



Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 5803

**Entwicklung eines
Immunosensors auf der
Basis akustischer
Oberflächenwellen**

T. Wessa

**Institut für Instrumentelle Analytik
Projekt Mikrosystemtechnik**

Juli 1996

**Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt**

**Wissenschaftliche Berichte
FZKA 5803**

**Entwicklung eines
Immunosensors auf der Basis
akustischer Oberflächenwellen**

Thomas Wessa

**Institut für Instrumentelle Analytik
Projekt Mikrosystemtechnik**

**von der Fakultät für Chemie der Universität Karlsruhe
genehmigte Dissertation**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
1996**

Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

ISSN 0947-8620

Entwicklung eines Immunosensors auf der Basis akustischer Oberflächenwellen

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Immunosensors auf der Basis kommerzieller Oberflächenwellenbauelemente (OFWB). Durch die Auswahl von piezoelektrischen Substraten auf der Basis von 36° -rot Y,X LiTaO₃ und horizontal polarisierter Scherwellen konnte der Betrieb in wässrigen Lösungen ermöglicht und dies für immunochemische Untersuchungen ausgenutzt werden.

Die Bauelemente sind mit Interdigitalstrukturen aus Aluminium versehen, da sich diese durch ihre guten akustischen Eigenschaften auszeichnen. Für chemische Anwendungen allerdings ist die geringe Stabilität des Aluminiums gegenüber Säuren und Laugen problematisch. Ein wichtiger Schritt hin zu einem Biosensor war die Entwicklung einer geeigneten Schutzbeschichtung mit Polyimid, die es zum einen erlaubte, die OFW-Bauelemente für längere Zeit in wässrigen phosphathaltigen Medien zu betreiben und zum anderen gleichzeitig als Basis für Immobilisationsversuche diente.

Mit Hilfe polyimidisierter Sensoren war es möglich das Sensorverhalten in Hinblick auf Leitfähigkeits- und Viskositätsänderungen zu untersuchen und zu charakterisieren. Auf der Basis der polyimidisierten Sensoroberfläche ist es außerdem gelungen Proteine mittels zweier verschiedener Immobilisationsmethoden kovalent zu fixieren.

Bei der ersten Methode handelt es sich um eine Abscheidung von monoklonalen Antikörpern mittels einer bromcyan-aktivierten Polyimidschicht. Die so immobilisierten Antikörper gegen Glucoseoxidase zeigten mit dem Antigen die gewünschte Immunoreaktion. Da das Antigen nach der Komplexbildung durch das Immunglobulin seine enzymatische Aktivität beibehält, konnte darüber hinaus die durch die Immunoreaktion abgeschiedene Menge an Glucoseoxidase quantifiziert werden. Ein OFW-Sensor, der durch die Cyanotransfertechnik mit Antikörpern beschichtet wurde, zeigte eine außerordentlich große Empfindlichkeit von 58 Hz/pg. Die Immobilisationsprozedur kann auf beliebige Immunglobuline der Klasse G angewendet werden. Allerdings litt die Reproduzierbarkeit des Sensorsignals unter den vielen Arbeitsschritten, die zur Herstellung des Immunosensors mittels Cyanotransfertechnik notwendig sind.

Als zweite Beschichtungstechnik wurde eine lichtinduzierte kovalente Anbindung von Proteinen an polyimidisierte Oberflächen untersucht. Durch die einmalige Modifikation eines Proteins ist es möglich das komplementäre Biomolekül zu detektieren. Die Derivatisierung mit einem carbenerzeugenden Reagens verlief hierbei über eine einfache Einzelschritt-synthese, die Aufarbeitung erfolgte ebenfalls über einfache Standardmethoden.

Die Anbindung von photoreaktiven Proteinen an Polyimid konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen und die Erhaltung der immunologischen sowie im Falle der modifizierten Glucoseoxidase (T-GOD) auch der enzymatischen Aktivität gezeigt werden. Nach der Beschichtung von OFW-Sensoren mit T-GOD konnte die Immunoreaktion mit polyklonalen Antikörpern gegen GOD beobachtet werden. Es ergab sich eine Nachweisgrenze von 2.7 nmol/l. Die Reproduzierbarkeit des Signals war im Falle der Immobilisierung durch eine photoinduzierte Reaktion deutlich höher als bei der Cyanotransfertechnik.

Development of an immunosensor based on surface acoustic wave devices

Summary

In this paper the use of commercially available surface acoustic wave devices for in-situ measurements in water was investigated. This was achieved by the use of piezoelectric substrates on the base of 36°-rot Y,X LiTaO₃ and horizontally polarized surface transverse waves. The devices worked as frequency determining elements of an oscillator circuit. The mass change caused by the precipitation of biomolecules was detected by the change of the resonance frequency of the oscillator.

The interdigital transducers of the devices were made of aluminium because of its excellent acoustic characteristics. However, the chemical instability of aluminium led to enormous corrosion processes even in phosphate buffer solution (pH=7). A thin shielding layer of polyimide showed the best properties to prevent these reactions while facilitating covalent immobilization of antibodies for the preparation of immunosensors.

The dependence of the sensor signal caused by a change of conductivity and viscosity was investigated with shielded devices. This shielding technique seems to be very appropriate to serve as a base for further steps towards an immunosensor. Two different procedures of covalent attachment of antibodies were developed.

On the one hand, the immobilization of antibodies was done by treating the surface of the sensor with a mixture of cyanogenbromide and triethylamine solutions which in effect passed CN⁺-ions to polyimide according to the cyanotransfer technique. In addition, the proteins were activated with carbodiimide and covalently precipitated to the modified sensor surface. In order to separate the specific and unspecific parts of the immunoreaction the unspecific binding sites were saturated with bovine serum albumine. The specific immunoreaction between the immobilized antibodies and the antigens could be observed and the sensitivity of this system was determined with 58 Hz/pg. Furthermore, the enzymatic activity and the immunochemical activity was preserved.

On the other hand, a one step photoreaction led to covalent binding of modified proteins to the sensor surface. The biomolecules were derivated with a carbene generating reagent. Under irradiation the resulting triplet carbene inserted in the polyimide layer on the SAW device. The immunoreaction between photoimmobilized glucose oxidase (antigen) and polyclonal antibodies against this enzyme could be observed and a detection limit of 2.7 nmol/l was determined.

The reproducibility of both methods were compared. The SAW-devices coated with proteins by the photoimmobilization method showed better properties than the immunosensors treated with cyanogenbromide.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
2	Theorie der Oberflächenwellen	13
2.1	Oberflächenwellen	13
2.1.1	Rayleighwellen	13
2.1.2	Horizontal polarisierte Scherwellen	14
2.2	Plattenmoden	17
2.3	Piezoelektrizität	19
2.3.1	Einfluß der Piezoelektrizität auf OFW	19
2.4	Erzeugung von Oberflächenwellen	20
2.4.1	Verzögerungsleitung und Resonator	21
2.5	Meßprinzip	21
2.6	Einfluß auf die OFW-Schallgeschwindigkeit	23
2.6.1	Elektrische Störung	25
2.6.2	Viskositätseinfluß	26
2.6.3	Massesensitivität	27
2.6.4	Temperatureinfluß	29
3	Theorie der Immunochemie	31
3.1	Immunität – Immunantwort	31
3.2	Antikörper	31
3.3	Antigene	34
3.4	Stabilität und Denaturierung	34
3.5	Immunoreaktion und ihre Kinetik	36
3.6	Immobilisierungsmethoden	36
3.7	Immunologische Analyseverfahren	40
3.7.1	Etablierte Methodik	40
3.7.2	Neue Entwicklungen der instrumentellen Analytik	40
3.7.2.1	Oberflächen Plasmonenresonanz	40
3.7.2.2	Optischer Gitterkoppler	41
3.7.3	Sensoren	41

4	Experimenteller Teil	44
4.1	Netzwerkanalysator	44
4.1.1	Die verwendeten OFW-Bauelemente	44
4.1.2	Siemens 454 MHz und 471 MHz	47
4.1.3	Hitachi 145 MHz	47
4.1.4	Murata 380 MHz und 254 MHz	47
4.2	Verwendetes biochemisches System	48
4.2.1	Glucoseoxidase	49
4.2.1.1	Struktur von Glucoseoxidase	49
4.2.1.2	Analysemethoden für Glucoseoxidase	50
4.3	Meßaufbau	51
4.3.1	Aufbau der Durchflußapparatur	51
4.3.2	Anordnung der Frequenzmeßanlage	51
5	Schutzbeschichtung	54
5.1	Passivierungsversuche	54
5.2	Polyimidisierung	56
5.2.1	Chemie der Polyimidisierung	56
5.2.2	Durchführung	58
5.2.3	Dämpfungsänderung bei der Schutzbeschichtung	60
5.2.4	Rasterelektronenmikroskopie	60
5.2.5	Chemische Resistenz der Schutzbeschichtung	61
6	Grundlegende Untersuchungen	64
6.1	Unspezifische Abscheidung von Protein	64
6.2	Einfluß einer elektrischer Größen	66
6.3	Viskositätseinfluß auf die Resonanzfrequenz	68
7	Immobilisierung auf OFW-Bauelementen	70
7.1	Cyanotransfertechnik	70
7.1.1	Aktivierung von Polyimid	71
7.1.2	Anbindung des Antikörpers über EDAC	73
7.1.3	Durchführung	73
7.1.4	Immunoreaktion	75
7.1.4.1	Vergleichende Experimente	77
7.1.5	Bestimmung der Glucoseoxidase-Aktivität	78
7.1.6	Bestimmung der Sensorempfindlichkeit	79
7.2	Photoimmobilisation	80
7.2.1	Prinzip der Photoimmobilisation	80
7.2.1.1	Derivatisierung von Rinderserumalbumin	80
7.2.1.2	Vergleich von direkter Anbindung eines Proteins und Coimmobilisierung	80
7.2.2	Photoimmobilisation von Rinderserumalbumin	83
7.2.2.1	Durchführung der direkten T-BSA-Anbindung	83

7.2.2.2	Immunologische Untersuchungen an T-BSA	83
7.2.2.3	Konzentrationsreihe polyklonaler Antikörper gegen BSA	85
7.2.2.4	Bestimmung der Nachweisgrenze	86
7.2.3	Regeneration der Sensoren	88
7.2.4	Coimmobilisierung von Glucoseoxidaseantikörpern	90
7.2.4.1	Anbindung durch Coimmobilisierung	90
7.2.5	Direkte Photoimmobilisation von Glucoseoxidase	91
7.2.5.1	Präparation und Charakterisierung von T-GOD	91
7.2.5.2	Immobilisation von T-GOD auf dem Sensor	101
7.2.5.3	Optimierung der abgeschiedenen Menge an T-GOD	101
7.2.5.4	Konzentrationsreihe	103
7.2.5.5	Bestimmung der Nachweisgrenze	104
7.2.5.6	Beprobung mit monoklonalen Antikörpern	106
7.3	Vergleich der Immobilisationsmethoden	107
8	Voruntersuchungen	110
8.1	Einsatz eines kompakten Sensorarrays	110
8.2	Beprobung mittels Fließinjektionsanalyse	110
9	Zusammenfassung	113
A	Biochemischer Anhang	125
A.1	Proteinbestimmung nach Lowry	125
A.2	Aktivitätsbestimmung mittels enzymatischem Assay	126
A.3	Bestimmung der radioaktiven Zerfälle	129
A.4	Biochemikalien	129
A.4.1	Antikörper	129
A.4.2	Antigene	130
B	OFW-Bauelemente Anhang	131
B.1	Übertragungskennlinien der OFWB's	131
B.2	Übertragungskennlinien bei Polyimidisierung	136
C	Abkürzungen und Symbole	138
C.1	Symbolverzeichnis	138
C.2	Abkürzungsverzeichnis	140

Abbildungsverzeichnis

2.1	Darstellung der Sagittalebene	14
2.2	Unterschiedliche Ausbreitungskomponenten	15
2.3	Teilchenbewegung der verschiedenen Wellentypen	17
2.4	Vergleich der verschiedenen Wellenarten	18
2.5	Vergleich einer Verzögerungsleitung mit einem Resonator	22
2.6	OFW-Bauelement in einem Oszillatorschaltkreis	22
2.7	Der Störungsrechnung zugrunde liegendes Koordinatensystem	25
2.8	Theoretische Abhängigkeit der OFW-Schallgeschwindigkeit von der Leitfähigkeit	27
2.9	Theoretische Abhängigkeit der OFW-Schallgeschwindigkeit von der Viskosität	28
2.10	Theoretische Abhängigkeit der Oberflächenschallgeschwindigkeit von der Massezunahme durch eine isotrope Schicht für OFWB's	29
2.11	Temperaturabhängigkeit der Frequenzänderung von Schwingquarzen für verschiedene Kristallschnitte	30
3.1	Struktur der Immunglobuline aus [Voe92]	32
4.1	Übertragungskennlinie eines unbeschichteten 380 MHz OFW-Sensors	45
4.2	Mikroskopische Aufnahmen der verwendeten OFW-Bauelemente	46
4.3	Enzymatische Wirkung von Glucoseoxidase	49
4.4	Absorptionsspektrum von Glucoseoxidase	50
4.5	Meßaufbau zur Detektion der Immunoreaktion	53
4.6	Hochfrequenzmeßanlage zur Detektion der Resonanzfrequenz	53
5.1	Reaktionsschema zur Ausbildung eines Polyimids	57
5.2	Kovalente Anbindung an hydrophile Oberflächen mit Hilfe einer dünnen Silanschicht	59
5.3	Dämpfung nach den einzelnen Beschichtungsschritten	61
5.4	Vergleich eines unbeschichteten mit einem polyimidisierten OFW-Bauelement im Rasterelektronenmikroskop	62
5.5	Unspezifische Abscheidung von Rinderserumalbumin und anschließendes Ablösen des Proteins mit Salzsäure auf einer Polyimidschicht	63
6.1	Frequenzänderung durch unspezifische Abscheidung von BSA	65

6.2	Relative Frequenzänderung der BSA-Abscheidung als Funktion der Arbeitsfrequenz	66
6.3	Frequenzänderung durch Leitfähigkeitsänderung der Pufferlösung . .	67
6.4	Frequenzänderung durch Viskositätsänderung der Analytlösung . . .	69
7.1	Aktivierung von hydrophilen Oberflächen mittels Bromcyan nach Kohn	71
7.2	Reaktion von BrCN mit der polyimidisierten Sensoroberfläche	72
7.3	Aktivierung einer Carbonsäuregruppe mit EDAC und Ausbildung einer Peptidbindung	74
7.4	Immunreaktion von immobilisierten GOD-Antikörpern mit Glucoseoxidase	76
7.5	Unterdrückung der unspezifischen Adsorption durch Blocken der Bindungsstellen mit Rinderserumalbumin	76
7.6	Kontrollversuche zur Immunreaktion nach Immobilisierung mittels Cyanotransfertechnik	77
7.7	Detektion der enzymatischen Aktivität von Glucoseoxidase	78
7.8	Modifikation von BSA mit TRIMID	81
7.9	Mögliche Wege der Photoimmobilisation	82
7.10	Immunreaktion zwischen polyklonalen Antikörpern und immobilisiertem T-BSA	84
7.11	Konzentrationsreihe polyklonaler BSA-Antikörper	85
7.12	Resonanzfrequenzänderung als Funktion der BSA-Antikörper im Analytstrom	86
7.13	Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit der T-BSA-Immunreaktion	87
7.14	Anfangsgeschwindigkeit der Immunreaktion als Funktion der Masse der polyklonalen BSA-Antikörper	87
7.15	Bestimmung der optimalen Regenerationszeit des Antikörper-Antigen-Komplexes	89
7.16	Immunreaktion bei Coimmobilisierung	91
7.17	Extinktionen der Fraktionen nach der Chromatographie	93
7.18	Bestimmung der Proteinkonzentration von T-GOD nach Lowry . . .	94
7.19	Bestimmung des TRIMID-Gehalts in T-GOD durch Bestimmung des Absorptionsunterschieds bei 348 nm vor und nach der Belichtung des Enzyms	95
7.20	Detektion der enzymatischen Aktivität von T-GOD	96
7.21	Bestimmung der Proteinkonzentration von [¹⁴ C]-T-GOD nach Lowry	98
7.22	Radioaktivität der polyimidisierten Glasträger	100
7.23	Bestimmung der optimalen Menge an abgetrenntem T-GOD	102
7.24	Absorptionszunahme bei 520 nm durch enzymatische Bildung eines Farbstoffes	102
7.25	Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen durch Beprobung mit Rinderserumalbumin	103
7.26	Konzentrationsreihe polyklonaler Antikörper gegen Glucoseoxidase . .	104
7.27	Resonanzfrequenzänderung als Funktion der Masse an Antikörper . .	105

7.28	Auswertung der Anfangsgeschwindigkeit der Immunoreaktion	105
7.29	Beprobung eines T-GOD beschichteten Sensors mit monoklonalen Antikörpern	106
8.1	Änderung des Leitwerts durch FIA	111
8.2	Abscheidung von Rinderserumalbumin durch FIA	112
A.1	BSA-Standard zur Proteinbestimmung nach Lowry	125
A.2	Aktivitätsbestimmung der Glucoseoxidase (A)	127
A.3	Aktivitätsbestimmung der Glucoseoxidase (B)	128
B.1	Übertragungskennlinien der 145 MHz Bauelemente	132
B.2	Übertragungskennlinien der 254 MHz Bauelemente	133
B.3	Übertragungskennlinien der 380 MHz Bauelemente	134
B.4	Übertragungskennlinien der 471 MHz Bauelemente	135
B.5	Änderung des Übertragungsverhaltens bei der Polyimidbeschichtung .	137

Kapitel 1

Einleitung

Schnelle Vorortanalytik gewinnt in den letzten Jahren in allen Bereichen zunehmend an Bedeutung. Auch in der Bioanalytik und insbesondere bei immunochemischen Untersuchungen spielt dieser Aspekt eine immer größere Rolle. Vor allem durch die wachsende Gefahr von Virusinfektionen, wie beispielsweise AIDS, wächst der Wunsch nach schnellen, einfachen und billigen Testmethoden, die eindeutige, leicht zu interpretierende Ergebnisse liefern. In diesem Zusammenhang werden Alternativen gesucht, die die bisherigen Standards zur Untersuchung biochemischer Prozesse ablösen. Dabei liegen unter anderem auf dem Gebiet der Biosensorik große Hoffnungen.

Biosensoren sind bioanalytische chemische Sensoren, die eine biochemische Reaktion in ein elektrisches Signal wandeln. Im allgemeinen bestehen sie aus zwei Komponenten, einem biologischen Erkennungselement und einem physikalischen Wandler. Das Erkennungselement liegt in Form einer bioaktiven Schicht vor, die die Sensitivität und Selektivität der Messung aufnimmt. Der physikalische Wandler übersetzt das biologische Geschehen in ein elektronisches Signal. Dieser Wandler kann dabei vielfältiger Art sein. Es existieren Biosensoren auf der Grundlage von optischen, akustischen, elektrochemischen, thermischen oder elektronischen Meßprinzipien.

