

**Entwicklung eines bildgebenden
Oberflächenplasmonenresonanzverfahrens
mit zwei Laserwellenlängen zum
Einsatz in der Bioanalytik**

Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Naturwissenschaften
des Fachbereiches Physik
der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von
Daniel Boecker

November 2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
2	Theorie	9
2.1	Volumenplasmonen in Metallen	9
2.2	Oberflächenplasmonen an Grenzflächen	10
2.3	Verlauf der Dispersionsrelation	12
2.4	Oberflächenplasmonen als Biosensor	16
2.5	Bindungskinetik auf einem Biosensor	19
3	Experimenteller Aufbau	23
3.1	SPR-Imaging Aufbau mit doppelter Wellenlängentechnik	24
3.1.1	Auswahl der Lichtquellen	26
3.1.2	Zusammenbau der Kretschmann-Anordnung	27
3.1.3	Übersicht über die verwendeten Flusszellen	28
3.1.4	Charakterisierung der temperierbaren Flusszelle	29
3.1.5	Funktionsweise der modifizierten CCD-Kamera	30
3.1.6	Triggerung der Laserdioden	32
3.1.7	Software	34
3.1.8	Fluidikdesign	35
3.2	Normierung der Empfindlichkeit	36
3.3	Herstellung der Polydimethylsiloxan Dichtungen	36
4	Analyse der einschränkenden Faktoren	39
4.1	Laterale Auflösung der optischen Abbildung	39
4.2	Begrenzung der Empfindlichkeit	45
4.2.1	Stabilisierung der Lichtintensität	45
4.2.2	Einfluss der Wellenlängenstabilität	49
4.2.3	Test unterschiedlicher Ansätze zur Stabilisierung der Wellenlänge	51
4.2.4	Einfluss des Schrotrauschens der CCD-Kamera	54
4.3	Verbesserung der Empfindlichkeit durch Referenzierung	55
4.3.1	Rauschunterdrückung durch verteilte Referenzflächen	56
4.3.2	Anwendung der Distributed Reference	59
5	Experimentelle Ergebnisse	63
5.1	Test der maximalen Empfindlichkeit anhand von Biotin-Bindungen	63
5.1.1	Präparation einer Biotin-Streptavidin-Schicht auf Gold	63

5.1.2	Identifikation des besten Mischungsverhältnisses	66
5.1.3	Messung der Biotinbindung an Streptavidin	67
5.1.4	Empfindlichkeitssteigerung durch Erhöhung des Splittingfaktors	72
5.2	Identifikation einer einzelnen Nukleotid-Polymorphismus Mutation .	75
5.2.1	Theorie der DNA-Schmelzkurven	76
5.2.2	Immobilisation von Oligonukleotiden auf Gold	77
5.2.3	Verbesserung der SNP Identifizierung	79
5.2.4	Präparation eines DNA Microarrays	82
5.2.5	Untersuchung der Einsetzbarkeit für High-Throughput-Messungen	84
5.3	Optimierung des Einfallwinkels	88
5.3.1	Theoretische Betrachtung	90
5.3.2	Demonstration der Empfindlichkeitssteigerung	90
5.3.3	Linearer Messbereich	92
6	Zusammenfassung	95

1 Einleitung

In den letzten zehn Jahren verzeichnete der Bereich der Biotechnologie einen rasanten Aufschwung. Mit dem Aufkommen der Bioinformatik konnten die riesigen, dort anfallenden Datenmengen verarbeitet und analysiert werden. Parallel dazu wurden neue Techniken entwickelt. Der enorme Fortschritt in diesem Bereich eröffnet neue Horizonte für vielfältige Anwendungen. Die Biotechnologie gilt daher nicht umsonst als eine der Schlüsseltechnologien für das 21. Jahrhundert.

Ein Meilenstein der Biotechnologie war die Entschlüsselung der menschlichen DNA im Jahr 2004 [1]. Dies war das Ergebnis einer jahrelangen, weltweiten Kooperation von tausenden Wissenschaftlern. Doch die Entschlüsselung war nur der erste Schritt. In einem zweiten Schritt muss jetzt das Verständnis gewonnen werden, wie über die DNA das komplexe Zusammenspiel von Proteinen in einer Zelle funktioniert.

Bis heute sind bereits etwa 1500 Stellen in der menschlichen DNA identifiziert worden, die verdächtig werden, durch Mutationen Auslöser für Erbkrankheiten zu sein. Eine der großen Aufgaben der genetischen Forschung ist es jetzt, ein Verständnis für die krankheitsauslösenden Mechanismen zu entwickeln.

Dazu ist es nötig in sehr vielen Experimenten unterschiedliche, menschliche DNA auf ihre Mutationen zu überprüfen. Zu diesem Zweck werden auf Glasplättchen tausende Oligonukleotide immobilisiert. Dies sind kurze, einzelsträngige DNA-Abschnitte. An diese Oligonukleotide kann die aufbereitete DNA eines Menschen hybridisiert werden. Durch die Auswertung der Bindungssignale kann die DNA auf Mutationen untersucht werden. Das Auslesen eines solchen Arrays geschieht über eine Laserfluoreszenztechnik, indem die doppelsträngige DNA nach der Hybridisierung mit einem Fluorophor markiert wird. Ein solches Experiment wird auch als *High-Throughput*-Anwendung bezeichnet, da für eine Probe gleichzeitig viele unterschiedliche Parameter getestet werden.

Solche *High-Throughput*-Anwendungen gibt es auch in anderen Bereichen der biologischen Forschung. Bei der Entwicklung von Medikamenten und Experimenten zum Verständnis von Protein-Protein-Wechselwirkungen ist man an der Reaktion eines Antigens auf viele unterschiedliche Antikörper interessiert. Zur Detektion wird hierbei meist ein sekundärer, mit einem Farbstoff markierter Antikörper verwendet. Dies ist ein Nachteil dieser Methode, denn sie versagt, wenn der immobilisierte Antikörper an die gleiche Stelle des Antigens bindet wie der sekundäre Antikörper. Auch macht sie die Analyse teuer und aufwändig, da mehrere Bindungsreaktionen nötig sind und jedes Array nur einmalig verwendet werden kann. Eine Detektionstechnik, die daher

direkt die Bindung eines Antigens an einen immobilisierten Antikörper detektieren kann, wäre von großem Vorteil.

Es existieren einige Verfahren, die eine Bindungsreaktion direkt nachweisen können. Elektrochemische Verfahren nutzen dazu eine Veränderung des Oberflächenwiderstands. Quarzmikrowaagen und Kantilever reagieren auf eine Massenzunahme durch gebundene Biomoleküle. Diese Techniken werden jedoch nur für die Beobachtung einzelner Bindungsreaktionen eingesetzt werden. Zur Detektion in einem *High-Throughput*-Experiment sind sie kaum geeignet, da dies sehr schwer zu realisieren wäre.

Eine ebenfalls weit verbreitete, optische Detektionstechnik ist die so genannte Oberflächenplasmonenresonanz (SPR, *Surface Plasmon Resonance*). Sie basiert auf der Anregung von Oberflächenplasmonen in einem dünnen Goldfilm. Binden auf dem Goldfilm weitere Biomoleküle, ändern sich die Resonanzbedingungen durch eine Veränderung des Brechungsindizes an der Goldoberfläche. Dieser Effekt wird zur Detektion der Bindungsreaktion ausgenutzt. Mit ihr kann im Gegensatz zu den meisten Fluoreszenz-techniken auch die Kinetik einer Bindungsreaktion bestimmt werden.

Die Empfindlichkeit wird üblicherweise über die Stabilität der Basislinie definiert. Diese wird in RIU (*Refractive Index Units*) angegeben und bezieht sich auf Volumenbrechungsindexänderungen. RIU ist eine künstliche Einheit, wird aber zur Beschreibung von SPR Experimenten allgemein verwendet. Die besten kommerziellen Geräte besitzen eine Empfindlichkeit von 3×10^{-7} RIU. Allerdings eignen sich diese Geräte nicht für den Einsatz in *High-Throughput*-Anwendungen, da sie lediglich einige wenige Reaktion simultan beobachten können.

In der jüngsten Vergangenheit finden sich bereits einige experimentelle Arbeiten, die ein bildgebendes und damit zum Auslesen von Immunoassays geeignetes SPR Verfahren zeigen. Eine solche alternative Technik ist von großem Interesse für die biologische Forschung. Dazu wird ein Goldchip mit einer monochromatischen Lichtquelle beleuchtet und die reflektierte Intensität mit einer CCD Kamera orts aufgelöst detektiert. Die beste, dokumentierte Empfindlichkeit beträgt 5×10^{-6} RIU für die simultane Messung von 144 möglichen Reaktionen [2]. Sie ist jedoch um mehr als eine Größenordnung schlechter als die Empfindlichkeit kommerzieller Geräte für Einzelmessungen.

Das ISAS besitzt viel Erfahrung in der Entwicklung und Verbesserung neuer analytischer Methoden. Durch die Verwendung zweier Laserwellenlängen und der Bestimmung des Differenzsignals konnte die Empfindlichkeit von Absorptionsmessungen verbessert werden [3]. Die Technik generiert ein höheres Signal, ist unempfindlich gegen Streulicht und bietet die Möglichkeit einer Stabilisierung der Lichtintensität.

Ziel dieser Arbeit ist es, diese Vorteil auch auf eine Messung von Oberflächenplasmonenresonanz zu übertragen und die Empfindlichkeit dadurch zu verbessern. Die ersten Experiment konnten eine simultane Beobachtung von drei Bioreaktionen demonstrieren [4]. Die Empfindlichkeit betrug 5×10^{-6} RIU. Für einen hochparallelen Einsatz

war dieser Versuchsaufbau jedoch ungeeignet, da für jede weitere Bioreaktion ein zusätzlicher Messkanal nötig gewesen wäre.

Das Hauptaugenmerk dieser Doktorarbeit lag daher auf der Entwicklung eines bildgebenden SPR-Verfahrens, das für eine *High-Throughput*-Anwendung geeignet ist und eine hohe Empfindlichkeit besitzt. Dazu wurde eine eigens für unsere Anforderungen modifizierte CCD-Kamera anstelle der Lock-In-Technik verwendet. Dies ist eine Voraussetzung für den Einsatz in einer *High-Throughput*-Anwendung.

Es war notwendig, eine ausführliche Analyse der Faktoren, die die Empfindlichkeit und laterale Auflösung begrenzen, durchzuführen. Auf diesen Ergebnissen aufbauend konnte eine Methode entwickelt werden, die es erlaubt diese Limitierungen teilweise zu überwinden.

Das Potential der doppelten Wellenlängentechnik wurde anhand von zwei biologischen Systemen demonstriert, was sowohl maximale Empfindlichkeit als auch einen möglichen Einsatz in einer *High-Throughput*-Anwendung zeigt.

2 Theorie

2.1 Volumenplasmonen in Metallen

Die Valenzelektronen eines metallischen Leiters können in einem einfachen Modell als ein quasifreies Elektronengas beschrieben werden. Werden die Elektronen durch eine externe Anregung aus ihrer Ruhelage ausgelenkt, so entsteht eine elektrische Polarisation \vec{P} innerhalb des Elektronengases:

$$\vec{P} = -\rho e \vec{d} . \quad (2.1)$$

Dabei bezeichnet ρ die Valenzelektronendichte, e die Elementarladung eines Elektrons und \vec{d} die Auslenkung aus der Ruhelage. Die Polarisation \vec{P} des Elektronengases erzeugt ein rücktreibendes elektrisches Feld \vec{E} :

$$\vec{E} = \frac{1}{\varepsilon_0 \varepsilon_R} \vec{P} = -\frac{\rho e}{\varepsilon_0 \varepsilon_R} \vec{d} . \quad (2.2)$$

(ε_0 = Dielektrizitätskonstante im Vakuum, ε_R = Dielektrizitätskonstante im Metall)

Dadurch ergibt sich zusammen mit der Masse m_e der Elektronen die Bewegungsgleichung eines harmonischen Oszillators:

$$m_e \frac{d^2}{dt^2} x = -\frac{\rho e^2}{\varepsilon_0 \varepsilon_R} x . \quad (2.3)$$

Diese kollektiven Schwingungen der Valenzelektronen in einem Festkörper werden Volumenplasmonen genannt. Die Eigenfrequenz hängt von den Materialeigenschaften ab und wird Plasmafrequenz ω_P genannt:

$$\omega_P = \sqrt{\frac{\rho e^2}{m_e \varepsilon_0 \varepsilon_R}} . \quad (2.4)$$

2.2 Oberflächenplasmonen an Grenzflächen

Plasmonen können auch an metallischen Grenzflächen auftreten und werden dann Oberflächenplasmonen genannt. Sie führen keine statischen Oszillationen aus, sondern bewegen sich wellenförmig entlang der Oberfläche.

Die erste dokumentierte Beobachtung findet sich im Jahr 1902 [5]. Allerdings konnten die experimentellen Daten erst 1941 von Fano als elektromagnetische Wellen an einer Oberfläche interpretiert werden [6].

Um die Entstehung von Oberflächenplasmonen zu verstehen, betrachtet man eine Grenzfläche zwischen einem Metall und einem Dielektrikum (siehe Abbildung 2.1). Die Oberflächenplasmonen bewegen sich als p-polarisierte Welle entlang der Grenzfläche. Die dabei entstehenden Felder können folgendermaßen beschrieben werden [7]:

$$\begin{aligned}
 z > 0 \quad \vec{E}_1 &= (E_{x1}, 0, E_{z1}) \exp[+i(k_{x1}x - k_{z1}z - \omega t)] \\
 &\quad \vec{H}_1 = (0, H_{y1}, 0) \exp[+i(k_{x1}x + k_{z1}z - \omega t)] \\
 z \leq 0 \quad \vec{E}_2 &= (E_{x2}, 0, E_{z2}) \exp[+i(k_{x2}x + k_{z2}z - \omega t)] \\
 &\quad \vec{H}_2 = (0, H_{y2}, 0) \exp[+i(k_{x2}x + k_{z2}z - \omega t)] .
 \end{aligned}$$

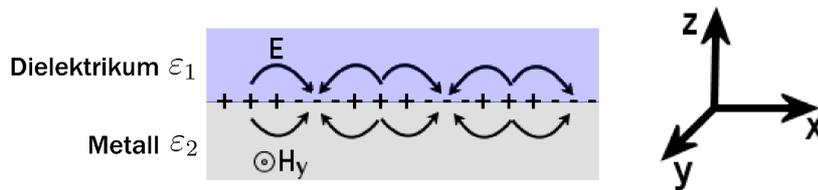


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Ladungen und des elektromagnetischen Feldes der Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche von Metall und Dielektrikum.

Die elektrischen und magnetischen Felder müssen die vier Maxwellgleichungen

$$\nabla \times \vec{E}(r, t) + \mu \frac{\partial \vec{H}(r, t)}{\partial t} = 0 \quad (2.5)$$

$$\nabla \cdot (\mu \vec{H}(r, t)) = 0 \quad (2.6)$$

$$\nabla \times \vec{H}(r, t) - \epsilon_0 \epsilon(r) \frac{\partial \vec{E}(r, t)}{\partial t} = 0 \quad (2.7)$$

$$\nabla \cdot (\epsilon_0 \epsilon(r) \vec{E}(r, t)) = 0 \quad (2.8)$$

und die Kontinuitätsbedingungen an der Grenzfläche

$$\begin{aligned}
E_{x1} &= E_{x2} \\
H_{y1} &= H_{y2} \\
\varepsilon_1 E_{z1} &= \varepsilon_2 E_{z2}
\end{aligned} \tag{2.9}$$

erfüllen. Aus den Kontinuitätsbedingungen 2.9 folgt für den Wellenvektor des elektromagnetischen Feldes in x-Richtung direkt

$$k_{x1} = k_{x2} = k_x .$$

Zusätzlich erhält man durch Anwendung der ersten beiden Maxwellgleichungen und den Kontinuitätsbedingungen die Dispersionsrelation in beiden Medien

$$k_x^2 + k_{zi}^2 = \varepsilon_i \left(\frac{\omega}{c} \right)^2 . \tag{2.10}$$

Für den Wellenvektor in x-Richtung ergibt sich daher also die allgemeine Dispersionsrelation der Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche:

$$k_x = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\varepsilon_1 \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2} \right)^{1/2} . \tag{2.11}$$

Die Dielektrizitätsfunktion des Dielektrikums ist in den meisten Fällen (Luft, Wasser) reell und zeigt wenn überhaupt nur eine sehr geringe Wellenlängenabhängigkeit. Die Dielektrizitätsfunktion von Metallen ist dagegen im Allgemeinen komplex ($\varepsilon_2 = \varepsilon_2' + i\varepsilon_2''$, $\varepsilon_2' < 0$) und wellenlängenabhängig. Daher hat auch der Wellenvektor k_x einen reellen und einen imaginären Anteil:

$$k_x' = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\varepsilon_1 \varepsilon_2'}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2'} \right)^{1/2} \tag{2.12}$$

$$k_x'' = \frac{\omega}{c} \left(\frac{\varepsilon_1 \varepsilon_2'}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2'} \right)^{3/2} \frac{\varepsilon_2''}{2\varepsilon_2'^2} . \tag{2.13}$$

Der reelle Teil beschreibt eine sich in x-Richtung fortbewegende Welle des elektrischen Feldes, wohingegen der imaginäre Teil die Schwingung dämpft. Die Ausbreitungslänge L der Oberflächenplasmonen ist definiert als die Strecke, nach der sich die Intensität des elektrischen Feldes um den Faktor $1/e$ verringert hat:

$$L = \frac{1}{2k_x''} . \tag{2.14}$$

Die Wellenvektoren in z-Richtung k_{z1} und k_{z2} sind imaginär, da $\omega/c < k_x$ und $\varepsilon'_2 < 0$ sind. Das elektrische Feld fällt daher wie eine Exponentialfunktion auf beiden Seiten der Grenzfläche ab. Die Eindringtiefe Z der Oberflächenplasmonen in das Metall bzw. in das Dielektrikum ist definiert als der Abfall des Feldes um den Faktor $1/e$:

$$Z_{Metall} = \frac{\lambda}{2\pi} \left(\frac{\varepsilon_1 + \varepsilon'_2}{\varepsilon_1^2} \right)^{1/2} \quad (2.15)$$

$$Z_{Dielekt} = \frac{\lambda}{2\pi} \left(\frac{\varepsilon_1 + \varepsilon'_2}{\varepsilon_2'^2} \right)^{1/2} . \quad (2.16)$$

Die Dielektrizitätsfunktion von Metallen ist stark wellenlängenabhängig. Daher zeigen auch die Ausbreitungslänge und die Eindringtiefe in das Dielektrikum eine solche Abhängigkeit (siehe Abbildung 2.2).

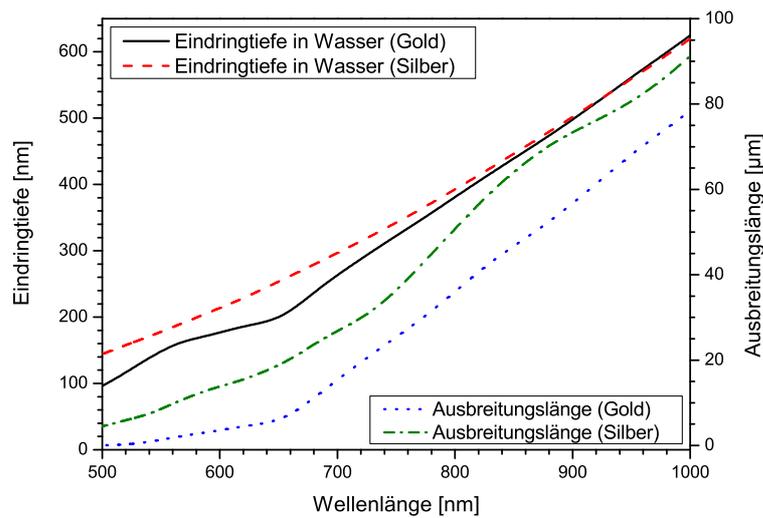


Abbildung 2.2: Abhängigkeit der Ausbreitungslänge der Oberflächenplasmonen und der Eindringtiefe des elektrischen Feldes von der Wellenlänge für Gold / Wasser bzw. Silber / Wasser Grenzflächen (Daten aus [8]).

2.3 Verlauf der Dispersionsrelation

Um einen Eindruck vom Verlauf der Dispersionsrelation der Oberflächenplasmonen zu erhalten, kann die Dielektrizitätsfunktion von Metallen im Drude-Modell vereinfacht folgendermaßen beschrieben werden [9]

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_P^2}{\omega^2} . \quad (2.17)$$

Dabei wird der imaginäre Anteil der Dielektrizitätsfunktion der Metalle vernachlässigt. Die Näherung beschreibt daher nicht die Dämpfung der Oszillationen. Zur Bestimmung des Wellenvektors entlang der Grenzfläche eignet sie sich jedoch sehr gut, da für Metalle meist $\varepsilon_2'' \ll \varepsilon_2'$ gilt. Nimmt man Luft als Dielektrikum ($\varepsilon_2(\omega) = 1$), so ergibt sich für die Dispersionsrelation der Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche folgender Ausdruck

$$k_x(\omega) = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\omega^2 - \omega_P^2}{2\omega^2 - \omega_P^2}}. \quad (2.18)$$

Die Abhängigkeit der Wellenlänge der Plasmonen von k_x und die Dispersionsrelationen des Lichtes in der Luft ($\omega = ck$) und im Metall ($\omega = \sqrt{\omega_P^2 + c^2k^2}$) sind in Abbildung 2.3 dargestellt. Für kleine k_x nähert sich die Dispersionsrelation der Oberflächenplasmonen der des Lichtes im Dielektrikum an, bleibt jedoch stets rechts von ihr. Für große k_x strebt sie asymptotisch dem Wert $\omega_P/\sqrt{2}$ entgegen.

Da kein Schnittpunkt der Dispersionsrelationen besteht, ist es nicht möglich Oberflächenplasmonen durch Einstrahlung von Licht anzuregen - weder durch Lichteinfall von Seiten des Dielektrikums noch von der Metallseite.

Um die Oberflächenplasmonen trotzdem anregen zu können, reduziert man die Metallschicht zu einem dünnen Metallfilm, der von zwei unterschiedlichen Dielektrika begrenzt wird - der so genannten Kretschmann-Anordnung (siehe Abbildung 2.4). P-polarisiertes Licht wird von der Seite des zweiten Dielektrikums unter dem Einfallswinkel Θ eingestrahlt. Die Dispersionsrelation für Licht in diesem Medium lautet

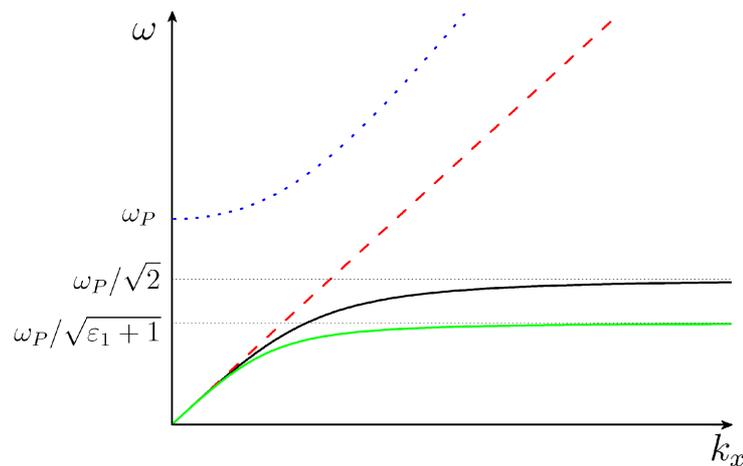


Abbildung 2.3: Die Dispersionsrelation der Oberflächenplasmonen an einer Metall/Luft Grenzfläche (schwarze Linie) hat mit den Dispersionsrelationen von Licht in Luft (rot) bzw. in einem Metall (blau) keinen Schnittpunkt. Besitzt das Dielektrikum eine Dielektrizitätskonstante ε_1 ungleich eins, so ist die Dispersionsrelation der Oberflächenplasmonen flacher und nähert sich asymptotisch dem Wert $\omega_P/\sqrt{1 + \varepsilon_1}$ (grün).

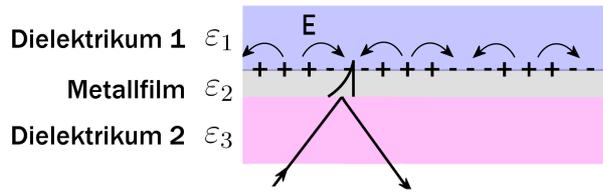


Abbildung 2.4: Das Licht fällt in der hier schematisch dargestellten Kretschmann-Anordnung durch das optische dichtere Dielektrikum 2 auf den Metallfilm und wird dort totalreflektiert. Das evaneszente elektrische Feld, das durch die Totalreflexion erzeugt wird, dringt in den Metallfilm ein und kann unter Resonanzbedingungen Oberflächenplasmonen an der gegenüberliegenden Grenzfläche anregen.

$$k_x = \sqrt{\varepsilon_3} \frac{\omega}{c} \sin \Theta . \quad (2.19)$$

Diese hat bei geeigneter Dielektrizitätskonstante ($\varepsilon_3 > \varepsilon_1$) einen Schnittpunkt mit der Dispersionsrelation der Oberflächenplasmonen (siehe Abbildung 2.5). Licht, das durch das zweite Dielektrikum auf die Metallfläche fällt, erzeugt bei der Totalreflexion ein evaneszentes Feld, welches in den Metallfilm hinein exponentiell abfällt. Dieses evaneszente Feld kann unter Resonanzbedingungen Oberflächenplasmonen auf der gegenüberliegenden Seite des Metallfilms anregen.

Neben der Impulserhaltung muss dabei auch die Energieerhaltung erfüllt sein. Das bedeutet, dass es für die Anregung mit monochromatischem Licht nur einen Resonanzwinkel gibt. Bei diesem schneiden sich die Dispersionsrelationen in einem Punkt, wo

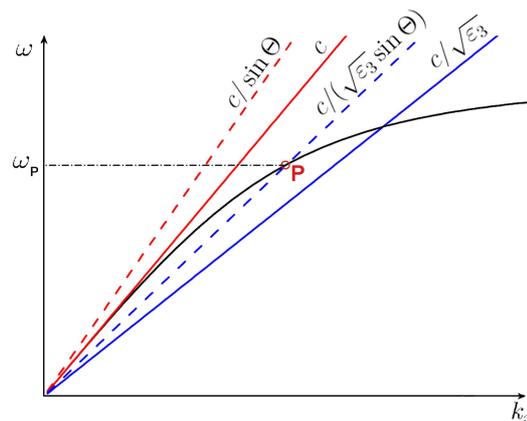


Abbildung 2.5: Die Dispersionsrelation der Oberflächenplasmonen (schwarze Linie) besitzt einen Schnittpunkt mit der Dispersionsrelation des Lichtes im zweiten Dielektrikum (blaue Linie). Alle Wellenlängen unterhalb des Punktes P können angeregt werden, indem der Einfallswinkel des Lichtes variiert wird. Wird monochromatisches Licht ($E = \hbar\omega_P$) eingestrahlt, werden Oberflächenplasmonen nur unter einem bestimmten Winkel Θ angeregt - nämlich genau dann, wenn sich die Dispersionsrelationen des Lichtes und der Oberflächenplasmonen im richtigen Energieniveau schneiden.

die Energie der einfallenden Photonen gleich der Energie der Oberflächenplasmonen ist. Beobachtet man die Reflektivität von monochromatischem Licht in Abhängigkeit vom Einfallswinkel, so zeigt sich die Anregung der Oberflächenplasmonen als Einbruch der Reflektivität bei einem bestimmten Resonanzwinkel. Alternativ kann auch die Reflektivität in Abhängigkeit von der Wellenlänge bei einem fixen Einfallswinkel beobachtet werden. Auch in diesem Fall findet sich für eine bestimmte Wellenlänge ein Resonanzminimum (siehe Abbildung 2.6).

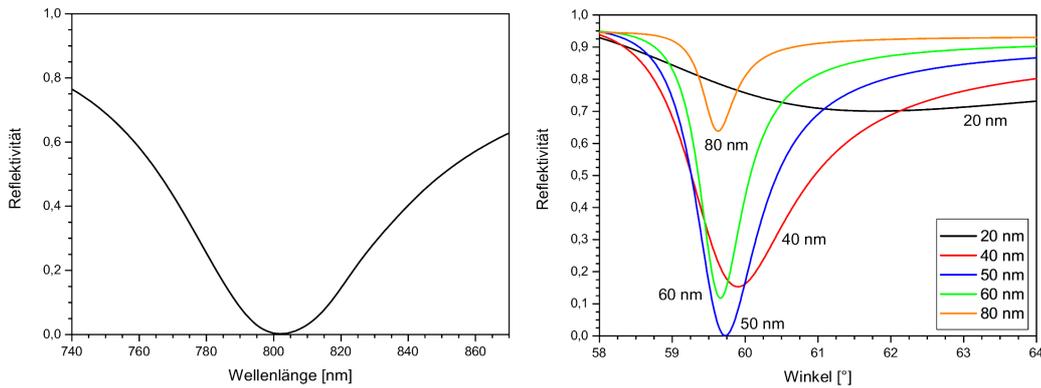


Abbildung 2.6: Das rechte Bild zeigt eine Resonanzkurve für eingestrahktes, weißes Licht bei einer Fixierung des Einfallswinkels ($d_{Gold} = 50 \text{ nm}$). Die linke Abbildung zeigt Reflektivitätskurven für unterschiedliche Schichtdicken des Goldfilms in einem Glas / Gold / Wasser System ($n_{Glas} = 1.61$, $\lambda = 780 \text{ nm}$). Bei der optimalen Schichtdicke von 50 nm wird die komplette Energie der Photonen bei Einstrahlung unter dem Resonanzwinkel in Oberflächenplasmonen umgewandelt (Berechnung mit [10]).

Eine Anregung der Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche zwischen zweitem Dielektrikum und Metall ist nicht möglich, da dies der Situation für ein 2-Schicht-System entspricht.

Die Dicke des Metallfilms spielt bei diesem Vorgang eine wichtige Rolle. Sie ist entscheidend dafür, wie viel Energie der einfallenden Photonen durch das evaneszente Feld an die Oberflächenplasmonen übertragen wird. Bei einer optimalen Ankopplung wird die komplette Energie der einfallenden Photonen zur Anregung von Oberflächenplasmonen genutzt. Um die optimale Dicke des Metallfilms zu bestimmen, nutzt man die Fresnel-Formeln, um die Reflektivität R des Drei-Schicht-Systems zu bestimmen [7].

$$R = |r_{012}^p|^2 = \left| \frac{E_R^p}{E_0^p} \right|^2 = \left| \frac{r_{01}^p + r_{12}^p \exp(2ik_{z1}d)}{1 + r_{01}^p r_{12}^p \exp(2ik_{z1}d)} \right|^2 \quad \text{mit}$$

$$r_{ik}^p = \left(\frac{k_{zi}}{\varepsilon_i} - \frac{k_{zk}}{\varepsilon_k} \right) / \left(\frac{k_{zi}}{\varepsilon_i} + \frac{k_{zk}}{\varepsilon_k} \right). \quad (2.20)$$

Anschaulich erklärt sich die optimale Schichtdicke dadurch, dass Photonen in den Metallfilm eindringen und zwischen den Dielektrika mehrmals reflektiert werden. Dabei

entsteht an den Grenzflächen konstruktive bzw. destruktive Interferenz. An der Grenzfläche des ersten Dielektrikums mit dem Metall sorgt die konstruktive Interferenz für die Entstehung der Oberflächenplasmonen. An der anderen Grenzfläche sorgt die destruktive Interferenz für die Auslöschung des reflektierten Strahls [11]. Theoretische Reflektivitätskurven für unterschiedliche Schichtdicken sind in Abbildung 2.6 aufgezeichnet.

2.4 Oberflächenplasmonen als Biosensor

Der typische experimentelle Aufbau zur Detektion von Biomolekülen mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz besteht aus einem Prisma, auf dessen Rückseite eine etwa 50 nm dicke Goldschicht aufgebracht ist. Auf der anderen Seite des Goldfilms wird eine Flusszelle befestigt, durch die man unterschiedliche Flüssigkeiten über den Goldfilm leiten kann. Die Oberflächenplasmonen werden durch Lichteinfall durch das Prisma angeregt (siehe Abbildung 2.7).

Das evaneszente elektrische Feld der Oberflächenplasmonen fällt über einige hundert Nanometer im Wasser ab. Der Brechungsindex in diesem Bereich beeinflusst die Resonanzbedingungen stark. Ändert sich der Brechungsindex des Wassers beispielsweise durch die Zugabe von Salzen, so verschiebt sich die Position des Resonanzminimums. Die Form der Resonanzkurve bleibt dabei weitestgehend unverändert. Die Reaktion auf eine Brechungsindexänderung des Wassers von 10^{-2} RIU zeigt Abbildung 2.8.

Da sich in diesem Fall der Brechungsindex homogen im gesamten evaneszenten Feld ändert, spricht man auch von einem Volumeneffekt. Die Oberflächenplasmonenresonanz ließe sich somit theoretisch nutzen, um Brechungsindizes von Flüssigkeiten zu bestimmen.

Interessanter ist jedoch die Möglichkeit dünne Schichten auf der Goldoberfläche mit

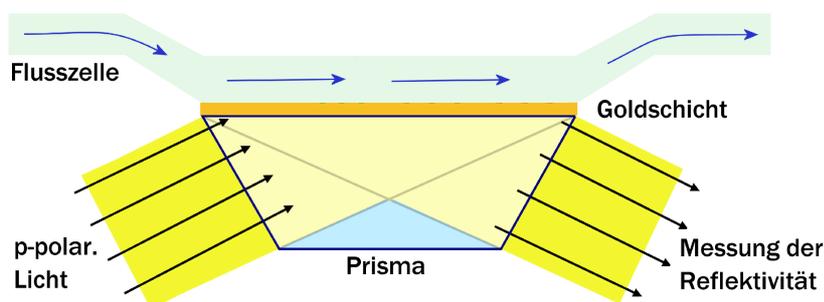


Abbildung 2.7: Kretschmann-Anordnung in einem typischen Oberflächenplasmonenresonanzexperiment. Auf der Rückseite eines Prismas ist eine dünne Goldschicht aufgebracht. Über der Goldschicht ist eine Flusszelle befestigt, durch die man Flüssigkeiten über die Goldschicht leiten kann. Die Oberflächenplasmonen werden an der Gold-Wasser-Grenzfläche durch Lichteinfall durch das Prisma angeregt.

