spezifische Bindungssignal auf Silan-PEG (12 Stunden) am höchsten.

Oberfläche	30 µg/mL Anti-Testosteron [nm]	1 mg/mL OVA [nm]
Silan-PEG (1 Std)/Testosteron	5.88 ± 0.17	0.08
Silan-PEG (4 Std)/Testosteron	5.15 ± 0.14	0.11
Silan-PEG (12 Std)/Testosteron	7.08 ± 0.10	0.28

Tabelle 27: Bindungssignale von 30 µg/mL Anti-Testosteron und 1 mg/mL OVA auf Silan-PEG/Testosteron-Oberflächen

Die RfS-Messungen zeigen, dass die beste sensitive Silan-PEG-Schicht nach 12 Stunden Reaktionszeit erhalten wird. Die spezifischen Bindungssignale sind auf dieser Schicht am höchsten. Auch der kinetische Verlauf der Bindungskurven entspricht den Erwartungen bei diesem Antikörperkonzentrationsbereich. Die unspezifische Adsorption von OVA mit 0,28 nm ist im Toleranzbereich.

5.3.4.2 DA-PEG-2000/Testosteronoxim: Vergleich der Lösungsmittel DCM und Wasser

In Abbildung 60 und Abbildung 61 sieht man die Anbindung von Anti-Testosteron und OVA auf den auf unterschiedliche Weise präparierten DA-PEG-2000/Testosteronoxim-Oberflächen. Beide Sensoroberflächen zeigen eine spezifische Wechselwirkung mit dem Analyten. Die Oberflächen zeigen auch nach der Regeneration gleich hohe Bindungssignale bei gleicher Analytkonzentration. Bei beiden sieht man eine geringe unspezifische Wechselwirkung mit Ovalbumin.

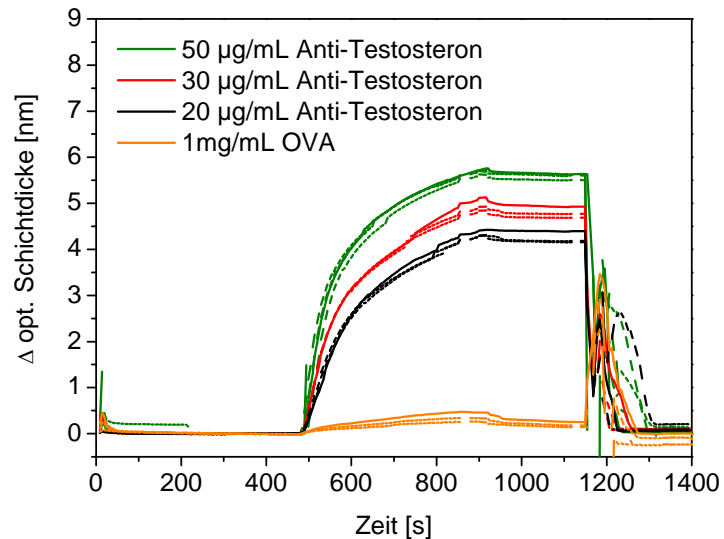


Abbildung 60: RfS-Messungen von 3 Anti-Testosteronkonzentrationen und 1mg/mL OVA auf DA-PEG-2000/Testosteronoxim (DCM)

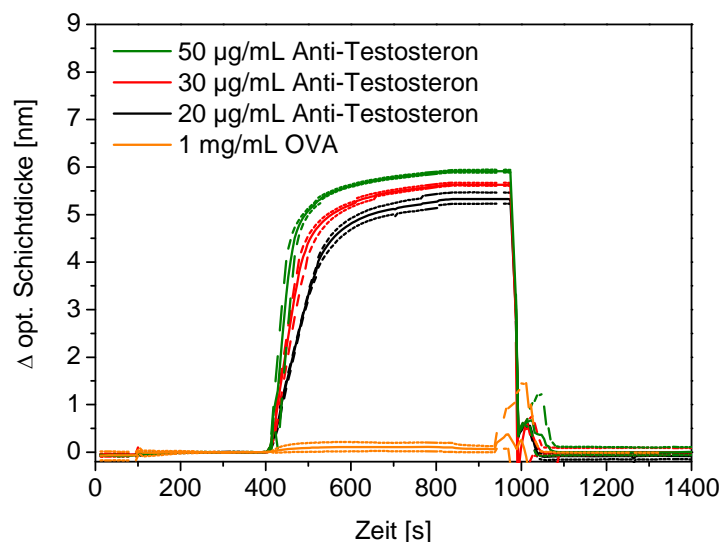


Abbildung 61: RfS-Messungen von 3 Anti-Testosteronkonzentrationen und 1 mg/mL OVA auf DA-PEG-2000/Testosteronoxim (H₂O)

Die obigen RfS-Messungen zeigen Ungleichheiten zwischen den unterschiedlichen präparierten PEG/Testosteronoxim-Oberflächen. Beide Sensoroberflächen zeigen trotz der gleichen Schichtzusammensetzung und Antikörperkonzentration, unterschiedliche Bindungssignale. Auf DA-PEG-2000/Testosteronoxim (DCM) ist die Oberfläche auch bei der hohen Analytkonzentration von 50 μ g/mL nicht gesättigt. Im Gegensatz zur DA-PEG-2000-Oberfläche präpariert bei Raumtemperatur und Wasser

als Lösungsmittel, wo sich deutlich die kinetisch kontrollierte Wechselwirkung zwischen immobilisierten Ligand und Analyten in der Form der Bindungskurve widerspiegelt.

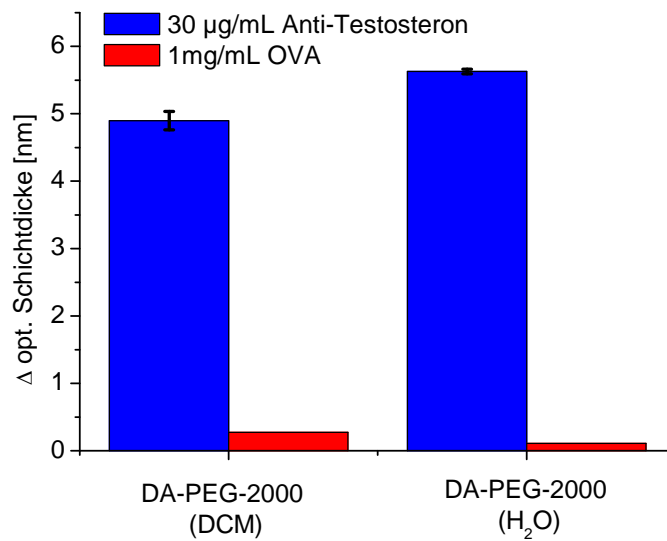


Abbildung 62: Bindungssignale von 30 µg/mL Anti-Testosteron auf DA-PEG-2000/Testosteronoxim (DCM) und DA-PEG-2000/Testosteronoxim (H₂O)

Oberfläche	30 µg/mL Anti-Testosteron [nm]	1 mg/mL OVA [nm]
DA-PEG-2000 (DCM)/Testosteron	4.90 ± 0.14	0.28
DA-PEG-2000 (H ₂ O)/Testosteron	5.63 ± 0.03	0.11

Tabelle 28: Bindungssignal von 30 µg/mL Anti-Testosteron und 1 mg/mL OVA auf DA-PEG-2000/Testosteron-Oberflächen

Auch die Abschirmung vor unspezifischer Wechselwirkung ist auf der DA-PEG-2000/Testosteronoxim (H₂O)-Oberfläche besser. Die maximale Signalthöhe bei 50 µg/mL Antikörper ist jedoch auf beiden Oberflächen vergleichbar (siehe Abbildung 62).