Anforderungen, die an einen Biosensor, speziell einen Immunosensor, gestellt werden, gehen über die klassischen Beurteilungsaspekte hinaus. Neben hoher Empfindlichkeit und Selektivität sowie guter Reproduzierbarkeit überzeugen vor allem niedrige Kosten sowie einfache und schnelle Durchführung der Messung. Dabei ist das Ziel, eine *in-situ* Messung der biologischen Reaktion zu beobachten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Biosensor auf der Basis akustischer Oberflächenwellen entwickelt werden, der auf käuflich erhältliche Bauelemente, wie sie in der modernen Telekommunikation verwendet werden, zurückgreift. Diese, eigentlich für die elektronische Anwendung konzipierten Bauelemente sind schon seit einigen Jahren Forschungsthema in der Gasanalytik. Erst in jüngerer Zeit sind sie auch Gegenstand der Forschung im Bereich der Flüssigkeitssensorik und vor allem auf dem Gebiet der Bioanalytik. Dabei wird zur Untersuchung von wässrigen Medien ein spezieller Wellentyp, die horizontal polarisierten Scherwellen, genutzt. Dieser wird auf piezoelektrischen Substraten mit besonderem Kristallschnitt erzeugt, wo-

durch die Einkopplung der Schallwelle in das Substrat mit vergleichbar geringem Energieverlust verbunden ist.

Durch die hochselektiven biochemischen Schlüssel-Schloß-Reaktionen war es das Ziel dieser Arbeit, einen Schritt hin zur Entwicklung eines, im Vergleich zu den etablierten Untersuchungsmethoden, konkurrenzfähigen Biosensors auf der Basis akustischer Oberflächenwellen zu leisten. Um diese Bauelemente als Biosensoren einzusetzen, mußten chemische Modifikationen der Oberfläche durchgeführt werden, die die Immobilisation von Proteinen beinhaltet. In diesem Zusammenhang sollte nach schonenden, d.h. vor allem pH-neutralen, Anbindungen von Biomolekülen auf der Sensoroberfläche gesucht werden. Der Grund für diese Anforderung an die kovalente Fixierung war durch das Oberflächenmaterial der Bauelemente vorgegeben. Diese bestehen zum Großteil aus mikrolithographisch aufgetragenen Aluminiumstrukturen, deren Oxidschicht keinen genügenden Schutz gegen Korrosionserscheinungen in wässrigen Meßmedien bietet.

Als biologische Erkennungsschicht sollten im Hinblick auf spätere Anwendungen Immunglobuline und deren korrespondierenden Antigene verwendet werden. Die Aufgabe ein Verfahren zur Beschichtung der Sensoroberfläche zu finden, das auf beliebige Antikörper oder Antigene übertragbar ist, stand dabei im Vordergrund. Dann ist ein Biosensor vorstellbar, der mit den etablierten sowie den in der Entwicklung befindlichen alternativen Meßverfahren konkurrieren kann.

Diese Dissertation sollte auch die Frage klären, inwieweit ein immunochemischer Sensor auf der Basis von akustischen Oberflächenwellen verwirklicht werden kann und gleichzeitig die Grenzen des Meßverfahrens herausarbeiten.

Kapitel 2

Theorie der Oberflächenwellen

2.1 Oberflächenwellen

Bei akustischen Oberflächenwellen (OFW) handelt es sich um Schallwellen, die sich an der Oberfläche eines Festkörpers ausbreiten. Ihre Existenz begründet sich in der Tatsache, daß an der Oberfläche eines Festkörpers kleinere Rückstellkräfte wirken als im Inneren eines Kristalls. Damit resultiert an der Oberfläche eine kleinere Schallgeschwindigkeit, was dazu führt, daß die Welle an der Oberfläche gebunden bleibt und nicht im Kristall zu Volumenwellen konvertiert. Je nach Ausbreitungskomponenten sowie Ausbreitungsmedium werden mehrere Arten akustischer Schallwellen unterschieden. Oberflächenwellen lassen sich mathematisch von elastischen Volumenwellen unendlich ausgedehnter Festkörper ableiten, wobei die Randbedingungen auf die freie Oberfläche bezogen werden müssen, d.h. es wird Kräftefreiheit außerhalb des Festkörpers angenommen.

2.1.1 Rayleighwellen

Oberflächenwellen auf freien, rein elastisch isotropen Festkörpern wurden erstmals 1885 von Lord Rayleigh beschrieben und werden daher Rayleighwellen (RW) genannt [Ray85]. Dieser klassische Typ von Oberflächenwellen propagiert entlang der Sagittalebene, die durch den Wellenvektor in x_1 -Richtung und den Normalenvektor auf die Oberfläche aufgespannt wird (siehe Abbildung 2.1).

Dadurch ergibt sich bei Rayleighwellen eine Auslenkungskomponente in den rückstellfreien Raum. Diese Auslenkungskomponente dringt etwa eine Wellenlänge tief in das Substrat bzw. in den Halbraum über der Oberfläche ein. Will man Rayleighwellen in flüssigen Medien anregen, so kann die Auslenkungskomponente in x_3 -Richtung an Kompressionsmoden der Flüssigkeit ankoppeln und die Welle wird in die Flüssigkeit abgestrahlt. Dies führt zur deutlichen Verringerung der akustischen Oberflächenenergie und damit zu großen Dämpfungen der Oberflächenwelle. Rayleighwellen sind immer mindestens 10 % langsamer als die langsamste Volumenwelle, da die Oberfläche auf Grund fehlender Rückstellkräfte akustisch weicher ist als das Festkörperinnere.

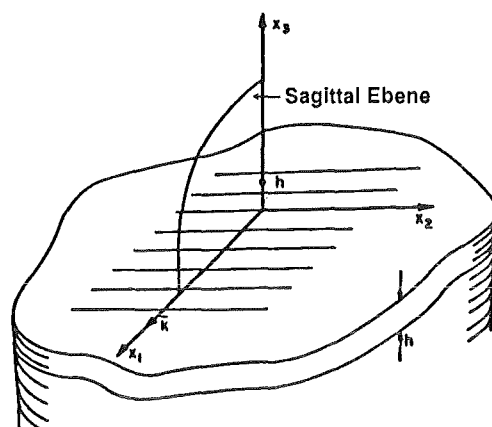


Abbildung 2.1: Darstellung der Sagittalebene

2.1.2 Horizontal polarisierte Scherwellen

Dieser Wellentyp unterscheidet sich in seinen Auslenkungskomponenten prinzipiell von den Rayleighwellen. Die Welle läuft nicht wie bei Rayleighwellen in der Sagittalebene, sondern senkrecht dazu, in der Ebene, die durch die Oberfläche aufgespannt wird, d.h. es existiert keine Auslenkungskomponente in den rückstellfreien Raum (x_3 -Richtung). Wird eine horizontal polarisierte Scherwelle (HPSW) in Flüssigkeiten angeregt, kommt es somit nur zu minimalen Energieverlusten. Die unterschiedlichen Auslenkungskomponenten von Rayleighwellen und horizontal polarisierten Scherwellen sind in Abbildung 2.2 vergleichend dargestellt.

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

- „Surface Skimming Bulk Waves“ (SSBW)

Horizontal polarisierte Scherwellen auf freien, rein elastisch isotropen Festkörperoberflächen werden als „Surface Skimming Bulk Waves“ bezeichnet. Bei diesem Wellentyp, für den im Deutschen keine einheitliche Bezeichnung existiert, handelt es sich um horizontal polarisierte, transversale Volumenwellen. SSBW's verlaufen auf einem freien, rein elastischen, isotropen Medium nicht komplett an der Oberfläche, sie konvertieren vielmehr zu Volumenwellen, indem die Welle mit zunehmender Ausbreitung in den Kristall abwandert [Lew77]. Der an der Oberfläche verbleibende Teil der Welle erfährt durch das Abstrahlen der SSBW in das Festkörperinnere eine höhere Wegstreckendämpfung. Die auf den ersten Blick als Nachteil für Sensoranwendungen erscheinende kürzere Laufstrecke wird durch nachfolgend genannte Aspekte wieder ausgeglichen [Frö84].

 - Eine höhere Eindringtiefe der Welle in den Kristall und damit eine geringere Energiedichte ermöglicht es, die Gesamtenergie der Welle zu erhöhen,

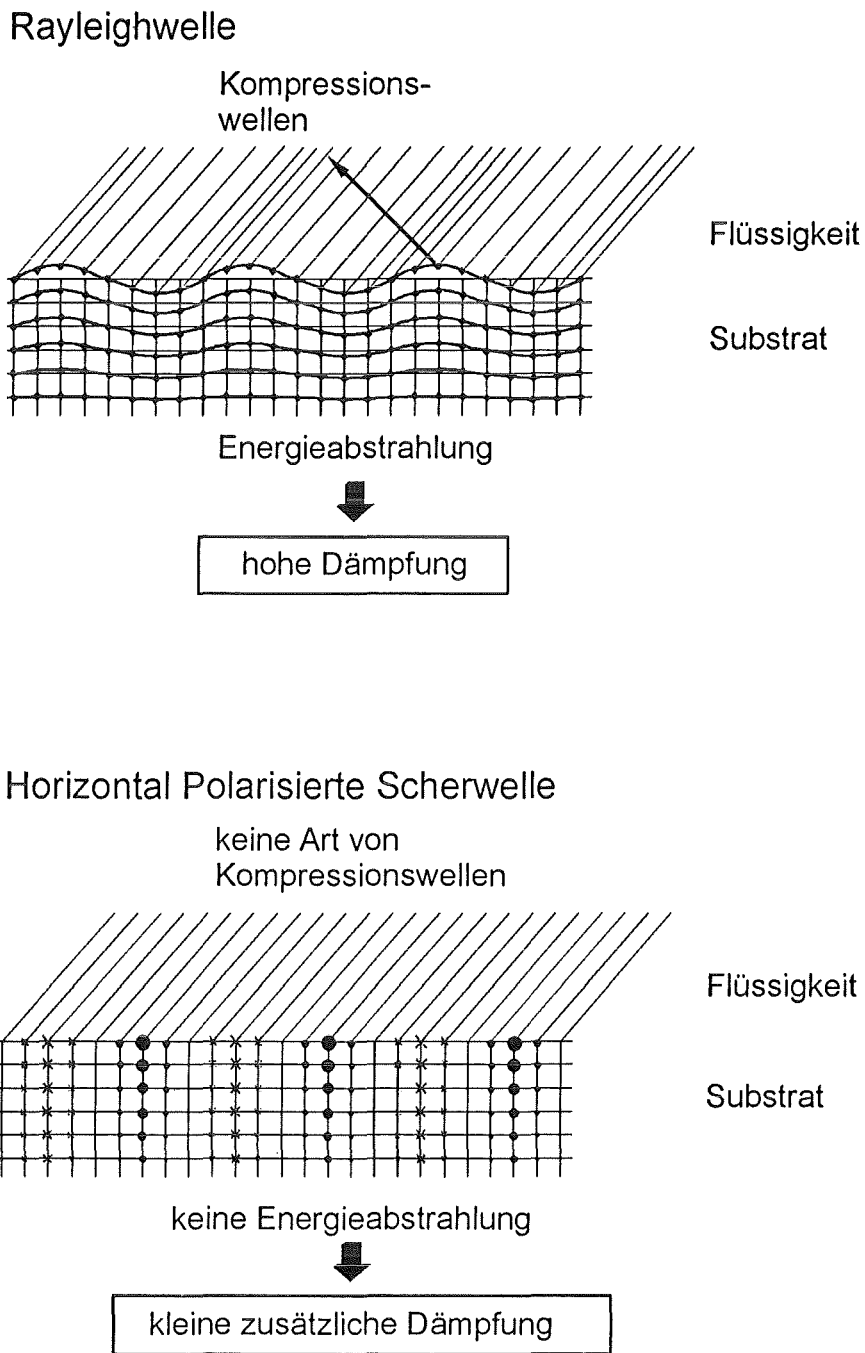


Abbildung 2.2: Unterschiedliche Ausbreitungskomponenten von Rayleighwellen und horizontal polarisierten Scherwellen

ohne daß es dabei zu Anharmonizitäten kommt.

- Die geringere Energiedichte ist auch der Grund dafür, daß die SSBW's weniger empfindlich auf Störungen an der Oberfläche, wie z.B. Verunreinigungen, reagieren. Damit ermöglichen sie den Bau robuster, langzeitstabiler, kommerzieller Bauelemente.
- Im Vergleich zu den Rayleighwellen läßt sich durch eine transversale Volumenwelle eine höhere Ausbreitungsgeschwindigkeit erzielen. Bei geeigneter Wahl des Kristallschnitts ergeben sich für Quarz Geschwindigkeiten von 5000 m/s, während die Rayleighgeschwindigkeiten bei ca. 3150 m/s liegen [Flo87].

- Bleustein–Gulyaev–Wellen

Wird eine horizontal polarisierte Scherwelle auf einem freien, anisotropen, piezoelektrischen Medium angeregt, kommt es zur Wechselwirkung der mechanischen Welle mit dem mitgeführten elektrischen Feld. Dieser Effekt der piezoelektrischen Versteifung führt zu einer Erhöhung der Oberflächenschallgeschwindigkeit. Der daraus resultierende Wellentyp wird als Bleustein–Gulyaev–Welle bezeichnet [Ble68], [Has94].

- Love–Wellen

Um eine SSBW an die Oberfläche zu binden, kann eine dünne, homogene Beschichtung auf das Ausbreitungsmedium aufgebracht werden, deren Schichtdicke im Bereich der Wellenlänge liegt. Ist die Ausbreitungsgeschwindigkeit der akustischen Welle in dieser Beschichtung kleiner als die an der Oberfläche, so verläuft die Welle in der aufgetragenen Schicht und wird dann als Love–Welle bezeichnet. Dieser Wellentyp wurde 1911 von A. Love als eine weitere Form von horizontal polarisierten Erdbebenwellen entdeckt [Lov11].

- Transversale Oberflächenwellen („Surface Transverse Waves“, STW)

Eine andere Möglichkeit die SSBW an dem Abtauchen in das Substrat zu hindern, besteht in der Beschichtung mit periodisch unterbrochenen Metallstrukturen, wie sie auch zur Erzeugung von Oberflächenwellen verwendet werden (siehe Kapitel 2.4). Diese Streifenstrukturen, die die gleiche Periodizität wie die Interdigitalschallwandler aufweisen, werden „Massegitter“ genannt. Durch diese Maßnahme wird der horizontal polarisierten Scherwelle an der Oberfläche ein periodisches Massepotential aufgeprägt, das nur Wellenlängen gleicher Periodizität an die Oberfläche bindet. Dieses „Massegitter“ ist in der Lage das elektrische Feld an die Oberfläche zu binden und somit den bei der SSBW auftretenden Energieverlust zu minimieren. Damit erreicht man eine zusätzliche frequenzselektierende Wirkung [Flo87].

Die charakteristischen Teilchenbewegungen an der Oberfläche sind für die unterschiedlichen Wellentypen in Abbildung 2.3 dargestellt. Rayleighwellen zeigen Teilchenbewegungen in der Papierebene, bei den horizontal polarisierten Scherwellen

dagegen verlaufen sie senkrecht dazu. Im Gegensatz zu den STW's erfolgt bei den SSBW's ein Abtauchen der Welle in das Substrat. Eine Zusammenfassung der verschiedenen Wellenarten ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

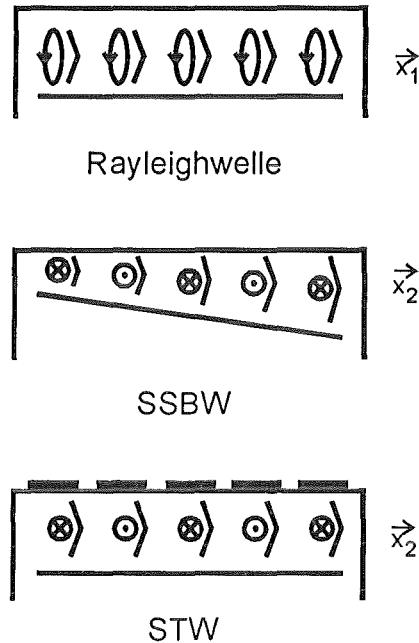


Abbildung 2.3: Teilchenbewegung der verschiedenen Wellentypen

2.2 Plattenmoden

Von diesem Wellentyp spricht man generell, wenn das gesamte Substrat von der akustischen Resonanz erfaßt wird. Anschaulich kann man sich Plattenmoden als Volumenwellen vorstellen, die zwischen Ober- und Unterseite des piezoelektrischen Substrats hin und her reflektiert werden. Dabei muß zwischen symmetrischen (Dickenschwingungen) und antisymmetrischen (Biegeschwingungen) Moden unterschieden werden. Findet man Teilchenbewegungen in der Sagittalebene, die bei Dickenschwingungen auftreten, so spricht man von Lamb-Wellen. Wird die Substratschichtdicke immer weiter verkleinert ($h=2 \mu\text{m}$) so gelangt man zu einem weiteren Wellentyp, der als „Flexural Plate Waves“ (FPW) bezeichnet wird. Ein Sensor auf der Basis von FPW's nutzt vor allem die Biegeschwingungen, des Substrats aus.