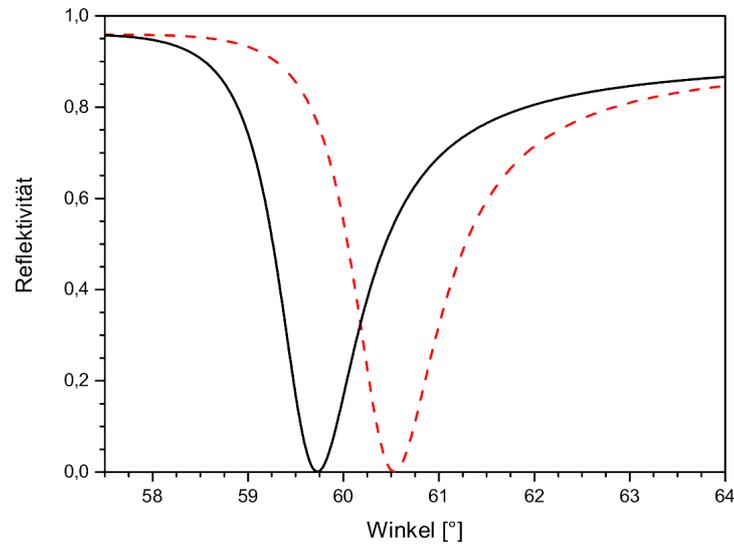


Abbildung 2.8: Verschiebung des Resonanzminimums auf Grund einer Brechungsindexänderung des Wassers in einem Glas / Gold / Wasser Schichtsystem (berechnet mit [10]; $n_{\text{Glas}} = 1.61$, $d_{\text{Gold}} = 50 \text{ nm}$, $n_{\text{H}_2\text{O}} = 1.33$, $\lambda = 780 \text{ nm}$, $\Delta n = 10^{-2} \text{ RIU}$)

Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz zu messen. Das sind in den meisten Fällen dünne Schichten aus Biomolekülen mit einer typischen effektiven Dicke von hundert Picometern bis wenigen Nanometern. Man nutzt dabei aus, dass sich die Brechungsindizes von Biomolekülen ($n_B \approx 1.50$) und Wasser unterscheiden ($n_P = 1.33$).

Das evaneszente Feld dringt üblicherweise einige hundert Nanometer in das Wasser ein. Der Einfluss der dünnen Biomolekülschicht ist gering und kann daher im Rahmen der Störungstheorie umfassend behandelt werden [11].

In einem einfacheren Ansatz berechnet man lediglich eine effektive Volumenbrechungsindexänderung, die das evaneszente Feld erfährt, wenn sich Biomoleküle auf der Goldschicht anlagern. Dazu berechnet man den mittleren Brechungsindex innerhalb des evaneszenten Feldes:

$$\begin{aligned}
 n_{eff} &= \left(\int_0^{\infty} n(x) e^{-\frac{x}{L_x}} dx \right) / \left(\int_0^{\infty} e^{-\frac{x}{L_x}} dx \right) \\
 &= \left(\int_0^d n_B e^{-\frac{x}{L_x}} dx + \int_d^{\infty} n_P e^{-\frac{x}{L_x}} dx \right) / L_x \\
 &= \left(\int_0^d n_B e^{-\frac{x}{L_x}} dx + \int_0^{\infty} n_P e^{-\frac{x}{L_x}} dx - \int_0^d n_P e^{-\frac{x}{L_x}} dx \right) / L_x .
 \end{aligned}
 \tag{2.21}$$

Da $d \ll L_x$ ist, lässt sich der Ausdruck vereinfachen zu

$$\begin{aligned} n_{eff} &\approx \left(\int_0^d n_B dx + \int_0^\infty n_P e^{-\frac{x}{L_x}} dx - \int_0^d n_P dx \right) / L_x \\ &= (n_B - n_P) \frac{d}{L_x} + n_P . \end{aligned} \quad (2.22)$$

Bildet sich eine dünne Biomolekülschicht der Dicke d auf dem Goldfilm, so reagiert die Resonanzkurve, als ob eine Volumenbrechungsindexänderung der Größe n_{eff} aufgetreten wäre. Diese effektive Brechungsindexänderung führt dazu, dass die Resonanzkurve zu einem größeren Resonanzwinkel verschoben wird (siehe Abbildung 2.9).

Die Bindung von Biomolekülen an eine Goldschicht ist jedoch in den meisten Fällen nicht sehr interessant. Vielmehr ist man an der Bindung zwischen zwei Molekülen interessiert (DNA-DNA, DNA-Protein, Protein-Protein Wechselwirkungen). Dazu immobilisiert man so genannte Fängermoleküle in einem ersten Schritt auf der Goldoberfläche. In einem zweiten Schritt werden die zu untersuchenden Moleküle in einer Lösung über die Goldoberfläche geleitet. Die Moleküle binden an die Fängermoleküle und vergrößern dadurch die Biomolekülschicht.

Da L_x und n_B konstant sind, ist die Verschiebung der Resonanzkurve direkt proportional zur Dicke der Bioschicht

$$\Delta n = n_{eff} - n_P = (n_B - n_P) \frac{d}{L_x} . \quad (2.23)$$

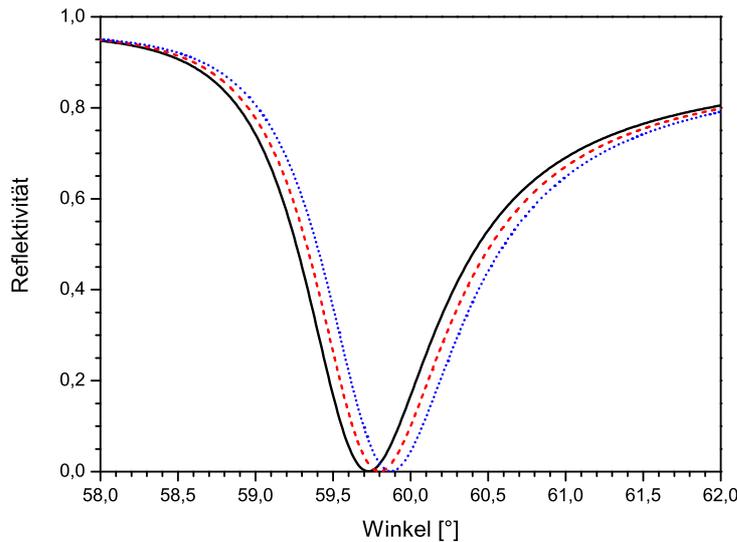


Abbildung 2.9: Verschiebung des Resonanzminimums bei Anlagerung einer 1 nm (rote Kurve) bzw. 2 nm (blaue Kurve) dicken Schicht aus Biomolekülen (berechnet mit [10]: $n_{Glas} = 1.61$, $d_{Gold} = 50$ nm, $n_{H_2O} = 1.33$, $\lambda = 780$ nm).

Durch eine zeitaufgelöste Messung der Resonanzkurve ist es daher möglich die Dynamik einer Bindungsreaktion zu beobachten.

Es gibt drei weitverbreitete Techniken um die Verschiebung der Resonanzkurve zu messen. Alle Methoden basieren auf der Einstrahlung von p-polarisiertem Licht um die Oberflächenplasmonen anzuregen.

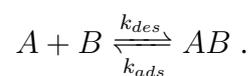
Im meist genutzten Aufbau wird der Goldfilm mit monochromatischem Licht divergent beleuchtet. Die Intensität des reflektierten Lichtes wird mit Hilfe einer Diodenzeile winkelaufgelöst gemessen. Durch Interpolation der gemessenen Reflektivitäten kann das Resonanzminimum in Abhängigkeit vom Einfallswinkel bestimmt werden [12, 13].

Ein weiterer Ansatz beruht auf weißem Licht, das unter einem festen Winkel die Oberfläche beleuchtet. Mit Hilfe eines Spektrometers kann die Reflektivität für unterschiedliche Wellenlängen ermittelt werden und darüber die Position des Resonanzminimums in Abhängigkeit von der Wellenlänge bestimmt werden [14].

Im dritten Ansatz wird monochromatisches Licht unter einem fixen Winkel eingestrahlt. Der Winkel ist dabei meist so gewählt, dass er auf der linken Seite des Resonanzminimums liegt, wo die Resonanzkurve ihre steilste Stelle aufweist. Verschiebt sich das Resonanzminimum, so lässt sich eine Erhöhung der Reflektivität detektieren. Der Anstieg ist dabei direkt proportional zur Verschiebung des Resonanzminimums innerhalb eines gewissen linearen Bereiches [15].

2.5 Bindungskinetik auf einem Biosensor

Moleküle aus einem Puffer binden an die Fängermoleküle auf der Oberfläche gemäß folgender Reaktionsgleichung:



Im Langmuir-Modell, das die meisten Adsorptionsprozesse gut beschreibt, geht man davon aus, dass

- es keine Wechselwirkung zwischen den adsorbierten Molekülen gibt,
- alle Bindungsplätze energetisch identisch sind
- und die Menge von Bindungsplätzen begrenzt ist.

Die Geschwindigkeit, mit der die Moleküle aus der Lösung auf die Oberfläche binden, wird durch die Konstante k_{ads} beschrieben. Die Desorption wird durch die Konstante k_{des} ausgedrückt.

In einem typischen Experiment wird die zu untersuchende Substanz kontinuierlich

über die Sensoroberfläche gepumpt. Die Konzentration c_A ist daher stets konstant, obwohl einige Moleküle auf die Oberfläche binden. Die Anzahl der freien Bindungsstellen c_B hängt direkt mit der Anzahl der gebundenen Moleküle auf der Oberfläche c_{AB} zusammen:

$$c_B = c_0 - c_{AB} . \quad (2.24)$$

(c_0 = Zahl der insgesamt verfügbaren Bindungsstellen)

Im Gleichgewicht gilt das Massenwirkungsgesetz und die Rate der Adsorption ist gleich der Desorption [16]:

$$k_{ads}c_Ac_B = k_{des}c_{AB} .$$

Es stellt sich eine definierte Oberflächenbelegung ein, die von den Adsorptions- und Desorptionskonstanten, sowie von der Konzentration der Moleküle im Puffer abhängig ist:

$$c_{AB} = c_0 \frac{1}{1 + S} \quad \text{mit} \quad S = \frac{k_{des}}{k_{ads}c_A} . \quad (2.25)$$

Da jeder Sensor ein gewisses Rauschniveau besitzt, gibt es nur einen gewissen Bereich, in dem eine analytische Bestimmung der Konzentration c_A möglich ist (siehe Abbildung 2.10).

Die Kinetik der Bindungsreaktion ergibt sich aus der Differentialgleichung

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}c_{AB} &= k_{ads}c_Ac_B - k_{des}c_{AB} \\ &= k_{ads}c_Ac_0 - c_{AB}K \quad \text{mit} \quad K = k_{des} + c_Ak_{abs} . \end{aligned} \quad (2.26)$$

Daraus ergibt sich für die Kinetik der Oberflächenbindung folgende Darstellung

$$c_{AB}(t) = D(1 - e^{-Kt}) \quad \text{mit} \quad D = c_0 \frac{1}{1 + S} . \quad (2.27)$$

Die Höhe des Bindungssignals und die Geschwindigkeit der Bindung ist durch das Verhältnis der Adsorptions- und Desorptionsgeschwindigkeiten und der Konzentration der Moleküle in der Lösung bestimmt. Je höher die Konzentration der Moleküle im Puffer, desto schneller erreicht die Reaktion ihr Gleichgewicht (siehe Abbildung 2.11).

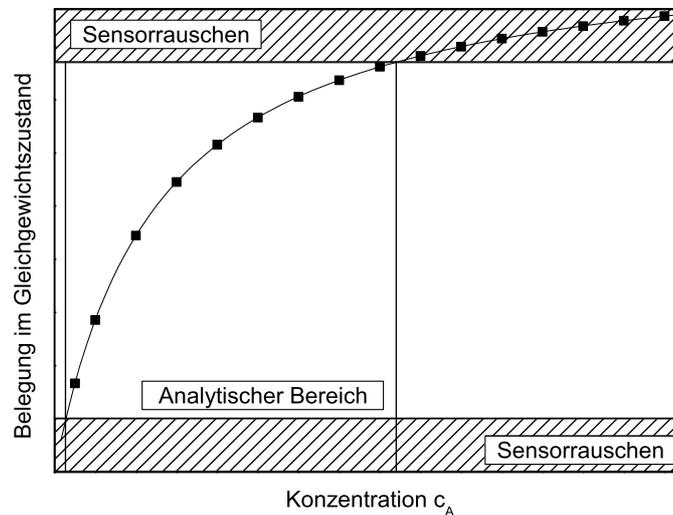


Abbildung 2.10: Die Oberflächenbelegung im Gleichgewichtszustand ist abhängig von der Konzentration der Moleküle im Puffer. Auf Grund des sensorspezifischen Rauschens kann die genaue Konzentration c_A nur in einem eng definierten Bereich ermittelt werden. Ist das Sensorsignal zu niedrig, kann es nicht detektiert werden. Ist das Sensorsignal zu hoch, kann es nicht mehr eindeutig einer Konzentration zugeordnet werden.

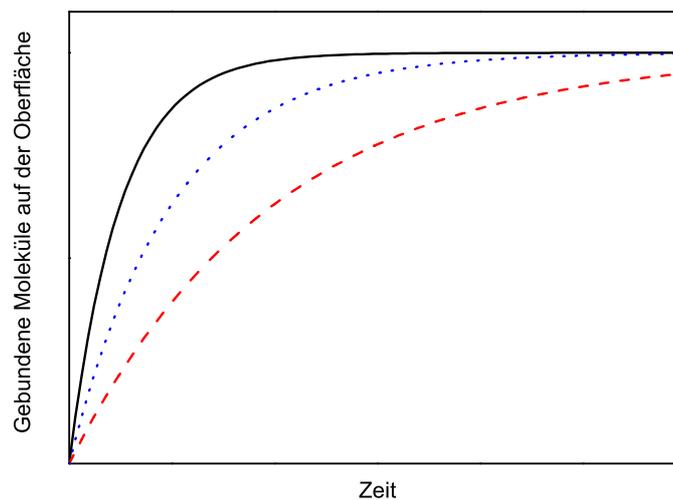


Abbildung 2.11: Die berechneten Langmuir-Adsorptionskurven für drei unterschiedliche Konzentrationen c_A zeigen, dass die Reaktion umso schneller ins Gleichgewicht kommt, je höher die Konzentration der Moleküle im Puffer ist. Die Höhe des Bindungssignals ist in allen Fällen gleich hoch, da $S \ll 1$.

3 Experimenteller Aufbau

Die meisten kommerziellen SPR-Geräte basieren auf der winkelaufgelösten Messung divergenten, monochromatischen Lichtes in einer Kretschmann-Anordnung. Diese Geräte besitzen eine meist sehr hohe Empfindlichkeit. Sie wird bestimmt durch die Stabilität der Basislinie und liegt bei den besten Geräten bei etwa 3×10^{-7} RIU.

Kommerzielle Geräte bieten jedoch in den meisten Fällen nur die Möglichkeit einige wenige Bindungsreaktion auf der Oberfläche zu beobachten. Da der Brechungsindex von Wasser stark temperaturabhängig ist, benötigen sie eine hochpräzise Temperaturstabilisierung um Driften zu vermeiden. Das winkelaufgelöste Messprinzip lässt sich jedoch nicht für *High-Throughput*-Anwendungen adaptieren. Die Entwicklung einer SPR-Methode, die die simultane Beobachtung von mehreren Bioreaktionen bei einer gleichzeitig hohen Empfindlichkeit bietet (so genanntes *SPR-Imaging*), ist daher von großer Bedeutung.

Die meisten und vielversprechendsten Entwicklungen in diesem Gebiet basieren auf der Einstrahlung monochromatischen, p-polarisierten Lichtes unter einem festen Winkel [2, 17–21]. Die Intensität des reflektierten Lichtes lässt sich dabei leicht mit einer CCD-Kamera beobachten, so dass eine orts aufgelöste Messung auf der Goldoberfläche möglich ist. Der Winkel wird so gewählt, dass sich die eingestrahlte Wellenlänge auf der linken Seite der Resonanzkurve befindet. Verschiebt sich die Resonanzkurve, so ändert sich die Reflektivität (siehe Abbildung 3.1). Sind auf der Goldoberfläche mehrere Stellen (so genannte *Spots*) mit unterschiedlichen Biorezeptoren beschichtet, so lassen sich Reaktionen in diesen Spots gleichzeitig beobachten. Heutzutage erreicht man dabei Empfindlichkeiten von etwa 5×10^{-6} RIU für 144 simultane Messungen [2].

Ein alternativer Ansatz basiert auf einer phasenempfindlichen Detektion, die Interferenzeffekte ausnutzt [22–25]. Dieser bietet eine sehr hohe Empfindlichkeit, die mit kommerziellen Geräten vergleichbar ist. Allerdings ist dieser Aufbau sehr anfällig gegenüber mechanischen Vibrationen und der lineare Messbereich stark eingeschränkt.

Ein weiterer Ansatz verwendet eine Weißlichtquelle und einen steuerbaren Monochromator, um die Resonanzkurve in der Wellenlängendomäne orts aufgelöst messen zu können [26, 27]. Die erreichte Empfindlichkeit ist jedoch ein bis zwei Größenordnungen schlechter als bei anderen Ansätzen.

Eine interessante Idee, die auf dem Vergleich einer Intensitätsmessung zweier unterschiedlich beschichteter Messstellen beruht, wurde von J. Homola entwickelt [28]. Sie erreicht ebenfalls eine hohe Empfindlichkeit, benötigt jedoch eine ganz spezielle Prä-

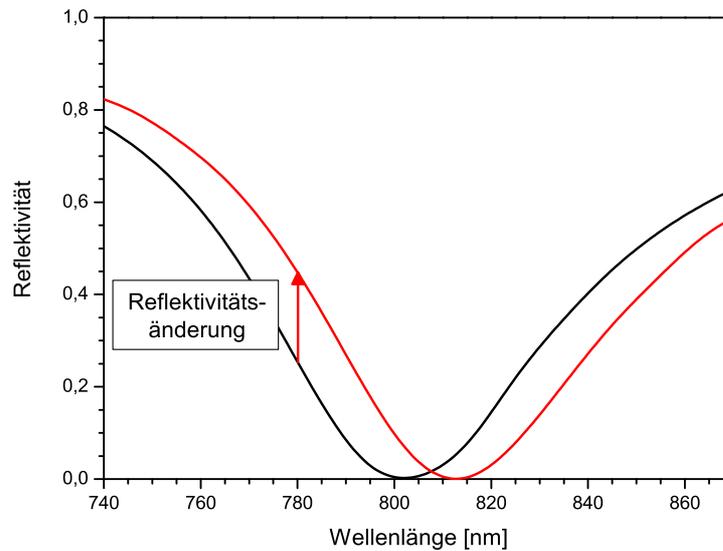


Abbildung 3.1: Der Winkel und die Wellenlänge des einfallendes Lichtes ist bei der Intensitätsmessung mit einer Wellenlänge so gewählt, dass man sich auf der linken Seite der Resonanzkurve befindet. Findet eine Verschiebung der Resonanzkurve statt, erhöht sich die Intensität des reflektierten Lichtes.

paration der Sensoroberfläche.

3.1 SPR-Imaging Aufbau mit doppelter Wellenlängentechnik

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelte neue SPR-Imaging Methode mit zwei Wellenlängen bietet einige Vorteile gegenüber der Intensitätsmessung mit nur einer Wellenlänge. Dazu werden zwei monochromatische Lichtstrahlen mit unterschiedlichen Wellenlängen gemeinsam unter einem festen Winkel auf die Goldoberfläche eingestrahlt. Die Wellenlängen und der Einfallswinkel sind dabei so gewählt, dass eine Wellenlänge auf der linken Seite und die andere Wellenlänge auf der rechten Seite der Resonanzkurve liegt. Durch Feinabstimmung des Winkels kann dabei ein Punkt erreicht werden, bei dem die reflektierten Intensitäten beider Laser gleich sind.

Entsteht nun eine Verschiebung der Resonanzkurve durch eine Anlagerung von Biomolekülen, erhöht sich die Reflektivität für die eine Wellenlänge und verringert sich für die andere. Ein Differenzsignal entsteht, das etwa doppelt so groß ist wie bei der Messung mit nur einer Wellenlänge (siehe Abbildung 3.2).

Der experimentelle Aufbau basiert im Prinzip auf zwei monochromatischen Laserstrahlen, die vereinigt werden und unter einem festen Winkel die Sensoroberfläche beleuchten (siehe Abbildung 3.3). Die Laser werden alternierend eingeschaltet und die Reflektivitäten der beiden Wellenlängen mit Hilfe einer modifizierten CCD-Kamera

separat und ortsaufgelöst gemessen.

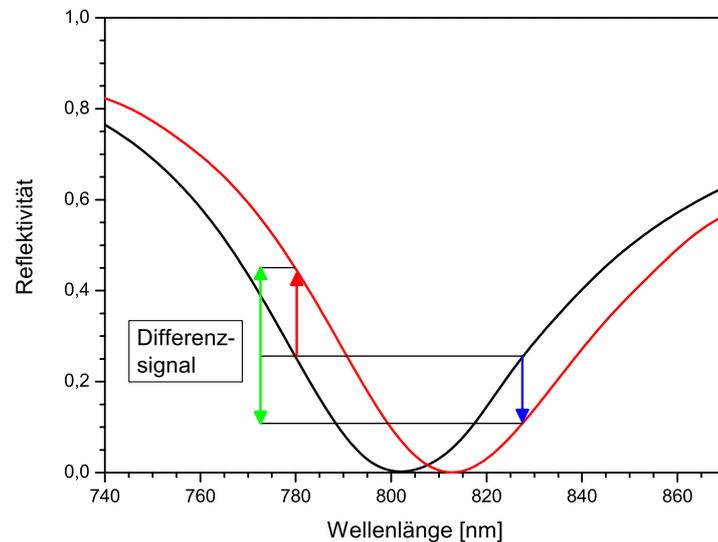


Abbildung 3.2: Bei der Zwei-Wellenlängen-Methode ist der Einfallswinkel für die benutzten Wellenlängen so gewählt, dass diese sich auf den gegenüberliegenden Seiten der Resonanzkurve befinden. Tritt eine Verschiebung der Resonanzkurve auf, so erhöht bzw. verringert sich die Intensität des reflektierten Lichtes. Das gemessene Differenzsignal ist etwa doppelt so hoch wie bei der Messung mit nur einer Wellenlänge.

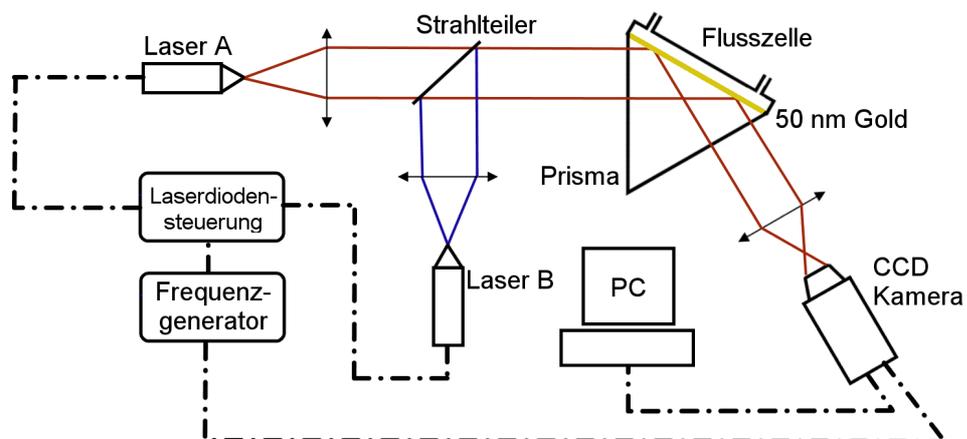


Abbildung 3.3: Prinzipieller Versuchsaufbau: Das Licht zweier Laser wird vereinigt und unter einem festen Winkel auf die Sensoroberfläche gestrahlt. Die Intensität des reflektierten Lichtes wird mit Hilfe einer modifizierten CCD-Kamera ortsaufgelöst gemessen.

3.1.1 Auswahl der Lichtquellen

Als monochromatische Lichtquellen werden zwei Laserdioden genutzt. Diese besitzen eine sehr geringe Spektralbreite (<1 nm). Außerdem liefern sie bei geeignetem Einbau bereits p-polarisiertes Licht, so dass auf einen Polarisator im Strahlengang verzichtet werden kann. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden drei unterschiedliche Laserdioden benutzt, die entweder als 780/830 nm oder 780/850 nm Paar eingesetzt wurden (siehe Tabelle 3.1).

Wellenlänge	Hersteller	Bezeichnung	Leistung
780 nm	Sharp	GH0781JA2C	120 mW
830 nm	Hitachi	HL-8325G	40 mW
850 nm	Thorlabs	L850P100	100 mW

Tabelle 3.1: Übersicht der verwendeten Laserdioden

Die Laserdioden sind in einer am ISAS entwickelten Laserdiodenhalterung eingebaut. Diese besteht aus einem Kupferblock, dessen Temperatur über ein Peltierelement eingestellt werden kann. Die Abwärme wird mit Hilfe einer Wasserkühlung abgeführt. Zur Temperaturmessung wird ein AD590 Thermofühler eingesetzt.

Die Laserdiodenansteuerung und die Temperaturstabilisierung wird von einem Laserdiodentreiber des Typs ITC502 der Firma Thorlabs übernommen.

Zur Aufweitung und Vereinigung der Laserdiodenstrahlen wurden im Laufe der Arbeit zwei leicht unterschiedliche Ansätze verwendet (siehe Abbildung 3.4). Im ersten Ansatz sitzen direkt vor den Laserdioden zwei kurzbrennweitige Linsen. Diese erzeugen jeweils einen parallelen Laserstrahl mit einem Durchmesser von etwa 1 mm. Die beiden Laserstrahlen werden mit Hilfe eines Strahlteilers vereinigt. Dieser Strahl wird durch eine weitere sehr kurzbrennweitige Linse aufgeweitet und durch eine langbrennweitige Linse ($f=500$ mm, $d=50$ mm) wieder parallelisiert. Der resultierende Strahl hat einen Durchmesser von 50 mm.

Im zweiten Ansatz wird auf die kurzbrennweitige Linse vor der Laserdiode verzich-

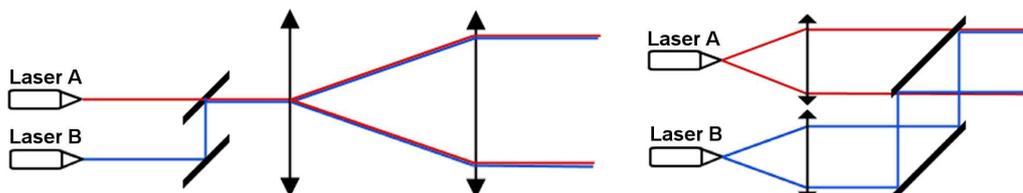


Abbildung 3.4: Es wurden zwei unterschiedliche Ansätze zur Vereinigung der Laserstrahlen getestet. Im ersten Ansatz (linkes Bild) werden dünne, parallele Laserstrahlen vereinigt und anschließend gemeinsam aufgeweitet. Im zweiten Ansatz (rechtes Bild) werden die Strahlen direkt hinter der Laserdiode aufgeweitet und dann vereinigt.

tet. Die Laserdiode emittiert das Licht dann mit einem Öffnungswinkel von etwa 30° . Jeweils eine Linse ($f=100$ mm, $d=40$ mm) im Abstand von 10 cm vor jeder Laserdiode sammelt einen Teil des abgestrahlten Lichtes und erzeugt einen parallelen Strahl. Mit Hilfe eines dicken, goldbedampften Glasblocks der als Strahlteiler genutzt wird, werden beide Strahlen großflächig vereinigt. Ein dünner, konventioneller Strahlteiler kann nicht eingesetzt werden, da dabei Interferenzen durch Reflexionen an der Vorder- und Rückseite auftreten würden. Die Größe des vereinigten Strahls wird durch den Strahlteiler begrenzt und beträgt etwa 20×30 mm².

Der zweite Ansatz erwies sich im Laufe dieser Arbeit als der bessere. Nicht zu unterdrückende, leichte mechanische Vibrationen führten beim ersten Aufbau dazu, dass die Position des vereinigten Strahls leicht variierte. Diese Verschiebungen wurden in der kurzbrennweitigen Linse verstärkt und führten zu Interferenzverschiebungen und Reflexionen innerhalb der Linse. Daraus resultierend war die Intensitätsstabilität stets schlechter als beim zweiten Ansatz.

3.1.2 Zusammenbau der Kretschmann-Anordnung

Für die Beobachtung des SPR Effektes wurden 60° Prismen verwendet, deren Spitzen zum Teil abgeflacht waren, um eine leichtere Befestigung zu gewährleisten. Die Grundfläche der Prismen betrug entweder 25×25 mm² oder 25×30 mm².

Goldbeschichtete Glasplättchen ($20 \times 20 \times 1$ mm³) der Firma Mivitec dienten als Sensorflächen [29]. Diese waren mit einer etwa 2 nm dicken Haftvermittlerschicht aus Chrom und einer 50 nm dicken Goldschicht beschichtet. Die Schichtdicke war so gewählt, dass die Resonanzkurve für die verwendeten Wellenlängen ein möglichst tiefes Resonanzminimum aufwies. Der Brechungsindex der Glasplättchen und der Prismen betrug 1.61.

Ein Tropfen Immersionsöl (Cargille, $n=1.61$) zwischen dem goldbeschichteten Glasplättchen und dem Prisma diente der optischen Verbindung der beiden Glaskörper. Dies ermöglicht die Wiederverwendung der Prismen und den Verbrauch der Glasplättchen als Einwegartikel.

Auf die Oberfläche des Goldchips wurde eine Flusszelle angebracht. Eine 1 mm dicke Form aus PDMS (Polydimethylsiloxan) diente als Dichtung. Darauf wurde ein Plexiglas- oder Kupferblock gelegt, der Bohrungen aufwies, durch die Flüssigkeiten in den entstandenen Hohlraum geleitet werden konnten. Anschließend wurde der komplette Sandwich - bestehend aus Prisma, goldbeschichtetem Glasplättchen und Flusszelle - zusammengedrückt, fixiert und auf einem Rotationstisch befestigt (siehe Abbildung 3.5).

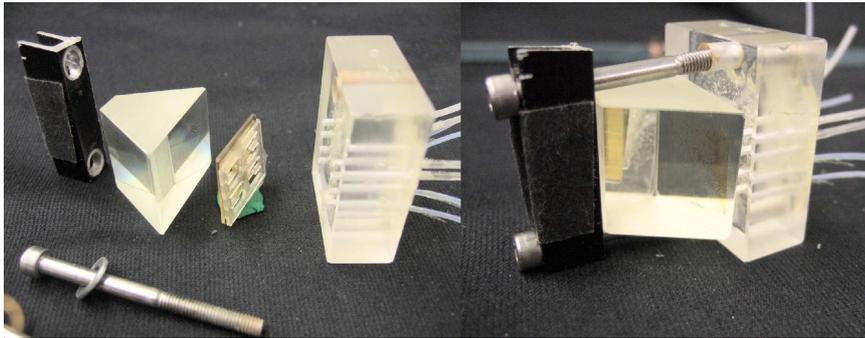


Abbildung 3.5: Die Kretschmann-Anordnung wird durch die Fixierung des Prismas, des Goldchips, einer Flusszellendichtung und eines Plexiglas bzw. Kupferblocks in einer Sandwich-Anordnung hergestellt.

3.1.3 Übersicht über die verwendeten Flusszellen

Zwei unterschiedliche Flusszellentypen wurden je nach Art des Experimentes genutzt. Der Typ A besteht aus einer Dichtung, die eine U-förmige Flusszelle bildet, 7.45 mm lang und 5.7 mm breit ist. Der mittlere Steg ist 3.5 mm lang und 1 mm breit. Bei einer späteren Variante der Flusszelle sind die Ecken abgerundet, um einen besseren Durchfluss zu gewährleisten. Vier U-förmige Flusszellen sind in einem Sandwich nebeneinander angeordnet, so dass mehrere unterschiedliche Experimente auf einem Goldchip durchgeführt werden können. Die Rückseite für die Flusszelle des Typ A besteht aus Plexiglas. Das Volumen einer Flusszelle beträgt etwa $39 \mu\text{l}$.

Der Typ B besteht aus einer S-förmigen Flusszelle, die $18 \times 18 \text{ mm}^2$ groß ist. Zwei Stege mit einer Länge von $16 \times 1 \text{ mm}^2$ teilen die Flusszelle in drei übereinander liegende, gleichgroße Bereiche auf. Für diese Flusszelle gibt es zwei unterschiedliche Rückwände. Die eine besteht wie beim Typ A aus Plexiglas, die andere aus einem Kupferblock. Das Volumen der S-förmigen Flusszelle beträgt etwa $290 \mu\text{l}$.



Abbildung 3.6: Ansicht der Dichtungen des Typs A und B, sowie der zugehörigen Gussformen und den verwendeten Rückseiten der Flusszellen.

3.1.4 Charakterisierung der temperierbaren Flusszelle

Für einige Experimente ist es wichtig, die Temperatur der Flüssigkeit einstellen und kontrollieren zu können. Zu diesem Zweck wurde als Rückwand für die S-förmige Flusszelle ein Kupferblock mit seitlichen Zuleitungen angefertigt (siehe Abbildung 3.7). Am Rand des Kupferblocks wurde eine kleine Vertiefung eingefräst, in der ein AD590 Temperaturfühler festgeklemmt werden kann, um die Temperatur des Kupferblocks zu messen. Auf die Rückseite des Kupferblocks können ein Peltierelement (3.9 Watt) und ein Kühlkörper befestigt werden. Das Peltierelement und der AD590-Temperaturfühler können an die Temperaturregelung eines Laserdiodensteuergeräts angeschlossen werden.

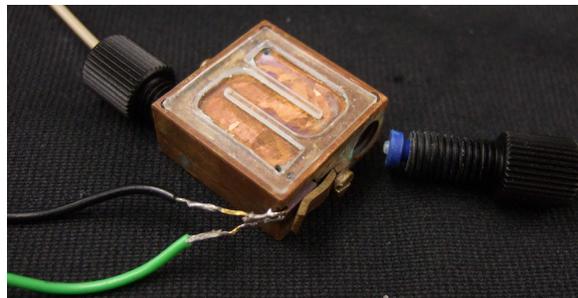


Abbildung 3.7: Die temperierbare Flusszelle besitzt einen Kupferblock als Rückwand. Der Block hat zwei seitliche Bohrungen, in denen Schläuche mit Plastikgewinden befestigt werden. Die Flüssigkeit fließt durch Kanäle im Inneren des Blocks und tritt an der Oberfläche durch kleine Öffnungen aus. Am Rand ist ein AD590 Thermofühler befestigt. Die PDMS Dichtung wird durch eine 1.5 mm tiefe Mulde auf dem Kupferblock fixiert.

Die Temperatur des Kupferblocks kann im Bereich von 5-90°C mit einer Genauigkeit von 0.01°C geregelt werden. Da die Flüssigkeit durch Zuleitungen innerhalb des Kupferblocks fließt und auch innerhalb der Flusszelle mit dem Kupferblock kontaktiert, nimmt sie die Temperatur des Kupferblocks sehr schnell an. Ob eine Flüssigkeit, die durch die Flusszelle gepumpt wird, tatsächlich die Temperatur des Kupferblocks erreicht, hängt von der Pumpgeschwindigkeit und der Temperaturdifferenz ab.

Um zu überprüfen, ob die Pumpgeschwindigkeit korrekt gewählt wurde, beobachtet man das SPR-Signal und stoppt dann den Pumpvorgang. Spätestens beim Stillstand nimmt die Flüssigkeit die Temperatur des Kupferblocks komplett an. Beobachtet man keine Änderung des SPR-Signals, bedeutet dies, dass die Flüssigkeit schon während des Pumpens die Temperatur des Kupferblocks angenommen hatte. Ansonsten wäre eine Temperatur- und damit auch eine Brechungsindexänderung die Folge, was man im SPR-Signal beobachtet hätte.

Ein Heizvorgang des Blockes von 20°C auf 50°C benötigt weniger als 60 Sekunden. Allerdings dauert es etwa 10 Minuten bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat und auch die Flüssigkeit die Temperatur angenommen hat (siehe Abbildung 3.8).

