

Einsatz von Nanopartikeln und optimierten Schichtsystemen für die Signalverstärkung in reflektometrischen Biosensoren

DISSERTATION

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2008

vorgelegt von

Goran Markovic

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2008

Dekan: Prof. Dr. L. Wesemann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Gauglitz

2. Berichterstatter: PD Dr. U. Weimar

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Günter Gauglitz danke ich herzlich für die Möglichkeit diese Arbeit unter hervorragenden Bedingungen in seiner Gruppe anfertigen zu können, für seine andauernde Unterstützung, Geduld und das große Vertrauen, das er mir während der ganzen Zeit entgegen gebracht hat.

PD Dr. Udo Weimar danke ich recht herzlich für die Übernahme des Koreferats.

Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für die stets fröhliche und freundschaftliche Atmosphäre und die Hilfsbereitschaft während all der Zeit. Insbesondere bedanken möchte ich mich bei Dr. Nina Käppel, Nina Schweizer, Florian Pröll und Jochen Mehne für die hervorragende und freudige Zusammenarbeit, die hilfreichen Diskussionen bei zahlreichen Projekten und die andauernde Unterstützung und Freundschaft, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Nina Schweizer schulde ich außerdem viel Dank für die AFM-Aufnahmen. Bei Markus Ehni bedanke ich mich herzlich für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Etablierung der Polyelektrolyt Multischichten und bei der Modifizierung der Kunststoffsubstrate. Dr. Günther Proll danke ich für die zahlreichen Hilfestellungen und konstruktiven Diskussionen. Karin Wöllner danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit am Ellipsometer.

Bei allen Partnern des EU-Projekts GENSSENSOR NANOPARTS, insbesondere bei Prof. Dr. Dietmar Blohm und Dr. Doris Meyerdierks, möchte ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit bedanken.

Dank schulde ich außerdem meinen Kommilitonen und Freunden Chris Sumowski, Sabine Schweizer, Christiane Albrecht, Stefanie Jäger, Claudia Hummel, Cornelia Gürtler, Sven zur Oven-Krockhaus, Joachim Heilemann, Dr. Dmitrij Rappoport, Hartmut Röhm und Marc Amann, für ihren Rückhalt und ihre Freundschaft über all die Jahre.

Mein größter Dank gilt meiner Familie: Radmila Markovic und Rainer Schramm, Anna, Jonas, Sonja und Gerhard Bergmann!

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	2
1. EINLEITUNG.....	2
1.1 HINTERGRUND UND MOTIVATION	2
1.2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	3
2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	5
2.1 BIOCHEMISCHE GRUNDLAGEN	5
2.1.1 BIOMOLEKULARE ERKENNUNG	5
2.1.2 ANTIKÖRPER.....	6
2.1.3 OLIGONUKLEOTIDE	9
2.2 BIOMOLEKULARE INTERAKTIONSANALYSE (BIA).....	15
2.2.1 DETEKTION AN GRENZSCHICHTEN	15
2.2.2 ANALYSE UNTER KINETISCH KONTROLLIERTEN BEDINGUNGEN	16
2.2.3 ANALYSE UNTER DIFFUSIONS-KONTROLLIERTEN BEDINGUNGEN.....	20
2.3 OPTISCHE GRUNDLAGEN	24
2.3.1 TRANSMISSION UND REFLEXION VON LICHT	24
2.3.2 REFLEXION AN DÜNNEN SCHICHTEN	25
2.4 REFLEKTOMETRISCHE INTERFERENZSPEKTROSKOPIE	27
2.4.1 ALLGEMEINES	27
2.4.2 EINFLUSS DES SCHICHTSYSTEMS.....	28
2.4.3 SPEKTRALE AUSWERTUNG	30
2.4.4 1- λ REFLEKTOMETRIE	32
2.5 NANOPARTIKEL	37
2.5.1 MAGNETISCHE NANOPARTIKEL.....	37
2.5.2 GOLDNANOPARTIKEL.....	39
2.5.3 SILIKANANOPARTIKEL	40
3. MATERIALIEN UND METHODEN	42
3.1 MATERIALIEN.....	42
3.1.1 STANDARDCHEMIKALIEN	42
3.1.2 BIOCHEMIKALIEN UND NANOPARTIKEL.....	42
3.1.3 POLYMERE UND BIOPOLYMERE.....	43
3.1.4 BESCHICHTETE GLASTRÄGER UND ANDERE SUBSTRATE	44
3.1.5 LÖSUNGEN	44

3.1.6 GERÄTE	45
3.2 METHODEN	45
3.2.1 OBERFLÄCHENMODIFIZIERUNG VON GLASTYPOBERFLÄCHEN.....	45
3.2.2 REFLEKTOMETRISCHE INTERFERENZSPEKTROSKOPIE (RIFS).....	48
3.2.5 1- λ REFLEKTOMETRIE (RIF).....	50
3.2.6 RASTERKRAFT MIKROSKOPIE.....	51
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	54
4.1 NANOPARTIKEL FÜR DIE REFLEKTOMETRISCHE INTERFERENZSPEKTROSKOPIE (RIFS)	54
4.1.1 ÜBERSICHT ÜBER DAS EU-PROJEKT GENSSENSOR NANOPARTS.....	54
4.1.2 CHARAKTERISIERUNG DER NANOBEADS FÜR DAS RIFS-SYSTEM.....	58
4.1.3 SIGNALVERSTÄRKUNG IM RIFS-SYSTEM UNTER VERWENDUNG VON NANOBEADS.....	62
4.1.4 CHARAKTERISIERUNG WEITERER NANOPARTIKEL FÜR DAS RIFS-SYSTEM	73
4.1.5 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	76
4.2 OPTIMIERTE SCHICHTSYSTEME FÜR DIE 1-LAMBDA REFLEKTOMETRIE (RIF)	77
4.2.1 ALLGEMEINES ZUR RIF	77
4.2.2 INTERFERENZGLAS FÜR DIE RIF	80
4.2.3 GOETHEGLAS FÜR DIE RIF.....	87
4.2.4 SCHWEIZERGLAS FÜR DIE RIF	89
4.2.5 UNVERGÜTETE SUBSTRATE FÜR DIE RIF.....	92
4.2.6 VERGLEICH DER SIGNAL-ZU-RAUSCH VERHÄLTNISSE DER SCHICHTSYSTEME	95
4.2.7 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER UNTERSUCHTEN SCHICHTSYSTEME.....	96
4.2.7 WEITERE MÖGLICHKEITEN ZUR OPTIMIERUNG	97
5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	99
LITERATURVERZEICHNIS	102
ANHANG	108
AKADEMISCHE LEHRER.....	108
LEBENS LAUF	109

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin, Absorption
A ₁	größter Signalwert
A ₂	kleinster Signalwert
ACA	Atrazincapronsäure, <i>atrazine caproic acid</i>
AFM	Rasterkraftmikroskopie, <i>atomic force microscopy</i>
AMD	Aminodextran
BIA	biomolekulare Interaktionsanalyse
BK7	BK7-Glas
BSA	Rinderserumalbumin, <i>bovine serum albumin</i>
C	Cytosin
CCD	ladungsgekoppeltes Bauteil, <i>charge coupled device</i>
CDR	Hypervariables Ende, <i>complementarity determining region</i>
CMD	Carboxymethyl-Dextran
D	Dielektrizitätskonstante, Diffusionskoeffizient
d	physikalische Schichtdicke
DAPEG	Diamino-Polyethylenglykol
DCC	Dicyclohexyl-carbodiimid
DCM	Dichlormethan
DCPEG	Dicarboxy-Polyethylenglykol
d _{diff}	Dicke der Diffusionsschicht
DIC	Diisopropyl-carbodiimid
DIPEA	N, N-Diisopropylethylamin
DMF	N, N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA, <i>double strand DNA</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest, <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FIA	Fließinjektionsanalyse
FSE	spektrale Auswertung, <i>full spectrum evaluation</i>
G	Guanin
GA	Glutarsäureanhydrid
gNP	Gold-Nanopartikel
Goe	Goethglas
GOPTS	3-Glycidylxypropyl-trimethoxysilan
HX	Hypoxanthin

Int	Interferenzglas
iRIf	parallele $1-\lambda$ Reflektometrie, <i>imaging RIf</i>
J	Fluss
k	Absorptionskoeffizient
k_a	Assoziationsratenkonstante
K_{aff}	Affinitätskonstante
k_d	Dissoziationsratenkonstante
k_D	Massentransportratenkonstante
K_{diss}	Dissoziationskonstante
K_{obs}	scheinbare Assoziationsratenkonstante
L	Ligand
LED	Leuchtdiode, <i>light emitting diode</i>
LNA	verschlossene Nukleinsäure, <i>locked nucleic acid</i>
LSPR	lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz, <i>localized surface plasmon resonance</i>
mNP	magnetische Nanopartikel
MSE	mittlere quadratische Abweichung, <i>mean squared error</i>
n	Brechungsindex
n_{500}	Brechungsindex bei der Wellenlänge 500 nm
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OVA	Ovalbumin
p	Steigungsfaktor der Logistikkfunktion
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
PEI	Polyethylenimin
PEM	Polyelektrolyt-Multischichten
PMMA	Polymethylmethacrylat
PNA	Peptid-Nukleinsäure, <i>peptide nucleic acid</i>
ppb	Teile pro Milliarde, <i>parts per billion</i>
R	Rezeptor
R	Reflexion
r, t	Fresnelkoeffizienten für Reflexion bzw. Transmission
RCA	<i>rolling circle amplification</i>
RIf	1-Wellenlängen Reflektometrie
RIfS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
RL	Rezeptor-Ligand-Komplex
RNA	Ribonukleinsäure

S	gemessenes Signal
Sch	Schweizerglas
SDS	Natriumlaurylsulfat, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SERS	oberflächenverstärkte Ramanspektroskopie, <i>surface enhanced raman spectroscopy</i>
sNP	Silika-Nanopartikel
SNP	Einzelbasen-Fehlstelle, <i>single nucleotide polymorphism</i>
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz, <i>surface plasmon resonance</i>
ssDNA	Einzelstrang-DNA, <i>single strand DNA</i>
T	Thymin, Transmission
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
TEOS	Tetraethylorthosilikat
T_m	Schmelztemperatur von DNA
TO	Testosteron 3-(O-carboxymethyl)oxim
U	Uracil
WW	Wechselwirkung
X	Xanthin
x	Ligandenkonzentration
x_0	Ligandenkonzentration am Testmittelpunkt
ZEO	ZEONOR
Δ (nd)	Änderung der optischen Schichtdicke
Γ_{GG}	Gleichgewichtsbeladung
Γ_{max}	Maximalbeladung

1. EINLEITUNG

1.1 HINTERGRUND UND MOTIVATION

Biosensoren sind ein wichtiges und weithin angewendetes Werkzeug für die Charakterisierung von biologischen Systemen. Ihre einfache Handhabung, die kurzen Messzeiten und geringen Anschaffungskosten sowie das Potenzial zur Miniaturisierung und Parallelisierung für das Hochdurchsatz-Screening sind wichtige Vorteile gegenüber konventionellen Methoden wie Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR) oder Massenspektrometrie (MS). Biosensoren bestehen aus einer biologischen Komponente und dem sog. Transducer. Die chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften der biologischen Komponente ändern sich direkt oder indirekt durch die Wechselwirkung mit dem Analyten. Der Transducer wandelt diese Änderung über optische, akustische, piezoresistive oder elektrochemische Transduktion in ein elektrisches Signal um. Speziell optische Sensoren sind derzeit Fokus der Forschung, da sie das größte Potenzial zur Parallelisierung und somit zum Hochdurchsatz bergen. Weitverbreitet sind auf Fluoreszenz basierende Methoden, die über unübertroffen gute Nachweisgrenzen verfügen. Sogenannte Fluoreszenz-Mikroarrays werden heutzutage standardmäßig zur DNA- und Proteinanalyse in der Forschung, Qualitätssicherung und vor allem in der klinischen Diagnostik eingesetzt [Nagl 2005]. Eine Übersicht über kommerziell erhältliche Systeme gibt [Biospektrum 2007]. Neben diesen auf (Farbstoff-) Markierung („Labels“) angewiesenen Systemen sind markierungsfreie Methoden ein qualitativ hochwertiges Werkzeug für die biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA). Hier wird durch Anbindung von Analyten an eine funktionalisierte Sensoroberfläche die Änderung einer physikalischen Eigenschaft ohne die Notwendigkeit einer Markierung detektiert. Dies hat den großen Vorteil, dass die biomolekulare Interaktion nicht durch die Labels beeinflusst bzw. verändert wird. Weit verbreitet ist die Oberflächenplasmonenresonanz Spektroskopie (*surface plasmon resonance*, SPR), die von der schwedischen Firma BiaCore zur Marktreife entwickelt und inzwischen von der General Electric (GE) Corporation vertrieben wird. Sie beruht auf der Verschiebung der Plasmonenresonanz in dünnen metallischen (meist Gold-) Schichten durch Brechungsindexänderung des umgebenden Mediums. Durch zeitaufgelöste Detektion dieser Verschiebung kann nicht nur Analytik betrieben, sondern auch die Thermodynamik und Kinetik von biomolekularen Wechselwirkungen charakterisiert werden. Bisher gibt es wenige bzw. nur überaus anspruchsvolle Ansätze für die Parallelisierung dieser Methode [Shumaker-Parry 2004; Homola 2004; Wegner 2004b]. Problematisch wirkt sich die Überlagerung der Plasmonenschwingung benachbarter Messpunkte aus [Frank 2005]. Ebenso müssen die Flusszellen für die SPR auf tausendstel Kelvin genau thermostatisiert werden, da der Brechungsindex stark temperaturabhängig ist.

Eine weitere direkt-optische Methode zur Charakterisierung biomolekularer Wechselwirkungen ist die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS). Diese detektiert zeitaufgelöst die

Verschiebung eines für jedes Schichtsystem charakteristisches Interferenzspektrum, die durch die Anbindung von Analyten an die Sensoroberfläche verursacht wird. Diese Verschiebung ist proportional zur optischen Schichtdicke (das Produkt aus Brechungsindex und physikalischer Schichtdicke). Aufgrund des gegenläufigen Temperatureffekts von Brechungsindex und physikalischer Schichtdicke ist die RfS nahezu temperaturunabhängig. Somit ist es nicht nötig, die Flusszellen aufwändig zu thermostatisieren. Es können vergleichbare Messungen bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt bzw. während einer Messung die Temperatur verändert werden. Somit ist es z. B. möglich, Schmelzkurven von doppelsträngiger DNA aufzunehmen [Pröll 2005]. Desweiteren ist die RfS eine sehr robuste Methode, die lediglich auf transparente Substrate beschränkt ist, und keine außergewöhnliche Vergütung der Substrate (z. B. Bedampfung mit Gold) benötigt.

Eine Parallelisierung der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie zum Messen in 96er Mikrotiterplatten wurde bereits etabliert. Mit diesem Aufbau konnten das Epitopmapping der Transglutaminase [Kröger 2002] und das Screening einer Thrombininhibitor-Bibliothek erfolgreich durchgeführt werden [Birkert 2001; Birkert 2002]. Desweiteren werden momentan neue Ansätze zum Messen frei skalierbarer Mikroarrays beruhend auf der sog. $1-\lambda$ Reflektometrie (Rif) [Frank 2005] verfolgt. Das kürzlich entwickelte iRif (*imaging Rif*) benötigt lediglich eine Leuchtdiode (LED), eine CCD-Kamera und den Träger für das Mikroarray. Damit können biomolekulare Wechselwirkungen an bis zu 880 Spots detektiert werden. Aufgrund dieses einfachen und sehr robusten Aufbaus birgt das iRif sehr großes Potential für die Entwicklung eines parallelisierten und miniaturisierten Geräts zum markierungsfreien Hochdurchsatzscreening für die Gen- und Protein-Analyse.

1.2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Im BMBF Verbundprojekt „Gensensorik“ sollte ein parallelisierter Aufbau basierend auf RfS für die Detektion von pathogenen Keimen, die Umweltanalytik und die Forensik entwickelt werden. Dieser DNA-Biosensor sollte bezüglich Immobilisierungsstrategie, Detektionsmethode und dem Nachweisassay charakterisiert werden. Basierend auf der spektralen Auswertung des durch Stützpunkte angenäherten Interferenzspektrums sollten Hybridisierungsereignisse zeit- und orts aufgelöst verfolgt werden [Jung 2003]. Als Engpass des in diesem Projekt entwickelten Aufbaus entpuppte sich das ungenügende Signal-zu-Rausch Verhältnis, das eine quantitative Auswertung der vermessenen Hybridisierungsexperimente unmöglich machte. Theoretische Optimierungen bezüglich Detektionseinheit, Lichtquelle und optischen Aufbaus wurden zwar durchgeführt, aber nicht experimentell bestätigt [Wegner 2004a]. Für die Verbesserung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses wurde deshalb im nachfolgenden EU-Projekt „GenSensor Nanoparts“ eine Verstärkung der Signale im

RfS-System durch Einsatz von speziell funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln (sog. Nanobeads) herbeigeführt. Diese Nanobeads bewerkstelligen zum einen eine einfache und schnelle Extraktion der interessanten Oligonukleotide aus dem zu analysierenden Probengemisch, zum anderen verstärken sie durch ihre Größe im anschließenden Schritt die auf dem RfS-Mikroarray detektierten (Hybridisierungs-)Signale. Da Nanopartikel bisher noch nicht für die Reflektometrische Interferenzspektroskopie zum Einsatz gekommen sind, sollen ihr Verhalten bezüglich der Fluidik, die unspezifische Bindung an Teile des Systems sowie an die verschiedenen Sensoroberflächen und ihre Signalverstärkung charakterisiert und optimiert werden. Neben den magnetischen Nanobeads werden weitere kommerziell erhältliche Nanopartikel Ziel der Untersuchungen sein. Gold- und Silika-Nanopartikel sind dabei wegen ihrer einfachen Funktionalisierbarkeit über Thiol- bzw. Silanchemie besonders interessant.

Desweiteren wird die bei [Frank 2005] eingeführte $1-\lambda$ Reflektometrie für den Einsatz bei (parallelisierter) biomolekularer Interaktionsanalyse charakterisiert und optimiert. Vor allem der quantitative Vergleich mit der spektralen Auswertung bei der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie anhand eines Modellsystems soll dabei im Vordergrund stehen. Die Frage, ob eine biomolekulare Interaktionsanalyse spektral bzw. bei einer einzelnen Wellenlänge ausgewertet dieselben quantitativen Informationen und Ergebnisse liefert, wird beantwortet. Darüber hinaus soll das Signal-zu-Rausch Verhältnis für die Rf durch Wahl geeigneter Schichtsysteme weiter optimiert werden. Hierfür werden drei vergütete und zwei unvergütete Schichtsysteme miteinander verglichen.

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 BIOCHEMISCHE GRUNDLAGEN

2.1.1 BIOMOLEKULARE ERKENNUNG

Biomolekulare Wechselwirkungen (WW) bilden die Basis des Lebens. Die biomolekulare Erkennung erfolgt hierbei über die Bindung eines Liganden an eine bestimmte Region eines Rezeptormoleküls, die sog. Bindungstasche. Die Bindung wird dabei durch eine Vielzahl schwacher attraktiver Kräfte ausgebildet. In Tabelle 1 ist eine Übersicht der Attraktionskräfte sowie deren Stärke und Abstandsabhängigkeit im wässrigen Medium gegeben.

Attraktionskraft	Abstandsabhängigkeit	Energie [kJ mol ⁻¹]
elektrostatische WW	d^{-2}	12 - 20
Wasserstoffbrückenbindung	d^{-6}	10 - 30
van-der-Waals WW	d^{-10}	0,5 - 5
hydrophobe WW	---	0 - 40

Tabelle 1: Übersicht über die für die biomolekulare Interaktion relevanten attraktiven Kräfte, ihre Abstandsabhängigkeit und ihre Energie in wässrigem Medium [Alberts 1990].

Wasserstoffbrückenbindungen tragen stark zur Bindung zwischen Ligand und Rezeptor bei und spielen bei der Wechselwirkung von Biomolekülen eine zentrale Rolle [Fersht 1987]. Die Hybridisierung von Oligonukleotid-Einzelsträngen wird von der Ausbildung einer Vielzahl von Wasserstoffbrücken zwischen den einzelnen Basenpaaren getragen und durch Auftrennen selbiger rückgängig gemacht. Elektrostatische Wechselwirkungen und van-der-Waals Kräfte zwischen Biomolekülen können über klassische Potentiale beschrieben werden, während bei hydrophoben Wechselwirkungen der Entropiegewinn durch Verdrängung von Wassermolekülen aus der Bindungstasche ausschlaggebend ist. Alle beitragenden Kräfte sind stark abstandsabhängig und treten nur über eine Distanz von ca. 100 pm bis 300 pm auf. Durch diese starke Annäherung spielen auch repulsiv wirkende Kräfte eine Rolle, die eine Abstandsabhängigkeit von d^{-9} bis d^{-12} aufweisen. Komplementäre Raumstrukturen der Bindungsstellen bzw. -taschen weisen maximale attraktive und minimale repulsive Kräfte auf und entscheiden somit über die Selektivität der biomolekularen Interaktion („Schlüssel-Schloss-Prinzip“). Ähnliche Wechselwirkungsregionen unterschiedlicher Bindungspartner können von der Bindungstasche erkannt und mit unterschiedlicher Stärke gebunden werden. Hierdurch kommt u. a. Kreuzreaktivität bei Antikörpern zustande. Dieses starre Schlüssel-Schloss-Prinzip wurde durch das genauere Modell des *induced-fit* ersetzt, welches eine konformative Änderung der beteiligten Wechselwirkungsregionen während der Bindung berücksichtigt („Schlüssel

und Schloss verändern sich gegenseitig“) [Leder 1995]. Die Bindungsenergie der Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor ist dabei abhängig von der Dielektrizitätskonstante des Umgebungsmediums. Biomoleküle liegen meist in gepufferter wässriger Phase vor, welche eine sehr hohe Dielektrizitätskonstante von ungefähr $D = 83$ besitzt. Dadurch wird im wässrigen Medium im Vergleich zum Vakuum die Bindungsenergie ionischer Wechselwirkung auf unter 5 %, die von Wasserstoffbrückenbindungen auf unter 25 % gesenkt. Elektrostatische-Kräfte werden desweiteren durch den pH-Wert und durch die Ionenstärke stark beeinflusst, so dass durch Änderung dieser Parameter in wässriger Phase die Bindung zwischen Ligand und Rezeptor wieder gelöst werden kann („Regeneration“). Biomolekulare Interaktionen sind im Allgemeinen also reversibel. Neben dem intermolekularen Einfluss bestimmt das Medium auch die intramolekulare Struktur der Biomoleküle. Proteine zeigen in nicht-wässrigen Lösungen veränderte Strukturen bzw. Konformationen, wodurch ihre Affinität und Spezifität beeinflusst wird [Wescott 1994].

2.1.2 ANTIKÖRPER

Bei den meisten Wirbeltieren treten verschiedene Isotypen von Antikörpern auf, eingeteilt nach den Gen-Abschnitten für die konstante Region der H-Ketten. Immunoglobulin A (IgA) liegt als Homo-Dimer vor und wird hauptsächlich auf den Schleimhäuten der Atemwege, der Augen, des Gastrointestinal- und Urogenitaltrakts sowie in Drüsen der Brustwarzen von Müttern sezerniert. Die Funktion von Immunoglobulin D (IgD) ist bisher unbekannt. Es kommt hauptsächlich auf den Membranen der B-Zellen vor und wird in nur sehr geringen Mengen in Blut und Lymphe sezerniert. Immunoglobulin E (IgE) liegt im Körper nahezu vollständig membrangebunden auf Mastzellen vor und quervernetzt bei Antigenkontakt, was zur Ausschüttung von Histamin führt (allergische Reaktion). Die eigentliche Aufgabe von IgE ist die Abwehr von Parasiten. Das als Pentamer vorliegende Immunoglobulin M (IgM) wird hauptsächlich gebildet, wenn der Körper das erste Mal mit einem Antigen in Kontakt kommt. In dieser Infektionsphase liegt es in größeren Mengen vor und kann somit zur Diagnose von Erkrankungen herangezogen werden. Die hauptsächlich gegen Bakterien wirkenden Immunoglobuline G (IgG) werden bevorzugt durch B-Lymphozyten und Plasmazellen nach Antigenkontakt gebildet und sind Teil der humoralen Immunantwort. Desweiteren kennt man Immunoglobulin Y (IgY) (das Äquivalent von IgG in Hühnern) und IgW (in Fischen).

Die zur Familie der IgG gehörenden Antikörper sind Proteine des Immunsystems, die aus zwei identischen schweren Ketten (*heavy chains*, H-Ketten) und zwei identischen leichten Ketten (*light chains*, L-Ketten) aufgebaut sind und durch kovalente Disulfid-Brücken eine Ypsilon-förmige Struktur ausbilden. Zusammen mit dem oberhalb der Gelenkregion (*hinge region*) liegenden Anteil der H-Ketten bilden die L-Ketten die sog. Fab-Region aus. Dieses hypervariable Ende (*complementarity determining region*, CDR) unterscheidet sich von Antikörper zu Antikörper und enthält das sog.

Paratop, die Antigenbindungsstelle. Das Epitop des Antigens besteht normalerweise aus 5-6 Aminosäure- bzw. Kohlenhydrat-Bausteinen und wird sehr spezifisch vom jeweiligen Antikörper erkannt und gebunden. Da Antikörper über zwei Antigenbindungsstellen verfügen, werden sie auch als bivalente Rezeptoren bezeichnet. Der restliche Anteil der beiden H-Ketten bildet das konstante Fc-Fragment (*crystallizable*), welches an Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche gewisser Zellen bzw. an Proteine des Komplementsystems binden und damit z. B. Opsonisierung, Zellyse, etc. einleiten kann. In Abbildung 1 ist der schematische Aufbau eines IgG-Antikörpers gezeigt.

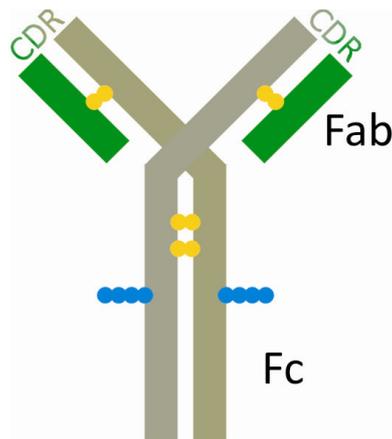


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines IgG-Antikörpers, bestehend aus Fab- und Fc-Fragmenten mit schweren Ketten (oliv/khaki), leichten Ketten (grün), Disulfid-Brücken (gelb), Zuckerresten (blau) und hypervariablen Enden (CDR).

Je nach Isotyp können zwei (IgD, IgE, IgG), vier (IgA) oder bis zu zehn (IgM) Antigene über die Paratope der Antikörper gebunden werden (Abbildung 2). Dabei können die Epitope auf demselben oder auf verschiedenen Antigenen (Quervernetzung) liegen. Die Bindung erfolgt hierbei über die Summe vieler schwacher Wechselwirkungskräfte (siehe Abschnitt 2.1.1) und resultiert in einer hohen Bindungsenergie.

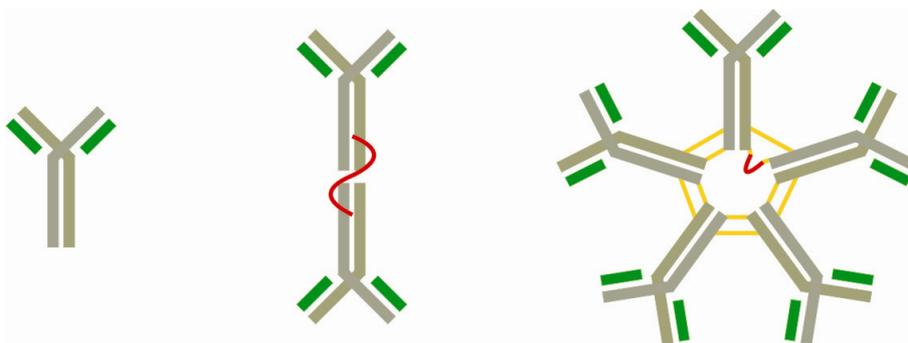


Abbildung 2: Antikörper-Isotypen. IgD-, IgE- und IgG-Antikörper liegen als Monomere vor (links), IgA-Antikörper als Homodimere (mitte) und IgM-Antikörper als Homopentamere (rechts). J-Peptide (joining peptides, rot) und Disulfidbrücken sorgen für strukturellen Zusammenhalt.

Diese Kräfte sind stark abstandsabhängig und wirken nur dann gut, wenn sich die interagierenden Biomoleküle stark annähern. Durch Veränderung des pH-Werts, der Ionenstärke oder durch Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen mittels Detergenzien kann die Bindung des Antikörpers an das Antigen gelöst werden. Für Komplexe zwischen Antikörper und ihren organischen Antigenen werden Gibbs-Bindungsenergien von $-10 \pm 3 \text{ kcal mol}^{-1}$ erreicht. Dies entspricht einer Affinitätskonstante K_{off} von $10^{7,3 \pm 1,9} \text{ M}^{-1}$. Im Allgemeinen decken die Affinitätskonstanten von Antikörper-Antigen-Komplexen einen weiten Bereich von 10^4 bis 10^{14} M^{-1} ab [Käppel 2007].

Klassisch werden Antikörper durch die Immunisierung von Tieren (im Speziellen von Mäusen, Kaninchen, Ziegen und Schafen) hergestellt. Der Körper der Versuchstiere bildet in einer gewissen Zeit nach Injektion des Antigens Antikörper, die anschließend aus dem Blut des Tiers extrahiert werden müssen. Auf diese Weise können in begrenztem Maße Antikörper hergestellt werden. Diese sind polyklonal, d. h. sie binden mit unterschiedlicher Spezifität an verschiedene Epitope gleicher bzw. unterschiedlicher Antigene (z. B. Metaboliten). Im Gegensatz dazu nennt man Antikörper welche nur ein einziges Epitop erkennen monoklonal. Sie werden durch die sog. Hybridoma-Technik gewonnen [Köhler 1975; Galfre 1977; Winter 1991]. Dabei werden Antikörper-produzierende Zellen (B-Lymphozyten) eines Tieres *in-vitro* mit permanenten B-Zell-Tumorzellen derselben Tierart fusioniert. Dies geschieht durch Zellkontakt in Polyethylenglykol-haltigem Medium innerhalb weniger Sekunden. Die entstandenen Zellhybriden (Hybridoma-Zellen) erben von der Plasmazelle die Fähigkeit, Antikörper zu produzieren und von der Tumorzelle die Fähigkeit, sich unendlich oft zu teilen.

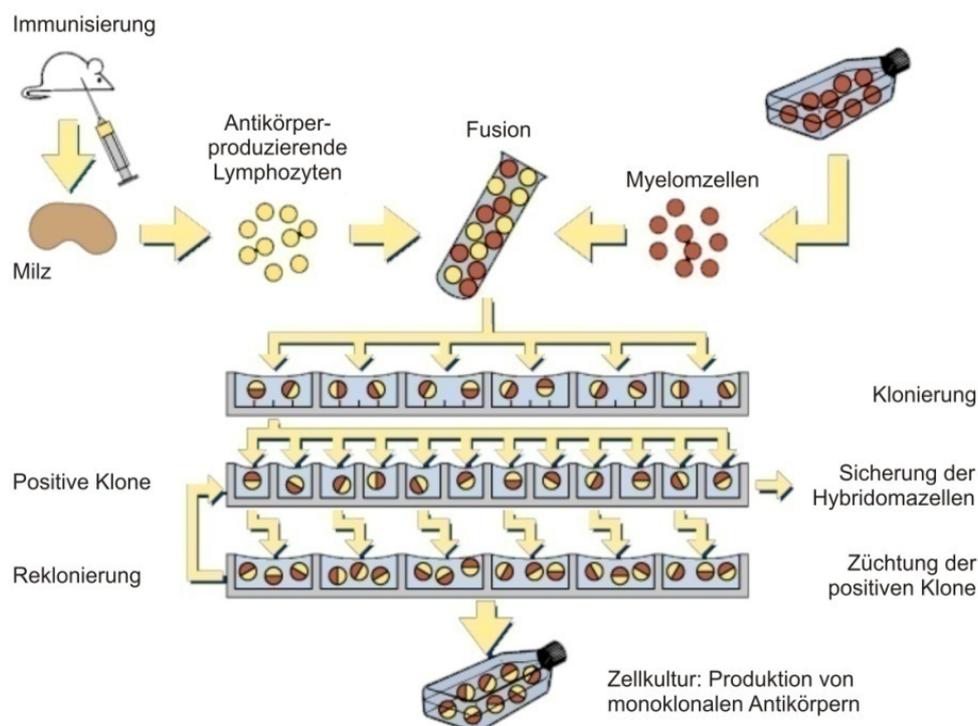


Abbildung 3: Herstellung von monoklonalen Antikörpern über Hybridoma-Technik (Quelle: Folienserie des Fonds der Chemischen Industrie).

Die Hybridoma-Zellen müssen von den restlichen Zellen der Mischung getrennt und anschließend kloniert werden (das sog. „Vereinzeln“), woraus ein Stamm von Zellen hervorgeht, der rein theoretisch unendlich große Mengen monoklonaler Antikörper herstellen kann. Eine Übersicht über die Hybridoma-Technik ist in Abbildung 3 gezeigt. Die auf diese Weise gewonnenen Antikörper werden in der (klinischen) Diagnostik für den Nachweis von Krankheitserregern, Proteinen, Hormonen, Toxinen und anderer Analyte verwendet (Immunoassays, z. B. *enzyme linked immunosorbent assay*, ELISA). Hierfür werden je nach Assaytyp Antikörper oder Antigene verwendet, die mit sog. Labels markiert sind, z. B. mit Enzymen, Fluorophoren, radioaktiven Labels oder Nanopartikeln (Gold-, farbige Polymer- oder magnetische Nanopartikel). Folgende Assay-Formate kommen dabei zum Einsatz: direkter [Sapsford 2001], kompetitiver [Tschmelak 2006], Sandwich-[Rowe-Taitt 2000] und Verdrängungs-Immunoassay [Anderson 2006]. Beim direkten Immunoassay binden Antigenmoleküle aus der Probenlösung an, auf einer Oberfläche (z. B. Mikrotiterplatte) immobilisierte Antikörper. Bei anschließender Zugabe von markierten Antigenmolekülen binden diese an verbliebene freie Antikörperparatope. War eine hohe Konzentration an Analytmolekülen in der Probe vorhanden, so können nur geringe Mengen markierter Antigene binden, das detektierte Signal verhält sich also umgekehrt proportional zur Konzentration in der Probe. Der Verdrängungs-Assay ist dem direkten Assay recht ähnlich, im ersten Schritt sättigt man durch Zugabe von markiertem Antigen die Oberfläche ab und leitet in einem anschließenden Schritt die Probenlösung mit zu analysierendem Antigen über die Oberfläche. Dadurch wird gebundenes markiertes Antigen aufgrund seiner relativen Affinität (relativ zur Affinität des nativen Antigens) verdrängt. Das detektierte Signal verhält sich ebenfalls umgekehrt proportional zur Konzentration in der Probe. Beim kompetitiven Immunoassay wird die Lösung mit zu quantifizierendem Antigen mit einem markierten Antikörper vorinkubiert und anschließend über eine Oberfläche mit immobilisiertem Antigen geleitet. Auch hier erhält man für eine hohe Konzentration an Analyt in der Lösung ein niedriges Signal und umgekehrt. Beim Sandwich-Assay kommen zwei Antikörper zum Einsatz, ein Fänger-Antikörper und ein Detektions-Antikörper. Der Fänger-Antikörper ist auf der Oberfläche immobilisiert und bindet das Antigen. Im Anschluss inkubiert man mit markiertem Detektions-Antikörper. Dieser bindet dabei an ein anderes Epitop des Antigens. Das detektierte Signal verhält sich hier direkt proportional zur Konzentration des Antigens.

2.1.3 OLIGONUKLEOTIDE

Oligonukleotide sind natürlich vorkommende oder artifiziell hergestellte Polymere (Nukleinsäuren, *nucleic acid*, NA) bestehend aus einer Sequenz von Nukleotidbausteinen. Ein Baustein besteht hierbei normalerweise aus einer Nukleinbase, einem Zuckerbaustein und einem Phosphatrest. Die

verschiedenen Nukleinbasen sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Als Zuckerbaustein kommen je nach Oligonukleotid entweder Ribose- (RNA) oder Desoxy-Ribose-Moleküle (DNA) in der Kette vor.

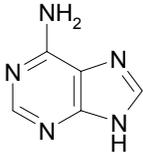
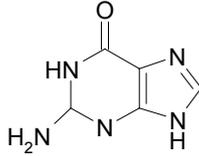
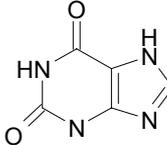
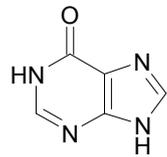
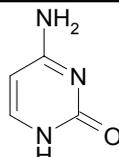
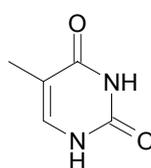
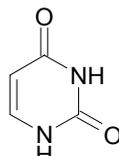
Grundgerüst	Nukleinbase	Abkürzung	Vorkommen	Struktur
Purin	Adenin	A	DNA, RNA	
	Guanin	G	DNA, RNA	
	Xanthin	X	DNA, RNA	
	Hypoxanthin	HX	DNA, RNA	
Pyrimidin	Cytosin	C	DNA, RNA	
	Thymin	T	DNA	
	Uracil	U	RNA	

Tabelle 2: Nukleinbasen, deren Vorkommen und Struktur.

Lagern sich zwei DNA-Einzelstränge (ssDNA) zu einem Doppelstrang (dsDNA) zusammen, so spricht man von Hybridisierung. Die Hybridisierung kommt durch hoch-spezifische Basenpaarung zustande, wobei sich stets Adenin und Thymin (zwei Wasserstoffbrückenbindungen) sowie Guanin und Cytosin (drei Wasserstoffbrückenbindungen) paaren (Abbildung 4).

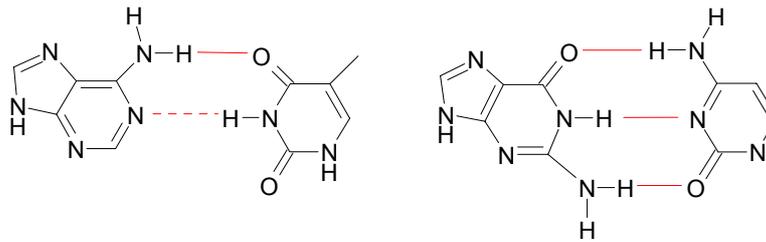


Abbildung 4: Basenpaarung durch Wasserstoffbrückenbindung (rot gestrichelt) zwischen A und T, sowie zwischen G und C.

Die dsDNA bildet eine rechtsgängige Doppelhelixstruktur (B-Form) aus. Dabei sind die aromatischen Ringe der Basen 340 pm voneinander entfernt und rechtwinklig zur Helixachse gestapelt. Jede Base ist gegenüber der vorhergehenden um 35 ° gedreht. Somit ergeben 10,5 Basenpaare eine volle Windung der Doppelhelix und zwischen den Rückgraten der Einzelstränge entstehen zwei unterschiedlich breite Furchen, die große und die kleine Furche [Koolman 1998]. Die genetische Information der DNA ist in ihrer Sequenz der Basenfolge enthalten, drei Basenpaare bilden hierbei ein Codon welches eine Aminosäure kodiert. DNA-Stränge werden durch Replikation bei der Zellteilung kopiert, die gesamte Information der Zelle wird somit auf ihre Tochterzelle weitergegeben. Bei der Genexpression wird durch Transkription DNA in mRNA (messenger RNA) umgesetzt, die den Zellkern verlässt und bei der Translation als Matrize für die Protein-Biosynthese fungiert.

Die Hybridisierung von ssDNA zu dsDNA kann mittels chemischer Substanzen (Säuren, Basen, Alkoholen) rückgängig gemacht werden (Denaturierung). Die Doppelhelix trennt sich wieder in ihre Einzelstränge auf. Desweiteren kann durch Temperaturerhöhung die dsDNA denaturiert werden, was als „Schmelzen“ der DNA bezeichnet wird. Als Schmelztemperatur wird hierbei die Temperatur angegeben, bei der genau die Hälfte der Menge an Doppelhelix denaturiert als Einzelstränge vorliegt (Abbildung 5).

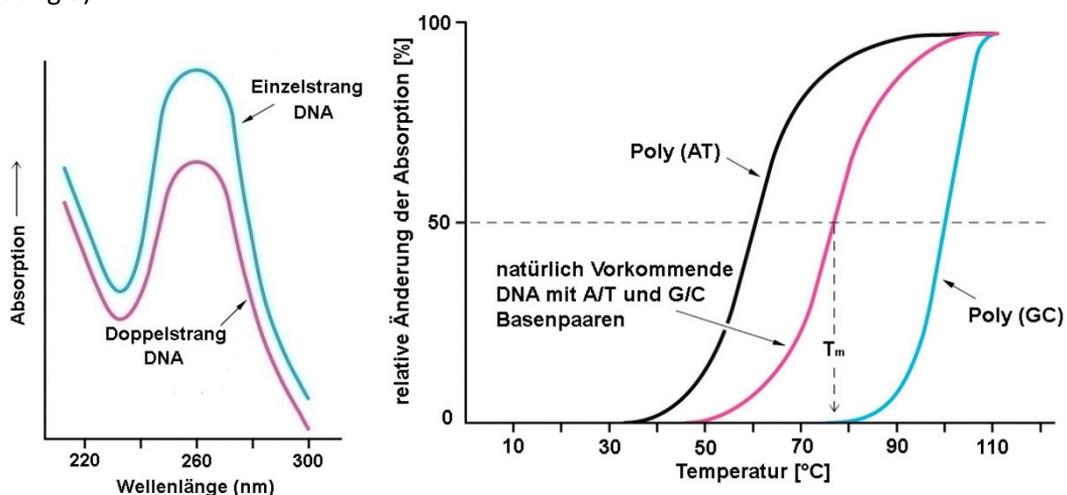


Abbildung 5: Absorptionsspektren von Einzel- und Doppelstrang-DNA (links) und Schmelzkurven verschiedener Doppelhelices (rechts) [Pröll 2004].

$$T_m = \left(81,5 + \log c_{\text{Salz}} - \frac{675}{n_{\text{Basenpaare}}} + 0,41 \cdot w_{\%GC} \right) \quad (2.1)$$

T_m	Schmelztemperatur der Doppelhelix
c_{Salz}	umgebende Salzkonzentration
$n_{\text{Basenpaare}}$	Anzahl der Basenpaare in der Doppelhelix
$w_{\%GC}$	Anteil der Guanin-Cytosin Basenpaare

Die Schmelztemperatur der DNA hängt stark von der Art der benachbarten Nukleotide ab. Somit lässt sich mit Hilfe des „Konzepts des nächsten Nachbarn“ die Schmelztemperatur in einem gewissen Maße voraussagen. Für die Abschätzung der Schmelztemperatur gilt Formel (2.1) [Lipsky 2001]. Falsche Paarung von Basen führen zu sog. *single nucleotide polymorphism* (SNP), diese lassen sich über die Schmelztemperatur ermitteln. Treten mehrere SNPs in näherer Nachbarschaft auf, so ist die Stärke der Hybridisierung im Vergleich zur perfekten Basenpaarung erniedrigt. DNA mit mehreren SNPs schmilzt bei geringeren Temperaturen. Da SNPs bei der Entstehung von Krankheiten (Diabetes, Bluthochdruck, Herzerkrankungen) involviert sein können, dienen sie in der medizinisch-genetischen Forschung als Marker für diese Krankheiten. Neben der Detektion durch Schmelzkurven wurden einige Methoden basierend auf Hochdurchsatz-Screening, Einzelmolekül-Assays und Rolling Circle Amplification (RCA) zur Identifizierung von SPNs entwickelt [Pröll 2004].

Neben natürlich vorkommender RNA und DNA gibt es künstlich synthetisierte Peptid-Nukleinsäuren (*peptide nucleic acid*, PNA) und „verschlossene Nukleinsäuren“ (*locked nucleic acid*, LNA) (Abbildung 6). PNA besitzt im Gegensatz zu den anderen Nukleinsäure-Arten statt dem negativ geladenen Zucker-Phosphat- ein elektro-neutrales peptidisches Rückgrat (meist bestehend aus N-(2-Aminoethyl)glycin- oder Alanyl-Monomeren). Aufgrund fehlender negativer Ladungen weisen Doppelhelices die PNA enthalten eine erhöhte Stabilität auf. Aufgrund seiner 2'-O,4'-C-Methylen-Brücke und damit einer dichteren Stapelung der Basenpaare bildet LNA noch stabilere Doppelhelices als seine analogen Verbindungen.

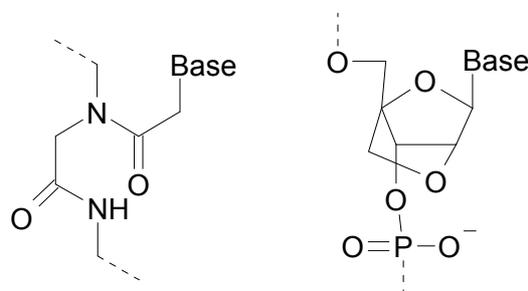


Abbildung 6: PNA-Nukleotid bestehend aus N-(2-Aminoethyl)glycin-Monomer (links) und LNA-Nukleotid (rechts).