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

Einteilung der verschiedenen Arten von Oberflächenwellen

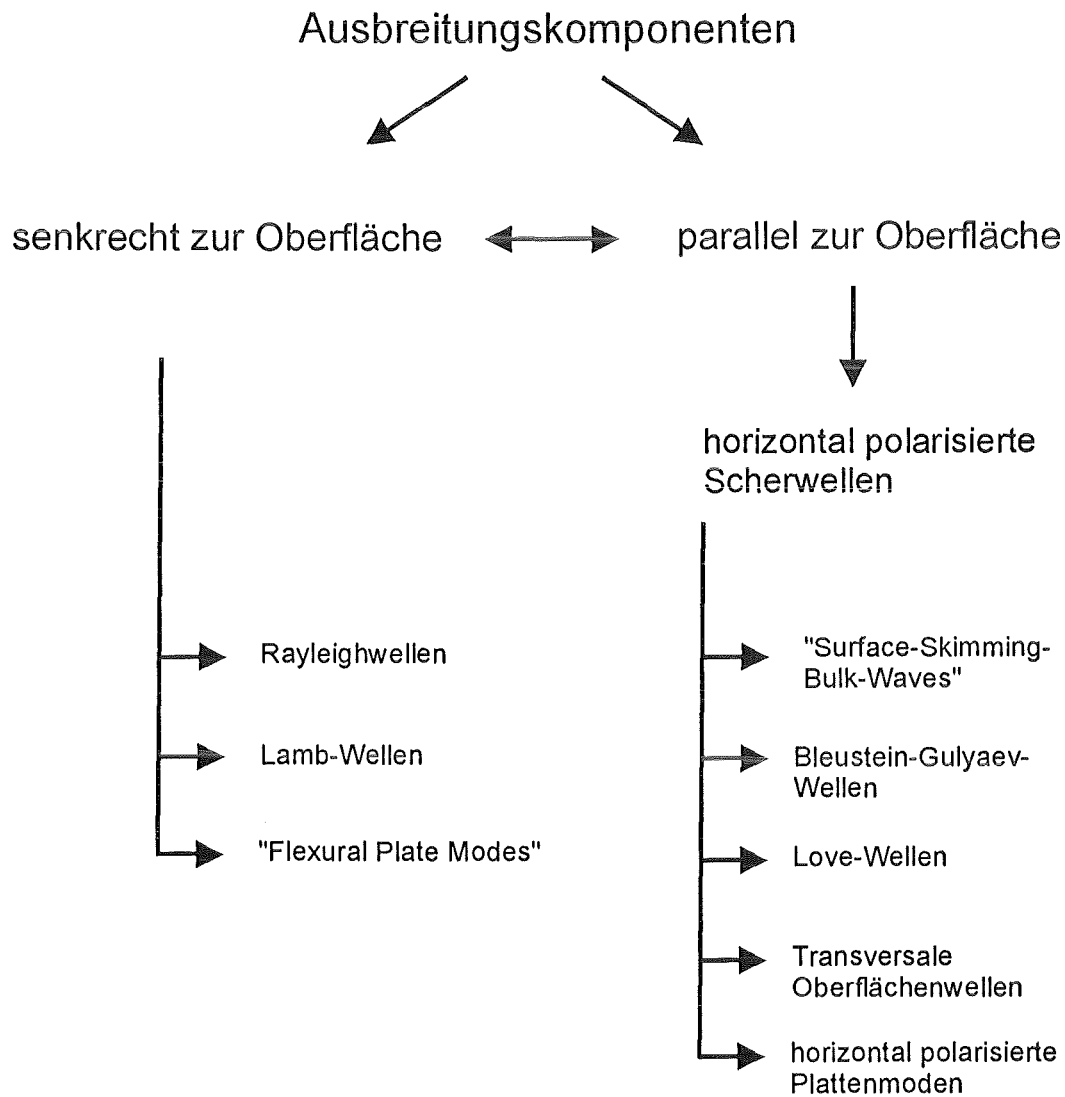


Abbildung 2.4: Vergleich der verschiedenen Wellenarten

2.3 Piezoelektrizität

Um eine Oberflächenwelle auf einem elastischen Festkörper zu erzeugen, wird meist ein piezoelektrischer Kristall verwendet. Die Brüder Jacques und Pierre Curie fanden 1880, daß durch Krafteinwirkung auf ausgezeichnete Kristalloberflächen elektrische Spannungen erzeugt und gemessen werden können, die aus Ladungsverschiebungen an der Oberfläche resultieren. Gegenüberliegende Oberflächen laden sich unterschiedlich auf und der Kristall wird zu einem makroskopisch meßbaren Dipol. Dieser Effekt, der zuerst an Quarz, Turmalin, Zinkblende und Topas entdeckt wurde, heißt Piezoelektrizität [Cur80]. Es existiert auch der umgekehrte Effekt, daß durch Anlegen eines elektrischen Wechselfeldes der Kristall periodisch verzerrt wird. Aus den Kompressionen bzw. Dehnungen des Kristalls resultieren dann Schwingungen des piezoelektrischen Substrats. Piezoelektrizität findet man allgemein bei Kristallen, die eine oder mehrere polare Achsen, aber kein Symmetriezentrum besitzen. Während die ersten Bauelemente auf der Basis des piezoelektrischen Effekts aus Siliziumdioxid bestanden¹, gewinnen in jüngerer Zeit vor allem Einkristalle aus LiTaO_3 oder LiNbO_3 als Substratmaterialien für akustische Bauelemente an Bedeutung.

2.3.1 Einfluß der Piezoelektrizität auf die Schallgeschwindigkeit der Oberflächenwelle

Akustische Oberflächenwellen werden im allgemeinen piezoelektrisch auf dem Substrat angeregt. Wie in Kapitel 2.3 beschrieben, entsteht durch eine Wechselspannung eine periodische, mechanische Deformation, die wiederum auf der Substratoberfläche ein elektrisches Feld erzeugt und somit die Oberfläche etwas versteift. Dies bedeutet, daß die Oberflächenwelle an ein durch den Piezoeffekt erzeugtes elektrisches Feld gekoppelt ist, was einen direkten Einfluß auf die Schallgeschwindigkeit der Welle hat; man findet eine durch piezoelektrische Versteifung leicht erhöhte Schallgeschwindigkeit. Die Stärke der Kopplung zwischen mechanischer Deformation und elektrischem Feld wird durch den dimensionslosen Kopplungsfaktor K beschrieben. Die piezoelektrische Versteifung wirkt auf den Elastizitätstensor, der über Gleichung (2.1) mit der Schallgeschwindigkeit verknüpft ist [Far78].

$$v^{piezo} = \sqrt{\frac{C_{Steif}}{\rho}} \quad (2.1)$$

mit

$$C_{Steif} = C(1 + K^2) \quad (2.2)$$

¹ SiO_2 stellt ein äußerst robustes Material dar; der Temperatureinfluß auf den piezoelektrischen Effekt ist klein, die Dämpfung des Bauelements gering.

Tabelle 2.1: Stoffkonstanten einiger piezoelektrischer Substrate

Substrat	Wellen- typ	Kristall- schnitt	Lauf- richtung	v [m/s]	K^2 [%]
α -Quarz	RW	ST	X	3158	0.11
LiNbO ₃	RW	Y	Z	3488	4.8
LiTaO ₃	RW	77.5°-rot Y	90° zu X	3379	1.6
LiTaO ₃	STW	36°-rot Y	X	4160	4.7

- V^{piezo} = Schallgeschwindigkeit im piezoelektrischen Medium
 ρ = Massendichte der Volumeneinheit
 C = Elastizitätstensor
 C^{Steif} = piezoelektrisch versteifter Elastizitätstensor
 K = Kopplungsfaktor

Der Kopplungsfaktor kann bei Oberflächenwellen im Gegensatz zu Volumenwellen nicht berechnet werden. Er wird vielmehr als relative Änderung der OFW-Schallgeschwindigkeit, die durch das Kurzschließen der elektrischen Felder bei einer Metallisierung entsteht, definiert:

$$\frac{\Delta V}{V_0} = \frac{K^2}{2} \quad (2.3)$$

In Tabelle 2.1 sind einige wichtige Eigenschaften und Konstanten für verschiedene piezoelektrische Substrate zusammengestellt.

2.4 Erzeugung von Oberflächenwellen

Zur Erzeugung von akustischen Oberflächenwellen auf piezoelektrischen Materialien verwendet man im allgemeinen Schallwandler, die mit einer hochfrequenten Wechselspannung angeregt werden. Diese Spannung erzeugt durch den Piezoeffekt eine periodische Oberflächendeformation, woraus eine Schallwelle resultiert. Ein miniaturisierter Schallwandler stellt heute die übliche Art der Anregung auf akustischen Oberflächenwellenbauelementen dar. Die Schallwandler sind meist aufgedampfte Aluminium- oder Goldstrukturen mit einer Dicke von 50–200 nm. Anschaulich kann man sich diese als zwei ineinandergreifende Kämmen vorstellen, von denen der eine mit einer hochfrequenten Wechselspannung angeregt wird, während der andere mit einem Massepotential geerdet ist. Alle Finger eines Kamms sind über eine metallisierte Fläche (Pads) miteinander verbunden und mit Bonddrähten über isolierte Durchführungen an die Füßchen der Sensoren (Pins) angeschlossen. Diese Art der miniaturisierten Schallwandler werden als Interdigitaltransducer (IDT) bezeichnet. Zwischen zwei Fingern der Kammkondensatoren bilden sich Wechselfelder aus, die

das piezoelektrische Material verzerren und eine akustische Oberflächenwelle sowohl in das Substratinnere als auch in den Halbraum über der Sensoroberfläche abstrahlen. Die Stärke des elektrischen Feldes wird dabei maßgeblich von der Dielektrizitätskonstanten (DK) zwischen den Interdigitaltransducern beeinflusst.

2.4.1 Verzögerungsleitung und Resonator

Nach der Anregung der Welle breitet sich diese entlang einer gewissen Laufstrecke auf der elastischen Oberfläche aus und wird von einem zweiten IDT, der die gleiche Periodizität aufweist wie der Sendetransducer empfangen. An den Fingern der Kammkondensatoren kommt es dabei zum umgekehrten Vorgang, die mechanische Schallwelle wird in eine elektromagnetische Welle zurückgewandelt. Durch die piezoelektrische Kopplung entstehen an jedem Fingerpaar Influenzladungen, die sich letztlich zu einer makroskopisch meßbaren Spannung addieren. Da sich akustische Wellen wesentlich langsamer ausbreiten als elektromagnetische Wellen, kommt es zwischen Sende- und Empfängertransducern zu einer Signalverzögerung. Aus diesem Grund wird dieser einfache, oben beschriebene Aufbau (siehe Abbildung 2.5a) auch Verzögerungsleitung („Delay Line“) genannt [Cal86].

Bei einem Resonator sind Sende- und Empfängertransducer dicht beieinander lokalisiert (siehe Abbildung 2.5b). Auf der jeweils gegenüberliegenden Seite befinden sich Reflektorfinger, die die erzeugte akustische Schallwelle zu einem geringen Teil an jedem Finger reflektieren. Durch die große Anzahl der Reflektorfinger kommt es dadurch zur Reflexion von einem sehr hohen Anteil des Signals. Diese reflektierten Anteile der Oberflächenwelle gelangen zu den Empfängertransducern, interferieren an dieser Stelle und werden als Hochfrequenz dort ausgekoppelt. Durch diese Anordnung der Interdigitalstrukturen erreicht man im Transmissionspektrum eine scharfe Kennlinie, während bei der Verzögerungsleitung ein Übertragungsband resultiert [Nom92], [Nom93].

In Abbildung 2.5 sind beide Arten von Oberflächenwellenbauelementen in einer Prinzipskizze dargestellt.

2.5 Meßprinzip

Bei der Verwendung von akustischen Bauelementen in der Sensortechnik werden diese meist als frequenzbestimmendes Glied in einen Oszillatorschaltkreis eingebaut und die Resonanzfrequenz detektiert. Abbildung 2.6 zeigt diesen Aufbau für ein Bauelement mit Verzögerungsleitung einer transversalen Oberflächenwelle (mit „Massegitter“).

Die Sendetransducer werden mit einer hochfrequenten Wechselspannung beaufschlagt und erzeugen (wie in Kapitel 2.4 beschrieben) eine akustische Oberflächenwelle. Diese läuft entlang der elastischen Oberfläche zum Empfängertransducer und wird dort in ein elektrisches Signal zurückgewandelt. Von dort aus gelangt es zu einem Hochfrequenzverstärker, der die Verluste ausgleicht und das Signal wieder in

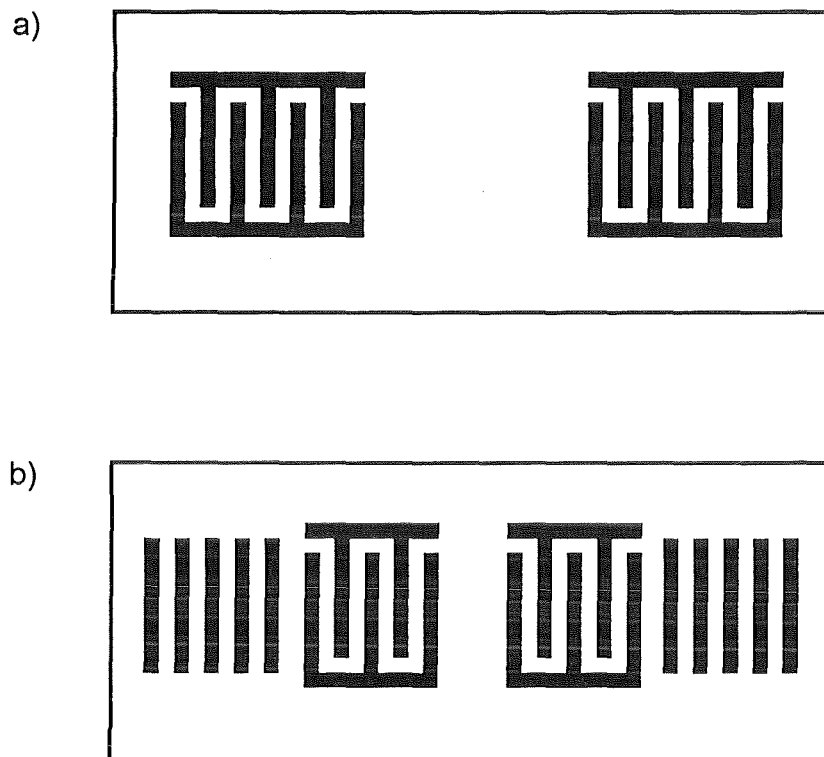


Abbildung 2.5: Vergleich des Aufbaus eines OFW-Bauelements beim Betrieb als Verzögerungsleitung a) und als Resonator b)

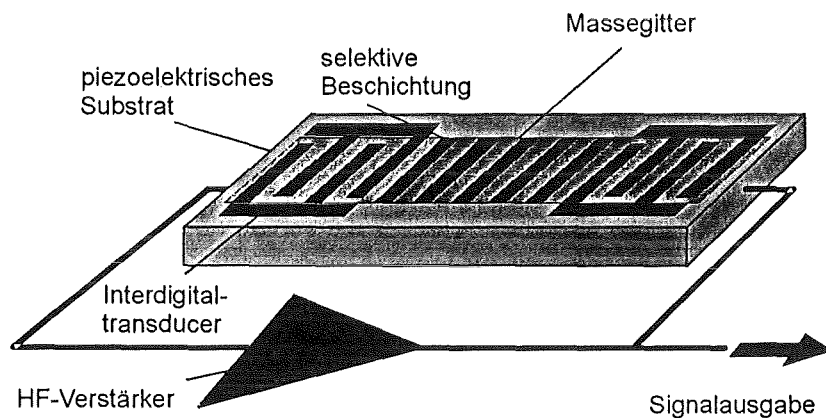


Abbildung 2.6: OFW-Bauelement als frequenzbestimmendes Glied in einem Oszillatorschaltkreis

die Sendetransducer einspeist, wodurch es zur Oszillation mit der spezifischen Resonanzfrequenz kommt. Die Oszillationsfrequenz wird in diesem Aufbau ausschließlich vom passiven Element, dem Oberflächenwellenbauelement (OFWB) bestimmt, da dieses durch seine Fingerstruktur frequenzselektierende Wirkung besitzt. Bringt man zwischen Sende- und Empfängertransducer eine selektive Beschichtung auf und beprobt das Bauelement mit einem Analyten, so kommt es zu einer Anlagerung des Analyten auf der Oberfläche. Diese Anlagerung kann sowohl kovalent als auch koordinativ oder adsorptiv sein. Sie bewirkt eine Änderung der Oberflächenschallgeschwindigkeit, welche ungefähr proportional zu der Resonanzfrequenzänderung des Oszillators ist [Rap91].

$$\frac{\Delta V}{V_0} \approx \frac{\Delta f}{f_0} \quad (2.4)$$

- ΔV = Änderung der Oberflächenschallgeschwindigkeit
- V_0 = Schallgeschwindigkeit der ungestörten Welle
- Δf = Resonanzfrequenzänderung
- f_0 = Grundfrequenz des Oszillator

2.6 Einflüsse auf die OFW-Schallgeschwindigkeit

Beim Betrieb eines Oberflächenwellenbauelements in wässrigen Meßmedien sind verschiedene Einflußgrößen auf die Oberflächenschallgeschwindigkeit denkbar. Die wichtigsten Parameter sind in dem totalen Differential in Gleichung (2.5) zusammengefaßt.

$$\begin{aligned} \frac{\Delta V}{V_0} = \frac{1}{V_0} & \left(\frac{\partial V}{\partial \sigma} \Delta \sigma + \frac{\partial V}{\partial \varepsilon} \Delta \varepsilon + \frac{\partial V}{\partial \eta} \Delta \eta + \frac{\partial V}{\partial m} \Delta m \right. \\ & \left. + \frac{\partial V}{\partial T} \Delta T + \frac{\partial V}{\partial C} \Delta C + \frac{\partial V}{\partial F} \Delta F + \dots \right) \end{aligned} \quad (2.5)$$

- σ = Leitfähigkeit
- ε = Dielektrizitätskonstante
- η = Viskosität
- m = Massebelegung
- T = Temperatur
- C = elastische Konstanten
- F = äußere Kräfte

Um die einzelnen Störeinflüsse genauer zu beschreiben und zu diskriminieren, gibt es neben der genauen Berechnung mittels Numerik – dies beinhaltet einen sehr hohen Rechenaufwand – die Möglichkeit, durch Störungsrechnung Näherungen zu finden, die die Einflüsse genügend genau erfassen.

Die Störungsrechnung² für die in dieser Arbeit ausschließlich verwendeten horizontal polarisierten Scherwellen geht davon aus, daß die physikalischen Verhältnisse durch eine beliebige Störung nur gering verändert werden [Aul90]. Weiterhin wird angenommen, daß die akustische Oberflächenwelle, die auf einem piezoelektrischen Substrat angeregt wird, nur von mechanischen und elektrischen Einflüssen abhängt. Daraus läßt sich die in Gleichung (2.9) angegebene Störungsgleichung ableiten, die sich auf die Störung der Ausbreitungskonstante β bezieht.

Die Ausbreitungskonstante β (komplex) ist über den Wellenvektor k und die Dämpfung α definiert :

$$\beta = k - i\alpha \quad (2.6)$$

$\Delta\beta$ gibt eine kleine Störung der Ausbreitungskonstanten an.

$$\Delta\beta = \beta' - \beta \quad (2.7)$$

Aus der Normierung von $\Delta\beta$ auf den Wellenvektor resultiert als neue Größe $\Delta\beta'$, die den Zusammenhang zwischen der Ausbreitungskonstanten und der relativen OFW-Schallgeschwindigkeitsänderung angibt:

$$\Delta\beta' = \frac{\Delta\beta}{k} = -\frac{\Delta V}{V_0} - i\frac{\Delta\alpha}{k} \quad (2.8)$$

$$\Delta\beta = -\frac{i}{4P} [-V^* \cdot T'_S - V' \cdot T_S + \Phi^*(i\omega D') + \Phi'(i\omega D^*)] \cdot \hat{x}_3 \Big|_{x_3=0} \quad (2.9)$$

- $\Delta\beta$ = Störung der komplexen Ausbreitungskonstante
- P = Leistungsflußdichte
- V = Teilchengeschwindigkeit
- T_S = Spannungstensor
- Φ = elektrostatisches Potential
- ω = Kreisfrequenz
- D = elektrische Verschiebung
- \hat{x}_3 = Einheitsvektor in x_3 -Richtung

Das zugrundeliegende Koordinatensystem ist in Abbildung 2.7 angegeben. Mit ' gekennzeichnete Größen beschreiben gestörte Verhältnisse, die mit * markierten konjugiert komplexe Größen.