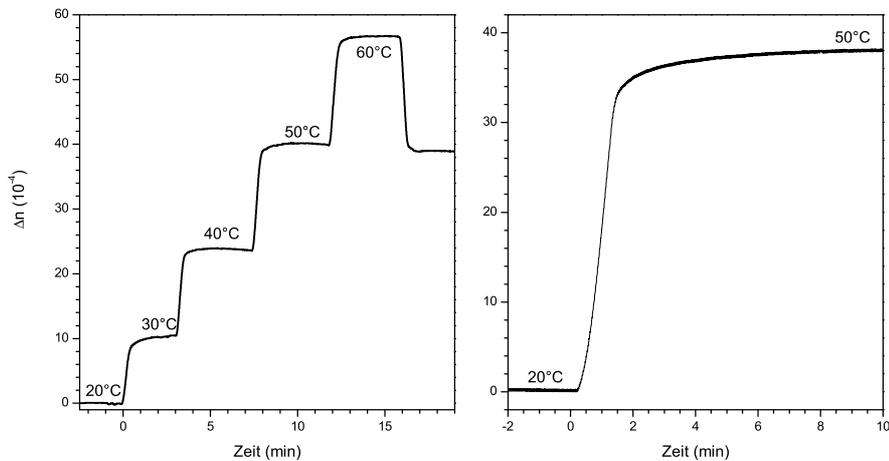


Abbildung 3.8: Die Temperaturänderung der Flüssigkeit lässt sich über das SPR-Signal beobachten, da der Brechungsindex von Wasser temperaturabhängig ist.

3.1.5 Funktionsweise der modifizierten CCD-Kamera

Eine Linse ($f=50$ mm, $d=40$ mm) zwischen Goldchip und CCD-Kamera ermöglicht die Abbildung eines bestimmten Bereiches der Goldoberfläche auf den CCD-Chip.

Um die reflektierten Intensitäten der beiden Laserdioden orts aufgelöst detektieren zu können, stehen zwei von der Firma Devael (Woltersdorf, Deutschland) modifizierte Kameras zur Verfügung - die MV 205 und die MV 285.

Die Laserdioden werden alternierend mit einer Frequenz von etwa 1.5 kHz an- und ausgeschaltet, d.h. es leuchtet jeweils nur ein Laser. Mit der gleichen Frequenz können bestimmte Zeilen auf dem CCD-Chip der beiden Kameras lichtempfindlich geschaltet werden. Man unterscheidet dabei die Zeilentypen A und B, die in einem nicht ganz regelmäßigem Muster auf dem CCD-Chip angeordnet sind (siehe Abbildung 3.9). Das Muster war durch bauartbedingt und durch die Firma Devael vorgegeben. Eine gleichmäßige Aufteilung der Zeilentypen wäre von Vorteil, da dadurch der Einfluss des Schrotrauschens auf die Empfindlichkeit verringert werden könnte (siehe Kapitel 4.2.4).

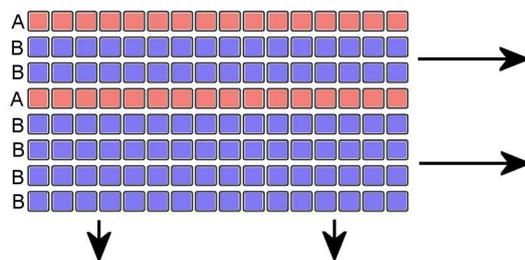


Abbildung 3.9: Die separat ansteuerbaren Zeilen des Typs A und B (rote bzw. blaue Pixel) sind in einem sich alle 8 Zeilen wiederholenden Muster auf dem CCD-Chip angeordnet.

Je ein Zeilentyp wird aktiv geschaltet, wenn einer der beiden Laser leuchtet. Diese Zeilen sammeln daher nur die reflektierte Intensität einer Laserdiode. Das Bild, das von der Kamera an den PC geliefert wird, enthält deshalb zeilenweise die Information für die eine oder andere Wellenlänge. Eine selbstentwickelte Software kann diese Informationen auswerten und die reflektierten Intensitäten für jede Wellenlänge ortsaufgelöst messen.

Sowohl die MV 205 als auch die MV 285 setzen den Sony Chip ICX285 ein und besitzen eine Auflösung von 1360×1024 Pixeln. Der einzige Unterschied besteht darin, dass die MV 205 eine Elektronenkapazität von 16000 und die MV285 eine von 36000 Elektronen pro Pixel besitzt.

Auf dem CCD-Chip ist neben jedem lichtempfindlichen Pixel ein lichtgeschützter Speicherpixel angeordnet. Normalerweise werden diese Speicherpixel genutzt um nach einer festgelegten Belichtungszeit die in den photoempfindlichen Pixeln gesammelten Elektronen zeitgleich in die Speicherpixel zu schieben und dann nacheinander auszulesen.

Bei den modifizierten Kameras wird diese Technik zweckentfremdet. Ein Frequenzgenerator speist die Kamera mit einem rechteckigem Triggersignal mit einer Frequenz von etwa 1.5 kHz. Die Laserdiodenansteuerung übernimmt dieses Signal ebenfalls.

Zu Beginn eines Triggersignals werden die photoempfindlichen Pixel in den Zeilen des Typs A zurückgesetzt und Laser A eingeschaltet. Anschließend werden in allen Pixeln Elektronen durch Photoneinfall generiert. Nachdem die halbe Triggerperiode vorbei ist und das Triggersignal fällt, werden jedoch nur die Elektronen aus den zuvor zurückgesetzten Pixeln in die Speicherpixel geschoben. Gleichzeitig werden die Zeilen des Typs B zurückgesetzt und die Laser umgeschaltet. Anschließend werden wieder Elektronen in allen Pixeln generiert, jedoch werden gegen Ende des Triggersignals nur die Elektronen aus den Zeilen des Typs B in die Speicherpixel geschoben (siehe Abbildung 3.10).

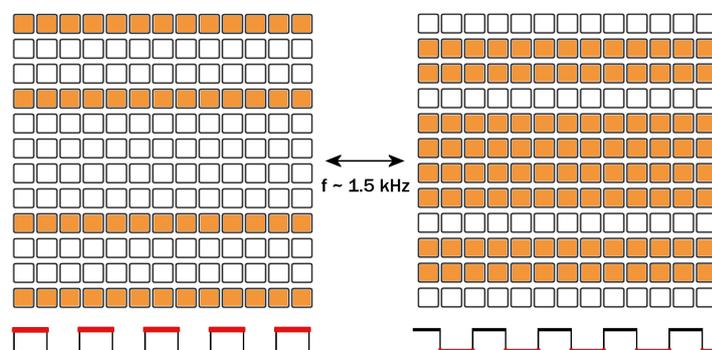


Abbildung 3.10: Die aktiven CCD Pixel (hier orange dargestellt) werden mit einer Frequenz von etwa 1.5 kHz abwechselnd geschaltet und sind jeweils während des rot markierten Bereiches des Triggersignals aktiv.

Der Kreislauf beginnt danach wieder von vorne. Durch mehrmaliges Durchlaufen dieses Zyklus werden nach und nach Elektronen in den Speicherpixeln akkumuliert.

Jeweils zu Beginn eines Triggerzyklusses überprüft die Kamera, ob eine vorher eingestellte Belichtungszeit erreicht ist. Ist dies der Fall, werden die Speicherpixel ausgelesen und das Bild an den PC transferiert.

3.1.6 Triggerung der Laserdioden

Die Laserdioden werden mit Hilfe einer im ISAS entwickelten Elektronik an- und ausgeschaltet. Dabei wird jedoch die Laserdiode nicht komplett ausgeschaltet, sondern der die Diode durchfließende Strom soweit verringert, dass er sich unterhalb der Laserschwelle befindet. Das Verhältnis der benutzten Laserintensität zur Lichtintensität, wenn der Laserdiodenstrom unter die Laserschwelle geregelt wurde, ist geringer als 10^{-3} . Durch vier Regler (je zwei pro Laserdiode) lässt sich diese Schwelle und die Geschwindigkeit, mit der der Strom wieder hochgeregelt wird, einstellen.

Hält man die Temperatur der Diode konstant und erhöht den Diodenstrom, so vergrößert sich die Wellenlänge stetig. Bei bestimmten Stromstärken wird diese stetige Änderung jedoch unterbrochen und die Wellenlänge des emittierten Lichtes ändert sich abrupt - die Laserdiode springt in eine andere Longitudinalmode. Derselbe Effekt tritt auf, wenn der Laserdiodenstrom kontinuierlich verringert wird. Allerdings sind die Sprungpunkte von der Richtung der Stromänderung abhängig (Hysterese, siehe Abbildung 3.11). Der selbe Effekt tritt auf, wenn der Strom konstant gehalten und die Temperatur geändert wird.

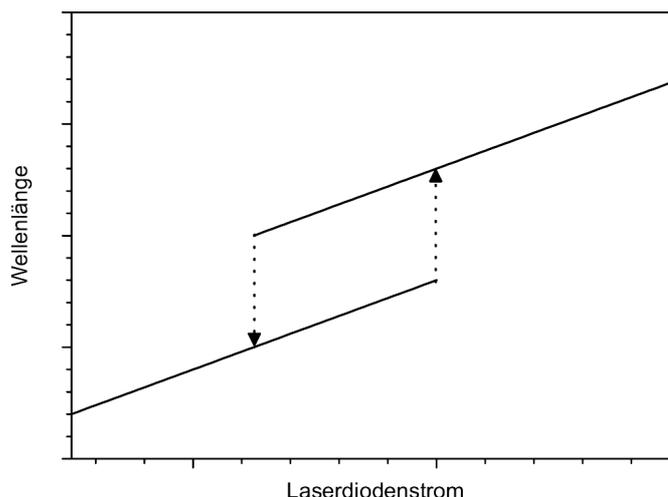


Abbildung 3.11: Die Wellenlänge einer Laserdiode ändert sich mit der Stromstärke stetig. An bestimmten Punkten springt die Laserdiode jedoch in eine andere Mode und ändert ihre Wellenlänge abrupt. Dieser Effekt besitzt eine Hysterese und ist abhängig von der Richtung der Stromänderung.

Dieser Effekt der Modensprünge tritt beim Ein- und Ausschalten ebenfalls auf. Die Temperatur der Laserdiode wird zwar über einen Kupferblock konstant gehalten, die in ihrem Inneren verändert sich durch das alternierende Ein- und Ausschalten jedoch ständig. Dadurch sind die Resonanzbedingungen in der Laserdiode nicht stabil und die Laserdiode springt bei einem ungünstig gewählten Arbeitspunkt nicht bei jedem Einschaltvorgang wieder in dieselbe Mode. Die Geschwindigkeit, mit der der Strom der Laserdiode beim Einschalten hochgeregelt wird, hat ebenfalls einen Einfluss auf die Modenstabilität, da dabei mehrere Moden durchlaufen werden.

Unterschiedliche Moden sind für die SPR-Messung nachteilig. Jede Wellenlänge besitzt einen leicht verschobenen Winkel für das SPR-Resonanzminimum. Variiert die Wellenlänge daher während der Messung, ändert sich durch die Verschiebung des Resonanzminimums die Reflektivität und ein Rauschsignal ist die Folge.

Um einen geeigneten Arbeitspunkt zu finden, setzt man in den Strahlengang ein 100 μm dickes Glasplättchen in einem 45° Winkel. Die reflektierte Strahlung sammelt man mit einer Linse auf einer Photodiode und beobachtet die Intensität mit Hilfe eines Oszilloskops.

Der Strahl wird sowohl an der Vorder- als auch an der Rückseite des Glasplättchens zu etwa 4% reflektiert. Die beiden Strahlen interferieren miteinander. Ändert sich die Wellenlänge durch einen Modensprung, so ändert sich das Interferenzmuster und damit auch die auf der Photodiode auftreffende Intensität. Auf dem Oszilloskop beobachtet man dann nicht nur ein, sondern zwei oder mehrere Intensitätsniveaus (abhängig von der Anzahl der Moden, siehe Abbildung 3.12).

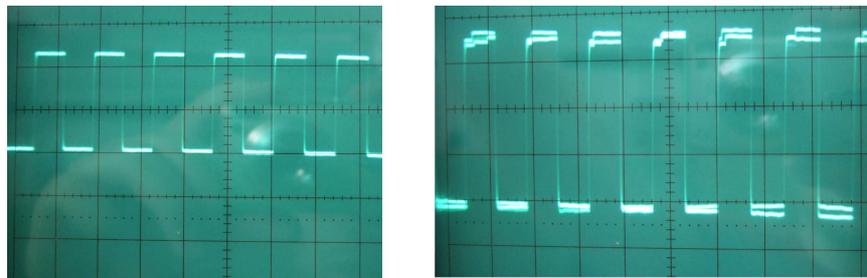


Abbildung 3.12: Das linke Bild zeigt ein Oszilloskop-Signal für eine Laserdiode ohne Modensprünge (linkes Bild). Auf dem rechten Bild ist zu erkennen, dass die Laserdiode nicht nur beim Einschalten in unterschiedliche Moden springt, sondern auch während eines Triggerzyklusses spontan die Mode wechseln kann.

Durch Variation der Temperatur und des Stromes am Laserdiodentreiber und Drehen der Regler an der Schaltelektronik versucht man den Arbeitspunkt so zu wählen, dass nur noch ein Intensitätsniveau auf dem Oszilloskop beobachtet werden kann. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass sich die Intensität des Lasers proportional zum Strom verändert. Die Intensitäten der beiden Laser müssen jedoch auf der CCD-Kamera gleich hoch sein, um eine homogene Ausleuchtung des CCD-Chips für beide Wellenlängen zu gewährleisten.

3.1.7 Software

Mit Hilfe der mit der Kamera mitgelieferten Software *MV Control* lassen sich alle wichtigen Kameraparameter einstellen. Außerdem erhält man ein Livebild der Kamera um alle Anpassungen direkt verfolgen zu können.

Die Kamera kann auch als normale Kamera benutzt werden. In diesem Fall ist die maximale Belichtungszeit für ein Bild 100 ms. Kürzere Belichtungszeiten können mit einem Schieberegler innerhalb der Software eingestellt werden. Die Bildübertragung an den PC dauert ebenfalls 100 ms. Die maximale Bildrate beträgt 5 Bilder pro Sekunde.

Wählt man den Triggermodus aus, so werden bestimmte Zeilen über eine externe Frequenzsteuerung aktiv und inaktiv geschaltet. Die Belichtungszeit t_B lässt sich in Vielfachen von $2 \mu\text{s}$ angeben. Die maximal erreichbare Framerate wird durch die Belichtungszeit und eine Konstante von 200 ms, die für den Transfer des Bildes benötigt wird, bestimmt:

$$F = \frac{1}{0.2 \text{ s} + t_B} . \quad (3.1)$$

Innerhalb der Kontrollsoftware lässt sich ebenfalls der so genannte *Gain* einstellen. Dieser ist ein Maß für die Verstärkung des A/D-Wandlers innerhalb der Kamera. Der A/D Wandler arbeitet mit einer 14-Bit Auflösung. Er sollte so eingestellt sein, dass für einen vollständig gesättigten Pixel ein Wert von 2^{14} zurückgegeben wird.

Ist der *Gain* zu hoch gewählt, so wird auch für einen noch nicht vollständig gesättigten Pixel das maximale digitale Signal ausgegeben. Das führt dazu, dass nicht die komplette Elektronenkapazität der Pixel genutzt wird.

Ist der *Gain* zu niedrig eingestellt, wird für einen komplett gesättigten Pixel nicht das maximale digitale Signal ausgegeben. In diesem Fall verringert sich die effektive Auflösung des A/D-Wandlers. Beides hat zur Folge, dass sich das Rauschen des CCD Chips verstärkt.

Der *Offset* regelt den Pegel, ab dem der A/D-Wandler eine Anzahl von Elektronen in den Pixeln als Null interpretiert. Ist der *Offset* zu niedrig, so wird selbst für einen vollständig leeren Pixel ein gewisses digitales Signal zurückgegeben. In diesem Fall wird nicht die komplette 14-bit Auflösung des A/D-Wandlers genutzt. Ist der *Offset* zu hoch, so werden auch Pixel, die eine geringe Anzahl von Elektronen gesammelt haben, als leer interpretiert. Dies kann zu einer Verfälschung der Messung führen.

Nachdem alle Parameter in der Kontrollsoftware eingestellt wurden, wechselt man zum selbstentwickelten Messprogramm *LiveProcessor*. Dieses bietet ebenfalls ein Livebild der Kamera. Wenn man dieses einfriert, lassen sich mit der Maus rechteckige Bereiche auf der Oberfläche definieren. In diesen Bereichen wird in der späteren Messung die Reflektivität und damit das SPR-Signal gemessen.

Die Software berechnet die mittlere Intensität pro Pixel für die Zeilen des Typs A und B in jedem Messbereich und zeigt sie auf dem Bildschirm an. Zusätzlich werden diese Werte subtrahiert und in einer Tabelle als Differenzsignal ausgegeben.

Zunächst werden in diesem Programm die Intensitäten der Laser abgeglichen. Dazu setzt man einen Messbereich auf eine Stelle, in der das Licht totalreflektiert wird (bspw. die PDMS Dichtung). Dann gleicht man die Intensitäten der Laser über Regulation des Laserdiodenstroms ab.

Anschließend werden eine oder mehrere Messbereiche, an Stellen die Oberflächenplasmonenresonanz zeigen, positioniert. Der grobe Winkel wurde bereits vorher mit einer Fluoreszenzkarte per Auge eingestellt. Nun wird der Winkel feinjustiert, so dass die Wellenlängen auf den gegenüberliegenden Seiten der Resonanzkurve liegen und eine gleich hohe Reflektivität besitzen.

Dann werden je nach Art des Experimentes Messbereiche auf der Goldoberfläche platziert und anschließend in den Livemodus gewechselt. Dort werden kontinuierlich die Bilder der Kamera für die gesetzten Messflächen ausgewertet und der zeitliche Verlauf des Differenzsignals in einem Diagramm dargestellt. Dadurch lassen sich in-situ Änderungen der Resonanzkurve in allen Messbereichen beobachten.

Die Software speichert jedoch sowohl die Daten für die einzelnen Wellenlängen als auch das Differenzsignal für eine spätere Auswertung in einer Textdatei. Zusätzlich kann die Software sowohl automatisch zu bestimmten Zeitpunkten als auch manuell einzelne Bilder abspeichern. Dies ist nützlich, um evtl. auftretende Luftblasen in der Flusszelle später identifizieren zu können.

3.1.8 Fluidikdesign

Eine Schlauchpumpe des Typs Gilson Minipuls 2 dient der Fluidiksteuerung. Die maximale Flussrate beträgt etwa 2 ml pro Minute (abhängig vom Gegendruck im Schlauchsystem) und ist stufenlos einstellbar.

Die Pumpe ist vor der Flusszelle eingebaut und drückt die Flüssigkeit durch das Schlauchsystem. Dies wirkt einer möglichen Luftblasenbildung in den Schläuchen entgegen, da ein leichter Überdruck im Schlauchsystem entsteht.

Luftblasen müssen vermieden werden, da sie meistens nicht problemlos durch die Flusszelle gepumpt werden, sondern dort verharren und im Laufe der Zeit weiter wachsen. Gelangt eine Luftblase in den Messbereich, muss die Messung abgebrochen werden.

Um Luftblasen aus der Flusszelle zu entfernen, ist zwischen Pumpe und Flusszelle ein Ventil für eine Spritze zwischengeschaltet. Mit dieser können Luftblasen mit hohem Druck aus der Flusszelle entfernt werden.

3.2 Normierung der Empfindlichkeit

Unter optimalen Bedingungen würde die Goldoberfläche komplett homogen beleuchtet. Dies ist jedoch in der Realität nie der Fall, da die Laserdiode ein gaußförmiges Intensitätsprofil aufweist und es durch Linsen, Strahlteiler und Staubkörner Interferenz- und Beugungseffekte gibt. Daher lassen sich absolute Intensitätsänderungen, die die Kamera an unterschiedlichen Stellen misst, nicht vergleichen.

Außerdem weisen die Resonanzbedingungen auf der Goldoberfläche lokale Inhomogenitäten auf. Dies ist auf eine nicht ganz homogene Bedampfung des Glasplättchens zurückzuführen. Sie treten jedoch auch auf, wenn bestimmte Bereiche mit Biomolekülen präpariert sind, die eine Verschiebung der Resonanzkurve zur Folge haben.

Da üblicherweise in unterschiedlichen Bereichen auf der Goldoberfläche Messungen vorgenommen werden, die Ergebnisse aber vergleichbar sein müssen, wird vor jedem Experiment eine Normierung vorgenommen. Dabei nutzt man aus, dass sich die Resonanzkurve bei einer Änderung des Brechungsindex der Flüssigkeit gleichförmig und unabhängig von einer unterschiedlichen Präparationen der Sensorfläche verschiebt.

Vor jedem Experiment wird zunächst Puffer gepumpt, um eine stabile Basislinie zu erreichen. Anschließend wird Puffer gepumpt, dessen Brechungsindex um einen bestimmten Wert verändert wurde. In allen Messbereichen beobachtet man daraufhin eine Änderung des Resonanzsignals. Die Höhe der Änderung ist abhängig von der Lage der Resonanzkurve und der eingestrahlten Laserintensität in diesen Messboxen.

In einer späteren Auswertung wird die Höhe dieses Signals zur Normierung der Messung genutzt. Wässrige Puffer wurden mit 0.3% NaCl versetzt. Dies hat eine Änderung des Brechungsindex von 4.5×10^{-4} zur Folge [30]. Wurde Ethanol als Puffer verwendet, wurde 0.5% H₂O zugegeben, was eine Änderung des Brechungsindex von 2.4×10^{-4} zur Folge hat [30].

3.3 Herstellung der Polydimethylsiloxan Dichtungen

Die Dichtungen der Flusszellen sowie die Flusszelle für die Mikrostrukturierung der Goldoberfläche (siehe Kapitel 5.1.3) bestehen aus Polydimethylsiloxan (PDMS), das farblos, ungiftig und chemisch inert ist. Es wird durch Mischen der Komponenten Silikon Elastomer und Curing Agent (Sylgard) im Verhältnis 10:1 hergestellt. Die beiden flüssigen Komponenten führen im Zusammenspiel dazu, dass sich Dimethylsilylgruppen über Sauerstoffbrücken miteinander verbinden und nach Erwärmen die Flüssigkeit erstarrt und in einer elastischen Form verhartet.

Zuerst wird das flüssige Gemisch jedoch für etwa 45 Minuten in einen evakuierten Exsikkator gegeben. Dadurch werden Luftblasen aus der Mischung entfernt.

Anschließend wird die Lösung in eine Gussform aus Aluminium gefüllt (siehe Abbildung 3.6). Die Gussform besitzt eine 1 mm tiefe Mulde, die in ihrer Form der gewünschten Dichtung entspricht. Überschüssiges PDMS an der Oberseite wird durch Abstreifen mit einem dünnen Glasplättchen entfernt. Anschließend wird der Metallblock auf eine Heizplatte gestellt und das PDMS bei 80°C circa 10 Minuten ausgehärtet. Danach kann die Dichtung aus der Gussform vorsichtig herausgelöst werden.

Die Herstellung einer Maske zur Mikrostrukturierung der Goldoberfläche erfolgt ähnlich. Allerdings besteht die Form aus einem Hohlraum, der komplett mit PDMS gefüllt wird, so dass das Abstreichen überflüssigen PDMS entfällt. Da außerdem das Volumen größer ist, muss die Zeit zum Aushärten verdoppelt werden.

$$V = \frac{b}{g} . \quad (4.2)$$

Selbst wenn das System optimal justiert ist, wird eine punktförmige Lichtquelle in der Gegenstandsebene bekanntermaßen als kreisförmiger Fleck mit dem Durchmesser s in der Bildebene dargestellt. Die Größe des Kreises wird durch die Apertur des optischen Systems bestimmt

$$s \approx 1.22 \times \frac{\lambda b}{d} . \quad (4.3)$$

Dabei bezeichnet λ die verwendete Wellenlänge und d den Durchmesser der Linse. Allerdings ist die dafür notwendige optimale Justage beim SPR-Imaging nicht möglich, da die abzubildende Goldoberfläche schräg zur optischen Achse steht. Das führt dazu, dass die korrekte Bildebene ebenfalls schräg zur optischen Achse steht. Die Photonenausbeute von CCD-Kameras ist jedoch stark winkelabhängig (siehe Abbildung 4.2) und fällt bereits für leichte Neigungswinkel stark ab. Die CCD-Kamera und damit auch die Bildebene muss daher meist senkrecht zur optischen Achse positioniert werden. Die korrekte Gegenstandsebene steht dann jedoch ebenfalls senkrecht zur optischen Achse. Wenn die CCD-Kamera etwas verkippt justiert werden kann, verbessert dies die optische Abbildung leicht, da dann auch die Gegenstandsebene leicht schräg steht.

Der Einfallswinkel für Oberflächenplasmonenresonanz und damit auch die Kippung der Goldoberfläche zur optischen Achse beträgt für $\lambda = 800$ nm ungefähr 60° . Allerdings durchlaufen die Strahlen ein Prisma mit einem Brechungsindex von 1.61. Dadurch verkürzt sich der optische Weg im Prisma und die Schrägstellung reduziert sich auf etwa 47° (siehe Abbildung 4.3).

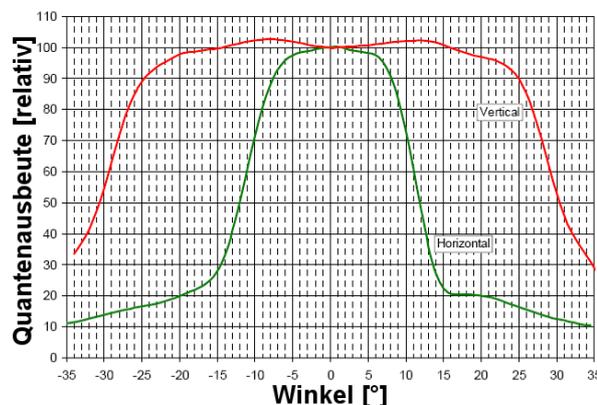


Abbildung 4.2: Die Quantenausbeute einer CCD-Kamera (hier exemplarisch für den Kodak KAI 1020 Chip gezeigt) ist abhängig vom Winkel des einfallendes Lichtes (horizontaler Einfall grün, vertikaler Einfall rot; aus [31]).

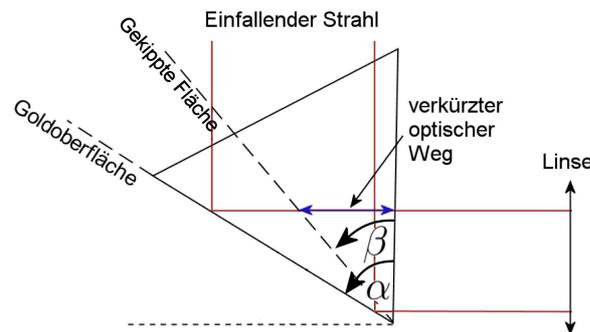


Abbildung 4.3: Die Goldoberfläche ist gegenüber der optischen Achse um etwa 60° (α) gekippt. Da der Lichtstrahl jedoch das Prisma durchläuft und dabei der optische Weg verkürzt wird, reduziert sich die Schrägstellung auf etwa 47° (β) bei einem Brechungsindex des Glases von 1.61.

Die Schrägstellung der Goldebene hat auch Auswirkungen auf die Abbildung durch die Linse. Während in einer Dimension die Gleichung 4.2 weiterhin Gültigkeit besitzt, werden Strukturen auf der Goldoberfläche in die andere Dimension um einen zusätzlichen Faktor $1/\cos\beta$ gestaucht. Dies und natürlich auch die Dimensionen des CCD-Chips müssen bei der optimalen Anordnung von Biorezeptorflächen auf der Goldoberfläche berücksichtigt werden.

Die Gegenstandsebene steht wie auch die Bildebene senkrecht zur optischen Achse. Die abbildende Linse wird meist so justiert, dass sich die Gegenstandsebene in der Mitte des abzubildenden Bereiches der Goldoberfläche befindet. Dort befindliche Strukturen werden auf dem CCD-Chip scharf abgebildet. Strukturen in den Randbereichen können jedoch nicht ohne Beugungseffekte auf den CCD-Chip projiziert werden. Da der Abstand der abzubildenden Strukturen zur Gegenstandsebene jedoch nur gering ist, handelt es sich dabei um Beugung im Nahfeld. Beugungseffekte treten überall dort auf, wo eine leicht unterschiedliche Reflektivität auf der Goldoberfläche auftritt (bspw. durch zwei unterschiedliche präparierte Biorezeptorflächen hervorgerufen). Das exakte Beugungsmuster lässt sich im Rahmen der Fresnel-Beugung im Allgemeinen nur numerisch berechnen [32, 33].

Um trotzdem eine Abschätzung der optischen Auflösung liefern zu können, kann der Abstand der Beugungsmaxima geometrisch bestimmt werden. Dazu betrachtet man das Beugungsmuster, das Strukturen, die am Rand der Goldoberfläche liegen, in der Gegenstandsebene besitzen. Dieses Beugungsmuster in der Gegenstandsebene kann als ein neues Bild betrachtet werden, das durch die Linse ohne weitere Beugungseffekte auf den CCD-Chip projiziert wird.

Zunächst betrachtet man dazu eine planare Wellenfront, die sich auf einen Beobachtungspunkt P zu bewegt (siehe Abbildung 4.4). Der Abstand der Front zum Beobachtungspunkt ist w . Durch den Punkt P werden nun Kreise gezogen mit Radien, die sich jeweils um $\lambda/2$ unterscheiden

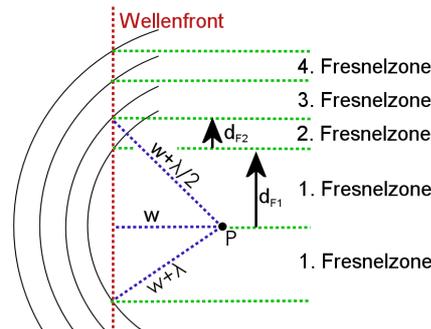


Abbildung 4.4: Kreise durch den Beobachtungspunkt P , deren Radii sich jeweils um $\lambda/2$ unterscheiden, teilen die Wellenfront in Fresnelzonen ein. Benachbarte Fresnelzonen haben einen Gangunterschied von $\lambda/2$ und interferieren destruktiv. Bei einer ungestörten Wellenfront löschen sich die äußeren Fresnelzonen aus, nur die innerste trägt zur Intensität am Beobachtungspunkt P bei.

$$w, \quad w + \frac{\lambda}{2}, \quad w + \frac{2\lambda}{2}, \quad w + \frac{3\lambda}{2}, \quad \dots, \quad w + \frac{j\lambda}{2}.$$

Die Schnittpunkte der Kreise mit der parallelen Strahlenfront unterteilen diese in so genannte Fresnelzonen [7]. Benachbarte Fresnelzonen haben eine Phasenverschiebung von $\lambda/2$ und interferieren destruktiv miteinander. Bei einer ungestörten Wellenfront treten keine Beugungseffekte auf, da nur die innerste Fresnelzone zur Intensität am Beobachtungspunkt beiträgt und sich das Licht aus den äußeren Fresnelzonen gegenseitig auslöscht.

Die hier skizzierte geometrische Lösung berücksichtigt nicht die Schrägstellung der Goldoberfläche, da es sich lediglich um eine Abschätzung handelt. Die Breite der n -ten Fresnelzone d_{Fn} ist vom Abstand w abhängig und lässt sich berechnen als

$$d_{Fn} = \lambda \left(\sqrt{\frac{2wn}{\lambda} + n^2} - \sqrt{\frac{2w(n-1)}{\lambda} + (n-1)^2} \right). \quad (4.4)$$

Um die Beugungsmuster, die an einer Strukturen auf der Goldoberfläche entstehen, abzuschätzen, betrachtet man die planare Wellenfront, deckt jedoch den unteren Teil durch eine Blende ab (siehe Abbildung 4.5). Dies entspricht der Situation, dass man die Kante einer Struktur, die auf der Oberfläche durch Intensitätsunterschiede entsteht, beobachtet. Die Intensität im Beobachtungspunkt fällt auf ein Viertel der ursprünglichen Intensität ab, da nur noch die Hälfte der mittleren Fresnelzone zur Intensität beiträgt. Das Licht aus den äußeren Fresnelzonen löscht sich jedoch weiterhin gegenseitig aus. Die Intensität verringert sich um dem Faktor 4, da für die Intensitätsberechnung die Amplitude der Wellenfront quadriert werden muss.

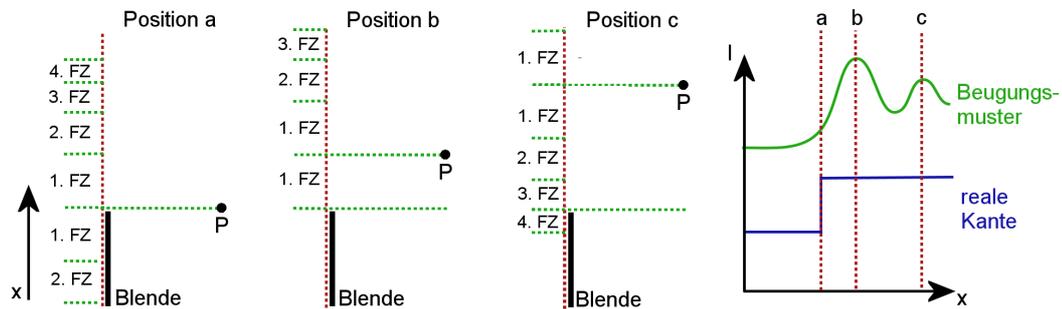


Abbildung 4.5: In Position a trägt nur die halbe innerste Fresnelzone zur Intensität im Beobachtungspunkt P bei. In Position b trägt die komplette innere Fresnelzone zur Intensität bei, so dass sich das erste Beugungsmaximum beobachten lässt. Der Abstand des ersten Beugungsmusters vom tatsächlichen Rand der abzubildenden Struktur entspricht daher der Größe der ersten Fresnelzone. In Position c löschen sich die zweite und dritte Fresnelzone komplett aus, so dass das erste Nebenmaximum erscheint.

Das erste Beugungsmaximum der Struktur erhält man, wenn der Beobachtungspunkt soweit verschoben wird, dass die komplette innere Fresnelzone wieder zur Intensität beiträgt. Auf den ersten Blick würde man dies als den Rand der Struktur identifizieren. Dabei weicht es um d_{F1} vom tatsächlichen Rand ab.

Neben dem ersten Beugungsmaximum erhält man weitere Nebenmaxima, deren Intensitäten jedoch zur Mitte der Struktur hin abnehmen. Das erste Nebenmaximum erkennt man, wenn zwei weitere Fresnelzonen zur Intensität im Beobachtungspunkt beitragen. Es tritt also im Abstand $d_{F2} + d_{F3}$ auf.

Die geometrische Betrachtung versagt, wenn die zu beobachtende Struktur auf der Oberfläche die gleiche Größenordnung wie die Fresnelzonen hat. Dann interferieren Maxima und Nebenmaxima von beiden Seiten der Struktur und das resultierende Beugungsmuster lässt sich nur numerisch bestimmen. Das Beugungsmuster wird jedoch irgendwo zwischen dem oben skizzierten und einer gaußförmigen Intensitätsverteilung liegen.