5.3.5 Zusammenfassung und Fazit

Die optimalste Silan-PEG-Beschichtung erhält man bei einer Reaktionszeit von 12 Stunden. Die Herstellungsdauer verkürzt sich im Vergleich zu DA-PEG 2000-Schichten um eine Stunde, da der Silanisierungsschritt mit GOPTS wegfällt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass:

- Alle Amino-PEG-Oberflächen, Silan-PEG sowie DA-PEG-2000 weisen einen Kontaktwinkel von ca. 30° auf, was auf eine ähnliche Oberflächenzusammensetzung schließen lässt.
- Mit Silan-PEG und DA-PEG-2000 erhält man homogen beschichtete Transduceroberflächen
- Die besten spezifischen Bindungssignale erhält man auf Silan-PEG/Testosteronoxim (12 Stunden) und auf DA-PEG-2000/Testosteronoxim (H₂O).
- Mit in Wasser gelöste DA-PEG-2000 erhält man auf einfacheren, ungiftigeren Weg qualitativ vergleichbare Ergebnisse, als mit in DCM gelösten DA-PEG-2000.
- Auf beiden Oberflächen sind reproduzierbare Messungen möglich, d.h. sie sind regenerierbar.
- Die Abschirmung von unspezifischer Proteinadsorption ist auf beiden PEG-Oberflächen gewährleistet.

5.4 AFM-Aufnahmen von Biopolymeren im wässrigen Medium

Da optische Biosensoren hauptsächlich in wässrigen Medien eingesetzt werden, erhält man ein realistischeres Bild der Biopolymeroberfläche, wenn man die AFM-Aufnahmen in Wasser aufnimmt. Aminodextran und auch Poly(ethylenglykol) lagern Wassermoleküle in ihre Polymerstruktur ein und quellen. Dadurch verändern sich die Polymereigenschaften und die Oberflächentopographie der sensitiven Schicht. Im folgenden Kapitel werden AFM-Aufnahmen von Dextran- und Poly(ethylenglykol)-Schichten gezeigt. Zum einen aufgenommen an Luft und zum anderen aufgenommen im Wasser. Alle Scans wurden im Tapping Modus aufgenommen um eventuelles Mitschleifen des weichen Biopolymers zu vermeiden [53].

5.4.1 Vergleich von Diamino-PEG mit verschiedenen Molekulargewichten und Aminodextran

Poly(ethylenglykol) gibt es in unterschiedlichsten Kettenlängen. ES sind vier PEG-Derivate exemplarisch herausgenommen und untersucht worden. Das Molekulargewicht variiert von 900 über 2000, 3000 bis 6000 Dalton. Alle PEG-Derivate besitzen Aminogruppen als Endgruppen. Die Beschichtung der Transducer wurde wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben durchgeführt. Um das Quellverhalten von AMD im Vergleich zu PEG zu untersuchen, wurden ebenso AFM-Bilder von AMD modifizierte Transducer in Wasser aufgenommen. Allgemein sind die Aufnahmen in Wasser verrauschter als die Aufnahmen in Luft. Dies rührt daher, dass durch den Tapping Modus der Cantilever in Schwingung versetzt wird. Diese schwingende Spitze erfährt in Wasser eine stärkere Reibung als an Luft. Der ebenfalls in Schwingung versetzte Wassertropfen beeinflusst ebenfalls den Cantilever. In Tabelle 29 und Tabelle 30 sind die AFM-Aufnahmen in Wasser und zum Vergleich auch die Aufnahmen in Luft von den Biopolymeren sowie von der reinen Glassubstratoberfläche zusammengefasst.

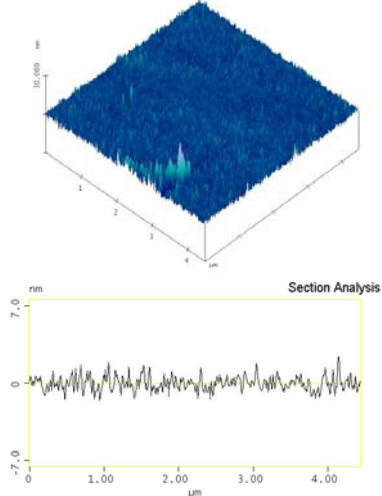
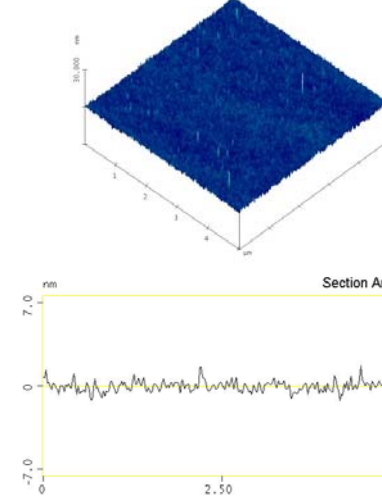
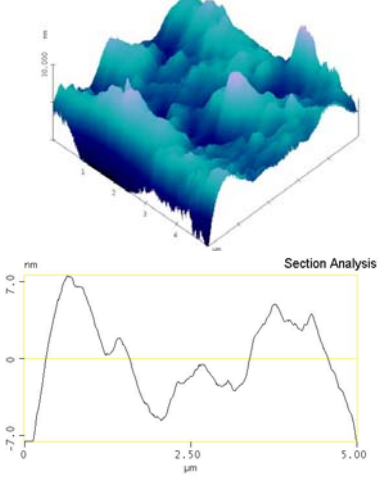
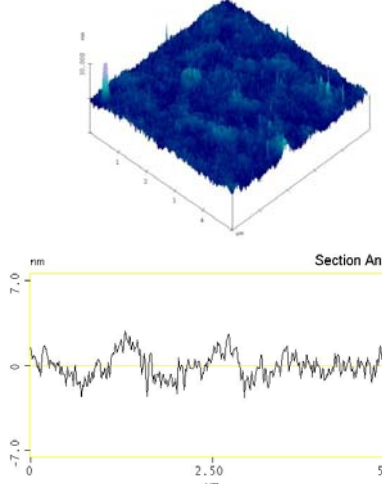
Oberfläche	Wasser	Luft
reines SiO ₂		
AMD		

Tabelle 29: AFM-Aufnahmen von reinem Glassubstrat, AMD Höhenskala 15nm aufgenommen in Wasser und in Luft.

Betrachtet man die Oberflächentopographie vom reinen Glassubstrat aufgenommen in Wasser und Luft, sieht man nur einen geringfügigen Unterschied. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die AFM-Aufnahmen von Biopolymeren aufgenommen in Luft erheblich von denen, die in Wasser aufgenommen wurden. Sehr deutlich wird das bei AMD. Die Hydrogelschicht quillt beinahe zu ihrer doppelten Schichtdicke an. Die zuvor nur schwach sichtbare wolkenartige Struktur zeigt sich im Wasser sehr deutlich.