DNA und ihre analogen Verbindungen können auf verschiedene Weisen hergestellt werden. Zum einen gewinnt man DNA-Protein-Komplexe durch Extraktion mit 1 M Natriumchlorid-Lösung aus Zellen und Zellkernen. Nach Abtrennung der Proteine mittels organischer Lösungsmittel, Detergenzien und/oder Enzymen fällt man die DNA in kaltem Ethanol aus und trennt die Stränge mittels Gel-Elektrophorese. Eine weitere, geläufige Herstellungsmethode ist die sog. Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR). An beiden Enden komplementärer, denaturierter Stränge werden zwei Oligonukleotidprimer anhybridisiert, anschließend wird über DNA-Polymerase jeweils ein Doppelstrang erzeugt, welcher wiederum bis zur Denaturierung erhitzt wird. Durch einen neuen Zyklus bestehend aus Abkühlen, Hybridisierung und Polymerase-Reaktion entsteht wieder eine Kopie jedes Einzelstranges. Nach 20 solcher Zyklen steigt die Zahl der DNA-Kopien exponentielle auf Millionen an [Saiki 1985]. Desweiteren kann DNA über die Gentechnik dargestellt werden. Hierfür wird die zu amplifizierende Sequenz in ein Bakterien-Plasmid kloniert, das Bakterium kultiviert und anschließend die DNA aus den Zellen extrahiert. Eine chemische Darstellung ähnlich der Festkörper-Synthese von Polypeptiden ist ebenfalls möglich. Hierbei wird das Oligonukleotid an einem festen Silikatträger schrittweise aufgebaut [Melby 1967; Melby 1969].

In den letzten Jahren wurden große Anstrengungen unternommen, DNA-Biosensoren zu entwickeln und zu kommerzialisieren. Vorteile von Biosensoren liegen in geringen Messzeiten und Anschaffungskosten, Möglichkeit zur Miniaturisierung und Parallelisierung, einfache Handhabung und die Wiederverwendbarkeit der sensitiven, biologischen Komponenten durch Regeneration. Der Biosensor besteht neben der biologischen Komponente noch aus dem Transducer. Dieser wandelt die Änderung der chemischen bzw. physikalischen Eigenschaft der biologischen Komponente je nach Messprinzip über optische, akustische, piezoresistive oder elektrochemische Transduktion in ein elektrisches Signal um, welches analysiert wird. Vor allem optische DNA-Biosensoren wurden bevorzugt entwickelt, da mit diesen eine gute Parallelisierung und Miniaturisierung der Sensoren möglich ist. Besonders verbreitet sind auf Fluoreszenzdetektion basierende DNA-Sensoren. Diese haben den Vorteil, dass sie über geeignete Wahl an Farbstoffen einen hohen Grad an Parallelisierung zulassen, außerdem weisen sie unübertroffen gute Nachweisgrenzen auf. Nachteile der Fluoreszenz-Mikroarrays liegen in der Tatsache begründet, dass nur Endpunktsbestimmungen der Hybridisierung möglich sind und dass die Fluorophore an den Oligonukleotiden die Hybridisierung beeinflussen können. Direkt-optische Methoden hingegen benötigen zur Detektion keine Markierung der Biomoleküle. Außerdem ermöglichen sie es, die Hybridisierung zeitaufgelöst zu verfolgen. Daraus lassen sich neben Konzentrationen auch kinetische und thermodynamische Konstanten der biomolekularen Interaktion berechnen. In den letzten Jahren wurden viele Fragestellungen zur DNA-Analyse mit Hilfe direkt-optischer Methoden untersucht, z. B. die Bestimmung von Punktmutationen in kurzen Oligonukleotidsequenzen, die Analyse von PCR-Produkten und der Nachweis von pathogenen Keimen in der Nahrungs- und Futtermittelindustrie sowie in der klinischen Diagnostik.

Neben der Oberflächenplasmonenresonanz Spektroskopie (*surface plasmon resonance*, SPR) die über ein evaneszentes Feld die Änderung des Brechungsindex an der sensitiven Schicht detektiert [Song 2002; Chien 2004; Rella 2004], kommt auch die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS) für die Untersuchung von Hybridisierungsexperimenten zum Einsatz [Sauer 1999, Möhrle 2005, Pröll 2005]. Bei der RIFS wird die optische Schichtdicke bestimmt, die das Produkt aus Brechungsindex und physikalischer Schichtdicke darstellt. Bei Temperaturänderung ändern sich diese beiden Parameter gegenläufig, so dass sich der Temperatureffekt nicht auf die Messsignale auswirkt. Beide Methoden verwenden planare Träger als Transducerelemente, auf denen die Fängeroligonukleotide immobilisiert sind. Bei parallelisierten Aufbauten sind diese in Rastern (sog. Arrays) auf der Oberfläche aufgebracht, die Detektion erfolgt dann orts aufgelöst über eine CCD-Kamera. Mittels dieser DNA-Chips können theoretisch hunderte bis tausende Nukleinsäuresequenzen aus einem Analyt-Gemisch heraus bestimmt und analysiert werden.

2.2 BIOMOLEKULARE INTERAKTIONSANALYSE (BIA)

2.2.1 DETEKTION AN GRENZSCHICHTEN

Die biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA) auf planaren Trägern findet an einer funktionalisierten Sensoroberfläche statt. Bei der Anbindung eines Analyten an seinen auf der Oberfläche immobilisierten Wechselwirkungspartner ändern sich eine oder mehrere physikalische Eigenschaften der sensitiven Schicht. Es handelt sich somit um eine heterogene Reaktion. Im Gegensatz dazu bezeichnet man biomolekulare Wechselwirkungen, die in Lösung stattfinden, als homogene Reaktionen.

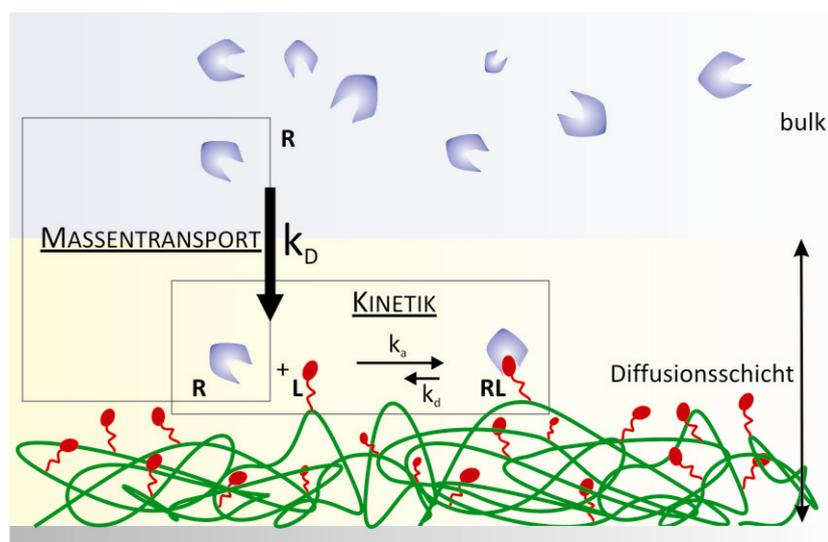


Abbildung 7: Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung an einer Grenzfläche im Durchfluss ([Piehler 1997]).

Betrachtet man eine Affinitätsreaktion an einer Grenzschicht, so setzt sich diese aus zwei Schritten zusammen: dem Massentransport an die Oberfläche (diffusions-limitiert) und der Kinetik der Wechselwirkung (kinetisch kontrolliert) zwischen den Bindungspartnern an der Oberfläche (Abbildung 7). Dabei handelt es sich formal um eine Folgereaktion, d. h. es kann nur der geschwindigkeits-bestimmende Schritt mit einem Biosensor detektiert werden. Betrachtet man die Interaktion eines Rezeptors R mit einem Liganden L an einer Oberfläche, so lässt sich diese Interaktion über folgende Gleichung beschreiben:



RL bezeichnet dabei den Ligand-Rezeptor-Komplex. Die thermodynamische Stabilität eines solchen Komplexes lässt sich über die Affinitätskonstante K_{off} der biomolekularen Wechselwirkung beschreiben (die in der Biochemie geläufigere Dissoziationskonstante K_{diss} ist das Reziprok der Affinitätskonstante). Rechnerisch ergibt sich die Affinitätskonstante über das Massenwirkungsgesetz oder über das Verhältnis der Assoziationsratenkonstante k_a zur Dissoziationsratenkonstanten k_d :

$$K_{off} = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[RL]}{[R] \cdot [L]} \quad (2.3)$$

$[R]$	Konzentration an Rezeptor
$[L]$	Konzentration an Ligand
$[RL]$	Konzentration an Ligand-Rezeptor-Komplex

Die Konzentration des Rezeptors in Lösung nimmt durch Anbindung an seinen Liganden auf der Oberfläche ab. Es entsteht somit ein Konzentrationsgradient zwischen Hauptteil der Lösung und Oberfläche des Sensors. Den Hauptteil der Lösung (das Volumen) nennt man bulk, den Bereich des Konzentrationsgradienten Diffusionsschicht. Je nach Variation der Konzentrationen an Ligand auf der Oberfläche bzw. der Konzentration an Rezeptor in Lösung kann man gezielt einen der beiden Schritte mit einem Biosensor beobachten und charakterisieren.

2.2.2 ANALYSE UNTER KINETISCH KONTROLLIERTEN BEDINGUNGEN

Unter kinetisch kontrollierten Messbedingungen wird mit Hilfe eines Biosensors die Bindungskinetik des Rezeptors mit dem auf einer Oberfläche immobilisierten Liganden detektiert (siehe Abbildung 7). Diese Bedingungen liegen vor, wenn die Konzentration an Ligand auf der Oberfläche gering und die Konzentration an Rezeptor in Lösung hoch ist. Dies bedeutet, dass die Konzentration in der

Diffusionsschicht während der Interaktionsanalyse gleich der Rezeptorkonzentration im bulk ist. Die Diffusion der Moleküle an die Oberfläche verläuft sehr viel schneller als die Bildung des Ligand-Rezeptor-Komplexes. Diese verläuft nach einem bimolekularen Mechanismus, der Zerfall des Komplexes nach einem monomolekularen Zerfallsmechanismus. Die Bildung des Ligand-Rezeptor-Komplexes lässt sich somit über folgende Geschwindigkeitsgleichung beschreiben [Kumpf 2005]:

$$\begin{aligned} \frac{d[RL_{\text{Oberfläche}}]}{dt} &= k_{a,\text{het}} \cdot [R_{\text{bulk}}] \cdot [L_{\text{Oberfläche}}] - k_{d,\text{het}} \cdot [RL_{\text{Oberfläche}}] \\ &= k_{a,\text{het}} \cdot [R_{\text{bulk}}] \cdot ([RL_{\text{Oberfläche,max}}] - [RL_{\text{Oberfläche}}]) - k_{d,\text{het}} \cdot [RL_{\text{Oberfläche}}] \end{aligned} \quad (2.4)$$

$k_{a,\text{het}}, k_{d,\text{het}}$	Ratenkonstante der Bindung an der Oberfläche
$[R_{\text{bulk}}]$	Rezeptorkonzentration im bulk
$[L_{\text{Oberfläche}}]$	Konzentration an auf der Oberfläche immobilisiertem Liganden
$[RL_{\text{Oberfläche}}]$	Konzentration an auf der Oberfläche gebildetem Ligand-Rezeptor-Komplex
$[RL_{\text{Oberfläche,max}}]$	theoretisch maximal mögliche Konzentration an Ligand-Rezeptor-Komplex auf der Oberfläche (Maximalbeladung) bei Injektion einer unendlich hohen Rezeptorkonzentration

Betrachtet man ein Durchflusssystem, d. h. wird Lösung der Konzentration $[R]$ ständig nachgeliefert, so kann die Konzentration des Rezeptors im bulk als konstant angesehen werden und man erhält eine Kinetik pseudo-erster Ordnung. Der zeitliche Verlauf der Komplexbildung wird durch mathematische Umformung und Integration obiger Formel erzielt und lautet:

$$[RL_{\text{Oberfläche}}](t) = [RL_{\text{Oberfläche,GG}}] \cdot (1 - e^{-k_{\text{obs}}t}) \quad (2.5)$$

Die Gleichgewichtsbeladung $[RL_{\text{Oberfläche,GG}}]$ beschreibt die Konzentration des Ligand-Rezeptor-Komplexes im Gleichgewicht, d. h. nach unendlich langer Reaktionszeit. Für $[RL_{\text{Oberfläche,GG}}]$ gilt dabei:

$$[RL_{\text{Oberfläche,GG}}] = [RL_{\text{Oberfläche,max}}] \cdot \frac{K_{\text{off}} \cdot [R_{\text{bulk}}]}{1 + K_{\text{off}} \cdot [R_{\text{bulk}}]} \quad (2.6)$$

Die scheinbare Ratenkonstante $k_{\text{obs,het}}$ spiegelt die Krümmung der Exponentialkurve wider. Für $k_{\text{obs,het}}$ gilt:

$$k_{\text{obs,het}} = k_{a,\text{het}} \cdot [R_{\text{bulk}}] + k_{d,\text{het}} \quad (2.7)$$

Da sowohl die Gleichgewichtsbeladung als auch die scheinbare Ratenkonstante von der Rezeptorkonzentration im bulk abhängig sind, ist es möglich unter kinetisch kontrollierten Messbedingungen sowohl die Thermodynamik als auch die Kinetik der biomolekularen Interaktion zu charakterisieren.

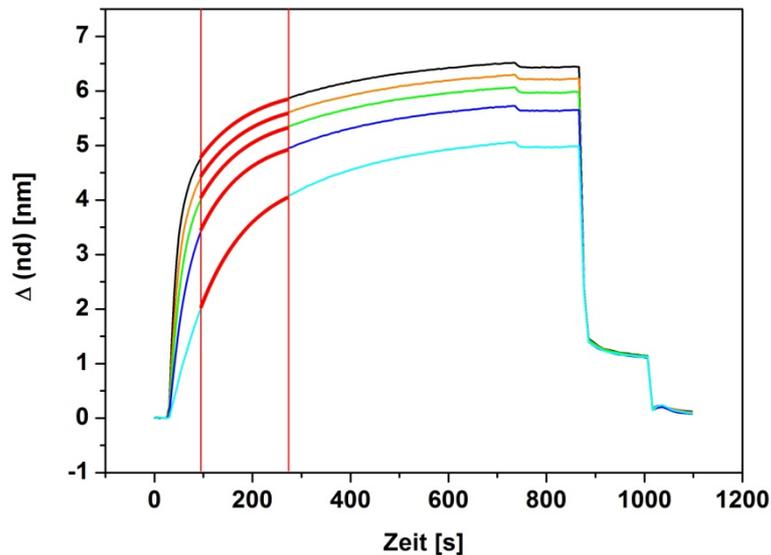


Abbildung 8: Auswertbarer Bereich der Assoziation (rot) bei kinetisch kontrollierten Bindungsexperimenten [Hänel 2003].

Abbildung 8 zeigt rot markiert den auswertbaren Bereich bei der Bestimmung der Affinitätskonstanten über die Krümmung der kinetisch kontrollierten Bindungskurve. Nur im mittleren Bereich der Bindungskurve ist eine sinnvolle exponentielle Kurvenanpassung möglich. Zu Beginn der Injektionsphase herrscht ein massentransport-limitiertes Verhalten vor, d. h. die Diffusion des Rezeptors zum Liganden an die Oberfläche ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (lineares Verhalten der Bindungskurve). Im hinteren Kurvenbereich hingegen herrscht biexponentielles Verhalten vor, d. h. der Rezeptor bindet nun auch an schlechter zugängliche Liganden auf der Oberfläche. Hier überlagert eine andere Assoziationsratenkonstante $k_{a,het,biexp}$ die zu untersuchende Assoziationsratenkonstante.

Über die Auftragung von $k_{obs,het}$ gegen die eingesetzte Rezeptorkonzentration $[R_{bulk}]$ lässt sich nach Gleichung (2.7) aus der Steigung die Assoziationsratenkonstante $k_{a,het}$ und aus dem Achsenabschnitt die Dissoziationsratenkonstante $k_{d,het}$ bestimmen (Abbildung 9). Aus dem Quotienten der beiden Ratenkonstanten lässt sich wiederum die Affinitätskonstante der Reaktion berechnen. Desweiteren kann man die Affinitätskonstante unter kinetisch kontrollierten Bedingungen auch unter der Verwendung des sog. „Scatchard-Plots“ bestimmen [Scatchard 1949]. Hierfür misst man die Gleichgewichtsbeladung des Rezeptors an die Oberfläche.

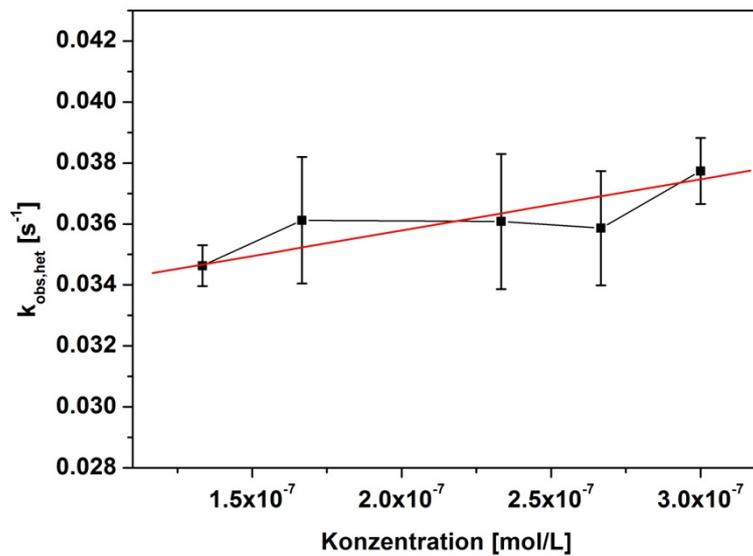


Abbildung 9: Auftragung von den aus Abbildung 8 erhaltenen Werten für $k_{obs,het}$ gegen die jeweilige eingesetzte Konzentration.

Diese folgt der Langmuir'schen Adsorptionsisothermen:

$$\Gamma_{GG} = \Gamma_{max} \frac{K_{off} \cdot C_R}{1 + K_{off} \cdot C_R} \quad (2.8)$$

Durch Umformung dieser Gleichung nach [Piehler 1997] erhält man den Scatchard-Plot:

$$\frac{\Gamma_{GG}}{C_R} = K_{off} \cdot \Gamma_{max} - K_{off} \cdot \Gamma_{GG} \quad (2.9)$$

Trägt man $\frac{\Gamma_{GG}}{C_R}$ gegen Γ_{GG} auf, so kann man die Affinitätskonstante K_{off} aus der Steigung der linearen Regression ermitteln (Abbildung 10).

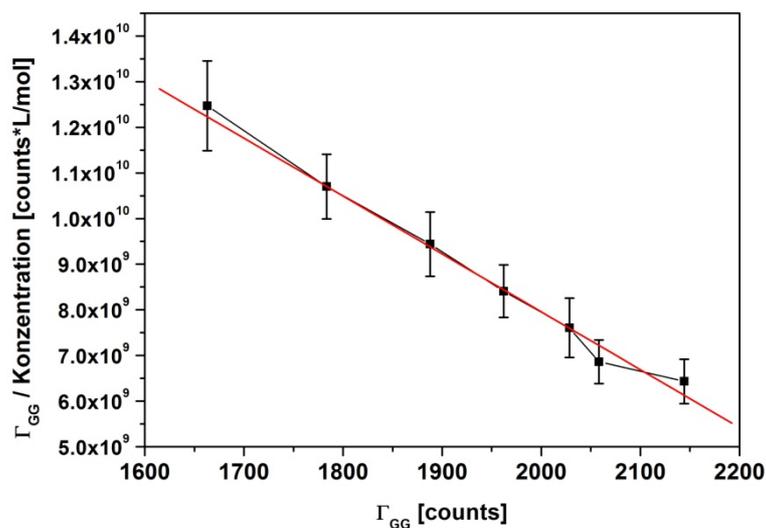


Abbildung 10: Scatchard-Plot zur Ermittlung der Affinitätskonstante.

2.2.3 ANALYSE UNTER DIFFUSIONS-KONTROLLIERTEN BEDINGUNGEN

Unter diffusions-kontrollierten Messbedingungen ist die Diffusion des Rezeptors der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und somit der Prozess, welcher mit einem Biosensor detektiert werden kann. Diese Bedingungen liegen vor, wenn die Konzentration an Ligand auf der Oberfläche hoch und die Konzentration an Rezeptor in Lösung niedrig ist. Dies bedeutet, dass jedes an die Oberfläche diffundierte Rezeptormolekül sofort einen Bindungspartner findet und mit diesem interagieren kann. Die Kinetik der Wechselwirkung ist somit deutlich schneller als die Diffusion der Teilchen an die Oberfläche. Die Diffusion des Rezeptors zur Oberfläche folgt dem 1. Fickschen Gesetz. Dieses lautet für den allgemeinen Fall:

$$J = -D \cdot \frac{\partial c}{\partial x} \quad (2.10)$$

J	Fluss
D	Diffusionskoeffizient
$\frac{\partial c}{\partial x}$	Konzentrationsgradient

Betrachtet man speziell nun die Diffusion des Rezeptors an die Oberfläche, so ergibt sich folgender Ausdruck:

$$-\frac{d[R_{\text{Oberfläche}}]}{dt} = \frac{d[RL_{\text{Oberfläche}}]}{dt} = D_R \cdot \frac{[R_{\text{bulk}}]}{d_{\text{diff}}} \quad (2.11)$$

D_R	Diffusionskoeffizient des Rezeptors
d_{diff}	Dicke der Diffusionsschicht

D_R ist dabei der Diffusionskoeffizient des Rezeptors, d_{diff} die Dicke der Diffusionsschicht.

Unter der Annahme, dass der Konzentrationsgradient durch die Diffusionsschicht hindurch linear ist und die Konzentration des Rezeptors an der Oberfläche gleich null, ergibt sich:

$$\frac{\partial c}{\partial x} = \frac{0 - R_{\text{bulk}}}{d_{\text{diff}}} \quad (2.12)$$

Kennt man die Dimensionen des Flusskanals und die Flussgeschwindigkeit parallel zur Sensoroberfläche, so ergibt sich für die Diffusionsschicht d_{diff} folgender Ausdruck:

$$d_{diff} = \sqrt[3]{\frac{D_R \cdot h^2 \cdot b \cdot l}{F}} \quad (2.13)$$

h	Höhe des Flusskanals
b	Breite des Flusskanals
l	Länge des Flusskanals
F	Flussgeschwindigkeit

Unter diesen diffusions-kontrollierten Messbedingungen kann die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand auf der Oberfläche nicht charakterisiert werden. Betrachtet man Gleichung (2.11) so erkennt man, dass die Komplexbildungsgeschwindigkeit proportional zur Konzentration an Rezeptor im bulk ist. Somit ist es also möglich, unter diesen Messbedingungen die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand im bulk, d. h. die homogene Reaktion, zu charakterisieren (siehe Abbildung 11). Da im Fall der homogenen Reaktion zwischen Ligand und Rezeptor die Umgebung die Wechselwirkung nicht stört (wie beim heterogenen Fall), sind die auf diese Weise ermittelten Affinitätskonstanten näher an der Realität und fallen meist etwas höher aus.

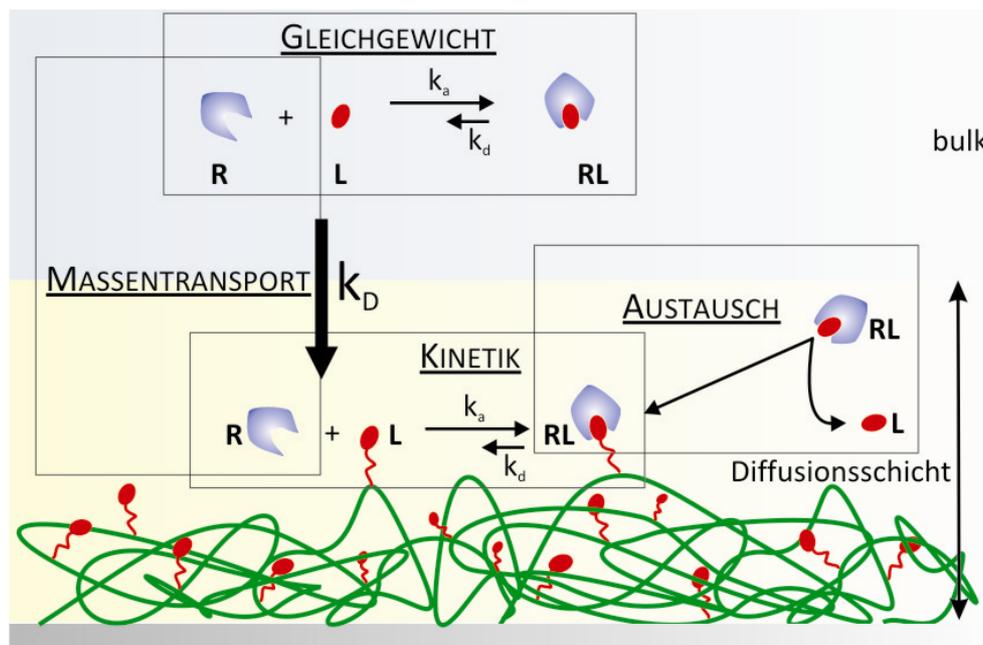


Abbildung 11: Wechselwirkungsprozesse bei der Detektion der freien Rezeptorkonzentration in homogener Phase ([Piehler 1997]).

Wichtig hierbei ist, dass man mit der Konzentration der aktiven Rezeptoren rechnet, d. h. nur die Konzentration an Rezeptoren berücksichtigt wird, die auch in der Lage zur biomolekularen Interaktion mit dem Liganden sind. Die aktive Konzentration des Rezeptors kann unter Umständen stark von der mit z. B. spektroskopischen Methoden bestimmten Rezeptorkonzentration abweichen.

Durch die Titration des Rezeptors mit dem Liganden kann man die Stabilität des Rezeptor-Ligand-Komplexes bestimmen. Aus der Titrationskurve kann die Affinitätskonstante bestimmt werden. Für Rezeptoren mit einem Paratop ist die Form der Kurve gegeben durch:

$$K_{\text{aff}} = \frac{[RL_{\text{bulk}}]}{([R_{\text{bulk}}]_0 - [RL_{\text{bulk}}]) \cdot ([L_{\text{bulk}}]_0 - [RL_{\text{bulk}}])} \quad (2.14)$$

Hierbei bezeichnen $[R_{\text{bulk}}]_0$ bzw. $[L_{\text{bulk}}]_0$ die eingesetzten Konzentrationen an Rezeptor bzw. Ligand. Lösen dieser Gleichung ergibt als physikalisch einzig sinnvolle Lösung:

$$[RL_{\text{bulk}}] = \frac{[R_{\text{bulk}}]_0 + [L_{\text{bulk}}]_0 + K_{\text{aff}}^{-1}}{2} - \sqrt{\left(\frac{[R_{\text{bulk}}]_0 + [L_{\text{bulk}}]_0 + K_{\text{aff}}^{-1}}{2}\right)^2 - [R_{\text{bulk}}]_0 \cdot [L_{\text{bulk}}]_0} \quad (2.15)$$

Die Konzentration der Rezeptoren, die noch an die auf der Oberfläche immobilisierten Liganden binden können, ergibt sich hieraus zu:

$$\begin{aligned} [R_{\text{bulk}}] &= [R_{\text{bulk}}]_0 - [RL_{\text{bulk}}] \\ &= \frac{[R_{\text{bulk}}]_0 - [L_{\text{bulk}}]_0 - K_{\text{aff}}^{-1}}{2} + \sqrt{\left(\frac{[R_{\text{bulk}}]_0 + [L_{\text{bulk}}]_0 + K_{\text{aff}}^{-1}}{2}\right)^2 - [R_{\text{bulk}}]_0 \cdot [L_{\text{bulk}}]_0} \end{aligned} \quad (2.16)$$

Die Rezeptorkonzentration ist somit abhängig von den eingesetzten Konzentrationen an Rezeptor und Ligand im bulk sowie von der Affinitätskonstante. Mit Gleichung (2.16) ist es somit möglich, sowohl die Affinitätskonstante als auch die Konzentration an aktiven Rezeptoren über eine Titrationsreihe zu bestimmen. Da diese Gleichung nur für monovalente Rezeptoren gilt, muss man bei monoklonalen Antikörpern das zweite Paratop berücksichtigen. Für monoklonale Antikörper ergibt sich somit die Konzentration an vollständig besetztem Rezeptor nach einer Binomialverteilung [Kumpf 2005] zu:

$$[R_{\text{bulk}}]_{\text{voll}} = \frac{[RL_{\text{bulk}}]^2}{2 \cdot [R_{\text{bulk}}]_0} \quad (2.17)$$

Diese Gleichungen gelten nur für definierte Systeme, bei denen die Bindungsstellen absolut gleichwertig sind, z. B. bei monoklonalen Antikörpern. Aus Gleichungen (2.16) und (2.17) ergibt sich für die Konzentration an aktiven Antikörpern:

$$\begin{aligned}
 [R_{bulk}]_{aktiv} &= \frac{[R_{bulk}]_0}{2} - [R_{bulk}]_{voll} \\
 &= \frac{[R_{bulk}]_0}{2} \cdot \frac{\left(\frac{[R_{bulk}]_0 - [L_{bulk}]_0 - K_{off}^{-1}}{2} + \sqrt{\left(\frac{[R_{bulk}]_0 + [L_{bulk}]_0 + K_{off}^{-1}}{2} \right)^2 - [R_{bulk}]_0 \cdot [L_{bulk}]_0} \right)^2}{2 \cdot [R_{bulk}]_0} \quad (2.18)
 \end{aligned}$$

Da die Titrationskurve durch Gleichung (2.18) nur sehr schlecht angepasst werden kann, verwendet man stattdessen die empirisch bestimmte und geläufigere Logistik-Funktion:

$$S = \frac{A_1 - A_2}{1 - \left(\frac{x}{x_0} \right)^p} + A_2 \quad (2.19)$$

S	gemessenes Signal
A ₁	größter Signalwert
A ₂	kleinster Signalwert
x	Ligandenkonzentration
x ₀	Ligandenkonzentration am Testmittelpunkt
p	Steigungsfaktor der Funktion

Über den Testmittelpunkt (blaue Markierung in Abbildung 12) dieser Funktion lässt sich die Affinitätskonstante der untersuchten Interaktion ermitteln. Dieser Wert ist meist etwas verfälscht, da nur die Rezeptorkonzentration und nicht die aktive Rezeptorkonzentration einbezogen wird.

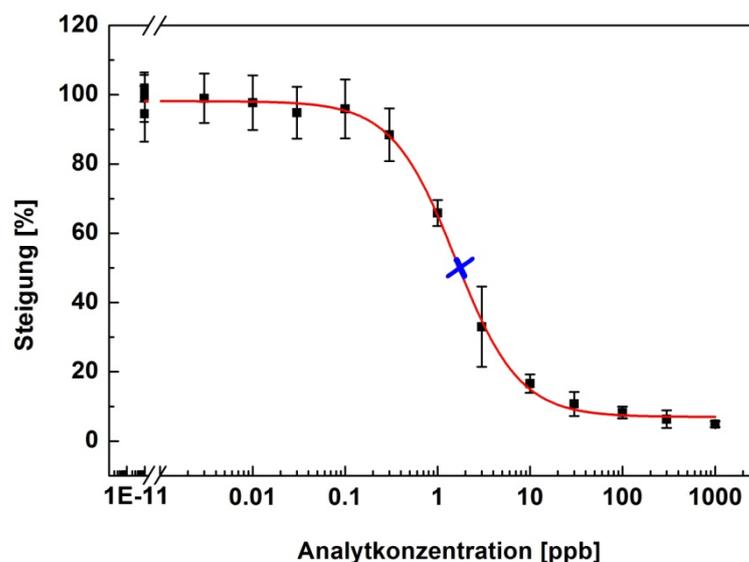


Abbildung 12: Logistik-Fit (rot) einer Titrationskurve eines Antikörpers mit seinem Liganden (Analyt), der Testmittelpunkt ist blau markiert.

Unter diffusions-kontrollierten Messbedingungen kann neben der Affinitätskonstante auch unter zeitabhängiger Beobachtung des Konzentrationsverlaufs der Reaktion die Assoziationsratenkonstante berechnet werden. Eine detaillierte Beschreibung der Bestimmung der Assoziationsratenkonstanten unter diesen Bedingungen ebenso wie die Überlagerung von Kinetik und Diffusion bei der biomolekularen Interaktionsanalyse findet sich bei [Kumpf 2005].

2.3 OPTISCHE GRUNDLAGEN

2.3.1 TRANSMISSION UND REFLEXION VON LICHT

Tritt Licht von einem Medium in ein anderes ein, so kann es zu Absorption A , Transmission T und/oder Reflexion R des Lichtes kommen, deren Ausmaß abhängig von den optischen Konstanten Absorptionskoeffizient k und Brechungsindex n der betrachteten Medien ist. Es gilt:

$$1 = T + R + A \quad (2.20)$$

Vernachlässigt man die Absorption ($k = 0$) und betrachtet den Einfall eines Lichtstrahls unter einem Winkel ϕ_1 auf die Phasengrenze zwischen den beiden Medien mit n_1 und n_2 (wobei $n_1 < n_2$), so wird der Lichtstrahl zum Teil reflektiert und zum Teil im Winkel ϕ_2 bezüglich des Lots in das Medium mit n_2 transmittiert („gebrochen“). Dabei gilt das Brechungsgesetz nach Snellius (Gleichung (2.21)) und es ergibt sich das in Abbildung 13 gezeigte Verhalten. Alle drei Teilstrahlen liegen dabei in einer Ebene.

$$n_1 \cdot \sin \phi_1 = n_2 \cdot \sin \phi_2 \quad (2.21)$$

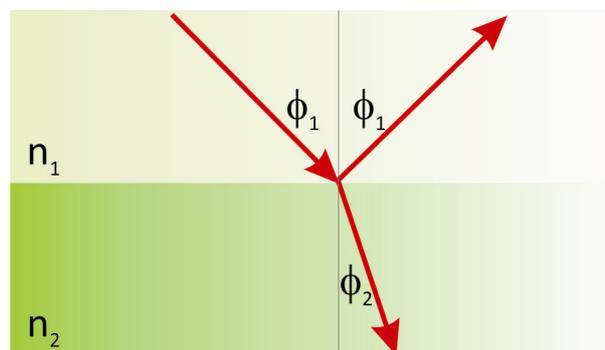


Abbildung 13: Transmission und Reflexion eines Lichtstrahls an einer Phasengrenze mit $n_1 < n_2$. Die elektromagnetische Welle trifft unter einem Winkel ϕ_1 auf die Phasengrenze und wird unter diesen Bedingungen bei Transmission zum Lot hin gebrochen.

Für den reflektierten Anteil gilt das Reflexionsgesetz („Einfallswinkel gleich Ausfallswinkel“). Die Intensität der Lichtstrahlen wird hierbei über die Fresnel-Koeffizienten beschrieben, $r_{p,12}$ bzw. $r_{s,12}$ für den reflektierten Teilstrahl, $t_{p,12}$ bzw. $t_{s,12}$ für den transmittierten Teilstrahl (Gleichung (2.22)). Der Index 12 steht für den Übergang des Lichts von Medium 1 nach Medium 2, p bezeichnet den Anteil des Lichts, der parallel zur Einfallsebene liegt, s den senkrecht dazu stehenden Anteil.

$$\begin{aligned}
 r_{p,12} &= \frac{n_2 \cos \phi_1 - n_1 \cos \phi_2}{n_2 \cos \phi_1 + n_1 \cos \phi_2} \\
 r_{s,12} &= \frac{n_2 \cos \phi_1 - n_1 \cos \phi_2}{n_1 \cos \phi_1 + n_2 \cos \phi_2} \\
 t_{p,12} &= \frac{2n_1 \cos \phi_2}{n_2 \cos \phi_1 + n_1 \cos \phi_2} \\
 t_{s,12} &= \frac{2n_1 \cos \phi_1}{n_1 \cos \phi_1 + n_2 \cos \phi_2}
 \end{aligned}
 \tag{2.22}$$

2.3.2 REFLEXION AN DÜNNEN SCHICHTEN

Als dünne Schichten bezeichnet man Schichten, deren physikalische Schichtdicke sich im Bereich der Wellenlänge des Lichts bewegt. Bei senkrechtem Lichteinfall ergibt sich für eine dünne Schicht mit dem Brechungsindex n_2 und der physikalischen Schichtdicke d_2 , welche umgeben ist von zwei Medien mit den Brechungsindizes n_1 und n_3 von unendlicher Schichtdicke, das in Abbildung 14 gezeigte Verhalten.

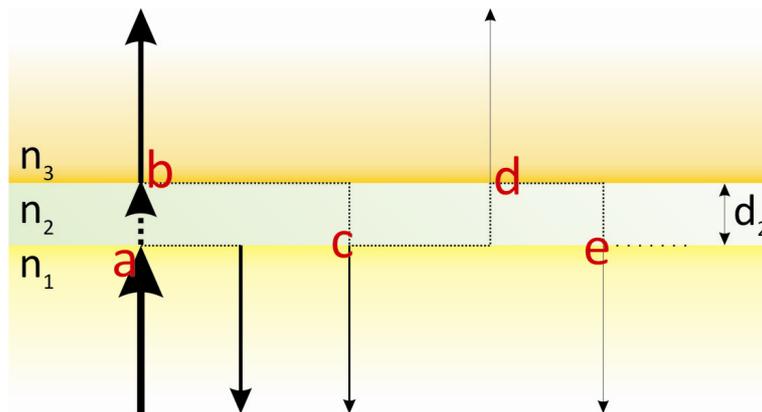


Abbildung 14: Mehrfachreflexion eines Lichtstrahls an einer dünnen Schicht bei senkrechtem Einfall nach [Frank 2005].

Der Lichtstrahl mit der Intensität 1 trifft bei **a** senkrecht auf die Phasengrenze und wird dort reflektiert und transmittiert. Für den reflektierten Teilstrahl gilt gemäß Gleichung (2.22)

$$r_1 = \frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2},$$

für den in die dünne Schicht transmittierten Teilstrahl ergibt sich gemäß Gleichung (2.20) eine Amplitude zu $\sqrt{1 - r_1^2}$. Der transmittierte Teilstrahl wird bei **b** erneut mit dem Bruchteil

$$r_2 = \frac{n_2 - n_3}{n_2 + n_3}$$

reflektiert, es ergibt sich somit für dessen Amplitude $r_2 \cdot \sqrt{1 - r_1^2}$. Dieser reflektierte Teilstrahl wird bei **c** wiederum mit einer Amplitude von $r_2(1 - r_1^2)$ transmittiert, die hier austretende Teilwelle hat im Unterschied zur bei **a** reflektierten Teilwelle einen Gangunterschied von $2n_2d_2$. Diese beiden Teilwellen werden nun nach Amplitude und Phase addiert, es ergibt sich:

$$r_1 + r_2(1 - r_1^2)e^{-i\Delta_1} \quad (2.23)$$

mit der Phase $\Delta_1 = \frac{4\pi}{\lambda}n_2d_2$. Bei Fortsetzung der Reflexion und Transmission der elektromagnetischen Welle innerhalb der Schicht mit n_2 (siehe **d** und **e** usw.) ergibt sich eine unendliche Anzahl an Teilwellen, deren Amplituden und Phasen sich in der resultierenden Welle addieren zu:

$$re^{i\epsilon} = \frac{r_1 + r_2 e^{-i\frac{4\pi}{\lambda}n_2d_2}}{1 + r_1 r_2 e^{-i\frac{4\pi}{\lambda}n_2d_2}} \quad (2.24)$$

Die messbare Reflektivität R erhält man durch Multiplikation von (2.24) mit ihrem komplex konjugierten Wert:

$$R = |re^{i\epsilon}|^2 = \frac{r_1^2 + r_2^2 + 2r_1r_2 \cos \Delta_1}{1 + r_1^2 r_2^2 + 2r_1r_2 \cos \Delta_1} \quad (2.25)$$

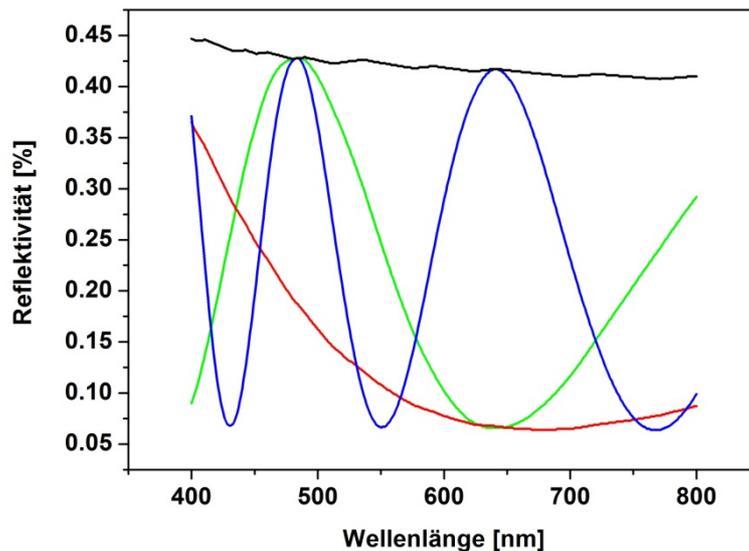


Abbildung 15: Simulierter Reflektivitätsverlauf einer 1 nm (schwarz), 115 nm (rot), 330 nm (grün) bzw. 660 nm (blau) dicken Siliziumdioxid-Schicht, jeweils auf BK7 Glassubstrat (überschichtet mit Wasser).

In Abbildung 15 ist der simulierte Reflektivitätsverlauf für eine Siliziumdioxidschicht mit unterschiedlichen Schichtdicken gegen die Wellenlänge im sichtbaren Bereich aufgetragen. Deutlich erkennbar ist, dass mit steigender Schichtdicke die Anzahl an Modulationen zunimmt, d. h. vermehrt Minima und Maxima im Reflexionsspektrum erscheinen, und dass bei diesem Schichtsystem im sichtbaren Bereich eine maximale Reflektivität von 0,45 % gegeben ist.

2.4 REFLEKTOMETRISCHE INTERFERENZSPEKTROSKOPIE

2.4.1 ALLGEMEINES

Die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS) ist eine auf Weißlichtinterferenz an dünnen Schichten basierende Methode zur markierungsfreien und Zeit-aufgelösten Detektion von Schichtdickenänderungen. Sie basiert auf dem Phänomen der Interferenz von reflektierten Teilstrahlen. Durch rückseitiges Beleuchten des planaren, transparenten Schichtsystems wird an jeder Phasengrenze der Lichtstrahl teils transmittiert, teils reflektiert. Je nach verwendetem Schichtsystem ergibt sich durch Brechungsindex n und physikalische Schichtdicke d ein für diesen Schichtaufbau charakteristisches Interferenzspektrum. Die sensitive Schicht ist die einzige Schicht, deren chemische bzw. physikalische Eigenschaften sich durch die biomolekulare Interaktion ändern. Sie ist die letzte Schicht, die der Lichtstrahl durchläuft. Durch Schichtdickenzunahme der sensitiven Schicht, z. B. durch die Anbindung eines Rezeptors an einen immobilisierten Liganden oder durch die Quellung von mikroporösen Polymeren durch Einlagerung von kleinen Molekülen, ändert sich der

Gangunterschied des Lichts in dieser Schicht. Hierdurch ändert sich die Intensität bei jeder Wellenlänge und das Interferenzspektrum verschiebt sich in horizontaler Richtung.

Durch Verfolgen eines prominenten Punktes, z. B. eines Extrempunktes, kann aus dieser Verschiebung auf die Änderung der optischen Schichtdicke zurückgeschlossen werden. Hierdurch ist es möglich, biomolekulare Interaktionen nicht nur qualitativ zu detektieren, sondern auch quantitativ zu charakterisieren. Zum einen lassen sich kinetische Ratenkonstanten (Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten) bestimmen, zum anderen kann die biomolekulare Wechselwirkung thermodynamisch charakterisiert werden (Affinitätskonstanten). Desweiteren ist die Konzentrationsbestimmung über Kalibrierung der eingesetzten Sensoren möglich. Vorteil der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie ist die Robustheit gegenüber Temperaturänderungen. Ändert sich die Temperatur während einer Messung, so kompensieren sich die Änderungen in Brechungsindex und physikalischer Schichtdicke durch gegenläufige Effekte nahezu komplett.

2.4.2 EINFLUSS DES SCHICHTSYSTEMS

Für die RfS kommen planare und transparente Träger zum Einsatz, hauptsächlich Glastypoberflächen bzw. Kunststoffsubstrate. Zur Funktionalisierung von Glastypoberflächen wird die etablierte Silanchemie auf Siliziumdioxid-Oberflächen eingesetzt, zur Funktionalisierung von Kunststoffsubstraten verwendet man hauptsächlich durch elektrostatische Wechselwirkung auf die Oberfläche aufgebrauchte Polyelektrolyt Multischichten (PEM) oder durch photochemische Methoden erzeugte funktionelle Gruppen.