Die laterale Auflösung der optischen Abbildung ist also durch zwei Faktoren begrenzt. Zum einen durch die Apertur des optischen Systems. Diese Begrenzung gilt für alle Strukturen auf der Goldoberfläche. Die zweite Begrenzung ergibt sich durch die Schrägstellung der Goldoberfläche. Dadurch ist es nur möglich einen schmalen Streifen auf der Goldoberfläche ohne Beugungsmuster abzubilden. Alle Strukturen, die links bzw. rechts davon liegen, zeigen Fresnelbeugung. Die Größe dieses Beugungseffektes ist abhängig vom Abstand der Struktur zur Gegenstandsebene.

Um eine Vorstellung von diesen Größen in einem realen Experiment zu bekommen, wird die laterale Auflösung am Beispiel einer mikrostrukturierten Goldoberfläche diskutiert. Auf der Goldoberfläche befinden sich $200 \mu\text{m}$ breite Protein-Streifen in einem Abstand von $400 \mu\text{m}$. Durch die Verschiebung der Resonanzkurve erscheinen die Protein-Streifen dunkel (siehe Abbildung 4.6).

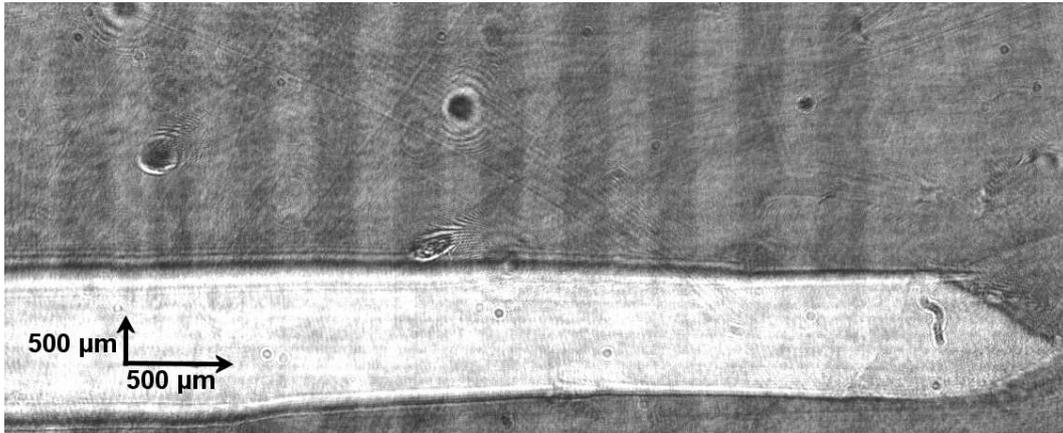


Abbildung 4.6: Die Bereiche, die mit einem Proteinmonolayer bedeckt sind, erscheinen dunkler. An der PDMS Dichtung existiert Totalreflexion, so dass sie deutlich heller ist als die Fläche in der Oberflächenplasmonenresonanz auftritt. Die Gegenstandsebene befindet sich rechts von der Mitte des Bildes. Die Strukturen dort werden deutlich schärfer abgebildet als am linken Rand.

Die Abbildung auf den CCD-Chip betrug etwa 1:1. Die Apertur ergibt sich mit der verwendeten Linse ($f=50$ mm, $d=50$ mm) als 0.5. Die kleinste laterale Auflösung ist daher $2 \mu\text{m}$ für Strukturen auf der Goldoberfläche, die sich direkt in der Gegenstandsebene befanden. Die Protein-Streifen mit den schärfsten Kanten befinden sich etwas rechts von der Mitte des Bildes.

Der äußerste linke Streptavidin-Streifen ist etwa 3 mm vom scharf abgebildeten Streifen entfernt. Durch die Verkippung und die Verkürzung des optischen Weges durch das Prisma, entspricht das einem Abstand der Strukturen am äußersten linken Rand zur Gegenstandsebene von etwa 2 mm.

Die Größe der ersten Fresnelzone beträgt daher etwa $56 \mu\text{m}$. Dies ist die Verschiebung des ersten Beugungsmaximums gegenüber des tatsächlichen Randes der Struktur. Die Breite der zweiten und dritten Fresnelzonen sind 24 bzw. $18 \mu\text{m}$. Die Breite der Streptavidinstreifen hat die gleiche Größenordnung wie die erste Fresnelzone. Die oben skizzierte Beugungsstruktur mit Haupt- und Nebenmaxima tritt daher nicht auf, da sich die Beugungsstrukturen überlagern.

Ein Intensitätsprofil durch den äußerst linken Streptavidinstreifen zeigt Abbildung 4.7. An den Rändern der Streptavidinstreifen treten Überschwinger auf, die aus der Fresnelbeugung resultieren. Nebenmaxima sind nicht zu erkennen. Das Intensitätsprofil durch einen Streptavidinstreifen, der in der Mitte des Bildes liegt, zeigt diese Überschwinger nicht, da hier keine Fresnelbeugung auftritt. Auch mit bloßem Auge erscheint der äußerst linke Streifen deutlich unschärfer als die Streptavidinstreifen in der Mitte des Bildes.

Wenn man die Totalreflexion an der etwa 1 mm breiten PDMS-Dichtung beobachtet, so erkennt man dort die typischen Fresnelbeugungsmuster mit Haupt- und Nebenmaxima

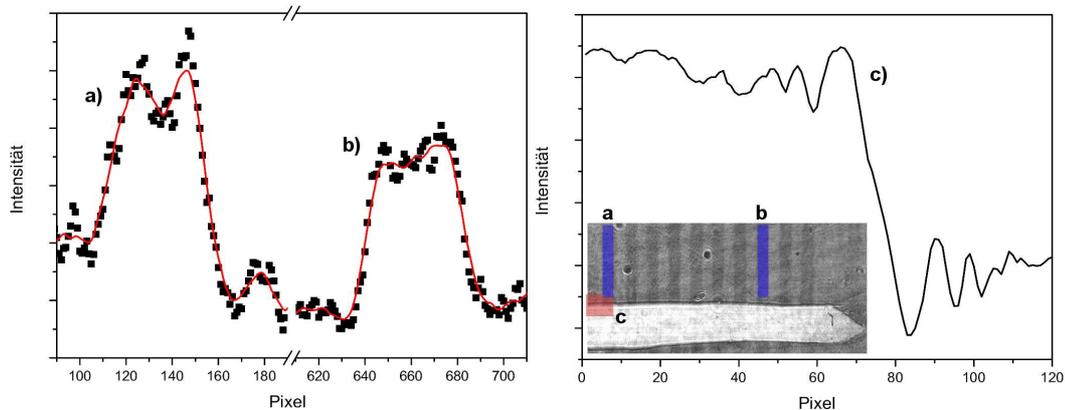


Abbildung 4.7: Intensitätsprofil durch zwei Streptavidinstreifen, die in der Abbildung blau markiert sind: Der linke Streptavidinstreifen zeigt im Gegensatz zum rechten Streptavidinstreifen Beugungseffekte. Rechts ist das Intensitätsprofil an der PDMS Dichtung gezeigt (rot markierter Bereich). Dort sind sowohl Haupt- als auch Nebenmaxima zu erkennen.

(siehe rechten Teil der Abbildung 4.7). Die Beugungsmuster werden zur Mitte des Bildes hin enger, da sich die erste Fresnelzone zur Gegenstandsebene hin ebenfalls verkleinert.

4.2 Begrenzung der Empfindlichkeit

Die Messung von Intensitätsveränderungen ist die Grundlage für SPR Imaging. Dies erfordert jedoch eine möglichst intensitätsstabile Lichtquelle, weil jede Fluktuation der Intensität eine Verschiebung der Resonanzkurve vortäuscht. Dies zeigt sich als Rauschsignal auf der Basislinie. Der Zusammenhang zwischen Intensitätsfluktuationen und dem Rauschen der Basislinie (ausgedrückt in Δn) beträgt etwa

$$\Delta n \approx \frac{1}{300} \frac{\Delta I}{I} \quad \text{für die Messung mit einer Wellenlänge und}$$

$$\Delta n \approx \frac{1}{600} \frac{\Delta I}{I} \quad \text{für die Messung mit zwei Wellenlängen.}$$

4.2.1 Stabilisierung der Lichtintensität

Die besten kommerziellen SPR-Geräte, die jedoch nur die Messung einer einzelnen, großflächigen Bioreaktion erlauben, weisen ein Rauschsignal von 3×10^{-7} RIU der Basislinie auf. Um dieses Niveau zu erreichen, müsste die Lichtquelle beim SPR-Imaging eine Intensitätsstabilität von etwa 1×10^{-4} für die Messung mit einer Wellenlänge bzw. 2×10^{-4} für die Messung mit zwei Wellenlängen besitzen.

Beim Aufbau mit zwei Wellenlängen sind die Intensitäten der beiden Laser gleich stark. Da die Laser abwechselnd ein- und ausgeschaltet werden, kann eine Photodiode und ein nachgeschalteter Lock-In-Verstärker genutzt werden, um das Differenzsignal der beiden Intensitäten zu messen. Dieses Signal ist sehr klein. Dadurch ist es leichter, auch geringe Schwankungen der Intensitäten über diesem niedrigen Differenzsignal zu messen. Der Ausgang des Lock-In Verstärkers kann außerdem auch als Rückkopplung genutzt werden. Dazu schließt man ihn an einen der beiden Laserdiodencontroller an. Registriert der Lock-In-Verstärker eine Intensitätsfluktuation, regelt dieser den Diodenstrom eines Lasers nach und stabilisiert dadurch das Differenzsignal der beiden Laserstrahlen.

Dabei ist unerheblich, welcher Laser die ursprüngliche Fluktuation erzeugt hat. Erhöht sich die Intensität eines Lasers durch Rauschen und die des anderen durch die Rückkopplung, ändert sich zwar die mittlere Intensität der beiden Laser. Das Differenzsignal wird davon jedoch nicht beeinflusst. Und dies ist auch die Messgröße in einem SPR-Imaging Experiment mit zwei Wellenlängen. Dort wird ebenfalls das Differenzsignal der beiden Intensitäten gemessen. Eine gleichmäßige Änderung der mittleren Intensitäten der Laser wird dabei kompensiert. Es sollte daher getestet werden, ob die Strahlqualität in einem SPR-Imaging Experiment mit zwei Wellenlängen durch eine Rückkopplung verbessert werden kann, um eine stabilere Beleuchtung zu realisieren.

Um das Potential dieser Technik zu testen, werden zwei dünne Laserstrahlen ($d \approx 1$ mm) vereinigt und mit einem Strahlteiler in zwei Strahlengänge aufgeteilt (siehe Abbildung 4.8). Die Laser werden wie beim SPR-Imaging mit einer Frequenz von etwa 1.5 kHz abwechselnd eingeschaltet. Zwei Photodioden, denen jeweils ein Lock-In-Verstärker nachgeschaltet ist, messen das Differenzsignal der beiden Intensitäten in je einem Strahlengang. Der Ausgang eines Lock-In-Verstärkers kann als Rückkopplung für die Strommodulation einer Laserdiode hinzugeschaltet werden. Der andere Lock-In-Verstärker wird zur Messung der Strahlqualität genutzt.

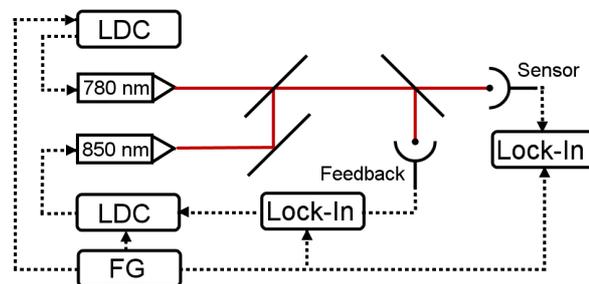


Abbildung 4.8: Aufbau zur Stabilisierung der Lichtintensität zweier dünner Laserstrahlen mit Hilfe einer Rückkopplung: Zwei Photodioden werden mit Hilfe von zwei nachgeschalteten Lock-In-Verstärker zur Messung der Strahlqualität eingesetzt. Ein Lock-In-Verstärker kann mit einem Laserdiodencontroller (LDC) verbunden werden und als Rückkopplung dienen. Die Laserdioden werden mit einer Frequenz von etwa 1.5 kHz getriggert. Als Triggerquelle dient ein Frequenzgenerator (FG).

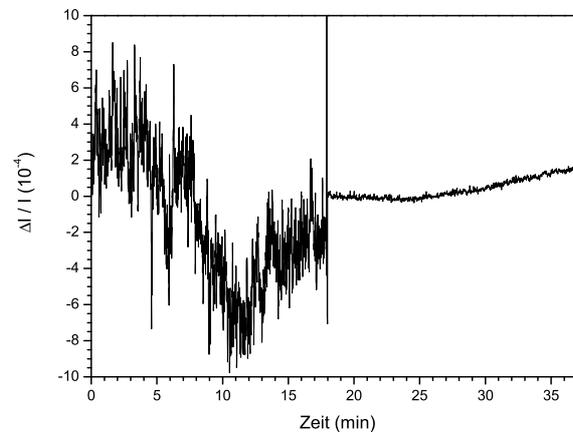


Abbildung 4.9: Messung der Intensitätsstabilität zweier vereinigter, dünner Laserstrahlen. Die Rückkopplung wurde nach 19 Minuten dazugeschaltet. Die Strahlqualität verbessert sich durch die Rückkopplung um einen Faktor sechs.

Ohne Rückkopplung betrug die Intensitätsstabilität in diesem Experiment $\Delta I/I = 3.7 \times 10^{-4}$. Dies entspräche einem theoretischem Rauschen der Basislinie von etwa 6×10^{-7} RIU. Nach 19 Minuten wurde die Rückkopplung zugeschaltet. Dies stabilisierte die Intensität auf 6×10^{-5} (siehe Abbildung 4.9). Dies entspräche einem Rauschen der Basislinie von etwa 9×10^{-8} RIU.

In einem nächsten Schritt soll geklärt werden, ob auch für einen aufgeweiteten Strahl eine Rückkopplung zur Stabilisierung der Intensität möglich ist. Dazu wird ein Teil eines aufgeweiteten Strahls mit Hilfe eines Glaskeils ausgekoppelt. Die keilartige Form des Strahlteilers ist nötig, um Interferenzen der Reflexionen an Vorder- und Rückseite zu vermeiden. Der teilreflektierte Strahl von einer Fläche des Glaskeils wird mit Hilfe einer Linse auf eine Photodiode gebündelt. Ein Lock-In-Verstärker misst dort das Differenzsignal und dient als Rückkopplung für einen der beiden Laser.

Da die CCD-Kamera nur einen Teil des aufgeweiteten Strahls beobachtet, die Rückkopplungsphotodiode jedoch den kompletten Strahl nutzt, wird vor den Glaskeil eine rechteckige Blende eingebaut. Diese begrenzt den aufgeweiteten Strahl, so dass er als eine rechteckige Fläche auf dem CCD-Chip beobachtet werden kann. Dadurch ist sichergestellt, dass sowohl die CCD-Kamera als auch die Photodiode das gleiche Licht detektieren. Verzichtet man auf die Blende, so lässt sich die Strahlqualität durch die Rückkopplung nicht verbessern.

In der Messsoftware wird die Intensität des Lichtstrahls in einem großen Bereich, der fast den gesamten Lichtstrahl abdeckt, gemessen. Ebenso werden einige kleinere Bereiche ausgewählt in denen die Auswirkung der Rückkopplung ebenfalls beobachtet wird.

Die Intensitätsstabilität des aufgeweiteten Strahls im großen Bereich betrug ohne Rückkopplung 3.6×10^{-4} und mit Rückkopplung 6×10^{-5} (siehe Abbildung 4.10).

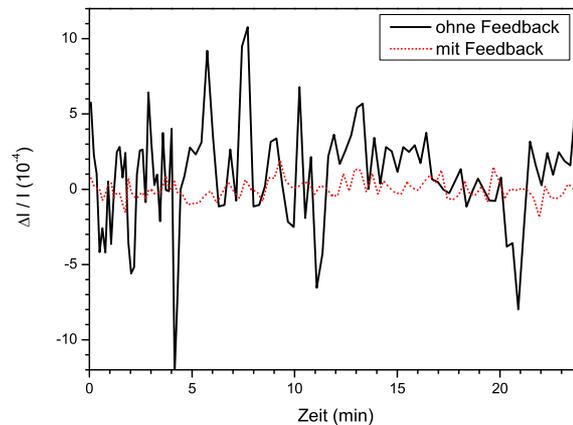


Abbildung 4.10: Messung der Intensitätsstabilität eines aufgeweiteten Strahls mit und ohne Rückkopplung: Die Strahlqualität verbessert sich durch die Rückkopplung um einen Faktor sechs.

Die Rückkopplung verbesserte also wie im Fall der unaufgeweiteten Laserstrahlen die Intensitätsstabilität um den Faktor sechs.

Jedoch war die Verbesserung durch die Rückkopplung in den kleineren Bereichen deutlich schlechter. Circa 2/3 der Boxen erfuhren lediglich eine Verbesserung des Rauschens um etwa einen Faktor 1.5. Die übrigen Boxen zeigten keine Verbesserung oder eine leichte Verschlechterung der Intensitätsstabilität durch die Rückkopplung. Dies ist bemerkenswert, da alle kleineren Bereiche zusammengenommen in ihrer Gesamtfläche ziemlich genau der Fläche des großen Bereiches entsprachen. Dort verbesserte sich die Strahlqualität jedoch um einen Faktor sechs.

Der Grund liegt in nicht statischen Interferenzmustern. Sie lassen sich mit bloßem Auge nicht beobachten, da ihre Modulationstiefe sehr gering ist und im Promillebereich der Gesamtintensität liegt. Um diese Strukturen sichtbar zu machen, müssen zwei Bilder, die mit einem gewissen zeitlichem Abstand aufgenommen wurden, in einem Bildbearbeitungsprogramm Pixel für Pixel voneinander abgezogen werden. Passt man den Kontrast an, so lassen sich Interferenzstrukturen erkennen, die sich im Laufe der Zeit verändert haben (siehe Abbildung 4.11).

Die Interferenzmuster können durch Staubkörner auf Linsen, Beugungseffekte an Linsen und Blenden oder durch Interferenzen an optischen Bauteilen entstehen. Die Photodiode kann diese lokalen Inhomogenitäten nicht beobachten, da sie stets nur die Gesamtintensität detektiert. Trotz der geringen Modulationstiefe der Interferenzen beeinflussen diese die Stabilität der Lichtintensität negativ, da das gemessene Differenzsignal unterhalb des Promillebereiches der Gesamtintensität liegt ($\Delta I/I < 10^{-3}$).

Die nicht statischen Interferenzmuster sind vor allem bei der Beobachtung kleinerer Bereiche störend, da dort die Randbereiche im Vergleich zur kompletten Messfläche größer sind. Ein Interferenzmaximum, das sich aus einem Beobachtungsbereich her-

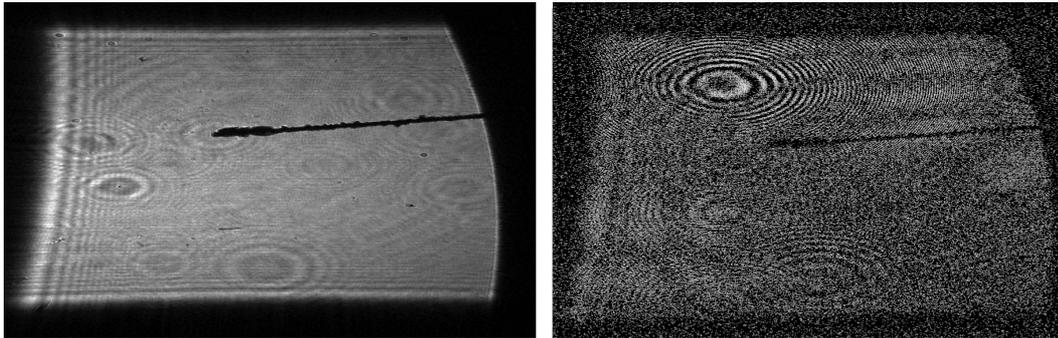


Abbildung 4.11: Für die Intensitätsmessung eines aufgeweiteten Strahls wurde vor den Glaskeil eine rechteckige Blende gesetzt, so dass sowohl die CCD-Kamera als auch die Rückkopplungsphotodiode das selbe Licht detektieren (linkes Bild). Subtrahiert man zwei in einem gewissen zeitlichen Abstand gemachte Bilder voneinander und passt den Kontrast an, so erkennt man nicht statische Interferenzmuster, die sich im Laufe der Zeit verändern (rechtes Bild). Man beachte vor allem das Interferenzmuster im oberen linken Bereich, das im Ursprungsbild nicht erkennbar ist.

ausbewegt, führt zu einer deutlich stärkeren Störung der mittleren Intensität als ein Interferenzmaximum, das sich innerhalb eines Beobachtungsbereiches bewegt. Das erklärt auch, warum die Rückkopplung für den großen Bereich gut funktionierte, aber nur geringe oder gar keine Verbesserung in den kleineren Bereichen beobachtbar war.

Die Gründe für die nicht statischen Interferenzmuster lassen sich leider meist nicht lokalisieren, da sie fast immer eine so geringe Modulationstiefe der Interferenz besitzen, dass sie im Originalbild nicht sichtbar sind.

4.2.2 Einfluss der Wellenlängenstabilität

Es zeigt sich leider jedoch, dass eine Stabilisierung der Lichtintensität für ein SPR-Experiment nicht der einzige entscheidende Faktor ist. Eine Kretschmannanordnung, die einen Oberflächenplasmoneneffekt zeigt, ist ein spektral empfindliches Element. Es muss daher auch die Stabilität der eingestrahnten Wellenlängen berücksichtigt werden.

Den Einfluss der Wellenlänge der emittierten Strahlung auf ein SPR-Experiment, lässt sich am einfachsten im Aufbau mit den unaufgeweiteten Laserstrahlen testen. Dazu wird hinter dem Strahlteiler zusätzlich eine Kretschmann-Anordnung in den Strahl gesetzt. Die Rückkopplungsphotodiode misst dabei weiterhin den direkten Strahl, die Messdiode misst den Strahl jedoch erst hinter dem SPR Aufbau (siehe Abbildung 4.12).

Ist der Einfallswinkel der Kretschmannanordnung so gewählt, dass der Laserstrahl totalreflektiert wird und keine Oberflächenplasmonenresonanz auftritt, verbessert die Rückkopplung die Intensitätstabilität wie erwartet. Die Intensitätstabilität $\Delta I/I$ betrug

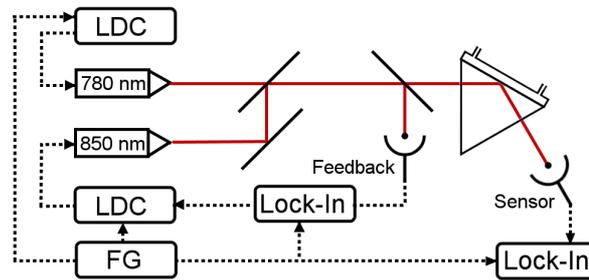


Abbildung 4.12: Die Skizze zeigt den Aufbau zur Messung der Strahlqualität hinter einer Kretschmann-Anordnung mit Rückkopplung.

2.1×10^{-4} ohne Rückkopplung und 2.5×10^{-5} mit Rückkopplung.

Dreht man die Kretschmannanordnung jedoch so, dass sich die beiden verwendeten Wellenlängen auf den gegenüberliegenden Seiten der Resonanzkurve befinden, so lässt sich keine Verbesserung mehr beobachten. Die gemessene Intensitätsstabilität hinter der Kretschmann-Anordnung betrug mit und ohne Rückkopplung weiterhin etwa 2×10^{-4} .

Dafür sind mehrere Faktoren ausschlaggebend. Die Änderung der Reflektivität bei einer Änderung der Wellenlänge beträgt auf der linken Seite der Resonanzkurve etwa $0.016 \Delta I / \text{nm}$. Eine typische SPR Messung wird bei etwa 20% Reflektivität durchgeführt ($I = 0.2$).

Existieren während eines Einschaltvorganges einer Laserdiode zwei konkurrierende Moden, so springt der Laser bei jedem Einschaltvorgang in eine der beiden Moden. Welche Mode dabei vom Laser gewählt wird, ist zufällig. Der Abstand zweier Diodenlasermoden ist im vorliegenden Fall 0.2 nm. Daraus resultiert eine Intensitätsänderung von 0.3% der Gesamtintensität hinter der Kretschmannanordnung durch einen Modensprung. Diese Intensitätsänderung tritt nur auf, wenn sich wie hier ein spektral empfindliches Element im Strahlengang befindet. Auf die eigentliche Ausgangsleistung der Laserdiode haben Modensprünge keinen großen Einfluss.

Bei einer typischen Zeitperiode von einer Sekunde für die Detektion eines Datenpunktes und einer üblichen Triggerfrequenz von 1.5 kHz wird eine Laserdiode 1500 mal eingeschaltet. Kann die Mode dabei in zwei oder mehr Moden springen, so stellt sich eine mittlere emittierte Wellenlänge ein. Diese Wellenlänge ist jedoch nicht konstant und daher mit einem statistischen Fehler behaftet. Ist das Verhältnis zweier vorliegender Moden etwa 50:50, so hat dies ein Rauschen der Intensität von 8×10^{-3} hinter der Kretschmann-Anordnung zur Folge. Zur Vereinfachung wurde hier davon ausgegangen, dass nur eine Laserdiode diese Modensprünge zeigt. Die Limitierung ist abhängig vom Verhältnis der vorhandenen Moden (siehe Tabelle 4.1).

Es muss also darauf geachtet werden, dass beide Laserdioden ohne Modensprünge betrieben werden. Leider haben Laserdioden meist nur wenige bestimmte Strom-Temperatur-Kombination bei denen dies gelingt.

Modenverhältnis	50 : 50	90 : 10	99 : 1	99.9 : 0.1
σ_λ	100 pm	60 pm	30 pm	7.5 pm
$\Delta I/I$	8×10^{-3}	5×10^{-3}	2×10^{-3}	6×10^{-4}

Tabelle 4.1: Das Verhältnis der vorhandenen Moden hat Einfluss auf die Stabilität der mittleren emittierten Wellenlänge. Je ausgeglichener das Verhältnis, desto stärker fluktuiert die mittlere Wellenlänge mit einer Standardabweichung von σ_λ um den Mittelwert. Die maximale Intensitätsstabilität $\Delta I/I$ ist von der Stabilität der Wellenlänge abhängig.

Aber selbst, wenn eine Laserdiode ohne Modensprünge betrieben werden kann, muss man davon ausgehen, dass bis zu einem Prozent der Laserleistung nicht in der Hauptmode emittiert wird, sondern auf die Nebenmoden verteilt ist. Diese Verteilung lässt sich leider nicht beobachten. Es ist jedoch davon auszugehen, dass auch das Verhältnis der Nebenmoden untereinander nicht konstant ist. Da hier eine Intensitätsstabilität im Bereich von 10^{-4} beobachtet wird, führt dies zu einem zusätzlichem Rauschen.

Die Wellenlänge des Lasers ist außerdem linear abhängig vom Laserdiodenstrom und wurde experimentell bestimmt zu etwa

$$\Delta\lambda \approx 0.005 \frac{\text{nm}}{\text{mA}} . \quad (4.5)$$

Durch die Rückkopplung wird der Laserdiodenstrom eines Lasers und damit auch dessen Wellenlänge geringfügig verändert. Variiert der Laserdiodenstrom um einen typischen Wert von etwa 0.1 mA, so begrenzt die dadurch hervorgerufene Wellenlängenänderung ($\Delta\lambda = 0.5$ pm) die Qualität der Intensitätsstabilität bereits auf 4×10^{-5} hinter der Kretschmann-Anordnung.

Sowohl die Variation der mittleren emittierten Wellenlänge durch Modensprünge oder immer vorhandene Nebenmoden und die Wellenlängenänderung durch die Rückkopplung verhindern eine Verbesserung der Intensitätsstabilität hinter der Kretschmann-Anordnung.

4.2.3 Test unterschiedlicher Ansätze zur Stabilisierung der Wellenlänge

Um die emittierte Wellenlänge zu stabilisieren, wurden die beiden Laserdioden in Lasergehäuse der Firma Toptica mit einer externen Rückkopplung eingesetzt. Dabei wird der Laserstrahl etwa 3 cm hinter der Laserdiode von einem Diffraktionsgitter reflektiert. Den Reflexionswinkel stellt man dabei so ein, dass das erste Beugungsmaximum der reflektierten Strahlung in die Laserdiode zurückreflektiert wird. Dadurch vergrößert sich die Resonatorlänge und verkleinert sich der Modenabstand. Die Laserdiode wird in eine bestimmte Mode gezwungen. Allerdings führte auch dies nicht zu einer

Verbesserung der Strahlqualität durch die Rückkopplung hinter einer Kretschmann-Anordnung.

Die Ursache dafür liegt in der Triggerung der Laserdioden. Durch das ständige Ein- und Ausschalten der Laserdioden variiert die Temperatur im Inneren der Diode ständig. Dies führt dazu, dass die Resonanzbedingungen beim Einschalten der Diode kontinuierlichen Veränderungen unterliegen. Um diesen Effekt sichtbar zu machen, wurden zwei einfache Etalons hergestellt. Diese bestehen aus je einem $100\ \mu\text{m}$ dicken Glasplättchen, das von beiden Seiten mit $25\ \text{nm}$ Gold bedampft wurde. Der freie Spektralbereich des Etalons beträgt für $\lambda = 800\ \text{nm}$ etwa $2\ \text{nm}$. Um ein Etalon für die emittierte Wellenlänge durchlässig zu machen, wird es leicht schräg gestellt, so dass das Resonanzmaximum des Etalons und die emittierte Wellenlänge übereinstimmen.

Das Etalon wurde vor eine der Laserdioden gestellt und die Intensität des emittierten Strahles mit einer Photodiode und einem Oszilloskop beobachtet. Es zeigt sich, dass die Laserdiode dabei während jeder Leuchtperiode mindestens einmal die Mode wechselt (siehe Abbildung 4.13). Dies ist ungewöhnlich, da eigentlich der externe Resonator die Mode der Laserdiode bestimmen sollte. Doch offenbar hat auch hier die Temperaturänderung im Inneren der Laserdiode einen Einfluss auf die emittierte Wellenlänge.

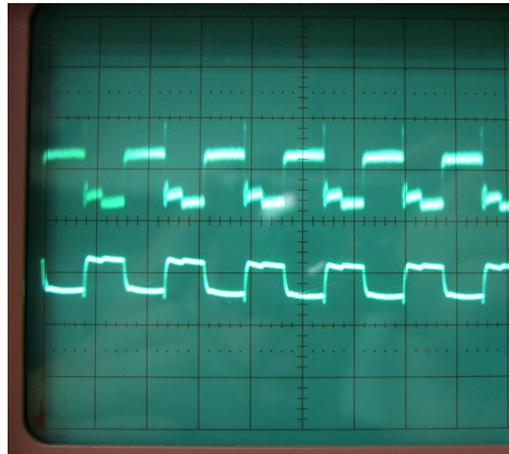


Abbildung 4.13: Intensität einer getriggerten Laserdiode mit externem Resonator: Die Laserdiode wechselt während der Leuchtphase die Mode, was sich in einer Änderung der Intensität zeigt. Der untere Graph zeigt die direkt gemessene Intensität der Diode. Im oberen Graphen befindet sich ein Etalon zwischen Photodiode und Laser, so dass bereits kleine Wellenlängenänderungen große Intensitätsänderungen zur Folge haben.

Das führt dazu, dass bei jedem Einschaltvorgang zwei oder mehr Wellenlängen emittiert werden. Da jedoch der Zeitpunkt des Modensprungs während der Einschaltphasen nicht fix ist, führt dies dazu, dass das Verhältnis der vorhandenen Wellenlängen variiert. Dies entspricht der Situation, dass eine Diode ohne externen Resonator Modensprünge beim Einschalten zeigt.

Laserdioden ohne externen Resonator zeigen dieses Verhalten nicht (wenn keine Mo-

densprünge auftreten). Ihre Wellenlänge verändert sich während der Leuchtphase ebenfalls leicht, aber kontinuierlich. Um dies sichtbar zu machen, stellt man das Interferometer so ein, dass die emittierte Wellenlänge auf einer Flanke des Resonanzmaximums liegt. Bereits geringe Änderungen der Wellenlänge während der Leuchtphase zeigen sich dann in starken Änderungen der Intensität (siehe Abbildung 4.14).

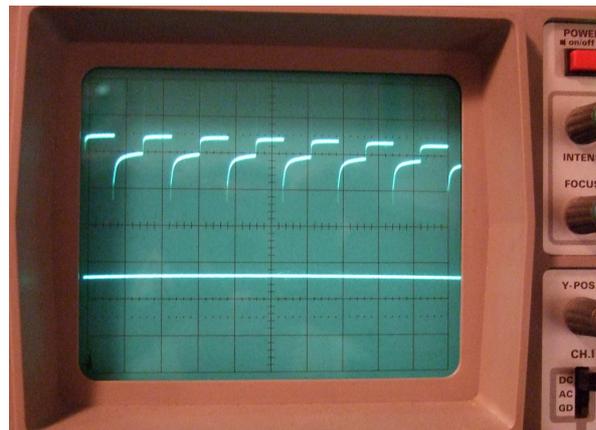


Abbildung 4.14: Intensität einer normalen Laserdiode ohne externen Resonator: Ein Etalon zwischen Laser und Photodiode zeigt die Drift der Wellenlänge während eines Einschaltvorganges. Ohne Etalon entspricht die Intensität des Lasers einem Rechtecksignal.

In einem weiteren Experiment wurde daher getestet, ob die Strahlqualität frei laufender Laserdioden mit Hilfe der Etalons verbessert werden kann. Setzt man ein Etalon vor eine Laserdiode, so wird nur die Wellenlänge der Hauptmode durchgelassen, wohingegen die Nebenmoden geschluckt werden. Die Stabilität der Wellenlänge verbessert sich daher.

Die Strahlqualität, die in Totalreflexion und ohne Etalon vor den Laserdioden gemessen wurde, betrug dabei 1.6×10^{-4} . Die Etalons wurden anschließend so vor die Laserdioden gesetzt, dass das Resonanzmaximum der Etalons mit den emittierten Wellenlängen übereinstimmte. Die zuvor gezeigte dramatische Intensitätsänderung beim Einschalten der Laserdiode lässt sich daher nicht mehr beobachten. Die Strahlqualität verschlechterte sich dennoch auf 6.7×10^{-4} . Dies hat seine Ursache in der Unterdrückung der Beiträge der Nebenmoden zur Gesamtintensität der Laser. Mit Rückkopplung konnte die Strahlqualität anschließend wieder auf 1.9×10^{-4} verbessert werden.