Werden die Gleichungen (2.8) und (2.9) miteinander vernüpft, so wird deutlich, daß sowohl die OFW-Schallgeschwindigkeit als auch die Dämpfung der Welle durch die mechanischen und elektrischen Störgrößen beeinflusst werden und somit beide auch Detektionsgrößen für die Sensoranwendung darstellen. Allerdings ist es ungleich schwerer die Dämpfung mit der gleichen Genauigkeit zu bestimmen wie die

²Eine explizite Beschreibung der Störungstheorie für HPSW's auf der Basis von 36°-rot Y,X LiTaO₃-Substraten ist in [Kon93] angegeben.

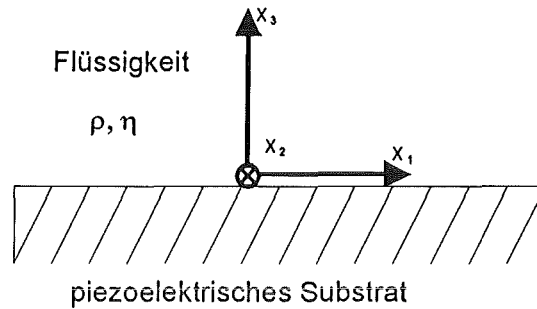


Abbildung 2.7: Der Störungsrechnung zugrunde liegendes Koordinatensystem

Resonanzfrequenz des Oszillators. In der Literatur wird der Unterschied der Meßgenauigkeit mit Faktor 10^3 angegeben [Bal89].

Aus den mittels Störungsrechnung abgeleiteten mathematischen Zusammenhängen ergeben sich unterschiedliche Abhängigkeiten der relativen Geschwindigkeitsänderung $\Delta V/V_0$ von der ungestörten OFW-Schallgeschwindigkeit V_0 . Diese Art der Diskriminierung der Einflußfaktoren ermöglicht es, auf Grund der resultierenden Funktion, den entscheidenden Störfaktor bzw. die Meßgröße zu bestimmen [Ric93].

2.6.1 Elektrische Störung

Bei einer elektrischen Störung kann es sich sowohl um eine Variation der Leitfähigkeit der Analytlösung als auch um eine Änderung der Dielektrizitätskonstante des Meßmediums handeln, was eine Veränderung der elektrischen Oberflächenimpedanz zur Folge hat. Als Störungsgleichung wird in der Literatur Gleichung (2.10) angegeben [Jos87], [Kon92].

$$\Delta\beta' = - \left(\frac{\Delta V}{V_0} \right)_{ISC} \frac{\epsilon_l' - \epsilon_l}{\epsilon_l' + \epsilon_P^T} \quad (2.10)$$

Die Größe $(\Delta V/V_0)_{ISC}$ beschreibt die Änderung der relativen OFW-Schallgeschwindigkeit bei Flüssigkeitsbeladung und kurzgeschlossener Oberfläche (l=„liquid“, SC=„short cut“).

$$\left(\frac{\Delta V}{V_0} \right)_{ISC} = -\omega (\epsilon_l + \epsilon_P^T) \frac{|\Phi|_{x_3=0}^2}{4P} \quad (2.11)$$

Dabei gilt:

$$\epsilon_P^T = \sqrt{\epsilon_{11}^T \epsilon_{33}^T - (\epsilon_{31}^T)^2}$$

und

$$\epsilon_l = \epsilon_r \epsilon_0 - i \frac{\sigma}{\omega}$$

- V_0 = Schallgeschwindigkeit bei „elektrisch offener“ Oberfläche
 ϵ_l = komplexe Dielektrizitätskonstante der ungestörten Flüssigkeit
 ϵ_P^T = effektive Dielektrizitätskonstante des piezoelektrischen Substrats

Als ungestörtes System wurde die Ausbreitung einer Oberflächenwelle bei Wasserbeladung angenommen. Damit ergibt sich für die relative Schallgeschwindigkeitsänderung bei Beprobung mit einer beliebigen wässrigen Lösung Gleichung (2.12).

$$\frac{\Delta V}{V} \approx \left(\frac{\Delta V}{V_0} \right)_{ISC} \frac{\omega^2 (\epsilon'_L - \epsilon'_l) (\epsilon'_L + \epsilon_P^T) + \sigma^2}{\sigma^2 + \omega^2 (\epsilon'_L + \epsilon_P^T)^2} \quad (2.12)$$

- ϵ'_L = Dielektrizitätskonstante des Analyten
 σ = elektrische Leitfähigkeit des Analyten

Diese Abhängigkeit der OFW-Schallgeschwindigkeit von den elektrischen Störgrößen entspricht der in der Gassensorik gefundenen [Ric85].

Mit Hilfe von Gleichung (2.12) und unter der Annahme, daß die Dielektrizitätskonstante von wässrigen Lösungen mit unterschiedlichen Salzgehalten gleich bleibt (DK=80, $(\epsilon'_L - \epsilon'_l) \approx 0$), konnte im Rahmen dieser Arbeit die Abhängigkeit der OFW-Schallgeschwindigkeit eines Bauelements aus LiTaO₃ von der Leitfähigkeit errechnet werden (siehe Abbildung 2.8). In einem Ausschnitt wurde der später relevante Bereich (siehe Kapitel 6.2) vergrößert und linear aufgetragen. Dort erkennt man im Falle einer Grundfrequenz von 380 MHz eine schwache, fast lineare Abnahme der relativen OFW-Schallgeschwindigkeit von 390 ppm/(S/m).

Durch die Detektion von Leitfähigkeitsänderungen mit akustischen OFW-Bauelementen können sowohl konduktometrische Titrationsen durchgeführt [Shi92] als auch enzymatische Reaktionen beobachtet werden, wobei eine enzymatisch katalysierte Reaktion beispielsweise eine pH-Wert-Änderung bewirken kann, z.B. die Harnstoffzersetzung durch Urease [Kon94].

2.6.2 Viskositätseinfluß

Ändert sich die Viskosität der Meßlösung, so beeinflusst dies auch die OFW-Schallgeschwindigkeit der akustischen Welle. Bei einer kurzgeschlossenen Oberfläche, d.h. ohne elektrische Störeinflüsse, wirkt sich die Viskositätsänderung direkt auf die akustische Oberflächenimpedanz und somit auf die relative Geschwindigkeitsänderung aus [Jos88], [Kon93]. Es ergibt sich eine Wurzelabhängigkeit der OFW-Schallgeschwindigkeit von der Viskosität [Kos93]:

$$\frac{\Delta V}{V} = -\frac{Vv_2^2}{4\omega P} \left(\sqrt{\frac{\omega\rho_l'\eta'}{2}} - \sqrt{\frac{\omega\rho_l\eta}{2}} \right) \quad (2.13)$$

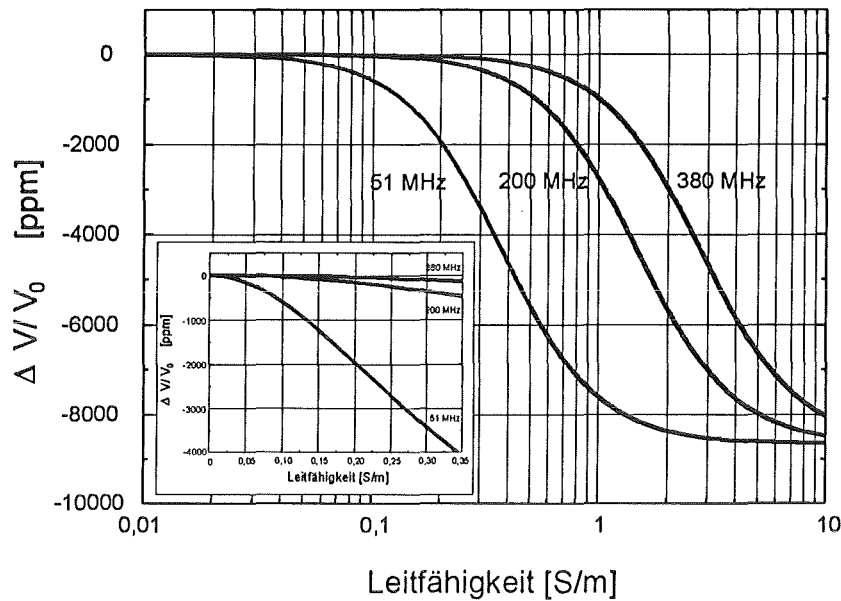


Abbildung 2.8: Theoretische Abhängigkeit der Oberflächenwellenschallgeschwindigkeit von der Leitfähigkeit für OFW-Bauelemente auf der Basis von LiTaO_3 bei unterschiedlichen Grundfrequenzen; berechnet nach Gleichung (2.12)

- v_2 = Teilchengeschwindigkeit in x_2 -Richtung
- ρ_l = Dichte der Flüssigkeit
- η = Viskosität der Flüssigkeit

Auch für den Fall der Störung der Oberflächenwelle durch steigende Viskosität wurde ein theoretischer Kurvenverlauf bestimmt (siehe Abbildung 2.9).

2.6.3 Massesensitivität

Um die Massesensitivität, also die Störung durch Massenbelegung der elastischen Oberfläche, eines Bauelementes zu bestimmen, geht man von einer dünnen Beschichtung der Dicke h aus. Dies kann ein isotroper Film sein, dessen Stoffeigenschaften durch seine Dichte ρ' sowie der elastischen Lamé-Konstante μ' ($\mu' = c'_{44}$) gegeben sind. Die Störfunktion lautet dann:

$$\frac{\Delta V}{V_0} = \frac{Vh}{4P} \left[\left(\rho' - \frac{\mu'}{V^2} \right) v_2^2 + \rho' v_3^2 \right] - i \frac{Vh}{4\omega P} \left(\frac{\omega}{V} \right)^2 \eta v_3^2 \quad (2.14)$$

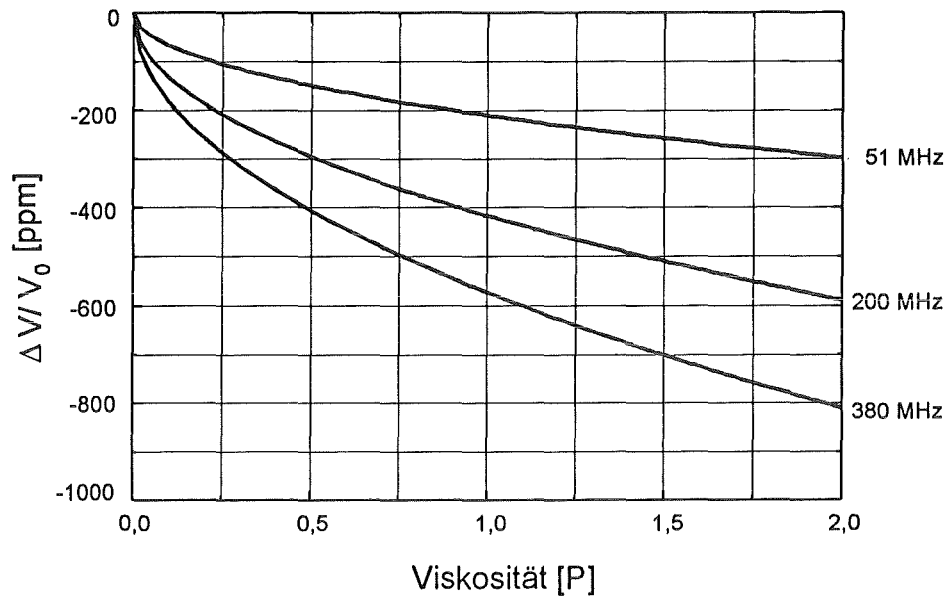


Abbildung 2.9: Theoretische Abhängigkeit der Oberflächenschallgeschwindigkeit von der Viskosität für OFWB's auf der Basis von LiTaO_3 bei unterschiedlichen Grundfrequenzen; berechnet nach Gleichung (2.13)

- h = Schichtdicke
- ρ' = Dichte der Schicht
- μ' = Lamé-Konstante
- c'_{44} = elastische Konstante

Damit resultiert für die relative Schallgeschwindigkeitsänderung, die durch eine Massenbelegung der Oberfläche bewirkt wird, der folgende Zusammenhang:

$$\frac{\Delta V}{V} = -\frac{Vh}{4P} \left[\left(\rho' - \frac{\mu'}{V^2} \right) v_2^2 + \rho' v_3^2 \right] \quad (2.15)$$

Aus dieser Gleichung ergibt sich die in Abbildung 2.10 dargestellte Kurve. Wird Gleichung (2.15) mit Gleichung (2.4) verknüpft und das Ergebnis in der Weise umgeformt, daß eine Abhängigkeit der Frequenzänderung von der Grundfrequenz zu erkennen ist, resultiert daraus Gleichung (2.16). Diese gilt unter der Voraussetzung, daß ein homogener Film auf der Oberfläche abgeschieden wird, der lediglich eine Änderung der Massenbelegung bewirkt.

$$\Delta f = f_0^2 c \Delta m \quad (2.16)$$

- f_0 = Arbeitsfrequenz
- c = Konstante
- Δm = Änderung der Massenbelegung

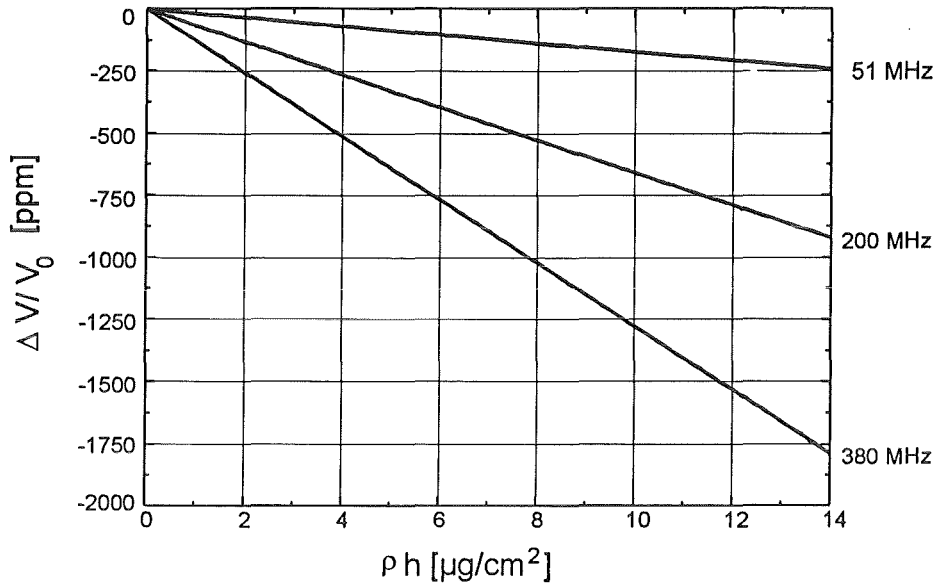


Abbildung 2.10: Theoretische Abhängigkeit der Oberflächenschallgeschwindigkeit von der Massezunahme durch eine isotrope Schicht für OFW's auf der Basis von LiTaO_3 bei unterschiedlichen Grundfrequenzen; berechnet nach Gleichung (2.15)

2.6.4 Temperatureinfluß

Durch Änderung der Temperatur kommt es auf Grund von Asymmetrien im Kristallgitter des Substrats zur Änderung der elastischen Konstanten. Dabei kann es zu gegenläufigen Effekten kommen, so daß eine Erhöhung der Temperatur eine Vergrößerung der Konstanten in eine Richtung bedingt, während in einer anderen Richtung eine Abnahme festzustellen ist. Um die Frequenzabhängigkeit des Bauelements von der Temperatur zu bestimmen, wird ein Polynom n -ten Grades angenähert [Mas64].

$$\frac{f(T)}{f_0} = a_0 + a_1(T - T_0) + a_2(T - T_0)^2 + a_3(T - T_0)^3 + \dots + a_n(T - T_0)^n \quad (2.17)$$

Für viele Substratmaterialien sind die Terme niedriger Ordnung (bis 3. Grad) im Polynom (2.17) dominierend, so daß oft eine Parabel bzw. eine Hyperbel resultiert. Solche Materialien besitzen einen Temperaturkompensationspunkt T_0 , an dem bei einer Erhöhung der Temperatur infinitesimale Frequenzänderungen vorliegen ($f'(T) = 0$). Dies bedeutet, daß am Kompensationspunkt die Temperaturabhängigkeit der Substrate vernachlässigt werden kann. Für einige Kristallschnitte ist deren Temperaturabhängigkeit in Abbildung 2.11 angegeben.

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Substratmaterial 36° -rot Y,X LiTaO_3 zeigt eine lineare Abhängigkeit der Frequenzänderung bei Temperaturerhöhung im Bereich von 10 - 50°C mit einer Steigung von $-1 \text{ kHz}/^\circ\text{C}$, d.h. es existiert für dieses

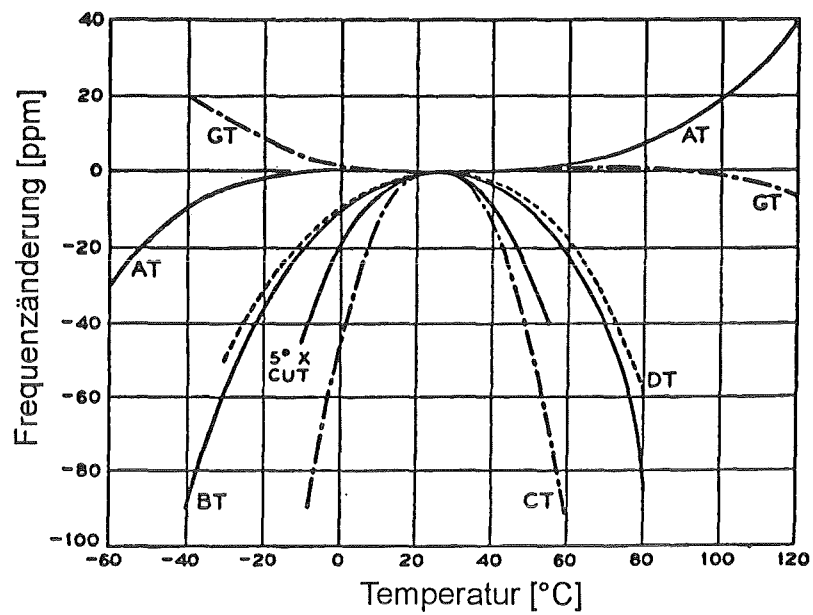


Abbildung 2.11: Temperaturabhängigkeit der Frequenzänderung von Schwingquarzen für verschiedene Kristallschnitte

piezoelektrische Substrat kein Temperaturkompensationspunkt im relevanten Temperaturbereich [Nom93].

Kapitel 3

Theorie der Immunochemie

3.1 Immunität – Immunantwort

Lebewesen besitzen zum Schutz gegen krankheitserregende Mikroorganismen und Viren ein System, welches Abwehrstoffe gegen körperfremde Moleküle (Antigene) produziert, das Immunsystem. Es können zwei Arten von Immunität unterschieden werden, die zelluläre und die humorale.