Betrachtet man Glasträger mit aufgebrauchten Siliziumdioxidschichten im sichtbaren Spektralbereich, so ist eine minimale Schichtdicke von 70 nm SiO_2 erforderlich, damit im Reflexionsspektrum ein Minimum erhalten wird. Dieses Minimum hat seinen Scheitelpunkt bei einer Wellenlänge von ungefähr 420 nm und ist recht breit, d. h. zur Auswertung durch einen Parabelfit relativ ungeeignet. Wächst die SiO_2 Schichtdicke weiter an, so verschiebt sich das Minimum zu höheren Wellenlängen bis es bei einer Schichtdicke von 130 nm SiO_2 wieder aus dem sichtbaren Bereich verschwindet. Ab 140 nm SiO_2 erscheint ein Maximum im Reflexionsspektrum, dieses verläuft ebenfalls recht breit und verschiebt sich bei weiterer Schichtdickenzunahme ebenfalls zu höheren Wellenlängen. Ab 210 nm SiO_2 erscheint zusätzlich ein Minimum. Bei 250 nm SiO_2 verschwindet das Maximum aus dem sichtbaren Bereich bis bei einer Schichtdicke von 280 nm SiO_2 wieder ein Maximum erscheint. In Abbildung 16 ist dieser Reflektivitätsverlauf gezeigt.

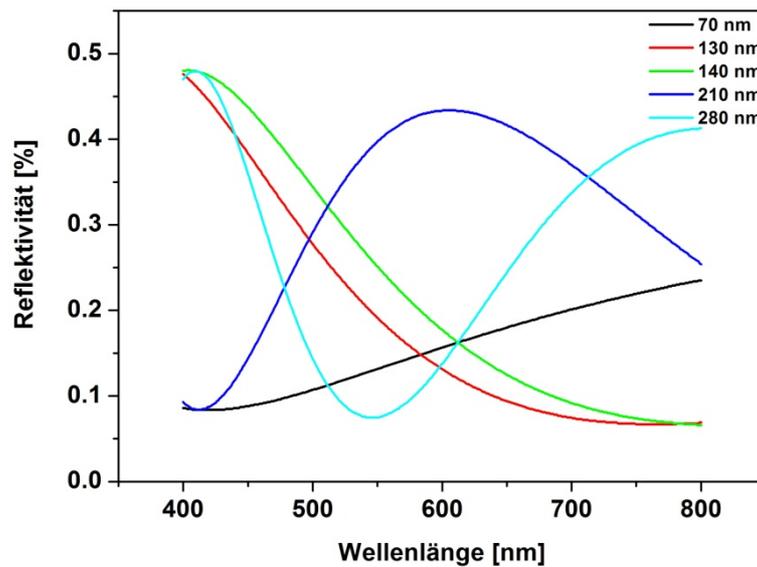


Abbildung 16: Simulierte Reflexionsspektren zur Bestimmung der minimalen Schichtdicken von Siliziumdioxid auf BK7 Glassubstrat zum Erhalt von Extrempunkten für die spektrale Auswertung.

Wie aus den Simulationen ersichtlich ist, scheint eine Schichtdicke von 280 nm SiO_2 von Vorteil, da ein spektral auswertbares Minimum im Bereich um eine Wellenlänge von 550 nm vorhanden ist. In diesem Wellenlängenbereich zeigen die verwendeten Diodenzeilenspektrometer ein geringes Rauschen, der Polynomfit sollte in diesem Bereich also optimal sein.

Durch Einbringen einer hochbrechenden Schicht (z. B. Tantalpentoxid Ta_2O_5 , $n_{500} = 2,2$) lässt sich die Reflektivität um einen Faktor von ca. sieben auf ungefähr 3 % steigern. In Abbildung 17 ist der Reflektivitätsverlauf einer 280 nm bzw. 330 nm dicken Siliziumdioxid-Schicht ohne bzw. mit einer darunter aufgetragenen 10 nm dicken Tantalpentoxid-Schicht im sichtbaren Bereich gezeigt.

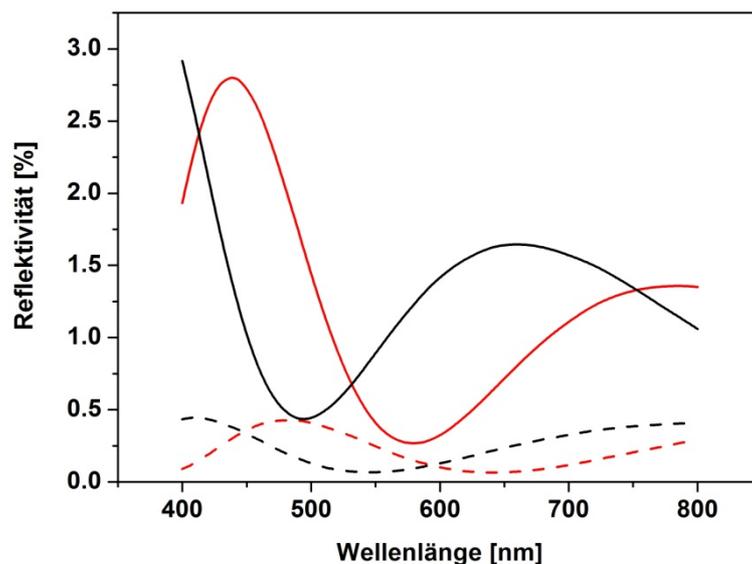


Abbildung 17: Vergleich des simulierten Reflektivitätsverlaufs einer 280 nm (schwarz) bzw. einer 330 nm (rot) dicken Siliziumdioxid-Schicht, ohne (gestrichelte Linie) bzw. mit (kompakte Linie) einer 10 nm dicken Tantalpentoxid-Schicht im sichtbaren Bereich gezeigt.

darunter aufgebracht 10 nm dicken Tantalpentoxid-Schicht, jeweils auf BK7 Glassubstrat (mit Wasser überschichtet).

Erkennbar ist, dass sich das Minimum durch vorheriges Aufbringen einer hochbrechenden Schicht zu kürzeren Wellenlängen (hypsochrom) verschiebt. Die Breite der Extrempunktbereiche wird durch die hochbrechende Schicht schmaler, diese sind durch einen Polynomfit besser anzunähern als breite Extrempunktbereiche, d. h. das Rauschen wird verringert. Als optimales Schichtsystem für die spektrale Auswertung ergibt sich somit eine 330 nm Siliziumdioxid-Schicht auf 10 nm Tantalpentoxid („Interferenzglas“).

2.4.3 SPEKTRALE AUSWERTUNG

Durch Zeit-aufgelöstes Verfolgen eines prominenten Punktes (Extrempunkt) im Interferenzspektrum während des Bindungsereignisses ist es möglich, über die optische Schichtdickenänderung Informationen über das Wechselwirkungssystem zu erhalten. Diese sog. „spektrale Auswertung“ erfordert ein Minimum oder ein Maximum im Interferenzspektrum, an welches ein Polynom angepasst wird. Die Verschiebung eines Scheitelpunkts dieses Polynoms wird dann zur Auswertung herangezogen. Je nach Polynom verbessert sich diese Anpassung durch Wahl einer höheren Ordnung bis zu einem Optimum bei einem Polynom zwölften Grades (Abbildung 18). Darüber hinaus wird die Anpassung wieder schlechter [Poppe 2007].

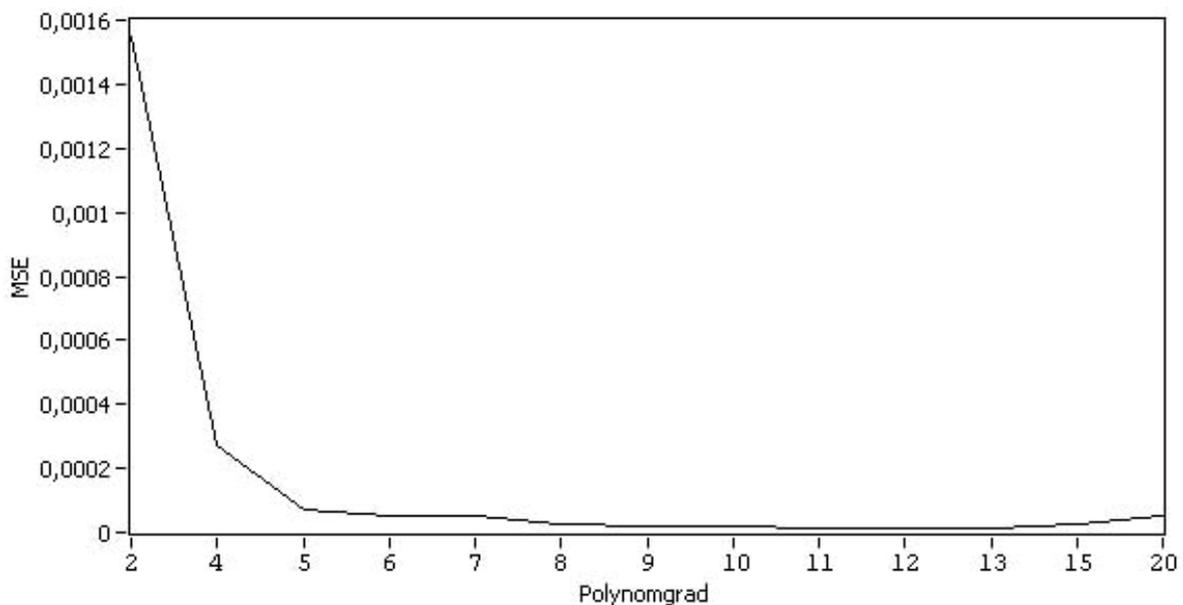


Abbildung 18: Mittlere quadratische Abweichung (MSE) der Polynomnäherungen 2., 4. bis 13., 15. und 20. Grades. Die Verwendung eines Polynoms zwölften Grades zur Anpassung an ein Extremum im Interferenzspektrum liefert den besten Fit (nach [Poppe 2007]).

Das Interferenzspektrum wird durch Referenzierung des Reflexionsspektrums erhalten. Hierbei wird das bei Verwendung von Weißlichtlampen auftretende Lampenspektrum subtrahiert. Als Referenz für Interferenzglas dient ein Transducer („Referenzglas“) mit einer 10 nm dicken Tantalpentoxid-Schicht auf Glassubstrat. Eine ausführliche Beschreibung der Referenzierung und Bestimmung der Maxima bzw. Minima findet sich in [Hänel 2003].

In Abbildung 19 sind die simulierten Reflexionsspektren von Referenzglas und Interferenzglas gezeigt (schwarze Kurven), sowie das durch Division dieser beiden erhaltene Interferenzspektrum (rot). Erkennbar ist, dass durch die Referenzierung das Minimum schmäler und symmetrischer wird und somit die Polynomannäherung weiter verbessert wird.

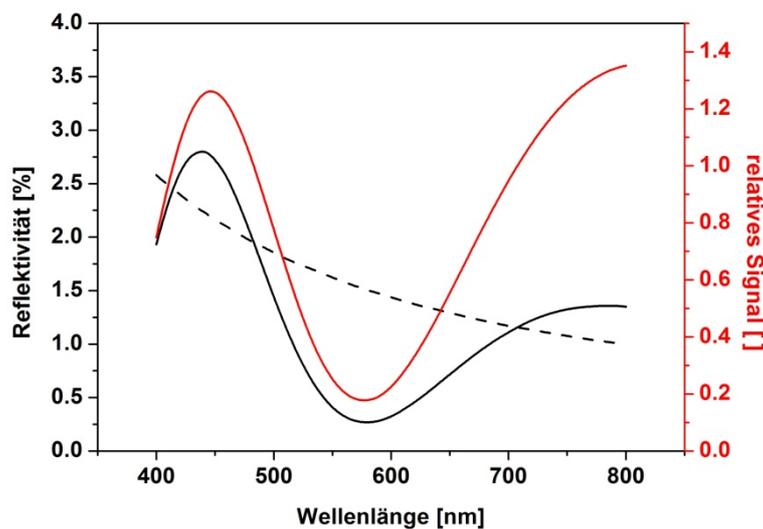


Abbildung 19: Simuliertes Reflexionsspektrum von Referenzglas (schwarz gestrichelt) und simuliertes Reflexionsspektrum von Interferenzglas (schwarz kompakt), jeweils auf BK7-Glassubstrat (mit Wasser überschichtet). Das daraus durch Referenzierung gewonnene Interferenzspektrum ist als rote kompakte Kurve dargestellt.

Der Vorteil der spektralen Auswertung durch Einbeziehen einer Vielzahl an Wellenlängen über einen bestimmten Bereich liegt in einem sehr geringen Rauschen von fünf bis zehn pm optischer Schichtdicke. Außerdem lassen sich Artefakte wie Absorption oder Streuung einfach und mit großer Sicherheit aus einem Interferenzspektrum erkennen.

Der Nachteil der spektralen Auswertung liegt begründet in der Tatsache, dass eine gewisse minimale Schichtdicke auf dem Glaträger vorhanden sein muss, damit im Wellenlängenbereich von Interesse überhaupt ein Extrempunkt vorhanden ist. Betrachtet man den sichtbaren Bereich zwischen 400 nm und 800 nm, so erscheint ein für die spektrale Auswertung optimales Minimum bei einer Schichtdicke von 330 nm Siliziumdioxid auf 10 nm Tantalpentoxid. Somit muss durch Aufdampfen von Schichten geeigneter Dicke auf das Trägermaterial oder durch Präparieren dieser Schichten erst die Ausgangssituation für eine spektrale Auswertung geschaffen werden.

In Abbildung 20 sind die bei einer Gleichgewichtsbeladung eines Antikörper-Antigen-Systems gemessenen Interferenzspektren gezeigt. Man erkennt deutlich die Verschiebung der Spektren nach höheren Wellenlängen. Durch Polynomfit an jedes Spektrum kann das Minimum ermittelt werden und somit die Verschiebung des Extrempunktes mit der Änderung der optischen Schichtdicke korreliert werden.

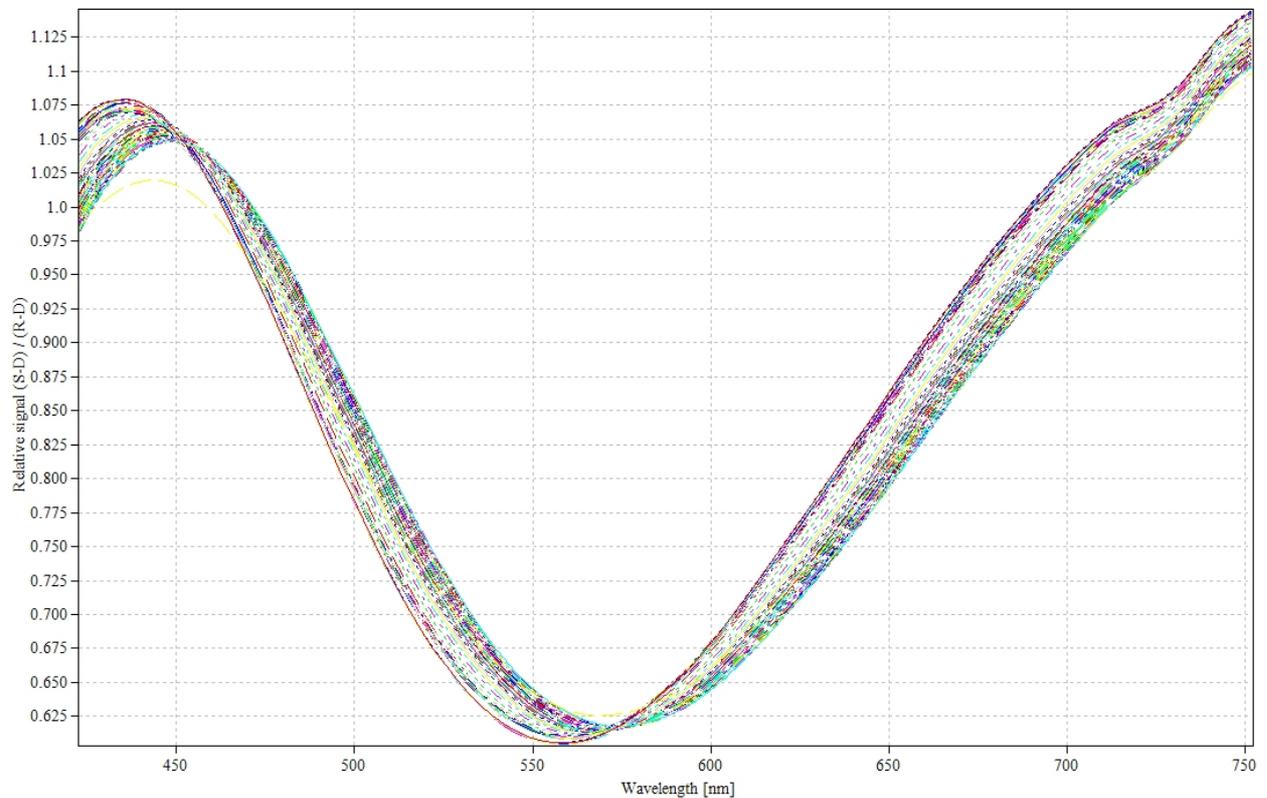


Abbildung 20: Bei der Gleichgewichtsbeladung eines Antikörpers an seinen immobilisierten Liganden aufgenommenen Interferenzspektren. Deutlich zu erkennen ist die Verschiebung des Minimums nach höheren Wellenlängen.

2.4.4 1- λ REFLEKTOMETRIE

Im Gegensatz zur spektralen Auswertung bei der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie wird bei der 1- λ Reflektometrie die Intensitätsänderung einer einzelnen, geeigneten Wellenlänge während des Bindungsereignisses verfolgt [Piehler 1997]. Es ist somit nicht nötig, die Verschiebung eines Extrempunktes im Spektrum zu verfolgen und es fällt die Restriktion einer minimalen physikalischen Schichtdicke [Frank 2005]. Der experimentelle Aufbau vereinfacht sich hierbei enorm, da zur Detektion lediglich eine monochromatische Lichtquelle, z. B. eine LED (*light emitting diode*), eine Photodiode und der funktionalisierte Transducer benötigt werden.

Bei der Änderung der optischen Schichtdicke der sensitiven Schicht durch Anbindung von Molekülen an die Oberfläche ändert sich die Reflektivität jeder Wellenlänge. Die Änderung ist je nach Schichtsystem und Wellenlänge unterschiedlich, für alle Wellenlängen ändert sich die Reflektivität aber periodisch. Abbildung 21 zeigt den Verlauf der Reflektivität bei den Wellenlängen 450 nm (schwarze Kurve) und bei 700 nm (rote Kurve) für einen Schichtzuwachs der AMD-Schicht um 250 nm auf Interferenzglas. Zu erkennen ist, dass bei einer Wellenlänge von 450 nm zwei Maxima und zwei Minima durchlaufen werden, während bei einer Wellenlänge von 700 nm nur ein Minimum und ein Maximum durchlaufen wird.

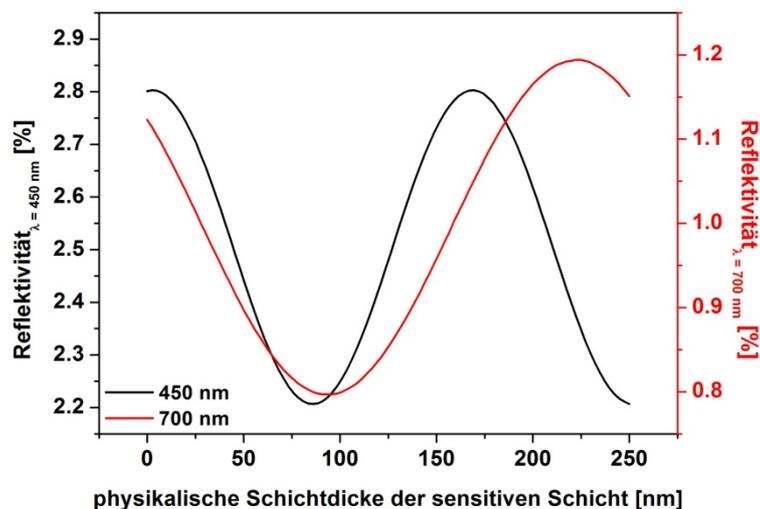


Abbildung 21: Simulierter Verlauf der Reflektivität der Wellenlängen 450 nm (schwarze Kurve) und 700 nm (rote Kurve) in Abhängigkeit der physikalischen Schichtdicke der sensitiven Schicht (in diesem Fall: AMD) auf Interferenzglas.

Zu beachten ist bei der $1-\lambda$ Reflektometrie, dass die zur Detektion verwendete Wellenlänge geeignet gewählt wird. Generell kann jede Wellenlänge verwendet werden, da die Information der biomolekularen Interaktion in jeder Wellenlänge vorhanden ist. Je nach Schichtsystem und betrachtetem Interaktionssystem ist aber eine andere Wellenlänge zur Erzielung einer optimalen Auswertung zu wählen.

Im Folgenden wird das Schichtsystem AMD auf Interferenzglas betrachtet. Unter Flüssigkeit (Puffer) ist das Polymer auf eine physikalische Schichtdicke von ungefähr 30 nm [Hehl 1998] gequollen. Bei Anbindung eines Antikörpers an einen auf dem AMD immobilisierten Liganden quillt die sensitive Schicht auf ca. 60 nm an. Für die Wellenlänge von 450 nm zeigt sich bei diesem Schichtdickenzuwachs von 30 nm auf 60 nm (und etwas darüber hinaus) ein linearer Zusammenhang, die Reflektivität nimmt linear mit der physikalischen Schichtdicke ab. Zur Beobachtung von biomolekularen Wechselwirkungen in diesem Bereich der physikalischen Schichtdickenänderung ist diese Wellenlänge somit geeignet. Für die Wellenlänge 700 nm zeigt sich ein linearer Zusammenhang bis genau 60 nm physikalischer Schichtdicke der sensitiven Schicht, darüber hinaus ist das Verhalten

nicht mehr linear. Diese Wellenlänge ist für die Untersuchung dieses Wechselwirkungssystems auf Interferenzglas somit ebenfalls geeignet. Betrachtet man hingegen die Wellenlänge 520 nm, so sieht man deutlich, dass man für das gewählte Antigen-Antikörper-System ein Maximum der Reflektivität durchläuft, für mittlere Konzentrationen an Analyt also größere Signale erzielt werden als für größere Konzentrationen (Abbildung 22). Außerdem kehrt sich die Änderung der Reflektivität von positiv nach negativ um.

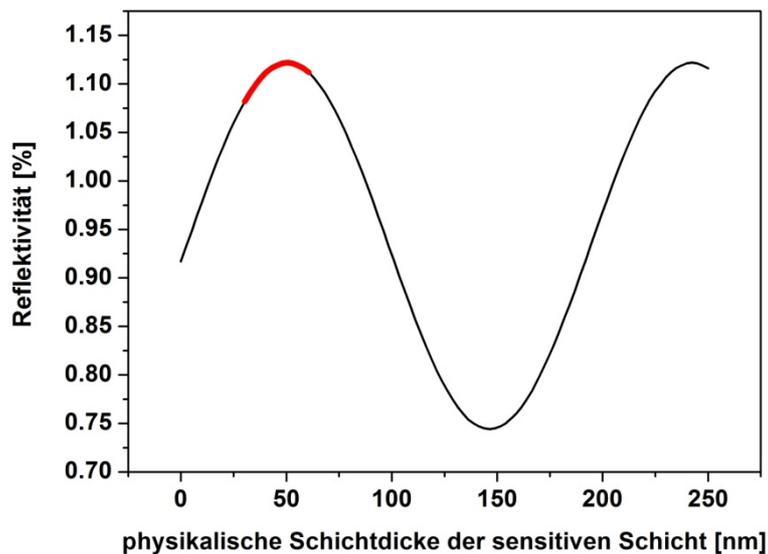


Abbildung 22: Simulierter Verlauf der Reflektivität bei der Wellenlänge 520 nm in Abhängigkeit der physikalischen Schichtdicke der sensitiven Schicht (in diesem Fall: AMD) auf Interferenzglas. Rot markiert ist der Bereich, in dem sich die physikalische Schichtdicke bei der Untersuchung der Anbindung von Antikörpern an immobilisiertes Antigen ändert.

In Abbildung 23 sind die bei der in Abbildung 20 gezeigten Messung der Gleichgewichtsbeladung eines Antikörpers mit immobilisiertem Liganden erhaltenen Spektren normiert auf das erste Spektrum gezeigt. Gut erkennbar ist in dieser Abbildung die Änderung der Intensität für jede Wellenlänge während der Messung. Maximale Intensitätsänderungen erhält man für die Wellenlängen 515 nm (positiv) und 648 nm (negativ). Bei ca. 450 nm und ca. 573 nm hingegen ändert sich die Intensität während der biomolekularen Interaktion fast gar nicht.

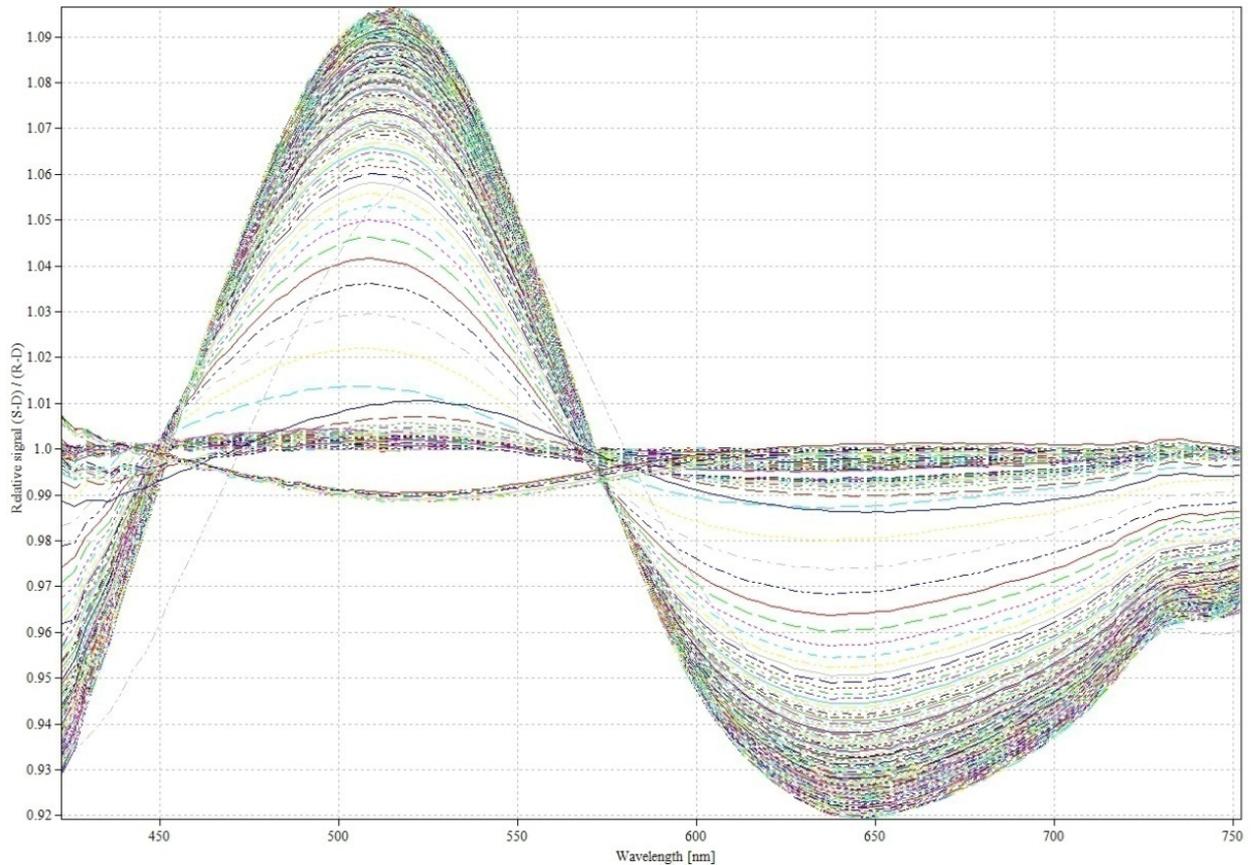


Abbildung 23: Aus einer Gleichgewichtsbeladung mit Antikörper erhaltene Interferenzspektren, normiert auf das erste Spektrum. Man erkennt deutlich die Änderung der Intensität bei jeder Wellenlänge (siehe auch [Kumpf 2005]).

Nach [Frank 2005] ist die Wellenlänge „optimal“, bei der die Intensitätsänderung maximal ist. Dies kann insofern falsch sein, als dass zwar das erhaltene Signal am größten ist, die gewählte Wellenlänge unter Umständen aber das in Abbildung 22 dargestellte Verhalten zeigt. Für quantitative Untersuchungen wie z. B. Affinitätskonstanten- oder Konzentrationsbestimmungen kann diese Wellenlänge somit ungeeignet sein. Essentieller als die maximale Intensitätsänderung ist die Gewährleistung einer linearen Abhängigkeit der Reflektivität von der Änderung der physikalischen Schichtdicke im betrachteten Messbereich.

Betrachtet man die Anbindung größerer Moleküle bzw. Teilchen, so ist die Wahl einer hohen Wellenlänge geeignet, da der Bereich, in dem sich die Intensität linear zur Schichtdickenzunahme verhält breiter ist, als bei kürzeren Wellenlängen. In Abbildung 24 sind die Abstände zwischen Minimum und Maximum in Abhängigkeit der Wellenlänge des eingestrahlten Lichts gezeigt. Verwendet man größere Wellenlängen für die $1-\lambda$ Reflektometrie, so kann man über einen größeren Bereich der physikalischen Schichtdickenzunahme messen, ohne Verlust der linearen Abhängigkeit der Reflektivität von der physikalischen Schichtdickenänderung. Dies kann insbesondere bei großen Analyten von Vorteil sein. Bei kleineren Wellenlängen hingegen ist die Empfindlichkeit der Messung für kleinere Moleküle größer.

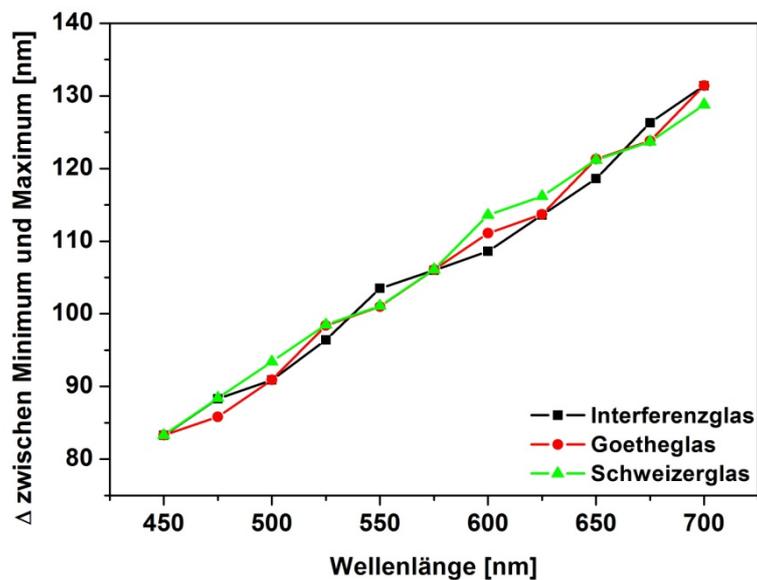


Abbildung 24: Aus simulierten Reflektivitätsverläufen erhaltene Abstände zwischen Minimum und Maximum, aufgetragen in Abhängigkeit der Wellenlänge des eingestrahlt Lichts.

Die $1\text{-}\lambda$ Reflektometrie lässt sich aufgrund ihrer Einfachheit sehr gut miniaturisieren und parallelisieren. Das zurzeit entwickelte iRif (*imaging Rif*) basiert auf eben dieser Methode. Mit einer LED wird ein funktionalisierter Mikroskop-Glasträger ausgeleuchtet, an dem die biomolekulare Interaktion stattfindet. Mit einer CCD-Kamera wird die Intensität des am Transducer reflektierten Lichts aufgezeichnet. Durch orts aufgelöste Auswertung der Intensitätsänderung kann man sehr einfach Hochdurchsatz-Screening auf Mikroarrays betreiben. Zum Referenzieren von unspezifischer Bindung wählt man nicht bespottete Flächen auf dem Mikroarray und verrechnet diese mit den interessanten Spots.

Ein Nachteil der Rif gegenüber der spektralen RifS ist, dass man Artefakte wie Luftblasen bzw. Brechungsindexsprünge nicht so einfach von Bindungssignalen unterscheiden kann, da beim spektralen RifS sich die Intensität sämtlicher Wellenlängen bei einem Artefakt analog zueinander verändern. Zur Erkennung von Artefakten in der Rif könnte eine zweite optimale Wellenlänge hinzugezogen werden. Diese könnte auch zur Driftkorrektur eingesetzt werden (sog. $2\text{-}\lambda$ Reflektometrie). Wichtig hierbei ist, dass sich die Änderung der Reflektivität bei der zweiten Wellenlänge im untersuchten Schichtdickenbereich ebenfalls linear verhält.

2.5 NANOPARTIKEL

Die in den letzten Jahren entstandene Nanotechnologie hat sich zu einem vielversprechenden Forschungsgebiet mit breitem Anwendungsfeld entwickelt. Materialien in Nanometerskala (griech. nano = Zwerg) zeigen aufgrund ihrer geringen Größe andere mechanische, optische, elektrische und magnetische Eigenschaften als die entsprechenden Materialien in makroskopischen Dimensionen. Das Verhältnis von Oberfläche zum Volumen macht Nanopartikel ebenfalls besonders in ihrem Verhalten. Nanopartikel bilden damit eine Brücke zwischen isolierten Atomen und Festkörpern. Nanomaterialien wurden schon in der Antike zur Färbung von Gläsern eingesetzt. Heutzutage finden sie Einsatz in der Katalyse, Photographie, als Beschichtung von Oberflächen und in der Datenspeicher- und Sensortechnologie.

Eine Vielzahl von Nanopartikeln bestehend aus unterschiedlichen Materialien ist derzeit Fokus der Forschung. Neben metallischen Nanopartikeln (v. a. Gold, Silber, Platin) kommen inzwischen auch magnetische Nanopartikel (z. B. Magnetit, Maghemit), halbleitende Materialien (z. B. TiO_2 , CdSe, CdS, PbS) und Polymer-Partikel (z. B. Polystyrol, PMMA, Polylactat) sowie Kombinationen oben genannter als sog. Core-Shell-Partikel zum Einsatz.

2.5.1 MAGNETISCHE NANOPARTIKEL

Magnetische Nanopartikel (mNP) finden v. a. Anwendung in der Biomedizin zur gezielten Freisetzung von Medikamenten, Nukleinsäuresequenzen oder radioaktiven Pharmazeutika im menschlichen Körper, zur Behandlung von Tumoren (Hyperthermie), in der Kernspinresonanstechnik, in Immunoassays und zur Abtrennung und Reinigung von Nukleinsäuren und Zellen. Die mNP bestehen normalerweise aus einem kleinen, meist 3-8 nm großen magnetischen Kern (Magnetit, Fe_3O_4) und einer umgebenden Hülle, welche den Hauptteil der Größe des Partikels ausmacht und die Agglomeration der Teilchen verhindert. Die Hülle besteht meist aus Tensiden, Biomolekülen oder Polymeren wie z. B. Dextran, und bietet die Möglichkeit, weitere (Bio-) Moleküle an die Partikel zu binden. Außerdem kann über die Wahl der Hülle die Biokompatibilität der Partikel gesteuert werden. Der Magnetit-Kern zeigt super-paramagnetisches Verhalten, d. h. Remanenz und Koerzitivkraft gehen gegen Null, nach Entfernen eines externen Magnetfeldes sind die Teilchen vollständig entmagnetisiert. Die Kristallstruktur von Magnetit (inverse Spinellstruktur) ist in Abbildung 25 gezeigt.

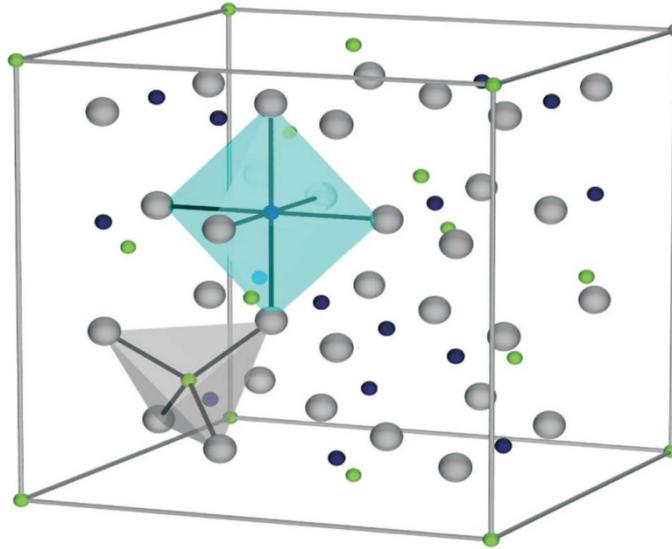


Abbildung 25: Kristallstruktur von Magnetit (inverse Spinellstruktur) (Quelle: <http://www.physik.uni-augsburg.de/~schrupda>).

Bisher ist Magnetit das einzige super-paramagnetische Material das für den Einsatz am und im Menschen zugelassen ist. Magnetit-Nanopartikel sind nicht-toxisch und biokompatibel und werden über die Niere oder Leber ausgewaschen oder über Phagozyten metabolisiert [Berry 2003].

Für die Herstellung von magnetischen Nanopartikel (mNP) gibt es zwischenzeitlich eine Reihe von Synthesevorschriften. Mittels nass-chemischer Verfahren lassen sich Magnetit-Nanopartikel einfach und mit guter Reproduzierbarkeit herstellen. Beim Mischen einer FeCl_2 -Lösung mit einer FeCl_3 -Lösung unter ammoniakalischen Bedingungen fallen Magnetit-Nanopartikel aus. Durch Variation der Reaktionsdauer und der Temperatur kann die Größe der entstehenden Nanopartikel gesteuert werden. Nach Abtrennung der mNP aus dem Gemisch werden diese mittels Tetrabutylammoniumhydroxid, oberflächenaktiven Stoffen (z. B. Tensiden) oder mit Polymerumhüllungen (z. B. Dextran) stabilisiert und gegen eine Agglomeration untereinander geschützt. Eine weitere Möglichkeit, magnetische Nanopartikel herzustellen besteht in der thermischen Zersetzung von Eisen-triacetylacetonat ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) oder Eisen-pentacarbonyl ($\text{Fe}(\text{CO})_5$). Die so erhaltenen Nanopartikel können nur in organischen Lösungsmitteln gelöst werden und erreichen eine maximale Größe von 15 nm Durchmesser. Desweiteren stellen spezielle Bakterien (*magnetospirillum gryphiswaldense*) sog. Magnetosome (Magnetit-Nanopartikel umgeben von Lipiden) mit einer Ausbeute von ungefähr 6 mg Magnetit pro Liter und Tag her [Heyen 2003; Buske 1984; Khalafalla 1980; Shen, 1999; Hyeon 2003; Sun 2002].

Je nach umgebender Hülle können diese magnetischen Nanopartikel auf unterschiedlichsten Wegen funktionalisiert werden, z. B. durch elektrostatische Wechselwirkungen, kovalente Bindungen (über homo- oder hetero-bifunktionelle Linker) oder Affinitätsreaktionen (Biotin-Streptavidin, Protein G-Antikörper).

2.5.2 GOLDNANOPARTIKEL

Goldnanopartikel (gNP) wurden schon vor vielen hundert Jahren aufgrund ihrer leuchtend roten Farbe zum Färben von Kirchenfenstern und Weinpokalen verwendet. Diese kommt durch eine starke Absorptionsbande im VIS-Bereich zustande, verursacht durch eine kollektive Schwingung der Leitungsbandelektronen (Plasmonenschwingung). Man spricht auch von lokalisierter Oberflächenplasmonenresonanz (*localized surface plasmon resonance*, LSPR). Die Resonanzwellenlänge hängt dabei vom Brechungsindex der Umgebung des Nanopartikels ab. Bindet ein Ligandmolekül in wässriger Lösung (Matrix) an einen auf dem gNP immobilisierten Rezeptor, so verändert sich der Brechungsindex in der näheren Umgebung und die Resonanzwellenlänge verschiebt sich (Abbildung 26).

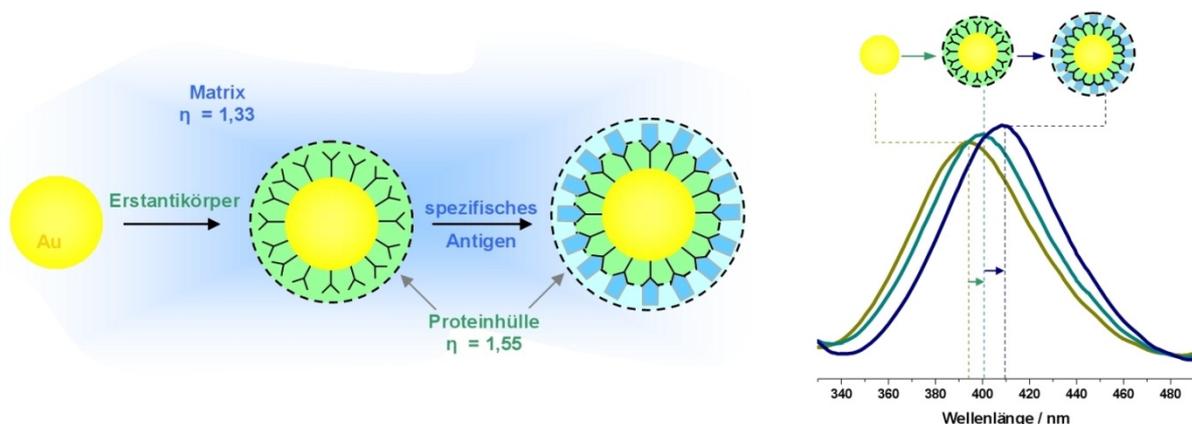


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Beschichtung von Goldnanopartikeln (links) und die sich dabei aufgrund des verändernden Brechungsindex der Umgebung verschiebenden UV/VIS-Spektren (modifiziert nach [Bücker, 2007]).

Diese Eigenschaft kann wie bei der konventionellen SPR zu sensorischen Zwecken (Biomolekulare Interaktionsanalyse) genutzt werden [Lukosz 1991; Lukosz 1997; Liedberg 1993; Englebienne 2003; Haes 2004a; Haes 2004b]. Außerdem werden die gNP zur Markierung von Molekülen (z. B. Proteine in Zerebrospinalflüssigkeit und Blutserum [Green 1925; Maclagan 1944] analog zur Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen verwendet.

Desweiteren verstärken Goldnanopartikel in der konventionellen Oberflächenplasmonenresonanz Spektroskopie aufgrund von Plasmonenkopplung das Signal [He 2000]. In der Ramanspektroskopie wird das Signal durch Einsatz von gNP sogar um mehrere Größenordnungen verstärkt (sog. oberflächenverstärkte Ramanspektroskopie, surface enhanced raman spectroscopy, SERS).

Goldnanopartikel können auf zwei Arten hergestellt werden: durch Feinverteilung von kristallinem Gold durch Anlegen eines Hochspannungsfeldes oder durch reduktive Kondensation von entsprechenden Metallsalzen. Die reduktive Kondensation von Goldsäure mit Citrat bei erhöhten Temperaturen ist die geläufigste Methode zur Herstellung von gNP in der Größe zwischen 2 nm und

50 nm. Die Reduktion von Goldsäure mit Iso-Ascorbinsäure in Gegenwart von Gummiarabikum liefert in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Konzentration des Reduktionsmittels gNP zwischen 80 nm und 5 μm [Goia 1999].

Zur Funktionalisierung von Goldnanopartikeln stehen zwei einfache und schnelle Möglichkeiten zur Verfügung. Die erste besteht in der elektrostatischen Anbindung von Polyelektrolyten. gNP sind negativ geladen, d. h. die Anbindung eines Polykations ist über Adsorption möglich und stabil. Dieses Polykation kann dann funktionalisiert bzw. durch Auftragen eines Polyanions die Hülle weiter verändert werden. Die zweite Möglichkeit liegt in der starken, dativen Bindung zwischen Schwefel- und Gold-Atomen [Paddephatt 1978; Dubois 1992]. Thiol-funktionalisierte Moleküle (z. B. Alkanthiole, thiolierte Oligonukleotide oder Proteine, etc.) wurden und werden erfolgreich bei der Synthese von gNP an diese angebunden (Abbildung 27) und eingesetzt.

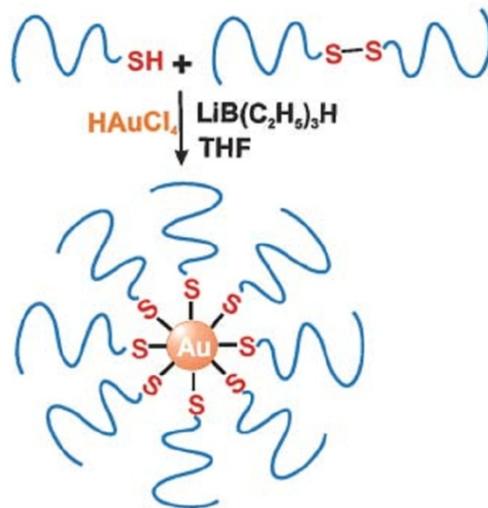


Abbildung 27: Schematische Darstellung der simultanen Synthese und Beschichtung von Goldnanopartikeln mittels thiolierter Moleküle (modifiziert nach [Shan 2007]).

2.5.3 SILIKANANOPARTIKEL

Silikananopartikel (sNP) werden hauptsächlich als Träger für (Fluoreszenz-)Farbstoffe verwendet. Hierfür werden die Farbstoffe entweder auf die Oberfläche gekoppelt oder in die Partikel eingebaut (Abbildung 28). Ähnlich den Quantenpunkten zeigen diese markierten sNP ein stark vermindertes Photobleichen der Farbstoffmoleküle. Die sNP lassen sich über Silanchemie einfach und schnell kovalent funktionalisieren und aufreinigen. Daher bieten sie ein großes Potential in der Multiplex-Analyse und als „*barcoding targets*“ [Wang 2006].