Anhand der Luft-Aufnahmen der einzelnen PEG-Derivate kann man keine Rückschlüsse auf die Kettenlänge ziehen. Benetzt man die Oberflächen mit Wasser kommt es zum Quellen der PEG-Schichten. Die Wasser-AFM-Aufnahme von DA-PEG-900 zeigt eine flache, einheitliche Oberfläche. Die gleiche Oberfläche aufgenommen in Luft zeigt geringe Unebenheiten, ist aber dennoch relativ gleichmäßig. Etwas anders sieht es bei den länger-kettigen PEG-Derivaten aus. Ab DA-PEG-2000 ist das Quellen in Wasser deutlich sichtbar. Vergleicht man die Wasser-AFM-Aufnahmen sehen sich DA-PEG-2000 und DA-PEG-3000 was das Höhenprofil betrifft recht ähnlich. Der Unterschied von 1000 Dalton scheint keine große Veränderung in der Oberflächentopographie zu erzeugen. Auch die Luft-Aufnahmen der beiden PEG-Schichten sind vergleichbar.

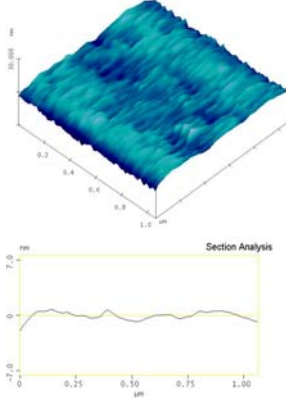
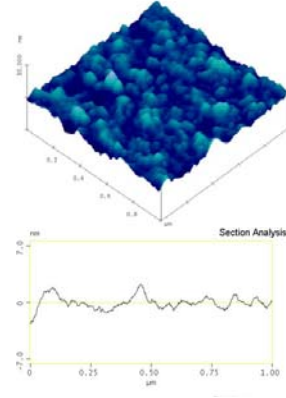
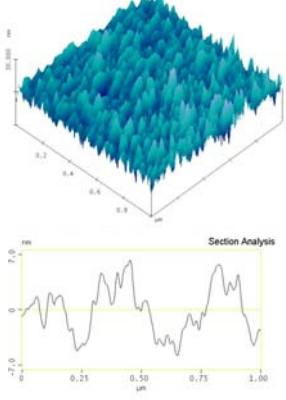
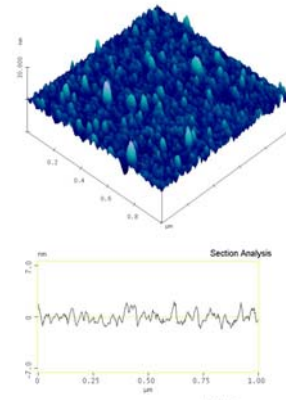
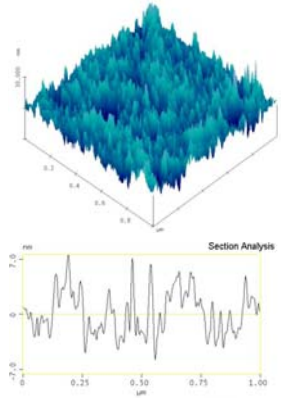
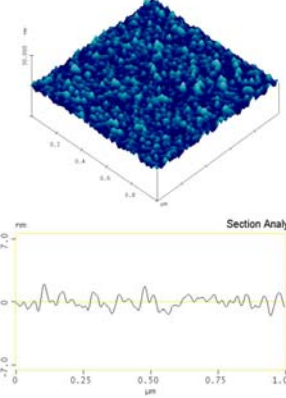
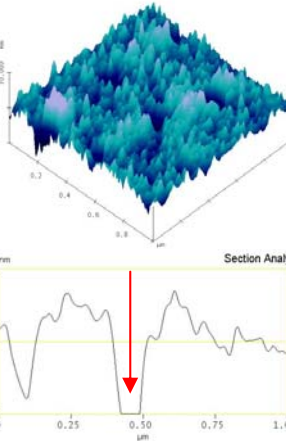
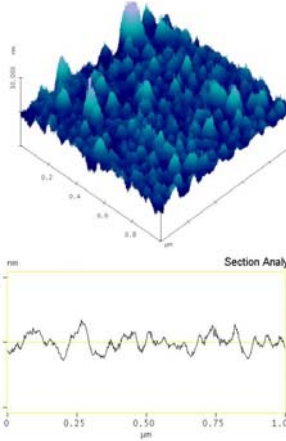
Oberfläche	Wasser	Luft
DA-PEG-900		
DA-PEG-2000		
DA-PEG-3000		
DA-PEG-6000		

Tabelle 30: AFM-Aufnahmen von DA-PEG-900; DA-PEG-2000, DA-PEG-3000 und DA-PEG-6000 aufgenommen in Wasser und in Luft

Ab dem Molekulargewicht von 6000 Dalton sieht man jedoch deutliche Unterschiede. Durch die höhere Anzahl an Ethyleneinheiten können sich mehr Wassermoleküle einlagern. Dies macht sich im Höhenprofil deutlich bemerkbar. Allerdings sieht man nicht nur eine Schichtdickenzunahme (größer 15 nm) sondern es bilden sich zum Teil tiefe Krater in der Oberfläche (siehe roter Pfeile in Tabelle 30).

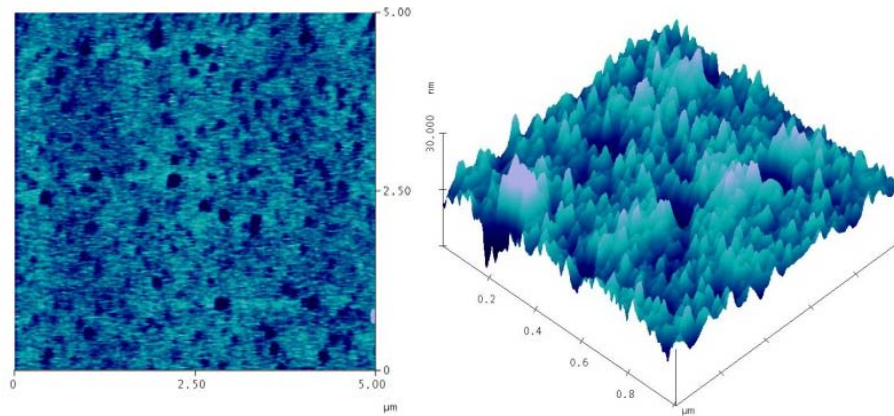


Abbildung 63: AFM-Aufnahme in Wasser von DA-PEG-6000 $5 \mu\text{m}^2$ (links) und $1 \mu\text{m}^2$ (recht)

In Abbildung 63 sieht man die tiefen Löcher noch deutlicher. Gezeigt ist ein Scanbereich von $5 \mu\text{m}^2$ und einer Höhenskala von 15 nm.