Die zelluläre Immunantwort ist gegen virusinfizierte Zellen, Pilze oder Parasiten gerichtet. Sie zerstört die Zelle, die das Immunsystem angreift, indem das Antigen von einer Makrophage eingeschlossen und fragmentiert wird. Diese Fragmente werden von Oberflächenproteinen (Proteine des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes, MHC-Proteine) der Makrophage gebunden. T-Lymphocyten tragen das zu dem Antigen komplementäre Erkennungszentrum und können so an die Makrophage binden. Dieser entstandene Komplex wird dann zur Vermehrung angeregt und somit werden nur die Zellen in großer Menge produziert, die das eingedrungene Antigen spezifisch erkennen.

Die humorale Immunität richtet sich durch die Produktion von Antikörpern in den B-Lymphocyten gegen die Antigene, die durch Bakterieninfektionen sowie extrazelluläre Virusinfektionen in den Organismus gelangen. Eine solche Reaktion auf Antigene im Organismus wird als primäre Immunantwort bezeichnet. Dabei wird das Antigen von dem Antikörper durch eine Immunreaktion komplexiert und dieser unschädliche Komplex aus dem Organismus entfernt. Weiterhin existieren Gedächtniszellen, die sich bei wiederholter Konfrontation mit dem gleichen Antigen wesentlich schneller vermehren als normale B-Zellen. Dieses Erinnern des Immunsystems an frühere Erreger wird sekundäre Immunantwort genannt.

3.2 Antikörper

Antikörper oder Immunglobuline sind Proteine, die in einer enormen Vielfalt auftreten und doch untereinander eng verwandte Strukturmerkmale aufweisen. So bestehen alle Antikörper aus vier Polypeptidketten, die in Y-Form angeordnet sind

(siehe Abbildung 3.1).

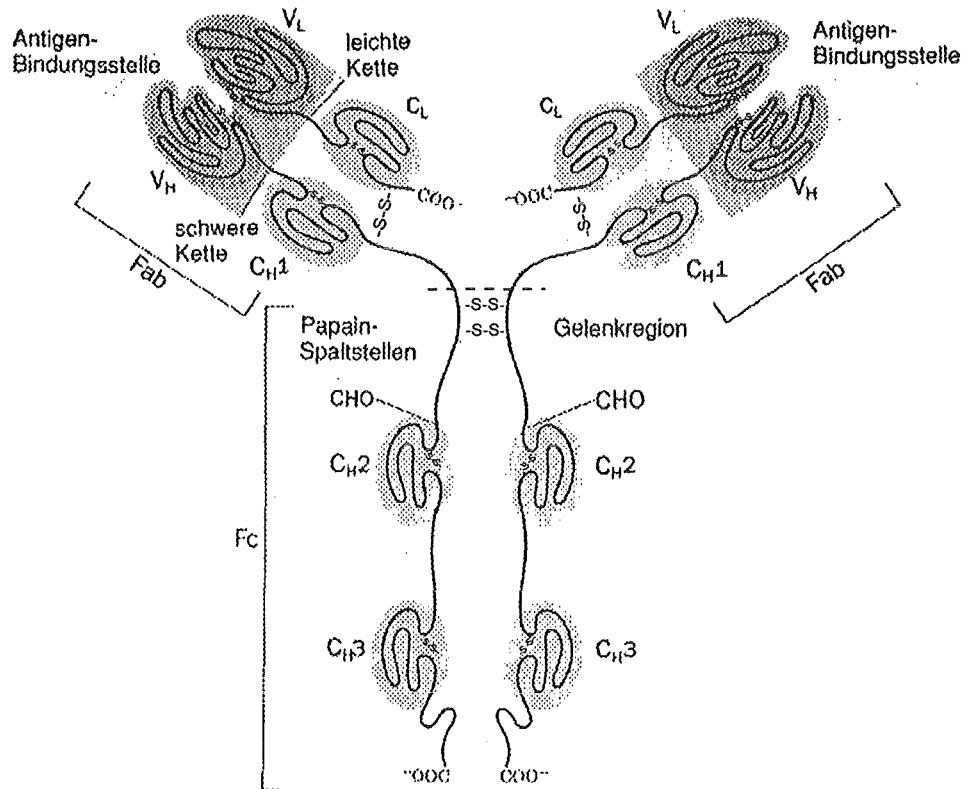


Abbildung 3.1: Struktur der Immunglobuline aus [Voe92]

Immunglobuline lassen sich enzymatisch in drei etwa gleich große Teile spalten [Por59]. Als Fragmente entstehen die beiden identischen Arme des Ypsilon und ein weiterer Teil, der Stamm des Ypsilon. Die Arme des Antikörpermoleküls enthalten die Bindungsstellen für die Immunreaktion und werden deshalb als Fragmente bezeichnet, die die antigenbindenden Stellen enthalten (Fab). Dies bedeutet, daß Antikörper immer mindestens zwei Antigene binden können, also bivalent sind. Der Stamm des Immunglobulins kann leicht kristallisieren und wird aus diesem Grund als kristallisierendes Fragment bezeichnet (Fc). Es ist unter anderem für den Transport des Immunglobulins innerhalb eines Organismus verantwortlich. Der Bereich zwischen dem Fab- und dem Fc-Teil eines Antikörpers wird Gelenkregion genannt. Sie besitzt einen entscheidenden Anteil an der Vielfalt der Immunglobuline. In dieser Gelenkregion kann das Immunglobulin mittels proteolytischer Enzyme wie Pepsin oder Papain gespalten werden [Cla72].

Die vier Polypeptidketten sind in schwere Ketten (H-Ketten) mit einem Molekulargewicht von ca. 50000–80000 g/mol, und in leichte Ketten (L-Ketten), deren Molekulargewicht ca. 25000 g/mol beträgt, unterteilt. Diese vier Ketten sind über

Tabelle 3.1: Unterteilung der Immunglobuline in verschiedene Klassen

	IgG ^a	IgM	IgA	IgE	IgD
schwere Ketten	γ	μ	α	ϵ	δ
leichte Ketten	κ, λ	κ, λ	κ, λ	κ, λ	κ, λ
Struktur der Untereinheiten	$\gamma_2\kappa_2,$ $\gamma_2\lambda_2$	$(\mu_2\kappa_2)_5J,$ $(\mu_2\lambda_2)_5J$	$(\alpha_2\kappa_2)_n^bJ,$ $(\alpha_2\lambda_2)_n^bJ$	$\epsilon_2\kappa_2,$ $\epsilon_2\lambda_2$	$\delta_2\kappa_2,$ $\delta_2\lambda_2$
Anzahl der Valenzen	2	10	2, 4 oder 6	2	2
Molekulargewicht [kD]	150	950	360 – 720	190	160
Serumkonz. [mg/ml]	8 – 16	0.5 – 2	1 – 4	0.01 – 0.4	0 – 0.4

^a Es gibt 4 Unterklassen, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, die sich in ihrer γ -Kette unterscheiden

^b n = 1, 2 oder 3

vier Disulfidbrücken sowie nicht kovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden. Am N-Terminus der schweren Ketten, also in der Gelenkregion der Antikörper, sind Oligosaccharide gebunden, die bis zu 4 % des Gesamtmoleküls ausmachen (Glycoproteine). Es existieren fünf unterschiedliche schwere Ketten ($\alpha, \delta, \epsilon, \gamma, \mu$), die für die Klassifizierung der Antikörper herangezogen werden. Bei den leichten Ketten sind ebenfalls zwei unterschiedliche Arten bekannt (κ, λ). Die fünf Antikörperklassen besitzen unterschiedliche Valenzen, da mehrere Antikörpermoleküle über Disulfidbrücken bzw. über eine weitere Polypeptidkette (J-Kette) wiederum untereinander verbunden sind. Eine Zusammenstellung der Antikörper ist in Tabelle 3.1 angegeben.

Die L-Ketten enthalten ca. 220 Aminosäuren, von denen etwa die Hälfte bei allen Immunglobulinen eine gleiche Sequenz aufbaut (konstante Region), während die andere Hälfte der Aminosäurenreihenfolge sich jeweils ändert (variable Region). Bei den schweren Ketten findet man ähnliche Strukturmerkmale. Dort gibt es drei konstante, homologe Regionen, die je 110 Aminosäuren enthalten und eine variable Region, die, ebenfalls 110 Aminosäuren lang, komplementär zur variablen Region der leichten Kette angeordnet ist. In jeder dieser Regionen ist nochmals eine Disulfidbrücke enthalten, die unter anderem für die unabhängige Domänenbildung der Immunglobuline verantwortlich ist. Innerhalb der variablen Regionen ist der Aminosäureaustausch nicht an jedem Punkt gleich. Es gibt dort drei Stellen, an denen die Variabilität der Aminosäuresequenz besonders hoch ist und die für die eigentliche

Erkennung des Antigens verantwortlich sind, was Versuche mit Affinitätsmarkierung belegen konnten. Diese Regionen heißen hypervariable oder komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR).

3.3 Antigene

Bei Antigenen handelt es sich im allgemeinen um körperfremde Substanzen, die sowohl partikulär (als Bakterien, Viren oder Pilze) als auch gelöst (als Proteine, Kohlenhydrate oder Nukleinsäuren) auftreten und ein Molekulargewicht von mindestens 3000 g/mol besitzen. Diese Moleküle stören das Immunsystem, das mit der Produktion von spezifischen Antikörpern gegen diese Antigene reagiert. Antigene besitzen immunologisch relevante Aminosäuresequenzen, Epitope, die von dem Antikörper erkannt werden. Diese immunologische Aktivität befindet sich im allgemeinen an anderer Stelle als beispielsweise die enzymatische Aktivität von Proteinen. Bei niedermolekularen Verbindungen, die die notwendige Erkennungssequenz (Determinante) zur Antikörperidentifizierung besitzen, spricht man von Haptenen. Sie sind in der Lage eine Immunreaktion einzugehen und damit Antikörper zu binden; sie können aber keine Antikörperproduktion initiieren. Zusätzlich tragen Antigene im allgemeinen mehrere Determinanten, so daß bei Kontakt des Immunsystems mit dem Antigen nicht nur ein spezifischer Antikörper gebildet wird, sondern ein Serum aus mehreren wirksamen Antikörpern. Dieses Verhalten wird als polyklonale Immunantwort bezeichnet, die produzierten Antikörper nennt man polyklonal [The89]. Durch ein spezielles Verfahren ist es auch möglich nur einen spezifischen Antikörper gegen ein Antigen zu erzeugen. Dazu wird ein Tier mit einem Antigen immunisiert und aus der Milz Lymphocyten entnommen, die dann mit Myelomzellen fusioniert werden. Das daraus resultierende Hybridom ist in der Lage eine einzige Art von Antikörper, die als monoklonal bezeichnet werden, zu produzieren und besitzt zudem die Eigenschaft des permanenten Wachstums. Monoklonale Antikörper erkennen im Gegensatz zu polyklonalen Immunglobulinen ausschließlich eine Determinante des Antigens.

3.4 Stabilität und Denaturierung

Unter thermodynamischen Gesichtspunkten handelt es sich bei Proteinen um labile Verbindungen. Zur Denaturierung ist lediglich eine Freie Energie von 0.4 kJ/mol pro Aminosäurerest notwendig [Voe92]. Verschiedene nichtkovalente Kräfte sind in ihrer Summe für die Proteinstruktur und somit für ihre Stabilität verantwortlich.

- Elektrostatische Kräfte
Dazu zählen zum einen ionische Wechselwirkungen, die allerdings nur einen sehr geringen Beitrag zu Stabilisierung des Polypeptids liefern. Zum anderen

handelt es sich um Dipol–Dipol–Wechselwirkungen – sowohl zwischen permanenten als auch induzierten Dipolen – und London–Dispersionskräfte, die einen deutlichen Beitrag zu Stabilisierung der Proteine leisten.

- Wasserstoffbrücken–Bindungen
In Proteinen findet man intramolekulare Wasserstoffbrücken–Bindungen, aber auch Verknüpfungen mit Wasser. Die innermolekularen Verbindungen sind so angeordnet, daß die maximale Anzahl an Wasserstoffbrücken entsteht, woraus ein sehr großer Einfluß auf die Proteinstruktur resultiert.
- hydrophobe Wechselwirkungen
Einen sehr großen Beitrag zu Stabilisierung von Proteinen liefern die hydrophoben Kräfte innerhalb eines Moleküls. Da die Aminosäurereste meist unpolarer Natur sind und sie sich somit dem Kontakt mit dem Lösungsmittel Wasser entziehen, kommt es zu einer Art „intramolekularer“ Mizellenbildung.
- Disulfid–Bindungen
Während der Proteinfaltung kommt es zur Ausbildung von Disulfidbrücken, die das Makromolekül in seiner Konformation stärken.

Die Zerstörung der Tertiärstruktur von Proteinen und somit ihre Denaturierung wird von verschiedenen Faktoren herbeigeführt:

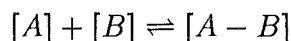
1. Temperaturerhöhung
Eine Erhöhung der Temperatur bedingt einen Konformationswechsel im Molekül, wodurch es zu einem Polymer mit statistischer Anordnung der Peptidketten kommt.
2. pH–Wert–Änderung
Durch Zugabe von Säuren oder Laugen werden die ionischen Wechselwirkungen zerstört. Es kommt zu einer Veränderung der Ladungsverteilung in den Seitenketten der Aminosäuresequenz.
3. Detergentien
Detergentien denaturieren Proteine bereits in kleinsten Konzentrationen. Sie lagern sich an die unpolaren Seitenketten des Polypeptids an und unterbinden die hydrophoben Wechselwirkungen.
4. hohe Konzentrationen wasserlöslicher organischer Substanzen
Diese Stoffe, wie aliphatische Alkohole, denaturieren ebenfalls auf Grund der Änderung von hydrophoben Wechselwirkungen, indem sie selbst diese Kräfte zum Lösungsmittel Wasser aufbauen.
5. chaotroper Effekt
Der Einfluß von Salzlösungen auf die Proteinstabilisierung kann unterschiedlicher Art sein. Einige Salze, wie KH_2PO_4 , stabilisieren die Tertiärstruktur des

Polypeptids, andere, wie beispielsweise KSCN, schwächen diese. Das unterschiedliche Verhalten von Ionen ist in der Hofmeister-Reihe sortiert. Destabilisierende Ionen nennt man chaotrop; ihr Wirkungsmechanismus ist noch nicht eindeutig geklärt. Sie sind in der Lage unpolare Substanzen deutlich besser in Wasser zu lösen, was wiederum zur Störung der hydrophoben Wechselwirkungen führt.

3.5 Immunoreaktion und ihre Kinetik

Antigen-Antikörper-Reaktionen beruhen auf der Ausbildung von komplementären van-der-Waals sowie hydrophoben Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und Ionenbindungen. Es kommt zu einer Schlüssel-Schloß-Reaktion der beiden Biomoleküle, bei der jedoch keine kovalente Bindung ausgebildet wird.

Eine Immunoreaktion eines monovalenten Antikörpers kann thermodynamisch mit dem Massenwirkungsgesetz beschrieben werden. Kinetisch gelten die formalistischen Ansätze der Gleichgewichtskinetik.



$$K_a = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[A - B]}{[A][B]}$$

- K_a = Affinitätskonstante
- k_a = Geschwindigkeitskonstante der Komplexbildung
- k_d = Geschwindigkeitskonstante der Komplexdissoziation

Die Affinitätskonstanten von Antikörpern liegen im Bereich von 10^5 – 10^{12} l/mol, die Komplexbildungsenergie beträgt ca. 25–65 kJ/mol.

Wird der Fall einer multivalenten Reaktion zwischen Antikörpern und einem Antigen betrachtet, so wird dies in der Literatur mit stochastischen Ansätzen zur Beschreibung der kinetischen Vorgänge angegeben [Pla93].

3.6 Immobilisation von Proteinen auf hydrophilen Oberflächen

Eine der wesentlichen Aufgaben in der Sensortechnik besteht in der reproduzierbaren Beschichtung von Oberflächen mit Biomolekülen. Immobilisationsmethoden, die für die Anwendung auf akustischen Sensoren geeignet sind, werden in [Gui89] und [Dro79] zusammengefaßt. Einige der am häufigsten verwendeten Immobilisationstechniken auf hydrophilen Oberflächen sind im folgenden kurz beschrieben.

- Selbstabscheidende Schichten

Die einfachste Möglichkeit, Proteine auf Oberflächen abzuscheiden, ist die In-

kubation des Festkörpers über einen längeren Zeitraum (2–24 Stunden) gegebenenfalls bei erhöhter Temperatur (37°C). Vor allem wenn sich auf der Oberfläche elementares Gold befindet (metallisierte Fläche, Elektroden aus Gold, etc.), ist dies eine schnelle und effektive Methode zur Anbindung von Biomolekülen [Kön93], [Köß94]. Es kommt dabei zu sehr starken intermolekularen Kräften zwischen den Thioleinheiten der Proteine und dem Metall. Diese Wechselwirkungen können aber auch zur Funktionalisierung der Oberfläche verwendet werden, indem man beispielsweise Dithiole, die zusätzlich eine endständige Carbonsäuregruppe aufweisen, abscheidet. Anschließend erfolgt dann, nach Aktivierung der Carboxylgruppe durch ein Carbodiimid, die kovalente Verknüpfung über den N-Terminus des Proteins [Dua94].

- Silanisierung einer hydrophilen Oberfläche

Eines der am häufigsten eingesetzten Sensormaterialien ist Quarz, dessen hydrophile Oberfläche (ca. 10^{14} Hydroxygruppen pro Quadratcentimeter [Lan93]) mit einer dünnen Silanschicht funktionalisiert werden kann. Dazu werden Aminosilane verwendet, die Ethoxy- bzw. Methoxygruppen enthalten (zur Silanisierung einer hydrophilen Oberfläche siehe Kapitel 5.2.2). Eine Kondensationsreaktion zwischen diesen Gruppen und der Hydroxygruppe der Oberfläche führt unter Abspaltung von Alkohol zur kovalenten Anbindung des Silans. Auf der Oberfläche befinden sich nach dieser Reaktion primäre Aminogruppen, an die Proteine angebunden werden können [Kön93], [Niw93]. Eine genaue und einfache Methode die Menge an Aminofunktionen auf der Oberfläche zu quantifizieren, stellt die fluorimetrische Detektion mittels Fluorescamin dar [Loc90]. Dabei wird durch Behandlung der Oberfläche mit Trinatriumphosphat über einen längeren Zeitraum bei erhöhter Temperatur die Silanschicht wieder abgelöst und die entstandene Lösung nach Umsetzung mit Fluorescamin spektroskopisch untersucht. Die damit minimal bestimmbare Menge an Aminosilan wird mit 1–2 nmol/ml angegeben.

Alternativ zu Aminosilanen können Epoxidgruppen (z.B. Glycidoxypropyltrimethoxy-silan), die nach Hydrolyse zu vicinalen Diolen reagieren, verwendet werden. Die Diolgruppierung wird anschließend mit Periodat unter Glycolspaltung zu einem Aldehyd oxidiert, woran das Protein über den N-Terminus angebunden werden kann [Roe83], [Tom95].