Zur Herstellung von reinen Silikananopartikeln gibt es neben dem für gewöhnlich verwendeten Stöber-Prozess [Stöber 1968] noch die Pyrolyse-Reaktionen [Pratsinis 1998], Mikroemulsionspolymerisation [Esquena 1997] und Wasserdampfhydrolysen [Ingebretsen 1983]. Beim Stöber-Prozess findet eine Hydrolyse von Tetraethylorthosilikat (TEOS) in einer Lösung aus Ammoniak, Wasser und Alkohol mit anschließender Kondensation der entstehenden Orthokieselsäure statt. Je nach Wasser- und Ammoniakkonzentration lassen sich nach Stöber sNP zwischen wenigen Nanometern und ca. 1 μm Größe synthetisieren. Durch Erhöhung der Monomerkonzentration erhält man noch größere sNP, allerdings erhöht sich die Größenverteilung drastisch [van Helden 1981]. Verwendet man Monomere mit längeren Alkylketten (z. B. Tetrapentylorthosilikat), so vergrößern sich die gebildeten sNP aufgrund geringerer Hydrolysegeschwindigkeit noch weiter [Bogush 1988].



Abbildung 28: Schematische Darstellung der Synthese von sog. „core-shell“-Partikeln aus Farbstoff-Organosilikat-Prekursoren mittels der Stöber-Methode (modifiziert nach [Burns 2006]).

3. MATERIALEN UND METHODEN

3.1 MATERIALIEN

3.1.1 STANDARDCHEMIKALIEN

DCC	Dicyclohexyl-carbodiimid	Sigma, Deisenhofen/D
DIC	Diisopropoyl-carbodiimid	Fluka, Neu-Ulm/D
DCM	Dichlormethan	Fluka, Neu-Ulm/D
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin	Sigma, Deisenhofen/D
DMF	N,N-Dimethylformamid	Fluka, Neu-Ulm/D
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid	Fluka, Neu-Ulm/D
GA	Glutarsäureanhydrid	Fluka, Neu-Ulm/D
GOPTS	3-Glycidyloxypropyl-trimethoxysilan	Fluka, Neu-Ulm/D
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxidlösung, 30 %ig	Fluka, Neu-Ulm/D
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure, rauchend	Sigma, Deisenhofen/D
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka, Neu-Ulm/D
KOH	Kaliumhydroxid	Fluka, Neu-Ulm/D
NaCl	Natriumchlorid	Fluka, Neu-Ulm/D
NaOH	Natriumhydroxid	Fluka, Neu-Ulm/D
NHS	N-Hydroxysuccinimid	Fluka, Neu-Ulm/D
OVA	Ovalbumin	Sigma, Deisenhofen/D
SDS	Natriumlaurylfatlösung (sodium dodecyl sulfate), 10 %ig	Fluka, Neu-Ulm/D
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl) -1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat	Fluka, Neu-Ulm/D
TO	Testosteron 3-(O-carboxymethyl)oxim	Sigma, Deisenhofen/D

3.1.2 BIOCHEMIKALIEN UND NANOPARTIKEL

Oligonukleotide

Sämtliche verwendete Oligonukleotide wurden bezogen von IBA, Göttingen/D.

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>
POIA3 anker 1	(H ₂ NC ₆) 5' - CGC TAC AAC CTA CAT - 3'
POIA3 antisense	5' - ATG TAG GTT GTA GCG - 3'
15T anker	(H ₂ NC ₆) 5' - TTT TTT TTT TTT TTT - 3'
21A-POIA3 tandem	5' - AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA CGC TAC AAC CTA CAT - 3'

Antikörper

<i>Name</i>	<i>Typ</i>	<i>Kommentar</i>
α -Testosteron	IgG	angegebene Affinitätskonstante $k = 5 \cdot 10^{10}$ [L/mol]; bezogen von Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen/D.
α -ACA	IgG	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. Abuknesha, King's College, London/UK.

Nanopartikel

<i>Material</i>	<i>Größe</i>	<i>Funktionalisierung</i>	<i>Hersteller</i>
SiO ₂	50 nm	Carboxy	G.Kisker GbR, Steinfurt/D
SiO ₂	50 nm	Streptavidin	G.Kisker GbR, Steinfurt/D
SiO ₂	70 nm	Carboxy	G.Kisker GbR, Steinfurt/D
Au	20 nm	---	Plano GmbH, Wetzlar/D
Au	20 nm	Antikörper (α -Biotin)	Plano GmbH, Wetzlar/D
Au	50 nm	---	Plano GmbH, Wetzlar/D
„Nanobeads“	50 nm	---	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
„Nanobeads“	50 nm	Amino	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
„Nanobeads“	50 nm	Streptavidin	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
„Nanobeads“	50 nm	Oligo(dT)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
„Nanobeads“	50 nm	POIA3-antisense	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
„Nanobeads“	50 nm	MaBu-antisense (LNA)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
„Nanobeads“	130 nm	POIA3-antisense	chemicell GmbH, Berlin/D
„Nanobeads“	250 nm	POIA3-antisense	G.Kisker GbR, Steinfurt/D
„Nanobeads“	500 nm	unfunktionalisiert	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D
„Nanobeads“	500 nm	POIA3-antisense	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach/D

3.1.3 POLYMERE UND BIOPOLYMERE

AMD	Aminodextran, 100000 Da, Aminierungsgrad 50 %	Innovent e.V., Jena/D
CMD	Carboxymethyldextran, 100000 Da	Innovent e.V., Jena/D
DAPEG	Diamino-Polyethylenglykol, 2000 Da	Rapp Polymere, Tübingen/D
DCPEG	Dicarboxy-Polyethylenglykol, 2000 Da	Rapp Polymere, Tübingen/D

3.1.4 BESCHICHTETE GLASTRÄGER UND ANDERE SUBSTRATE

Name	Substrat	1. Schicht*	2. Schicht*	Hersteller
Interferenzglas	D263 $n_{500} = 1,52$	Ta ₂ O ₅ $n_{500} = 2,2$ $d = 10$ nm	SiO ₂ $n_{500} = 1,46$ $d = 330$ nm	Unaxis, Balzers/FL
Interferenzreferenz	D263 $n_{500} = 1,52$	Ta ₂ O ₅ $n_{500} = 2,2$ $d = 10$ nm	---	Unaxis, Balzers/FL
Goetheglas	BK7 $n_{500} = 1,52$	Ta ₂ O ₅ $n_{500} = 2,2$ $d = 45$ nm	SiO ₂ $n_{500} = 1,46$ $d = 20$ nm	Berliner Glas, Berlin/D
Goethe-Referenz	BK7 $n_{500} = 1,52$	Ta ₂ O ₅ $n_{500} = 2,2$ $d = 45$ nm	---	Berliner Glas, Berlin/D
Jägerglas	BK7 $n_{500} = 1,52$	Cr $n_{500} = 2,8$ $d = 3$ nm	---	Berliner Glas, Berlin/D
Schweizerglas	BK7 $n_{500} = 1,52$	TiO ₂ $n_{500} = 2,6$ $d = 100$ nm	---	MICROS Präzisionsoptik GmbH & Co. KG, Schmiedefeld/D
BK7-Substrat	BK7 $n_{500} = 1,52$	---	---	MICROS Präzisionsoptik GmbH & Co. KG, Schmiedefeld/D
Plastik	ZEONOR $n_{500} = 1,52$	---	---	microfluidic ChipShop GmbH, Jena/D

(* Die 1. Schicht ist die direkt auf das Substrat aufgetragene Schicht, die 2. Schicht ist auf die 1. Schicht aufgedampft.)

3.1.5 LÖSUNGEN

phosphatgepufferte Kochsalzlösung, PBS (phosphate buffered saline)	8,76 g (150 mmol) NaCl und 1,36 g (10 mmol) KH ₂ PO ₄ in 1 L bidestilliertem Wasser, auf pH 7,4 titriert
„Piranha“	60 mL H ₂ SO ₄ (konz., 96 %ig) und 40 mL H ₂ O ₂ (30 %ig) VORSICHT: Wärmeentwicklung beim Mischen!
Regenerationslösung 1	0,5 % SDS, mit HCl auf pH 1,9 titriert

3.1.6 GERÄTE

Küvettspektrometer SPEKOL 1100 von Analytik Jena AG, Jena/D, modifiziert nach [Kraus 1993] mit Polymerlichtleiter (PMMA), 1 mm Durchmesser mit 1-auf-2 Faserkoppler von Boehringer Ingelheim microParts GmbH, Dortmund/D, und 5 V / 10 W Halogenlampe mit integriertem Reflektor von Oshino Lamps GmbH, Nürnberg/D.

ASIA Fließinjektionsanalyse(FIA)-System und Autosampler von ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld/D.

pH-Meter CG 843 von Schott AG, Mainz/D.

Spektralellipsometer ES4G von Sopra SA, Paris/F.

Multimode™ SPM-Gerät von Veeco Metrology Inc., Santa Barbara/USA.

UV/VIS-Spektrometer lambda 2 von Perkin Elmer, München/D.

3.2 METHODEN

3.2.1 OBERFLÄCHENMODIFIZIERUNG VON GLASTYPOBERFLÄCHEN

Die einzelnen Behandlungsschritte zur Funktionalisierung der Glastypoberflächen sind schematisch in Abbildung 29 gezeigt. Die kovalente Anbindung von Polymer und Ligand liefert eine sehr stabile Oberflächenbeschichtung, die lange haltbar und gut regenerationsfähig ist. Somit sind diese Schichten sehr häufig wieder verwendbar.

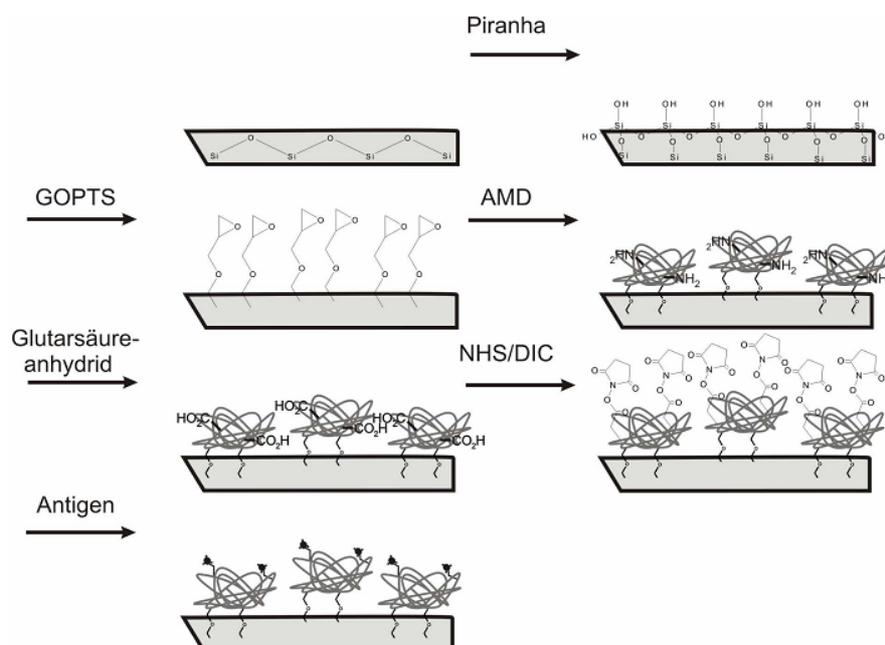


Abbildung 29: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte bei der kovalenten Oberflächenfunktionalisierung von Glastypoberflächen (nach [Albrecht 2006]).

Reinigung und Aktivierung

Zur Reinigung und Aktivierung werden „Interferenzglas“ und „Goethe-Glas“ für maximal eine Minute in 6 N KOH eingelegt, mit bidestilliertem Wasser gespült und anschließend im Ultraschallbad mit „Piranha“ für zehn Minuten aktiviert. Hierdurch werden auf der Siliziumdioxid-Schicht Silanol-Gruppen erzeugt und der Transducer wird sehr hydrophil.

„Schweizer-Glas“ wird im Plasmaverascher mit Sauerstoff-Plasma (300 W unter 0,8 mbar O₂) 15 Minuten lang behandelt. Hierdurch wird die Oberfläche ebenfalls gereinigt und für die anschließende Silanisierung aktiviert [Schweizer 2005].

Da die Aktivierung bereits nach wenigen Stunden abklingt, werden die so behandelten Glasträger gleich weiterverarbeitet.

Silanisierung

Die frisch gereinigten und aktivierten Glasträger werden gründlich mit bidestilliertem Wasser gespült und im Stickstoffstrom trocken geblasen. Für die Silanisierung wird in einer leeren Glaskammer 15 µL GOPTS auf einen Glasträger pipettiert und mit einem zweiten Träger gedeckelt (sog. „Sandwich-Technik“). Nach einer Stunde werden die Glasträger gründlich mit wasserfreiem Aceton gespült und mit Stickstoff trocken geblasen. Die mit GOPTS silanisierten Glasträger werden gleich weiterverarbeitet.

Immobilisierung von Biopolymer

Zur Immobilisierung von Aminodextran wird in einer mit Wasserdampf gesättigten Glaskammer 10 µL einer AMD-Lösung (1 mg AMD in 10 µL bidestilliertem Wasser) auf einen Glasträger pipettiert und mit einem zweiten gedeckelt und über Nacht stehen gelassen. Danach werden die Glasträger gründlich mit bidestilliertem Wasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen.

Zur Immobilisierung von Polyethylenglykol wird in einer leeren Glasschale 10 µL einer PEG-Lösung (4 mg PEG in 1 mL DCM) auf einen silanisierten Träger pipettiert und die Glasschale dann in einem Ofen bei 70 °C über Nacht stehen gelassen. Danach werden die Glasträger gründlich mit bidestilliertem Wasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen.

Die so aufgebrauchten Biopolymerbeschichtungen sind bei Lagerung der Glasträger im Kühlschrank über mehrere Monate haltbar.

Immobilisierung von carboxy-funktionalisierten Liganden bzw. Biotinylierung

Zur Immobilisierung von carboxy-funktionalisierten Liganden wird zuerst eine Lösung aus 1 mg Ligand mit 1,5 μL DIC in 10 μL wasserfreiem DMF eine Minute lang aktiviert, anschließend 10 μL dieser Lösung in einer mit DMF-Dampf gesättigten Kammer auf einen Glasträger pipettiert und mit einem zweiten gedeckelt. Nach Reaktion über Nacht werden die Glasträger zuerst mit DMF, dann mit bidestilliertem Wasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen.

Zur Biotinylierung von amino-funktionalisierten Oberflächen wird in einer mit DMF-Dampf gesättigten Kammer 10 μL einer Lösung bestehend aus 1 mg d-Biotin, 1,4 mg TBTU und 4 μL DIPEA in 50 μL wasserfreiem DMF auf einen Glasträger pipettiert und mit einem zweiten gedeckelt. Nach zwei Stunden werden die Glasträger gründlich mit DMF und anschließend mit bidestilliertem Wasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen.

Immobilisierung von amino-funktionalisierten Liganden

Zur Immobilisierung von amino-funktionalisierten Liganden wird die amino-funktionalisierte Oberfläche in einem ersten Schritt mittels Glutarsäureanhydrid umfunktionalisiert. Hierfür pipettiert man in einer mit DMF-Dampf gesättigten Kammer 10 μL einer Lösung aus 4 mg Glutarsäureanhydrid in 1 μL wasserfreiem DMF auf einen Glasträger und deckelt mit einem zweiten. Nach Reaktion über Nacht werden die Glasträger zuerst mit DMF, anschließend mit bidestilliertem Wasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen. Auf die so hergestellten carboxy-funktionalisierten Glasträger wird dann in einer mit DMF-Dampf gesättigten Kammer 10 μL einer Lösung aus 7,5 mg NHS und 3 μL DIC in 10 μL wasserfreiem DMF pipettiert, mit einem zweiten gedeckelt und mindestens vier Stunden stehen gelassen. Anschließend werden die Glasträger mit DMF und wasserfreiem Aceton gespült und mit Stickstoff trocken geblasen. Aufgrund der Reaktivität der so erzeugten Aktivester müssen diese Glasträger zügig weiterverarbeitet werden.

Amino-funktionalisierte Oligonukleotide werden mit Hilfe eines Piezo-Spotters [Stemmler 1999] auf die Oberfläche gedruckt. Dies bewirkt eine höhere Dichte von DNA-Einzelsträngen auf der Oberfläche und trägt somit zu einem höheren Signal bei der Hybridisierung mit dem komplementären DNA-Einzelstrang bei.

Andere amino-funktionalisierte Liganden werden flächig auf die mit Aktivester aktivierten Glasträger aufgebracht. Hierfür pipettiert man in einer mit Lösungsmittel-Dampf gesättigten Glaskammer 10 μL einer Lösung des Liganden (1 mg Ligand in 10 μL des jeweiligen Lösungsmittels) auf einen Glasträger, deckelt mit einem zweiten und lässt über Nacht stehen. Anschließend werden die Glasträger gründlich mit bidestilliertem Wasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen.

Aufbau von Polyelektrolyt Multischichten

Polyelektrolyt Multischichten können entweder offline oder online, d. h. in der Flusszelle des RfS-Aufbaus, auf den Glastypoberflächen aufgebracht werden. Hierfür werden die Glaträger wie oben beschrieben gereinigt und aktiviert. Dann erfolgt das Eintauchen bzw. das Durchspülen der RfS-Flusszelle mit einer PEI-Lösung für mindestens fünf Minuten. Anschließend trägt man alternierend ein beliebiges Polyanion bzw. ein beliebiges Polykation auf die Glaträgeroberfläche auf. Die so hergestellten Polymerbeschichtungen sind bei Lagerung der Glaträger im Kühlschrank über mehrere Wochen haltbar.

Je nachdem, welche Schicht als letzte aufgetragen wird, entscheidet sich das Vorgehen für die weitere Funktionalisierung der Oberfläche. Nach oben genannten Protokollen können dann sowohl carboxy- als auch amino-funktionalisierte Liganden immobilisiert werden.

3.2.2 REFLEKTOMETRISCHE INTERFERENZSPEKTROSKOPIE (RIFS)

Aufbau

Über eine Faseroptik wird Licht einer Halogenlampe senkrecht auf einen Glaträger (Transducer) geführt. Das an dem Glaträger reflektierte Licht wird über dieselbe Faser eingesammelt und gelangt über einen Y-Koppler zum Diodenzeilenspektrometer. Zwischen Transducer und Lichtleiter wird ein Tropfen Glycerin als Matching-Flüssigkeit gebracht, der den Brechungsindexsprung zwischen Lichtleiter und Luft minimieren und störende Reflektivitäten beseitigen soll [Brecht 1993]. Ein schematischer Aufbau ist in Abbildung 30 gezeigt.

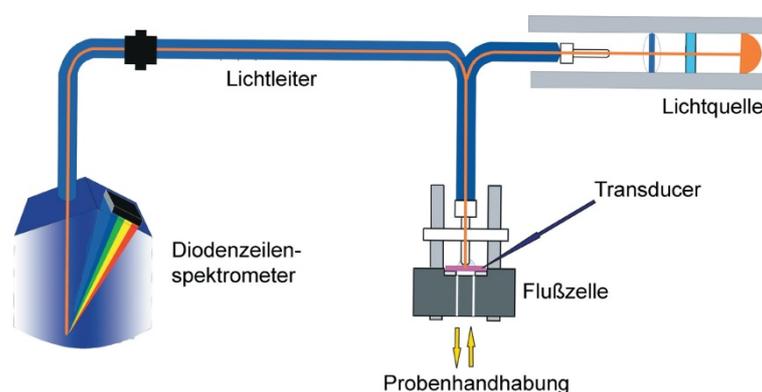


Abbildung 30: Schematische Darstellung eines RfS-Aufbaus (nach [Pröll 2004]).

Probenhandhabung

Die Messungen wurden ausschließlich im Durchfluss durchgeführt. Zur Probenhandhabung wurde ein kommerzielles Fließinjektionsanalyse(FIA)-System mit zwei Peristaltikpumpen, einem Scherventil, einem Auswahlventil sowie einem Autosampler verwendet. Ein schematischer Aufbau ist in Abbildung 31 gezeigt.

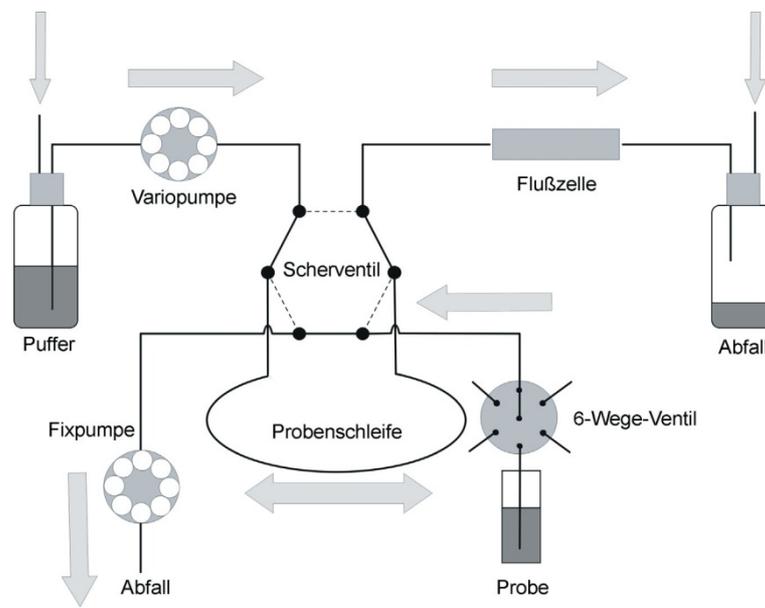


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Probenhandhabung mit einem FIA-System (nach [Pröll 2004]).

Messung

Das Programm MEASURE von Gerolf Kraus wurde zur Steuerung der FIA und zur Erfassung der Interferenzspektren verwendet. Gemessen wurde in Zeitintervallen von 5 Sekunden. Dabei wurde die Integrationszeit möglichst so gewählt, dass 90 % der Sättigung des Detektors erreicht wurde. Je nach Integrationszeit wurden so viele Spektren aufsummiert, wie in 90 % des Zeitintervalls möglich war. Damit wird eine Verbesserung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses erreicht.

Auswertung

Für die spektrale Auswertung (*full spectrum evaluation*, FSE) wurde das Programm Ifz von Andreas Brecht und Gerolf Kraus verwendet, mit dem es möglich ist, Bindungskurven on-line aufzunehmen. Die spektrale Auswertung erfolgt durch die Anpassung eines Polynoms an einen ausgewählten

Extrempunkt des korrigierten Interferenzspektrums und durch on-line Verfolgung der Verschiebung des Scheitelpunkts. Das korrigierte Interferenzspektrum $I_{korr}(\lambda)$ ergibt sich zu:

$$I_{korr}(\lambda) = \frac{I_{mess}(\lambda) - I_{dunkel}(\lambda)}{I_{ref}(\lambda) - I_{dunkel}(\lambda)} \quad (3.1)$$

$I_{korr}(\lambda)$	korrigierte Interferenzspektrum
$I_{mess}(\lambda)$	gemessenes Reflexionsspektrum
$I_{ref}(\lambda)$	Referenzspektrum
$I_{dunkel}(\lambda)$	Dunkelstrom-Spektrum

Für die spektrale Auswertung auf Interferenzglas wird das Minimum bei $m = 1,5$ ausgewertet. Das Schichtsystem des verwendeten Interferenzglas ist so konzipiert, dass sich die Änderung der detektierten optischen Schichtdicke während des Bindungsereignisses direkt proportional zur Zunahme der physikalischen Schichtdicke ändert.

3.2.5 1- λ REFLEKTOMETRIE (RIF)

Die 1- λ Reflektometrie stellt eine sehr vereinfachte Form der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIFS) dar. Hierbei wird der Intensitätsverlauf während des Bindungsereignisses bei einer Wellenlänge gegen die Zeit verfolgt. Jede Wellenlänge trägt hierbei dieselbe Information. Für jedes Schichtsystem ist der Verlauf der Reflektivitäten bei der Anbindung von Analyten an die Oberflächen und somit bei Schichtdickenzunahme der sensitiven Schicht für jede Wellenlänge unterschiedlich. Zur Auswertung können nur die Wellenlängen herangezogen werden bei denen die Reflektivität im Verlauf des Bindungsereignisses linear zur Schichtdickenzunahme zu- bzw. abnimmt. Nur unter diesen Bedingungen ist ein Vergleich zwischen FSE und der Auswertung bei einer Wellenlänge möglich.

Für Messungen mit einer Wellenlänge kam das ebenfalls bei spektral ausgewerteten Messungen verwendete SPEKOL 1100 zum Einsatz. Die biomolekularen Interaktionen wurden spektral aufgezeichnet, somit konnte für ein und dieselbe Messung bei unterschiedlichen Wellenlängen ausgewertet werden, was einen erheblich besseren Vergleich ermöglicht.

Abbildung 32 zeigt einen schematischen Aufbau eines möglichen 1- λ RIFS-Aufbau ohne Spektrometer.

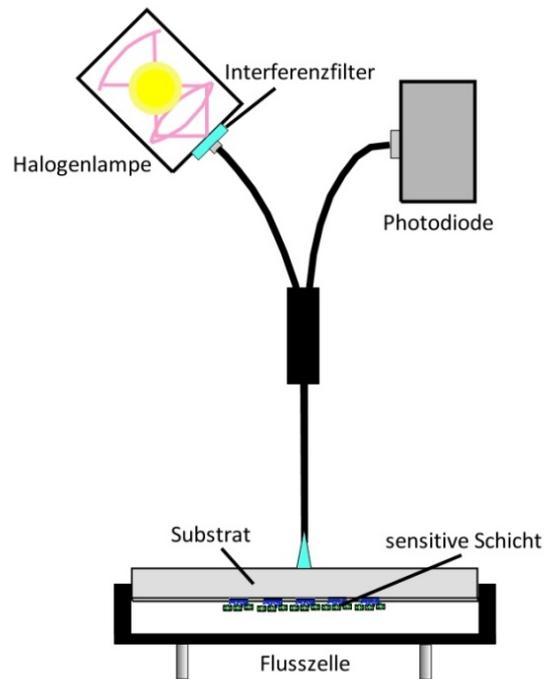


Abbildung 32: Möglicher 1-lambda RIFs-Aufbau zur biomolekularen Interaktionsanalyse (nach [Frank 2005]).

3.2.6 RASTERKRAFT MIKROSKOPIE

Das Messprinzip eines Rasterkraftmikroskops (*atomic force microscopy*, AFM) ähnelt einem Plattenspieler, bei dem eine Nadel über eine unebene Oberfläche gezogen und die Tonfolge von der Höhenveränderung der Nadel bestimmt wird. Während einer AFM-Messung wird die an einer Balkenfeder befestigte Nadel bzw. Spitze zeilenweise in der xy-Ebene über einen vorher festgelegten Bereich der Oberfläche gerastert. Je nach Wechselwirkung der Spitze mit der Oberfläche wird die Balkenfeder dabei unterschiedlich ausgelenkt. Die Verbiegung der Balkenfeder lässt sich über verschiedene Verfahren messen und dient als Regelsignal (Abbildung 33). Bei dem für diese Arbeit verwendeten Rasterkraftmikroskop wird die Verbiegung der Balkenfeder optisch detektiert. Die durch aufgedampftes Metall verspiegelte Rückseite der Balkenfeder wird von einer Laserdiode beleuchtet und der Reflex mittels einer zwei- bzw. viergeteilten Photodiode detektiert. Mit zweigeteiltem Photodetektor kann nur die vertikale Verbiegung der Balkenfeder detektiert werden, während mit viergeteiltem Photodetektor auch die horizontale Verbiegung und somit auch laterale Reibungskräfte gemessen werden können. Je nach Beschaffenheit der untersuchten Oberfläche lassen sich unterschiedliche Modi für die Messung der Proben-Topographie verwenden. Unter Verwendung des statischen Modus (*contact mode*) berührt die Spitze die Oberfläche und die Balkenfeder verbiegt sich je nach Wechselwirkungskraft mit der Probe.

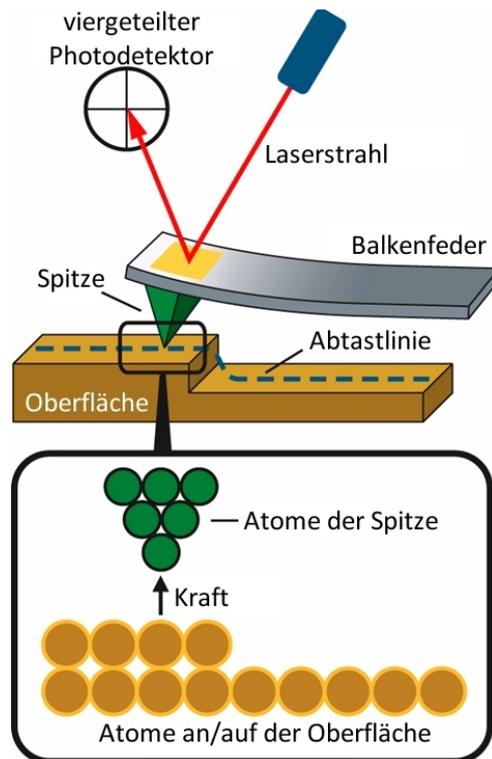


Abbildung 33: Schematische Darstellung eines Messablaufs mit einem Rasterkraftmikroskop.

Je nach Ausmaß der Verbiegung muss die Probe zur Spitze hin- oder von ihr wegbewegt werden, um einen voreingestellten Sollwert einzuhalten. Die hierfür nötige z-Spannung wird über die Auswerteeinheit ausgelesen und ergibt aufgetragen über die x- und y-Positionen in der Ebene ein Bild der Oberflächentopographie der Probe. Nachteile des statischen Modus liegen in der Beschädigung der Spitze durch das Rastern der Probe (xy-Richtung) sowie durch sog. „*jump to contact*“, welcher durch attraktive Kräfte bei der Annäherung der Spitze an die Oberfläche (z-Richtung) eintreten kann. Handelt es sich bei den verwendeten Proben um weiches, empfindliches Material (z. B. biologische Proben), so können neben Artefakten im AFM-Bild durch Verunreinigung der Spitze auch Beschädigungen an der Probe entstehen. Vorteil des Kontaktmodus ist die sehr hohe (atomare) Auflösung beim Abrastern der Probe.

Im dynamischen Modus (*tapping mode*) wird die Balkenfeder über die piezokeramische Platte an der sie befestigt ist zu einer Schwingung nahe seiner Resonanzfrequenz angeregt. Je nach Wechselwirkungskraft mit der Probe ändert sich bei konstanter Ausgangsfrequenz die Amplitude dieser Schwingung. Repulsive Kräfte erhöhen die Amplitude der Schwingung, attraktive Kräfte wirken genau umgekehrt. In der Regeleinheit wird die gemessene Amplitude mit dem Soll-Wert verglichen und eine entsprechende Spannung auf den z-Positionierer gegeben, um diese Abweichung zu kompensieren. Hieraus ergibt sich, wie beim statischen Modus durch Abfahren der Probe in xy-Ebene ein Bild der Oberflächentopographie der Probe. Der *tapping mode* eignet sich sehr gut für weiche bzw. biologische Proben. Nachteilig wirkt sich die Schwingung der Balkenfeder bei Messungen unter

Flüssigkeit aus, da hierbei die Wassermoleküle ebenfalls zur Schwingung gebracht werden und hierdurch Artefakte auf dem gemessenen AFM-Bild entstehen können.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 NANOPARTIKEL FÜR DIE REFLEKTOMETRISCHE INTERFERENZSPEKTROSKOPIE (RIFS)

4.1.1 ÜBERSICHT ÜBER DAS EU-PROJEKT GENSENSOR NANOPARTS

Ziel des BMBF-Verbundprojektes Gensensorik war, mittels parallelisierter Reflektometrischer Interferenzspektroskopie (RIFS) Oligonukleotidsequenzen in industriell verwertbarer Form Zeit-aufgelöst und quantitativ nachzuweisen. Der hierfür zu entwerfende Gensensor sollte zur Detektion von pathogenen Keimen in Nahrungs- und Futtermitteln, in der Umweltanalytik und in der Forensik zum Einsatz kommen. Im Gegensatz zu üblichen auf Fluoreszenz basierenden Mikroarrays, bei denen nur die Endpunkte der Hybridisierung bestimmt werden können, ist es mit RIFS möglich, unmarkierte Oligonukleotide Zeit-aufgelöst zu detektieren. Hierdurch können nicht nur Konzentrationsbestimmungen erfolgen, sondern auch Informationen über die Kinetik und Thermodynamik der Bindung erhalten werden. Desweiteren entfällt die Probenvorbereitung und die biomolekulare Wechselwirkung wird nicht durch Labels beeinflusst und ggf. verfälscht. Wie sich bei [Jung 2003] gezeigt hat, ist die Reflektometrische Interferenzspektroskopie eine vielversprechende Methode für die Entwicklung eines miniaturisierten, parallel optischen Biosensors.

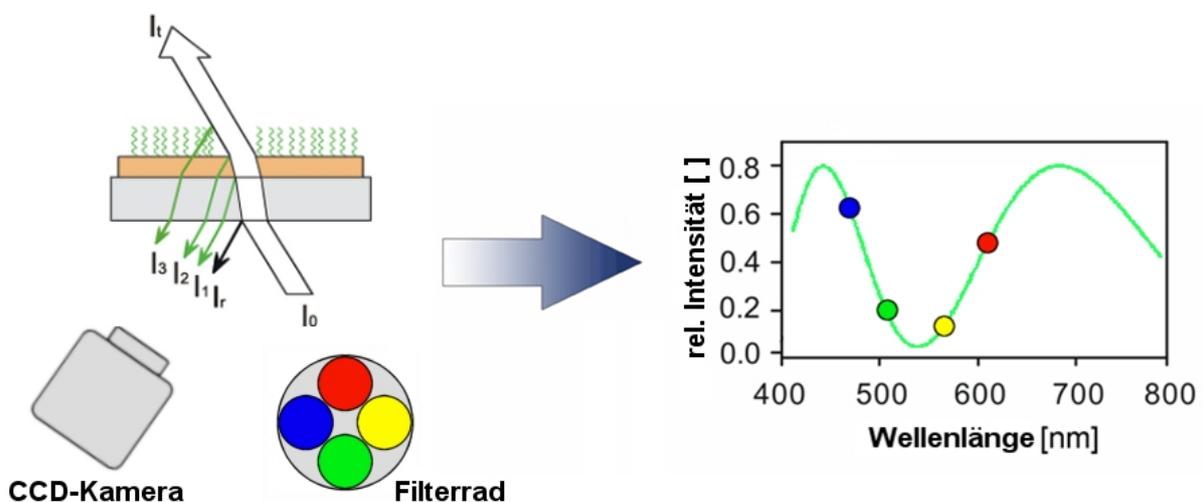


Abbildung 34: Schema der Zusammensetzung eines Interferenzspektrums beim parallelen RIFS aus Messungen bei verschiedenen, einzelnen Wellenlängen.

Bisherige parallele RIFS-Aufbauten (Mini-RIFS Aufbauten) bestehen apparativ aus der FIA, einer CCD-Kamera als Detektor und einer Weißlichtquelle mit vorgeschaltetem Filterrad (Abbildung 34, links). Bei Verwendung einer CCD-Kamera zur Flächendetektion kann bei der Beobachtung der biomolekularen Interaktion an der Oberfläche die Wellenlängen-Information nicht abgegriffen werden. Deshalb werden über ein Filterrad mit vier bis sechs Farbfiltern „Stützpunkte“ des

Interferenzspektrums aufgenommen und dieses anschließend an die gemessenen Punkte angenähert (Abbildung 34, rechts). Auch hier wird die Verschiebung eines prominenten Punktes im Spektrum (Maximum oder Minimum) zur Auswertung der optischen Schichtdicke herangezogen.

Engpass der bisher entwickelten Mini-RlFS Aufbauten war und ist ein hohes Rauschen von über 200 pm bei einem Hybridisierungssignal von knapp unter 200 pm (Abbildung 35). Hierbei ist weder eine quantitative noch eine qualitative Aussage über die biomolekulare Interaktion möglich.

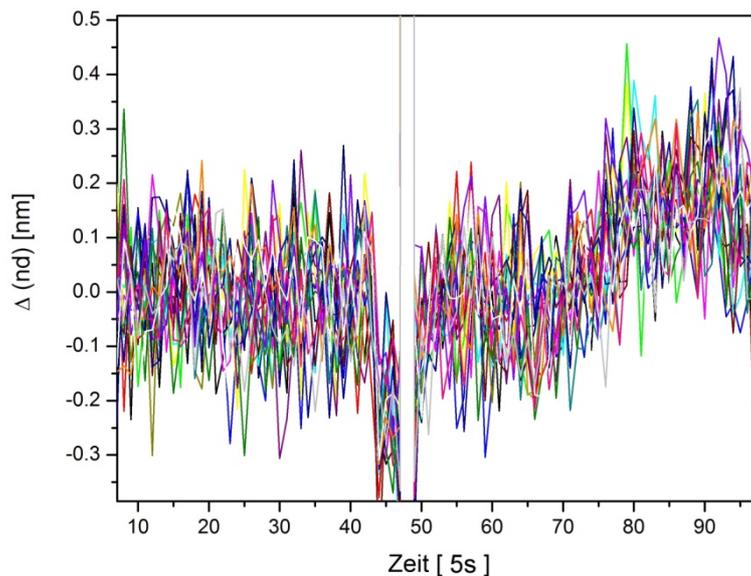


Abbildung 35: Bindungskurven eines Hybridisierungsexperiments, aufgezeichnet mittels des im BMBF-Projekts „Gensensorik“ entwickelten parallelen RlFS-Aufbaus. Im Zeitintervall zwischen 45 und 50 [a.u.] störte eine Luftblase die Detektion.

Der Ansatz zur Lösung des Problems bestand zuerst darin, das Rauschen durch Optimierung des Messaufbaus zu verbessern. Hierfür wurden apparative Parameter wie Detektor (CCD-Kamera), Lichtquelle und optischer Aufbau (Interferenzfilter, Leuchtdioden, Stereomikroskop-Aufbau) theoretisch optimiert sowie die Eigenschaften der Bioschichten näher untersucht, um das Rauschen zu verringern [Wegner 2004a]. Unglücklicherweise konnten diese Optimierungsansätze experimentell nicht im beschriebenen Ausmaß bestätigt werden.

Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses liegt in der Amplifikation der Hybridisierungssignale. Dies sollte im Rahmen des EU-Projektes GenSensor Nanoparts („Nanobiotechnical components of an advanced bioanalytical microarray system“, NMP4-CT-2003-505808) verwirklicht werden. Da die Signalstärke im RlFS von der optischen Schichtdicke und somit vom Produkt aus Brechungsindex und physikalischer Schichtdicke abhängig ist, kann durch Beeinflussung dieser beiden Parameter bei der Interaktionsanalyse das detektierte Signal verstärkt werden. Es liegt also nahe, durch Anbringen von großen Molekülen oder Partikeln an die Oligonukleotid-Sequenzen das Hybridisierungssignal zu amplifizieren. Geeignet erscheinen magnetische Nanopartikel (sog. Nanobeads), die neben der Signalverstärkung im RlFS auch eine

experimentell einfache und schnelle Extraktion von Analyt-Oligonukleotidsequenzen aus einem Gemisch (z. B. Zellhomogenat) durch Anlegen eines hochgradienten Magnetfeldes ermöglichen. Eine Analysendauer von vielen Stunden kann somit auf ungefähr eine Stunde reduziert werden.

Die Nanobeads bestehen aus einem superparamagnetischen Magnetit-Kern ($\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$), der ungefähr 3-5 nm groß und von einer Dextranhülle umgeben ist, die je nach Synthese-Bedingungen einen Durchmesser zwischen 30 nm und 500 nm annehmen kann. Die umgebende Dextranhülle verhindert zum einen, dass die Magnetit-Kerne agglomerieren („monodisperse Lösungen der Nanobeads“), zum anderen bieten sie die Möglichkeit, funktionelle Gruppen und damit Liganden jeglicher Art an den Partikel zu binden. Außerdem weisen Dextrane eine sehr gute Biokompatibilität auf, d. h. sie binden nicht unspezifisch an Oberflächen, andere Moleküle oder Partikel.

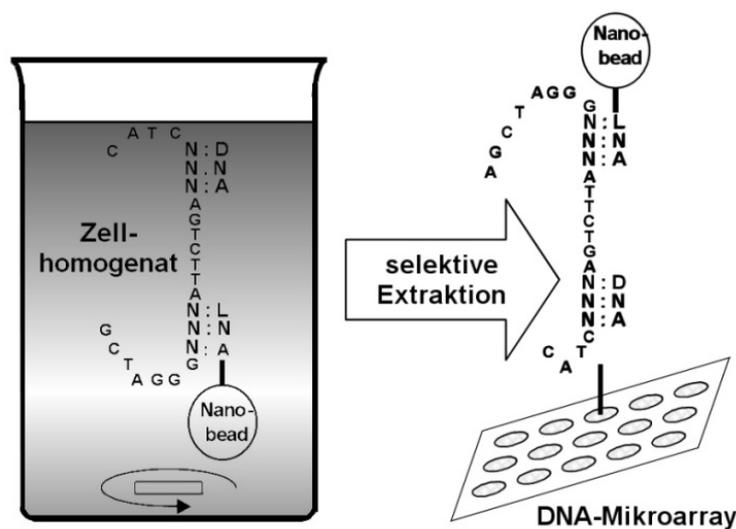


Abbildung 36: Schematischer Ablauf der selektiven Extraktion von Analyten aus einem Zellhomogenat mit Hilfe von magnetischen Nanobeads und anschließender Analyse auf dem DNA-Mikroarray mittels RIFS.

Die Nanobeads tragen dabei eine einzigartige Oligonukleotid-Sequenz, die nur an ein spezielles Ende der Analyt-Oligonukleotide bindet. Diese Sequenzen können über bioinformatische Algorithmen berechnet werden und liefern die notwendige Selektivität beim Extrahieren aus dem Homogenat. Für eine quantitative Extraktion der Analyten muss eine starke Hybridisierung gewährleistet sein, damit der Oligonukleotid-Nanobead-Komplex stabil bleibt. Hierfür kommen mit LNA funktionalisierte Nanobeads zum Einsatz, deren Bindung zu DNA aufgrund konformativer Eigenschaften der entstehenden Doppelhelix thermodynamisch stärker ist als bei reiner DNA-DNA-Hybridisierung. Die mit LNA-Nanobeads extrahierten Analyt-Sequenzen werden dann ohne weitere Aufbereitung über das RIFS-Mikroarray geleitet. Hier findet die signalverstärkte Hybridisierung des verbleibenden freien Sequenzbereichs mit auf der Mikroarray-Oberfläche immobilisierten Fänger-Oligonukleotiden statt. Damit eine selektive Analyse der zu quantifizierenden Oligonukleotide durchgeführt werden kann, muss sichergestellt werden, dass die Analyt-DNA selektiv aus dem Gemisch extrahiert werden kann.

Hierfür muss diese zwei einzigartige Sequenzen an Basenpaaren im Strang besitzen, damit zum einen selektiv LNA-funktionalisierte Nanobeads an einen Sequenzbereich binden und die Analyt-DNA quantitativ extrahiert werden können. Zum anderen muss über den zweiten Sequenzbereich eine selektive Hybridisierung auf dem Mikroarray ermöglicht werden (Abbildung 36).