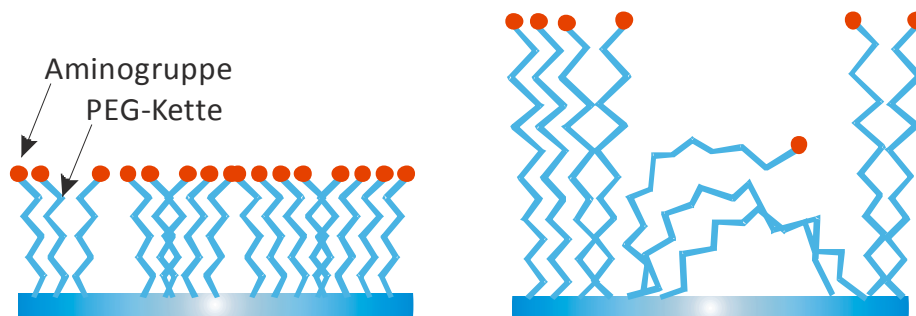


Abbildung 64: schematische Darstellung von PEG-Schichten mit unterschiedlichen Kettenlängen

Eine mögliche Erklärung dieser Lochbildung ist, dass ab einer gewissen Länge sich die Polymerketten biegen und auch die zweite Aminofunktion mit der Silan-Oberfläche reagiert. Somit sind beide Kettenenden kovalent an die Oberfläche gebunden (siehe Abbildung 64). Das Glassubstrat ist nicht mehr gleichmäßig, homogen bedeckt und die Anzahl an funktionellen Gruppen für die weitere Modifizierung verringert sich.

5.4.1.1 Vergleichende RfS-Messungen der unterschiedlich schweren DA-PEG-Derivaten

Um festzustellen ob die Kettenlänge einen Einfluss auf die Effektivität der sensitiven Sensorschicht hat wurden an die immobilisierten PEG-Ketten Biotin kovalent angebunden. Streptavidin wurde als Analyt gewählt, da dieses durch seine hohe Affinität und Spezifität zum Biotin eindeutige Bindungssignale zeigt. Durch die hohe Affinität ist eine Regeneration der Oberfläche nicht möglich. Es wurde somit nur eine Messung pro Chip durchgeführt. In Abbildung 65 ist die optische Schichtdickenänderung von $50 \mu\text{g/mL}$ Streptavidin auf den unterschiedlichen PEG/Biotin-Oberflächen aufgetragen.

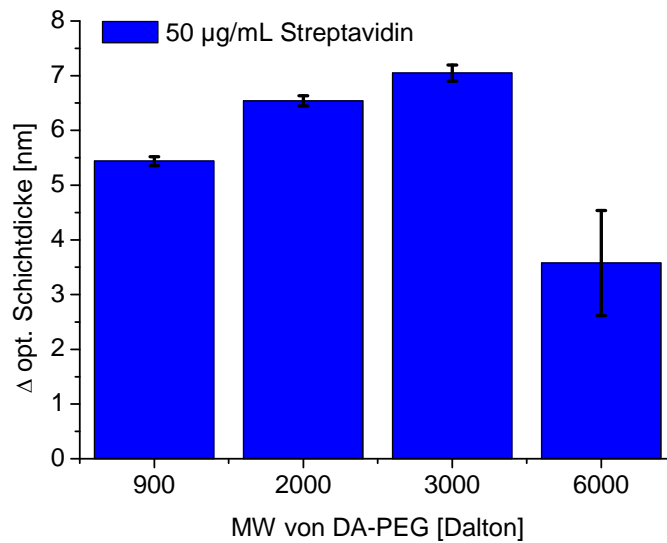


Abbildung 65: RfS-Messungen von 50 µg/mL Streptavidin auf DA-PEG/Biotin mit unterschiedlichen Molekulargewicht

Oberfläche	50 µg/mL Streptavidin [nm]
DA-PEG-900/Biotin	5.44 ± 0.08
DA-PEG-2000/Biotin	6.54 ± 0.09
DA-PEG-3000/Biotin	7.05 ± 0.15
DA-PEG-6000/Biotin	3.57 ± 0.96

Tabelle 31: Bindungssignal von 50 µg/mL Streptavidin auf Da-PEG/Biotin-Oberflächen

In Tabelle 31 sind die Bindungssignale von 50 µg/mL Streptavidin auf den verschiedenen PEG/Biotin-Derivaten zusammengefasst. Betrachtet man die Schichtdickenänderung von Streptavidin nimmt diese zuerst mit zunehmender PEG-Kettenlänge zu. Der Grund für die relativ niedrige Signalthöhe auf DA-PEG-900 lässt sich mit der Größe des verwendeten Analyten erklären. Streptavidin besitzt ein Molekulargewicht von 60 000 Dalton und besteht aus vier Untereinheiten. Jede Untereinheit kann das Vitamin Biotin mit einer Affinität von ca. 10^{14} - 10^{15} M⁻¹ binden. Auf der Oberfläche kann es zu sterischen Hinderungen kommen, wenn nun viele dieser relativ großen Proteine an die immobilisierten Biotin-Moleküle anbinden. Bei längeren und somit flexibleren PEG-Ketten haben mehr Proteine auf der Oberfläche Platz. Allerdings stoppt dieser Trend bei DA-PEG-6000. Die Schichtdickenänderung auf DA-PEG-6000 ist noch geringer als auf DA-PEG-900. Dies unterstützt die obig beschriebene Vermutung, dass ab einer gewissen Kettenlänge keine einheitliche PEG-Oberfläche gebildet wird, sondern Lücken in der sensitiven Schicht entstehen. Damit stehen weniger funktionelle Gruppen zur Anbindung des Liganden zur Verfügung. Dies erklärt den schlagartigen Rückgang des Bindungsvermögens [57].¹

¹ Die hier diskutierten RfS-Messungen von Biotin/Streptavidin auf unterschiedlichen PEG-Derivaten wurden von Jochen Mehne (damaliger CTA im Arbeitskreis Gauglitz) durchgeführt.

5.4.2 Zusammenfassung und Fazit

Die AFM-Aufnahmen im wässrigen Medium haben gezeigt, dass PEG-Derivate, sowie AMD durch die Einlagerung von Wassermolekülen stark quellen und sich ihre Polymerstruktur, Oberflächeneigenschaften und Topographie ändert. Die Oberflächentopographie von AMD an Luft zeigt schon eine andere Struktur im Vergleich DA-PEG an Luft. Diese strukturellen Unterschiede werden in Wasser deutlicher. AMD, aufgenommen in Wasser ist ein voluminöses Hydrogel mit stark vergrößerter Oberfläche.

Bei Betrachtung der verschiedenen DA-PEG-Kettenlängen kann man anhand der AFM-Aufnahmen in Luft keine großen Unterschiede erkennen. Bei den AFM-Aufnahmen in Wasser sieht man eine deutliche Schichtzunahme und ab einer PEG-Kettenlänge von 6000 Dalton sind deutliche Lücken in der Schicht zu erkennen. Diese Lochbildung kann sich dadurch erklären, dass bei einer bestimmten Kettenlänge das PEG sich umbiegt und die zweite Aminogruppe mit der Epoxidgruppe der Silanschicht reagiert. Somit wird der PEG-Rasen durch Knäulbildung unterbrochen und es gehen funktionelle Gruppen für die Ligandenanbindung verloren (siehe Abbildung 63). Diese Interpretation wird auch durch RfS-Messungen unterstützt. Die Streptavidinanbindung an biotinylierte PEG-Oberflächen steigt erst mit zunehmender PEG-Kettenlänge, nimmt aber abrupt bei DA-PEG-6000 ab (siehe Abbildung 65).