Eine größere Qualitätssteigerung verhinderte dabei die schmale Transmissionslinie des Etalons. Der Strom der Laserdiode konnte nur in einem sehr engem Bereich variiert werden, da ansonsten die emittierte Wellenlänge auf eine der Flanken der Resonanzlinie geriet und starke Intensitätsänderungen die Folge waren. Diese wirkten dann der eigentlichen Kompensation durch die Rückkopplung entgegen. Daher stieg die Strahlqualität durch die Rückkopplung nur um einen Faktor 3 und glich lediglich die Verschlechterung aus, die zuvor durch die Unterdrückung der Nebenmoden entstanden war. Es gelang daher zwar durch die Etalons die Nebenmoden zu unterdrücken und

eine sehr hohe Wellenlängenstabilität zu realisieren, aber die schmalen Transmissionslinien begrenzen gleichzeitig den dynamischen Bereich der Rückkopplung.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es für ein SPR-Imaging Experiment nicht praktikabel ist, einen Aufbau mit Rückkopplung oder Interferometern vor den Laserdioden zu nutzen, da diese keinen Gewinn in der Intensitätsstabilität hinter einer Kretschmann-Anordnung bringen. Eine Stabilität von 1×10^{-4} hinter einer SPR-Anordnung scheint eine natürliche Grenze zu sein, die sich vermutlich nur mit sehr viel höherem Aufwand als hier bereits gezeigt, überwinden ließe. Denkbar wäre bspw. eine elektrooptische bzw. akustooptische Modulation der Laserstrahlen.

Eine Lichtquelle zu finden, die eine Intensitätsstabilität unterhalb von 10^{-4} zeigt, ist sehr schwer. Es wurde daher eine Methode entwickelt, diese Fluktuationen auf eine andere Art und Weise zu kompensieren (siehe Kapitel 4.3.1)

4.2.4 Einfluss des Schrotrauschens der CCD-Kamera

Die fundamentale Begrenzung der Empfindlichkeit ist das Schrotrauschen. Bei nicht bildgebenden SPR-Experimenten spielt dies keine Rolle, da stets ausreichend Photonen zur Verfügung stehen. Bei einer Intensitätsmessung mit einer CCD-Kamera steht aber je nach Anzahl der zu beobachtenden Bioreaktionen nur eine begrenzte Anzahl von Pixeln zur Verfügung. Jeder Pixel der CCD-Kamera besitzt eine bestimmte Elektronenkapazität. Das ist die maximale Anzahl von Elektronen, die ein Pixel während der Belichtung eines Bildes speichern kann. Die Lichtintensität kann daher nicht beliebig erhöht werden, sondern muss so gewählt werden, dass keine Sättigung der Pixel auftritt. Dadurch kann das Schrotrauschen vor allem bei High-Throughput-Anwendungen zur dominierenden Rauschquelle werden.

Um für ein Standard SPR-Experiment mit nur einer Wellenlänge die geringst mögliche detektierbare Intensitätsveränderung zu berechnen, muss das Schrotrauschen der Elektronen in der benutzten Anzahl von Pixeln N_{Pixel} pro Messbereich berücksichtigt werden. Dieses ist abhängig von der Elektronenkapazität c_{Kap} , der Füllrate der Pixel W und der Anzahl von Bildern F , über die für einen Datenpunkt gemittelt wird. Die Gesamtzahl der Elektronen für einen Messbereich ergibt sich daher als

$$N_{Elektronen} = N_{Pixel} \times c_{Kap} \times W \times F . \quad (4.6)$$

Damit ein Signal messbar ist, muss es das Rauschniveau übertreffen. In der Analytik ist die Nachweisgrenze üblicherweise definiert als ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 3. Für SPR-Experiment wird allgemein ein S/R-Verhältnis von 1 als Empfindlichkeit definiert. Die untere Schranke für die Messung einer Intensitätsänderung ergibt sich daher als

$$\frac{\Delta I}{I} = \frac{\sqrt{N_{\text{Elektronen}}}}{N_{\text{Elektronen}}} = \frac{1}{\sqrt{N_{\text{Elektronen}}}}. \quad (4.7)$$

Für die in dieser Arbeit benutzten modifizierten Kameras stimmt diese Rechnung jedoch nur teilweise. Es muss berücksichtigt werden, dass die Intensitäten für zwei Wellenlängen separat gemessen werden. Das resultierende Schrotrauschen für beide Wellenlängen addiert sich im Differenzsignal. Außerdem sind die zur Verfügung stehenden Pixel nicht gleichmäßig auf beide Wellenlängen verteilt, sondern im Verhältnis 1 : 3. Die Begrenzung durch das Schrotrauschen der CCD Kamera für die Messung mit zwei Wellenlängen lässt sich daher ausdrücken als

$$\frac{\Delta I}{I} = \sqrt{\frac{1}{0.75} + \frac{1}{0.25}} \times \frac{1}{\sqrt{N_{\text{Elektronen}}}} \approx \frac{2.3}{\sqrt{N_{\text{Elektronen}}}}. \quad (4.8)$$

Dabei geht man davon aus, dass die Füllrate W für beide Wellenlängen etwa gleich hoch ist. Die durch das Schrotrauschen gegebene Intensitätsbegrenzung ist daher bei Messungen mit zwei Wellenlängen um einen Faktor 2.3 höher als bei Messungen mit nur einer Wellenlänge. Wären die Pixel gleichmäßig auf beide Wellenlängen verteilt, so würde das Rauschen nur um einen Faktor zwei steigen. Allerdings muss man berücksichtigen, dass das Signal bei der zweifachen Wellenlängenmessung doppelt so hoch wie bei der Messung mit nur einer Wellenlänge ausfällt. Das gleicht den Verlust der Empfindlichkeit durch das Schrotrauschen fast aus.

4.3 Verbesserung der Empfindlichkeit durch Referenzierung

Die Stabilität der Lichtquelle ist ein entscheidender Faktor für die maximal erreichbare Empfindlichkeit beim SPR-Imaging. Allerdings begrenzen auch andere Faktoren die Empfindlichkeit.

Der Brechungsindex zwischen Laufpuffer und einer zu untersuchenden Probe ist in den meisten Fällen leicht unterschiedlich, da es schwierig ist sie auf $< 10^{-6}$ RIU anzupassen. Dies führt dazu, dass beim Wechsel von einer Flüssigkeit zu einer anderen eine Brechungsindexstufe existiert. Ein mögliches Bindungssignal, das zum selben Zeitpunkt aufträte, kann dadurch überlagert und möglicherweise verdeckt werden.

Zusätzlich besitzt auch der Brechungsindex von Wasser eine Temperaturabhängigkeit. Eine Änderung von 0.1°C hat bereits eine Brechungsindexänderung des Laufpuffers von $\sim 10^{-5}$ RIU zur Folge. Um eine Stabilität der Basislinie von 3×10^{-7} RIU zu erreichen, muss die Temperatur der Flüssigkeiten auf 3 mK genau kontrolliert werden.

Daher besitzen die meisten kommerziellen SPR-Geräten eine aufwändige Temperaturstabilisierung, um Driften der Basislinie zu minimieren.

Das SPR-Imaging bietet eine elegante Lösung, um solche Störungen zu kompensieren. Dazu nutzt man aus, dass die Goldoberfläche orts aufgelöst beobachtet werden kann. Neben den eigentlichen Messflächen, auf denen Fängermoleküle immobilisiert sind, werden bestimmte Bereiche auf der Goldoberfläche als Referenzflächen genutzt.

Variiert der Brechungsindex der Flüssigkeit auf Grund von Temperaturschwankungen oder dem Durchleiten einer anderen Flüssigkeit, verschiebt sich sowohl im Messbereich als auch im Referenzbereich die Resonanzkurve. Diese Verschiebung kann in beiden Bereichen gleichermaßen detektiert werden. Die störende Änderung des Volumenbrechungsindex kann durch Subtraktion der Signale kompensiert werden.

Allerdings muss gegebenenfalls auch die Referenzfläche mit geeigneten Biomolekülen präpariert werden, um eine unspezifische Bindung der zu detektierenden Moleküle zu unterbinden. Dies würde die Messung ansonsten verfälschen. Kurze Oligonukleotide binden beispielsweise kaum unspezifisch an Goldoberflächen, so dass keine Präparation der Referenzflächen nötig ist. Proteine hingegen besitzen eine sehr hohe Affinität zu Gold. In diesen Fällen muss die Goldschicht durch eine proteinabweisende Schicht geschützt werden.

Fluktuationen der Intensität und der Wellenlänge werden bis zu einem gewissen Grad ebenfalls durch die Referenzierung kompensiert. Eine vollständige Kompensation ergibt sich leider nicht, da dazu die Oberfläche homogen ausgeleuchtet sein müsste. Außerdem liegt der Messpunkt auf der SPR Kurve in den Referenz- und Signalbereichen oft an leicht unterschiedlichen Positionen, da zumindest in den Signalbereichen Biomoleküle immobilisiert sind. Dies führt dazu, dass eine Intensitäts- bzw. Wellenlängenänderung nicht die gleiche Volumenbrechungsindexänderung in beiden Bereichen vortäuscht, da die Steigung in den Messpunkten auf der SPR Kurve unterschiedlich ist.

4.3.1 Rauschunterdrückung durch verteilte Referenzflächen

Die Rauschunterdrückung mit nur einer Referenzfläche funktioniert jedoch nur, solange die Störung homogen ist und auf der gesamten Goldoberfläche gleichzeitig auftritt. Dies ist jedoch oft nicht der Fall. Eine externe Temperaturänderung hat einen Temperatur- und damit auch einen Brechungsindexgradienten in der Flusszelle zur Folge. Auch das Verdrängen einer Flüssigkeit aus der Flusszelle durch eine Flüssigkeit mit einem anderen Brechungsindex geschieht zeitlich und räumlich fluktuierend. Diese Störungen werden besser kompensiert, wenn die Signal- und Referenzflächen in mehrere kleine, eng nebeneinander liegende Bereiche aufgeteilt werden. Die Gesamtfläche der Bereiche bleibt dabei konstant (siehe Abbildung 4.15). Dieser Ansatz wird als *Distributed Reference* bezeichnet und wurde erstmalig im Rahmen dieser Arbeit eingeführt und angewendet [34].

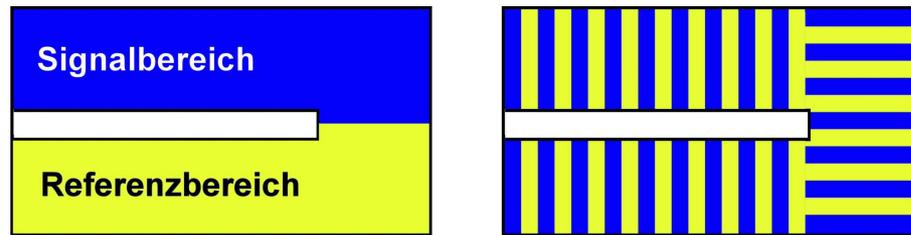


Abbildung 4.15: Zur Kompensation von störenden Volumenbrechungsindexänderungen kann in einer U-förmigen Flusszelle der obere Teil als Signal- und der untere Teil als Referenzbereich genutzt werden (linkes Bild). Eine deutlich bessere Rauschunterdrückung ergibt sich, wenn die Signal- und Referenzbereiche in kleine, eng nebeneinander liegende Bereiche aufgeteilt werden (rechtes Bild). Die Gesamtfläche der Messbereiche bleibt dabei unverändert.

Um den Sachverhalt zu verdeutlichen, wird der Einfluss der *Distributed Reference* auf eine eindimensionale Störung betrachtet (siehe Abbildung 4.16). Dies kann beispielsweise ein Temperaturgradient in der Flusszelle sein. Dieser führt automatisch auch zu einem Gradienten der reflektierten Intensität $F(l, 0)$. Der Gradient ist jedoch nicht statisch, so dass sich seine Form $F(l, \Delta t)$ nach einer gewissen Zeit Δt geändert hat

$$\Delta F(l) = F(l, 0) - F(l, \Delta t) . \quad (4.9)$$

Das Rauschen, das durch die zeitliche Änderung des Gradienten verursacht wird, ist in einem Signal- und einem Referenzbereich, die einen Abstand von $\Delta l/2$ haben, nicht korreliert. Das differentielle Rauschen $N_{\Delta l}$ ergibt sich daher als

$$N_{\Delta l} = \int_0^{\Delta l/2} \Delta F(l) dl - \int_{\Delta l/2}^{\Delta l} \Delta F(l) dl . \quad (4.10)$$

Geht man davon aus, dass $F(l)$ hinreichend klein und stetig ist, kann der Ausdruck vereinfacht ausgedrückt werden als

$$N_{\Delta l} = \frac{\Delta F(\Delta l) - \Delta F(0)}{2} \times \frac{\Delta l}{2} . \quad (4.11)$$

Ordnet man mehrere Signal- und Referenzbereiche entlang der Strecke l nebeneinander an, so ist das resultierende Rauschen umgekehrt proportional zur Anzahl der benutzten Segmente:

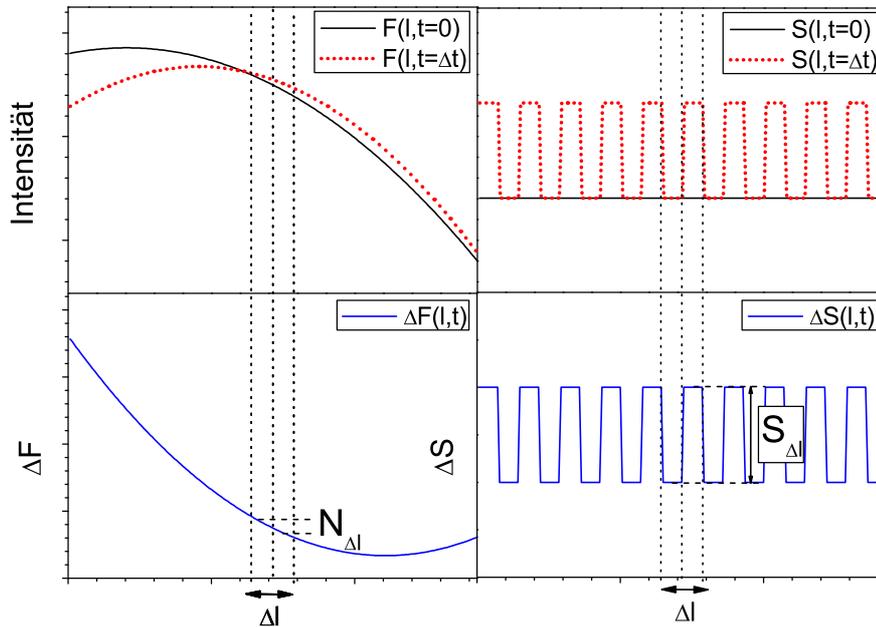


Abbildung 4.16: Teilt man die Störung $F(l)$ in mehrere kleine Segmente im Abstand $l/2$ auf, verringert sich das Rauschsignal zwischen zwei benachbarten Signal- und Referenzbereichen. Das Signal S ist von der Aufteilung unberührt.

$$\begin{aligned}
 N &= \sum_{k=0}^{m-1} \int_{k\Delta l}^{k\Delta l + \Delta l/2} \Delta F(l) dl - \int_{k\Delta l + \Delta l/2}^{k\Delta l + \Delta l} \Delta F(l) dl \\
 &= \frac{\Delta F(\Delta l) - \Delta F(0)}{2} \times \frac{\Delta l}{2} \\
 &= \frac{\Delta F(\Delta l) - \Delta F(0)}{2} \times \frac{l}{2m}.
 \end{aligned} \tag{4.12}$$

Zu Beginn der Messung haben noch keine Moleküle an die Oberfläche gebunden. Weder in den Signal- noch in den Referenzbereich existiert ein Signal ($S(0) = 0$). Binden sich nach einer Zeit Δt Moleküle aus der Flüssigkeit an die Fänger-moleküle auf der Oberfläche, entsteht ein Signal nur in den Signalbereichen ($\Delta S(\Delta t) = \text{const}$). In den Referenzbereichen tritt keine Änderung des Signals auf ($\Delta S(\Delta t) = 0$). Das Signal entlang der Strecke l ergibt sich dann zu

$$\begin{aligned}
S &= \sum_{k=0}^{m-1} \int_{k\Delta l}^{k\Delta l + \Delta l/2} \Delta S(l) dl - \int_{k\Delta l + \Delta l/2}^{k\Delta l + \Delta l} \Delta S(l) dl \\
&= \sum_{k=0}^{m-1} \int_0^{\Delta l/2} \Delta S(0) dl \\
&= \text{const} \times m \frac{\Delta l}{2} .
\end{aligned} \tag{4.13}$$

Das resultierende Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist daher direkt proportional zu der Anzahl der verwendeten Segmente m (dem so genannten *Splittingfaktor*). Je höher der Splittingfaktor durch Aufteilung der Sensorfläche in kleinere Messflächen gewählt werden kann, desto höher ist die Empfindlichkeit:

$$S/N = \text{const} \times \frac{2m}{\Delta F(l) - \Delta F(0)} . \tag{4.14}$$

4.3.2 Anwendung der Distributed Reference

Um die Verbesserung durch eine *Distributed Reference* Anordnung zu testen, wurden in einer U-förmigen Flusszelle insgesamt 24 nebeneinander liegende, gleichgroße Messbereiche auf einer unbehandelten Goldoberfläche definiert. Das SPR-Signal wurde in allen Bereichen separat gemessen.

Zunächst wurde durch die Flusszelle Laufpuffer gepumpt, um eine stabile Basislinie zu erhalten. Nach etwa 4 Minuten wurde der Laufpuffer durch einen mit zusätzlichem NaCl versetzten Puffer ersetzt, der einen leicht unterschiedlichen Brechungsindex besitzt (siehe Abbildung 4.17). Das simuliert eine Brechungsindexänderung, wie sie meist auch beim Wechsel vom Laufpuffer zu einer realen Probe auftritt. Anschließend wurde wieder Laufpuffer gepumpt. Nach etwa 15 Minuten wurde der Laufpuffer durch einen auf 55°C erwärmten Laufpuffer ersetzt. Dadurch änderte sich der Brechungsindex des Laufpuffers und es entstand ein Temperaturgradient innerhalb der Flusszelle. Nach etwa 2 Minuten wurde wieder der vorher verwendete Laufpuffer gepumpt.

Zunächst wurden die Signale in allen Bereichen summiert, um eine Messung ohne Referenz zu simulieren. Die Brechungsindexänderung durch dem mit NaCl versetzten Laufpuffer betrug $4,5 \times 10^{-4}$ RIU. Ein mögliches Bindungssignal wäre von der Brechungsindexstufe überlagert worden. In der Realität fallen die Unterschiede zwischen einem Laufpuffer und einer realen Probe jedoch normalerweise ein bis zwei Größenordnungen kleiner aus.

Fasst man die ersten 12 Bereiche zu einem großen Signal- und die übrigen 12 Bereiche zu einem großem Referenzbereich zusammen, so lässt sich die Brechungsindexstufe

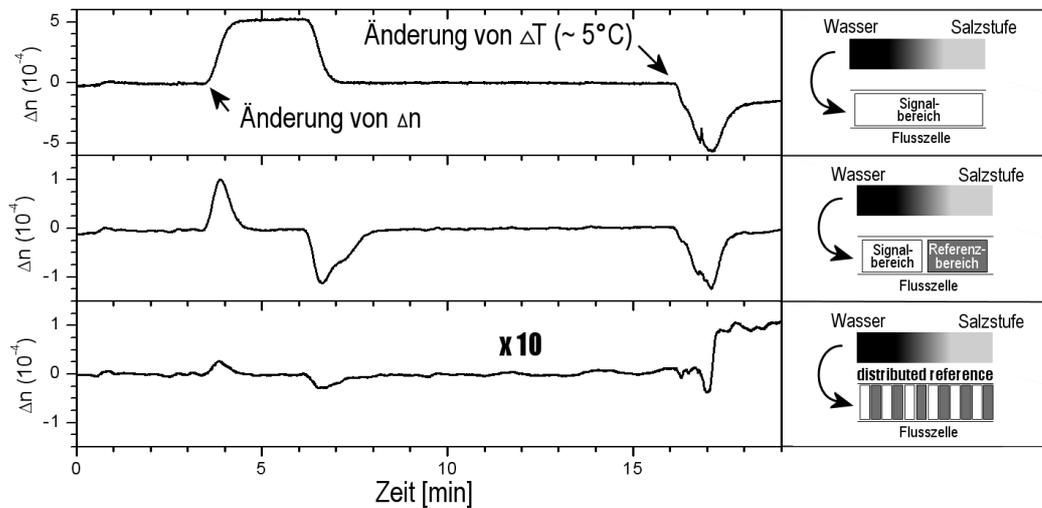


Abbildung 4.17: Kompensation von Brechungsindexänderungen, die durch eine Salzlösung bzw. eine Temperaturänderung hervorgerufen wurden: Die obere Box zeigt die Brechungsindexänderung in einem großen Signalbereich. Die Kompensation mit einem Referenzbereich reduziert die Störung bereits (mittlere Box). Doch erst die Anwendung der *Distributed Reference* kompensiert die Störung wirklich effektiv (unterste Box, Signal mit Faktor 10 multipliziert).

teilweise kompensieren. Ist der Austausch der Flüssigkeit komplett erfolgt, befindet sich das Differenzsignal wieder auf der Basislinie. Lediglich während des Austausches entstehen Überschwinger des Differenzsignals in der Höhe von etwa 1×10^{-4} RIU, was etwa 20% der ursprünglichen Störung entspricht. Diese sind darauf zurückzuführen, dass die Front der Flüssigkeiten zeitlich versetzt die Signal- bzw. Referenzbereiche erreicht.

Teilt man die 24 Bereiche abwechselnd in Signal- und Referenzbereiche auf und summiert gleichartige, kompensiert dies die Störung deutlich besser. Die Überschwinger sind nur noch etwa 5×10^{-6} RIU groß und damit zwei Größenordnungen kleiner als die ursprüngliche Störung. Selbst kleine Bindungssignale könnten trotz der großen Störung problemlos beobachtet werden.

Bei der Kompensation des temperierten Puffers zeichnet sich ein ähnliches Bild ab. Die eigentliche Störung ist in einem einzelnen großen Signalbereich etwa 5×10^{-4} groß. Die Referenzierung mit einem Referenzbereich reduziert die Störung um etwa eine halbe Größenordnung. Mit aufgeteilten Signal- und Referenzbereichen verbessert sich die Kompensation jedoch noch deutlich weiter. Allerdings ist sie nicht ganz so gut wie bei der Kompensation der Brechungsindexstufe. Dies könnte daran liegen, dass sich durch die Erwärmung Luftblasen im Puffer bilden können, die natürlich den Brechungsindex stark beeinflussen und in diesem Fall zu einem Sprung in der Basislinie führten.

Die Verbesserung durch die *Distributed Reference* lässt sich auch an der Stabilität der Basislinie beobachten. Dazu bestimmt man die Standardabweichung der Basisli-

nie vom Mittelwert zwischen der Salzstufe und der durch den erwärmten Puffer hervorgerufenen Signaländerung. Das Rauschen der Basislinie beträgt für einen einzelnen großen Signalbereich etwa 2.7×10^{-6} RIU. Nutzt man einen große Signal- und einen großen Referenzbereich erhöht sich die Stabilität bereits um einen Faktor 2 auf 1.3×10^{-6} RIU. Durch die Anwendung der *Distributed Reference* gewinnt man einen Faktor fünf und verbessert die Stabilität auf 2.9×10^{-7} RIU.

Mit Hilfe des *Distributed Reference* Ansatz konnte in diesem einfachen Experiment die gleiche Empfindlichkeit erreicht werden, wie sie auch kommerzielle SPR-Geräte mit einer aufwändigen Temperaturstabilisierung bieten. Auf eine solche konnte jedoch komplett verzichtet werden. Eine weitere Verbesserung der Nachweisgrenze durch eine Erhöhung der benutzten Segmente m ist denkbar. Die Methode der *Distributed Reference* ist universell einsetzbar und lässt sich auch bei jeder anderen bildgebenden Detektionstechnik, deren Empfindlichkeit durch inhomogene Störungen beeinflussbar ist, anwenden.

5 Experimentelle Ergebnisse

5.1 Test der maximalen Empfindlichkeit anhand von Biotin-Bindungen

Die Bindung von Streptavidin an Biotin ist eine der stärksten nicht kovalenten Bindungen ($K_D = 10^{-14} - 10^{-16} M^{-1}$) [35]. Es ist ein Standardsystem in der Bioanalytik. Sein Einsatzgebiet ist vielfältig und erstreckt sich vom Aufbau von Streptavidinmonolayer auf Oberflächen [36, 37] über die Präparationen von 2D-Strukturen auf Oberflächen [38] bis hin zur Verstärkung von Signalen in der Bioanalytik [39, 40].

Streptavidin ist ein Protein und wird aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* gewonnen. Es besitzt vier Bindungsstellen für Biotinmoleküle und hat ein Molgewicht von etwa 60 kg/mol. Biotin ist ein relativ kleines Molekül und auch als Vitamin H bekannt. Die chemische Summenformel lautet $C_{10}H_{16}N_2O_3S$. Das Molekulgewicht ergibt sich daher als 244 g/mol.

5.1.1 Präparation einer Biotin-Streptavidin-Schicht auf Gold

Für die Präparation eines Biotin-Streptavidin-Systems auf Gold wurden zwei verschiedene Biotinthiole eingesetzt: $HS(CH_2)_{11}NHC(O)$ -Biotin und $HS(CH_2)_{11}EG_3$ -Biotin (Prochimia, Polen, Abbildung 5.10). Es wurden zwei Biotinthiole getestet, da das zuerst gekaufte Biotinthiol nicht zu einer optimalen Präparation eines Streptavidinmonolayers geeignet war.

Beide Moleküle bestehen aus einer Kohlenstoffkette, die an einem Ende eine Thiolgruppe besitzt. Die Thiolgruppe besitzt eine hohe Affinität zu Gold und bildet eine kovalente Bindung mit dem Gold aus. Daher lassen sich mit diesen Thiolgruppen selbst ordnende Schichten auf Gold präparieren (so genannt *SAM's - self assembled monolayers*). Am anderen Ende der Kohlenstoffkette befindet sich jeweils ein Biotinmolekül. Binden die Thiolgruppen an die Goldschicht, stehen die Biotinmoleküle von der Oberfläche ab und können als Bindungspartner für Streptavidin dienen. Der Unterschied zwischen den beiden Biotinthiolen liegt in einer hydrophilen EG_3 -Gruppe zwischen der Kohlenstoffkette und dem Biotin, die nur das zweite Biotinthiol besitzt. Die EG_3 -Gruppe besteht aus 3 C_2H_4O -Gruppen.

Beide Biotinthiole wurden als 1 mM-Lösungen in Ethanol angesetzt (Sigma Aldrich,

99.8%). Würden allein diese Lösungen zur Präparation einer Biotin-Schicht auf dem Gold genutzt, so wäre die Biotindichte auf der Oberfläche zu hoch. Es wäre kaum Platz vorhanden, um eine Bindung zwischen einem Streptavidin-Molekül und einem Biotinthiol auszubilden. Daher verwendet man zusätzliche Mercaptothiole, um die Biotindichte zu reduzieren. Diese bestehen aus einer Kohlenstoffkette mit einer Thiolgruppe an einem Ende. Sie binden ebenso wie die Biotinthiole an Gold. Durch Wahl eines geeigneten Verhältnisses zwischen einem Biotinthiol und einem Mercaptothiol kann die Dichte der Biotinmoleküle auf der Oberfläche eingestellt werden.

Als Abstandhalter wurden zwei unterschiedliche Mercaptothiole eingesetzt: 11-Mercapto-1-Undecanol und 6-Mercapto-1-Hexanol (Sigma Aldrich, 97%). Die Kohlenstoffkette des ersten Abstandhalters besitzt 11 Kohlenstoffatome und hat daher die gleiche Länge wie die Kohlenstoffkette der Biotinthiole. Der zweite Abstandhalter ist kürzer und besitzt lediglich sechs Kohlenstoffatome.

Die Mercaptothiole wurden ebenfalls als 1 mM Lösungen in Ethanol angesetzt. Anschließend wurden diese im Verhältnis 9:1 (Biotinthiol ohne EG₃-Gruppe) bzw. 12:1 (Biotinthiol mit EG₃-Gruppe) mit den Biotinthiolen gemischt. Jede Lösung wurde anschließend in Kontakt mit einer Goldoberfläche gebracht. Das Bindungssignal wurde mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz beobachtet. Innerhalb von wenigen Minuten bildete sich eine komplette Biotinthiol-Schicht aus [41].

Streptavidin wurde als 200 nM Lösung in einem Hepes-Puffer angesetzt. Dieser besteht aus 10 mM Hepes und 150 mM NaCl, gelöst in Wasser. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von NaOH auf 7.4 eingestellt. Um die Bindung des Streptavidins an die unterschiedlichen Biotinthiolschichten vergleichen zu können, wurde vor jedem Experiment eine Brechungsindexstufe von 4.5×10^{-4} RIU gemessen. Dazu wurde Hepes-Puffer, dem zuvor 0.3 % NaCl zugegeben war, durch die Flusszelle gepumpt.

Die Bindung des Streptavidins an die Biotinthiolschicht ohne EG₃-Gruppe war unabhängig vom gewählten Mercaptothiol. In beiden Fällen betrug das resultierende Signal etwa 3×10^{-4} RIU (siehe Abbildung 5.2). Nachdem keine weitere Steigerung des Streptavidin-Signals mehr beobachtet werden konnte, wurde wieder Hepes-Puffer

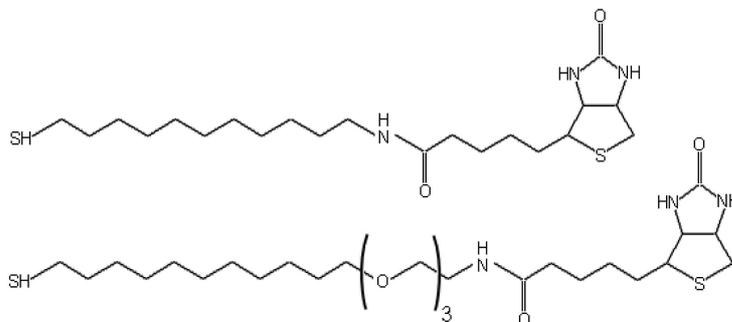


Abbildung 5.1: Strukturformel von HS(CH₂)₁₁NHC(O)-Biotin (oben) und HS(CH₂)₁₁EG₃-Biotin (unten)

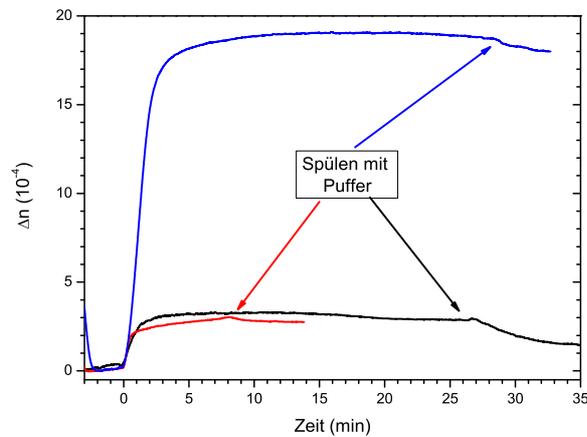


Abbildung 5.2: Die Bindung von Streptavidin an eine Biotinthschicht, die aus einer Lösung von 11-Mercapto-1-Undecanol (schwarze Kurve) bzw. 6-Mercapto-1-Hexanol (rote Kurve) mit einem Biotinthiol ohne EG_3 -Gruppe präpariert wurde, ist in beiden Fällen etwa 3×10^{-4} RIU groß. Durch Spülen mit Puffer lässt sich etwa die Hälfte der Streptavidinmoleküle im Fall des längeren Mercaptothiols wieder abwaschen. Benutzt man ein Biotinthiol mit EG_3 -Gruppe und 11-Mercapto-1-Undecanol, fällt das Bindungssignal des Streptavidins deutlich höher aus (blaue Kurve).

durch die Flusszelle gepumpt. Daraufhin lösten sich im Fall der mit 11-Mercapto-1-Undecanol präparierten Biotinschicht etwa die Hälfte der Streptavidinmoleküle wieder ab. Bei der mit dem kürzeren Mercaptothiol präparierten Biotinschicht war der Abfall des SPR-Signals deutlich geringer. Hier wurden nur wenige Streptavidinmoleküle abgewaschen.

Offenbar führt das längere Mercaptothiol zu einer sterischen Behinderung. Die Biotingruppen ragen nicht weit genug über die Kohlenstoffketten hinaus, so dass sie die tiefliegenden Bindungstaschen des Streptavidinmoleküls nicht erreichen können. Die Streptavidinmoleküle binden daher unspezifisch an die Biotinthschicht und können zum Teil wieder abgewaschen werden.

Für das Biotinthiol mit EG_3 -Gruppe wurde nur die Mischung mit 11-Mercapto-1-Undecanol getestet. Die Bindung des Streptavidins an diese Biotinschicht zeigte ein deutlich höheres Signal als die zuvor getesteten Biotinschichten ($\Delta n \approx 1.8 \times 10^{-3}$ RIU).

Die Dicke der Streptavidinschicht lässt sich mit Hilfe der Formel 2.23 berechnen und betrug etwa 4 nm. Das Volumen eines Streptavidin-Moleküls kann über die Faustformel

$$1 \text{ Da} \hat{=} 0.1 \text{ nm}^3 \quad (5.1)$$

abgeschätzt werden. Geht man von einer kubischen Form des Proteins aus, so wäre

jede Seite des Proteins 4 nm lang. Das gemessene Bindungssignal repräsentiert daher bereits einen absolut deckenden Streptavidinmonolayer ohne Zwischenräume. Das Zusammenspiel von 11-Mercapto-1-Undecanol und dem Biotinthiol mit EG₃-Gruppe ist offenbar optimal, um einen äußerst dichten Streptavidinmonolayer auf einer Goldschicht zu präparieren.

Bei allen Experimenten war die Biotindichte auf der Oberfläche in etwa gleich, da die Unterschiede zwischen den Biotinthiolen äußerst gering und die Mischungsverhältnisse ähnlich waren. Der Grund für die schlechtere Präparation eines Streptavidinmonolayers mit Biotinthiolen ohne EG₃-Gruppe ist also nicht dort zu suchen.

Offenbar liegt die Ursache in der EG₃-Gruppe selbst. Dabei ist jedoch die Verlängerung der Kohlenstoffkette durch die EG₃-Gruppe nur teilweise entscheidend. Der Abstand zwischen dem Biotinmolekül beim Biotinthiol mit EG₃-Gruppe und dem 11-Mercapto-1-Undecanol war in etwa genauso groß wie beim Experiment mit dem Biotinthiol ohne EG₃-Gruppe und 6-Mercapto-1-Hexanol. Die Verkürzung der Kohlenstoffkettenlänge führte dort jedoch nicht zu einer besseren Anbindung des Streptavidins im Vergleich zu der Präparation mit dem längeren Mercaptothiol. Es ist also wichtig, dass zwischen Biotin-Gruppe und den Kohlenstoffketten ein gewisser Abstand besteht. Allerdings kann dies nicht der entscheidende Faktor sein, da man ansonsten auch für das Biotinthiol ohne EG₃-Gruppe ein höheres Streptavidinsignal hätte messen müssen.

Wichtiger ist die hydrophile Eigenschaft der EG₃-Gruppe. Die Goldoberfläche ist hydrophob. Die EG₃-Gruppen stoßen sich daher von der Goldoberfläche und damit auch von den Kohlenstoffketten der Mercaptothiole ab. Dadurch sind die Biotin-Gruppen besser orientiert und können eine Bindung mit dem Streptavidin eher ausbilden.

5.1.2 Identifikation des besten Mischungsverhältnisses

Um das optimale Mischungsverhältnis des Biotinthiols mit EG₃-Gruppe und 11-Mercapto-1-Undecanol für die Bildung eines möglichst dichten Streptavidinmonolayers zu bestimmen, wurden unterschiedliche Mischungsverhältnisse angesetzt und das Bindungssignal des Streptavidins an die Biotinthiolschicht gemessen [41].