Ein Arbeitspaket innerhalb des EU-Projekts Gensensor-Nanoparts beschäftigte sich mit der bioinformatischen Berechnung eben solcher DNA/LNA-Paare mit einzigartig passenden Sequenzbereichen. Folgende Parameter der Oligonukleotidsequenzen wurden bei der Berechnung dieser Paare berücksichtigt und optimiert:

- Schmelztemperatur
- Selbsthybridisierung
- Kreuzhybridisierung zwischen DNA/DNA- und DNA/LNA-Paaren
- Abstand („Spacer“) zwischen den Oligonukleotidpaaren
- Sekundärstruktur der Sequenzen

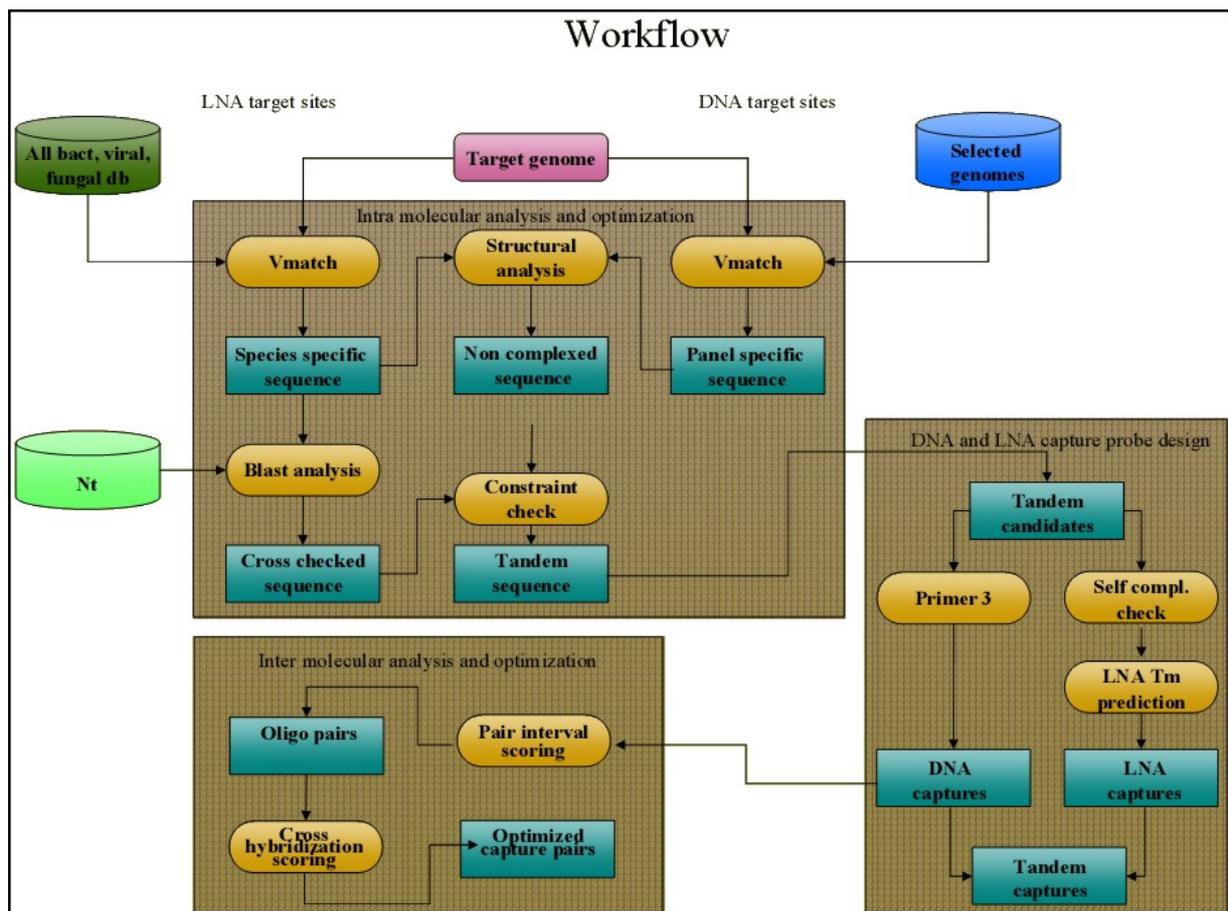


Abbildung 37: Schema der für die Berechnung der optimierten DNA/LNA-Paare verwendeten bioinformatischen Pipeline.

Basierend auf diesen intra- und intermolekularen Wechselwirkungen konnten sieben optimierte Sätze an DNA/LNA-Paaren für fünf Genome pathogener Keime berechnet werden. Eine Übersicht über die dabei verwendete bioinformatische Pipeline ist in Abbildung 37 gezeigt.

4.1.2 CHARAKTERISIERUNG DER NANOBEADS FÜR DAS RIFS-SYSTEM

Damit eine quantitative Detektion von Analyt-Oligonukleotiden gewährleistet werden kann, muss sichergestellt werden, dass die Nanobeads nicht unspezifisch an Teile der Fließinjektionsanalyse (FIA) bzw. an die Sensoroberfläche binden und somit die Signale bzw. Ergebnisse der Auswertung verfälschen.

Für Untersuchungen zur unspezifischen Bindung der magnetischen Nanopartikel an die Mikrofluidik-Komponenten war eine Quantifizierung vor und nach Durchlaufen des Systems notwendig. Hierfür kamen UV/VIS spektroskopische Messungen zum Einsatz, über die eine relative Quantifizierung möglich ist.

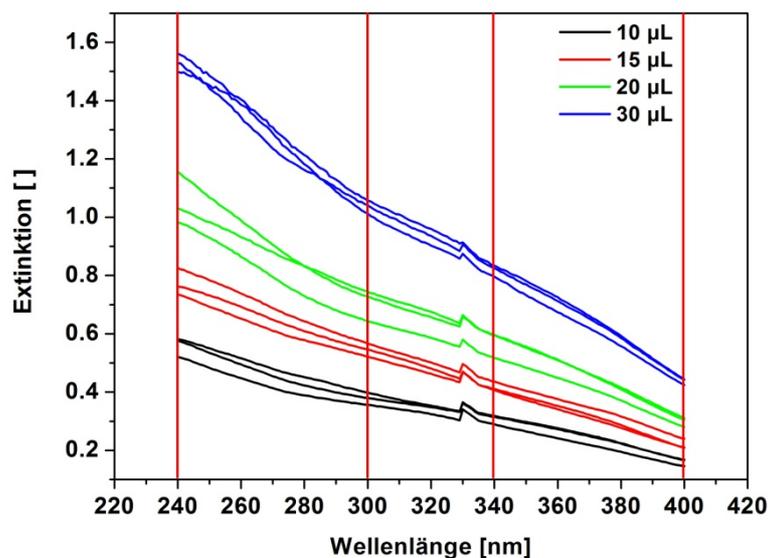


Abbildung 38: Mittels UV/VIS-Spektroskopie aufgenommene Absorptionsspektren verschieden konzentrierter Aminobeads-Lösungen zur Quantifizierung der Nanopartikel.

Abbildung 38 zeigt dreifache UV/VIS-Messungen von vier verschiedenen Konzentrationen an Nanobeads zwischen 240 nm und 400 nm Wellenlänge (links) nach Durchlaufen der Mikrofluidik. Bei Auftragung der Extinktion vier verschiedener Wellenlängen zeigt sich eine lineare Abhängigkeit der Extinktion von der Konzentration an Nanobeads (Abbildung 39). Somit ist eine Quantifizierung vor und nach Durchlaufen der Proben durch die Fließinjektionsanalyse und eine Aussage über unspezifische Bindung innerhalb der FIA möglich.

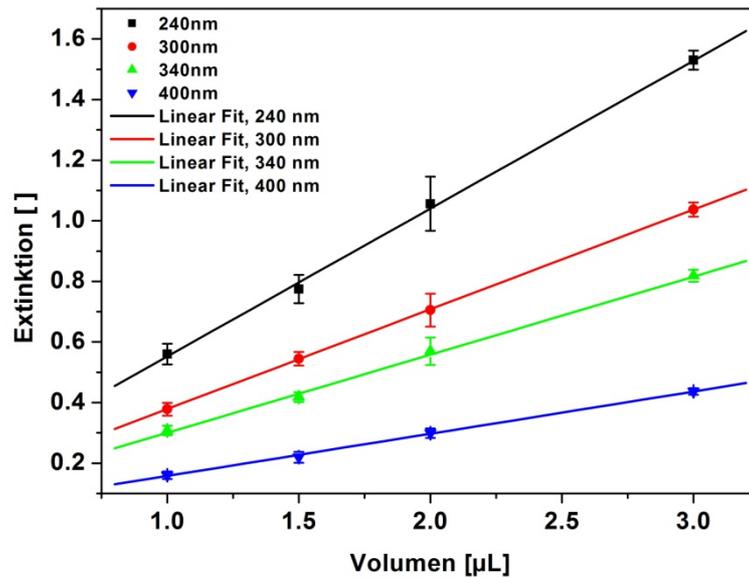


Abbildung 39: Linearer Zusammenhang zwischen Extinktion und Konzentration an Aminobeads in Lösung.

Abbildung 40 zeigt die Extinktion nach Durchlaufen unterschiedlicher Schlauchlängen. Die Extinktion ist nach Durchlaufen längerer Schläuche geringer als bei kürzeren, somit ist auch die Konzentration geringer. Unnötig lange Schläuche sollten deshalb vermieden werden.

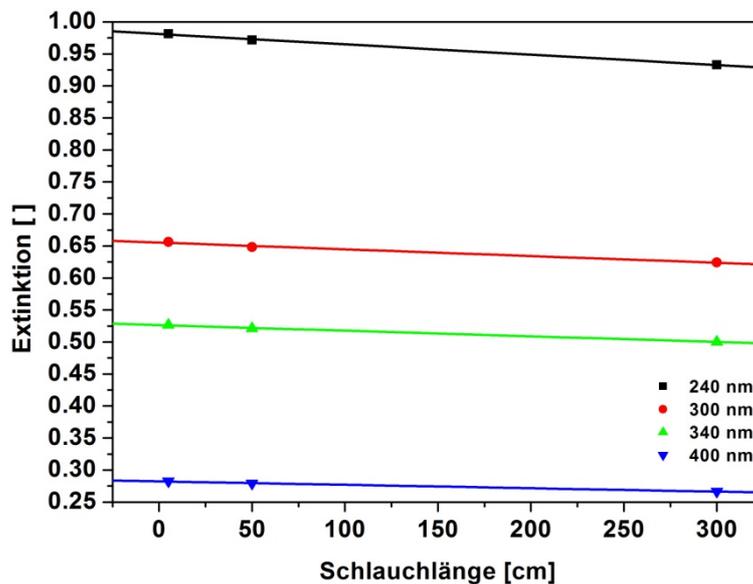


Abbildung 40: Absorptionsspektroskopische Messungen zum Einfluss der Schlauchlänge des mikrofluidischen Systems auf die Konzentration der Aminobeads in Lösung und somit der unspezifischen Bindung der Nanopartikel an Teile der Mikrofluidik.

Bei der verwendeten FIA beträgt die gesamte Schlauchlänge ca. 50 cm, der Verlust an Nanobeads nach Durchlaufen ist dabei < 5 %. Somit ist die unspezifische Bindung innerhalb des mikrofluidischen Systems gering genug für weitere Experimente. Desweiteren sind zwei unterschiedliche

Schlauchmaterialien und der Einfluss von Verbindungsstücken zwischen den Schläuchen auf evtl. mechanisches Anhaften der Nanobeads untersucht worden. Auch hier wurde keine nennenswerte unspezifische Bindung der Nanobeads an die FIA detektiert.

Desweiteren muss sicher gestellt werden, dass die Nanobeads nicht unspezifisch an die Sensoroberfläche binden, da RIFS eine direkt-optische Methode ist und somit unspezifische Bindung nicht-relevanter Biomoleküle das detektierte Signal fälschlicherweise erhöht. Für die Modifikation der Sensoroberflächen kamen unterschiedliche (Bio-)Polymere zum Einsatz, von denen bekannt ist, dass sie die unspezifische Bindung von Proteinen an Oberflächen bis zu einem bestimmten Maß inhibieren:

- Diamino-Polyethylenglykol (DAPEG)
- Dicarboxy-Polyethylenglykol (DCPEG)
- Carboxymethyl-dextran (CMD)
- CM-5 Dextran (CM5)
- Aminodextran (AMD)

Diese Oberflächen wurden auf unspezifische Bindung getestet. Hierfür wurden diese mit zwei hohen Konzentrationen an amino-funktionalisierten Nanobeads („Aminobeads“) inkubiert. Es wurden pro oben genannte Oberflächenbeschichtung vier Sensorchips präpariert. Jeweils drei dieser Transducer wurden mit einer Konzentration von 137 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Aminobeads (schwarze Kurven) inkubiert, ein Transducer mit der doppelten Menge, d. h. mit 274 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Aminobeads (rote Kurven). In Abbildung 41 bis Abbildung 43 sind die jeweiligen Bindungskurven für jede Oberflächenmodifikation gezeigt. Die Injektionsphasen sind blau hinterlegt.

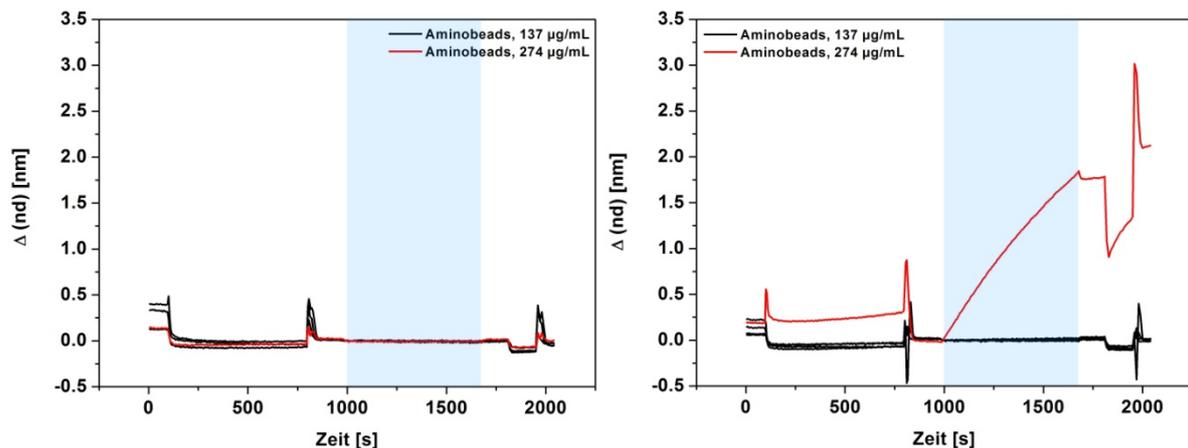


Abbildung 41: Unspezifische Bindung von Aminobeads in unterschiedlichen Konzentrationen an CM5-Dextran- (links) und CMD-Oberflächen (rechts).

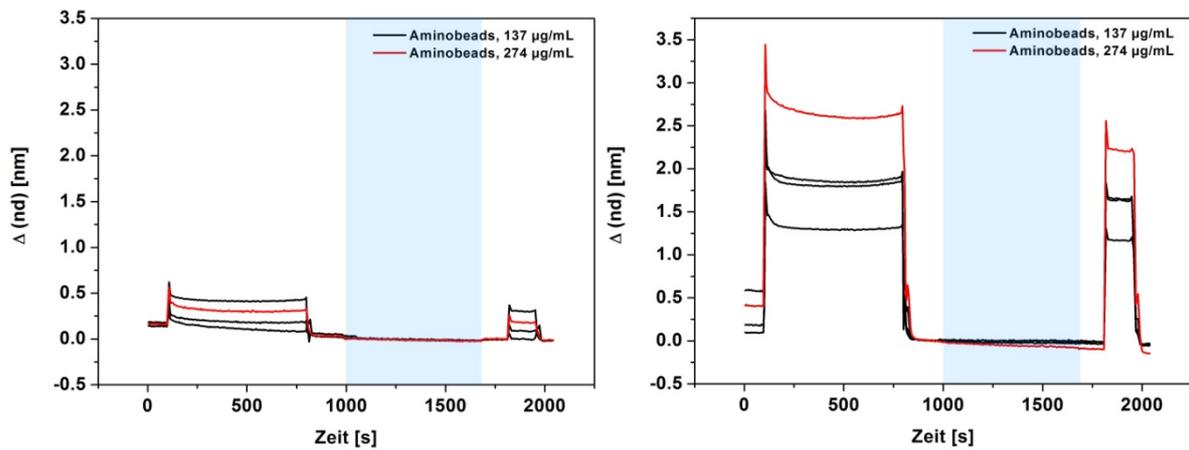


Abbildung 42: Unspezifische Bindung von Aminobeads in unterschiedlichen Konzentrationen an DCPEG- (links) und DAPEG-Oberflächen (rechts).

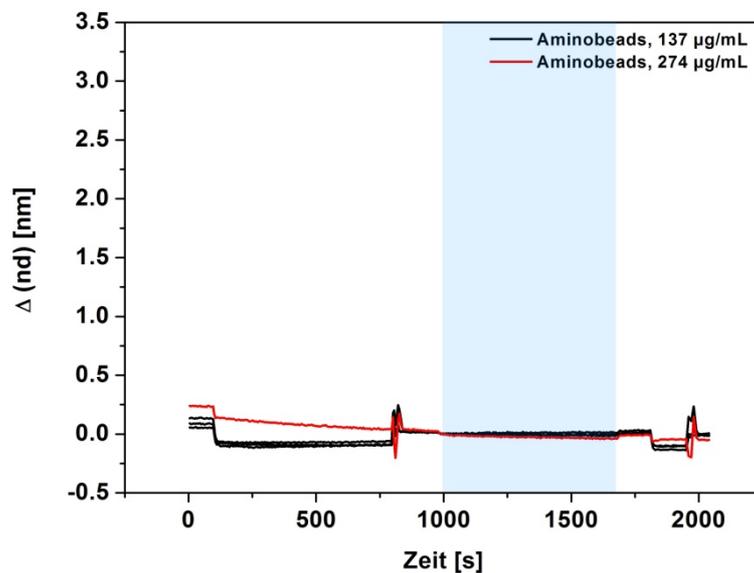


Abbildung 43: Unspezifische Bindung von Aminobeads in unterschiedlichen Konzentrationen an AMD-Oberflächen.

Vor der Injektion der Aminobeads zum Zeitpunkt 1000 s wurde mit 1 mL Regenerationslösung 1 die Oberfläche „regeneriert“, d. h. von möglichen adsorbierten Bestandteilen gesäubert. Nach der Inkubation wurde als Teil des Messprogramms wieder mit Regenerationslösung 1 kurz gespült um mögliche anhaftende Aminobeads von der Transduceroberfläche zu waschen. Wie man aus obigen Abbildungen erkennen kann, binden die Aminobeads an keine der präparierten Oberflächenbeschichtungen, mit Ausnahme von Carboxymethyldextran (CMD) bei sehr hoher Konzentration (274 µg/mL). Aufgrund von elektrostatischer Wechselwirkung zwischen einer großen Anzahl an Carboxyl-Funktionen auf der Sensoroberfläche und den Amino-Funktionen an den Partikeln findet hier eine starke unspezifische Adsorption von Aminobeads an die Oberfläche statt. Die optische Schichtdicke ändert sich dabei um ca. 1,75 nm, eine sehr große Änderung für eine unspezifische Bindung. Dies lässt darauf vermuten, dass Nanopartikel durch ihre Größe und dadurch

herbeigeführten starken optischen Schichtdickenänderung ein großes Signal im RIFS verursachen. Das Spülen mit Regenerationslösung 1 nach der Injektion der Aminobeads führt nicht zur Reinigung der Oberfläche, die Beads haften also stark an der Oberfläche.

Zur Überprüfung ob dieses Signal tatsächlich von der unspezifischen Bindung von Aminobeads hervorgerufen wurde, wurden von der Oberfläche dieses Transducer AFM-Bilder im *tapping mode* aufgenommen. Tatsächlich wurden an unterschiedlichen Orten auf der Oberfläche Nanobeads gefunden, ein exemplarisches AFM-Bild in dreidimensionaler Darstellung ist in Abbildung 44 gezeigt.

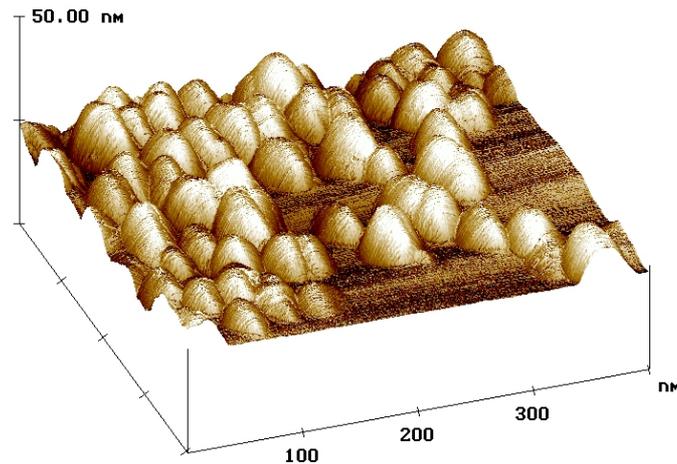


Abbildung 44: AFM-Bild eines trockenen CMD-Transducers, an dessen Oberfläche Aminobeads unspezifisch gebunden sind.

Das AFM-Bild zeigt Hügel, die horizontal Ausmaße von etwas weniger als 50 nm, vertikal Ausmaße von kleiner 25 nm zeigen. Aufgrund der Tatsache, dass die Bilder im trockenen Zustand aufgenommen wurden, sind die Dextranhüllen der Aminobeads in sich zusammengefallen, d. h. die Partikel geben nicht den exakten, sphärischen Durchmesser von 50 nm wider.

Da Aminodextran keine unspezifische Bindung der Nanobeads aufweist und eine hohe Oberflächenbeladung aufgrund der auf der Oberfläche gebildeten dreidimensionalen Matrix bietet, wurde dieses Biopolymer als Oberflächenbeschichtung für die weiteren Experimente verwendet.

4.1.3 SIGNALVERSTÄRKUNG IM RIFS-SYSTEM UNTER VERWENDUNG VON NANOBeadS

Die notwendigen Voraussetzungen für die Untersuchung der spezifischen Bindung von funktionalisierten Nanopartikeln an die jeweiligen Sensoroberflächen ist unter Verwendung der Nanobeads gewährleistet, d. h. es findet keine unspezifische Bindung im RIFS-System statt. Die durch biomolekulare Wechselwirkung der funktionalisierten Nanobeads mit immobilisierten Liganden erhaltenen Signale sind somit alle spezifischer Natur. Ob eine Signalverstärkung unter Verwendung

dieser Nanopartikel beobachtbar ist, wie stark die Amplifikation ist und wie sie sich verbessern lässt sollte anhand mehrerer Systeme untersucht werden (Abbildung 45). Hierfür kamen mit Streptavidin-funktionalisierte Nanobeads, Oligo(dT)-Nanobeads und POIA3-Nanobeads zum Einsatz. Diese wurden an biotinylierte AMD-Oberflächen, AMD-Poly(A)-Oberflächen bzw. an AMD-Oberflächen mit immobilisiertem POIA3-Anker inkubiert und das erhaltene Signal mit dem Signal verglichen, das man bei Inkubation der gleichen Menge an Rezeptor ohne Nanobead erhält.

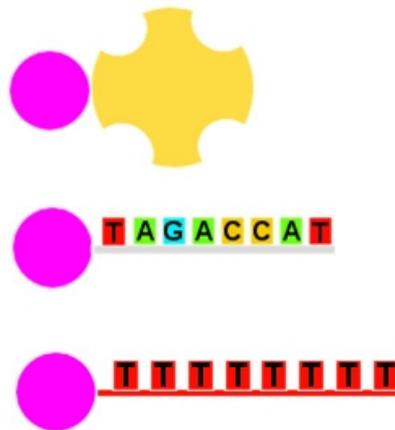


Abbildung 45: Verwendete Nanobeads-Systeme, der 50 nm Nanopartikel ist als lila-farbener Kreis dargestellt. Oben: Streptavidin-Nanobeads, Mitte: LNA- bzw. DNA-Nanobeads, Unten: Oligo(dT)-Nanobeads.

In Abbildung 46 sind exemplarische Bindungskurven der spezifischen Bindung von 75 nM Streptavidin bzw. die gleiche Menge Streptavidin an Nanobeads gezeigt.

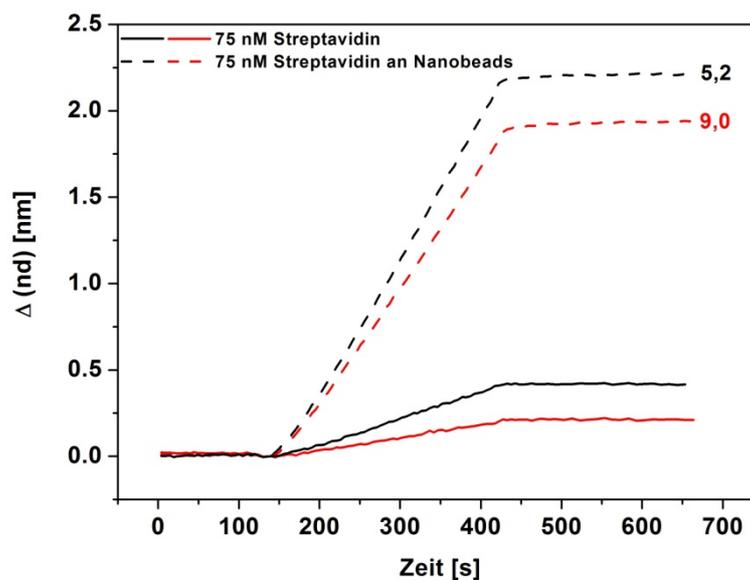


Abbildung 46: Bindungskurven der spezifischen Bindung von 75 nM Streptavidin bzw. 75 nM Streptavidin an Nanobeads an biotinylierte AMD-Oberflächen und deren Verstärkungsfaktoren.

Deutlich zu erkennen ist, dass das Bindungssignal der Streptavidin-Nanobeads deutlich größer ist als das von Streptavidin. Hierbei wird das Signal um einen Faktor zwischen 5 und 10 verstärkt. Eine Regeneration dieser Sensoren war nicht möglich, da die Affinität zwischen Biotin und Streptavidin sehr hoch ist ($K_{\text{aff}} = 10^{14} - 10^{15} \text{ M}^{-1}$). Für jede in Abbildung 46 gezeigte Bindungskurve wurde ein neuer, funktionalisierter Transducer verwendet.

Für die spezifische Bindung von Oligo(dT) an mit Poly(A) funktionalisierte AMD-Oberflächen wurde eine Konzentration von 10 pM untersucht (siehe Abbildung 48). Die Oligonukleotid-Sequenz wurde direkt an den komplementären Poly(A)-Strang auf der Oberfläche hybridisiert („direkte Hybridisierung“). Die direkte Hybridisierung ist schematisch in Abbildung 47 gezeigt.

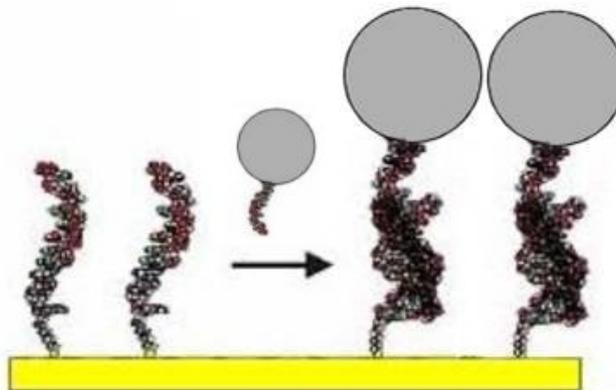


Abbildung 47: Schematische Darstellung der direkten Hybridisierung von mit Oligonukleotid funktionalisierten Nanobeads an immobilisierte, komplementäre Stränge auf der Oberfläche.

Auch hier wurde für jede Bindungskurve ein neuer, funktionalisierter Sensorchip verwendet. Es zeigte sich bei diesem System eine Signalverstärkung unter Verwendung der Nanobeads von Faktor zehn. Bei der zweiten Messreihe (rote Kurven) erreichte der Signalverstärkungsfaktor 22,6 bei Verwendung der Oligo(dT)-Nanobeads, da aber zu Beginn der Injektion von 10 pM Oligo(dT) auf dem frischen Transducer (rote, kompakte Kurve) bei ca. 125 s eine Luftblase das Signal gestört hat, ist dieser Amplifikationsfaktor nicht aussagekräftig. Für die erste Messreihe zeigt sich auch hier eine Verstärkung des Signals um einen Faktor von ca. zehn.

Desweiteren wurden mit DNA funktionalisierte Nanobeads der Größe 50 nm untersucht. Diese wurden an den auf der Oberfläche immobilisierten komplementären Strang hybridisiert. Das dabei erhaltene Signal wurde mit dem der normalen Hybridisierung von DNA verglichen. Für jede in Abbildung 49 gezeigte Bindungskurve wurde ein neuer Transducer verwendet. Somit ist auch eine Aussage über die Reproduzierbarkeit der Oberflächenbeschichtung von Chip zu Chip möglich. Das Hybridisierungssignal von 10 nM, 50 nM und 100 nM DNA bzw. 10 nM, 50 nM und 100 nM DNA an Nanobeads wurde im RIFS-Gerät vermessen.

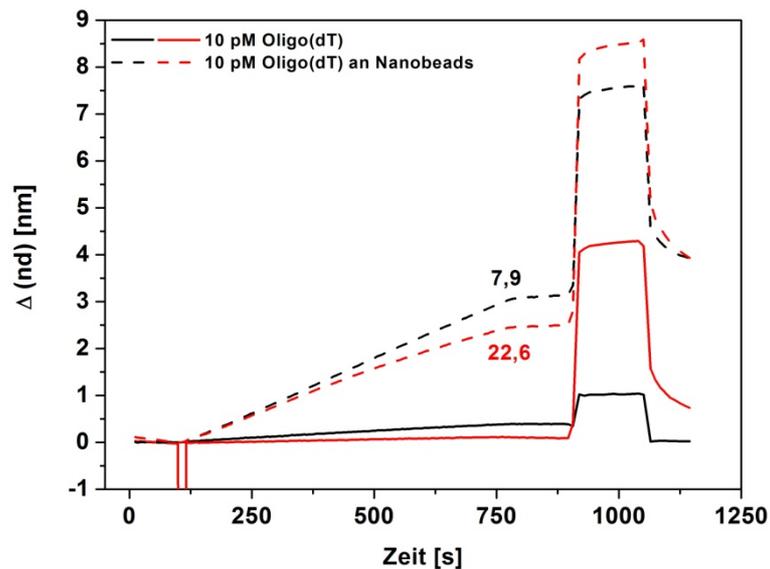


Abbildung 48: Bindungskurven der spezifischen Bindung von 10 pM Oligo(dT) bzw. 10 pM Oligo(dT) an Nanobeads an mit Poly(A) funktionalisierten AMD-Oberflächen und deren Verstärkungsfaktoren.

Dies kommt aufgrund der sterischen Hinderung der 50 nm großen Nanopartikel untereinander auf der Oberfläche zu Stande. Die *chip-to-chip* Reproduzierbarkeit ist bei diesem System ausgesprochen hoch, da durch die verwendete piezo-basierte Spotting-Technologie sehr homogene Oberflächenbeschichtungen realisierbar sind.

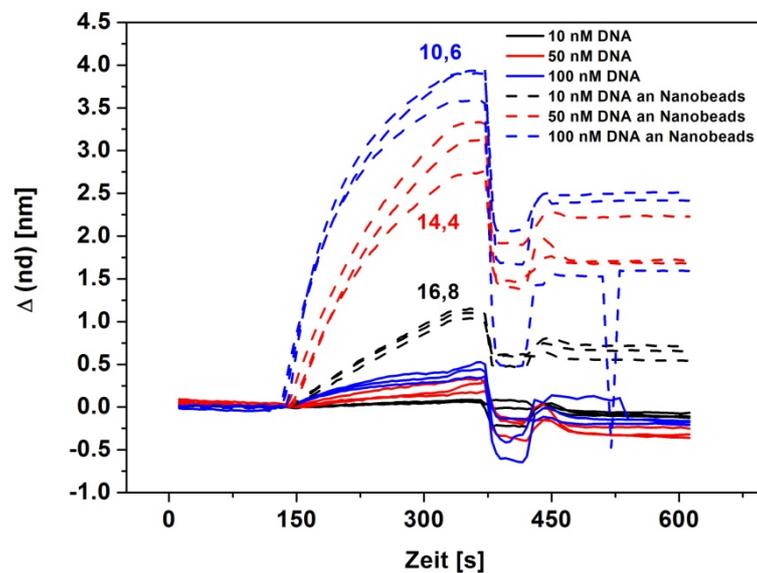


Abbildung 49: Bindungskurven der spezifischen Bindung von drei unterschiedlichen Konzentrationen an DNA bzw. DNA an Nanobeads an mit komplementären Strang funktionalisierten AMD-Oberflächen. Die *chip-to-chip* Reproduzierbarkeit ist aufgrund der verwendeten piezo-basierten Spotting-Technologie sehr gut.

Bei Verwendung von 50 nm großen funktionalisierten Nanobeads kann das Signal bei spezifischer biomolekularer Interaktion, im Vergleich zum gewöhnlichen System, um einen Faktor von

mindestens zehn verstärkt werden. Bedenkt man, dass sich die Konzentrationsangaben für die Biomoleküle an den Nanobeads auf die gesamte Lösung beziehen, dank der sphärischen und großen Gestalt der Nanopartikel aber nicht alle Partikel aufgrund ihrer langsamen Diffusion an die Oberfläche gelangen können (siehe unten) bzw. Biomoleküle an der entgegengesetzten Seite der Partikeloberfläche nicht die Möglichkeit zur Interaktion mit den immobilisierten Liganden besitzen, ist die „effektive Konzentration“ der verwendeten Biomoleküle geringer als die angegebene. Somit ist die Verstärkung des Signals unter Verwendung von 50 nm großen Nanobeads größer als Faktor zehn. Problematisch ist die Regeneration der Sensorchips nach erfolgter spezifischer Bindung der Nanobeads. Biotin/Streptavidin lässt sich per se nicht regenerieren, bei der direkten Hybridisierung von Oligonukleotid-Nanobeads an die entsprechenden Komplementärstränge auf der Oberfläche wurden verschiedene chemische Regenerationsmittel sowie auch physikalische Prozesse angewendet.

Folgende Lösungen wurden zur Regeneration der Oberflächen nach erfolgter direkter Hybridisierung von DNA-Nanobeads getestet. Hierfür wurde stets ein neuer Transducer mit DNA-Nanobeads hybridisiert und eines der u. g. Regenerationsmittel verwendet.

- 2 M KCl, pH 1.9
- 10 mM Glycin, pH 1.5
- SDS 0.5%, pH 1.9 (entspricht Regenerationslösung 1)
- SDS 0.5%, 3 M Harnstoff, pH 1.9
- HCl, pH 1.0
- NaOH, pH 9.0

Keine der o. g. Lösungen konnte die Transducer-Oberfläche erfolgreich regenerieren, d. h. die Basislinie wurde nach dem Spülen nicht wieder erreicht. Da keine chemische Denaturierung des hybridisierten DNA-Nanobeads/DNA-Komplexes möglich war, wurde versucht den Doppelstrang durch Temperaturerhöhung (physikalische Denaturierung) zu lösen. Hierfür wurde die temperierbare RIFS-Flusszelle verwendet wie sie in [Pröll 2004] beschrieben wird. Nach direkter Hybridisierung der DNA-Nanobeads an den auf der Oberfläche immobilisierten Komplementärstrang wurde der Transducer mit Puffer gespült und dabei die Temperatur in der Flusszelle langsam erhöht. Nach Erreichen einer Temperatur von 40 °C löste sich zwar ein kleiner Anteil der hybridisierten DNA-Nanobeads, die Oberfläche war aber keineswegs regeneriert und für eine weitere Messung zu verwenden. Bei 40 °C wurde dann mit Regenerationslösung 1 gespült, auch dies führte zu keinem Erfolg. Es wurde ein neuer Sensor eingebaut, DNA-Nanobeads direkt an die Oberfläche hybridisiert und mit Puffer gespült. Anschließend wurde die Temperatur auf 65 °C erhöht und dann mit Regenerationslösung 1 gespült. Zwar gelang unter diesen Bedingungen eine Regeneration der Oberfläche, d. h. die Basislinie wurde nach Ende des Spülvorgangs wieder erreicht. Anschließend

Messungen mit derselben Konzentration an DNA-Nanobeads führten aber zu einem stets stark verminderten Signal bei der Hybridisierung. Das Spülen der Oberfläche mit Regenerationslösung 1 bei einer Temperatur von 65 °C scheint somit die Oberflächenmodifikation zu zerstören und ist deshalb auch nicht geeignet.

Als Ziel des EU-Projektes GenSensor Nanoparts war die qualitative und quantitative Untersuchung von Oligonukleotidsequenzen pathogener Keime zur Qualitätssicherung in der Nahrungs- und Futtermittelindustrie. Hierfür muss die zu analysierende Sequenz („Analyt-DNA“) aus dem Gemisch extrahiert und auf dem Mikroarray detektiert werden. Dabei hybridisiert ein Teil der Analyt-DNA an die Sequenz an den Nanobeads, ein zweiter Bereich der Analyt-DNA-Sequenz kann anschließend an die Oberfläche hybridisieren. Dies soll im Folgenden als „Tandem-Hybridisierung“ bezeichnet werden (siehe Abbildung 50). Um dieses System nachzustellen, wurde die Sequenz „21A-POIA3 tandem“ als Analyt-DNA herangezogen, die „POIA3 antisense“-Sequenz wurde an magnetische Nanobeads gekoppelt, die „15T-Anker“-Sequenz wurde auf die Sensoroberfläche gespottet.

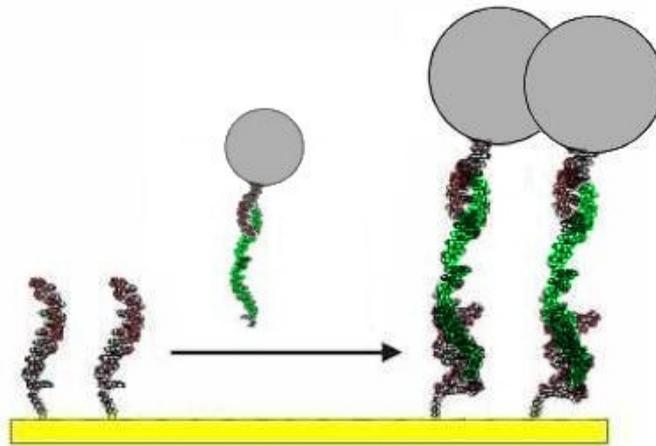


Abbildung 50: Schematische Darstellung der „Tandem-Hybridisierung“. Eine „bivalente“ Oligonukleotidsequenz (Analyt-DNA, grün dargestellt) wird mit LNA- bzw. DNA-Nanobeads vorinkubiert und als hybridisierter Komplex über die mit zweitem Komplementärstrang („Fänger-DNA“) funktionalisierte Sensoroberfläche geleitet.

Zunächst sollte geklärt werden, ob bei diesem System ebenfalls aufgrund großer Änderung der physikalischen Schichtdicke durch die Nanobeads eine Signalverstärkung im RIFS-System möglich ist. Hierfür wurden drei unterschiedliche Konzentrationen an Analyt-DNA (1 nM, 3 nM und 5 nM „21A-POIA3 tandem“-Sequenz) zuerst mit einer konstanten Menge an DNA-Nanobeads vorinkubiert und anschließend auf ein und demselben Sensorschip vermessen (Abbildung 51). Auch bei der Tandemhybridisierung erhält man eine Signalverstärkung mit Hilfe der Nanobeads. Außerdem ist bei der Tandemhybridisierung mit Regenerationslösung 1 eine erfolgreiche Regeneration der Sensoroberfläche möglich, der Sensorschip ist somit wiederverwendbar.

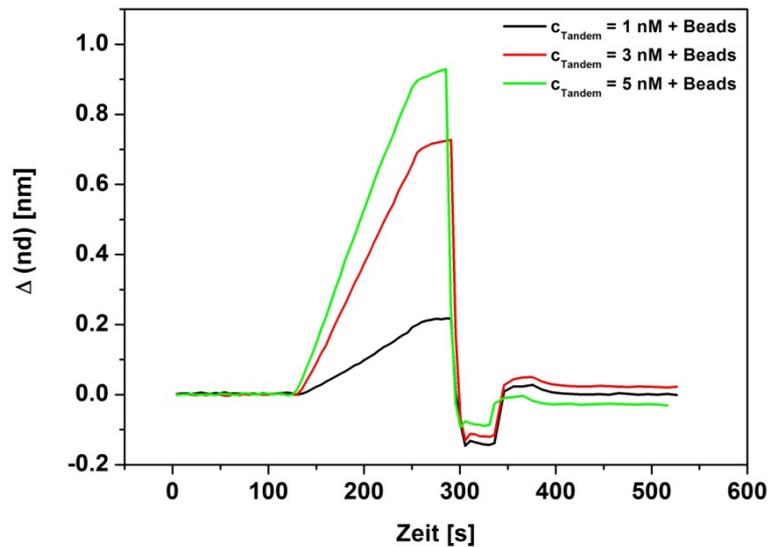


Abbildung 51: Bindungskurven der Tandemhybridisierung von drei unterschiedlichen Konzentrationen an mit DNA-Nanobeads vorinkubierter Analyt-DNA auf einem Sensor-Chip. Die Denaturierung der gebildeten Doppelhelix konnte erfolgreich mit Regenerationslösung 1 durchgeführt werden.

Unter diesen Bedingungen ist die Kalibrierung eines Sensors möglich. In Abbildung 52 ist die Kalibrierung eines Sensorchips mit der Analyt-DNA-Sequenz (schwarze Kurve) sowie die Kalibrierung desselben Chips mit Analyt-DNA-Sequenz vorinkubiert an Nanobeads (rote Kurve) gezeigt. Aus den aufgetragenen Kurven kann man deutlich eine Verbesserung der Nachweisgrenze um eine Größenordnung erkennen.

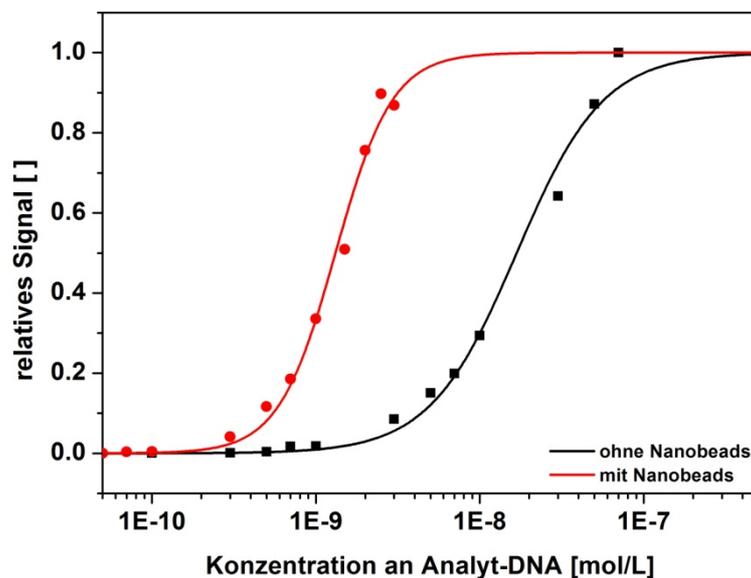


Abbildung 52: Kalibrierung eines Sensors mit Analyt-DNA ohne (schwarz) bzw. mit Nanobeads (rot). Die Nachweisgrenze verbessert sich mit Hilfe der Nanobeads um eine Größenordnung.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass unter Verwendung geeigneter Nanobeads bei der Untersuchung von Oligonukleotid-Hybridisierungen eine Signalverstärkung um einen Faktor von mindestens zehn beobachtbar ist. Bei direkter Hybridisierung lässt sich der Transducer nicht regenerieren ohne dabei die Sensorbeschichtung zu beschädigen, bei Tandemhybridisierung hingegen ist eine einfache Regeneration des Sensors mit Regenerationslösung 1 möglich. Somit kann dieser für viele weitere Messungen wiederverwendet und kalibriert werden.

In allen bisher beschriebenen Experimenten kamen Nanopartikel der Größe 50 nm zum Einsatz. Diese zeigten bei mehreren Systemen einen Signalverstärkungsfaktor von ungefähr zehn im Vergleich zu den herkömmlichen Interaktionssystemen ohne Nanobeads. Dieser Signalverstärkungseffekt kommt aufgrund der Größe der Partikel zu Stande. Es stellte sich somit die Frage, ob mit Hilfe von noch größeren Nanopartikeln eine Erhöhung der Signalamplifikation möglich ist. Deshalb wurden Nanopartikel der Größe 130 nm, 250 nm und 500 nm im RfS-System untersucht.

Zunächst wurden die 500 nm großen, mit DNA funktionalisierten Nanobeads untersucht. Diese wurde wie vorher mit der Tandem-Sequenz hybridisiert und im Anschluss über eine mit Fänger-DNA funktionalisierte Sensoroberfläche geleitet. Es trat während der Injektion der Probe keine Änderung der optischen Schichtdicke auf. Anschließende AFM-Aufnahmen bestätigten, dass keine 500 nm großen Nanobeads an die Oberfläche hybridisiert sind. Grund hierfür ist die enorme Größe, das im Vergleich zu den 50 nm Partikeln große Gewicht dieser Nanobeads und somit der sehr kleine Diffusionskoeffizient der Partikel. Unter den gegebenen Flussbedingungen hatten die Nanobeads keine Möglichkeit an die Oberfläche zu diffundieren und mit dem komplementären Strang zu hybridisieren.

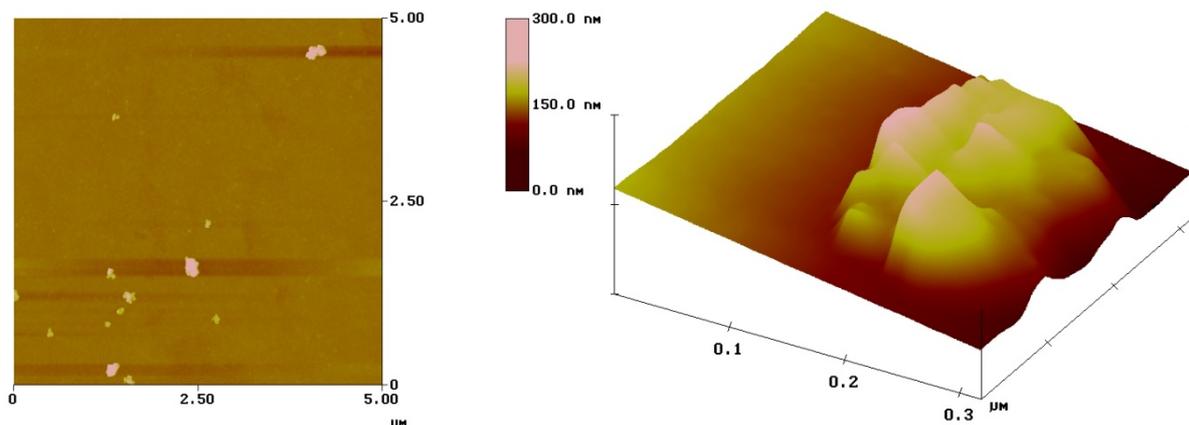


Abbildung 53: AFM-Bild (Tapping-Mode) eines trockenen AMD/DNA-Transducers, an dessen Oberfläche in einem vorherigen Schritt in der RfS-Anlage 250 nm große DNA-Nanobeads hybridisiert wurden.