Außerdem werden Ankopplungen an den N-Terminus eines Polypeptids mittels Glutardialdehyd als Verbindungsmolekül zwischen aminosilanisierter Oberfläche und der Aminofunktion des Proteins durchgeführt [Nak88], [Mog94], [Maq94]. Das dabei entstehende Imin wird meist noch mit einem Borhydrid (NaBH_4 bzw. NaCNBH_3) zu sekundären Aminen reduziert [Lee78], [Bie94].

Die Anbindung des Proteins über den C-Terminus wird bei Sensoranwendungen, in Analogie zur Peptidchemie, durch ein Carbodiimid erreicht [Yon93]. Dabei wird die endständige Carboxylgruppe mit dem Carbodiimid aktiviert, die nukleophile Aminogruppe greift das Protein unter Bildung eines Amids an [Cho77a].

- **Aktivierung der Hydroxygruppen auf der Oberfläche mit Bromcyan**
Bei dieser Methode werden die OH-Gruppen der Oberfläche mit konzentrierter Natronlauge in Alkoxyionen überführt, die nach Umsetzung mit Bromcyan in hochreaktive Cyansäureester übergehen, welche in der Lage sind, Biomoleküle kovalent zu binden. Eine detailliertere Beschreibung dieser Methode ist in Kapitel 7.1 angegeben.
Um die große Gefährlichkeit von Bromcyan zu umgehen, werden häufig auch andere Reagenzien zur Erzeugung von Carbamaten verwendet. Dazu gehören vor allem Nitrophenyl-, N-Hydroxysuccinimidyl- oder Trichlorphenylchlorformiate, die über eine stabile Carbamatbindung das Protein mit der Oberfläche verknüpfen [Dro82], [Wil82].

- **Anbindung mittels lichtinduzierter Reaktion (Photoimmobilisation)**
Dabei wird eine lichtempfindliche Gruppe an ein Biomolekül gebunden, die nach Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge Radikale oder Carbene erzeugt. Benzophenonderivate eignen sich auf Grund ihrer hohen Quantenausbeute besonders zur Erzeugung von Radikalen (Triplet-Biradikale), die dann leicht wasserstoffabstrahierende Spezies unter Ausbildung einer kovalenten Bindung angreifen. Die so erzeugten Ketylradikale reagieren idealerweise nicht mit der Matrix der Biomoleküle, dem Wasser [Dor84].
Um Carbene zu erzeugen, verwendet man oft Diazirine, die nach Bestrahlung zu den Elektronenmangelverbindungen reagieren. Eine ausführliche Beschreibung erfolgt in Kapitel 7.2.2.
Neben diesen direkten Verfahren zur lichtinduzierten Immobilisation gibt es außerdem die Möglichkeit, photoreaktive Polymere mit einem Biomolekül zu mischen und durch Bestrahlung auszupolymerisieren [Mit94] bzw. durch geeignete Monomerenwahl das abzuschneidende Polymer maßzuschneidern („tailoring“), so daß Ankergruppen für Immobilisationsmethoden entstehen [Gen93].

- **Einbetten des Biomoleküls in eine Sol-Gel-Matrix**
Sol-Gel-Matrices stellen einen neuen Aspekt in der Sensortechnik dar. Die Möglichkeit strukturierte, miniaturisierte Schichten auf nahezu allen Oberflächen abzuschneiden, eröffnet viele neue Wege. Auch in der Biosensorik wird dieses Prinzip oft verwendet, wobei das Biomolekül unspezifisch oder kovalent in die Sol-Gel-Schicht eingebettet wird [Dav94], [Züh95].

- **Kovalente Anbindung von Proteinen an eine Dextranschicht**
Unterschiedliche Modifikationen des Polysaccharids Dextran liefern verschiedene Anbindungsgruppen, u.a. Carboxymethyl- [Min93], Amino- [Gau94] oder Cyanatestergruppen [Arm72], [Sak77]. Diese modifizierten Dextrane werden über die entstandenen funktionellen Gruppen zum einen kovalent an die Oberflächen angebunden, zum anderen dienen sie zur Immobilisation des Biomoleküls.

- **Modifizierung des Kohlenhydratanteils in Antikörpern**

Eine elegante Methode zur Anbindung von Proteinen an eine Oberfläche stellt die Oxidation des Kohlenhydratanteils in den Glycoproteinen dar. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß die im Protein enthaltenen Zucker, die meist in der Gelenkregion des Antikörpers lokalisiert sind [Mel83], nicht an der Immunreaktion teilnehmen und somit durch die Immobilisation keine biologische Information verloren geht. Dabei wird unter milden Bedingungen – enzymatische Oxidation oder Oxidation mit Periodat – ein vicinales Diol in eine Aldehydgruppe überführt [Sha87]. Diese kann mit einem primären Amin, z.B. die mit Aminosilanen behandelte Oberfläche, zu einer Schiffschschen Base reagieren, die dann mit NaCNBH_3 zu sekundären Aminen reduziert wird.

- **Anbindung über Protein A**

Um Antikörper gerichtet auf einer Oberfläche abzuscheiden, bedient man sich der Affinitätseigenschaften von Protein A. Dieses Protein bindet Immunglobuline der Klasse G am Fc-Teil des Moleküls [Har88], so daß die antigenbindenden Stellen des Antikörpers nicht auf der Oberfläche fixiert werden können und diese auch nicht zur Oberfläche hin gerichtet sind. Dazu wird zunächst Protein A mit Hilfe einer beliebigen Immobilisationsprozedur auf der Oberfläche abgeschieden und anschließend mit Antikörpern inkubiert [Pal93], [Bra93], [Mur87].

- **Anbindung über aktivierte Peptidbindungen**

Diese etwas aufwendige Methode kann zur Immobilisation von Proteinen auf Polyethylenoberflächen verwendet werden. Das Polymer wird mit konzentrierter Salpetersäure oxidiert und die entstandene Carboxylgruppe mit Diaminohexan umgesetzt. Die aminofunktionalisierte Oberfläche wird dann mit dem Protein – insbesondere mit Rinderserumalbumin – kovalent über Glutardialdehyd quervernetzt. Die entstandene Proteinschicht wird mit POCl_3 behandelt, wobei ein Carbonsäurederivat entsteht, das direkt mit der Aminofunktion eines Proteins ein Amid ausbilden kann [Ngo80].

- **Polyethylenimin**

In verzweigten Polyethylenimin liegen primäre, sekundäre sowie tertiäre Aminseinheiten vor [Gra91]. Es wird meist mittels Spin-Coating auf eine Oberfläche aufgebracht und haftet darauf über nicht kovalente Kräfte [Pru90]. Die primären Aminogruppierungen werden zur Immobilisation herangezogen, indem mit Glutardialdehyd oder einem Carbodiimid Proteine an ihrer Aminofunktion bzw. Carboxylfunktion gebunden werden.

3.7 Unterschiedliche Verfahren zur Beobachtung einer Immunoreaktion

3.7.1 Etablierte Methodik

Immunologische Untersuchungen werden routinemäßig mit Immunoassays durchgeführt. Darunter versteht man Methoden, die auf der hochspezifischen Schlüssel-Schloß-Bindung zwischen Antikörpern und Antigenen beruhen. Bei dem mittlerweile etablierten Verfahren handelt es sich im allgemeinen um den ELISA-Test („enzyme linked immunoabsorbent assay“), der einen heterogenen, kompetitiven Assay darstellt. Auf Mikrotiterplatten werden Antikörper gegen den gewünschten Analyten im Unterschuß immobilisiert. Das ELISA-Verfahren basiert auf der Konkurrenzreaktion zwischen einem geeignet markierten Enzym und dem eigentlichen Analyten um die Antikörperbindungsstellen. Bei der Enzymmarkierung können verschiedene Prinzipien wie Chemilumineszenz (CIA), Fluoreszenz (FIA) oder photometrische Detektion (EIA) ausgenutzt werden, wobei die Fluoreszenzmarkierung immer mehr an Bedeutung gewinnt. Durch Messung der nach mehreren Waschschritten verbliebenen Fluoreszenz kann dann mit Hilfe einer Kalibrierkurve auf den Analytgehalt geschlossen werden. Der ELISA-Test, der im Falle von Aflatoxinen noch 5 ppt (≈ 15 pmol/l) Analyt nachweisen kann [Bau91], löste in den letzten Jahren die Immunoassays, die auf einer radiologischen Markierung, meist mit ^3H , ^{14}C bzw. den Iodisotopen ^{125}I und ^{131}I , beruhen (RIA, IRMA), ab. Der Nachteil all dieser Immunoassays besteht in der relativ aufwendigen Durchführung, die hohen Personalaufwand erfordert sowie in der notwendigen Markierung der Proteine. Aus diesem Grund ist die Suche nach alternativen Meßmethoden, die markierungsfreie Biomoleküle verwenden, Gegenstand der momentanen Forschung.

3.7.2 Neue Entwicklungen der instrumentellen Analytik

3.7.2.1 Oberflächen Plasmonenresonanz

Ein Methode zur Detektion von Proteinen auf Festkörpern ist die Oberflächen Plasmonenresonanz. Das Meßprinzip bedient sich einer monochromatischen Strahlungsquelle, einem Prisma mit einem Glasträger, dessen Oberfläche metallisiert wird (Sensorchip) sowie einer Detektionseinheit. Ein Lichtstrahl tritt in das Prisma ein und wird an der Oberfläche gebrochen. Einfallendes Licht, das mit einem größeren Winkel als dem „kritischen Winkel“ auf die vergoldete Oberfläche trifft, erzeugt ein evaneszentes Feld, welches in der Metallschicht eine elektromagnetische Oberflächenwelle – ein Oberflächen Plasmon – anregt [Ste91]. Dieser kritische Winkel, der „Surface Plasmon Resonance Angle“ (SPR-Winkel), verschiebt sich in Abhängigkeit von den optischen Eigenschaften des Prismas sowie der metallischen Oberfläche und dem Brechungsindex des flüssigen Mediums, das in Kontakt mit der metallisierten Oberfläche steht. Bei einer Abscheidung von Proteinen auf dem Sensor ändert sich ausschließlich der Brechungsindex an der Phasengrenzfläche und es kommt zu

einer Verschiebung des SPR-Winkels, was als Meßsignal detektiert wird.

Die vergoldete Sensoroberfläche wird mit einem Aliphaten modifiziert und daran ein carboxymethyliertes Dextran kovalent gebunden. Dies ist die Basis für die Immobilisierung von Antikörpern auf der Sensoroberfläche (siehe Kapitel 3.6).

Geräte, die mit Hilfe dieses Meßprinzips arbeiten, sind bereits kommerziell erhältlich. Für Pestizide (Terbutryn) wurde mit dieser analytischen Methode eine Nachweisgrenze von 0.05 ppb (=0.23 nmol/l) erreicht [Min93].

3.7.2.2 Optischer Gitterkoppler

Ein optischer Gitterkoppler besteht im allgemeinen aus einer Strahlungsquelle (He-Ne-Laser) und einem optischen Gitter, das auf $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ Oberflächen aufgebracht ist, sowie einer Detektionseinheit. Beobachtet wird die Änderung des Einkopplungswinkels des Lasers, der sich je nach Brechungsindex auf der Oberfläche ändert. Als effektive Meßgröße wird das Produkt aus Brechungsindex und Schichtdicke ausgewertet, wobei die Variation der Schichtdicke deutlich drastischer ausfällt als die Brechungsindexänderung. Dies bedeutet aber auch, daß verschiedene Spezies wie beispielsweise F(ab)_2 -Fragmente mit dieser Methode nicht direkt detektiert werden können, da die durch sie hervorgerufene Schichtdickenänderung zu klein ist. Auf der Oberfläche des optischen Gitters erfolgt die Immobilisierung der Antikörper bzw. der Antigene. Während der Immunoreaktion kommt es zur Anlagerung des komplementären Proteins, was eine Änderung der o.g. Detektionsgrößen verursacht. Die Nachweisgrenze für Pestizide (Atrazin), gemessen mit dem optischen Gitterkoppler, wird mit $15 \mu\text{g/l}$ (=62.2 nmol/l) angegeben [Bie94]. Die Nachweisgrenze für Prostatakrebsantigene liegt für den optischen Gitterkoppler hingegen um eine Zehnerpotenz niedriger bei 2 nmol/l [Gao95].

3.7.3 Sensoren

Ziel vieler Forschungsrichtungen ist es, die etablierten Immunoassays durch Sensorsysteme zu ersetzen. Allein auf dem Gebiet der akustischen Sensorik, und nur die soll hier kurz erläutert werden, sind neben Oberflächenwellenbauelementen zwei weitere unterschiedliche Meßprinzipien Gegenstand der aktuellen Forschung.

1. Schwingquarze

Die von Sauerbrey 1959 beschriebenen Eigenschaften eines Schwingquarzes [Sau59] gewinnen für die Biosensorik wieder vermehrt an Bedeutung. In Zusammenhang mit der Entwicklung in der Mikrolithographie ist es seit einigen Jahren möglich, preisgünstige, miniaturisierte Module in Massenproduktion herzustellen. Seit einiger Zeit werden Schwingquarze auch in der Flüssigkeitssensorik als Leitfähigkeits- [Sha94], [She93] oder Viskositätsdetektoren [Kur93] und im speziellen auch in der Bioanalytik verwendet [Mur93], [Ple86]. Ein Schwingquarz besteht im allgemeinen aus einem AT-Quarzkristall, der

beidseitig mit Elektroden versehen ist. Dieser kann analog zu den OFW-Bauelementen durch eine hochfrequente Wechselspannung zur Resonanz gebracht werden und als frequenzbestimmendes Glied eines Oszillatorschaltkreises fungieren. Meßgröße ist ebenfalls die Resonanzfrequenz des Oszillators, der die Änderung in der Massenbelegung auf der Oberfläche des Schwingquarzes detektiert. Meist sind die Elektroden auf einem Schwingquarz aus Gold [Abe93], was die Abscheidung von Proteinen wesentlich vereinfacht (siehe Kapitel 3.6). Der Nachteil der Schwingquarze im Vergleich zu den anderen akustischen Sensoren liegt in der niedrigeren Sensitivität. Basierend auf den Ableitungen von Sauerbrey wird ihre Massenempfindlichkeit wie folgt angegeben:

$$\Delta f = -k \cdot f_0^2 \cdot h \cdot \frac{\Delta m}{A} \quad (3.1)$$

k	=	Konstante
f_0	=	Grundfrequenz
h	=	Schichtdicke
Δm	=	Massenbelegung der Oberfläche
A	=	Oberfläche

Der empirisch gefundene Zusammenhang für Schwingquarze aus Gleichung (3.1) zeigt die gleichen Abhängigkeiten wie Gleichung (2.16), die aus störungstheoretischen Überlegungen resultiert. Damit ist eine entscheidende Einflußgröße auf die Signaländerung sowohl bei Schwingquarzen als auch bei OFW-Bauelementen durch die Grundfrequenz des Oszillators gegeben. Schwingquarze können aber nur bis zu einer Arbeitsfrequenz von maximal 25–30 MHz hergestellt werden, da diese Frequenz mit der Dicke des Kristalls korreliert. Je höher die Grundfrequenz, desto dünner muß der Quarzkristall geschnitten werden, wodurch die Substrate immer größere mechanische Instabilität aufweisen.

2. Sensoren auf der Basis akustischer Plattenmoden

Ein akustischer Plattenmodensensor (APM) unterscheidet sich nur unwesentlich von einem OFW-Bauelement. Der Unterschied liegt auf der, den IDT's gegenüberliegenden Seite des piezoelektrischen Substrats. Im Falle der OFW-Bauelemente ist diese Seite aufgeraut, wodurch Reflexionen unterdrückt werden. Im Falle der APM-Sensoren hingegen ist diese poliert, so daß es zu Reflexionen der entstandenen Lamb-Wellen an der Substratoberfläche kommt. Die reflektierten Wellen werden zwischen den beiden Substratoberflächen weiter hin und her gespiegelt, bis sie schließlich zu den Empfängertransducern gelangen, wo sie ausgekoppelt werden. Auf der polierten Seite des piezoelektrischen Materials tritt die Welle geringfügig aus dem Substrat aus und kann, wenn sie dort mit dem Analyten in Kontakt gelangt, mit diesem wechselwirken. Dies bedeutet, daß die empfindlichen Schallwandler nicht in Kontakt mit dem Analyten gelangen, was einen großen Vorteil dieser Sensoren darstellt.

Jedoch wirkt das Bauelement bei dieser Anordnung als dichtendes Element, wodurch das Substrat zusätzlichem mechanischen und thermischen Streß standhalten muß [Rus94]. APM-Sensoren werden bei ähnlichen Frequenzen wie OFW-Bauelemente betrieben. Dies bedeutet, daß neben den eigentlich gewünschten Lamb-Wellen auch eine Oberflächenwelle auf der Transducerseite mit deutlich geringerer Dämpfung als die Lamb-Welle angeregt wird. Dadurch ist es nicht ohne weiteres möglich, APM-Sensoren als frequenzbestimmendes Glied einer Oszillatorschaltung zu betreiben, da der Oszillator durch die Frequenz der Oberflächenwelle bestimmt würde. So muß man, um die Änderung der Nebenmode detektieren zu können, auf eine wesentlich aufwendigere Phasenmessung ausweichen. APM-Sensoren finden bereits in der Flüssigkeitssensorik als Viskositätssensoren [Sat93a] und als Immunosensoren [Dah94] Anwendung.

Eine spezielle Form von APM-Bauelementen stellen die „Flexural Plate Mode“ (FPW)-Sensoren dar. Diese bestehen aus einer sehr dünnen ($2\ \mu\text{m}$) Membran, die entweder mittels Piezoeffekt (Abscheidung von piezoelektrischem ZnO auf der Membran [Whi87]) oder durch elektrostatische Anregung [Gie93] zu antisymmetrischen Schwingungen also Biegeschwingungen („flexural“), angeregt wird. Die Arbeitsfrequenz der FPW-Sensoren liegt bei weitaus niedrigeren Frequenzen (im Bereich 1–5 MHz), wodurch man auf aufwendige Hochfrequenztechnik verzichten kann. Auf Grund einer durch die dünne Membran bedingten höheren spezifischen Empfindlichkeit dieses Sensortyps erreicht man bei diesen Arbeitsfrequenzen ähnliche Werte wie bei OFW-Bauelementen. Der Nachteil besteht jedoch in der mechanischen Instabilität der Membran, die vor allem beim Betrieb in Flüssigkeiten stark belastet wird und entsprechend einen erhöhten mechanischen Rauschanteil bewirkt.

Ein Vergleich der berechneten Massesensitivitäten (definiert als relative OFW-Schallgeschwindigkeitsänderung dividiert durch die Änderung der Massenbelegung pro Flächeneinheit $(\Delta V/V_0)/(\Delta m/A)$ [cm^2/g]) dieser beiden akustischen Sensorensysteme findet man in [Tom95]. Dort wird für FPW-Sensoren in Flüssigkeiten ein Wert von ca. $200\ \text{cm}^2/\text{g}$ und für Schwingquarze von $12\ \text{cm}^2/\text{g}$ angegeben. Der Wert für einen APM-Sensor liegt in der gleichen Größenordnung wie der für Schwingquarze. Die Berechnungen der Massesensitivität für OFW-Bauelementen führen zu $180\ \text{cm}^2/\text{g}$ [Bae92].