Es zeigt sich, dass ein Mischungsverhältnis von etwa 2.5:1 das größte Streptavidinsignal besitzt. Bei einem etwas ausgeglichenerem Mischungsverhältnis von 1.5:1 fällt das Streptavidinsignal im Vergleich um etwa 10% ab. Offenbar sind die Biotin-Gruppen in diesem Fall auf der Oberfläche zu dicht angeordnet, um einen optimalen Nährboden für einen möglichst dichten Streptavidinmonolayer zu bilden. Erhöht man das Mischungsverhältnis, so verringert sich das Streptavidinsignal ebenfalls. Offenbar ist in diesen Fällen der Biotinabstand zu groß und es bilden sich Zwischenräume in der Streptavidinschicht.

Die Unterschiede sind jedoch sehr gering und in allen Fällen entsteht ein geordneter Streptavidinmonolayer mit einer hohen Dichte. Insofern kann das Mischungsverhältnis

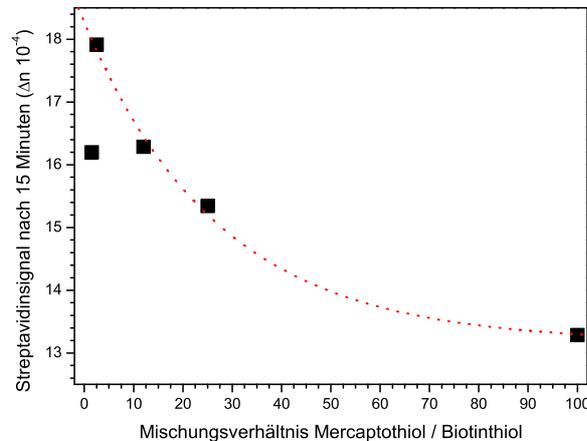


Abbildung 5.3: Die Höhe des Streptavidinsignals wurde für unterschiedliche Mischungsverhältnisse des Biotinthiols und des Mercaptothiols jeweils nach 15 Minuten bestimmt.

in einem weitem Bereich variiert werden, ohne die Funktionalität zu stark zu beeinträchtigen.

5.1.3 Messung der Biotinbindung an Streptavidin

Zur Demonstration neuer Geräte und Techniken wird in vielen Fällen auf das Biotin-Streptavidin-System zurückgegriffen, da dieses leicht zu handhaben und allgemein bekannt ist. Dabei wird meist die gut messbare Bindung des Proteins an Biotin verwendet [42]. Eher seltener wird die deutlich schwerer messbare Bindung des Biotins an eine Streptavidinschicht verwendet [43]. Die Moleküle sind sehr klein und rufen nur ein geringes Signal hervor. Außerdem ist die maximale Dichte der Biotinmoleküle durch die Anzahl der Bindungsstellen der Streptavidinmoleküle vorgegeben. Der resultierende Biotinmonolayer besitzt daher Zwischenräume, die das zu erwartende Signal zusätzlich reduzieren.

Doch gerade diese Bindung empfiehlt sich als Gradmesser für die Empfindlichkeit der SPR-Imaging Methode mit zwei Wellenlängen, da hier eine sehr empfindliche Technik zur Verfügung steht, die auch zur Messung von sehr kleinen Molekülen eingesetzt werden kann. Um die maximale Empfindlichkeit zu testen, wurde der *Distributed Reference* Ansatz verwendet [34].

Dazu wurde eine PDMS Struktur hergestellt, die insgesamt 4 Flüssigkeitsreservoir besitzt. Davon sind jeweils zwei durch 17 parallele Kanäle mit einem Querschnitt von $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ verbunden. Die Kanälen sind voneinander durch eine $200 \mu\text{m}$ dicke PDMS-Wand getrennt und zu einer Seite des PDMS Blocks hin offen. Die Struktur kann mit Hilfe einer extra angefertigten Passform auf ein Goldplättchen gedrückt werden. Dadurch kann die Kanalstruktur als Flusszelle verwendet werden. Die Reservoirs können durch Zuleitungen von der gegenüberliegenden Seite des PDMS Blockes be-

füllt werden. Leitet man eine Flüssigkeit durch die Kanäle, können Moleküle auf der Oberfläche immobilisiert und dadurch eine Strukturierung der Oberfläche erreicht werden.

Die Flächen, die durch PDMS vor dem Kontakt mit der Flüssigkeit geschützt sind, können später als Referenzflächen genutzt werden. Da sich an der PDMS-Oberfläche jedoch sehr schnell Staubteilchen und Biomoleküle anlagern und diese bei Kontakt mit der Goldfläche die Referenzflächen kontaminieren würden, muss die PDMS Maske vor jeder Verwendung gereinigt werden. Dazu wurde sie zunächst mit Wasser und Ethanol gespült und mit Stickstoff getrocknet, um grobe Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurden das PDMS für etwa 5 Minuten einem Sauerstoffplasma ausgesetzt. Dazu wird die Maske in einen mit Raumluft gefüllten Exsikkator gegeben, der anschließend bis auf etwa 1 mbar evakuiert wird. Dann wird ein Sauerstoffplasma im Exsikkator durch ein elektromagnetisches Wechselfeld erzeugt. Diese Prozedur entfernte sämtliche organischen Verbindungen auf dem PDMS.

Anschließend wurde die Struktur auf ein Goldplättchen gesetzt und angedrückt. Die Flusszelle wurde zunächst mit Ethanol gefüllt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen in der Flusszelle zurückblieben. 1 mM Lösungen eines biotinylierten Thiols und 11-Mercapto-1-Undecanols wurden im Verhältnis 1:9 gemischt. Diese Mischung wurde anschließend für 2 Minuten durch die Flusszelle gepumpt, um einen Biotin-Monolayer auf der Goldoberfläche zu präparieren. Anschließend wurde erneut mit Ethanol gespült, um überflüssiges Biotinthiol aus der Flusszelle zu entfernen. Die PDMS Struktur wurde entfernt und der komplette Goldchip mit einer 1 mM OEG-6-Ethanol-Lösung bedeckt. OEG-6 ist ein proteinresistentes Thiol, das auf den Referenzflächen zwischen den Biotinstreifen immobilisierte und diese gegen Proteinanlagerung resistent machte.

Der so präparierte Goldchip wurde anschließend mit Hilfe eines Immersionsöls an ein Prisma gekoppelt. Eine etwa 300 μm dicke Gummi-Dichtung und eine Rückwand aus Plexiglas bildeten eine S-förmige Flusszelle über dem Goldchip. Die abbildende Linse wurde so positioniert, dass ein etwa $6 \times 10 \text{ mm}^2$ großer Bereich beobachtet werden konnte. Die Biotinthiole und die OEG-Moleküle rufen nur eine sehr kleine und ähnlich große Verschiebung der Resonanzkurve hervor. Ein Intensitätsunterschied der Reflektivität zwischen den unterschiedlichen Bereichen und damit eine Streifenstruktur war nicht erkennbar.

Die Flusszelle wurde zunächst mit HEPES-Puffer gefüllt. Dann wurde eine 200 nM Streptavidin-Lösung hindurch gepumpt. Sobald die ersten Streifenstrukturen erkennbar waren, wurde auf diesen ein Messbereich definiert und die weitere Bindung des Streptavidins an die Biotinschicht beobachtet. Dadurch war es zwar nicht möglich die Höhe des Streptavidinsignals, jedoch den Zeitpunkt der Sättigung der Streptavidinschicht zu bestimmen.

Nach etwa 30 Minuten war der Bindungsprozess beendet und es wurde mit HEPES-Puffer gespült. Ein Streptavidinmonolayer erzeugt eine starke Verschiebung der Resonanzkurve und damit auch eine starke Reflektivitätsänderung. Daher war die Strei-

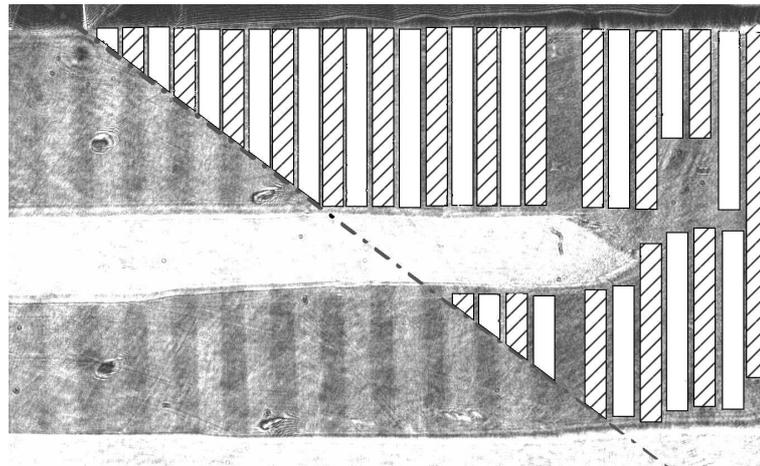


Abbildung 5.4: Die helleren Streptavidinstreifen lassen sich von den dunkleren OEG-6-Flächen auf Grund der unterschiedlichen Reflektivitäten gut voneinander unterscheiden. Im rechten oberen Teil des Bildes sind die originalen Signal- und Referenzbereiche eingezeichnet.

fenstruktur anschließend gut zu identifizieren. Auf Grund der starken Verschiebung der Resonanzkurve durch das Streptavidin musste der Resonanzwinkel neu justiert werden. Anschließend wurden 25 Signalbereiche auf den Streptavidinstreifen und 25 Referenzbereiche auf den OEG-6 Flächen positioniert (siehe Abbildung 5.4).

Vor der Messung der Biotinbindung wurde etwa 20 Minuten lang Hepes-Puffer über den Goldchip gepumpt, um die Basislinie zu stabilisieren. Dann wurde eine $1 \mu\text{M}$ Biotin-Lösung in Hepes-Puffer durch die Flusszelle geleitet. Für jeden aufgenommenen Datenpunkt wurde über 25 Bilder integriert. Daraus resultiert eine Zeitauflösung von 10 Sekunden. Die Signale aus den Signal- bzw. Referenzbereichen wurden jeweils normiert, aufsummiert und anschließend voneinander subtrahiert. Die Biotinbindung erzeugt ein Signal, das einer Volumenbrechungsindexänderung von 3.3×10^{-6} RIU entspricht. Das S/R-Verhältnis betrug etwa neun (siehe Abbildung 5.5).

Die Stabilität der Basislinie wurde über einen Zeitraum von zehn Minuten vor der Biotinbindung gemessen und betrug bei der Verwendung aller 50 Messbereiche 3.7×10^{-7} RIU. Dies ist vergleichbar mit der Empfindlichkeit des besten momentan verfügbaren kommerziellen SPR-Gerätes für Einzelmessungen. Nutzt man lediglich neun Paare bzw. nur ein Paar von Signal- und Referenzbereichen zur Auswertung, so reduziert sich das S/R-Verhältnis auf 4 bzw. 2.5 (siehe Abbildung 5.6).

Das Bindungssignal der Biotinstufe ist um einen Faktor drei kleiner als in einer früheren Messung [4]. Diese basierte jedoch auf der Detektion der Reflektivität mit Hilfe einer Photodiode und verwendete lediglich einzelne, größere Messbereiche ($3 \times 4 \text{ mm}^2$).

Ein Grund für diese Diskrepanz könnte darin liegen, dass das bei der Messung mit der CCD-Kamera verwendete OEG-6 bereits mehr als vier Wochen alt war, da die ersten Versuche nicht erfolgreich waren und keine frische OEG-6-Lösung zur Hand war. Die

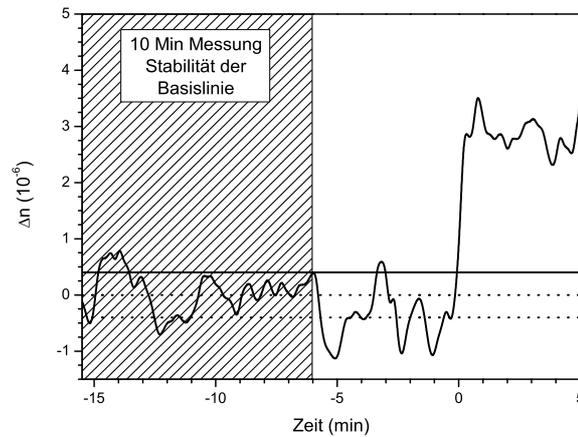


Abbildung 5.5: Verwendung aller 50 Messbereiche: Die Höhe der Biotinbindung betrug $3,3 \times 10^{-6}$ RIU. Die Stabilität der Basislinie wurde über einen Zeitraum von 10 Minuten vor der eigentlichen Bindung gemessen.

Proteinresistenz eines OEG-6-Monolayers reduziert sich jedoch bereits nach vier Wochen deutlich [38]. In diesem Fall wäre auf den OEG-6 Flächen ebenfalls Streptavidin vorhanden und würde als Bindungspartner für Biotin zur Verfügung stehen. Ein dabei entstehendes Bindungssignal würde jedoch von dem eigentlichen Bindungssignal auf den Streptavidinstreifen abgezogen. Das Differenzsignal entspräche daher lediglich der Differenz der gebundenen Biotinmoleküle auf den Signal- und Referenzbereichen.

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde ein weiterer Goldchip mit Biotinstreifen und OEG-6 Flächen präpariert. Da die Streifenstruktur im SPR Bild nicht erkennbar

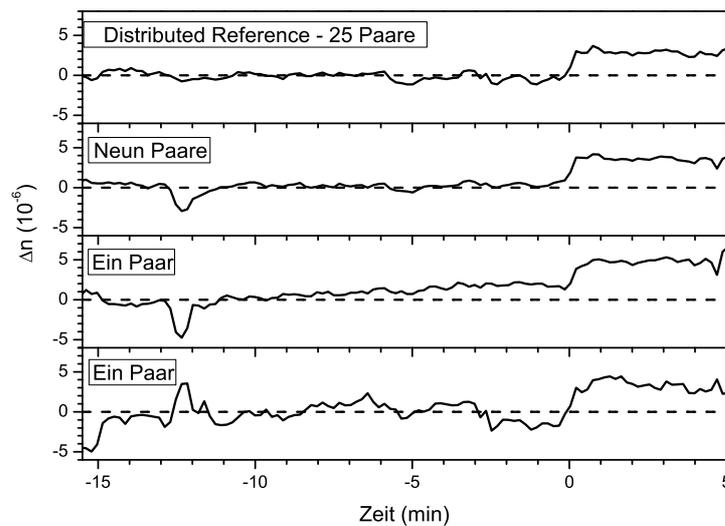


Abbildung 5.6: Biotinbindung und Basislinie für unterschiedlich viele Paare aus Signal- und Referenzbereichen.

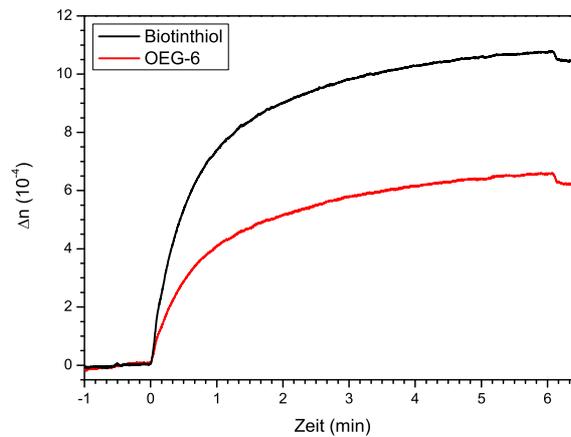


Abbildung 5.7: Bildung eines Streptavidinmonolayers in den Biotin- bzw OEG-6-Bereichen.

war, wurden vor Beginn der Streptavidinbindung einige Messbereiche unterschiedlicher Größe und Form zufällig auf der Oberfläche positioniert.

Die Bindung des Streptavidins wurde von Beginn an in allen Messbereichen beobachtet. Da nach der Immobilisierung des Streptavidins die Streifenstruktur sichtbar war, konnten nachträglich zwei Messbereiche identifiziert werden, die nur einen Biotinstreifen bzw. eine OEG-6 Fläche abdeckten. Das Streptavidinbindungssignal auf einem Biotinbereich betrug etwa 1×10^{-3} RIU, in einem OEG-6 Bereich war es immer noch groß (etwa 6×10^{-4} RIU, siehe Abbildung 5.7).

Das Ergebnis zeigt, dass die OEG6-Flächen nicht proteinresistent waren, sondern eine Anlagerung von Streptavidinmolekülen auch dort stattfand. Es ist allerdings anzumerken, dass die OEG-6 Lösung in diesem Experiment noch etwa zwei Wochen älter war als beim vorherigen Experiment zur Beobachtung der Biotin-Bindung. Die Proteinresistenz war daher weiter herabgesetzt. Da sich auf den OEG-6-Flächen etwa halb so viele Streptavidinmoleküle wie auf den Biotinflächen angelagert haben, würde auch ein später gemessenes Biotinbindungssignal nur halb so groß ausfallen, als wenn die OEG-6-Flächen eine Streptavidinanlagerung verhindert hätten.

Zusätzlich deutet auch die geringe Höhe des Streptavidinsignals darauf hin, dass der auf den Biotinthiolen aufbauende Streptavidinmonolayer nicht die höchst mögliche Dichte aufweist. Ein Grund dafür könnte darin liegen, dass auch die Biotinthiollösung schon einige Wochen alt war. Wegen der reduzierten Streptavidindichte reduziert sich die Zahl der möglichen Bindungsstellen für Biotinmoleküle und dementsprechend auch das zu erwartende Signal. Diese beiden Faktoren können daher als Erklärung dienen, warum das Biotinsignal bei dem beschriebenen Experiment um einen Faktor drei kleiner als im Experiment mit den Photodioden ausfiel.

Bei einer Optimierung der Oberflächenchemie könnte das Biotinsignal vergrößert werden. Dass es in diesem Experiment zu klein ausfiel, war jedoch nicht von Nachteil, da es die Empfindlichkeit der Technik unterstrich. Ein sehr kleines Molekül konnte

trotz nicht optimaler Oberflächenchemie mit einem sehr guten S/R-Verhältnis detektiert werden. Selbst kleinere Moleküle mit einem Molgewicht von unter 50 Dalton sollten bei einer geeigneten Oberflächenchemie messbar sein.

5.1.4 Empfindlichkeitssteigerung durch Erhöhung des Splittingfaktors

Um den Einfluss des Splittingfaktors auf die Rauschunterdrückung zu untersuchen, wurden die Signale von je 16 benachbarten Signal- und Referenzbereichen von der Messung der Biotinbindung in unterschiedlichen Zusammensetzungen analysiert, um unterschiedliche Splittingfaktoren zu simulieren. Je acht Paare befanden sich im oberen bzw. unteren Teil der Flusszelle (siehe Abbildung 5.8). Um einen Splittingfaktor von 1 zu simulieren, wurden die oberen acht Paare zu einem großen Signalbereich zusammengefasst. Die unteren acht Paare bildeten den Referenzbereich. Die resultierenden Signale wurden voneinander abgezogen und die Stabilität der Basislinie über einen Zeitraum von zehn Minuten vor dem Zeitpunkt der Biotinbindung gemessen. Das Biotinsignal lässt sich natürlich nicht mehr beobachten, da die konstruierten Messbereiche die gleiche Anzahl von Streptavidin- bzw. OEG-6-Flächen besitzen.

Analog zu dem oben beschriebenen Vorgehen wurden die Signal- und Referenzbereiche immer kleiner konstruiert, so dass auch die Splittingfaktoren 2,4 und 8 simuliert werden konnten. Die Messung des Rauschens für einen Splittingfaktor von 16 entspricht dann wieder der originalen Aufteilung von Signal- und Referenzbereichen.

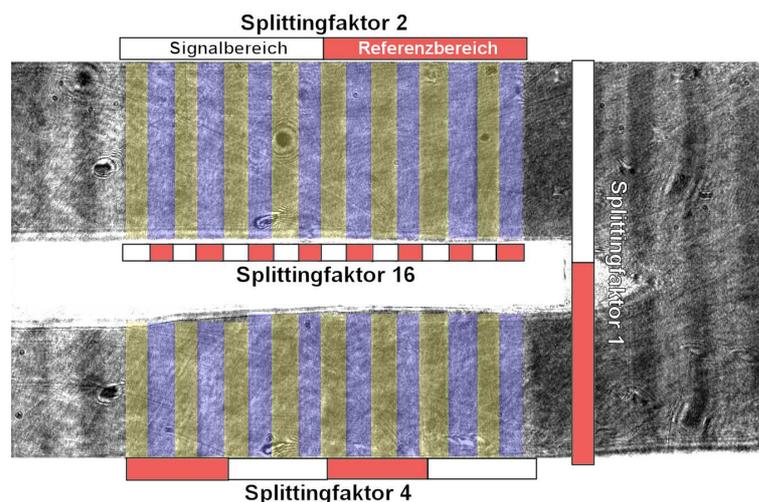


Abbildung 5.8: Insgesamt 16 Paare aus Signal- und Referenzbereichen wurden zur Simulation unterschiedlicher Splittingfaktoren genutzt. Für den Splittingfaktor 1 wurden die oberen 16 Boxen zu einem großen Signalbereich und die unteren 16 Boxen zu einem großen Referenzbereich zusammengefasst. Für jede Verdopplung des Splittingfaktor wurden diese Flächen geteilt, so dass doppelt so viele Signal- und Referenzbereich simuliert werden konnten.

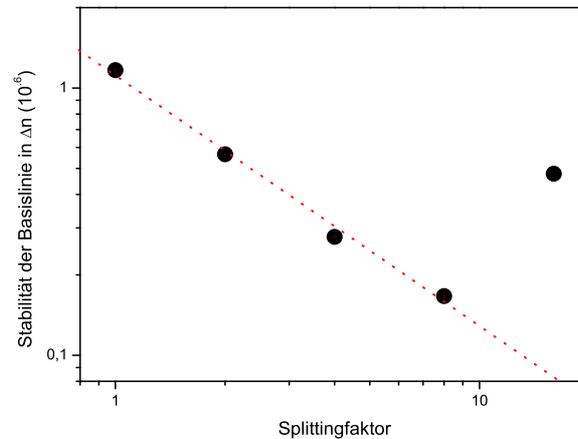


Abbildung 5.9: Die Stabilität der Basislinie verbessert sich mit jeder Erhöhung des Splittingfaktors. Lediglich der Datenpunkt für 16 weicht von diesem linearem Zusammenhang ab.

Die Abhängigkeit des Rauschens vom Splittingfaktor zeigt Abbildung 5.9. Das Rauschen verringert sich linear mit der Erhöhung des Splittingfaktors. Dies bestätigt die theoretische Vorhersage. Für den Splittingfaktor 8 ergibt sich das Rauschen der Basislinie nur noch mit 1.6×10^{-7} RIU und ist damit etwa einen Faktor 2 besser als das beste kommerzielle Gerät. Nur das Ergebnis für den höchsten Splittingfaktor weicht von der linearen Abhängigkeit ab. Der Grund dafür ist in der unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheit der Referenz- und Signalbereiche zu suchen.

Für den Splittingfaktor 16 sind alle Signalbereiche auf den Streptavidinstreifen und alle Referenzbereiche auf den OEG-6-Flächen positioniert. Die Reflektivität zwischen diesen Bereichen ist stark unterschiedlich. Dies bedeutet aber auch, dass die Messpunkte auf der Resonanzkurve in beiden Bereichen an unterschiedlichen Stellen liegen. Die Kompensation von inhomogenen Volumenbrechungsindexänderungen ist dadurch nicht beeinträchtigt. Intensitätsfluktuationen der Lichtquelle können jedoch nicht vollständig korrigiert werden. Diese unvermeidbaren Fluktuationen täuschen abhängig von der Position des Messpunktes auf der Resonanzkurve unterschiedliche Volumenbrechungsindexänderungen vor und sind daher die Limitierung für die Stabilität der Basislinie.

Bei den niedrigeren Splittingfaktoren tritt dieses Problem nicht auf, da in jedem simulierten Messbereich gleichviele Streptavidin- und OEG-6-Flächen vorhanden sind. Die Position des Messpunktes auf der Resonanzkurve zwischen simulierten Signal- und Referenzbereichen ist daher identisch.

Um eine weitere Sensitivitätssteigerung zu erhalten, müssten die Referenzflächen mit einem Protein beschichtet werden, das eine gleichgroße Verschiebung der Resonanzkurve wie das Streptavidin hervorruft, aber keine Affinität zu Biotin zeigt. Eine Extrapolation des Rauschverhaltens ergibt, dass die Stabilität der Basislinie in diesem Fall auf unter 1×10^{-7} RIU gesenkt werden kann.

Allerdings treten in diesem Fall neue Probleme auf, da die Signal- und Referenzbereiche dann nicht mehr optisch voneinander zu unterscheiden sind. Außerdem wäre eine aufwändigere Oberflächenchemie für die Mikrostrukturierung nötig. Für die im Allgemeinen sehr schwierige Messung von sehr kleinen Molekülen oder sehr niedrigen Konzentrationen könnte sich ein solcher Aufwand jedoch in einigen Fällen lohnen. Solche Nachweise sind momentan nur über eine nachträgliche Signalamplifikation mit Hilfe eines zweiten, größeren Antikörpers möglich [25, 44]. Demgegenüber bietet das SPR-Imaging eine schnelle und direkte Detektion ohne zusätzlichen Aufwand.

5.2 Identifikation einer einzelnen Nukleotid-Polymorphismus Mutation

Die Erbinformation einer menschlichen Zelle steckt in ihrer DNA (*Desoxyribonukleinsäure - engl. deoxyribonucleic acid*). Sie enthält die Informationen für die Produktion aller im menschlichen Körper vorkommender Proteine und Ribonukleinsäuren (RNA). Chemisch gesehen handelt es sich bei der DNA um eine Nukleinsäure, die aus einer Kette von vier unterschiedlichen Basen (Adenin, Thymin, Guanin, Cytosin) besteht. Die Basen werden üblicherweise mit ihren Anfangsbuchstaben abgekürzt. Normalerweise ordnet sich die DNA in einer Doppelhelix an, in der sich jeweils Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin gegenüberliegen. Zwischen Adenin und Thymin bilden sich dabei zwei, zwischen Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrückenbindungen aus.

Nachdem das menschliche Genom 2001 weitestgehend und 2004 vollständig entschlüsselt wurde [1, 45, 46], konzentriert sich die Forschung im Bereich der Genomik heutzutage auf die Analyse der so genannten SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Dies sind Variationen im menschlichen Genom, die bei mindestens 1% der menschlichen Population vorliegt. Etwa 90% aller Variationen sind SNP. Sie treten etwa alle 100-300 Basenpaare entlang der menschlichen DNA, die insgesamt 3 Milliarden Basenpaare besitzt, auf.

SNP werden verdächtigt, Auslöser für bestimmte Krankheiten zu sein. Eines der best-dokumentierten Beispiele dafür ist das so genannte ApoE Protein [48]. Sein Bauplan ist auf einem Teil der DNA kodiert, der zwei SNP aufweist. So existieren insgesamt drei leicht unterschiedliche ApoE Proteine (abgekürzt E2, E3, E4). Menschen, die ein E4-Protein besitzen, haben eine erhöhte Wahrscheinlichkeit an Alzheimer zu erkranken. Demgegenüber besitzen Menschen mit dem E2-Protein offenbar eine natürliche Resistenz gegen diese Krankheit. Die Ergebnisse sind jedoch nicht eindeutig. So können auch Menschen mit dem E2-Protein an Alzheimer erkranken, ebenso wie Menschen mit dem E4-Protein bis an ihr Lebensende von der Krankheit verschont bleiben können.

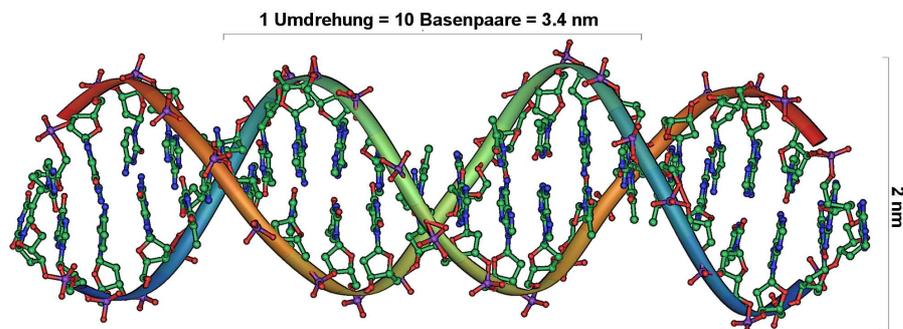


Abbildung 5.10: DNA-Doppelhelix [47]

Höchstwahrscheinlich ist nie ein einzelner SNP für den Ausbruch einer Krankheit verantwortlich, sondern eine Kombination von mehreren SNP. Diese Zusammenhänge zu erkennen, ist die große Aufgabe der Genomforschung.

Um zu bestimmen, welche SNP-Modifikationen bei einer zu untersuchenden menschlichen DNA vorliegen, werden auf einem Mikroarray je nach Anzahl der zu untersuchenden SNP einige hundert bis mehrere tausend Oligonukleotide immobilisiert. Dies sind kurze DNA-Einzelstränge mit einer Länge von etwa 20-30 Basenpaaren. Jeweils vier Oligonukleotide sind so modifiziert, dass sie zur Messung eines SNP dienen. Ihre DNA-Sequenzen sind gleich und eindeutig einem bestimmten Teil der menschlichen DNA zuzuordnen. Sie unterscheiden sich lediglich an der Position des SNP und besitzen dort je eine der vier möglichen Basen.

Bindet eine Einzelstrang-DNA an ein vollständig komplementäres, immobilisiertes Oligonukleotide, spricht man von einem *perfect match*. Allerdings bindet sich die Einzelstrang-DNA auch an die übrigen drei immobilisierten Oligonukleotide, da sie nur an einer Stelle in der DNA-Sequenz differieren. In diesem Fall spricht man von einem *one mismatch*. Diese Bindungen sind energetisch weniger stabil, da sich an der Stelle des Fehlers keine Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Daher binden sich in einem SNP-Experiment mehr Oligonukleotide an eine vollständig komplementäre DNA. Durch eine Messung der Hybridisierungssignale und eines Vergleichs der Signale untereinander, lässt sich daher der Typ des SNP identifizieren.

In einem realen Experiment wird menschliche DNA extrahiert, gestückelt und in einem Puffer auf das Mikroarray gegeben. Die DNA liegt dabei immer noch als Doppelhelix vor. Die Temperatur des Puffers wird dann soweit erhöht, dass sich die Doppelhelix auflöst. Anschließend wird die Temperatur gesenkt, so dass die vorliegenden DNA-Einzelstränge wieder zu einer Doppelhelixbindung übergehen. Allerdings binden dabei auch einige der Einzelstränge an die immobilisierten Oligonukleotide auf der Oberfläche.

Durch Anfärben der gebundenen DNA auf der Oberfläche durch Fluorophore kann dann bestimmt werden, welchen SNP die untersuchte DNA besitzt. Allerdings sind diese Microarrays je nach Anzahl der zu untersuchenden SNP sehr teuer und können nur einmalig benutzt werden.

Das SPR-Imaging könnte zukünftig in diesem Bereich eingesetzt und anstelle der Fluoreszenztechnik zum Auslesen der Microarrays benutzt werden. Dadurch würden zum einen Kosten für das Anfärben der Doppelbindungen entfallen und zusätzlich wäre ein solches Mikroarray mehrfach einsetzbar, da eine Renaturierung des DNA-Chips beim SPR Imaging möglich ist.

5.2.1 Theorie der DNA-Schmelzkurven

Zwei komplementäre DNA-Einzelstränge bilden unter normalen Umständen (Raumtemperatur, in Puffer gelöst) eine Doppelhelix. Der Übergang in Einzelstränge bei Er-

höhung der Temperatur ist fließend und vollzieht sich in einem relativ engen Temperaturfenster. Die Anzahl der in einer Doppelhelix vorliegenden DNA in Abhängigkeit von der Temperatur wird Schmelzkurve genannt. Als Schmelztemperatur wird dabei die Temperatur bezeichnet, bei der nur noch 50% der DNA in einer Doppelhelix vorliegt.

Die Schmelztemperatur ist abhängig von der Länge der DNA. Außerdem spielt die Zusammensetzung der Basenpaare eine Rolle, da GC-Paare eine Wasserstoffbrückenbindung mehr ausbilden als AT-Paare. Befindet sich eine falsche Basenpaarung in der Doppelhelix, reduziert dies die Schmelztemperatur deutlich. Wie hoch die Reduktion ausfällt, ist abhängig von der Länge der DNA und der Position der Fehlstelle in der Doppelhelix. Zusätzlich wird die Schmelztemperatur auch noch durch die Salzkonzentration des Puffers beeinflusst. Je höher der Salzgehalt, desto niedriger ist die abstoßende Wirkung der negativ geladenen DNA-Einzelstränge und umso höher die Schmelztemperatur.

5.2.2 Immobilisation von Oligonukleotiden auf Gold

Um Oligonukleotide auf Gold zu immobilisieren, gibt es mehrere Ansätze mit einer jeweils unterschiedlichen Oberflächenchemie [49–52]. Am einfachsten gelingt die Immobilisation, wenn das 5'-Ende des Oligonukleotids mit einer zusätzlichen Thiolgruppe modifiziert wurde. Diese Thiolgruppe kann dann direkt zur Immobilisation des Oligonukleotids dienen.

Bei der Immobilisation muss auf eine ausgewogene Dichte der Oligonukleotide geachtet werden. Ist die Dichte zu hoch, stehen zwar sehr viele Bindungsplätze zur Verfügung, aber die Hybridisierungseffizienz ist niedrig, da nicht genug Platz zur Ausbildung einer Doppelhelix zur Verfügung steht [53]. Das resultierende Bindungssignal ist kleiner, als man erwarten würde, wenn alle Bindungsplätze genutzt würden. Ist die Dichte auf der Oberfläche zu niedrig, liegt zwar die Hybridisierungseffizienz bei 100%, aber das Signal fällt trotzdem zu niedrig aus, da Raum für zusätzliche DNA Bindungen verschwendet wurde. Dies ist insbesondere für SNP-Analytik wichtig, da dort Bindungssignale unterschiedlicher DNA-Spots miteinander verglichen werden. Die Dichte der unterschiedlichen DNA Spots muss also identisch sein.

Die Dichte lässt sich auf unterschiedliche Arten beeinflussen. Großen Einfluss hat dabei die Salzkonzentration des Puffers, in der die DNA zur Immobilisierung gelöst ist. Eine Einzelstrang-DNA ist negativ geladen. Das führt dazu, dass bereits immobilisierte Oligonukleotide einer Immobilisation von weiteren Oligonukleotiden entgegenwirken. Durch eine Erhöhung der Salzkonzentration im Puffer schirmen die Salzionen die negativ geladenen Oligonukleotide ab und reduzieren die abstoßende Wirkung. Daher ist die resultierende Oligonukleotiddichte auf der Oberfläche umso größer, je höher die Salzkonzentration im Puffer ist [54, 55].

Außerdem lässt sich die DNA-Dichte über die Immobilisationszeit und durch eine

Immobilisation als Doppelhelix beeinflussen [56, 57].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Immobilisation von Oligonukleotiden jeweils $1 \mu\text{M}$ DNA in einem Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer ($1 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$ gelöst in Wasser) angesetzt. Die Lösung wurde für mindestens 2 Stunden in Kontakt mit der Goldoberfläche gebracht, was zur Ausbildung eines kompletten Monolayers ausreicht [57]. Geschah die Immobilisation außerhalb der SPR-Flusszelle, so wurde die Goldoberfläche anschließend mit Wasser gespült und mit Stickstoff getrocknet.