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die sensitive Schicht eines direkt optischen Sensors, bestehend aus einem Biopolymer und einem Ligand, muss verschiedene Kriterien erfüllen. Sie sollte zum einen homogen und stabil auf dem Transducer haften. Desweiteren soll der Analyt spezifisch mit dem immobilisierten Ligand interagieren. Unspezifische Wechselwirkungen sollten nicht stattfinden. Je nach Wechselwirkungspaar sollte die Oberfläche Regenerationslösungen standhalten. Zusätzlich zu den obig genannten Faktoren sollte die Präparation der sensitiven Schichten von Chip zu Chip reproduzierbar sein. In Betracht gezogen werden sollte auch die Herstellungsdauer und Art einer funktionalisierten Oberfläche. Hinsichtlich dieser Anforderungen wurden im Rahmen dieser Arbeit fünf PEG-Derivate untersucht:

- 4-arm-Amino-PEG
- 8-arm-Amino-PEG
- Di-Epoxid-PEG
- Di-NHS-PEG
- Silan-Amino-PEG
-

Verglichen wurden diese mit den schon etablierten Biopolymeren AMD, DA-PEG-2000 und DC-PEG-2000. Als Modellsysteme dienten Testosteronoxim/Anti-Testosteron sowie BSA/Anti-BSA. Zum Test der unspezifischen Proteinadsorption wurde das Protein Ovalbumin verwendet. Zur Charakterisierung der PEG-Oberflächen wurden Kontaktwinkelmessungen und AFM-Aufnahmen durchgeführt. In folgender Tabelle sind die noch unmodifizierten Biopolymeroberflächen mit ihren jeweiligen Kontaktwinkeln und Rauigkeiten (RMS-Werte) zusammengefasst. Es werden die Oberflächen aufgelistet, die die besten Ergebnisse zeigten.

Biopolymeroberfläche	Kontaktwinkel [°]	RMS-Werte [nm]
DA-PEG-2000 (DCM)	33 ± 3	1.25 ± 0.26
DA-PEG-2000 (H ₂ O)	29 ± 3	1.29 ± 0.12
AMD(H ₂ O)	26 ± 5	0.92 ± 0.10
8-arm-PEG (H ₂ O)	37 ± 3	1.21 ± 0.17
4-arm-PEG (H ₂ O)	34 ± 6	0.77 ± 0.08
Di-Epoxid-PEG (DMSO/1 Std.)	45 ± 7	0.71 ± 0.04
Silan-PEG (DMSO/12 Std.)	33 ± 6	0.63 ± 0.03
Di-NHS-PEG (DMSO/1 Std.)	36 ± 4	0.63 ± 0.02

Tabelle 32: Kontaktwinkel und RMS-Werte der unmodifizierten Biopolymeroberflächen

Alle Aminofunktionalisierten PEG-Derivate weisen einen ähnlichen Kontaktwinkel auf. Aminodextran ist das einzige Biopolymer, welches kein PEG-Derivat ist. Es weist den niedrigsten Kontaktwinkel auf. Die Rauigkeit der Oberflächen liegen in einem Bereich von 0,6 bis 1,3 nm, was auf eine recht homogene Schicht hinweist.

Zur Charakterisierung der spezifischen und unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Probe und sensitiver Sensoroberfläche diente die direkt optische Detektionsmethode RIFS.

In Tabelle 33 sind die RfS-Messungen von allen modifizierten Sensoroberflächen zusammengefasst.

Biopolymermodifizierung	RfS-Messungen	
	spezifische Antikörperwechselwirkung [nm]	unspezifische Wechselwirkung von 1mg/mL OVA [nm]
DA-PEG-2000 (DCM)/Testosteronoxim	30 µg/mL Anti-Testosteron 4.90 ± 0.14	0.28
DA-PEG-2000 (H ₂ O)/Testosteronoxim	30 µg/mL Anti-Testosteron 5.63 ± 0.03	0.11
AMD(H ₂ O)/Testosteronoxim	30 µg/mL Anti-Testosteron 3,96 ± 0,20	0.33
8-arm-PEG (H ₂ O)/Testosteronoxim	30 µg/mL Anti-Testosteron 6.93 ± 0.03	0.05
4-arm-PEG (H ₂ O)/Testosteronoxim	30 µg/mL Anti-Testosteron 6.40 ± 0.24	0.3
Di-Epoxid-PEG (DMSO-1 Std.)/Testosteronoxim	30 µg/mL Anti-Testosteron 4.27 ± 0.16	1.39
Silan-PEG (DMSO-12 Std.)/Testosteronoxim	30 µg/mL Anti-Testosteron 7.08 ± 0.10	0.28
DA-PEG-2000 (DCM)/GA/BSA	50 µg/mL Anti-BSA 0.89 ± 0.04	0.09
DC-PEG-2000 (DCM)/BSA	50 µg/mL Anti-BSA 0.84 ± 0.02	0.11
Di-Epoxid-PEG (DMSO-1 Std.)/BSA	50 µg/mL Anti-BSA 1.61 ± 0.28	0.23
Di-NHS-PEG (DMSO-1 Std.)/BSA	50 µg/mL Anti-BSA 1.31 ± 0.10	0.31

Tabelle 33: RfS-Messungen auf den modifizierten Biopolymeren von spezifischer Wechselwirkungen und unspezifischer Wechselwirkungen

Die mit Testosteronoxim bzw. BSA modifizierten Biopolymere zeigen alle eine spezifische Wechselwirkung mit dem jeweiligen Antikörper. Bei der Präparation von Di-Epoxid-PEG- und Silan-PEG-Derivate wurden die Reaktionszeiten variiert. Di-Epoxid-PEG wurde kovalent an ein Aminosilan gekoppelt. Die Reaktionszeit war zum einen 1 Stunde und zum anderen 12 Stunden. Die spezifische Wechselwirkung von 30 µg/mL Anti-Testosteron zeigt bei 1 Stunde Reaktionszeit ein Bindungssignal von 4,3 nm. Nach 12 Stunden Reaktionsdauer verlief die Funktionalisierung mit Testosteronoxim weniger effektiv. Dies schlägt sich im Bindungssignal nieder. Es beträgt bei 30 µg/mL Antikörper nur noch 2,6 nm. Bei der Verwendung von Silan-PEG war eine vorherige Silanisierung des Glastransducers nicht notwendig. Das Silan-PEG konnte direkt auf die aktivierte Glasoberfläche gegeben werden. Nach 12 Stunden Reaktionszeit erhielt man eine homogen bedeckte Polymeroberfläche. Die RfS-Messungen zeigen ein Bindungssignal von 7 nm bei 30 µg/mL Anti-Testosteron. Dies ist deutlich höher als die spezifische Wechselwirkung auf DA-PEG-2000 mit 5,5 nm optischer Schichtdickenänderung und ist im Vergleich zu allen anderen modifizierten Oberflächen das höchste Signal.

Beim Lösungsmittelvergleich DCM und Wasser weist DA-PEG-2000 gelöst in Wasser eine höhere spezifische Analytanbindung auf als DA-PEG-2000 gelöst in DCM.

Um das Di-NHS-PEG-Derivat zu vermessen wurde das aminofunktionalisierte BSA als Ligand verwendet. Zum Vergleich dienten DA-PEG-2000- und DC-PEG-2000-Oberflächen. Auch Di-Epoxid-PEG wurde mit BSA umgesetzt.