Dieser theoretische Vergleich macht deutlich, daß sowohl für FPW- als auch für OFW-Sensoren eine deutlich größere Sensorempfindlichkeit als für Schwingquarze oder APM-Sensoren zu erwarten ist.

Kapitel 4

Experimenteller Teil

4.1 Netzwerkanalysator

Die akustoelektrischen Eigenschaften der Sensoren, d.h. ihre Übertragungscharakteristiken, ändern sich bei Beschichtung bzw. Modifikation der Sensoroberfläche. Schichtdicke, Homogenität sowie Durchhärtung der aufgetragenen Schicht beeinflussen das Transmissionsspektrum des Bauelements. Um Veränderungen im Signalverhalten zu beobachten, wurde ein Netzwerkanalysator der Fa. Hewlett Packard (85046 A) verwendet. Dabei wurde zum einen das Transmissionsspektrum des Oberflächenwellenbauelements ausgewertet und zum anderen die Phasenlage bei einer bestimmten Frequenz beobachtet. Zur näheren Erläuterung sind in Abbildung 4.1 diese beiden Aspekte dargestellt.

Die Oszillatorelektronik arbeitet bei einer konstanten Phase, d.h. die Resonanzfrequenz des Oszillators wird immer auf ein und dieselbe Phasenlage bezogen. Deshalb wurden die Bauelemente am Netzwerkanalysator immer bei dieser Phasenlage untersucht, wobei die Dämpfungsänderung durch Beschichtung beobachtet werden konnte. Ein Meßwert war mit Hilfe dieser Methode bis zu 0.3 dB genau bestimmbar. Durch dieses Vorgehen konnten Beschädigungen an Sensoren vor und nach der Beschichtung erkannt und diese Bauelemente aussortiert werden.

4.1.1 Die verwendeten OFW-Bauelemente

Für diese Arbeit standen mehrere OFW-Bauelemente als Sensoren zur Verfügung, welche in Tabelle 4.1 zusammengestellt und in Abbildung 4.2 gezeigt sind.

Allgemein gilt nach Gleichung (2.16), daß mit zunehmender Grundfrequenz die Empfindlichkeit quadratisch ansteigt. Deshalb sollten Bauelemente mit möglichst hoher Arbeitsfrequenz die größte Attraktivität besitzen. Steigende Arbeitsfrequenz bedingt immer kleinere Abstände zwischen den Interdigitalstrukturen, wodurch es beim Betrieb in Wasser zu einem wachsenden kapazitiven Einfluß der IDT's kommt. Die Änderung der akustischen Sensoreigenschaften beim Wechsel des Betriebs der Bauelemente von Luft nach Wasser ist im Anhang B.1 an Hand von Übertragungskennlinien gezeigt.

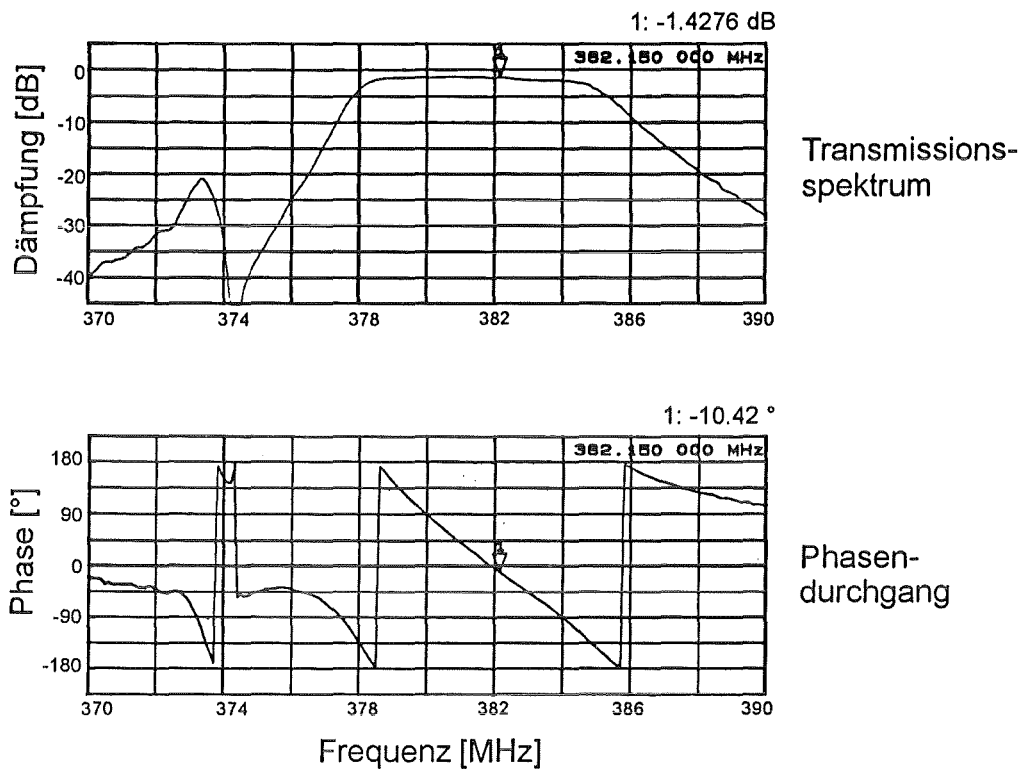
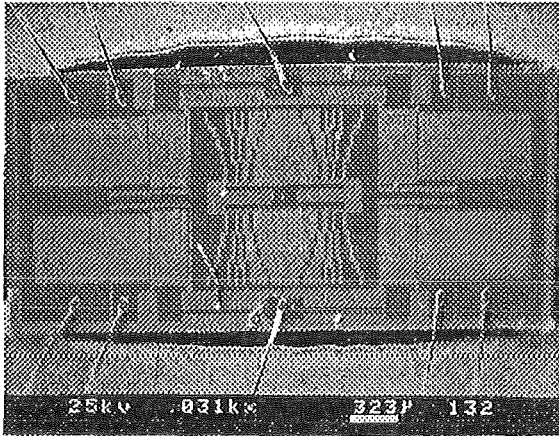


Abbildung 4.1: Übertragungskennlinie eines unbeschichteten 380 MHz OFW-Sensors

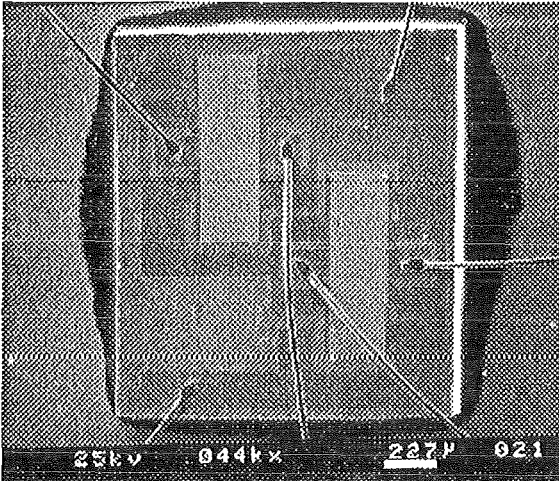
Tabelle 4.1: Zusammenstellung der verwendeten OFW-Bauelemente

Firma	Bautyp	f_0 [MHz]	Dämpfung an Luft [dB]	Dämpfung in Wasser [dB]
Hitachi	HS 158	145	3	6
Murata	SAF 254	254	2	4.5
Murata	SAF 380	380	2	6.5
Siemens	B 4512	454	2.5	13.1
Siemens	B 4514	471	2.5	13.3



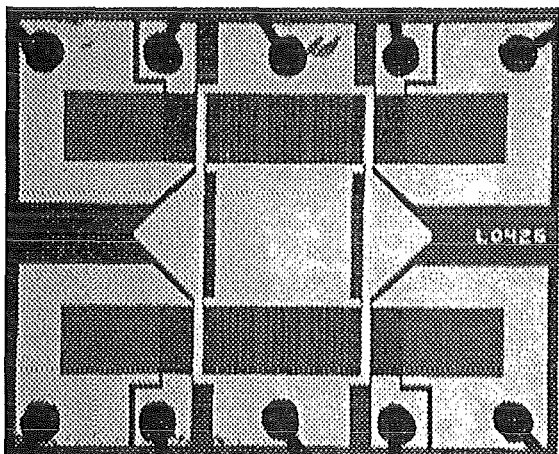
Hitachi 145 MHz

HS 158



Murata 380 MHz

SAF 380



Siemens 454 MHz

B 4512

Abbildung 4.2: Mikroskopische Aufnahmen der verwendeten Oberflächenwellenbauelemente

Bei den oben angeführten akustischen Oberflächenwellenbauelementen handelt es sich ausschließlich um käuflich erworbene Hochfrequenzfilter auf der Basis von 36° -rot Y,X LiTaO₃-Substraten. Die darauf befindlichen Interdigitalstrukturen aus Aluminium erzeugen eine horizontal polarisierte Scherwelle auf der Oberfläche des Substrats. Aluminium als Elektrodenmaterial hat die besten akustischen Eigenschaften bezüglich der Einkopplung des elektrischen Signals in den Oszillator. Durch unterschiedliche Periodizität der Interdigitalstrukturen können verschiedene Arbeitsfrequenzen und somit Filtercharakteristiken erhalten werden. Alle in Tabelle 4.1 angeführten Bauteile werden in der Telekommunikation als miniaturisierte Filtereinheiten verwendet.

4.1.2 Siemens 454 MHz und 471 MHz

Bei den verwendeten Sensoren der Fa. Siemens handelt es sich in beiden Fällen um „Dual Delay Line“-Sensoren. Auf diesen Bauelementen sind zwei Verzögerungsleitungen auf das piezoelektrische Substrat aufgebracht. Diese beiden Bahnen sind durch eine metallisierte Fläche voneinander getrennt. Beim Betrieb in wässrigen Lösungen kommt es jedoch zu einer merklichen Verschlechterung der Transmissionseigenschaften. Die „Dual Delay Line“-Anordnung bewirkt bei diesen Bauelementen auf Grund der größeren Laufstrecken der Oberflächenwelle auf dem Substrat eine größere Einfügedämpfung. Zusätzlich bewirkt der bereits erwähnte kapazitive Einfluß bei solch hohen Arbeitsfrequenzen ebenfalls eine größere Dämpfung.

4.1.3 Hitachi 145 MHz

Diese OFW-Bauelemente der Fa. Hitachi arbeiten bei einer Grundfrequenz von 145 MHz. Es handelt sich dabei ebenfalls um „Dual Delay Line“ Konfigurationen, deren zwei Verzögerungsleitungen elektrisch miteinander verbunden sind. Abbildung 4.2 zeigt die komplizierte Struktur der aufgebrachten Interdigitaltransducer. Die Sensoren wurden auf Grund ihrer niedrigen Arbeitsfrequenz sowie der relativ hohen Dämpfung bei Betrieb in wässrigen Medien nicht für immunologische Untersuchungen eingesetzt. Auch im Falle der 145 MHz-Sensoren ist die Anordnung als Verzögerungsleitung und die damit verbundene größere Laufstrecke der Oberflächenwellen, der Grund für die erhöhten Dämpfungswerte sowohl an Luft als auch in Wasser.

4.1.4 Murata 380 MHz und 254 MHz

Die Bauelemente der Fa. Murata besitzen auf dem piezoelektrischen Kristall je zwei Resonatorstrukturen, die beide frequenzselektierende Wirkung besitzen. Diese beiden Resonatoren sind in Reihe angeordnet, parallel zu ihnen wird zur Impedanzanpassung ein interdigitaler Kondensator geschaltet. Dieser besitzt die gleiche Form wie die IDT's der Resonatoren, ist aber nicht wie diese verschaltet (siehe Abbildung 4.2).

Werden die einzelnen Verdrahtungen auf den Bauelementen gelöst (im folgenden exemplarisch für den 380 MHz-Sensor beschrieben) und anschließend die beiden Resonatoren nacheinander einzeln wieder verdrahtet, so können ihre charakteristischen Transmissionspektren separat betrachtet werden. Für den ersten Resonator ergibt sich ein Maximum im Transmissionspektrum bei etwa 378 MHz. Der zweite Resonator hat zwei Maxima in seiner Übertragungskurve (372 MHz, 382 MHz), die durch Strukturierung der Anregungstransducer zustande kommen; dazwischen liegt ein Minimum bei 378 MHz (=Maximum des ersten Resonators). Der parallel geschaltete interdigitale Kondensator dient zur optimalen Signalanpassung, so daß das Ausgangssignal von Resonator 1 optimal als Eingangssignal von Resonator 2 übergeben werden kann. Daraus resultiert ein Filterband mit geringer Welligkeit im Durchlaßbereich von ca. 14 MHz (siehe Übertragungskennlinien im Anhang B.1). Bei Betrieb in wässrigen Lösungen wird diese Impedanzanpassung gestört, so daß das Transmissionspektrum des zweiten Resonators dominiert. Damit hat das Oberflächenwellenbauelement bedingt durch die Dämpfungseigenschaften zwei alternative Betriebspunkte. Bei welcher Frequenz der Oszillator seinen Arbeitspunkt wählt, hängt von der Phasenlage ab, die durch die Oszillatorelektronik bestimmt wird. Diese ist auf eine optimale Phase von 0° eingestellt und wird durch das OFW-Bauelement im Oszillatorschaltkreis um -10° verschoben.

Die beiden Arbeitsfrequenzen 380 MHz bzw. 254 MHz werden durch unterschiedliche Periodizität der Interdigitalstrukturen erzeugt, die Bauelemente sind aber sonst baugleich. Je enger die Finger im Anregungs- bzw. im Empfängertransducer beieinander liegen, desto höher ist die Arbeitsfrequenz, da die Wellenlänge der angeregten Oberflächenwelle abnimmt.

4.2 Verwendetes biochemisches System

Zur Untersuchung einer Immunoreaktion wurde das biologische System Glucoseoxidase (GOD) und Antikörper gegen dieses Enzym ausgewählt. Dabei sollte wahlweise sowohl das Antigen als auch der Antikörper auf der Sensoroberfläche immobilisiert werden. Es handelt sich bei den Antikörpern um Immunglobuline der Klasse G (IgG), so daß bei Entwicklung eines erfolgreichen Verfahrens dieses auf beliebige Antikörper der Klasse G übertragen werden kann.

Entscheidend für die Wahl von anti-Glucoseoxidase Antikörpern war die Tatsache, daß Glucoseoxidase nach der Immunoreaktion ihre enzymatische Aktivität beibehält. Außerdem kann man Glucoseoxidase auch in sehr kleinen Mengen durch verschiedene analytische Verfahren noch hinreichend genau bestimmen.

Für die kovalente Anbindung von Antikörpermolekülen der Klasse IgG gibt es eine Vielzahl von Literaturstellen, die für die Immobilisationsproblematik herangezogen werden konnten.

4.2.1 Glucoseoxidase

Glucoseoxidase oxidiert enzymatisch β -D-Glucose unter Sauerstoffverbrauch zu Glucosäure und Wasserstoffperoxid (siehe Abbildung 4.3).

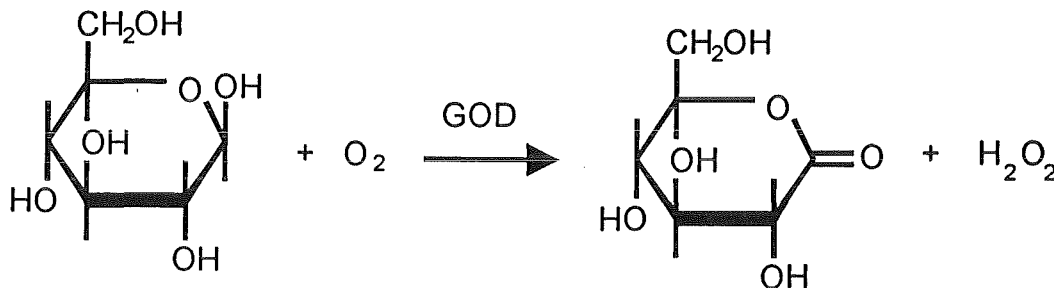


Abbildung 4.3: Enzymatische Wirkung von Glucoseoxidase

4.2.1.1 Struktur von Glucoseoxidase

Es handelt sich bei GOD um ein Glycoprotein mit Flavinanteil. Es liegt meist als Dimer vor und enthält je Untereinheit ein Flavinadeninindinukleotidmolekül (FAD), das als Coenzym fungiert.

Der Extinktionskoeffizient einer Lösung aus 1 mg/ml Protein bei 280 nm beträgt 1.8 (1 cm Weglänge). Der isoelektrische Punkt liegt bei 4.5; das Molekulargewicht beträgt 186000 g/mol [Fou90]. In Abbildung 4.4 ist das Absorptionsspektrum einer Glucoseoxidaselösung (1.32 mg/ml in PBS) im Wellenlängenbereich von 250–500 nm angegeben. Neben dem bereits erwähnten Proteinpeak bei 280 nm sind die beiden Flavinpeaks bei 375 nm bzw. 450 nm zu erkennen, die auch für die gelbe Farbe des Proteins verantwortlich sind.

Strukturuntersuchungen an Glucoseoxidase zeigen, daß das Coenzym fest an das Protein gebunden, aber nicht kovalent mit ihm verknüpft ist. FAD ist verantwortlich für die Redoxvorgänge der Glucoseoxidation. Im allgemeinen kann der Isoalloxazinring des FAD's beliebig ein Elektron (Reduktion zur Semichinonform) oder zwei Elektronen (Reduktion zur Hydrochinonform) aufnehmen und dann die reduzierte Form FADH_2 bilden. Bei Glucoseoxidase wird die Semichinonform als Zwischenprodukt nicht ausgebildet; es handelt sich um einen Zweielektronenprozeß [Dix79]. Soll das Enzym seine katalytischen Eigenschaften beibehalten, so muß das FADH_2 wieder in FAD überführt werden. Das Substrat reduziert FAD vollständig, d.h. ohne Ausbildung eines radikalischen Zwischenprodukts, zu FADH_2 , welches durch den Akzeptor wieder in die oxidierte Form überführt wird. Verliert Glucoseoxidase seine enzymatische Aktivität, so ist das meist die Folge der Abspaltung der FAD-Moleküle. Prosthetische Gruppen wie FAD sind oft nicht allzu fest an das Enzym gebunden, so daß die Gruppe das Apoenzym verlassen kann und durch Zusatz von FAD wieder das Holoenzym entsteht [Voe92].