Eine Übersicht über die in dieser Doktorarbeit verwendeten Oligonukleotide zur Immobilisation auf der Goldoberfläche findet sich in der Tabelle 5.1. Die Oligonukleotide RS1 und RS2 unterscheiden sich lediglich an einer Position und werden daher zur Demonstration einer SNP-Analyse verwendet. Alle Oligonukleotide beginnen am 5'-Ende mit 5 Thymin-Basen. Diese dienen lediglich als Abstandhalter der aktiven DNA-Sequenz von der Goldoberfläche.

Auf die Verwendung menschlicher DNA wurde verzichtet. Dies hätte den experimentellen Aufwand extrem vergrößert, da man dazu die DNA extrahieren und aufbereiten hätte müssen. Stattdessen wurde zu jeder thiolmodifizierten DNA ein künstlich hergestelltes Einzelstrang-Oligonukleotide gekauft (siehe Tabelle 5.2).

Bezeichnung	Basenfolge	M [g/mol]
RS1	5'-TTT TTA GAA GAC AAA GAG CTC AT-3'	7268
RS2	5'-TTT TTA GAA GAG AAA GAG CTC AT-3'	7308
G-HCV	5'-TTT TTC CAA GAA AGG ACC CG-3'	6299
T1-HCV	5'-TTT TTC TCC AGG CAT TGA GC-3'	6271
T2-HCV	5'-TTT TTC AAC CCA ACG CTA CT-3'	6184

Tabelle 5.1: Liste aller zur Verfügung stehenden Oligonukleotide, die eine Thiolgruppe am 5'-Ende besitzen und daher zur Immobilisation auf Gold geeignet sind.

Bezeichnung	Basenfolge	M [g/mol]
RS1c	5'-ATG AGC TCT TTG TCT TCT-3'	5447
RS2c	5'-ATG AGC TCT TTC TCT TCT-3'	5407
G-HCVc	5'-TTT CGG GTC CTT TCT TGG-3'	5479
T1-HCVc	5'-GCT CAA TGC CTG GAG-3'	4594
T2-HCVc	5'-AGT AGC GTT GGG TTG-3'	4680

Tabelle 5.2: Liste der komplementären DNA.

5.2.3 Verbesserung der SNP Identifizierung durch Optimierung der Messtemperatur

Üblicherweise wird die DNA Hybridisierung in einem SNP Experiment bei Raumtemperatur durchgeführt. Das garantiert eine maximale Bindung der Oligonukleotide und ein großes Signal. Allerdings gibt es die theoretische Vorhersage, dass die Unterscheidbarkeit eines SNP deutlich verbessert werden kann, wenn die Verschiebung der Schmelztemperatur durch einen SNP für die Analyse ausgenutzt wird [58].

Um dies experimentell zu verifizieren, wurde auf eine Hälfte eines Goldchips das Oligonukleotide RS2 immobilisiert. Die andere Hälfte des Goldchips wurde als Referenz genutzt. Anschließend wurde das Goldplättchen in die temperierbare Flusszelle eingebaut. Mit Hilfe des Peltierelements war es möglich, die Puffertemperatur in der Flusszelle frei zu wählen.

Zunächst wurde Hepes-Puffer zur Stabilisierung der Basislinie durch die Flusszelle geleitet. Darauf folgte eine 1 μ M Lösung der komplementären RS2c-DNA, die ebenfalls in Hepes-Puffer gelöst war. Das Bindungssignal wurde mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanz detektiert. Anschließend wurde eine 6 M Harnstofflösung für etwa 10 Minuten durch die Flusszelle geleitet. Diese löste die Doppelhelix auf und renaturierte die Oberfläche, so dass diese anschließend für ein weiteres DNA-Hybridisierungsexperiment genutzt werden konnte. Das Hybridisierungssignal wurde für unterschiedliche Puffertemperaturen gemessen und daraus die Schmelzkurve für den *perfect match* bestimmt [41]. Anschließend wurde das gleiche Experiment auch mit RS1c durchgeführt, um die Schmelzkurve für eine *one mismatch* Bindung zu bestimmen.

Es wurden mehrere Experimente mit jeweils neu präparierten Goldoberflächen für die Auswertung verwendet. Die absoluten Bindungssignale der einzelnen Experimente waren jedoch nicht vergleichbar, da die Immobilisierung nicht reproduzierbar gelang. Daher wurde für jedes Experiment auch ein Bindungssignal bei Raumtemperatur gemessen. Dieses wurde dann zur Normierung und Vergleichbarkeit der Experimente verwendet. Das Bindungssignal für den *one mismatch* wurde dabei auf 70% des *perfect match* Bindungssignals gesetzt, da dies einem später gemessenen Verhältnis bei Raumtemperatur entspricht. Beide Schmelzkurven sind in Abbildung 5.11 dargestellt.

Das Temperaturfenster, in dem der Übergang zwischen einer Doppelhelix und dem Vorliegen von Einzelstrang-DNA liegt, ist für beide Schmelzkurven etwa gleich groß. Die Schmelztemperaturen unterscheiden sich wie erwartet um etwa 7.2°C auf Grund der Fehlstelle innerhalb der Doppelhelix beim *one mismatch*.

Allerdings sind die absoluten Werte der Schmelztemperatur im Vergleich zu der Hybridisierung in einer wässrigen Lösung deutlich herabgesetzt. Die theoretische Schmelztemperatur für den *perfect match* beträgt unter Berücksichtigung der vorliegenden Salzkonzentration 56.9°C [59]. Dies liegt deutlich über der gemessenen Schmelztemperatur von 43.5°C. Die theoretisch berechnete Schmelztemperatur für den *one mis-*

match ist 51.1°C .

Die Differenz zwischen der theoretischen und der gemessenen Schmelztemperatur resultiert aus der abstoßenden Wirkung der DNA auf der Oberfläche untereinander [58]. In einer Lösung stoßen sich nur die zwei negativ geladenen DNA-Einzelstränge voneinander ab. Dem wirken die Wasserstoffbrückenbindungen in der Doppelhelix entgegen. Auf einer Oberfläche kommen zusätzlich noch die abstoßenden Kräfte hinzu, die benachbarte immobilisierte Oligonukleotide auf eine DNA-Doppelhelix ausüben. Das führt dazu, dass die stabilisierend wirkenden Kräften der Wasserstoffbrückenbindungen eher überwunden werden und die Schmelztemperatur daher gesenkt wird. Je höher die DNA-Dichte auf der Oberfläche, desto weiter wird die Schmelztemperatur herabgesetzt [58].

Entscheidend ist jedoch, dass die Differenz der Schmelztemperaturen zwischen *perfect match* und *one mismatch* auch bei einer Messung mit immobilisierter DNA erhalten bleibt. Bei einer Messung bei Raumtemperatur ist der Unterschied zwischen den absoluten Bindungssignalen etwa 30%. Subtrahiert man die beiden Schmelzkurven, so erkennt man jedoch, dass das größte Differenzsignal bei etwa 40°C auftritt. Bei dieser Temperatur ist die Hybridisierungseffizienz für den *one mismatch* bereits auf unter 50% gesunken, wohingegen sie für den *perfect match* noch oberhalb von 50% liegt. Eine SNP-Messung bei dieser Temperatur verspricht eine deutlich bessere Unterscheidbarkeit der Bindungssignale.

Daher wurde ein neuer Goldchip wie oben beschrieben mit RS2 präpariert. Auf dieser Oberfläche wurden bei 25°C und bei 40°C jeweils drei Hybridisierungssignale für den *perfect match* und den *one mismatch* gemessen. Dies erlaubt die Bestimmung eines mittleren Bindungssignals und einer Standardabweichung zur Bestimmung des Fehlers (siehe Abbildung 5.12). Zwischen den Messungen wurde die Oberfläche durch

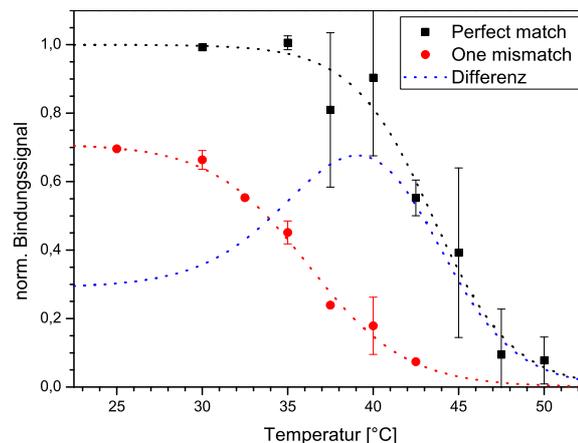


Abbildung 5.11: Für die Auswertung der Schmelzkurven für einen *perfect match* und einen *one mismatch* wurden die Bindungssignale jeweils auf das bei Raumtemperatur gemessene Bindungssignal normiert. Die Schmelztemperatur für den *perfect match* beträgt 43.5°C bzw. 36.2°C für den *one mismatch*.

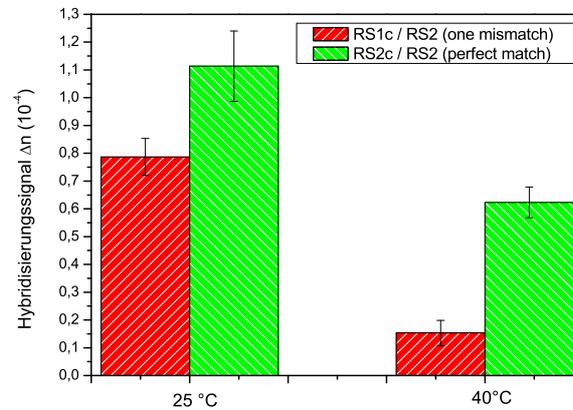


Abbildung 5.12: Das mittlere Hybridisierungssignal eines perfect matches und eines one mismatches ist bei 40°C deutlich größer als bei 25°C.

zehnminütiges Spülen mit einer 6 M Harnstoff Lösung renaturiert. Die absoluten Bindungssignale sind in diesem Fall miteinander vergleichbar, da für alle Experimente die selbe Oberfläche genutzt wurde.

Das mittlere Bindungssignal bei 25°C für einen *perfect match* betrug $(1.11 \pm 0.12) \times 10^{-4}$ RIU bzw. $(0.79 \pm 0.06) \times 10^{-4}$ RIU für einen *one mismatch*. Der Gesamtfehler ergibt sich aus den beiden Einzelfehlern zu 0.14×10^{-4} RIU. Die Differenz der beiden Signale (0.32×10^{-4} RIU) ist kleiner als die 3σ -Umgebung des Gesamtfehlers. Mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit kommt es daher vor, dass das Bindungssignal eines *one mismatches* größer ausfällt als das Bindungssignal eines *perfect matches*. Dies würde zu einer falschen SNP-Analyse führen.

Bei 40°C ergibt sich ein mittleres Bindungssignal von $(0.62 \pm 0.06) \times 10^{-4}$ RIU für den *perfect match* und $(0.15 \pm 0.05) \times 10^{-4}$ RIU für den *one mismatch*. Die Differenz zwischen den Bindungssignalen hat sich vergrößert auf 0.47×10^{-4} RIU und liegt damit weiter außerhalb der 3σ -Umgebung des Gesamtfehlers (0.08×10^{-4} RIU). Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit für eine falsche SNP-Analyse deutlich herabgesetzt.

Durch eine Erhöhung der Messtemperatur wird die Höhe des absoluten Messsignals zwar etwas verringert, allerdings kann die Wahrscheinlichkeit für eine falsche SNP-Identifikation deutlich verringert werden, da die Differenz zwischen den beiden Werten erhöht wird.

Die optimale Messtemperatur für eine SNP-Analyse ist jedoch abhängig von den verwendeten Oligonukleotiden und kann daher nicht für alle Messungen als Standard festgelegt werden. So ist die Schmelztemperatur zu einem großen Teil durch die Länge und Zusammensetzung der DNA bestimmt. Die Salzkonzentration des Puffers verschiebt die Schmelztemperatur zu höheren Temperaturen. Demgegenüber hat die Oberflächendichte einen negativen Einfluss auf die Schmelztemperatur. In dem oben beschriebenen Experiment wurde sie um etwa 13°C abgesenkt. Je nach Art der Oberflächenchemie kann diese Verschiebung aber auch kleiner oder größer ausfallen.

Für eine temperaturoptimierte SNP-Analyse in einem Microarray wäre daher eine sorgfältige Auswahl der Oligonukleotide nötig, um eine einheitliche optimale Mess-temperatur für alle Oligonukleotide zu gewährleisten. Es wäre auch denkbar, mehrere gleichartige DNA Spots mit unterschiedlichen Oberflächendichten zu präparieren und so für jede SNP-Analyse mehrere optimale Messtemperaturen zur Auswahl zu haben [58].

5.2.4 Präparation eines DNA Microarrays

Neben der Unterscheidbarkeit eines SNP in einem Hybridisierungsexperiment ist das Auslesen eines DNA Microarrays ein wichtiges Kriterium für die Einsetzbarkeit des SPR Imagings. Daher wurden in Zusammenarbeit mit der Universität Tübingen einige Microarrays auf Gold präpariert.

Dazu wurde ein Prototyp eines TopSpot Microrarrayers verwendet [60]. Das Herzstück des Spotters ist ein Druckkopf, der aus einer Fluidikzelle mit 24 Flüssigkeitsreservoirs besteht (siehe Abbildung 5.13). In der Mitte des Druckkopfes befinden sich 24 dünne Bohrungen, die in einem 4×6 -Muster angeordnet sind und über dünne Kanäle mit den Reservoirs verbunden sind. Durch Kapillarkräfte füllen sich die Bohrungen mit den Flüssigkeiten aus den Reservoirs.

Der Druckkopf wird anschließend in den TopSpot eingebaut und das Goldplättchen darunter positioniert. Ein kurzer piezoelektrischer Impuls, der auf den Druckkopf ausgeübt wird, lässt die in den Bohrungen vorhandene Flüssigkeit als Tropfen aus dem Druckkopf austreten. Diese landen dann auf dem Goldchip, der einige Millimeter unter dem Druckkopf positioniert ist. Die Bohrungen füllen sich sofort wieder mit Flüssigkeit und können kurze Zeit später erneut benutzt werden. Der Goldchip kann schrittweise unter der Fluidikzelle verschoben werden, so dass auf dem Goldchip durch

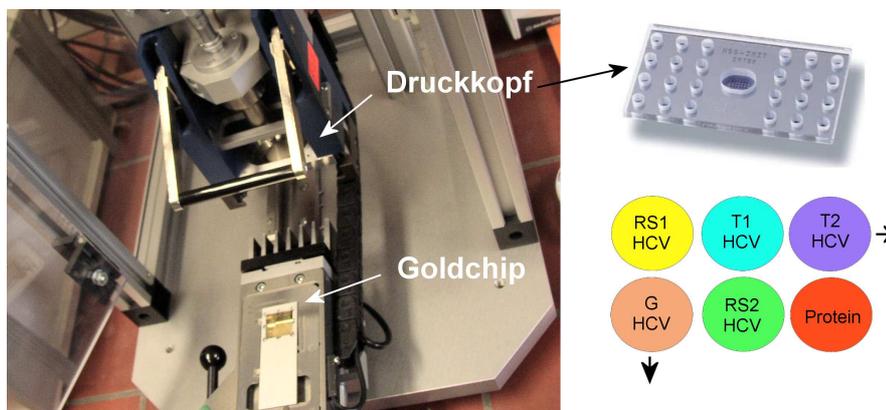


Abbildung 5.13: Das Foto zeigt den TopSpot Microarrayer. Der Goldchip konnte unter dem Druckkopf schrittweise verschoben werden, so dass der komplette Goldchip mit einem Microarray präpariert werden konnte. Dieses bestand aus einem sich wiederholendem 2×3 Muster von 5 Oligonukleotiden und einem Protein.

mehrmalige Spotvorgänge ein regelmäßiges Muster erzeugt werden kann. Die maximale Anzahl unterschiedlicher Flüssigkeiten ist dabei auf 24 begrenzt. Es gibt allerdings auch Druckköpfe, die 96 bzw. 384 Reservoirs besitzen.

Das Microarray wurde mit 5 unterschiedlichen Oligonukleotiden und einem Protein aufgebaut. Die unterschiedlichen Moleküle waren dabei in einem 2×3 -Muster angeordnet, das sich über den kompletten Goldchip wiederholte (siehe Abbildung 5.13). Die Oligonukleotide waren am 5'-Ende thiolmodifiziert und lagen zum Spotten als $1 \mu\text{M}$ Lösung in $1 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$ Puffer vor. Das Protein hatte ebenfalls eine Thiolmodifizierung und war in einem Kaliumphosphatpuffer gelöst ($20 \text{ mM K}_3\text{PO}_5$, 5 mM MgCl_2 , $\text{pH}=7.4$). Zum Spotting wurde die Proteinlösung im Verhältnis 1:1 mit Wasser verdünnt. Das Molgewicht des Proteins war sehr groß und betrug etwa 250 kg/mol .

Die durch die DNA erzeugte Reflektivitätsänderung ist nicht groß genug, um die DNA Spots in einem SPR-Experiment direkt identifizieren zu können. Die Proteinspots erzeugen eine deutlich größere Reflektivitätsänderung, so dass sie als Erkennungsmuster für das DNA Microarray genutzt wurden.

Unglücklicherweise produzierte der Spotter kein regelmäßiges Muster auf der Goldoberfläche (siehe Abbildung 5.14). So fehlten einige Tropfen in der Matrix oder wurden etwas abseits von ihrer eigentlich vorgesehenen Position auf die Goldoberfläche gesetzt.

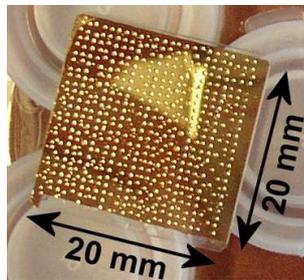


Abbildung 5.14: Vollständig gespottetes Microarray auf einem Goldchip: Unglücklicherweise war das Array nicht perfekt, so dass an einigen Stellen Tropfen fehlten oder nicht an der vorgesehenen Stelle positioniert waren.

Der Goldchip wurde während des Spotvorganges auf 10°C Celsius gekühlt. Dies verhinderte eine vorzeitige Verdampfung der DNA- und Proteintropfen, was einer Immobilisierung der Moleküle auf das Gold entgegengewirkt hätte. Nach dem Spotprozess wurden die Goldplättchen in ein geschlossenes Becherglas gegeben, in dem etwas Wasser vorhanden war und eine gesättigte Wasserstoffatmosphäre herrschte. Dies verhinderte eine Verdampfung der Tropfen dauerhaft.

Die Goldchips wurden für mehr als 12 Stunden in diesem Behältnis aufbewahrt. Anschließend wurde die Oberfläche mit Wasser gespült und mit Stickstoff getrocknet.

Einige DNA Chips wurden nicht abgewaschen und an Luft getrocknet. Die Tropfen auf dem Goldchip verdampften dabei sehr schnell. Dadurch blieb eine dünne Salzschrift

auf der Goldoberfläche zurück, die der Größe und Form des ursprünglichen Tropfens entsprach. Die Salzschrift konnte anschließend unter einem Lichtmikroskop beobachtet werden. Der mittlere Durchmesser der Tropfen betrug $480 \pm 50 \mu\text{m}$. Der Abstand zwischen zwei Tropfen wurde mit $800 \mu\text{m}$ bestimmt.

5.2.5 Untersuchung der Einsetzbarkeit für High-Throughput-Messungen

Ein präparierter DNA Goldchip wurde in den SPR Aufbau eingebaut. Dabei wurde die S-förmige Flusszelle benutzt. Auf eine Temperaturstabilisierung wurde jedoch verzichtet, so dass alle Messungen bei Raumtemperatur durchgeführt wurden [61].

Die Proteinspots erzeugten eine starke Reflektivitätsänderung, so dass sie leicht identifiziert werden konnten (siehe Abbildung 5.15). Da die relative Position der DNA Spots zu den Proteinspots bekannt war, wurden die Messbereiche für die DNA Spots daher anhand der sichtbaren Proteinspots positioniert. Insgesamt wurden 32 Messbereiche für DNA Spots und neun Referenzflächen für die Messung platziert. Jede DNA-Messfläche war 18×42 Pixel groß. Leider erlaubte die von uns verwendete Software nicht mehr als 50 Bereiche gleichzeitig zu messen.

Zunächst wurde Laufpuffer (10 mM KH_2PO_4 , 100 mM KCl, pH=6.5) zur Stabilisierung der Basislinie gepumpt. Anschließend wurden für jeweils etwa fünf Minuten 1 μM Lösungen von RS1c, T1-HCVc und G-HCVc durch die Flusszelle geleitet. Zwischen den einzelnen DNA Lösungen wurde jeweils wieder Laufpuffer gepumpt.

Zur Auswertung wurden für die RS1-, RS2-, T2- und G-HCV-Messbereiche über 5,

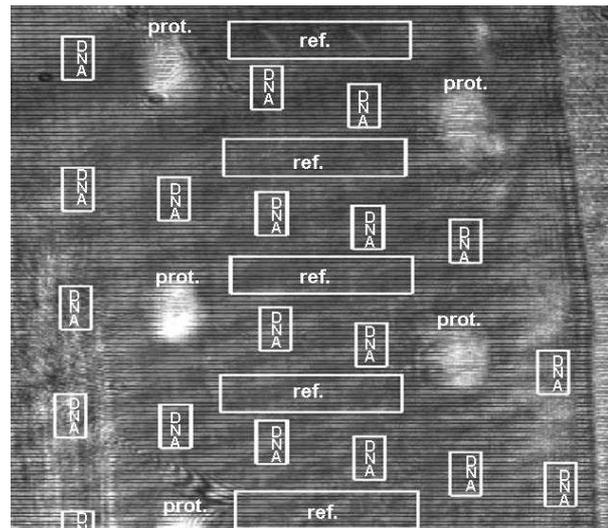


Abbildung 5.15: Ansicht des Microarrays im SPR-Experiment: Lediglich die Proteinspots können eindeutig identifiziert werden. Anhang ihrer Positionen wurden die Messbereiche für die DNA und Referenzbereiche festgelegt.

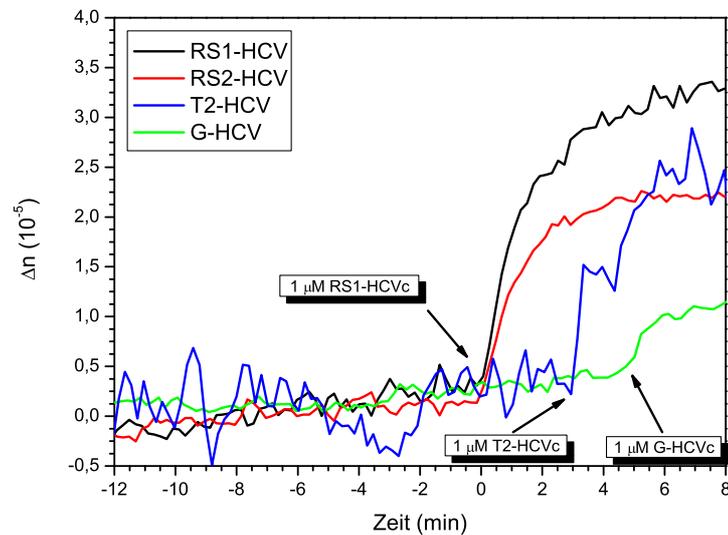


Abbildung 5.16: Spezifische Hybridisierung im Microarray. Für jedes Signal wurde über eine bestimmte Anzahl von gleichartigen Messbereichen gemittelt.

4, 8 bzw. 5 gleichartige Messbereiche gemittelt. Die Hybridisierungssignale sind in Abbildung 5.16 dargestellt. Zur Veranschaulichung sind die Hybridisierungssignale für T2-HCVc und G-HCVc zeitlich verschoben worden, so dass sie in der Abbildung 2 bzw. 4 Minuten nach der RS1c Bindung auftreten. Tatsächlich traten sie etwa 7 bzw. 14 Minuten nach der RS1c Bindung auf.

Bei der Injektion von RS1c treten sowohl im RS1 als auch im RS2 Bereich Bindungssignale auf. Dieses ist für den RS1 Messbereich etwas größer als für den RS2 Bereich. Dies ist zu erwarten, da es einem *perfect match* entspricht und zeigt, dass eine SNP Analyse auch in einer Microarrayanordnung möglich ist.

Die Stabilität der Basislinie ist in den T2-Bereichen deutlich schlechter als in den anderen Messbereichen. Dabei konnte hierfür über 8 Messbereiche gemittelt werden. Daher wäre eigentlich eine Stabilisierung im Vergleich zu den anderen Messbereichen zu erwarten gewesen. Der Grund für das höhere Rauschen liegt in der Anordnung der T2-Spots auf dem Goldchip. Sie befinden sich in Flussrichtung direkt hinter den Proteinspots. Sehr wahrscheinlich ist daher, dass sich einige unspezifisch gebundene Proteine aus den Proteinspots lösen und durch den laminaren Fluss hauptsächlich über die T2-Spots abtransportiert werden. Diese Proteine können sich an die DNA Spots anlagern und auch wieder ablösen (so genanntes *rebinding*). Auf Grund des hohen Molekulargewichtes des verwendeten Proteins stört dies die Basislinie erheblich.

Das Bindungssignal von T2-HCVc fällt auf Grund der etwas geringeren Molmasse etwas kleiner aus als das von RS2c. Das Bindungssignal von G-HCVc in den entsprechenden Messbereichen ist jedoch noch einmal deutlich kleiner und lässt sich nicht durch unterschiedliche Molgewichte erklären. Der Grund hierfür wird ersichtlich, wenn man jeden G-HCV-Messbereich einzeln betrachtet. Lediglich in zwei der

fünf G-HCV-Messbereiche lässt sich eine Bindung beobachten. Die anderen drei Bereiche zeigen überhaupt keine Änderung der Basislinie bei Zugabe der komplementären DNA. Durch die Mittelung über 5 Messbereiche fällt das mittlere Bindungssignal daher kleiner aus.

Der Grund dafür ist in der ungleichförmigen Strukturierung des Microarrays zu suchen. Die DNA Spots waren nicht direkt identifizierbar und die Messbereiche mussten daher blind gesetzt werden. Drei der G-HCV Messbereiche waren daher vermutlich in Bereichen platziert, in denen der DNA Tropfen entweder gar nicht oder deutlich abseits vom Muster gespottet wurde. Daher war keine G-HCV DNA in diesen Messbereichen vorhanden. Ein Bindungssignal konnte deswegen nicht beobachtet werden.

Die Ungleichmäßigkeit des Musters machte sich auch an einer anderen Stelle bemerkbar. Betrachtet man die Bindung von RS1c in jedem der 5 RS1-Messbereich separat, erkennt man deutliche Unterschiede in der Höhe des Messsignals (siehe Abbildung 5.17). Bereits bei leichten Abweichung der DNA Spots aus dem Muster des Microarrays decken die blind gesetzten Messbereiche nur zu einem gewissen Teil eine Fläche mit immobilisierter DNA ab. Im Rest des Messbereiches wird lediglich eine Goldoberfläche beobachtet, bei der keine Bindung erwartet wird. Das Bindungssignal verringert sich daher, je nachdem wie weit der gespottete DNA Tropfen vom Muster abweicht.

Für die Auswertung wurde für jeden Datenpunkt über 25 Bilder gemittelt, um nicht durch Schrotrauschen des CCD-Chips begrenzt zu sein. Daraus resultiert eine Zeitauflösung von 10 Sekunden. Die Stabilität der Basislinie eines einzelnen Messbereiches wurde exemplarisch anhand der fünf RS1-Spots über zehn Minuten mit 1.4×10^{-6} RIU bestimmt. Die Limitierung durch das theoretisch berechnete Schrotrauschen lag

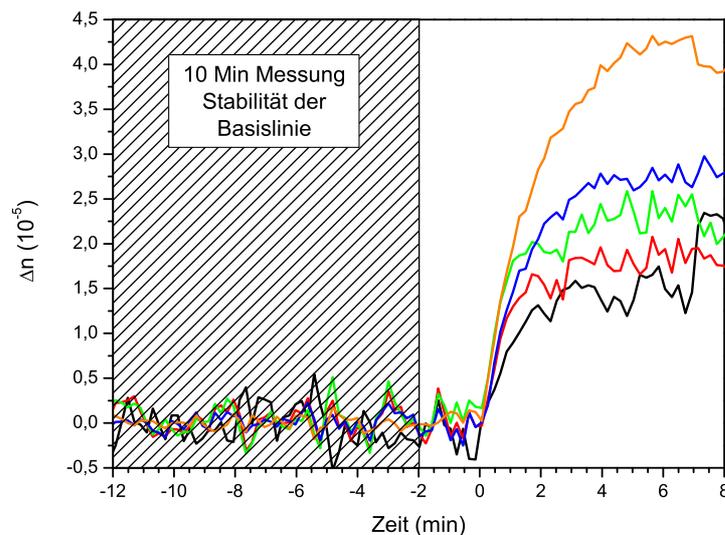


Abbildung 5.17: Bindung der komplementären DNA in den 5 RS1-HCV Messbereichen. Die Stabilität der Basislinie wurde anhand dieser Messungen über einen Zeitraum von 10 Minuten bestimmt.

trotz der Datenmittelung über 25 Punkte immer noch bei 7×10^{-7} RIU und trug daher nicht unwesentlich zum Gesamtrauschen bei. Mittelt man die fünf RS1-Messbereiche, so reduziert sich das Rauschen der Basislinie auf 8×10^{-7} RIU. Das theoretische Schrotrauschen verringert sich auf 3×10^{-7} RIU.

Die gemessenen Hybridisierungssignale sind etwa fünf mal kleiner, als in früheren Messungen, bei denen die selben Oligonukleotide verwendet wurden [4]. Dort geschah die Immobilisation jedoch von Hand indem ein großer Tropfen der Flüssigkeit auf die Goldoberfläche gesetzt wurde. Bei der hier verwendeten Spottingtechnik betrug das Volumen eines Tropfens etwa 17 nl. Selbst wenn alle Oligonukleotide, die in einem solchen Tropfen vorhanden waren, auf der Goldoberfläche immobilisierten, betrug die DNA-Dichte nur etwa 5×10^{12} Moleküle pro cm^2 . Dies ist einen Faktor zwei geringer als für einen vollständig gesättigten DNA Monolayer nötig ist [62, 63]. Eine Steigerung des Hybridisierungssignals ließe sich also durch eine Optimierung der Oberflächenchemie erreichen. Außerdem sollte durch eine exaktere Positionierung der DNA Spots die Streuung der Bindungssignale verringert und die Vergleichbarkeit unterschiedlicher DNA Spots verbessert werden.

Legt man die Größe der hier verwendeten Messbereiche zu Grunde und berücksichtigt, dass etwa 25% der Goldoberfläche mit DNA Spots belegt ist, könnten bei optimaler Anordnung des DNA Arrays und der vollen Ausnutzung des CCD-Chips insgesamt 400 DNA Spots gleichzeitig beobachtet werden. Dabei ist die Empfindlichkeit von 1.4×10^{-6} RIU für diese 400 parallelen Einzelmessungen etwa um einen Faktor 4 besser als konventionelle SPR-Imaging Experimente, die lediglich 144 Reaktionen simultan messen konnten [2].

5.3 Verbesserung der Empfindlichkeit durch Optimierung des Einfallswinkels

In den meisten SPR-Imaging Experimenten wird lediglich eine Wellenlänge zur Beleuchtung der Goldoberfläche genutzt. Dies vereinfacht den experimentellen Aufbau, da Standardkomponenten zur Ausleuchtung und Messung verwendet werden können. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine Möglichkeit gefunden, die Empfindlichkeit konventioneller SPR-Imaging Experimente ohne zusätzlichen Aufwand zu erhöhen [64].

Eine Verschiebung der Resonanzkurve durch eine Brechungsindexänderung Δn führt dabei zu einer Signaländerung S , die sich allgemein folgendermaßen ausdrücken lässt:

$$S = \frac{dI_0R}{dn} \Delta n = I_0 \frac{dR}{dn} \Delta n \quad . \quad (5.2)$$

Dabei bezeichnet R die Reflektivität im gewählten Messpunkt auf der Resonanzkurve und I_0 die Intensität der Lichtquelle.

In fast allen experimentellen Arbeiten wird dieser Ausdruck zur Optimierung des Einfallswinkels genutzt. Dieser wird daher so gewählt, dass an der steilsten Stelle der Resonanzkurve gemessen wird, wo dR/dn ein Maximum besitzt.

Dabei wird übersehen, dass nicht ein maximales Signal der entscheidende Faktor für die Empfindlichkeit ist, sondern das S/R-Verhältnis. Dieses gilt es zu optimieren. Dazu muss analysiert werden, welche Faktoren zum Rauschen beitragen.

Ist die Nachweisgrenze durch Fluktuationen des Volumenbrechungsindex der Flüssigkeit beschränkt (bspw. durch einen Temperaturgradienten), so ist es gleichgültig, an welcher Stelle der Resonanzkurve gemessen wird. Denn das Rauschen wird genauso wie ein auftretendes Signal verstärkt. Das S/R-Verhältnis ist in diesem Fall unabhängig vom Einfallswinkel.

Anders stellt sich die Lage jedoch dar, wenn lediglich wenige Pixel des CCD-Chips zur Beobachtung eines Messbereiches verwendet werden. Das Schrotrauschen des CCD-Chips kann dann die Empfindlichkeit beschränken. Das Rauschen N ist in diesem Fall abhängig von den Kameraparametern (siehe Kapitel 4.2.4)

$$N = \sqrt{N_{Pixel} c_{Kap} W F} = \sqrt{\alpha \times W} = \sqrt{\alpha \frac{I_0 R}{I_{CCD}}} \quad (5.3)$$

(N_{Pixel} =Pixelanzahl, c_{Kap} =Elektronenkapazität, F =Bilderanzahl)

Die Füllrate W ergibt sich aus dem Quotienten der reflektierten Intensität und der kameraspezifischen Intensität I_{CCD} , die ausreicht um einen Pixel vollständig zu sättigen. Das S/R-Verhältnis ergibt sich daher zu

$$S/N = \sqrt{\frac{I_0 I_{CCD}}{\alpha R}} \frac{dR}{dn} \Delta n . \quad (5.4)$$

Dieser Ausdruck ist direkt proportional zu $\sqrt{I_0}$. Eine simple Erhöhung der Beleuchtungsintensität würde daher zu einem verbesserten S/R-Verhältnis führen. Diese Folgerung ist jedoch ein Trugschluss, da sich die Beleuchtungsintensität nur so weit erhöhen lässt bis die reflektierte Intensität das Sättigungsniveau des CCD-Chips erreicht. Für die maximale Beleuchtungsintensität gilt deswegen

$$I_0^{max} = I_{CCD}/R . \quad (5.5)$$

Das S/R-Verhältnis ergibt sich daher zu

$$S/N = \frac{I_{CCD}}{\sqrt{\alpha}} \frac{dR/dn}{R} \Delta n . \quad (5.6)$$

Resultiert das Rauschen hauptsächlich aus Intensitätsfluktuationen der Lichtquelle, so ist das Rauschen proportional zur reflektierten Intensität:

$$N = \beta I_0 R \quad (5.7)$$

$$\Rightarrow S/N = \frac{1}{\beta} \frac{dR/dn}{R} \Delta n . \quad (5.8)$$

In beiden Fällen ist das S/R-Verhältnis abhängig von der relativen Empfindlichkeit E :

$$E = \frac{dR/dn}{R} . \quad (5.9)$$

Um den optimalen Einfallswinkel zu bestimmen, muss daher nicht der Ausdruck dR/dn optimiert werden, sondern die relative Empfindlichkeit E . Allerdings ist es experimentell sehr aufwändig, Reflektivitätsänderung, die auf Grund einer Brechungsindexänderung auftreten, für alle Positionen auf der Resonanzkurve zu messen. Man kann jedoch ausnutzen, dass

$$d\Theta/dn = \text{const} = \gamma \quad (5.10)$$

gilt. Daher lässt sich die relative Empfindlichkeit auch durch eine einfache und schnelle Messung der Resonanzkurve bestimmen und optimieren:

$$E = \frac{dR}{dn} \frac{1}{R} = \frac{dR}{d\Theta} \frac{d\Theta}{dn} \frac{1}{R} = \gamma \frac{dR/d\Theta}{R} . \quad (5.11)$$

5.3.1 Theoretische Betrachtung

Um den Einfluss einer optimierten relativen Empfindlichkeit auf ein SPR-Imaging Experiment simulieren zu können, wurde eine theoretische Analyse durchgeführt [10]. Als Parameter wurde eine eingestrahlte Wellenlänge von 780 nm, eine Goldschichtdicke von 48 nm und ein Brechungsindex von 1.61 für das Glasprisma gewählt. Die Resonanzkurve wurde für zwei wässrige Lösungen, deren Brechungsindex sich um 6×10^{-5} RIU unterschied, berechnet.