Die Oberflächenbeladung von 50 µg/mL Anti-BSA ist auf DA-PEG-2000 und DC-PEG-2000 nahezu gleich. Die höchste Analytanbindung von Anti-BSA findet man auf Di-Epoxid-PEG. Allerdings hat man hier auch die höchste Standardabweichung. Dies und die relativ hohe unspezifische Adsorption von OVA zeigen, dass hier die Oberflächenpräparation noch optimiert werden muss. Es lassen sich aus den obigen Ergebnissen folgende Aussagen treffen:

- 8-arm-Amino-PEG ist eine Alternative zu AMD mit der höchsten spezifischen Oberflächenbeladung und mit der niedrigsten unspezifischen Adsorption.
- Die Verwendung von Silan-Amino-PEG vereinfacht die Präparation der sensitiven Schicht, da die Modifizierung des Glassubstrates mit einem Silan wegfällt. Die Sensorqualität bleibt erhalten und zeigt zudem die höchste spezifische Wechselwirkung mit dem Analyten.
- Durch die Verwendung von Di-NHS-PEG verkürzt sich die Oberflächenmodifizierung auf 8 Stunden. Umfunktionalisierung der Aminogruppe zur Carboxylgruppe, sowie die darauf folgende Aktivierung, ist nicht mehr notwendig. Der Ligand kann direkt an das PEG-Derivat angebunden werden. Im Vergleich zum DA-PEG-2000 und DC-PEG-2000 erhält man die höchste spezifische Bindung.
- Mit Di-Epoxid-PEG besitzt man ein flexibel einsetzbares Biopolymer. Der Ligand kann über Carboxyl- und über Aminogruppen kovalent an die Oberfläche immobilisiert werden. Allerdings sind die Reproduzierbarkeit der Schichtpräparation und die damit verbundene Abschirmung vor unspezifischer Adsorption noch nicht optimal.
- DA-PEG-2000 gelöst in Wasser anstatt in DCM ergibt eine vergleichbare sensitive Sensorschicht.

Desweiteren wurden noch AFM-Messungen im wässrigen Medium vorgestellt. Darunter auch Abbildungen von unterschiedlich schweren PEG-Derivaten. Die AFM-Aufnahmen von PEG-900 über PEG-2000 bis PEG-3000 zeigen eine gleichmäßige Bedeckung der Oberfläche an Luft als auch in Wasser. RfS-Messungen von Streptavidin auf biotinylierten PEG-Oberflächen zeigen eine steigende Oberflächenbeladung mit steigender Kettenlänge. Dies lässt sich mit der Größe des Analyten (Molekulargewicht von Streptavidin 60 000 Dalton) erklären. Auf dem länger-kettigen PEG-Rasen können sich die Streptavidinmoleküle besser anordnen als auf dem kurz-kettigen PEG-900. Dieser Trend bricht aber bei PEG-6000 ab. Die AFM-Messungen in Wasser zeigen inhomogene, durchbrochene Oberflächen. Ab einer gewissen Länge der Polymerkette scheint sich das PEG umzubiegen, so dass zum Teil das zweite aminofunktionalisierte Polymerende mit der silanisierten Oberfläche reagiert. Die Vermutung wird durch RfS-Messungen unterstützt. Das Bindungssignal nimmt bei PEG-6000 stark ab. Durch das zweiseitige Anbinden an die Oberfläche gehen funktionelle Gruppen für die weitere Modifizierung verloren. Dies schlägt sich in der spezifischen Wechselwirkung mit dem Streptavidin nieder. Die AFM-Aufnahmen in Luft haben keine Auffälligkeiten der verschieden langen PEG-Derivate gezeigt. Erst die Messungen im wässrigen Medium haben dieses Oberflächenphänomen offengelegt.

Die in dieser Arbeit charakterisierten PEG-Derivate erweitern das Repertoire an Oberflächenmodifizierungen im Bereich der optischen Biosensorik. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen auch, dass noch viel Potential in der Präparation von sensitiven Schichten steckt. Die zahlreichen kommerziell erhältlichen PEG-Derivate bieten dabei neue noch nicht völlig ausgeschöpfte Möglichkeiten an Immobilisierungsstrategien.

7 Literatur

- [1] C. Albrecht, N. Kaepfel, G. Gauglitz. Two immunoassay formats for fully automated CRP detection in human serum. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391[5], 1845-1852. 2008.
- [2] C. Albrecht, P. Fechner, D. Honcharenko, L. Baltzer, G. Gauglitz. A new assay design for clinical diagnostics based on alternative recognition elements. *Biosens. Bioelectron.* 25[10], 2302-2308. 2010.
- [3] Jaeger S, Ehni M, Eberhardt C, Rolle M, Grathwohl P, Gauglitz G. CCD camera image analysis for mapping solute concentrations in saturated porous media. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395[6], 1867-1876. 2009.
- [4] J. Tschmelak, N. Kaepfel, G. Gauglitz. TIRF-based biosensor for sensitive detection of progesterone in milk based on ultra-sensitive progesterone detection in water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382[8], 1895-1903. 2005.
- [5] IUPAC compendium of Chemical Terminology 2nd Edition 1997, 1992, International Union of Pure and Applied Chemistry: Research Triangle Park, NC. 1997.
- [6] A. Rasooly, K.E. Herold *Biosensors and Biodetection: Methods and Protocols : Electrochemical and Mechanical Detectors, Lateral Flow and Ligands for Biosensors*, Humana Press, 2009.
- [7] J. Tschmelak, M. Kumpf, N. Kaepfel, G. Proll, G. Gauglitz. Total internal reflectance fluorescence (TIRF) biosensor for environmental monitoring of testosterone with commercially available immunochemistry: Antibody characterization, assay development and real sample measurements. *Talanta* 69[2], 343-350. 2006.
- [8] A. Brandenburg, R. Polzius, F. Bier, U. Bilitewski, E. Wagner, Direct observation of affinity reactions by reflected-mode operation of integrated optical grating coupler. *Sensors and Actuators B: Chemical* 30 (1996) 55-59.
- [9] A. Brecht, G. Gauglitz. Recent developments in optical transducers for chemical or biochemical applications. *Sensors and Actuators, B: Chemical* B38[1-3], 1-7. 1997.
- [10] G.H. Cross, A.A. Reeves, S. Brand, J.F. Popplewell, L.L. Peel, M.J. Swann, N.J. Freeman, A new quantitative optical biosensor for protein characterisation. *Biosensors and Bioelectronics* 19 (2003) 383-390.
- [11] J. Piehler, A. Brandenburg, A. Brecht, E. Wagner, G. Gauglitz. Characterization of grating couplers for affinity-based pesticide sensing. *Applied Optics* 36[25], 6554-6562. 1997.
- [12] J. Homola, S.S. Yee, G. Gauglitz, Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B: Chemical* 54 (1999) 3-15.
- [13] J. Homola. Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377[3], 528-539. 2003.