Die 250 nm großen Nanobeads wurden ebenfalls mit Tandem-DNA vorinkubiert und anschließend über einen mit Fänger-DNA funktionalisierten Sensor geleitet. Hier erhielt man ebenfalls kein RfS-Signal bei der Injektion der Probe. Anschließende Aufnahmen von AFM-Bildern zeigten jedoch

vereinzelt gebundene Nanopartikel (Abbildung 53). Die Größe der auf die Oberfläche gebundenen Partikel entsprach 250 nm, zum Teil agglomerierten auch Nanopartikel auf der Oberfläche.

Dasselbe Experiment wurde ebenfalls mit 130 nm Nanobeads durchgeführt. Im RIFS-System wurde ein Hybridisierungssignal erhalten, dieses ist jedoch im Gegensatz zu den bisher erhaltenen negativ (Abbildung 54). Dies erschien zunächst verwunderlich, da aufgrund der Schichtdickenzunahme der sensitiven Schicht durch die Partikel ein großes, positives Signal erwartet wurde. Das negative Signal kommt hier aber aufgrund der Überschreitung der „kritischen“ physikalischen Schichtdicke zustande (siehe unten). Ein negatives Signal durch „Zusammenstauchen“ des Biopolymers aufgrund der Gewichtskraft der Nanopartikel konnte ausgeschlossen werden, da der Sensor in der Flusszelle vertikal steht und somit keine Gewichtskraft zum Tragen kommt.

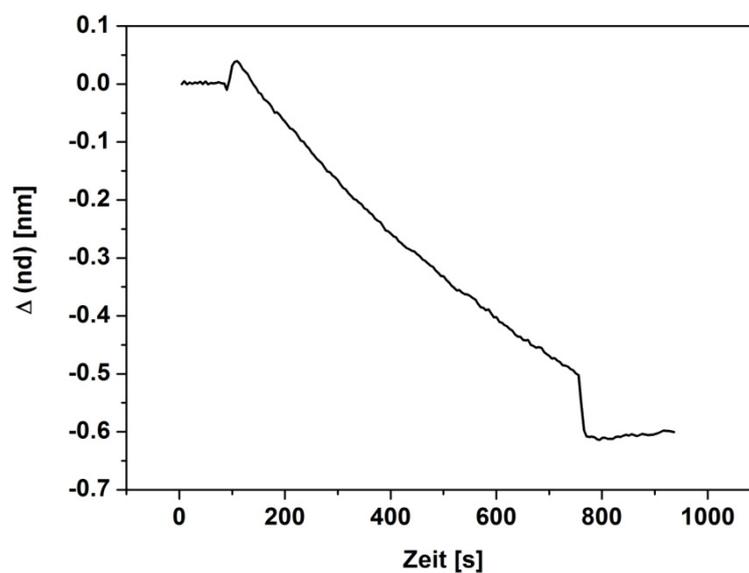


Abbildung 54: Negatives RIFS-Bindungssignal erhalten bei der Hybridisierung von 130 nm großen DNA-Nanobeads an eine AMD/DNA-Oberfläche.

AFM-Bilder dieses RIFS-Sensors bestätigten, dass Nanopartikel der Größe 130 nm an die Oberfläche hybridisierten (Abbildung 55). Im Vergleich zu den AFM-Bildern der auf dem RIFS-Sensor hybridisierten 250 nm Nanobeads sieht man hier eine viel größere Anzahl an hybridisierten Nanobeads. Aufgrund der geringeren Größe und damit einem größeren Diffusionskoeffizienten diffundiert unter gleichen Messbedingungen eine größere Menge an Nanobeads an die Oberfläche, wo sie mit der Fänger-DNA hybridisieren können.

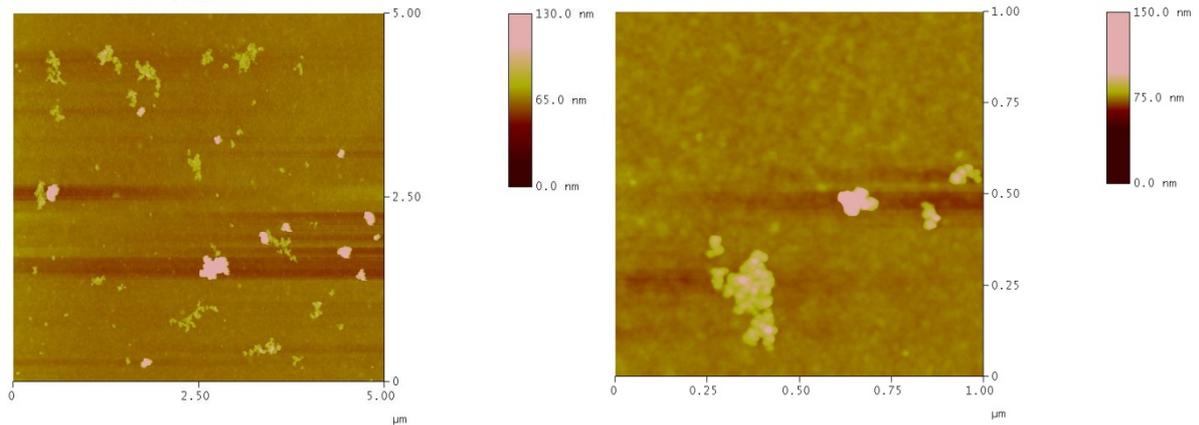


Abbildung 55: AFM-Bild (Tapping-Mode) eines trockenen AMD/DNA-Transducers, an dessen Oberfläche in einem vorherigen Schritt in der RfS-Anlage 130 nm große DNA-Nanobeads hybridisiert wurden.

Negative Bindungssignale in der RfS wurden bereits in [Piehler 1997] beschrieben. Hier wurde ein enorm dickes Schichtsystem aufgebaut, indem alternierend Polystreptavidin und biotinyliertes BSA subsequent auf eine biotinylierte AMD-Oberfläche inkubiert wurden (Abbildung 56). Nach fünf einzelnen Schichten wechselte das bis dahin positive Signal im RfS zu negativen Signalen. Nach vier weiteren Schichten erhielt man dann wieder positive Signale bei der Anbindung der jeweiligen Schichten. Nach erneutem Aufbringen von fünf einzelnen Schichten änderte sich das Bindungssignal wieder von positiv zu negativ.

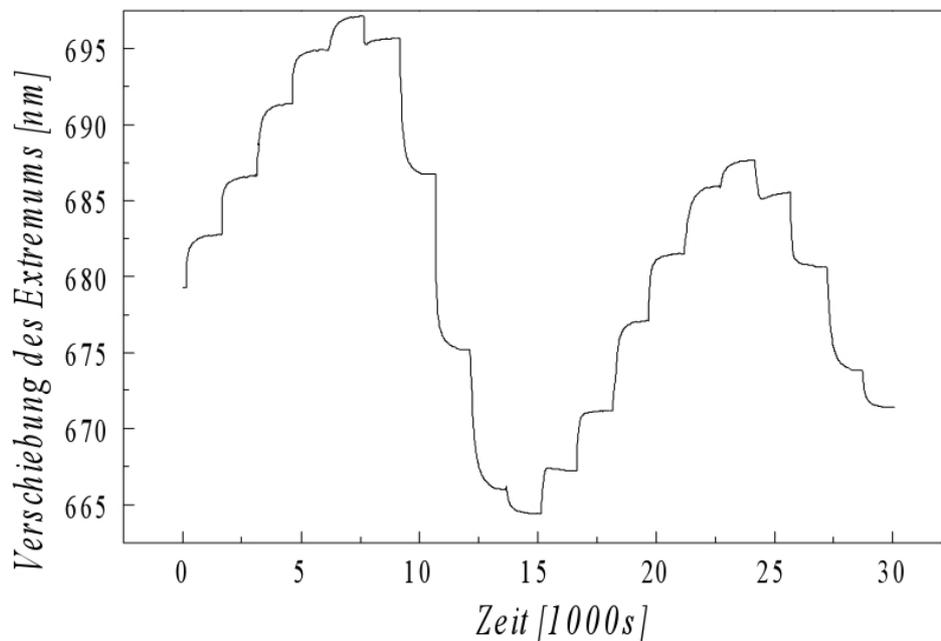


Abbildung 56: RfS-Bindungssignal beim alternierenden Aufbringen von Polystreptavidin und biotinyliertem BSA auf eine biotinylierte AMD-Oberfläche. Zunächst detektiert man positive Bindungssignale, im Mittelteil der Bindungskurve kehrt sich das Signal nach negativ um, um am Ende wieder positive Ausschläge zu geben (modifiziert nach [Piehler 1997]).

Negative RIFS-Bindungssignale, sowohl auf Interferenzglas als auch auf anderen Schichtsystemen, wurden auch in [Kröger 2003] und [Schweizer 2005] gezeigt und auch im Laboralltag desöfteren erhalten, v. a. wenn AMD-Schichten über längere Zeit immobilisiert wurden.

Erklären kann man sich dieses Phänomen durch Simulation der Interferenzspektren für große Schichtdickenzunahmen. Verwendet wurde hierfür das Programm FILMWIZARD. In Abbildung 57 sind die simulierten Interferenzspektren für die jeweiligen Schichtdicken gezeigt. Wie man erkennen kann verschiebt sich nach einer Schichtdickenzunahme von 40 nm bis 50 nm (beginnend bei einer Ausgangsdicke der sensitiven Schicht von 30 nm) das Interferenzspektrum nicht zu höheren Wellenlängen sondern zu niedrigeren. Aufgrund der Periodizität der Reflektivitätsänderung bei jeder Wellenlänge verschiebt sich ab einer gewissen optischen Schichtdicke das Spektrum in die entgegengesetzte Richtung.

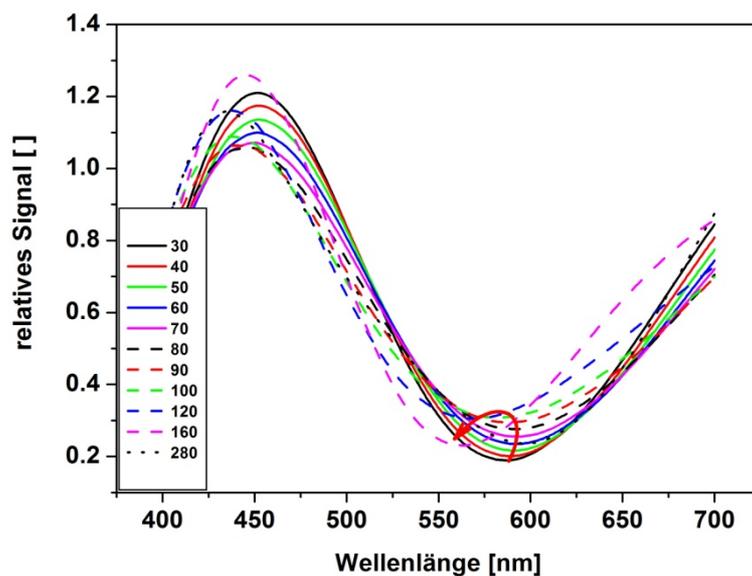


Abbildung 57: Simulierte Interferenzspektren für physikalische Schichtdicken der sensitiven Schicht (hier: AMD) zwischen 30 nm und 280 nm. Man erkennt zunächst eine Verschiebung nach höheren Wellenlängen, bis sich ab ca. 70 nm physikalischer Schichtdicke („kritische Schichtdicke“) eine Verschiebung nach niedrigeren Wellenlängen ergibt (roter Pfeil).

In [Frank 2005] wurde dieser Effekt bereits diskutiert. Hier wurde die Lage des Parabelminimums im Interferenzspektrum in Abhängigkeit der physikalischen Schichtdicke der sensitiven Schicht simuliert. Es zeigt sich ebenfalls, dass ab einer Schichtdicke der Bioschicht von ca. 70 nm sich die Verschiebung des Minimums im Interferenzspektrum in die entgegengesetzte Richtung ändert. Bei ca. 170 nm physikalischer Schichtdicke kehrt sich die Richtung der Verschiebung erneut um. Im Bereich der Minima bzw. Maxima in Abbildung 58 verhält sich die Verschiebung des Extrempunkts im Interferenzspektrum nicht mehr linear zur Zunahme der physikalischen Schichtdicke. Somit sollte es vermieden werden, bei Messungen auf diesem Schichtsystem (in diesem Fall Interferenzglas) eine

physikalische Schichtdicke von größer 60 nm zu erreichen, da sonst die mittels spektraler Auswertung erhaltenen Signalhöhen nicht mehr miteinander vergleichbar sind.

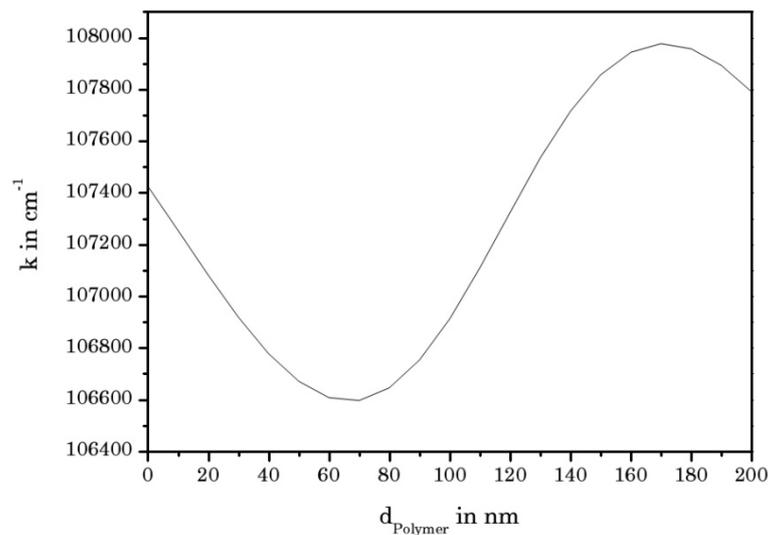


Abbildung 58: Lage des Minimums im Interferenzspektrum (in Wellenzahlen) in Abhängigkeit von der physikalischen Schichtdicke d_{Polymer} (nach [Frank 2005])

Nach [Hehl 1998] quellen AMD-Oberflächen von ca. 5 nm unter Luft auf ca. 30 nm unter Puffer auf. Daher sollte sich die Schichtdickenänderung im Bereich von ca. 30 nm physikalischer Schichtdicke bewegen. Das Schichtsystem von Interferenzglas wurde somit genau auf diese Bedingungen optimiert. Die 330 nm dicke SiO_2 -Schicht bewirkt also zum einen, dass man ein Minimum im Interferenzspektrum erhält, zum anderen, dass mit diesen Oberflächen Oligonukleotid-Hybridisierungs-, Protein-Protein- und Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen optimal verfolgt werden können. Wie man aus Abbildung 58 entnehmen kann, lassen sich Systeme mit größeren Wechselwirkungspartnern bis zu einer physikalischen Schichtdickenänderung von ca. 30 nm auf AMD bzw. 40 nm auf PEG auf Interferenzglas untersuchen. Selbst bei einer Anfangsschichtdicke der sensitiven Schicht von 80 nm ist maximal eine Schichtdickenänderung von ca. 70 nm auf diesem Schichtsystem mit den gegebenen Algorithmen auswertbar.

4.1.4 CHARAKTERISIERUNG WEITERER NANOPARTIKEL FÜR DAS RIFS-SYSTEM

Neben den magnetischen Nanobeads wurden auch weitere Nanopartikel für das RIFS-System untersucht. Charakterisiert werden sollten Gold- und Silika-Nanopartikel, weil diese mittels einfacher Thiol- bzw. Silan-Chemie funktionalisierbar sind. Da sich in den vorangegangenen Experimenten gezeigt hat, dass Nanopartikel der Größe 100 nm wegen dem Auftreten von negativen Bindungssignalen nicht verwendet werden sollten, kamen Nanopartikel der Größe 20 nm, 50 nm und 70 nm zum Einsatz.

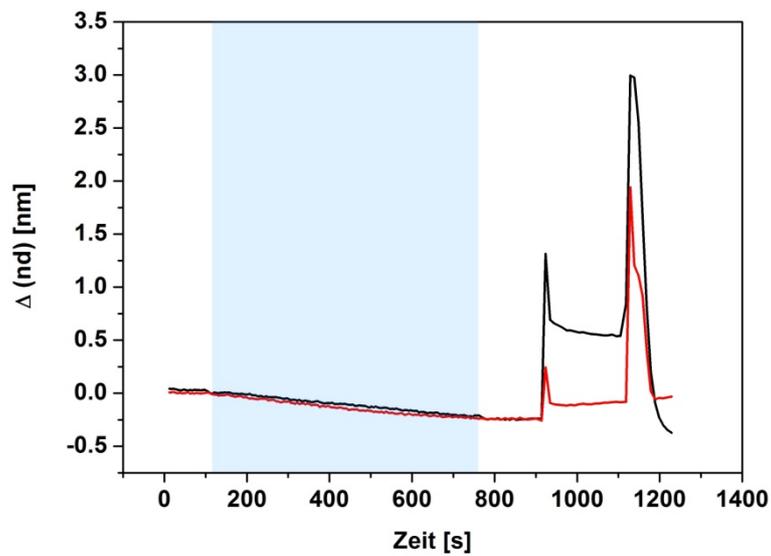


Abbildung 59: Unspezifische Bindung von unfunktionalisierten Gold-Nanopartikeln auf AMD-Oberflächen (Zweifachmessung auf zwei unterschiedlichen AMD-Chips).

Zunächst wurde ebenfalls die unspezifische Bindung von unfunktionalisierten, 20 nm großen Gold-Nanopartikeln an eine vorher mit Regenerationslösung 1 gesäuberte AMD-Oberflächen getestet. In Abbildung 59 sind zwei Bindungskurven für diese unspezifische Bindung gezeigt (Injektionsphase blau unterlegt). Man erkennt einen leichten linearen Abfall des Bindungssignals.

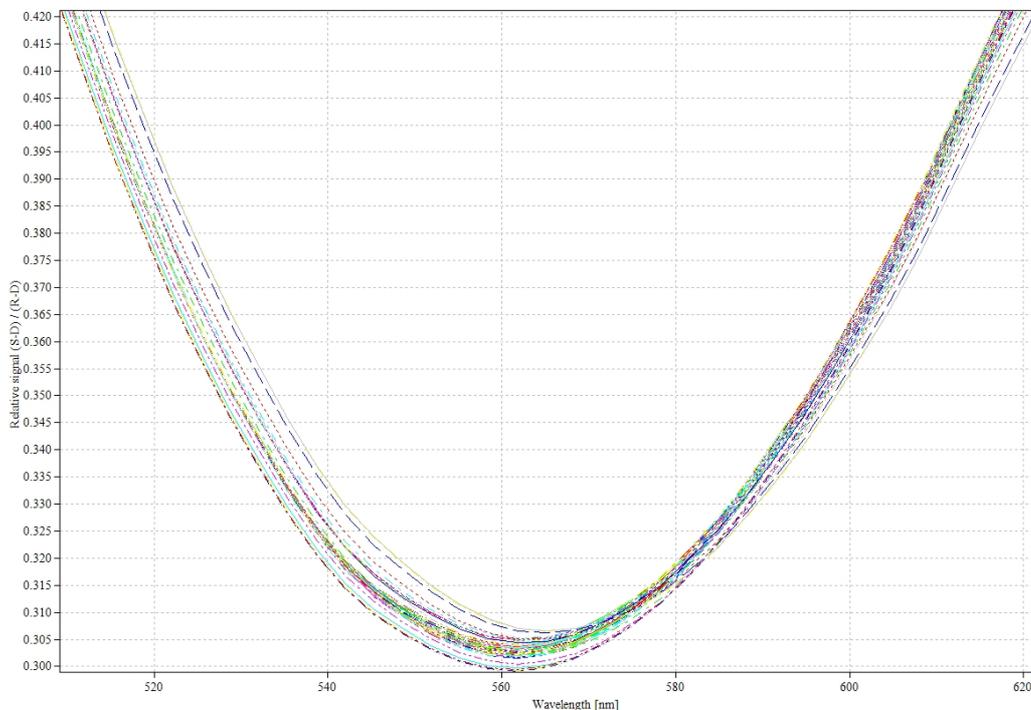


Abbildung 60: Detaillierte Darstellung des Minimums von Interferenzspektren, die bei der unspezifischen Bindung von 20 nm Gold-Nanopartikeln an AMD-Oberflächen aufgenommen wurden.

In Abbildung 60 ist ein Ausschnitt der Interferenzspektren einer der oben beschriebenen Messungen gezeigt. Man erkennt eine vergleichsweise starke Intensitätsänderung der Interferenzspektren unter Beibehaltung ihrer Form, d. h. eine Verschiebung der gesamten Spektren in vertikaler Richtung. Dies deutet auf Streueffekte der Gold-Nanopartikel im RfS-System hin, da man für Luftblasen im System ebenfalls einen solchen Effekt beobachtet. Die Form der Spektren an sich bleibt gleich, es verschiebt sich als ganzes zu höheren Intensitäten. Aufgrund dieses Streueffekts konnte über die unspezifische Bindung der 20 nm Gold-Nanopartikel zunächst keine Aussage getroffen werden.

Anschließend wurde die spezifische Bindung von mit α -Biotin Antikörpern funktionalisierten Gold-Nanopartikeln der Größe 20 nm an biotinylierte AMD-Oberflächen untersucht. In Abbildung 61 ist eine Bindungskurve (schwarz) dieser Gold-Nanopartikel aus sehr verdünnter Lösung gezeigt.

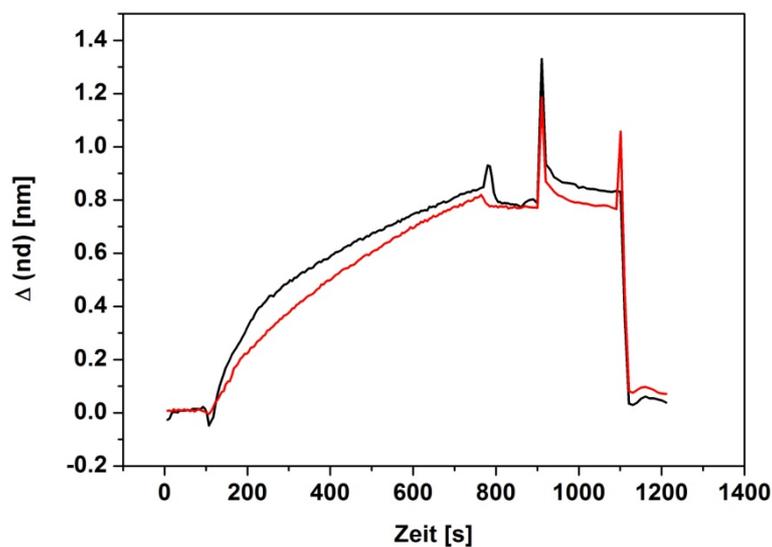


Abbildung 61: Inkubation von 20 nm großen Au-Nanopartikel funktionalisiert mit Antikörper (α -Biotin) auf eine biotinylierte AMD-Oberfläche (schwarz) bzw. auf eine AMD-Oberfläche (rot).

Zum Testen der unspezifischen Bindung wurde dieselbe Menge an mit α -Biotin Antikörpern funktionalisierten Gold-Nanopartikeln an eine unfunktionale AMD-Oberfläche inkubiert. Wie man aus Abbildung 61 erkennt, zeigen diese Nanopartikel eine große unspezifische Bindung. Diese Tatsache lässt sich zurückführen auf das Fehlen einer biokompatiblen Umhüllung der Gold-Nanopartikel (z. B. mit Dextran). Für weitere Experimente waren diese Gold-Nanopartikel somit aufgrund großer unspezifischer Bindung und Streuung für das RfS-System unbrauchbar.

Ebenso wurden 50 nm und 70 nm große Streptavidin-modifizierte Silika-Nanopartikel auf unspezifische und spezifische Bindung untersucht. In Abbildung 62 ist die unspezifische Bindung von 50 nm bzw. 70 nm großen Silika-Partikeln an AMD-Oberflächen gezeigt.

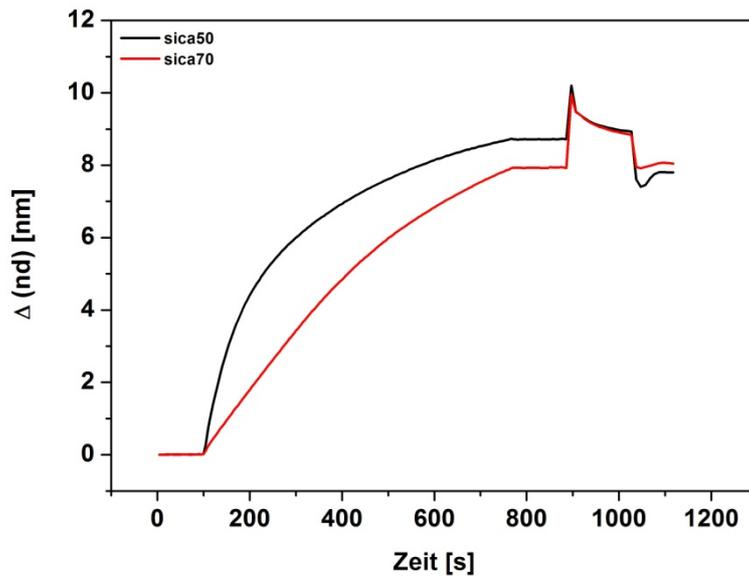


Abbildung 62: Unspezifische Bindung von mit Streptavidin funktionalisierten Silika-Nanopartikeln an mit AMD beschichtete Sensoroberflächen. Man erkennt die deutlich schnellere Anbindung der kleineren 50 nm Partikel im Vergleich zu 70 nm Partikeln.

Aufgrund der enorm hohen unspezifischen Bindung der Streptavidin-funktionalisierten Silika-Nanopartikel an die beschichteten Transducer war die Untersuchung der spezifischen Bindung dieser Partikel an biotinylierte AMD-Oberflächen hinfällig. Diesen Partikeln fehlt ebenfalls eine „schützende“ Biopolymer-Hülle, die die unspezifische Bindung inhibiert. Man erkennt, dass bei Inkubation gleicher Mengen an Partikeln die kleineren 50 nm großen Silika-Partikel schneller unspezifisch an die Oberfläche binden als die 70 nm großen. Dies ist auch der Grund dafür, dass am Ende der Injektionsphase unter denselben Messbedingungen ein um etwa 1 nm optischer Schichtdicke größeres Signal für die kleinere Silika-Partikel erhalten wird. Eine längere Injektion der 70 nm sNP würde zu einem höheren Endwert des Signals führen, da sich die rote Kurve in Abbildung 62 nicht in der Sättigung befindet.

4.1.5 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Nanobeads scheinen aufgrund ihrer Biokompatibilität am geeignetsten für den Einsatz in direkt-optischen Methoden wie der RIFS zu sein. Die den Magnetit-Kern umgebende Dextranhülle inhibiert die unspezifische Bindung der Nanobeads an Teile der Mikrofluidik sowie an die Sensoroberflächen komplett. Im Gegensatz hierzu zeigen nicht mit Biopolymer umhüllte Nanopartikel starke unspezifische Bindung an die verwendeten Oberflächenmodifikationen. Eine Schutzhülle bestehend aus z. B. Dextran oder Polyethylenglykol ist somit unabdingbar.

Die spezifische Bindung der Nanobeads bzw. die unspezifische Bindung der 50 nm und 70 nm großen Silika-Nanopartikel zeigen überaus große Signale im RIFS. Diese Signalverstärkung wird hauptsächlich

getragen durch den enormen Schichtdickenzuwachs der sensitiven Schicht. Dabei zeigt sich, dass das Signal für spezifische Affinitätsreaktionen bzw. Hybridisierungen um einen Faktor von mindestens zehn durch Einsatz von Nanopartikeln verstärkt wird. Die direkte Hybridisierung von an Nanobeads gebundenen Oligonukleotiden an komplementäre Stränge auf der Oberfläche lässt sich mittels chemischer und physikalischer Methoden nicht befriedigend regenerieren, ohne die Oberflächenmodifikation dabei zu zerstören. Die mittels Tandem-Hybridisierung gebundenen Oligonukleotid-Nanobeads hingegen lassen sich mit der Standardregenerationslösung (Regenerationslösung 1) erfolgreich und vollständig entfernen. Der verwendete Sensor kann problemlos für zahlreiche weitere Messzyklen wiederverwendet und somit kalibriert werden.

Die Untersuchung der Größe der verwendeten Nanopartikel ergab ein Optimum bei einem Durchmesser von 50 nm. Zum einen zeigen größere Nanopartikel aufgrund ihres Eigengewichts langsamere Diffusion an die Sensoroberflächen. Zum anderen erhält man für Nanopartikel ab einer Größe von 70 nm eine Umkehr der im RfS detektierten Bindungssignale von positiv nach negativ. Dies kommt durch die Änderung der Verschiebung des Interferenzspektrums von „bathochrom“ nach „hypsochrom“ zu Stande. Eine Vergleichbarkeit dieser Signale ist bisher nicht möglich, sollte aber mit Hilfe geeigneter Auswertalgorithmen durchführbar sein.

4.2 OPTIMIERTE SCHICHTSYSTEME FÜR DIE 1-LAMBDA REFLEKTOMETRIE (RIF)

4.2.1 ALLGEMEINES ZUR RIF

Zur Charakterisierung der 1- λ Reflektometrie (Rif) für die biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA) und v. a. für den Vergleich mit der spektralen Auswertung (RfS) soll eine inzwischen sehr gut charakterisierte und etablierte Antigen-Antikörper Wechselwirkung als Testsystem herangezogen werden, welches in der RfS bereits sehr gute und reproduzierbare Signale liefert. Dabei handelt es sich um die Interaktion zwischen Atrazincapronsäure (Ligand) und dem Antikörper α -ACA (Rezeptor). Verglichen werden soll die Affinitätskonstante, die man für dieses System mittels RfS bzw. Rif erhält. Für kinetisch kontrollierte Messungen wurde die Atrazincapronsäure über die im Abschnitt 3.2.1 beschriebene Chemie auf AMD-funktionalisierte Substrate immobilisiert und die entsprechende Konzentration an Antikörper inkubiert. Hierfür kam eine dreifach bestimmte Konzentrationsreihe mit 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bis 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Antikörper im Abstand von 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zum Einsatz, d. h. für jedes Substrat wurden 21 Messungen auf ein und demselben Transducer durchgeführt. Für diffusionslimitierte Messungen wurde Atrazincapronsäure auf AMD-funktionalisierte Substrate immobilisiert, die Konzentration an Antikörper durch vorherige Inkubation der entsprechenden Menge an Ligand im Cup eingestellt (Affinitätstitration). Für die Regeneration der Oberflächen wurde stets Regenerationslösung 1 erfolgreich eingesetzt.

Untersucht wurde die Antigen-Antikörper Wechselwirkung auf folgenden Schichtsystemen (siehe Abschnitt 3.1.4):

- Interferenzglas
- Goetheglas
- Schweizerglas
- BK7-Glas
- Plastik-Substrat (ZEONOR)

Anhand des bereits für die RIFs verwendeten Interferenzglases soll auf die Besonderheiten der 1- λ Reflektometrie eingegangen werden. Es wird sich herausstellen, dass dieses Schichtsystem für die RIF relativ ungeeignet ist. Desweiteren wurden in der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie Goetheglas und Schweizerglas eingesetzt. Ersteres liefert in der RIFs aufgrund seiner dicken Tantalpentoxid-Schicht ein besseres Signal-zu-Rausch Verhältnis als Interferenzglas, ist aber aufgrund der dünnen Siliziumdioxid-Schicht nur dann anwendbar, wenn dicke Polymerschichten auf dieses Substrat aufgebracht werden. Deshalb wurde es vornehmlich für die Chemosensorik eingesetzt. Hier werden Polymerschichten mit mehreren hundert Nanometern auf diese Träger mittels *spin coating* aufgebracht. Schweizerglas wurde aufgrund des aufgedampften Titandioxids untersucht, welches ein besonders biokompatibles Material darstellt und für Prothesen im menschlichen Körper (Endoprothesen) breite Anwendung findet. Diverse Charakterisierungen dieses Materials mit RIFs wurden bereits durchgeführt [Mutschler 2004; Schweizer 2005]. BK7-Glas und Plastik-Substrat wurde v. a. unter dem Gesichtspunkt des Einsatzes als Wegwerfprodukt („disposables“) untersucht. Diese Träger sind unvergütet und deshalb besonders günstig.

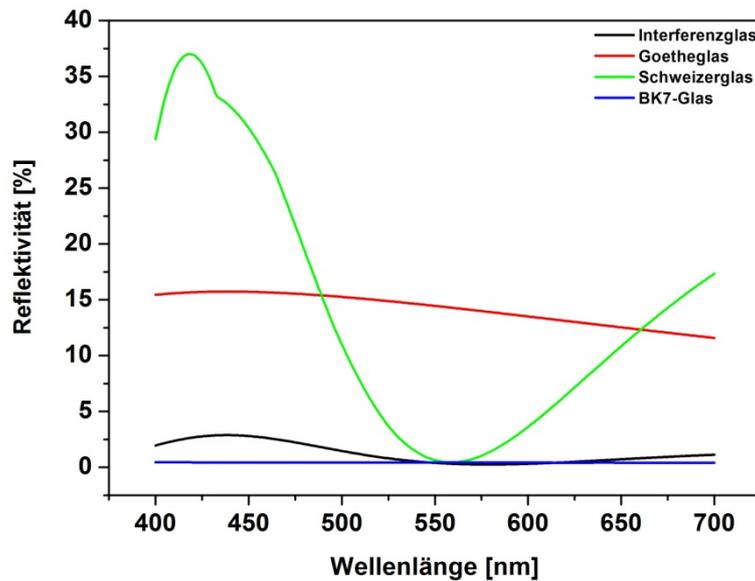


Abbildung 63: Vergleich der Reflektivitäten (simuliert) über den sichtbaren Bereich für die verwendeten Substrate.

Abbildung 63 zeigt die simulierten Reflektivitäten der einzelnen Schichtsysteme im sichtbaren Bereich des Lichts. Wie man deutlich erkennen kann, zeigen die Schichtsysteme sehr unterschiedliches Verhalten. BK7-Glas und Plastik-Substrat zeigen eine sehr geringe, über den sichtbaren Bereich konstante Reflektivität. Dies lässt im Vergleich zu den anderen Schichtsystemen hohes Rauschen beim Einsatz in der Rif vermuten, da weniger Licht auf den Detektor (Photodiode) fällt. Interferenzglas zeigt das typische, modulierte Reflexionsspektrum, die Reflektivität bewegt sich dabei zwischen 0,25 % (bei 575 nm) und 3 % (bei 440 nm). Die gesteigerte Reflektivität im Vergleich zum unvergüteten BK7-Glas kommt durch die Ta_2O_5 -Schicht zu Stande, dieses Material hat einen Brechungsindex von $n_{500} = 2,2$. Goetheglas zeigt im Vergleich zu Interferenzglas eine deutlich höhere Reflektivität des Lichts (11 % bis 16 %), diese Eigenschaft kommt durch die 4,5 mal dickere Tantalpentoxid-Schicht zu Stande. Eine andere wichtige Eigenschaft dieses Schichtsystems ist die Tatsache, dass die Reflektivität im sichtbaren Bereich relativ konstant verläuft. An Schweizerglas wiederum wird noch mehr Licht reflektiert (zwischen 0,4% und 33 %), was aufgrund des Brechungsindexes von $n_{500} = 2,6$ und der physikalischen Schichtdicke von $d = 100$ nm herrührt. Das Reflexionsspektrum an Schweizerglas zeigt ein Minimum bei ca. 560 nm mit einer Reflektivität von 0,4 %. Unterhalb von 432 nm ist der Absorptionskoeffizient von Titandioxid größer Null, deshalb sollte unterhalb dieser Wellenlänge nicht mit Rif gemessen werden, wenn auch die Reflektivität in diesem Bereich den größten Wert zeigt.

Simuliert man die Reflektivitäten der Materialien Ta_2O_5 und TiO_2 bei verschiedenen Schichtdicken, so erhält man das in Abbildung 64 gezeigte Verhalten.

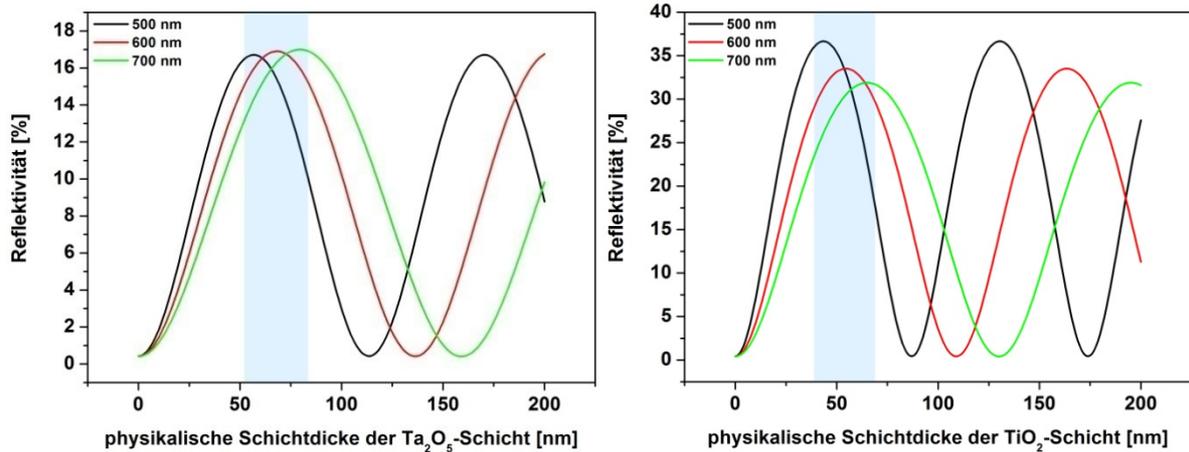


Abbildung 64: Verlauf der simulierten Reflektivitäten in Abhängigkeit der physikalischen Schichtdicke für Ta₂O₅ (links) und TiO₂ (rechts) für drei Wellenlängen.

In der Abbildung ist der Bereich der Schichtdicke markiert (blau), in dem die Reflektivität maximal über den sichtbaren Bereich ist. Dies ist bei einer physikalischen Schichtdicke von ca. 60 nm Ta₂O₅ bzw. ca. 50 nm TiO₂ der Fall. Man sieht außerdem, dass das verwendete Goetheglas mit einer physikalischen Schichtdicke von 45 nm Ta₂O₅ für die RIF eine relativ gute Wahl, da die Reflektivität sehr hoch ist. Das verwendete Schweizerglas mit 100 nm TiO₂ hingegen ist eine relativ schlechte Wahl, die Reflektivität zeigt ein Minimum bei einer Wellenlänge von 600 nm.

4.2.2 INTERFERENZGLAS FÜR DIE RIF

Für einen Vergleich der mit der 1-λ Reflektometrie erhaltenen Daten mit denen mittels spektraler RIFs gemessenen, muss zunächst die Affinitätskonstante des Testsystems bestimmt werden. Hierfür wurde eine Konzentrationsreihe unter kinetisch kontrollierten Bedingungen auf Interferenzglas spektral vermessen und ausgewertet. Abbildung 65 zeigt den Scatchard Plot dieser Konzentrationsreihe.

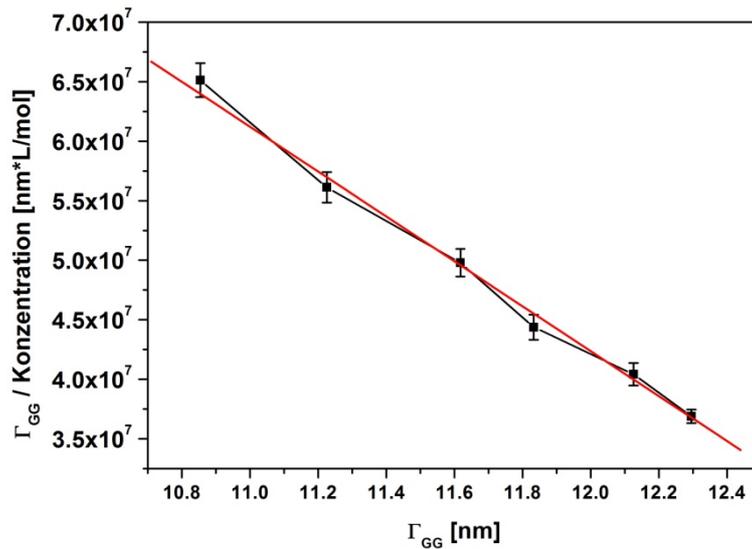


Abbildung 65: Scatchard Plot für die spektrale Auswertung der Antigen-Antikörper Interaktion auf Interferenzglas.

In der Abbildung sind von links nach rechts die steigenden Konzentrationen beginnend mit 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bis 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Schritten von 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aufgetragen. Die schwarzen Verbindungslinien zeigen einen richtigen Verlauf der Maximalbeladung mit der Konzentration. Die Steigung der Ausgleichsgerade (rot) entspricht der Affinitätskonstante der Interaktion. Diese beträgt hier $K_{\text{aff, spektral}} = 1,885 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. Mit ein und derselben Messung wurde nun bei einzelnen, ausgewählten Wellenlängen ausgewertet. Dieser Wert stimmt mit dem in [Kumpf 2005] unter kinetisch kontrollierten Messbedingungen gemessenen sehr gut überein.

Betrachtet man die biomolekulare Interaktion von Antikörpern mit an auf der Oberfläche immobilisierten Antigenen, so erhält man die in Abbildung 23 gezeigte Änderung der Intensität für jede Wellenlänge.

Nach [Frank 2005] sind hier die für die Rlf „optimalen Wellenlängen“, also jene mit maximaler Intensitätsänderung, die Wellenlängen 515 nm (positive Änderung) und 648 nm (negative Änderung). Simuliert man den Reflektivitätsverlauf für dieses Schichtsystem bei den genannten Wellenlängen, so erkennt man, dass sie für die Antigen-Antikörper Untersuchung sehr schlecht geeignet sind. Das gilt v.a. für die Wellenlänge von 515 nm. In Abbildung 66 ist der Reflektivitätsverlauf dieser beiden Wellenlängen bei einer typischen Antigen-Antikörper Wechselwirkung gezeigt.

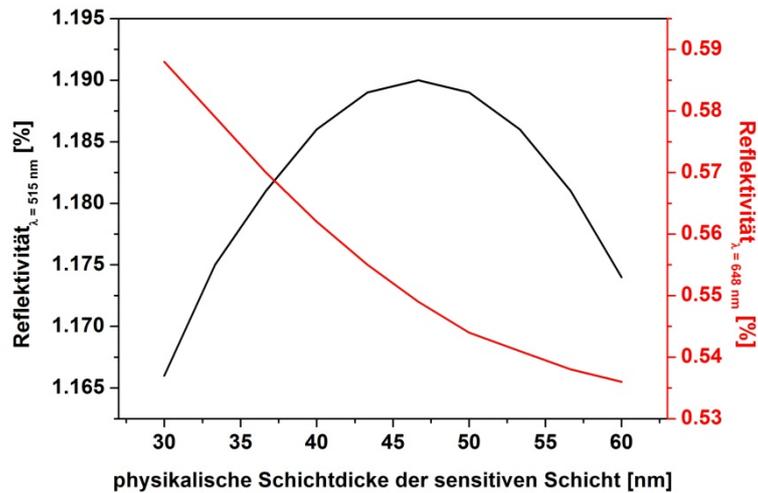


Abbildung 66: Simulierter Reflektivitätsverlauf der Wellenlängen 515 nm und 648 nm bei der Untersuchung einer typischen Antigen-Antikörper Wechselwirkung auf Interferenzglas.

Wie man erkennen kann verläuft die Reflektivitätsänderung in dem untersuchten Schichtdickenbereich nicht linear. Für die Wellenlänge 515 nm durchläuft die Reflektivitätsänderung sogar ein Maximum.

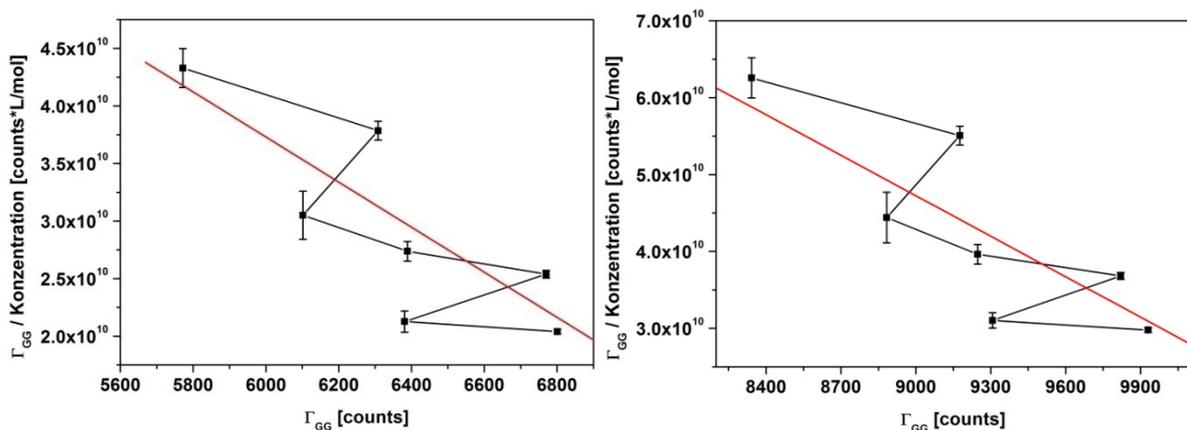


Abbildung 67: Scatchard Plots für die Wellenlängen 515 nm (links) und 648 nm (rechts) der Antigen-Antikörper Interaktion auf Interferenzglas.