Den Verlauf der relativen Empfindlichkeit zeigt Abbildung 5.18a. Das Maximum liegt bei 58.68° und damit 0.07° links vom Resonanzminimum bei 58.75° (siehe Abbildung 5.18c). Die relative Empfindlichkeit ist dort um etwa einen Faktor 3.5 größer als an der steilsten Stelle der Resonanzkurve, wo das größte Signal auftritt (siehe Abbildung 5.18b). Die Reflektivität im Minimum betrug 1.1%. Diese hat einen großen Einfluss auf die Steigerung der Sensitivität durch Maximierung der relativen Empfindlichkeit. Würde sie durch eine Optimierung der Goldschichtdicke verringert, ließe sich eine noch größere Sensitivitätssteigerung erreichen. Allerdings ist es experimentell schwierig, kleinere Reflektivitäten als 1% im Resonanzminimum zu erreichen.

5.3.2 Demonstration der Empfindlichkeitssteigerung

Um die theoretischen Überlegungen experimentell zu verifizieren, wurde in eine Kretschmann-Anordnung ein etwa 1 mm breiter Laserstrahl eingestrahlt ($\lambda = 780$ nm). Die Reflektivität wurde mit einer Photodiode gemessen. Das dominierende Rauschsignal war die Instabilität der Laserintensität. Die Reflektivität im Resonanzminimum betrug 1.5%. Durch die Flusszelle wurden abwechselnd zwei wässrige Lösungen geleitet, deren Brechungsindizes sich um etwa 6×10^{-5} unterschieden. Die Signaländerungen, die durch diese Volumenbrechungsindexänderung hervorgerufen wurden, und die Stabilität der Basislinie wurden für unterschiedliche Einfallswinkel gemessen. Im linken Teil der Abbildung 5.19 sieht man sehr deutlich, warum das maximale S/N-Verhältnis nicht an der steilsten Stelle der Resonanzkurve erreicht wird: Das Rauschen verringert sich relativ linear, wohingegen das Signal erst zum Resonanzminimum hin deutlich abfällt.

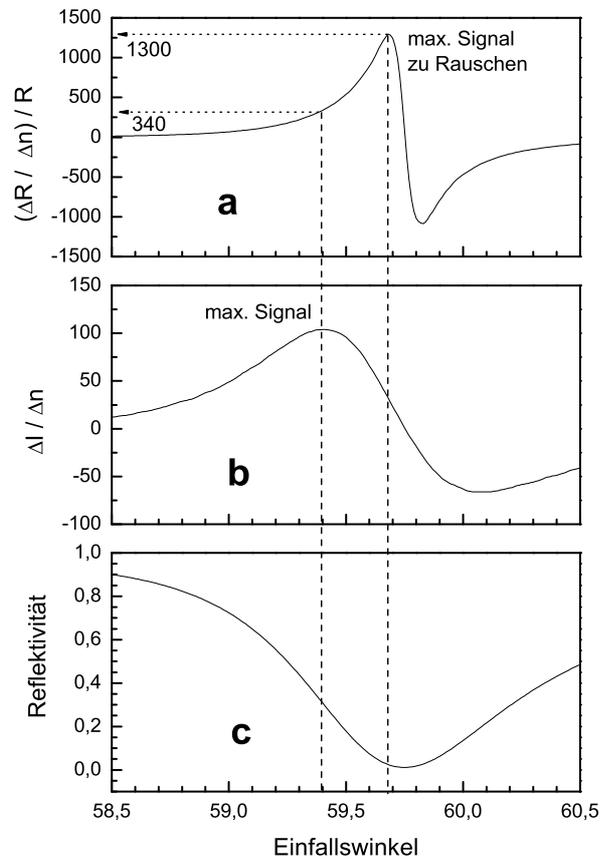


Abbildung 5.18: Die Abbildung zeigt die Theoretische Reflektivitätskurve (c), die Empfindlichkeit (b) und die relative Empfindlichkeit (a) in Abhängigkeit vom Einfallswinkel ($d_{Gold}=48$ nm, $\lambda=780$ nm, $n_{Glas}=1.61$). Die gestrichelten Linien zeigen die Positionen an, in denen die Empfindlichkeit bzw. die relative Empfindlichkeit ihre Maxima besitzen.

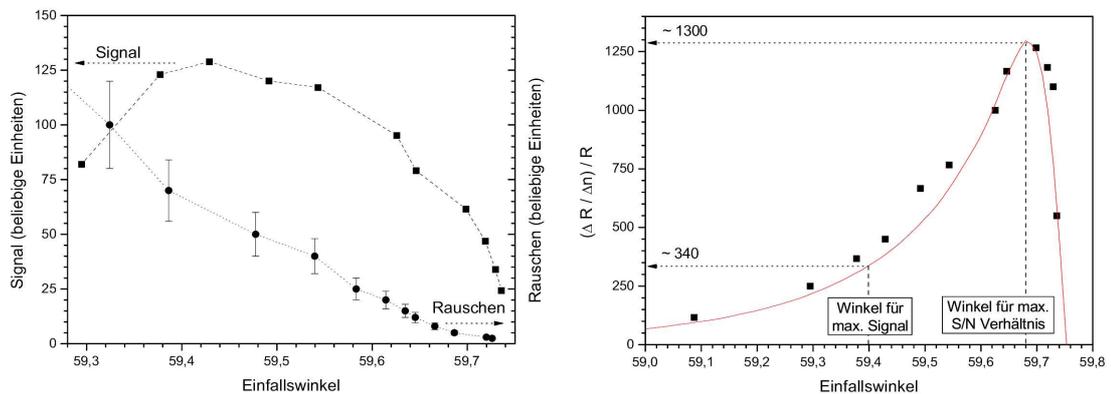


Abbildung 5.19: Die Abbildung zeigt die mit einer Photodiode gemessene Intensitätsänderung (■), die durch eine Volumenbrechungsindexänderung hervorgerufen wurde, und das dazugehörige Rauschen des reflektierten Intensität (●) in Abhängigkeit vom Einfallswinkel. Rechts ist die relative Empfindlichkeit aufgetragen, die aus diesen Daten resultiert, und das S/N-Verhältnis in Abhängigkeit vom Einfallswinkel zeigt.

Berechnet man aus den experimentellen Daten die relative Empfindlichkeit, ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit den theoretischen Abschätzungen (siehe rechten Teil der Abbildung 5.19). Die relative Empfindlichkeit beträgt bei einem Winkel von 58.68° etwa 1300, wohingegen sie an der Stelle des maximalen Signals bei 59.40° nur etwa 340 beträgt. Das demonstriert die Verbesserung des S/R-Verhältnisses um einen Faktor 3.5 bei Optimierung des Einfallswinkels im Vergleich zu dem üblicherweise benutzten Winkel, der ein maximales Signal garantiert.

Für einen Test, bei der die Empfindlichkeit durch das Schrotrauschen eines CCD-Chips begrenzt ist, wurde eine Kretschmannanordnung mit einem aufgeweiteten Laserstrahl beleuchtet ($\lambda = 850 \text{ nm}$). Die reflektierte Intensität wurde in kleinen Bereichen ($20 \times 20 \text{ Pixel}$) gemessen.

Die Reflektivität im Resonanzminimum fiel in diesem Experiment nur auf etwa 5% der Gesamtintensität ab. Dies ist zum einen auf die veränderte Wellenlänge zurückzuführen, kann jedoch auch an einem nicht vollständig parallelisierten bzw. teilweise falsch polarisierten Strahl gelegen haben. Zum Fitten der experimentellen Daten wurde die Dicke der Goldschicht verändert ($d = 54.5 \text{ nm}$).

Das Schrotrauschen wurde einmalig gemessen. Da die Laserintensität stets so nachgeregelt wurde, dass der CCD-Chip immer zu etwa 70% gesättigt war, war das Schrotrauschen für alle Einfallswinkel gleich groß. Zur Signalmessung wurden die selben Flüssigkeiten wie bei der Messung mit der Photodiode verwendet. Die Höhe des resultierenden Signals wurde für unterschiedliche Einfallswinkel gemessen. Da die Laserintensität für geringe Reflektivitäten deutlich erhöht werden konnte, tritt das größte gemessene Signal nicht an der steilsten Stelle der Resonanzkurve auf, sondern an der Stelle der maximalen relativen Empfindlichkeit.

Die gemessene relative Empfindlichkeit ist zusammen mit dem theoretischen Fit in Abbildung 5.20 gezeigt. Die Verbesserung der Empfindlichkeit durch die Wahl eines optimierten Einfallswinkels reduziert sich im Vergleich zu der Messung mit der Photodiode auf den Faktor 2. Dies liegt daran, dass die Reflektivität im Resonanzminimum lediglich 5% betrug.

5.3.3 Linearer Messbereich

Kalibrationskurven für SPR Experimente, die auf Messungen von Reflektivitätsänderungen basieren, sind niemals perfekt linear, da die Flanken der Resonanzkurve stets leicht gekrümmt sind. Allerdings liegt die Vermutung nahe, dass durch die stärkere Krümmung in der Nähe des Resonanzminimums der lineare Bereich bei einer Messung in dessen Nähe stärker eingeschränkt ist, als bei einer Messung an der steilsten Stelle der Resonanzkurve.

Um dies zu untersuchen, wurden unterschiedliche Salzlösungen angesetzt und nacheinander durch die Flusszelle geleitet. Die Änderung der Reflektivität wurde mit Hilfe des 780 nm Lasers und der Photodiode gemessen. Beide Kalibrationskurven sind in

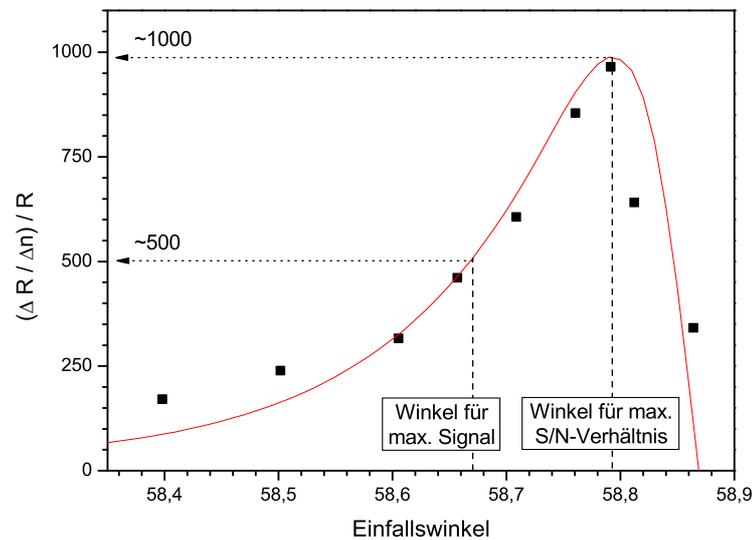


Abbildung 5.20: Mit einer CCD-Kamera gemessene relative Empfindlichkeit E in Abhängigkeit vom Einfallswinkel. Das Rauschen ist für alle Einfallswinkel gleich groß, da die CCD-Kamera stets gleich stark gesättigt ist. Lediglich die Signalhöhe ändert sich in Abhängigkeit vom Einfallswinkel.

Abbildung 5.21 zeigt. Die quadratischen Datenpunkte wurden beim optimalen Einfallswinkel gemessen, wohingegen die runden Datenpunkte durch die Messung am steilsten Punkt der Resonanzkurve entstanden. Beide Messkurven zeigen eine gute Übereinstimmung mit den theoretisch berechneten Kalibrationskurven.

Bis zu einer Volumenbrechungsindexänderung von etwa 10^{-3} RIU zeigen beide Kalibrationskurven ein annähernd lineares Verhalten. Erst danach treten deutliche Abweichungen auf.

Es ist allerdings anzumerken, dass der lineare Bereich bei einer Messung mit einer CCD-Kamera durch die Sättigung des CCD-Chips begrenzt wird. Um einen größeren Messbereich zu gewährleisten, muss die anfängliche Sättigung der Pixel herabgesetzt werden. Dies führt jedoch direkt zu einer Verschlechterung des S/R-Verhältnisses. In der Praxis muss daher immer ein Kompromiss zwischen maximaler Empfindlichkeit und einem angemessenen Messbereich gefunden werden.

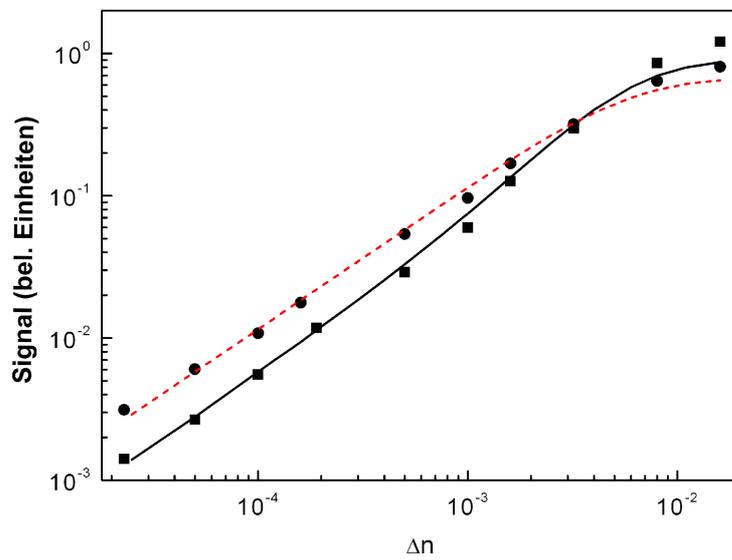


Abbildung 5.21: Kalibrationskurven für unterschiedliche NaCl Lösungen gemessen im Maximum der relativen Empfindlichkeit (schwarze Kurve) bzw. an der steilsten Stelle der Resonanzkurve (rote Kurve).

6 Zusammenfassung

Die Entwicklung eines bildgebenden SPR-Verfahrens, das auf der doppelten Wellenlängentechnik basiert, war das Ziel dieser Doktorarbeit. Dazu wurden unterschiedliche Techniken der Strahlaufweitung und -vereinigung getestet und eine leistungsfähige Software entwickelt.

Außerdem war es nötig, eine umfassende Analyse der die Empfindlichkeit limitierenden Faktoren durchzuführen. Die Ergebnisse lassen sich größtenteils auch auf konventionelle SPR-Imaging-Verfahren übertragen, die nur eine Wellenlänge benutzen.

Die optische Auflösung von Strukturen auf der Sensoroberfläche ist durch die Schrägstellung der Goldoberfläche in Bezug zur optischen Achse eingeschränkt. Es kann lediglich ein kleiner Bereich der Sensoroberfläche scharf abgebildet werden. Hier ist die maximal erreichbare Auflösung durch die Apertur des optischen Systems bestimmt. An Strukturen in den Randbereichen der Sensorfläche tritt Fresnelbeugung auf. Die Größe der Interferenzeffekte wurde geometrisch hergeleitet und abgeschätzt. Die optische Auflösung ist wichtig für die Präparation von Microarrays für *High-Throughput*-Anwendungen. Die Spotgröße muss an diese angepasst gewählt werden.

Die Intensitätsstabilität der Laser ist ein entscheidender Faktor für die maximal erreichbare Empfindlichkeit. Die doppelte Wellenlängentechnik erlaubt die Stabilisierung des Differenzsignals zweier Laser. Es wurde gezeigt, dass eine solche Stabilisierung auch für einen aufgeweiteten Strahl realisiert werden kann. Allerdings wirken nicht statische Interferenzen mit einer sehr geringen Modulationstiefe störend und verhindern eine effektive Verbesserung der Strahlqualität für kleine Messbereiche.

In einem SPR-Experiment traten bei der Stabilisierung der Lichtintensität zusätzliche Schwierigkeiten auf. Die emittierte Wellenlänge ist nicht stabil und fluktuiert auf Grund des kontinuierlichen Ein- und Ausschaltens der Laserdioden. Es entstehen dabei Modensprünge und das Verhältnis der vorhandenen Nebenmoden variiert. Ebenfalls wird die Wellenlänge durch die Strommodulation der Rückkopplung beeinflusst.

Mit Hilfe eines Etalons konnten die Nebenmoden freilaufender Laserdioden unterdrückt und die emittierte Wellenlänge stabilisiert werden. Allerdings führte dies zunächst zu einer Verschlechterung der Intensitätsstabilität. Eine Intensitätsstabilisierung mit einer Rückkopplung konnte jedoch auf Grund des eingeschränkten dynamischen Bereiches durch das Etalon nur die zuvor eingetretene Verschlechterung der Strahlqualität kompensieren. Unter dem Strich brachte dies keine Verbesserung.

Als Ergebnis kann festgehalten werden, dass eine Stabilisierung der Laserintensitäten

für ein SPR-Experiment mit einfachen Mitteln nicht realisierbar ist. Um sowohl die Wellenlänge als auch die Intensität zu stabilisieren, müssten die Laser elektro- oder akustooptisch moduliert werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde daher auf eine Rückkopplung verzichtet und eine Methode entwickelt, um Intensitätsfluktuationen auf andere Art und Weise zumindest teilweise zu kompensieren.

Daher wurde das für Biosensoren neuartige *Distributed Reference* Verfahren entwickelt, das Intensitätsfluktuationen und inhomogene Störungen wie Brechungsindexgradienten innerhalb der Flusszelle durch eine geschickte Anordnung von Signal- und Referenzflächen kompensiert.

Um die Empfindlichkeit des SPR-Imaging Verfahrens mit zwei Wellenlänge zu untersuchen, wurde die *Distributed Reference* zur Nachweise einer Biotinbindung an Streptavidin eingesetzt. Dazu wurde ein Streptavidinmonoschicht in 200 μm breiten Streifen, zwischen denen sich jeweils eine 200 μm breite Referenzfläche befand, auf einem Goldchip präpariert. Die Bindung des Biotins war 3.3×10^{-6} RIU groß und wurde durch Mittelung über 50 Signal- und Referenzbereiche gemessen. Die Stabilität der Basislinie betrug 3.7×10^{-7} RIU und ist vergleichbar mit der Empfindlichkeit von kommerziellen SPR-Geräten für Einzelflächenmessungen.

Die Empfindlichkeit war dabei durch Intensitätsfluktuationen beschränkt, da in Signal- und Referenzbereichen in unterschiedlichen Messpunkten auf der Resonanzkurve gemessen wurde. Würden die Signal- und Referenzflächen ähnlich präpariert, wäre eine Empfindlichkeit unterhalb von 10^{-7} RIU erreichbar. Dies zeigt, dass ein bildgebendes SPR-Experiment sehr flexibel ist und auch eingesetzt werden kann, wenn maximale Empfindlichkeit benötigt wird.

Außerdem wurde die Einsetzbarkeit des SPR-Imaging zur SNP-Analyse demonstriert. Dabei wurde zunächst experimentell verifiziert, dass sich die Schmelztemperatur von Oligonukleotiden durch Immobilisation wie theoretisch vorhergesagt verringert. Durch Ausnutzen unterschiedlicher Schmelztemperaturen konnte die Unterscheidbarkeit einer SNP-Analyse durch eine Optimierung der experimentellen Hybridisierungstemperatur um einen Faktor 2.6 verbessert werden.

Anschließend wurde gezeigt, dass die doppelte Wellenlängentechnik auch eine Verbesserung beim Auslesen von DNA Microarrays bringt. Die Empfindlichkeit für einen einzelnen $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ großen Messbereich betrug 1.4×10^{-6} . Durch optimale Anordnung des Microarrays auf dem Goldchip wäre es möglich, gleichzeitig 400 Reaktionen mit dieser Empfindlichkeit zu beobachten. Dadurch gelang es im Vergleich zu bisherigen Arbeiten sowohl die Anzahl der beobachtbaren Reaktion zu verdreifachen als auch gleichzeitig die Empfindlichkeit deutlich zu verbessern.

Das SPR-Imaging ist daher eine wertvolle Alternative zum Auslesen von DNA Microarrays. Im Gegensatz zur Fluoreszenztechnik können die Microarrays dabei mehrfach genutzt werden, da die Hybridisierung rückgängig gemacht werden kann. Da die Messung in der Flüssigkeit geschieht, kann zusätzlich die Hybridisierungstemperatur optimal gewählt und die Wahrscheinlichkeit einer falschen SNP Identifizierung ver-

ringert werden. Aber auch für andere *High-Throughput*-Anwendung, bei denen eine Wiederverwendung des Microarrays sinnvoll ist oder auf die Verwendung eines sekundären Antikörpers verzichtet werden soll, ist das SPR-Imaging eine Alternative.

Abschließend wurde eine kurze Analyse der häufigsten Rauschquellen in bildgebenden SPR Experimenten gezeigt. Als Konsequenz daraus wurde gezeigt, dass die Empfindlichkeit von konventionellen SPR-Imaging Experimente deutlich gesteigert werden kann, wenn der Messpunkt nahe des Resonanzminimums statt wie bisher üblich an der steilsten Stelle der Resonanzkurve liegt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit der entwickelten SPR-Imaging Technik ein großer Schritt nach vorne gelungen ist. So konnte eine Empfindlichkeit für eine Einzelmessung demonstriert werden, die einen Vergleich mit den besten kommerziellen Geräten nicht scheuen muss. Dabei ist das Empfindlichkeitspotenzial noch nicht vollständig ausgeschöpft, da eine weitere Steigerung durch eine Optimierung der Oberflächenchemie zu erwarten ist. Aber auch im Bereich der *High-Throughput*-Anwendung konnte die Empfindlichkeit für eine simultane Beobachtung von 400 Spots deutlich gesteigert werden. Die Empfindlichkeit wurde dabei zu einem großen Teil vom Schrotrauschen der CCD-Kamera limitiert.

Die Elektronenkapazität und die Bildrate moderner CCD-Kameras wird durch den schnellen Fortschritt der CCD-Technik jährlich verbessert. Es ist daher abzusehen, dass man zukünftig entweder mehr Bioreaktionen mit der gleichen Empfindlichkeit oder genauso viele Bioreaktionen mit einer höheren Empfindlichkeit messen können.

Denkbar ist außerdem, einen Metallfilm aus Silber statt aus Gold zu verwenden. Die Resonanzkurve von Silber ist deutlich schmaler, so dass Brechungsindexänderungen zu einer stärkeren Reflektivitätsänderung und damit Empfindlichkeitssteigerung führen. Vermutlich müsste jedoch die Silberschicht durch eine dünne Goldschicht geschützt werden, da Silber chemisch deutlich aktiver als Gold ist.

Die laterale optische Auflösung ist für alle SPR Experimente durch die Schrägstellung der Goldoberfläche begrenzt. Ein Fortschritt könnten dort die so genannte *Localized Surface Plasmon Resonance* bringen. Diese tritt in sehr kleinen, dünnen Metallstrukturen (< 100 nm) auf, die auf einem Glaträger präpariert werden können. Die Breite der Resonanzkurve ist dort ähnlich groß wie bei der Oberflächenplasmonenresonanz in einem Metallfilm. Das präparierte Glasplättchen kann wie die Goldoberfläche in einem konventionellen SPR-Experiment zur Messung von Bioreaktionen genutzt werden. Allerdings wird das Licht dabei in Transmission detektiert, so dass das Glasplättchen senkrecht zur optischen Achse positioniert werden kann. Die optische Auflösung ist daher lediglich durch die Apertur des optischen Systems begrenzt. Der Einsatz der doppelten Wellenlängenmethode ist auch dort möglich und verspricht vor allem auf Grund einer nur geringen Modulationstiefe der Resonanz eine Steigerung der Empfindlichkeit.

Literaturverzeichnis

- [1] I. H. G. S. Consortium. *Nature*, 431:931–945, 2004.
- [2] J. Shumaker-Parry C. T. Campbell. *Analytical Chemistry*, 76:907–917, 2004.
- [3] J. Koch, A. Zybin, K. Niemax. *Spectrochimica Acta Part B*, 57:1547–1561, 2002.
- [4] A. Zybin, C. Grunwald, V. M. Mirsky, J. Kuhlmann, O. S. Wolfbeis, K. Niemax. *Analytical Chemistry*, 77:2393–2399, 2005.
- [5] R. W. Wood. *Philosophical Magazine*, 4:396, 1902.
- [6] U. Fano. *Journal of the Optical Society America*, 31:213–222, 1941.
- [7] M. Born. *Principles of optics*. Cambridge University Press, 2006.
- [8] <http://www.sopra-sa.com/index2.php?goto=dl&rub=4>.
- [9] C. Kittel. *Einführung in die Festkörperphysik*. Oldenbourg, 1993.
- [10] <http://unicorn.ps.uci.edu/cgi-bin/fcform.cgi>.
- [11] H. Raether. *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*. Springer-Verlag, 1988.
- [12] A. W. Wark, H. J. Lee, R. M. Corn. *Analytical Chemistry*, 77:3904–3907, 2005.
- [13] A. J. Jääsläinen, K.-E. Peiponen, J. A. Rätty. *Journal of Dairy Science*, 84:38–43, 2001.
- [14] X. Liu, D. Song, Q. Zhang, Y. Tian, Z. Liu, H. Zhang. *Sensors and Actuators B*, 117:188–195, 2006.
- [15] A. J. Thiel, A. G. Frutos, C. E. Jordan, R. M. Corn, L. Smith. *Analytical Chemistry*, 69:4948–4956, 1997.
- [16] C. E. Mortimer. *Chemie*. Georg Thieme Verlag, 1996.
- [17] G. Steiner. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379:328–331, 2004.
- [18] J. Shumaker-Parry, M. Zareie, R. Aebersold, C. T. Campbell. *Analytical Chemistry*, 76:918–929, 2004.

- [19] B. P. Nelson, T. E. Grimsrud, M. R. Liles, R. M. Goodman, R. M. Corn. *Analytical Chemistry*, 73:1–7, 2001.
- [20] Y. Li, W. W. Alastair, H. J. Lee, R. M. Corn. *Analytical Chemistry*, 78:3158–3164, 2006.
- [21] V. Kanda, J. K. Kariuki, D. J. Harrison, M. T. McDermott. *Analytical Chemistry*, 76:7257–7262, 2004.
- [22] S. Y. Wu, H. P. Ho, W. C. Law, C. Lin, S. K. Kong. *Optics Letters*, 29:2378–2380, 2004.
- [23] Y. Xinglong, W. Dingxin, W. Xing, D. Xiang, L. Wei, Z. Xinsheng. *Sensors and Actuators B*, 108:765–771, 2005.
- [24] L. Jungfeng, D. Xiang, Y. Xinglong, W. Dongsheng. *Sensors and Actuators B*, 108:778–783, 2005.
- [25] S.-J. Chen, S. Yuang-Deng, H. Feng-Ming, T. Chia-Yuan, C. Yi-Kuang. *Journal of Biomedical Optics*, 10:034005, 2005.
- [26] E. Fu, T. Chinowsky, J. Foley, J. Weinstein, P. Yager. *Review of Scientific Instruments*, 75:2300–2304, 2004.
- [27] S. Otsuki, K. Tamada, S. Wakida. *Applied Optics*, 44:3468–3472, 2005.
- [28] M. Piliarik, H. Vaisocherova, J. Homola. *Biosensors and Bioelectronics*, 20:2104–2110, 2005.
- [29] <http://www.micro-systems.de>.
- [30] C. W. Robert. *Handbook of Chemistry*. CRC Press, 1974.
- [31] *Datenblatt Kodak KAI 1020 Chip*.
- [32] K. D. Mielenz. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, 105:581–587, 2000.
- [33] S. Godoy. *Physical Review A*, 65:042111, 2002.
- [34] D. Boecker, A. Zybin, C. Grunwald, V. Mirsky, K. Niemax. *zur Veröffentlichung bei Review of Scientific Instruments eingereicht*.
- [35] O. H. Laitinen, H. R. Nordlund, V. P. Hytöen, M. S. Kulomaa. *Trends in Biotechnology*, 25:269–277, 2007.
- [36] A. Schmidt, J. Spinke, T. Bayerl, E. Sackmann, W. Knoll. *Biophysical Journal*, 63:1185–1192, 1992.
- [37] L. Häussling, H. Ringsdorf, F.-J. Schmidt, W. Knoll. *Langmuir*, 7:1837–1840, 1991.

- [38] C. Grunwald, W. Eck, N. Opitz, J. Kuhlmann, C. Wöll. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 6:4358–4362, 2004.
- [39] M. Mondal, C. Rajkhowa, B. S. Prakash. *Zoological Science*, 23:633–639, 2006.
- [40] V. Sunkara, B. J. Hong, J. W. Park. *Biosensors and Bioelectronics*, 22:1532–1537, 2007.
- [41] C. Beilein. *Diplomarbeit Fachhochschule Iserlohn*, 2007.
- [42] F. Yu, S. Tian, D. Yao, W. Knoll. *Analytical Chemistry*, 76:3530–3535, 2004.
- [43] V. Konopsky E. Alieva. *Analytical Chemistry*, 79:4729–4735, 2007.
- [44] Y. Teramura H. Iwata. *Analytical Biochemistry*, 365:201–207, 2007.
- [45] I. H. G. S. Consortium. *Nature*, 409:890–921, 2001.
- [46] I. H. G. S. Consortium. *Science*, 291:1304–1351, 2001.
- [47] <http://de.wikipedia.org/wiki/DNA>.
- [48] W. J. Strittmatter, A. M. Saunders, D. Schmecher, M. Pericak-Vance, J. Enghild, G. S. Salvesen, A. D. Roses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90:1977–1981, 1993.
- [49] R. Marie, H. Jensenius, J. Thaysen, C. B. Christensen, A. Boisen. *Ultramicroscopy*, 91:29–36, 2002.
- [50] X. Su, Y.-J. Wu, R. Robelek, W. Knoll. *Langmuir*, 21:348–353, 2005.
- [51] M. Boncheva, L. Scheibler, P. Lincoln, H. Vogel, B. Akerman. *Langmuir*, 15:4317–4320, 1999.
- [52] J. M. Brockmann, A. G. Frutos, R. M. Corn. *Journal of the American Chemical Society*, 121:8044–8051, 1999.
- [53] A. W. Peterson, L. K. Wolf, R. M. Georgiadis. *Journal of the American Chemical Society*, 124:14601–14607, 2002.
- [54] K. Castelino, B. Kannan, A. Majumdar. *Langmuir*, 21:1956–1961, 2005.
- [55] K. A. Peterlinz R. M. Georgiadis. *Journal of the American Chemical Society*, 119:3401–3402, 1997.
- [56] M. Yang, H. C. M. Yau, H. L. Chan. *Langmuir*, 14:6121–6129, 1998.
- [57] T. M. Herne M. J. Tarlov. *Journal of the American Chemical Society*, 119:8916–8920, 1997.
- [58] A. Vainrub B. M. Pettitt. *Biopolymers*, 73:614–620, 2004.

-
- [59] <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>.
- [60] <http://www.biofluidix.com/>.
- [61] D. Boecker, A. Zybin, V. Horvatic, C. Grunwald, K. Niemax. *Analytical Chemistry*, 79:702–709, 2007.
- [62] M. Yang, H. C. M. Yau, H. L. Chan. *Langmuir*, 14:6121–6129, 1998.
- [63] L. K. Wolf, Y. Gao, R. M. Georgiadis. *Langmuir*, 20:3357–3361, 2004.
- [64] A. Zybin, D. Boecker, V. Mirsky, K. Niemax. *Analytical Chemistry*, 79:4233–4236, 2007.

Liste der im Rahmen dieser Dissertation publizierten bzw. zur Publikation eingereichten Arbeiten

- D. Boecker, A. Zybin, V. Horvatic, C. Grunwald und K. Niemax, *Differential Surface Plasmon Resonance Imaging for High-Throughput Bioanalyses*, Analytical Chemistry, 79(2), 702-709, 2007
- A. Zybin, D. Boecker, V. Mirsky und K. Niemax, *Enhancement of the Detection Power of Surface Plasmon Resonance Measurements by Optimization of the Reflection Angle*, Analytical Chemistry, 79(11), 4233-4236, 2007
- D. Boecker, A. Zybin, C. Grunwald, V. Mirsky und K. Niemax, *Distributed Reference and Sensing Spots in Microstructured Surface Plasmon Resonance Imaging*, zur Veröffentlichung bei Review of Scientific Instruments eingereicht, 2007

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Beteiligten bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Kay Niemax danke ich für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe am ISAS arbeiten zu dürfen. Er gab mir die Möglichkeit, für drei Jahre in einem hochinteressanten wissenschaftlichen Bereich selbständig forschen zu können.

Herrn Prof. Dr. Manfred Bayer danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Koreferats.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Alexander Zybin für viele Tipps und die hervorragende Unterstützung meiner Arbeit. Ohne die vielen Diskussionen mit ihm wäre die Klärung vieler Probleme weitaus mühsamer gewesen.

Für die gute Zusammenarbeit zu Beginn meiner Arbeit am ISAS danke ich Dr. Vlasta Horvatic. Ohne ihre Anschubunterstützung wäre der schnelle Einstieg in das für mich neue Forschungsgebiet nicht so leicht möglich gewesen.

Ich möchte ebenfalls Dr. Christian Grunwald danken, der die Software zum Auswerten der Bilder entwickelt und uns beim Verständnis der Oberflächenchemie des Biotin-Streptavidin-Systems viel geholfen hat.

Cornelia Beilein danke ich für die nette Atmosphäre in unserem Büro während ihrer Zeit am ISAS. Aber auch die gemeinsame, wissenschaftliche Forschung mit ihr hat mir sehr viel Freude bereitet.

Auch den übrigen Kollegen am ISAS gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit und nette Arbeitsatmosphäre.

Meinen Eltern danke ich für die Förderung meines naturwissenschaftlichen Interesses und die Unterstützung in all den Jahren.

Mein besonderer Dank geht an meine Freundin Eveline Pauls, die mich in den drei Jahren der Promotion liebevoll begleitet hat.