- [14] A. Brecht, J. Ingenhoff, G. Gauglitz. Direct monitoring of antigen-antibody interactions by spectra interferometry. *Sensors and Actuators, B: Chemical* 61[1-3], 96-100. 1992.
- [15] A. Brecht, G. Gauglitz. Optimized layer systems for immunosensors based on the RIFS transducer. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 349[5], 360-366. 1994.
- [16] R.G. Heideman, P.V. Lambeck, Remote opto-chemical sensing with extreme sensitivity: design, fabrication and performance of a pigtailed integrated optical phase-modulated Mach-Zehnder interferometer system. *Sensors and Actuators B: Chemical* 61 (1999) 100-127.
- [17] Benny K.C.Lo. *Antibody Engineering Methods and Protocols*. [248]. 2004. Humana Press.
- [18] P. Fechner, G. Gauglitz, J.A. Gustafsson. Nuclear receptors in analytics: A fruitful joint venture or a wasteful futility? *TrAC, Trends Anal.Chem.* 29[4], 297-305. 2010.
- [19] G. Roth, S. Freund, B. Möhrle, K. Wöllner, J. Bruenjes, G. Gauglitz, K.H. Wiesmueller, G. Jung. Ubiquitin binds to a short peptide segment of hydrolase UCH-L3: a study by FCS, RfS, ITC and NMR. *ChemBioChem* 8[3], 323-331. 2007.
- [20] A.S. Belmont, S. Jaeger, D. Knopp, R. Niessner, G. Gauglitz, K. Haupt. Molecularly imprinted polymer films for reflectometric interference spectroscopic sensors. *Biosensors & Bioelectronics* 22[12], 3267-3272. 2007.
- [21] N. Ishida, M. Sakamoto, M. Miyahara, K. Higashitani, Static Method to Evaluate Interaction Forces by AFM. *Journal of Colloid and Interface Science* 235 (2001) 190-193.
- [22] T. Cass, F.S. Ligler *Immobilized Biomolecules in Analysis - A Practical Approach*, 1998.
- [23] J. Piehler, A. Brecht, R. Valiokas, B. Liedberg, G. Gauglitz. A high-density poly(ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces. *Biosensors & Bioelectronics* 15[9-10], 473-481. 2000.
- [24] J. Piehler, A. Brecht, K.E. Geckeler, G. Gauglitz. Surface modification for direct immunoprobes. *Biosensors & Bioelectronics* 11[6/7], 579-590. 1996.
- [25] J. Piehler, A. Brecht, K. Hehl, G. Gauglitz. Protein interactions in covalently attached dextran layers. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces* 13[6], 325-336. 1999.
- [26] G.T.Hermanson. *Bioconjugate Technique*. 2. 2008. Academic Press.
- [27] J. Piehler. *Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern*. 1997. Universität Tübingen.
- [28] L.Bergmann, C.Schaefer, H.Niedrig *Lehrbuch der Experimental Physik Band 3 Optik*, Walter de Gruyter; Berlin-NewYork, 1993.
- [29] P.A. Tipler, G. Mosca, M. Basler, R. Dohmen, C. Heinisch, A. Schleitzer, M. Zillgitt *Physik: Für Wissenschaftler Und Ingenieure*, Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
- [30] M. Kumpf. *Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA) im elektrophoretischen Fluss*. 2005. Rhombos-Verlag.
- [31] G.G. Brecht A. *Optical Probes and Transducers*. *Biosensors & Bioelectronics* 10, 923-936. 1995.

- [32] E.Hecht Optik, Oldenbourg, Wissenschaftsverlag GmbH, 1989.
- [33] A. Brecht, G. Gauglitz, W. Nahm. Interferometric measurements used in chemical and biochemical sensors. *Analisis* 20[3], 135-140. 1992.
- [34] A. Brecht, G. Lang, G. Gauglitz. Wavelength dependencies in interferometric measurements of thin protein films. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 346[6-9], 615-617. 1993.
- [35] G. Gauglitz, A. Brecht, G. Kraus, W. Nahm. Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-)layers. *Sensors and Actuators, B: Chemical* B11[1-3], 21-27. 1993.
- [36] N. Gadegaard. Atomic force microscopy in biology: technology and techniques. *Biotechnic & Histochemistry* 81[2-3], 87-97. 2006.
- [37] Roland Wiesendanger Scanning probe microscopy and spectroscopy: methods and applications, Press Syndicate of the university of cambridge, 1994.
- [38] S.N. Magonov, M.H. Whangbo Surface analysis with STM and AFM: experimental and theoretical aspects of image analysis, VCH, 1996.
- [39] K.D. Jandt, Developments and perspectives of scanning probe microscopy (SPM) on organic materials systems. *Materials Science & Engineering R21 (1998)* 221-295.
- [40] T. Mutschler. Charakterisierung bio- und chemosensitiver Schichten mit Ellipsometrie und AFM. 2004.
- [41] R.W.J.a.T.A.D. Sadhana Sharma. Evaluation of the Stability of Nonfouling Ultrathin Poly(ethylene glycol) Films for Silicon-Based Microdevices. *Langmuir* 20[2], 348-356. 2004.
- [42] J.Koolman, K.-H.Röhm Taschenatlas der Biochemie, Georg Thieme Verlag, 2003.
- [43] E.T. Vandenberg, L. Bertilsson, B. Liedberg, K. Uvdal, R. Erlandsson, H. Elwing, I. Lundström, Structure of 3-aminopropyl triethoxy silane on silicon oxide. *Journal of Colloid and Interface Science* 147 (1991) 103-118.
- [44] S.Lofas. Dextran modified self-assembled monolayer surfaces for use in biointeraction analysis with surface plasmon resonance. *Pure and Applied Chemistry* 67[5], 829-834. 1995.
- [45] D.G.C. Buddy D.Ratner Surface modification of polymeric biomaterials, Plenum Press, New York, 1996.
- [46] J.Milton Harris Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications, Plenum Press, New York, 1992.
- [47] G. Wedler Lehrbuch der physikalischen Chemie, Wiley-VCH, 2004.
- [48] K. Andersson, R. Karlsson, S. Loefaas, G. Franklin, M.D. Haemaeläinen. Label-free kinetic binding data as a decisive element in drug discovery. *Expert Opin.Drug Discovery* 1[5], 439-446. 2006.
- [49] W.Kusnezow, A.Jacob, A.Walijew, F.Diehl, J.D.Hoheisel. Antibody microarrays: an evaluation of production parameters. *Proteomics* 3, 254-264. 2003.

- [50] G. Kraus, A. Brecht, V. Vasic, G. Gauglitz. Polymer-based RIFS sensing: an approach to the indirect measurement of organic pollutants in water. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 348[8-9], 598-601. 1994.
- [51] A. Brecht. *Interferenzspektroskopische Untersuchungen von Affinitätsreaktionen*. 1993.
- [52] H. Lechner *Die Kontaktwinkelmessung: Ein Verfahren zur Bestimmung der freien Grenzflächenenergie*, Krüss, GmbH Rosenheim, 1984.
- [53] P.K.Hansma, J.P.Kleveland, M.Radmacher, D.A.Walters, P.E.Hillner, M.Bezanilla, M.Fritz, D.Vie, H.G.Hansma. Tapping mode atomic force microscopy in liquid. *Appl.Phys.Lett.* 64[13]. 1994.
- [54] L.Li, S.Chen, S.Oh, S.Jiang. In Situ Single-Molecule Detection of Antibody-Antigen Binding by Tapping-Mode Atomic Force Microscopy. *Analytical Chemistry* 74[23], 6017-6022. 2002.
- [55] S.Rau. *Testosteron in Milch als Modellsystem für die Lebensmittelanalytik mittels optischer Sensoren*. 2011.
- [56] S.Rau, G.Gauglitz, Reflectometric interference spectroscopy (RIFS) as a new tool to measure in the complex matrix milk at low analyte concentration. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (2012) 529-536.
- [57] J. Mehne, G. Markovic, F. Proell, N. Schweizer, S. Zorn, F. Schreiber, G. Gauglitz, Characterisation of morphology of self-assembled PEG monolayers: a comparison of mixed and pure coatings optimised for biosensor applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (2008) 1783-1791.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