Ermittelt man bei diesem Antigen-Antikörper System die Affinitätskonstante unter kinetisch kontrollierten Bedingungen erhält man die in Abbildung 67 gezeigten Scatchard-Plots. Die Affinitätskonstante ergibt sich bei der Wellenlänge 515 nm zu $K_{\text{aff}, 515 \text{ nm}} = 1,957 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, bei der Wellenlänge von 648 nm zu $K_{\text{aff}, 648 \text{ nm}} = 1,754 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. Zwar liefern die Scatchard Plots der beiden Wellenlängen Affinitätskonstanten, die im Bereich der spektral ausgewerteten liegen. Jedoch erkennt man an den schwarzen Verbindungslinien zwischen den Messpunkten, dass der Verlauf der Maximalbeladung mit der Konzentration bei beiden Wellenlängen „falsch“ ist. Man erhält für 25 $\mu\text{g/mL}$ eine größere Maximalbeladung als für 30 $\mu\text{g/mL}$, ebenso für 40 $\mu\text{g/mL}$ und 45 $\mu\text{g/mL}$.

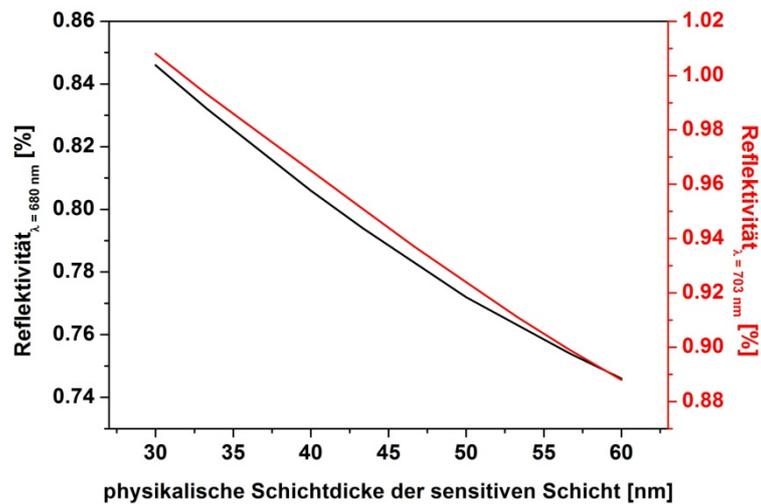


Abbildung 68: Simulierter Reflektivitätsverlauf der Wellenlängen 680 nm (schwarz) und 703 nm (rot) bei der Untersuchung einer typischen Antigen-Antikörper Wechselwirkung auf Interferenzglas.

Die nach [Frank 2005] gewählten „optimalen Wellenlängen“ mit maximaler Intensitätsänderung liefern zwar die höchsten Signale, aber falsche quantitative Ergebnisse, da die Linearität von Reflektivität zu physikalischer Schichtdickenänderung nicht gegeben ist. Mittels Simulation lassen sich wirklich optimale Wellenlängen finden, die quantitativ richtige Ergebnisse liefern. Für Interferenzglas sind das z. B. die Wellenlängen 680 nm und 703 nm. In Abbildung 68 ist der Verlauf der Reflektivität mit der physikalischen Schichtdicke im gemessenen Bereich für beide Wellenlängen gezeigt. Wertet man den spektral aufgenommenen Datensatz nun bei diesen Wellenlängen aus, so erhält man die in Abbildung 69 gezeigte Scatchard Plots. Da, wie bei der spektralen Auswertung mit RIFS, hier die Linearität gegeben ist, stimmt der Verlauf der Maximalbeladung mit der Konzentration überein (schwarze Verbindungslinien zwischen den Punkten).

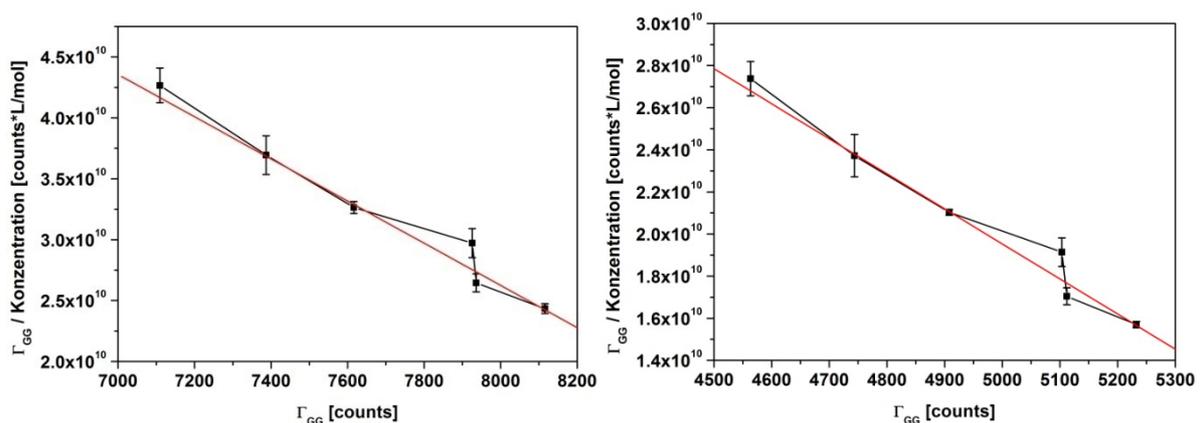


Abbildung 69: Scatchard Plots für die Wellenlängen 680 nm (links) und 703 nm (rechts) der Antigen-Antikörper Interaktion auf Interferenzglas.

Die Affinitätskonstante ergibt sich bei der Wellenlänge 680 nm zu $K_{\text{aff}, 680 \text{ nm}} = 1,730 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, bei der Wellenlänge von 703 nm zu $K_{\text{aff}, 703 \text{ nm}} = 1,754 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. Die Affinitätskonstante für die Auswertung bei

den Wellenlängen 680 nm und 703 nm fällt etwas niedriger aus als bei der spektralen Auswertung. Dies vom höheren Rauschen in den Bindungskurven und damit einer schlechteren Anpassung bei der Bestimmung der Maximalbeladung herrühren.

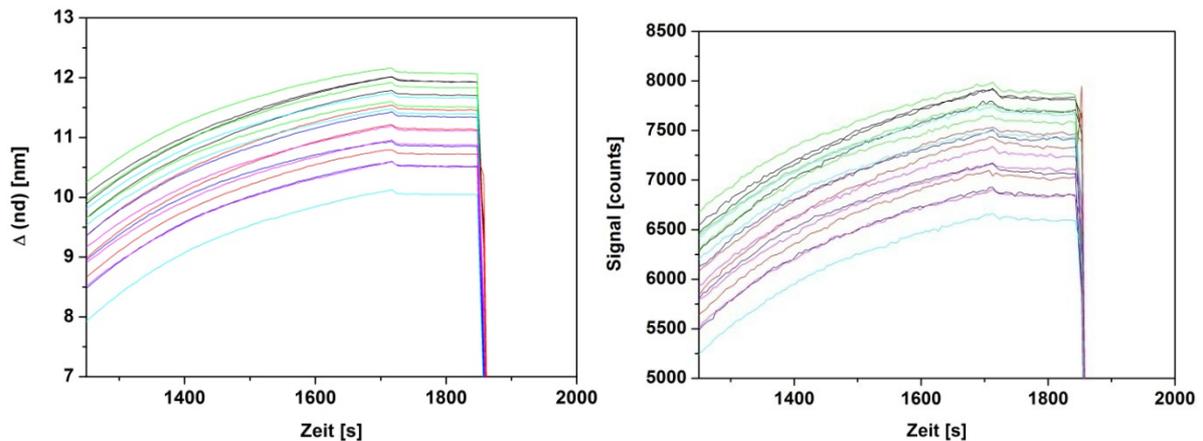


Abbildung 70: Ausschnitt aus den Bindungskurven der Messreihen zur kinetisch kontrollierten Affinitätskonstantenbestimmung, links spektrale Auswertung, rechts Auswertung bei der Wellenlänge 680 nm.

In Abbildung 70 sind die Messreihen gezeigt, links spektral ausgewertet, rechts exemplarisch bei der Wellenlänge 680 nm. Abgesehen von dem größeren Rauschen für die Auswertung bei 680 nm sehen die Bindungskurven gleich aus.

Trägt man die über die jeweiligen Scatchard Plots erhaltenen Affinitätskonstanten für die spektrale und $1-\lambda$ Auswertung in einem Schaubild auf (Abbildung 71), so erkennt man, dass die Affinitätskonstanten für die nach [Frank 2005] ausgewählten Wellenlängen (515 nm und 648 nm) sich zwar im Bereich des Wertes für die spektrale Auswertung bewegen, man muss jedoch bedenken, dass die Auswertung an sich falsch ist. Für die Wellenlängen 680 nm und 703 nm, die eine lineare Abhängigkeit der Reflektivität von der Änderung der Schichtdicke bei der biomolekularen Interaktion zeigen, erhält man eine leicht niedrigere Affinitätskonstante als für die spektrale Auswertung, dafür sind aber die Werte der beiden Wellenlängen quasi gleich.

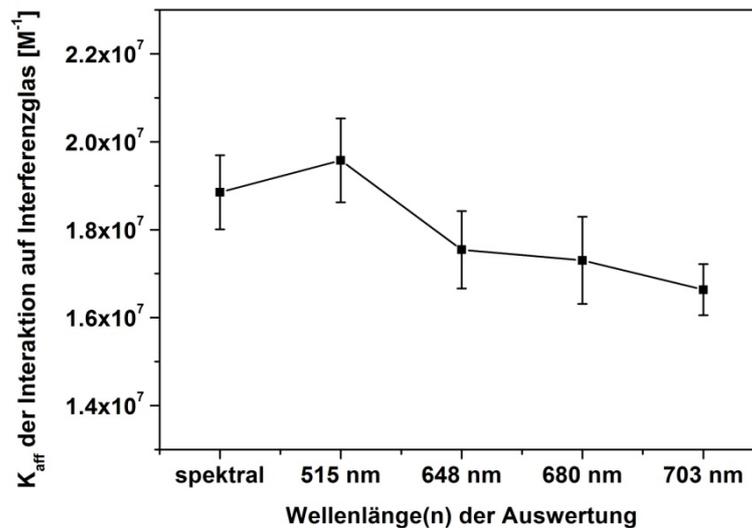


Abbildung 71: Spektrale vs. 1-lambda Auswertung der Affinitätskonstanten der Antigen-Antikörper Interaktion unter kinetisch kontrollierten Messbedingungen auf Interferenzglas.

Neben der Bestimmung der Affinitätskonstanten unter kinetisch kontrollierten Messbedingungen wurde auch unter diffusions-limitierten Bedingungen die Affinitätskonstante der homogenen Reaktion bestimmt. Hierfür wurde wiederum zuerst eine Messreihe spektral aufgenommen und spektral ausgewertet. Die Steigungen der Geraden in der Bindungskurve wurden gegen die Konzentration (halb-logarithmische Auftragung) aufgetragen und mit dem Logistikfit der Testmittelpunkt der Titration bestimmt. Aus diesem lässt sich die Affinitätskonstante berechnen. Abbildung 72 zeigt die spektral ausgewertete Titrationskurve des Testsystems auf Interferenzglas. In der Abbildung wurden die drei Ausreißer (grün) maskiert und nicht zur Annäherung mit dem Logistikfit herangezogen. Der Testmittelpunkt ergibt sich zu $x_0 = 3,06$ ppb bzw. $c_{\text{TM}} = 1,277 \cdot 10^{-8}$ mol/L Atrazin. Daraus ergibt sich eine Affinitätskonstante von $K_{\text{aff, Tit, spektral}} = 1,989 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$. Die Affinitätskonstante ist somit ungefähr eine Größenordnung höher als unter kinetisch kontrollierten Messbedingungen.

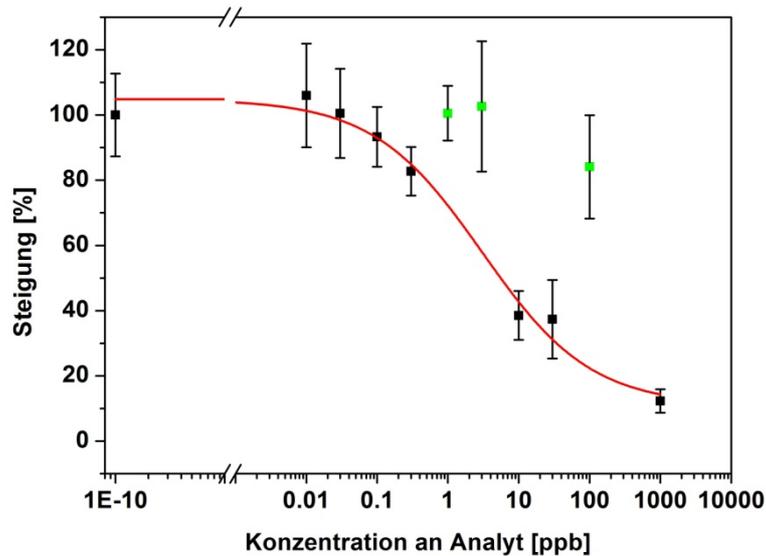


Abbildung 72: Titration mit Logistikfit (rot) zur Bestimmung der Affinitätskonstanten der homogenen Reaktion auf Interferenzglas. Ausreißer sind grün maskiert und wurden zur Annäherung mit der Logistikfunktion nicht herangezogen.

Dies ist bekannt, da bei der Reaktion an der heterogenen Phase (an der Oberfläche) andere konformative Bedingungen und Zugänglichkeiten zum Liganden bestehen als in homogener Phase. Der für die homogene Reaktion ermittelte Wert für die Affinitätskonstante entspricht somit auch eher der Realität.

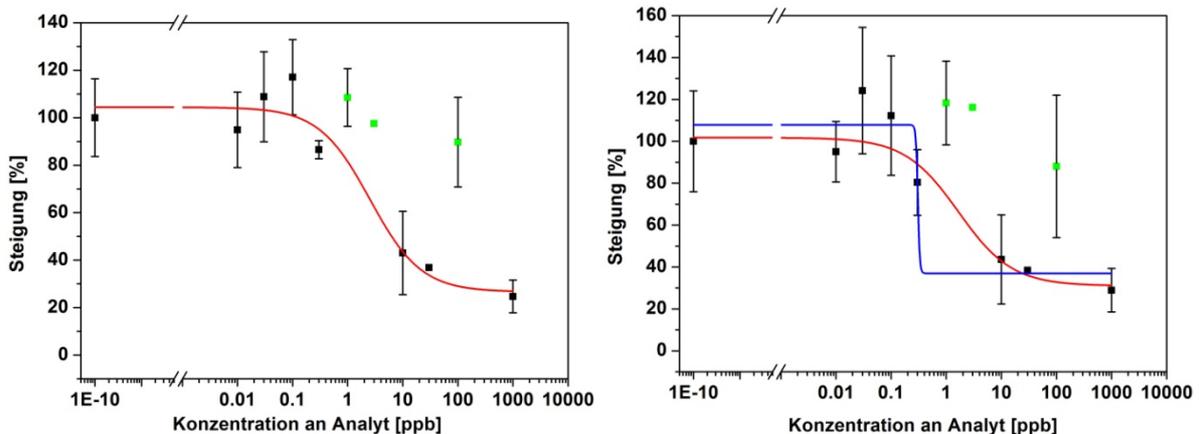


Abbildung 73: Titration mit Logistikfit (rot) zur Bestimmung der Affinitätskonstanten der homogenen Reaktion auf Interferenzglas, ausgewertet bei den Wellenlängen 680 nm (links) und 703 nm (rechts). Ausreißer sind grün maskiert und wurden zur Annäherung mit der Logistikfunktion nicht herangezogen. Rechts: Der blaue Logistikfit beinhaltet den Wert bei $c_{Analyt} = 0,03$ ppb Atrazin, der rote nicht.

In Abbildung 73 ist die Auswertung der diffusions-limitierten Messreihe bei den Wellenlängen 680 nm und 703 nm gezeigt. Die großen Standardabweichungen für jeden Wert kommen aufgrund des großen Rauschens der Bindungskurven und der damit schlechten linearen Regression jeder einzelnen

Steigung zu Stande. Bei der Wellenlänge 703 nm wurde der Messpunkt bei $c_{\text{Analyt}} = 0,03$ ppb nicht zur Annäherung mit der Logistikkfunktion herangezogen, da sonst der Fit sehr schlecht wird (blaue Kurve). Für die Affinitätskonstante ergibt sich $K_{\text{aff, Tit, 680 nm}} = 2,414 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ und $K_{\text{aff, Tit, 703 nm}} = 3,830 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$. Die Auswertung ist aufgrund der verrauschten Bindungskurven und den geringen Signalen relativ ungenau.

Interferenzglas ist das Standard-Schichtsystem für die RIFs. Für die üblichen, spektral ausgewerteten Bindungsstudien ist dieses Schichtsystem als optimal berechnet und bestimmt worden. Für die RIF hingegen scheint das Schichtsystem ungeeignet zu sein. Es finden sich zwar wenige Wellenlängen, mit denen nach RIF ausgewertet werden kann, die sehr dicke Siliziumdioxidschicht von 330 nm erzeugt aber für die meisten Wellenlängen viel Modulation. Der Großteil der Wellenlängen im sichtbaren Bereich fällt somit für die RIF weg. Die sowohl spektral als auch bei einer Wellenlänge berechneten Affinitätskonstanten decken sich gut mit in der Vergangenheit bestimmten Werten. Wie zu erwarten ist die gemessenen Affinitätskonstante der homogenen Reaktion größer als die der heterogenen. Die Auswertung der homogenen Reaktion nach RIF erweist sich aufgrund des erhöhten Rauschens sowie der niedrigen Bindungssignale und somit schlechter linearer Regression als schwierig und ungenau. Rausch-stabilere Photodioden könnten hier für eine Verbesserung der Ergebnisse zum Einsatz kommen.

4.2.3 GOETHEGLAS FÜR DIE RIF

Wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben bewegt sich die Reflektivität von Goetheglas im Bereich zwischen 11 % und 16 %. Somit wird viel Licht an dem Schichtsystem zum Detektor zurück reflektiert. Hierdurch kann man die Integrationszeit des Detektors für die Aufsummierung des Lichts heruntersetzen und die Anzahl an Messungen innerhalb der üblichen 5-Sekunden Messabschnitte erhöhen. Hierdurch verbessert sich das Signal-zu-Rausch Verhältnis. RIF-Bindungskurven auf Goetheglas sollten somit rauschärmer sein als jene auf Interferenzglas bzw. unvergüteten Substraten.

In Abbildung 74 sind die simulierten Interferenzspektren gezeigt, die man für verschiedenen Dicken an sensitiver Schicht (AMD) erhält. Es wurde dabei auf Goethe-Referenz referenziert.

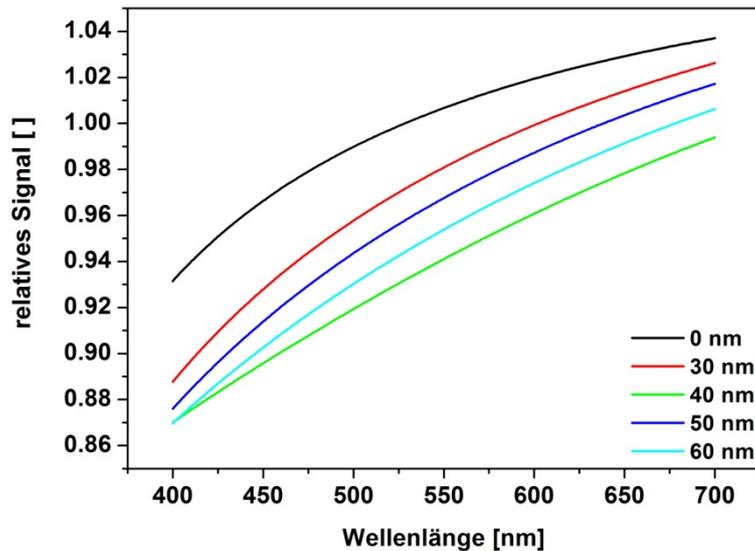


Abbildung 74: Simulierte Interferenzspektren von Goetheglas mit 0 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm und 60 nm dicker sensitiver Schicht, referenziert auf Goethe-Referenz. Ab einer Wellenlänge von ca. 525 nm nimmt die Reflektivität für jede Wellenlänge linear mit der physikalischen Schichtdicke ab.

Wie man aus der Abbildung erkennt, verhält sich die Änderung der Reflektivität ab einer Wellenlänge von ca. 525 nm und aufwärts linear zur physikalischen Schichtdickenänderung. Somit können auf diesem Schichtsystem problemlos zwischen 525 nm und 700 nm Wellenlängen ausgewertet werden. Auch auf Goetheglas wurde eine kinetisch kontrollierte Messreihe durchgeführt und die Affinitätskonstante bei unterschiedlichen Wellenlängen über den Scatchard Plot bestimmt. Vier exemplarische Ergebnisse sind in Abbildung 75 gezeigt. Die Maximalbeladung zeigt die richtige Reihenfolge der Konzentrationen und der Fit liegt ausgesprochen gut auf den Messwerten, v. a. für kleinere Wellenlängen.

Die Affinitätskonstante, die sich aus den jeweiligen Scatchard-Plots für die einzelnen Wellenlängen ergibt, ist in Tabelle 3 wiedergegeben:

ausgewertete Wellenlänge [nm]	aus dem Scatchard Plot erhaltene K_{aff} [M^{-1}]
525	$1,546 \cdot 10^7$
601	$1,334 \cdot 10^7$
650	$1,228 \cdot 10^7$
699	$1,078 \cdot 10^7$

Tabelle 3: Aus den jeweiligen Scatchard-Plots der Goetheglas-Messungen erhaltenen Affinitätskonstanten.

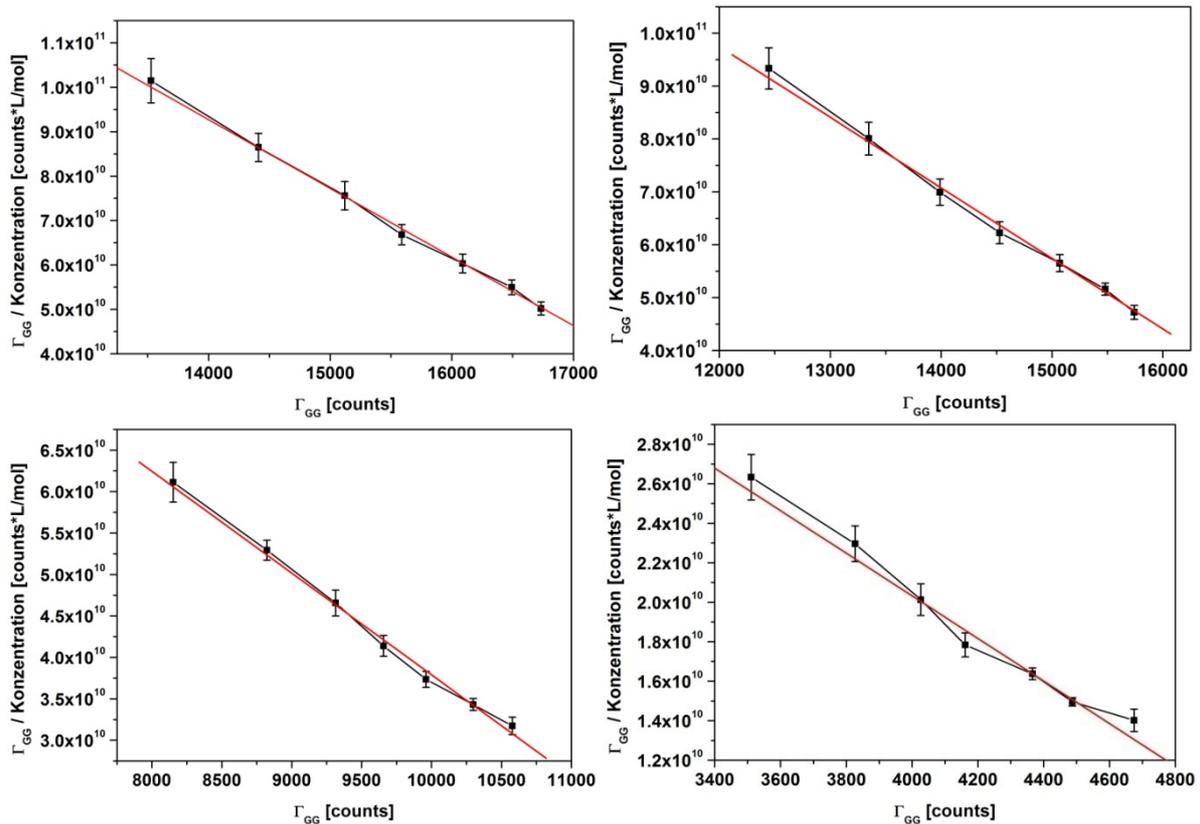


Abbildung 75: Scatchard Plots für die Wellenlängen 525 nm (links oben), 601 nm (rechts oben), 650 nm (links unten) und 699 nm (rechts unten) der Antigen-Antikörper Interaktion auf Goetheglas.

Die erhaltenen Werte für jede Wellenlänge liegen unter Berücksichtigung des Bereichs der Affinitätskonstante über vier Größenordnungen ($10^{7,3\pm 1,9} \text{ M}^{-1}$) für organische Antigene recht nahe beieinander, fallen aber etwas niedriger aus als die Affinitätskonstante, die man aus der spektralen Auswertung auf Interferenzglas erhält. Dies kann von der leicht unterschiedlichen Oberflächenmodifikation herrühren. Auf Interferenzglas sind als oberste Schicht 330 nm Siliziumdioxid aufgedampft, auf Goetheglas nur 20 nm. Dieser große Unterschied kann unter Umständen Einfluss auf die Oberflächenchemie und somit auf die biomolekulare Interaktion haben (siehe [Kumpf 2005]).

4.2.4 SCHWEIZERGLAS FÜR DIE RIF

Wie bereits erwähnt ist Titandioxid ein sehr interessantes Material zur Herstellung von Endoprothesen. Es verfügt über eine gute Biokompatibilität, außerdem zeigt es einen hohen Brechungsindex von $n_{500} = 2,6$. Für Schweizerglas erwartet man aufgrund der sehr hohen Reflektivität die rauschärmsten Bindungskurven in der RIF. Obwohl die 100 nm Titandioxid-Schicht wie in Abbildung 64 gezeigt eine recht schlechte Wahl ist, wurde dieses Schichtsystem trotzdem vermessen. Für die RIF sind Wellenlängen größer 575 nm zur Auswertung geeignet.

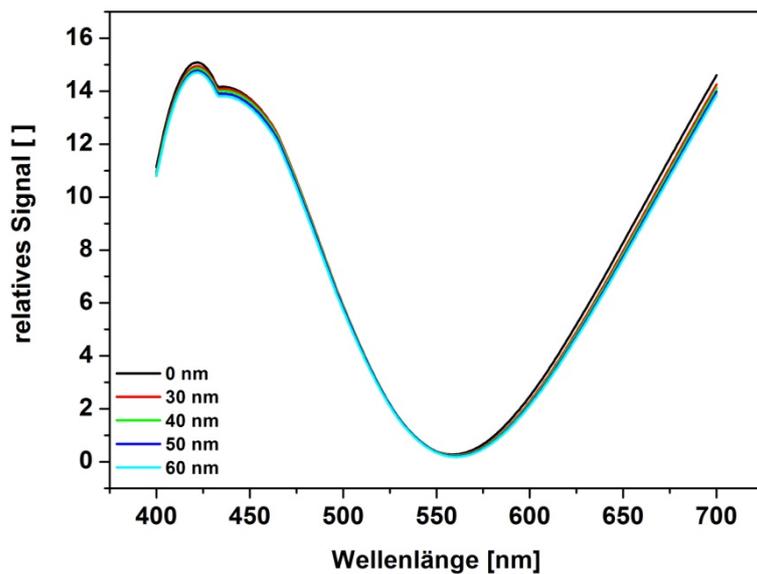


Abbildung 76: Simulierte „Interferenzspektren“ von Schweizerglas mit 0 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm und 60 nm dicker sensitiver Schicht, referenziert auf Interferenz-Referenz. Unterhalb der Wellenlänge von 435 nm absorbiert das Titandioxid Licht.

Für 575 nm erhält man eine sehr geringe Reflektivität (Minimum in Abbildung 76), bei 700 nm liegt die Reflektivität bei ca. 16 %.

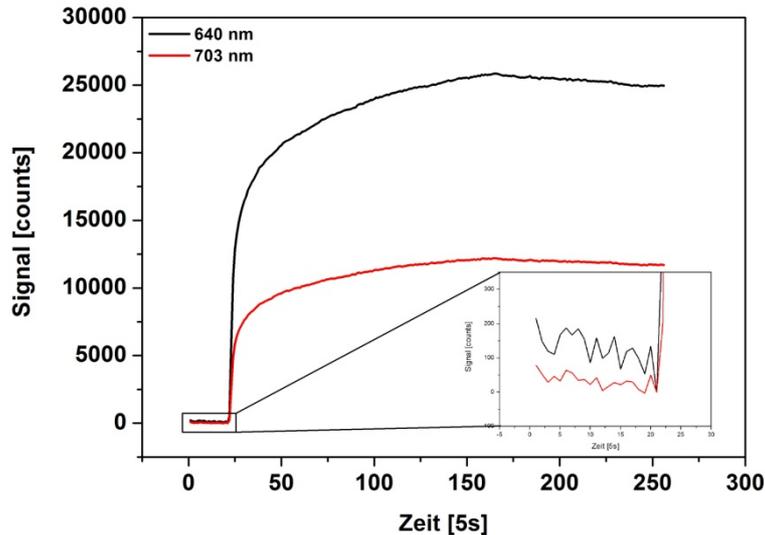


Abbildung 77: Bindungskurve von 50 µg/mL Antikörper an immobilisierten Liganden auf Schweizerglas, ausgewertet bei 640 nm (schwarz) und 703 nm (rot). Das Rauschen (kleiner Kasten rechts unten) ist aufgrund höherer Reflektivität bei 703 nm geringer als bei 640 nm.

Auch auf Schweizerglas wurde eine kinetisch kontrollierte Konzentrationsreihe zur Bestimmung der Affinitätskonstanten des Testsystems durchgeführt. Die Scatchard Plots für die Wellenlängen 640 nm und 703 nm sind in Abbildung 78 gezeigt.

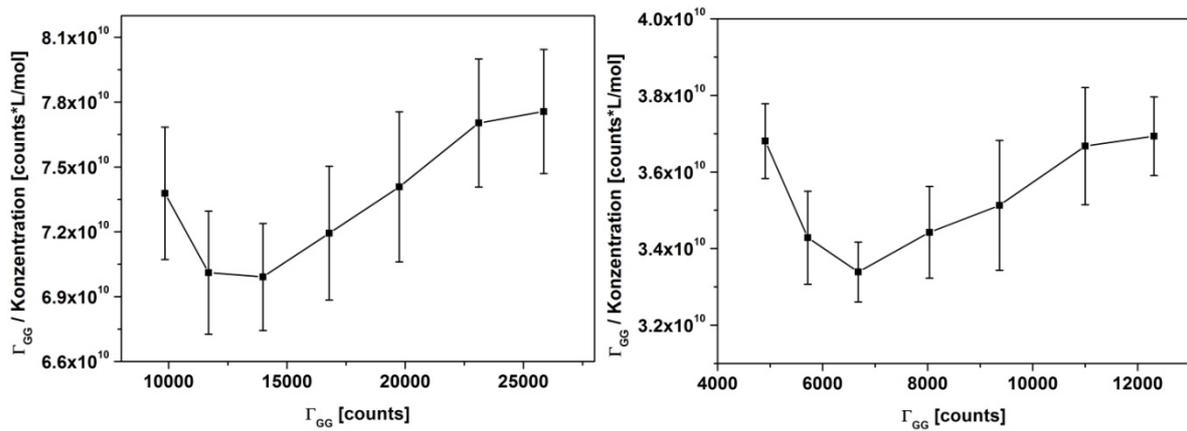


Abbildung 78: Scatchard Plots für die Wellenlängen 640 nm (links) und 703 nm (rechts) der Antigen-Antikörper Interaktion auf Schweizerglas. Aufgrund der Instabilität der Oberflächenchemie im Laufe der Messreihe zeigen die Plots anomales Verhalten, es konnte keine Affinitätskonstante berechnet werden.

Die Scatchard Plots zeigen anomales Verhalten, eine Auswertung durch lineare Regression war somit nicht möglich. Ursache hierfür ist die Instabilität der Oberflächenchemie auf diesem Schichtsystem. Abbildung 79 zeigt die Konzentrationsreihe (die Dreifachmessung der Konzentration 20 µg/mL wurde der Übersichtlichkeit halber aus der Abbildung entfernt).

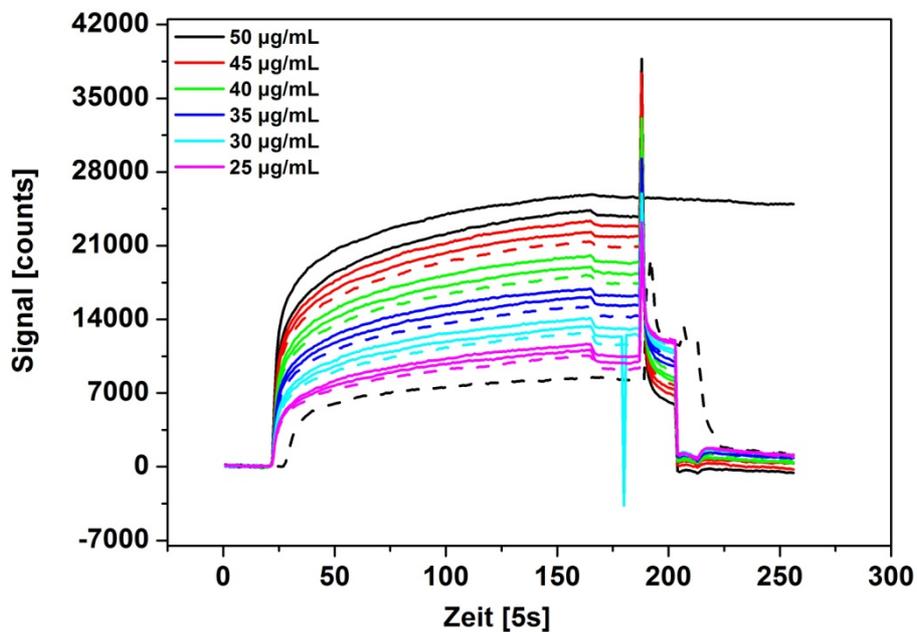


Abbildung 79: Kinetisch kontrollierte Konzentrationsreihe auf Schweizerglas, ausgewertet bei 640 nm. Gestrichelte Linien zeigen die letzte Messung der jeweiligen Konzentration. Die Dreifachmessung der Konzentration 20 µg/mL wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit aus der Abbildung entfernt.

Die gestrichelten Kurven stellen die letzte Messung der jeweiligen Konzentration dar. Das Bindungssignal nimmt stetig ab. Am Ende der Konzentrationsreihe wurde ein erneutes Mal mit 50 $\mu\text{g/mL}$ Antikörper inkubiert. Hierbei zeigt sich die in der Abbildung schwarz gestrichelte Kurve, die unterhalb der anderen liegt (zur besseren Darstellung in horizontaler Richtung verschoben). Dies beweist die Instabilität der Oberflächenmodifikation.

4.2.5 UNVERGÜTETE SUBSTRATE FÜR DIE RIF

BK7-Glas und ZEONOR sind unvergütete Substrate, die aus einem einzigen Material bestehen. BK7-Glas ist das gewöhnliche Glas, das für Objektträger verwendet wird. Für transparente Verkleidungen in medizinischen Produkten, Handykameras, Scheinwerfern etc. werden ZEONOR und andere Cycloolefin-Kunststoffe verwendet. Beide Substrate haben einen ähnlichen Brechungsindex von ca. $n_{500} = 1,52$. Die Reflektivität an diesen Substraten fällt somit niedriger aus als bei den bisher diskutierten Schichtsystemen. Die folgenden Untersuchungen sollten klären, ob und wie gut biomolekulare Interaktion an diesen Substraten möglich ist, da sie hohes Potential für den Einsatz als Einweg-Chips darstellen.

Wie für die anderen Schichtsysteme auch wurde zunächst der Reflektivitätsverlauf dieser Substrate über den sichtbaren Bereich des Lichts simuliert. Dieser ist in Abbildung 80 gezeigt. Man erkennt, dass die Reflektivität sehr gering ist (kleiner 0,5 %) und nahezu konstant über den sichtbaren Bereich. Die Änderung der Reflektivität mit der physikalischen Schichtdickenänderung der sensitiven Schicht ist bei jeder Wellenlänge linear. Somit zeigen diese Substrate den Vorteil, dass bei jeder Wellenlänge im sichtbaren Bereich mit RIF gemessen werden kann.

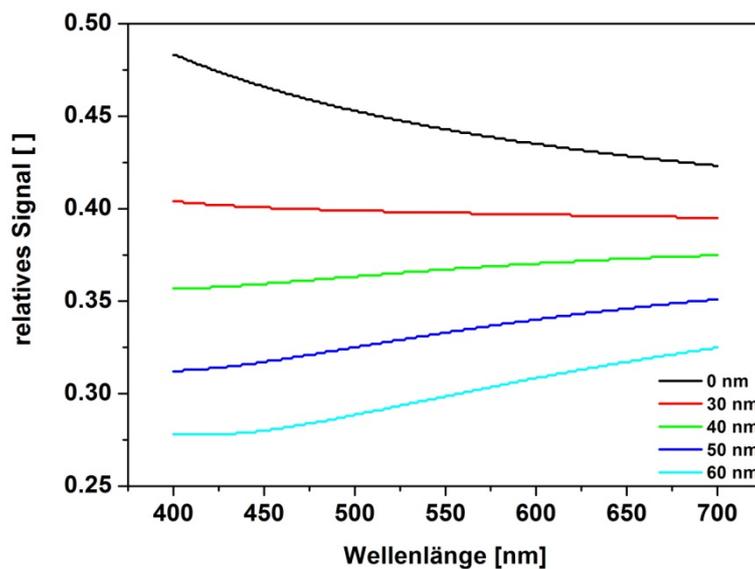


Abbildung 80: Simulierte Reflexionsspektren von BK7-Glas bzw. Plastiksubstrat mit 0 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm und 60 nm dicker sensitiver Schicht.

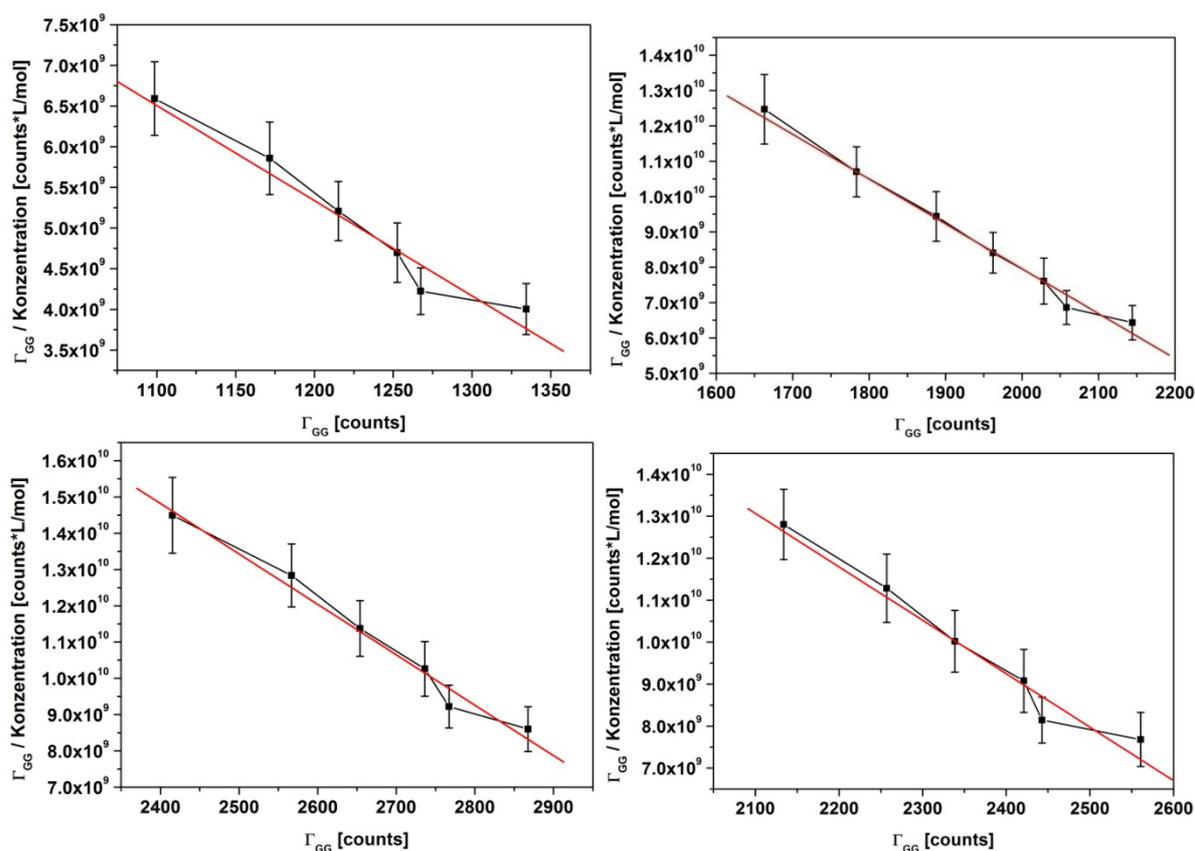


Abbildung 81: Scatchard Plots für die Wellenlängen 501 nm (links oben), 525 nm (rechts oben), 551 nm (links unten) und 601 nm (rechts unten) der Antigen-Antikörper Interaktion auf BK7-Glas.

Zunächst wurden Konzentrationsreihen auf BK7-Glas durchgeführt und exemplarisch bei vier Wellenlängen ausgewertet. In Abbildung 81 sind die Scatchard Plots für diese Wellenlängen gezeigt. Die Standardabweichungen der Messpunkte sind höher als beim vergüteten Glas. Die Affinitätskonstante, die sich aus den jeweiligen Scatchard Plots ergibt, ist in Tabelle 4 wiedergegeben:

ausgewertete Wellenlänge [nm]	aus dem Scatchard Plot erhaltene K_{aff} [M^{-1}]
501	$1,171 \cdot 10^7$
525	$1,268 \cdot 10^7$
551	$1,390 \cdot 10^7$
601	$1,273 \cdot 10^7$

Tabelle 4: Aus den jeweiligen Scatchard-Plots der BK7-Messungen erhaltenen Affinitätskonstanten.

Die Affinitätskonstante ist für alle Wellenlängen sehr gut vergleichbar. Im Vergleich zur auf Interferenzglas ermittelten Affinitätskonstante ist auch die auf BK7-Glas erhaltene etwas geringer. Im Vergleich zur Affinitätskonstante auf Goetheglas ist auf BK7-Glas die Abweichung geringer.

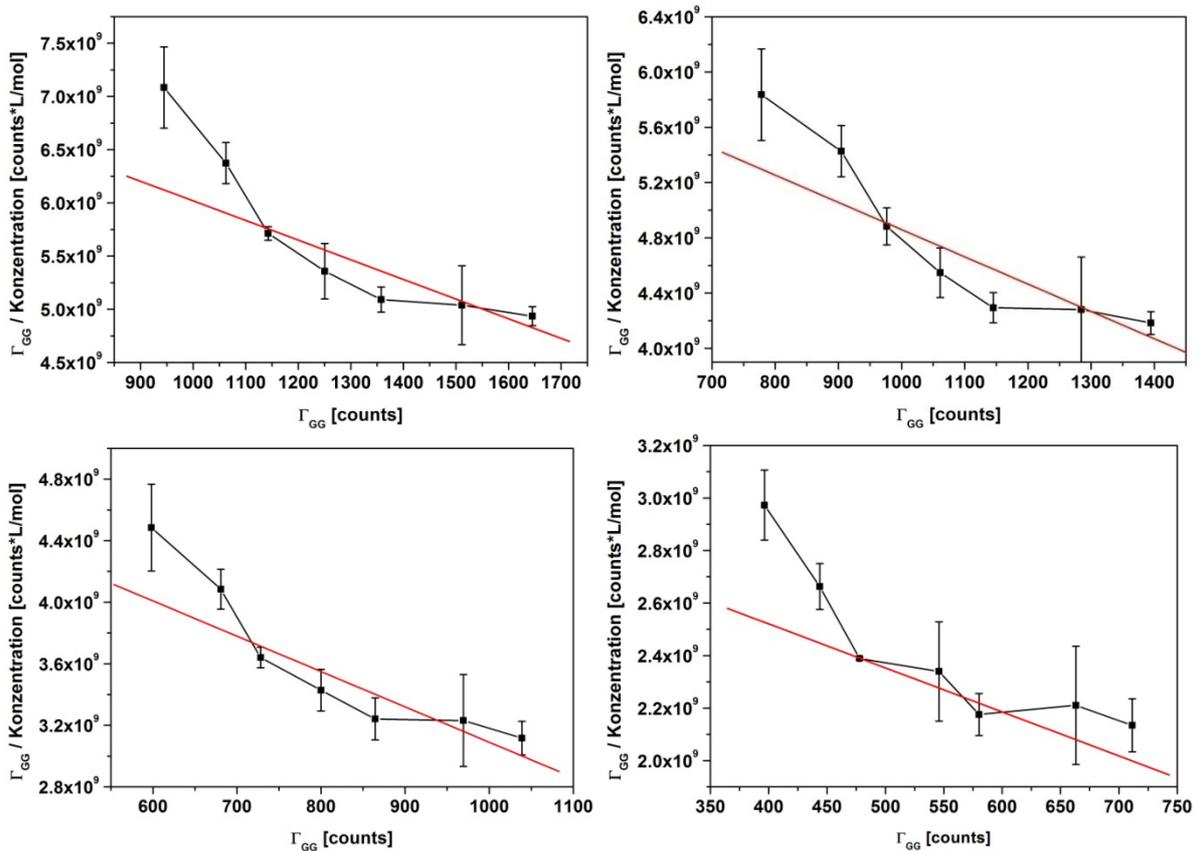


Abbildung 82: Scatchard Plots für die Wellenlängen 542 nm (links oben), 640 nm (rechts oben), 680 nm (links unten) und 703 nm (rechts unten) der Antigen-Antikörper Interaktion auf ZEONOR-Plastiksubstrat.