[L]	Ligandkonzentration
[R]	Rezeptorkonzentration
[R _{Fluss}]	Rezeptorkonzentration im Fluss
[RL]	Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes
[RL _{GG}]	Komplexkonzentration im Gleichgewicht
[RL _{max}]	Maximale Komplexkonzentration an der Oberfläche
R _q	Rms-Wert, mittlere Rauigkeit
8-arm-PEG	8arm-Amino-Polyethylenglykol
Aceton	Aceton, getrocknet, max. 0,01 % Wasser
AFM	Rasterkraftmikroskopie (engl. Atomic Force Microscopy)
AMD	Aminodextran
α-Testosteron	Anti-Testosteron
Biotin	Biotin
c	Lichtgeschwindigkeit
d	physikalische Schichtdicke
DA-PEG-2000	Diamino-Polyethylenglykol; MW 2000
DCC	1,3-Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DC-PEG-2000	Dicarboxyl-Polyethylenglykol; MW 2000
DIC	Diisopropylcarbodiimid
Di-Epoxi-PEG	Di-Epoxid-Polyethylenglykol, MW 3400
Di-NHS-PEG	Di-N-Hydroxysuccinimid-Polyethylenglykol, MW 3400

DIPEA	N,N'-Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
E	elektrischer Feldvektor
Epot	Lennard-Jones-Potential
F	Kraft
FIA	Fließ-Injektionsanalyse
GOPTS	3-Glycidyoxypropyl-trimethoxysilan
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
I	Intensität
Ig	Immunglobulin
K	Gleichgewichts- bzw. Affinitätskonstante
k	Federkonstante
k _a ; k _d	Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante
k _s	Scheinbare Ratenkonstante
n	Brechungsindex
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OVA	Hühnereialbumin (engl. Ovalbumin)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (engl. Phosphate buffered saline)
PEG	Polyethylenglykol
r	Reflektivität
RIfS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
SA	Streptavidin
SDS	Natriumlaurylsulfatlösung (engl. Sodium dodecyl sulfate)
Silan-PEG	Silan-Amino-Polyethylenglykol, MW 3400
SPM	Oberflächenplasmonen Mikroskopie (engl. Surface Plasmon Microscopy)
TBTU	2-(1H-Benotriazol-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluoniumtetrafluoroborat

Testosteronoxim

Testosteron 3-(O-carboxymethyl)oxim

8.2 Veröffentlichungen

8.2.1 Vorträge

Titel	Wann	Wo
Charakterisierung von TiO₂- Oberflächen mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie zur Optimierung von medizinischen Implantaten	2006	Minisymposium, Riezlern
Rasterkraftmikroskopie als Werkzeug zur Charakterisierung von funktionalisierten Biopolymeren für die Sensorik	2007	Anakon, Jena
Wechselwirkungen von Zellwandbestandteilen mit unterschiedlichen Oberflächen mittels RlFS	2009	Promotionsverbund „Einblicke in die Bakterien-Material-Wechselwirkung“, Tübingen

8.2.2 Poster

Titel	Wann	Wo
Charakterisierung von TiO₂-Oberflächen mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie(RlFS) zur Optimierung von medizinischen Implantaten, N. Schweizer, M. Kumpf, G. Gauglitz	2005	Sensorsymposium, Dresden
Characterization of TiO₂-surfaces with Reflectometric Interference Spectroscopy (RlFS) to optimize biocompatibility of medical implants, N. Schweizer, M. Kumpf, G. Gauglitz	2006	Analytica, München
Characterization of morphology of self assembled PEG monolayers optimized for biosensor applications, N. Schweizer, G. Gauglitz	2008	EuChemS, Turin
Analytische Verfahren zur Charakterisierung biomolekularer Interaktionen, P. Fechner, N. Schweizer, G. Gauglitz	2008	GDNÄ-Wachstum, Tübingen
Characterization and development of an advanced biosensor for detection of endocrine disrupting chemicals (EDCs) with Reflectometric Interference Spectroscopy (RlFS) and AFM, P. Fechner, N. Schweizer, G. Gauglitz	2008	Bio meets Nano, Frankfurt
Charakterisierung und Optimierung von sensitiven Schichten für die optische Sensorik im Bereich der Umweltchemie, N. Schweizer, G. Gauglitz	2009	GDCh-Wissenschaftsforum, Frankfurt

Investigation and characterisation of three different biopolymers for orientated immobilisation of antibodies for biosensor applications, N. Schweizer, G. Gauglitz	2010	Analytica, München
Comparison of surface functionalization strategies for label-free biosensor applications, N. Schweizer, G. Gauglitz	2010	EuChemS, Nürnberg
Entwicklung und Charakterisierung von spezifischen Immobilisierungsstrategien für den Einsatz in der direkten optischen Biosensorik, N. Schweizer, G. Gauglitz	2011	GDCh-Wissenschaftsforum, Bremen

8.2.3 Publikation

J. Mehne, G. Markovic, F. Proell, N. Schweizer, S. Zorn, F. Schreiber, G. Gauglitz, Characterisation of morphology of self-assembled PEG monolayers: a comparison of mixed and pure coatings optimised for biosensor applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (2008)

8.3 Akademische Lehrer

Prof. Dr. Klaus Albert, Prof. Dr. Thomas Chassé, Prof. Dr. Dines Christen, Prof. Dr. Heiner Eckstein, Dr. Hans-Joachim Egelhaaf, Pro. Dr. Günter Gauglitz, Prof. Dr. Günter Häfelinger, Dr. Dietrich Hoffmann, Prof. Dr. Volker Hoffmann, Prof. Dr. Wlter Jäger, Prof. Dr. Günther Jung, Dr. Wolfhard Koch, Prof. Dr. Karl-Artur Kovar, Prof. Dr. Detlef Krug, Prof. Dr. Norbert Kuhn, Prof. Dr. Ekkehard Lindner, PD Dr. Mack, Prof. Dr. Martin E. Maier, Prof. Dr. Hermann A. Mayer, Prof. Dr. Hans-Jürgen Meyer, Prof. Dr. Ulrich Nagel, Prof. Dr. Heinz Oberhammer, Prof. Dr. Christian Ochsenfeld, Prof. Dr. Dieter Oelkrug, Prof. Dr. Holm Pauschmann[†], PD Dr. Helmut Pommer, PD Dr. Götz Reinhard, Prof. Dr. Volker Schurig, Prof. Dr. Michael Schwarz, Prof. Dr. Eberhard Schweda, Prof. Dr. Bernd Speiser, Prof. Dr. Dr. h.c. Joachim Strähle[†], Prof. Dr. Gerhard J. Wagner, Prof. Dr. Udo Weimar, Prof. Dr. Lars Wesemann, Prof. Dr. Klaus-Peter Zeller, Prof. Dr. Thomas Ziegler