Die Scatchard Plots für zwei Wellenlängen von auf ZEONOR gemessenen Konzentrationsreihen sind in Abbildung 82 gezeigt. Die Messpunkte liegen im Vergleich mit den anderen Substraten nicht perfekt auf einer Geraden. Außerdem sind die Standardabweichungen für zwei Konzentrationen besonders hoch.

Die Affinitätskonstante, die sich aus den jeweiligen Scatchard Plots für die einzelnen Wellenlängen ergibt, ist in Tabelle 5 wiedergegeben:

ausgewertete Wellenlänge [nm]	aus dem Scatchard Plot erhaltene K_{aff} [M^{-1}]
542	$1,845 \cdot 10^7$
640	$1,973 \cdot 10^7$
680	$2,296 \cdot 10^7$
703	$1,675 \cdot 10^7$

Tabelle 5: Aus den jeweiligen Scatchard-Plots der ZEONOR-Messungen erhaltenen Affinitätskonstanten.

Auf Plastik-Substrat zeigt die Bestimmung der Affinitätskonstante eine große Abweichung innerhalb der Wellenlängen. Die Werte sind im Mittel etwas höher als der Referenzwert, der spektral auf Interferenzglas erhalten wurde.

4.2.6 VERGLEICH DER SIGNAL-ZU-RAUSCH VERHÄLTNISSE DER SCHICHTSYSTEME

Zum Vergleich der Signal-zu-Rausch (SNR) Verhältnisse bei der Anbindung von 50 µg/mL Antikörper an auf den unterschiedlichen Schichtsystemen immobilisierten Liganden wurde der Wert der Gleichgewichtsbeladung am Ende der Injektionsphase durch den Wert für das größte *peak-to-peak* Rauschen geteilt. Hierfür wurde exemplarisch bei den Wellenlängen 550 nm und 680 nm ausgewertet. Die für die jeweilige Wellenlänge erhaltenen SNR-Werte sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

	$\lambda = 550 \text{ nm}$			$\lambda = 680 \text{ nm}$		
	<i>Rauschen</i>	<i>Signal</i>	<i>SNR</i>	<i>Rauschen</i>	<i>Signal</i>	<i>SNR</i>
BK7	22	3037	138,0	32	1173	36,7
ZEO	30	1698	56,6	27	977	36,2
Int	23	4719	205,2	21	7037	335,1
Goe	77	20448	265,6	114	6475	56,8
Sch	68	26553	390,5	108	17678	163,7

Tabelle 6: Vergleich der Signal-zu-Rausch Verhältnisse der untersuchten Schichtsysteme für zwei verschiedene Wellenlängen.

Man erkennt deutlich, dass die unvergüteten Substrate ein deutlich schlechteres SNR zeigen als die Schichtsysteme mit hochbrechenden Schichten. Für die Wellenlänge 550 nm zeigt Schweizerglas das beste Signal-zu-Rausch Verhältnis und das größte Signal (höchste Anzahl an *counts*). Dies ist aufgrund des hohen Brechungsindex der TiO₂-Schicht zu erwarten. Bei der Wellenlänge 680 nm zeigt sich unerwartet das beste SNR für Interferenzglas.

Für die spektrale Auswertung bei der Anbindung von 50 µg/mL Antikörper an immobilisierte Liganden auf Interferenzglas zeigt das SNR mit einem Wert von 8888,3 ein um Größenordnungen besseres Verhältnis. Wichtig zu beachten ist hierbei, dass die mittels Rlf aufgenommenen Bindungskurven mit den Photodioden des Diodenzeilenspektrometers erhalten wurden. Diese zeigen aufgrund ihrer Eigenschaften als Teil der Diodenzeile ein höheres Rauschen als eine einzelnen Diode mit vorgeschaltetem Interferenzfilter (1- λ Aufbau, siehe Abbildung 32). Daher sollte sich mit dem nach [Frank 2005] vorgeschlagene Aufbau eine Verbesserung der SNR-Werte für die Rlf ergeben.

4.2.7 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER UNTERSUCHTEN SCHICHTSYSTEME

Fasst man die Ergebnisse der auf den verschiedenen Schichtsystemen gemessenen Affinitätskonstante des Testsystems zusammen, so erhält man Abbildung 83. Man erkennt, dass im Großen und Ganzen die Werte recht dicht beieinander liegen und somit die RIF auch quantitativ vergleichbar ist mit der RIFs. Vergleicht man die verschiedenen Schichtsysteme untereinander, so sieht man, dass das Testsystem auf unterschiedlichen Schichtsystemen leicht veränderte Affinitäten zeigt. Je nach Schichtsystem wird die Beschaffenheit der Oberflächenbeschichtung leicht unterschiedlich sein. Dies wirkt sich gering auf die biomolekulare Interaktion aus [Schweizer 2005].

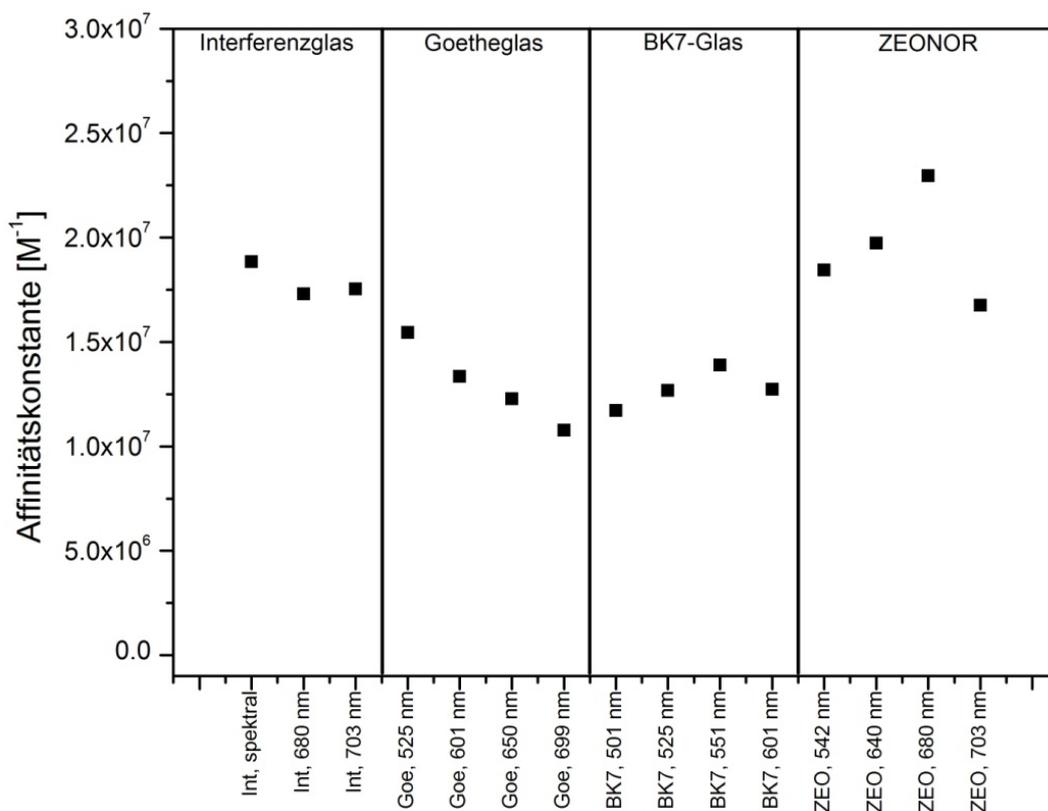


Abbildung 83: Übersicht über die auf den verschiedenen Substraten bei unterschiedlichen Wellenlängen ermittelte Affinitätskonstante.

Interferenzglas zeigt in der zusammenfassenden Abbildung zwar die besten Ergebnisse, ist jedoch bei der Wahl der zur Auswertung verwendbaren Wellenlängen sehr eingeschränkt. Goetheglas zeigt nach Interferenzglas die besten Scatchard-Plots. Zur Auswertung kann jede Wellenlänge oberhalb 525 nm herangezogen werden. BK7-Glas zeigt als unvergütetes Substrat trotz sehr geringer Reflektivitäten unerwartet gute Ergebnisse. Die Bindungskurven zeigen gute Signale und sind gut auswertbar. Messungen auf BK7-Glas sind im sichtbaren Bereich bei jeder Wellenlänge mit RIF auswertbar. Die Messungen auf Plastiksubstrat ZEONOR sind für unvergütetes Substrat ebenfalls gut,

die erhaltenen Werte zeigen aber im Vergleich zu BK7-Glas eine größere Abweichung untereinander. Messungen auf Schweißerglas ergaben aufgrund der Instabilität der Oberflächenmodifikation unglücklicherweise keine Ergebnisse bezüglich der Affinitätskonstante. Dieses Schichtsystem zeigt jedoch aufgrund der höchsten Reflektivitäten das geringste Rauschen in den Bindungskurven. Betrachtet man den Wellenlängenbereich, den man zur Auswertung heranziehen kann, so erkennt man, dass die unvergüteten Substrate im ganzen sichtbaren Bereich eine lineare Abhängigkeit der Reflektivität von der Schichtdickenänderung zeigen. Für die Gewährleistung der Linearität muss für Goetheglas eine Wellenlänge größer 525 nm gewählt werden, für Schweißerglas eine Wellenlänge größer 600 nm und für Interferenzglas eine Wellenlänge größer 680 nm.

4.2.7 WEITERE MÖGLICHKEITEN ZUR OPTIMIERUNG

Wie bereits erwähnt ist Schweißerglas mit einer 100 nm dicken Titandioxid-Schicht ein relativ schlecht gewähltes Schichtsystem. Abbildung 64 rechts zeigt, dass eine 50 nm dicke TiO_2 -Schicht eine im Vergleich zu Schweißerglas doppelt so hohe Reflektivität von ca. 30 % zeigt. Somit wäre es möglich mit diesem Schichtsystem das Rauschen noch weiter zu verringern.

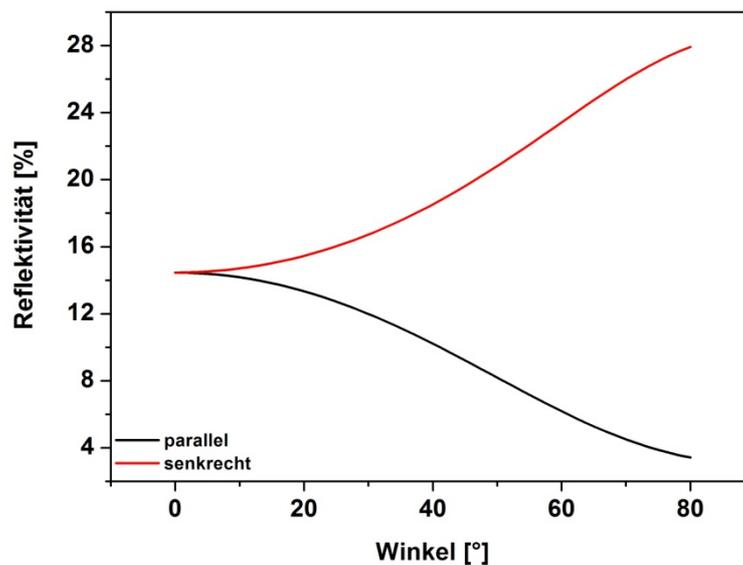


Abbildung 84: Reflektivitätsverlauf für den parallelen und senkrechten Anteil des Lichts bei der Wellenlänge 525 nm für Goetheglas mit einer 30 nm dicken AMD-Schicht.

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Optimierung der Schichtsysteme für die Rif ist die Messung unter unterschiedlichen Winkeln. Wie bereits bei [Frank 2005] diskutiert, zeigen die Schichtsysteme für verschiedene Winkel unterschiedliche, z. T. deutlich höhere Reflektivitäten (Abbildung 84). Zu beachten ist, dass sich bei schrägem Einfall nach Fresnel für senkrechten bzw. parallelen Anteil des Lichts unterschiedliche Reflektivitäten bzw. Intensitäten ergeben. Für Goetheglas lässt sich bei der

Wellenlänge 525 nm die Reflektivität für den senkrechten Anteil des Lichts von 15 % auf beinahe 30 % vergrößern. Ein Grenzfall wäre das Messen unter dem Winkel der Totalreflexion (Total Reflektometrische Interferenzspektroskopie) [Vollprecht 2004; Jäger 2005; Nötzold 2008].

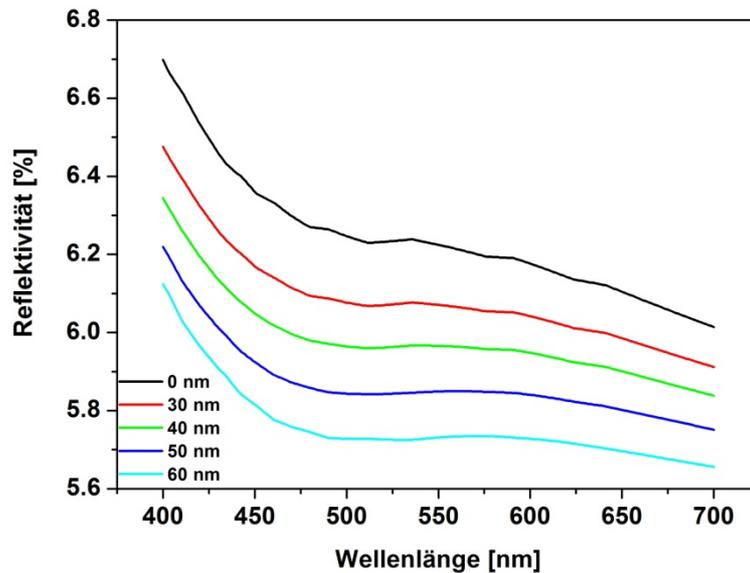


Abbildung 85: Simulierte Reflexionsspektren von Zirkoniumdioxid-Substrat mit 0 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm und 60 nm dicker sensitiver Schicht, überschichtet mit Wasser.

Eine weitere Möglichkeit das Signal-zu-Rausch Verhältnis über größere Reflektivitäten zu verbessern ist die Wahl eines transparenten Substrates mit hohem Brechungsindex. Hierfür könnte Zirkoniumdioxid zum Einsatz kommen. Dieses findet hauptsächlich Einsatz in der Dentologie aufgrund seiner besonderen Eigenschaften wie Biokompatibilität und mechanische Festigkeit [Katz 2007]. Abbildung 85 zeigt die simulierten Reflexionsspektren eines Zirkoniumdioxid-Substrats mit aufgetragener AMD-Schicht. Die Reflektivität bewegt sich im Bereich zwischen 5,7 % und 6,7 % für den sichtbaren Bereich des Lichts.

5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Themengebiete für die Optimierung des Signal-zu-Rausch (SNR) Verhältnisses für reflektometrische Biosensoren untersucht. Zum einen sollte der Einsatz von funktionalisierten Nanopartikeln für die Signalverstärkung in der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIFS) untersucht werden. Der Fokus der Untersuchungen lag insbesondere auf speziell entwickelten und funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln. Vor allem im Hinblick auf die Verwendung für eine schnelle und einfache Extraktion von Oligonukleotiden pathogener Keime sowie einer anschließenden Analyse dieser DNA-Fragmente auf dem RIFS-Mikroarray sollten diese Nanopartikel charakterisiert und die optimalen Eigenschaften bestimmt werden. Hierfür war es nötig, den Einfluss des RIFS-System als Ganzes auf die Nanopartikel zu untersuchen. Vorab musste geklärt werden, ob die verwendeten Nanopartikel an Teile des mikrofluidischen Systems unspezifisch binden und sich somit deren Konzentration im System verändert. Dafür war eine Quantifizierung der Nanopartikel notwendig, die über UV/VIS-Spektroskopie bewerkstelligt werden konnte. Desweiteren musste geklärt werden, ob die Partikel unspezifisch an die präparierten Oberflächenmodifikationen binden und somit die detektierten Signale verfälschen. Hierfür wurden diverse Oberflächenbeschichtungen untersucht. Die magnetischen Nanopartikel die aus einem Magnetit-Kern bestehen der von einer Dextranhülle umgeben ist, zeigten dabei die besten Ergebnisse. Aufgrund des umgebenden Biopolymers fand keine unspezifische Bindung dieser Nanobeads an die Sensoroberflächen statt, die Nanobeads zeigten sehr gute Biokompatibilität. Die untersuchten Gold- bzw. Silika-Nanopartikel hingegen wiesen keine Polymerhülle auf. Dies führte zu enormer unspezifischer Bindung. Gold-Nanopartikel zeigten in mäßig konzentrierter Lösung zusätzlich Probleme durch Streuung bei der Detektion im RIFS-System. Zur Charakterisierung der Signalverstärkung der Nanopartikel aufgrund ihrer Größe wurden verschiedene Systeme untersucht. Hierfür wurden zuerst Nanopartikel mit einem Durchmesser von 50 nm verwendet. Bei jedem der verwendeten Interaktionssysteme konnte eine Verstärkung der spezifischen Signale um einen Faktor von mindestens zehn gezeigt werden. Unter Verwendung von Nanopartikeln größer 70 nm zeigte sich eine Umkehr der Verschiebung des Interferenzspektrums. Diese Tatsache wurde bereits in früheren Arbeiten beobachtet. Mittels Simulation von Interferenzspektren konnte gezeigt werden, dass sich nach Überschreiten einer „kritischen“ physikalischen Schichtdicke das Interferenzspektrum nach kürzeren Wellenlängen verschiebt. Eine Korrelation von „positiven“ und „negativen“ Bindungskurven ist bisher nicht gelungen. Unterstützende Bild-Aufnahmen mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM) der verwendeten Sensoren konnten jedoch zeigen, dass tatsächlich Nanopartikel auf die funktionalisierten Sensoroberflächen hybridisiert sind. Die AFM-Bilder bestätigten ebenfalls die langsamere Diffusion größerer Nanopartikel an die Sensoroberflächen.

Weitere Untersuchungen von Nanopartikeln für die Reflektometrische Interferenzspektroskopie sollten sich auf mit Biopolymer funktionalisierten Partikeln fokussieren, da nur diese aufgrund sehr geringer unspezifischer Bindung überhaupt in direkt-optischen Messmethoden Einsatz finden können. Eine Vergleichbarkeit von „positiven“ mit „negativen“ Bindungssignalen solle mittels mathematischer Algorithmen näher untersucht und somit eine deutliche Verbesserung des Signalverstärkungsfaktors erzielt werden. Vor allem der Einsatz von biokompatiblen, funktionalisierten Quantenpunkten (QD) in einer Kombination aus direkt-optischer und auf Fluoreszenz basierender Detektion könnte synergistische Informationen der untersuchten biologischen Systeme liefern.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Optimierung und quantitativen Charakterisierung der bereits qualitativ untersuchten $1-\lambda$ Reflektometrie (Rif). Hierfür wurden unterschiedliche Schichtsysteme untersucht und miteinander verglichen. Anhand eines Testsystems (Antigen-Antikörper Wechselwirkung) wurde die bei der RifS angewendete spektrale Auswertung mit der Auswertung nur einer Wellenlänge bei der Rif verglichen. Hierfür wurde die Affinitätskonstante unter kinetisch kontrollierten und diffusions-limitierten Bedingungen auf dem in der RifS verwendeten Interferenzglas spektral bestimmt. Da die detektierten Signale bei der homogenen Reaktion sehr gering ausfallen, das Rauschen des Signals bei der Rif jedoch noch recht hoch ist, konnte eine Bestimmung dieser Affinitätskonstanten mittels Rif nur sehr ungenau erfolgen. Im Weiteren wurde nur der unter kinetisch kontrollierten Messbedingungen ermittelte Wert berücksichtigt. Dieser Wert wurde mit den bei einer Wellenlänge ermittelten Werten für verschiedene Schichtsysteme verglichen. Dabei zeigte sich, dass Interferenzglas zwar für die Reflektometrische Interferenzspektroskopie sehr gut geeignet ist, für die Rif jedoch nur in eingeschränktem Maße. Goetheglas hingegen fand bisher keine Anwendung in der RifS-Biosensorik, da eine spektrale Auswertung mit diesem Schichtsystem für die verwendeten, dünnen sensitiven Schichten nicht möglich ist. Für die Rif hingegen zeigte Goetheglas besonders gute Eigenschaften. Die hohe Reflektivität der dickeren Tantalpentoxid-Schicht zeigte eine Verbesserung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses im Vergleich zum Interferenzglas. Eine weitere Verbesserung des SNR durch Verwendung von Schweizerglas konnte aufgrund der Instabilität der sensitiven Schicht auf diesem Schichtsystem nur theoretisch diskutiert werden. Desweiteren wurden zwei weitere völlig unvergütete Substrate in die Untersuchung miteinbezogen, v. a. unter dem Gesichtspunkt diese als sog. „disposables“ zu verwenden. Standardmäßig verwendetes Objektträgerglas (BK7-Glas) und ein transparentes Cycloolefin-Polymer (ZEONOR) zeigten bei der Untersuchung des Testsystems und der Ermittlung der Affinitätskonstante ebenfalls sehr gute Verwendbarkeit. Die Ursache der Streuung der Werte für die Affinitätskonstante auf ZEONOR kann eine im Vergleich zu BK7-Glas inhomogenere Oberfläche bzw. Oberflächenbeschichtung sein. Im Gesamten betrachtet entspricht der bei einer

Wellenlänge ermittelte Wert der Affinitätskonstanten sehr gut dem mittels spektraler Auswertung erhaltenen Wert.

Weitere Möglichkeiten zur Optimierung der $1-\lambda$ Reflektometrie (Rif) wurden bereits im Ergebnisteil theoretisch diskutiert. Vor allem die Winkelabhängigkeit der mit Rif erhaltenen Signale sollte näher untersucht und ein optimaler apparativer Aufbau konstruiert werden. Darüber hinaus sollten das SNR für weitere Wellenlängen mit gegebener Linearität von Schichtdicke und Reflektivitätsänderung untersucht und evaluiert werden. Weitere funktionalisierbare und transparente Ein-Schicht-Substrate (wie Zirkoniumdioxid) mit großem Brechungsindex sollten für die Rif ausführlich theoretisch und experimentell untersucht werden, da auf diesem Wege eine weitere Vereinfachung des Systems und eine weitere Verringerung des Rauschens erreicht werden kann.

LITERATURVERZEICHNIS

- [Alberts 1990] Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D., Molekularbiologie der Zelle, zweite Auflage, VCH, Weinheim 1990.
- [Albrecht 2007] Albrecht C., Entwicklung von TIRF-basierten Immunosensoren für die klinische Diagnostik, Diplomarbeit, Tübingen, 2007.
- [Anderson 2006] Anderson G. P., Moreira S. C., Charles P. T., Medintz I. L., Goldman E. R., Zeinali M., Taitt C. R., Detection Using Multiplexed Liquid Array Displacement Immunoassays, *Analytical Chemistry* 78, 2006, 7, 2279-2285.
- [Bassil 2003] Bassil N., Maillarta E., Canva M., Lévy Y., Millot M.-C., Pissard S., Narwa R., Goossens M., One hundred spots parallel monitoring of DNA interactions by SPR imaging of polymer-functionalized surfaces applied to the detection of cystic fibrosis mutations, *Sensors and Actuators B: Chemical* 94, 2003, 3, 313-323.
- [Berry 2003] Berry C. C., Curtis A. S. G., Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine (Invited Topical Review), *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36, 2003, R198-R206.
- [Biospektrum 2007] Methoden & Anwendungen, Marktübersicht, Lab-on-Chip-Systeme/Mikroarrays, *Biospektrum* 7, 2007, 764-773.
- [Birkert 2001] Birkert O., Markierungsfreies Hochdurchsatzscreening mittels reflektometrischer Interferenzspektroskopie, Dissertation, Tübingen, 2001.
- [Birkert 2002] Birkert O., Gauglitz G., Development of an assay for label-free high-throughput screening of thrombin inhibitors by use of reflectometric interference spectroscopy, *Anal Bioanal Chem* 372, 2002, 141-147.
- [Bogush 1988] Bogush G. H., Zukoski C. F., in "Ultrastructure Processing of Advanced Ceramics", Mackenzie J. D., Ulrich D. R., 1988, Wiley, New York.
- [Brecht 1993] Brecht A., Interferenzspektroskopische Untersuchung von Affinitätsreaktionen, Dissertation, Tübingen, 1993.
- [Bücker 2007] Bücker P., Integration von Rezeptoren in inerte Matrices zur markierungsfreien und quantitativen Detektion biospezifischer Wechselwirkungen mit LSPR-aktiven Nanopartikeloberflächen, Dissertation, Heidelberg, 2007.
- [Burns 2006] Burns A., Ow H., Wiesner U., Fluorescent core-shell silica nanoparticles: towards "Lab on a Particle" architectures for nanobiotechnology, *Chemical Society Reviews* 35, 2006, 1028-1042.
- [Buske 1984] Buske N., Sonntag H., Götze T., Magnetic Fluids - Their preparation, stabilization, and applications in colloid science, *Colloids and Surfaces* 12, 1984, 195-202.
- [Chien 2004] Chien F.-C., Liu J.-S., Su H.-J., Kao L.-A., Chiou C.-F., Chen W.-Y., Chen S.-J., An investigation into the influence of secondary structures on DNA hybridization using surface plasmon resonance biosensing, *Chemical Physics Letters* 397, 2004, 4-6, 429-434.

-
- [Dubois 1992] Dubois L. H., Nuzzo R. G., Synthesis, Structure, and Properties of Model Organic Surfaces, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 43, 1992, 437-463.
- [Englebienne 2003] Englebienne P., van Hoonacker A., Verhas M., Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences, *Spectrosc. Int. J.* 17, 2003, 255-259.
- [Esquena 1997] Esquena J., Tadros T. F., Kostarelos K., Solans C., Preparation of narrow size distribution silica particles using microemulsions, *Langmuir* 13, 1997, 6400-6406.
- [Fersht 1987] Fersht A. R., The hydrogen bond in molecular recognition, *Trends Biochem. Sci.* 12, 1987, 301-304.
- [Frank 2005] Frank R., Reflektometrische und integriert optische Sensoren für die Bioanalytik, Dissertation, Tübingen, 2005.
- [Galfre 1977] Galfre G., Howe S. C., Milstein C., Butcher G. W., Howard J. C., Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines, *Nature* 266, 1977, 550-552.
- [Goia 1999] Goia D. V., Matijevic E., Tailoring the particle size of monodispersed colloidal gold, *Colloids Surf. A*, 146, 1999, 1-3, 139-152.
- [Green 1925] Green F., The Colloidal Gold Reaction of the Cerebrospinal Fluid, *Medizin Fritz-Dieter Söhn*, Berlin, 1925.
- [Haes 2003] Haes A. J., van Duyne R. P., Nanoscale optical biosensors based on localized surface plasmon resonance spectroscopy, *Proc. of SPIE Vol.* 5221, 2003, 47-58.
- [Haes 2004a] Haes A. J., van Duyne R. P., A unified view of propagating and localized surface plasmon resonance biosensors, *Anal. Bioanal. Chem.* 379, 2004, 920-930.
- [Haes 2004b] Haes A. J., van Duyne R. P., Preliminary studies and potential applications of localized surface plasmon resonance spectroscopy in medical diagnostics, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 4, 2004, 4, 527-537.
- [He 2000] He L., Musick M. D., Nicewarner S. R., Salinas F. G., Benkovic S. J., Natan M. J., Keating C. D., Colloidal Au-Enhanced Surface Plasmon Resonance for Ultrasensitive Detection of DNA Hybridization, *J. Am. Chem. Soc.* 122, 2000, 9071-9077.
- [Hehl 1998] Hehl K., Untersuchung dünner polymerer Filme und deren Wechselwirkung mit Analyten mit spektraler Ellipsometrie, Dissertation, Tübingen, 1998.
- [Heyen 2003] Heyen U., Schüler D., Growth and magnetosome formation by microaerophilic *Magnetospirillum* strains in an oxygen-controlled fermentor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 2003, 536-544.
- [Homola 2004] Homola J., Surface plasmon resonance biosensors for multianalyte detection, *Chemical Sensors* 20, 2004, Suppl. B, 200-201.
- [Hyeon 2003] Hyeon T., Chemical synthesis of magnetic nanoparticles, *Chem. Commun.* 8, 2003, 927-934.
- [Ingebretsen 1983] Ingebretsen B. J., Matijevic E., Hodgson A. W., Aiken A. F., Preparation of uniform colloidal dispersions by chemical reactions in aerosols : III. Mixed
-

-
- titania/alumina colloidal spheres, *J. Colloid Interface Sci.* 95, 1983, 1, 228-239.
- [Jäger 2005] Jäger S., Charakterisierung von Oberflächen und Polymerschichten sowie deren sensorische Anwendung in der Reflektometrischen und Totalreflektometrischen Interferenzspektroskopie, Diplomarbeit, Tübingen, 2005.
- [Jung 2003] Jung A., Parallele, markierungsfreie Detektion biomolekularer Wechselwirkungen an Mikroarrays, Dissertation, Tübingen, 2003.
- [Käppel 2007] Käppel N. D., Immunoassay-Optimierung für verschiedene Probenmatrices, Dissertation, Tübingen, 2007.
- [Katz 2007] Katz F., Literaturübersicht über Zirkoniumdioxid in der Zahnmedizin und Bruchbelastbarkeit am Beispiel von Slot-Inlay Brückengerüsten, Dissertation, Freiburg, 2007.
- [Khalafalla 1980] Khalafalla S. E., Reimers G. W., Preparation of dilution-stable aqueous magnetic fluids, *IEE Transactions on Magnetics* 16, 1980, 2, 178-183.
- [Köhler 1975] Köhler K. G., Milstein C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* 256, 1975, 495-497.
- [Koolman 1998] Koolman J., Röhm K.-H., Taschenatlas der Biochemie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1998.
- [Kraus 1993] Kraus G., Reflektometrisch-interferometrische Bestimmung organischer Verbindungen, Dissertation, Tübingen, 1993.
- [Kröger 2002] Kröger K., Bauer J., Fleckenstein B., Rademann J., Jung G., Gauglitz G., Epitope-mapping of transglutaminase with parallel label-free optical detection, *Biosensors and Bioelectronics* 17, 2002, 11-12, 937-944.
- [Leder 1995] Leder L., Berger C., Bornhauser S., Wendt H., Ackermann F., Jelesarov I., Bossard H. R., Spectroscopic, calorimetric and kinetic demonstration of conformational adaption in peptide-antibody recognition, *Biochemistry* 34, 1995, 16509-16518.
- [Liedberg 1991] Liedberg B., Lundstrom I., Stenberg E., Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance, *Sens. Actuators B: Chemical* 11, 1993, 1, 63-72.
- [Lipsky 2001] Lipsky R. H., Mazzanti C. M., Rudolph J. G., Xu K., Vyas G., Bozak D., Radel M. Q., Goldman D., DNA Melting Analysis for Detection of Single Nucleotide Polymorphisms, *Clinical Chemistry* 47, 2001, 635-644.
- [Lukosz 1991] Lukosz W., Principles and sensitivities of integrated optical and surface plasmon sensors for direct affinity sensing and immunosensing, *Biosens. Bioelectron.* 6, 1991, 3, 215-225.
- [Lukosz 1997] Lukosz W., Integrated-optical and surface-plasmon sensors for direct affinity sensing. Part II: Anisotropy of adsorbed or bound protein adlayers, *Biosens. Bioelectron.* 12, 1997, 3, 175-184.
- [Maclagan 1944] Maclagan N. F., The serum colloidal gold reaction as a liver function test, *Br. J. Exp. Pathol.* 25, 1944, 15-20.
-

-
- [Melby 1967] Melby L. R., Strohbach D. R., Oligonucleotide Syntheses on Insoluble Polymer Supports. I. Stepwise Synthesis of Trthymidin Diphosphate, *J. Am. Soc.* 89, 1967, 450-453.
- [Melby 1969] Melby L. R., Strohbach D. R., Oligonucleotide Syntheses on Insoluble Polymer Supports. II. Pentathymidine Tetraphosphate, *J. Org. Chem.* 34, 1969, 421-427.
- [Möhrle 2005] Möhrle B., Kumpf M., Gauglitz G., Determination of affinity constants of Locked Nucleic Acid (LNA) and DNA duplex formation using label-free sensor technology, *Analyst* 130, 2005 1634-1638.
- [Mutschler 2004] Mutschler T., Charakterisierung bio- und chemosensitiver Schichten mit Ellipsometrie und AFM, Dissertation, Tübingen, 2004.
- [Nagl 2005] Nagl S., Schäferling M., Wolfbeis O. S., Fluorescence Analysis in Microarray Technology, *Microchimica Acta* 151, 2005, 1-2, 1-21.
- [Nötzold 2008] Nötzold K., Jäger S., Michel S., Reichelt S., Eichhorn K.-J., Gauglitz G., Grundke K., ADSA-TRIS: a new method to study interfacial phenomena at polymer-aqueous solution interfaces, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 10.1007/s00216-007-1816-8
- [Paddephatt 1992] Paddephatt R. J., *The Chemistry of Gold*, Amsterdam, Elsevier, 1978.
- [Piehler, 1997] Piehler, J., Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern, Dissertation, Tübingen, 1997.
- [Pratsinis, 1998] Pratsinis S. E., Flame Aerosol Synthesis of Ceramic Powders, *Prog. Energy. Combust. Sci.* 24, 1998, 197-219.
- [Pröll 2004] Pröll F., Charakterisierung von Oligonukleotid-Hybridisierung mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie, Diplomarbeit, Tübingen, 2004.
- [Pröll 2005] Pröll F., Möhrle B., Kumpf M., Gauglitz G., Label-free characterisation of oligonucleotide hybridisation using reflectometric interference spectroscopy, *Anal Bioanal Chem* 2, 2005, 382, 1889-1894.
- [Rella 2004] Rella R., Spadavecchia J., Manera M. G., Siciliano P., Santino A., Mita G., Liquid phase SPR imaging experiments for biosensors applications, *Biosensors Bioelectronics* 20, 2004, 1140-1148.
- [Rowe-Taitt 2000] Rowe-Taitt C. A., Hazzard J. W., Hoffman K. E., Cras J. J., Golden J. P., Ligler F. S., Simultaneous detection of six biohazardous agents using a planar waveguide array biosensor, *Biosensors and Bioelectronics* 15, 2000, 579-589.
- [Saiki 1985] Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N., Enzymatic Amplification of B-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia, *Science* 230, 1985, 1350-1354.
- [Sapsford 2001] Sapsford K. E., Liron Z., Shubin Y. S., Ligler F. S., Kinetics of Antigen Binding to Arrays of Antibodies in Different Sized Spots, *Analytical Chemistry* 73, 2001, 22, 5518-5524.
- [Sauer 1999] Sauer M., Brecht A., Charisse K., Stemmler I., Gauglitz G., Bayer E., Interaction of chemically modified antisense oligonucleotides with sense
-

-
- DNA: a label free interaction study, *Anal Chem* 71, 1999, 2850-2857.
- [Scatchard 1949] Scatchard G., The attractions of proteins for small molecules and ions, *Annals of the New York Academy Sciences* 51, 1949, 660-672.
- [Schweizer 2005] Schweizer N., Charakterisierung von Titandioxid- und Nickeloxid-Oberflächen mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie, Diplomarbeit, Tübingen, 2005.
- [Shan 2007] Shan J., Tenhu H., Recent advances in polymer protected gold nanoparticles: synthesis, properties and applications, *Chem. Commun.* 44, 2007, 4580-4598.
- [Shen 1999] Shen L., Laibinis P. E., Hatton T. A., Bilayer surfactant stabilized magnetic fluids: synthesis and interactions, *Langmuir* 15, 1999, 15, 447-453.
- [Shumaker-Parry 2004] Shumaker-Parry J. S., Aebersold R., Campbell C. T., Parallel, quantitative measurement of protein binding to a 120-element doublestranded DNA array in real time using surface plasmon resonance microscopy, *Anal. Chem.* 76, 2004, 2071-2082.
- [Song 2002] Song F., Zhou F., Wang J., Tao N., Lin J., Vellanoweth R. L., Morquecho Y., Wheeler-Laidman J., Detection of oligonucleotide hybridization at femtomolar level and sequence-specific gene analysis of the *Arabidopsis thaliana* leaf extract with an ultrasensitive surface plasmon resonance spectrometer, *Nucleic Acids Research* 30, 2002, 14, e72/1-e72/11.
- [Stemmler 1999] Stemmler I., Miniaturisierte Affinitätsanalytik - Ortsaufgelöste Oberflächenmodifikation, Assays und Detektion, Dissertation, Tübingen, 1999.
- [Stöber, 1968] Stöber W., Fink A., Bohn E. J., Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range, *Colloid Interface Sci.* 26, 1968, 62-69.
- [Sun 2002] Sun S., Zeng H., Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 124, 2002, 28, 8204-8205.
- [Tschmelak 2006] Tschmelak J., Kumpf M., Käppel N., Proll G., Gauglitz G., 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, 2006, 2, 343-350.
- [van Helden 1981] van Helden A. K., Jansen J.W., Vrij, A. J., Preparation and characterization of spherical monodisperse silica dispersions in nonaqueous solvents, *J. Colloid Interface Sci.* 81, 1981, 354-368.
- [Vollprecht 2004] Vollprecht M., Grundke K., Gauglitz G., Eichhorn K.-J., Michel S., Pöschl K., Busche S., Vorrichtung und Verfahren zur Untersuchung von Sptionsvorgängen an Fest-Flüssiggrenzflächen eines Probensystems, Patentanmeldung DE1020040389578, Deutsches Patent- und Markenamt, München, 2004.
- [Wang 2006] Wang L., Tan W., Multicolor FRET silica nanoparticles by single wavelength excitation, *Nano Lett.* 6, 2006, 1, 84-88.
- [Wegner 2004a] Wegner M. L., Aufbau und Charakterisierung eines miniaturisierten parallelen optischen Detektionssystems zur Untersuchung von
-

- Oligonukleotiden, Dissertation, Tübingen, 2004.
- [Wegner 2004b] Wegner G. J., Wark A. W., Lee H. J., Codner E., Saeki T., Fang S., Corn R. M., Real-Time Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements for the Multiplexed Determination of Protein Adsorption/Desorption Kinetics and Surface Enzymatic Reactions on Peptide Microarrays, *Anal. Chem.* 76, 2004, 5677-5684.
- [Wescott 1994] Wescott C. R., Klibanov A. M., The solvent dependence of enzyme specificity, *Biochim. Biophys. Acta* 1206, 1994, 1-9.
- [Winter 1991] Winter G., Milstein C., Man-made antibodies, *Nature*, 349, 1991, 293-299.

ANHANG

AKADEMISCHE LEHRER

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, D. Christen, G. Drews, M. Düfer, H. Eckstein, H.-J. Egelhaaf, G. Gauglitz, F. Gönnerwein, M. Hanack, T. Hehl, D. Hoffmann, V. Hoffmann, G. Häfelinger, G. Jung, W. Jäger, D. Krug, N. Kuhn, E. Lindner, G. Mack, M. E. Maier, H. A. Mayer, H.-J. Meyer, U. Nagel, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pommer, G. Reinhard, A. Rieker, P. Ruth, M. Sausbier, V. Schurig, M. Schwarz, E. Schweda, J. Strähle, W. Voelter, G. J. Wagner, U. Weimar, K.-P. Zeller, T. Ziegler.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten	
Name	Goran Markovic
Adresse	Neckarhalde 46 D - 72070 Tübingen
Geburtsdatum und -ort	09.03.1979, Hechingen
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig
Ausbildung	
Grundschule 1985 - 1989	Grundschule Hechingen
Weiterführende Schule 1989 - 1998	Allgemeinbildendes Gymnasium, Hechingen
1998	Abitur
Hochschule 10/1998 - 10/2000	Grundstudium (Chemie) an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
10/2000	Vordiplom
11/2000 - 10/2003	Hauptstudium (Chemie) an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen Wahlpflichtfach: Pharmakologie und Toxikologie
11/2003 - 05/2004	Diplomarbeit in Chemie unter Anleitung von Prof. Dr. Günter Gauglitz, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie (IPTC), Eberhard-Karls-Universität Tübingen Titel: Optimierung und Charakterisierung von Carboxymethyldextran Oberflächen für optische Biosensoren
05/2004	Diplom
seit 06/2004	Doktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Günter Gauglitz, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie (IPTC), Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Publikationen	
2006	G. Markovic, T. Mutschler, K. Wöllner, G. Gauglitz, Application of surface acoustic waves for optimization of biocompatibility of carboxymethylated dextran surfaces, Surf Coat Technol 201(3-4), 2006, 1282-1288.
2007	G. Proll, G. Markovic, L. Steinle, G. Gauglitz, Reflectometric Interference Spectroscopy, in "Methods in Molecular Biology", <i>accepted</i>
2008	J. Mehne, G. Markovic, F. Pröll, 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, Anal Bioanal Chem, DOI 10.1007/s00216-008-2066-0

Präsentationen und Weiterbildungen	
2001	26. Baden-Württemberg Kolloquium: „Computergestützte Chirurgie in der Unfallchirurgie und Orthopädie“, Ulm, Deutschland, 24.-28. September 2001.
2004	G. Markovic, G. Gauglitz: Optimization and characterization of carboxymethylated dextran surfaces for optical biosensors, „The 2004 Younger European Chemists' Conference“, Turin, Italien, 25.-29. August 2004 (Poster).
2005	G. Markovic, G. Gauglitz: Optimierung und Charakterisierung von Carboxymethyl-dextranoberflächen für optische Biosensoren, „4. Deutsches BioSensor Symposium“, Regensburg, Deutschland, 13.-16. März 2005 (Poster). G. Markovic, G. Gauglitz: Einsatz von magnetischen Nanopartikeln in der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie, BASF, Ludwigshafen, Deutschland, 10. Juni 2005 (Vortrag).
2006	Biacore Seminar: Protein-Immobilisierung für erfolgreiche Bindungsstudien, München, Deutschland, 17. Oktober 2005. G. Markovic, T. Mutschler, K. Wöllner, G. Gauglitz: Application of surface acoustic waves for optimization of biocompatibility of carboxymethyl dextran surfaces for biosensors, „94th Bunsenkolloquium: Controlling protein adsorption at materials surfaces“, Bayreuth, Deutschland, 06.-07. März 2006 (Vortrag). G. Markovic, T. Mutschler, K. Wöllner, G. Gauglitz: Application of surface acoustic waves for optimization of biocompatibility of carboxymethyl dextran surfaces for biosensors, „EUROPT(R)ODE VIII“, Tübingen, Deutschland, 02.-05. April 2006 (Poster). G. Markovic, T. Mutschler, K. Wöllner, G. Gauglitz: Application of surface acoustic waves for optimization of biocompatibility of carboxymethylated dextran surfaces, „Analytica Conference 2006“, München, Deutschland, 25.-27. April 2006 (Poster). Präsentation der Universität Tübingen, IPTC, auf der „SENSOR+TEST 2006“, Nürnberg, Deutschland, 30. Mai -01. Juni 2006. CARE-MAN Workshop - Summer School on „Fluorescence and Biomolecules“, Tübingen, Deutschland, 24.-27. September 2006. Woollam-Ellipsometrie-Seminar, L.O.T.-Oriol GmbH & Co. KG, Darmstadt, Deutschland, 25. Oktober 2006.
2007	Satellite Workshop: Nanotechnology for gene analysis, „EuroNanoForum 2007 - Nanotechnology in Industrial Applications“, Düsseldorf, Deutschland, 19. Juni 2007. Satellite Workshop: Health Care by Biosensor Measurements and Networking (CARE-MAN), „EuroNanoForum 2007 - Nanotechnology in Industrial Applications“, Düsseldorf, Deutschland, 19. Juni 2007. CARE-MAN Workshop: Biochips in theory & practice, Austrian Research Centers, Seibersdorf, Österreich, 21.-22. Juni 2007. GDCh-Sommerschule: Qualitätssicherung analytischer Daten, Berlin, Deutschland, 27.-31. August 2007. G. Markovic, M. Ehni, N. Schweizer, K. Wöllner, G. Gauglitz: Polyelektrolyt Multischichten für die optische Biosensorik, „8. Dresdner Sensor-Symposium“, Dresden, Deutschland, 10.-12.

Dezember 2007 (Poster).

G. Markovic, et al.: GenSensor Nanoparts - nano-biotechnische Komponenten eines bioanalytischen Mikroarray-Systems, „8. Dresdner Sensor-Symposium“, Dresden, Deutschland, 10.-12. Dezember 2007 (Poster).

Biacore Symposium 2007 - at the GE Research center, Garching/München, Deutschland, 29.-30.11. 2007.