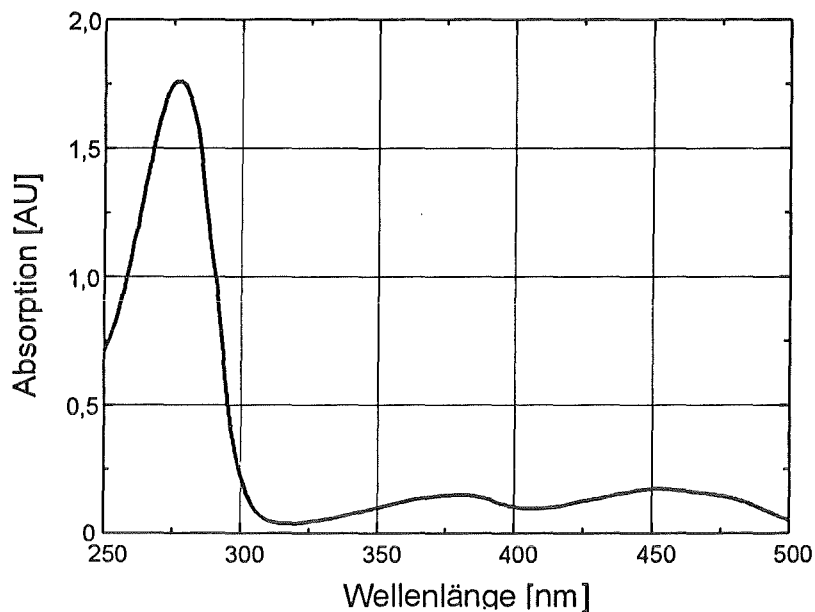


Abbildung 4.4: Absorptionsspektrum von Glucoseoxidase (1.32 mg/ml in PBS)

Lyophilisiert kann Glucoseoxidase bei 0°C mehrere Jahre ohne Verlust der enzymatischen Aktivität gelagert werden.

4.2.1.2 Analysemethoden für Glucoseoxidase

Zur Detektion der Glucoseoxidase können verschiedene analytische Verfahren herangezogen werden:

- Sauerstoffverbrauch
Mit einer Sauerstoffelektrode nach Clark wird elektrochemisch der Verbrauch von Sauerstoff durch die enzymatisch katalysierte Reaktion gemessen. Aus der Reaktionsgeschwindigkeit kann auf die vorhandene Menge an Katalysator geschlossen werden [Kak94], [Sch91].
- Detektion von Wasserstoffperoxid
 H_2O_2 kann amperometrisch mit Hilfe einer gesättigten Kalomelektrode nachgewiesen werden [Ngo80], [Kak94]. Dabei ist zu beachten, daß Glucoseoxidase oft noch Verunreinigungen von Katalase enthält, einem Enzym, das Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff disproportioniert [Sch91], [Cho77b].

- Bestimmung der Enzymmenge mit photochemischen Methoden
Diese Art der Detektion wurde zur Bestimmung der abgeschiedenen Menge an Glucoseoxidase auf Oberflächenwellenbauelementen bzw. zur Überprüfung der enzymatischen Restaktivität nach chemischen Modifikationen an dem Enzym verwendet. Aus dem Nebenprodukt der Glucoseoxidation, dem Wasserstoffperoxid, und einem Phenolderivat sowie einem Phenazon wird in Anwesenheit von Peroxidase durch oxidative, enzymatische Kopplung ein roter Farbstoff erzeugt, was durch eine Absorptionszunahme bei 520 nm beobachtet werden kann [Fou90]. Die Bestimmung der Glucoseoxidaseaktivität kann dann mit der Enzymaktivität einer Kalibrierlösung verglichen und somit Rückschlüsse auf den ursprünglichen Gehalt an Glucoseoxidase gezogen werden.

4.3 Meßaufbau

4.3.1 Aufbau der Durchflußapparatur

Der apparative Aufbau der Fluidik ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Die Sensoren wurden zur Abschirmung der Hochfrequenz und damit zur Vermeidung eines Übersprechens in einen Meßadapter aus Aluminium eingebaut, der mit Tefloneinsätzen versehen ist. Die Tefloneinsätze besaßen ein Volumen von 80 μl sowie zwei Rohrstutzen mit 0.5 mm Innendurchmesser, die über ein Verbindungsstück aus Silikon-schlauch mit Teflonschläuchen verbunden waren. Der Innendurchmesser der Teflonschläuche betrug 0.7 mm. Die Analyt- bzw. die Spüllösungen wurden mit Hilfe einer Zahnradpumpe der Fa. Ismatec (SA MV-Z) aus den Vorratsgefäßen gezogen und über die Sensoren gedrückt. Von dort gelangte der Flüssigkeitsstrom über einen Durchflußmesser in das Abwasser. Die zu analysierenden Lösungen konnten aus den Vorratsbehältern über ein 4-Wege-Ventil (Latek TMV), das an eine parallele Schnittstelle des Meßrechners angeschlossen und darüber steuerbar war, wahlweise zudosiert werden. Dieses Mehrwegeventil enthielt einen Steuerkopf aus Teflon mit 0.5 mm Innenbohrungen für die Flüssigkeitsströme. Durch dieses Fluidiksystem war es möglich, während der Beprobung der Sensoren mit einem Analyten die Zuleitung des zweiten Vorratsgefäßes mit Hilfe einer Schlauchquetschpumpe (Ismatec MC-MS CA 4/8) zu reinigen.

Mit Hilfe eines Konduktometers (WTW LF 539) konnten die Leitfähigkeiten der verschiedenen Analytlösungen auf 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ genau bestimmt werden.

4.3.2 Anordnung der Frequenzmeßanlage

Die Hochfrequenzmeßanlage ist in Abbildung 4.6 gezeigt. Die Aluminiumadapter mit den OFW-Sensoren wurden über feste SMA-Anschlüsse mit der Oszillatorelektronik verbunden. Diese Oszillatorelektronik bestand aus dem passiven Bauteil, dem Oberflächenwellenbauelement und einem aktiven Bauteil, einem Hochfrequenzverstärker. Letzterer arbeitete mit einer Betriebsspannung von 6 V bei einer Strom-

aufnahme von 200 mA und konnte maximal eine Dämpfung von 24 dB ausgleichen. Die Oszillatorfrequenz wurde über einen internen Meßverstärker aus der Meßelektronik herausgeführt.

In der Frequenzmeßanlage waren 4 Elektroniken mit je zwei Anschlüssen für OFW-Sensoren eingebaut, so daß bis zu 8 Bauelemente gleichzeitig untersucht werden konnten. Die Phasenlage der Elektronik war auf 0° eingestellt, die durch das passive Bauelemente auf -10° verschoben wurde. Alle Oszillationselektroniken hatten 3 SMA-Ausgänge, jeweils zwei Hochfrequenzkanäle um die Resonanzfrequenz zu detektieren und einen dritten, der die Differenzfrequenz der beiden Sensoren durch Mischen und Filtern ausgab. Die Hochfrequenzausgänge waren mit einem Scanner (Philips PM 2327) verbunden, der nacheinander maximal 8 Kanäle auf einen Ausgang legte. Dieses Signal wurde von einem Hochfrequenzzähler (Philips PM 6680) gezählt, der, wie der Scanner, über eine GPIB-Schnittstellenkarte (National Instruments GPIB-PCII/IIA) mit dem Meßrechner verbunden war. Eine solche Karte ermöglicht die Datenerfassung sowie die Steuerung der Meßgeräte. Bei der Software handelte es sich um ein selbstgeschriebenes Meßprogramm, das mit Hilfe des Programmpakets LabWindows (Test Team Plus DM 120086) erstellt wurde. Die Daten wurden auf dem Bildschirm ausgegeben und gleichzeitig in Form von ASCII-Daten in einer Datei abgespeichert. Die entstandene Datei konnte anschließend mit handelsüblichen Auswertprogrammen analysiert werden.

Die Vorteile der Scannerlösung lagen vor allem in der Kostenfrage. Mit dieser Variante war es möglich 8 Meßsignale mit nur einem Hochfrequenzzähler sequentiell so schnell zu verfolgen und zu analysieren, daß quasi eine parallele Auswertung der Sensorsignale vorlag. Durch die Aufzeichnung der Hochfrequenzen standen mehr Informationen zur Verfügung (Richtung des Signals, keine Temperaturkompensation u.ä.) als bei der Detektion von Mischfrequenzen.

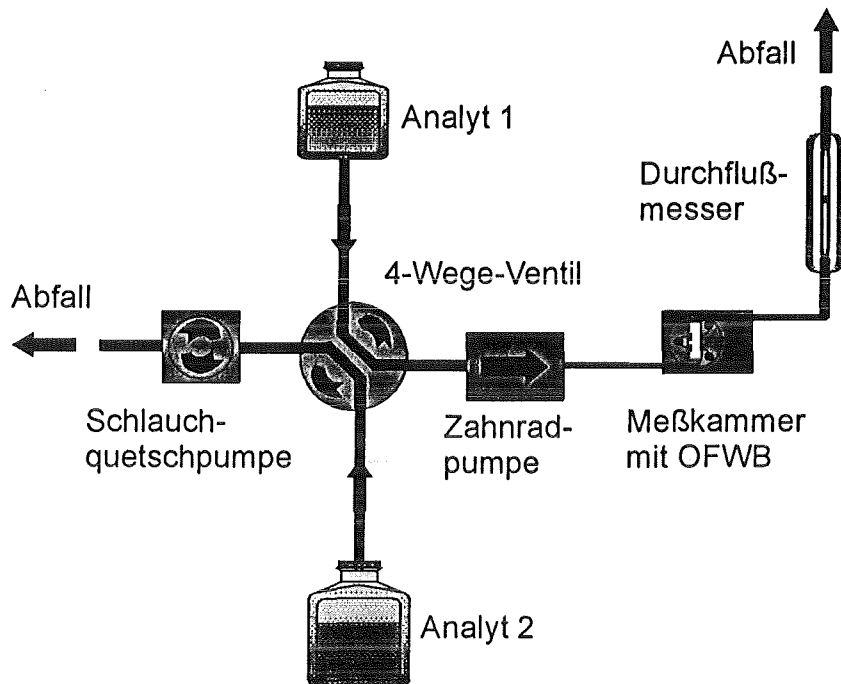


Abbildung 4.5: Meßaufbau zur Detektion der Immunreaktion mit einer Durchflußanordnung

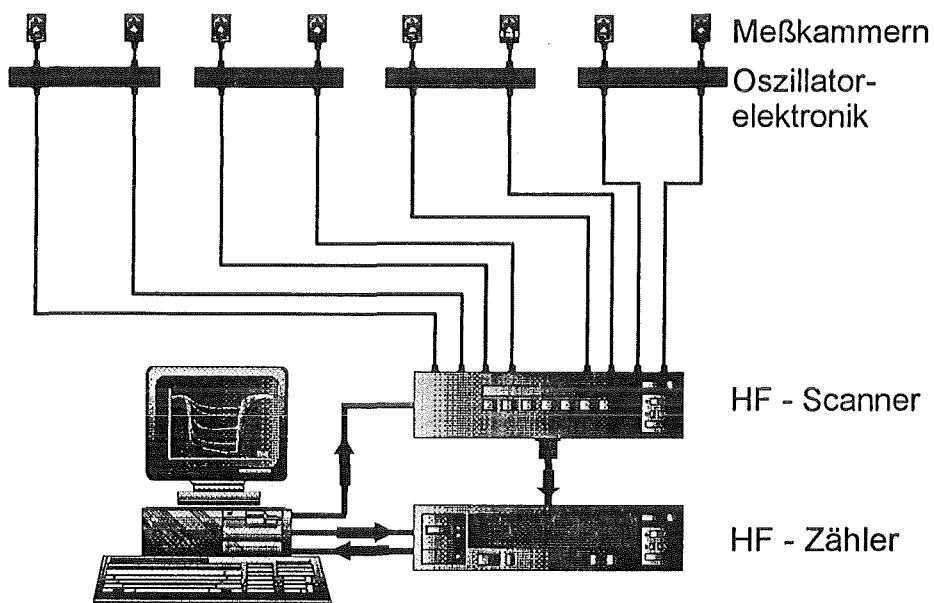


Abbildung 4.6: Hochfrequenzmeßanlage zur Detektion der Resonanzfrequenz von maximal 8 Bauelementen

Kapitel 5

Schutzbeschichtung

Die in Kapitel 3.6 aufgeführten Immobilisationsmöglichkeiten erfordern fast ausschließlich chemische Bedingungen, denen die Interdigitaltransducer nicht standhalten. Die Elektroden auf dem OFW-Bauelement sind zwar mit einer Aluminiumoxidschicht überzogen, diese ist jedoch nicht dicht genug, um das Metall vor Auflösungserscheinungen zu schützen und es konnten daher bereits in wässrigen Lösungen Korrosionsphänomene beobachtet werden.

Da als Meßmedium für immunochemische Reaktionen im allgemeinen Phosphatpuffer mit pH 6.8 bis 7.4 verwendet werden, ist es notwendig, die Interdigitaltransducer chemisch zu schützen, um Beschädigungen an den Interdigitalstrukturen zu vermeiden.

5.1 Passivierungsversuche

Zur chemischen Passivierung der Aluminiumstrukturen wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Um zu beurteilen, ob eine Schutzbeschichtung erfolgreich war, wurde der Sensor zunächst unter dem Mikroskop mit 0.1 M Salzsäure behandelt; trat keine optische Veränderung auf, wurde der Sensor in den Oszillatorschaltkreis eingebaut und sein sensorisches Verhalten bestimmt. Hält ein Sensor der Beprobung mit Säure stand, so sollte es möglich sein, die geschützte Oberfläche als Basis für die Mehrzahl der in Kapitel 3.6 beschriebenen Immobilisationsmethoden zu verwenden. Zum anderen wäre dann eine Regeneration der Oberfläche denkbar: Salzsäure in dieser Konzentration denaturiert Proteine durch Änderung der Ionisierung der Aminosäuren (siehe Kapitel 3.4). Dadurch kommt es zur Veränderung der Ladungsverteilung im Molekül und somit zur Änderung der elektrostatischen Verhältnisse, was zur Auffaltung der Proteinstuktur führt [Voe92].

Für alle Passivierungsversuche wurden 380 MHz-Bauelemente der Fa. Murata verwendet.

Im folgenden sind einige Versuche zur Schutzbeschichtung von OFW-Bauelementen aufgeführt:

- Einsatz von oxidierenden Säuren
Zur Verstärkung der Aluminiumoxidschicht wurde ein Sensor mit Salpetersäure behandelt. Dabei wurde die Konzentration der Säure und die Inkubationszeit variiert. Der Sensor zeigte mikroskopisch keinerlei Veränderungen, allerdings müssen sich bei der Prozedur die akustischen Eigenschaften des Sensors verändert haben, da nach der Behandlung kein Transmissionspektrum von dem OFW-Bauelement mehr aufgezeichnet werden konnte.
- Sputtern von Siliziumdioxid
Eine SiO_2 -Schicht hat neben ihrer chemischen Inertheit noch den Vorteil, daß die Dichte der OH-Gruppen, die Ankergruppen für einen Großteil von Immobilisationsprozeduren sind, auf dem Sensor wesentlich erhöht wird.
Die Sensoren wurden am Institut für Radiochemie in der Gruppe von Herrn Bruns mit Hilfe einer Hochfrequenz Sputteranlage beschichtet (13.56 MHz). Bei dem Targetmaterial handelte es sich um hochreines Siliziumdioxid mit einem SiO_2 -Gehalt größer 99.99 %. Durch Zumischen von 10 Vol-% Sauerstoff zum Argonplasma wird ein Abscheiden unterstöchiometrischer Schichten, wie sie beim Sputtern von oxidischen Materialien entstehen, vermieden. Um zu dichten Schichten zu gelangen, wurde mit einer geringen Abscheiderate von 0.8 nm/min gearbeitet. Die Beschichtungsdicke wurde mit Hilfe eines Schwingquarzes zu 74 nm SiO_2 bestimmt.
Die Sensoren zeigten nach der Beschichtung fast unveränderte akustische Eigenschaften, bei der Behandlung mit Säure konnte aber sofort Wasserstoffentwicklung festgestellt werden. Die hergestellten Schichten waren damit nicht dicht genug, um den Angriff von Säure zu unterdrücken bzw. zu verzögern. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich die schlechte Kantenüberdeckung der Transducer.
- Sputtern von Siliziumnitrid Si_3N_4
Mittels eines speziellen CVD-Verfahrens wurde am Fraunhofer Institut für Biotechnologie in St. Ingbert Si_3N_4 auf OFW-Bauelementen abgeschieden. Durch die „Mixed Frequency Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition“ (PECVD)-Technik ist es möglich, extrem spannungsarme Si_3N_4 -Schichten auf beliebigen Substratmaterialien abzuschneiden. Si_3N_4 wird aus Silan SiH_4 und Ammoniak aus dem Plasma gebildet. Die Besonderheit dieses Verfahrens ist das ständige Umschalten der Plasmafrequenz zwischen 13.56 MHz und 187 kHz. Durch die hohe Frequenz entstehen jeweils Si_3N_4 -Schichten, die eine sehr niedrige Druckspannung aufweisen, niedrige Frequenzen bewirken hingegen eine hohe Zugspannung der entstandenen Schichten. Die abgeschiedene Menge wurde ebenfalls mit einem Schwingquarz kontrolliert, wobei eine Schichtdicke von 51 nm bzw. 94 nm bestimmt wurde.

Die so beschichteten Sensoren zeigten bei der Behandlung mit Salzsäure ebenfalls sofort Wasserstoffentwicklung, wobei sich die Transducer auflösten. Dieses Verhalten liegt wahrscheinlich in Inhomogenitäten der abgeschiedenen Schichten begründet.

5.2 Polyimidisierung

Eine aus der Halbleitertechnologie und anderen Sensoranwendungen [Sat93b] bekannte Methode der Passivierung ist die Behandlung von Wafern mit Polyimid. Dieses Polymer zeichnet sich durch seine hohe chemische Resistenz sowohl gegen Säuren als auch gegen Laugen aus. Mit Polyimid können einfach dünne (bis zu ca. 50 nm), homogene Schutzschichten auf hydrophile Oberflächen aufgebracht werden.

Die Passivierung der Sensoroberfläche mit Polyimid erwies sich als geeignet für die Schutzbeschichtung von OFW-Bauelementen und wird deshalb im folgenden genauer erklärt.

5.2.1 Chemie der Polyimidisierung

Ein Polyimid entsteht aus einem organischen Säuredianhydrid und einem Diamin. Die beiden Monomere reagieren bereits bei Raumtemperatur unter Ausbildung einer Polyamidcarbonsäure zu einem langkettigen Polyaddukt als Zwischenstufe der Polyimidbildung. Bei der Schutzbeschichtung von OFW-Bauelementen wurde ein aromatisches Polyimid verwendet, wobei die Vorstufe, ein braunes Polyaddukt, käuflich erhältlich ist und aus den Monomeren 3,3',4,4'-Biphenyltetracarbonsäuredianhydrid und p-Phenyldiamin besteht. Wird das Polyaddukt bei 200°C getempert, so kommt es unter Wasserabspaltung zur Ausbildung der Polyimidstruktur. Abbildung 5.1 zeigt den Reaktionsverlauf von der Monomermischung bis zur Ausbildung des Polyimids.

Um das Polyimid mit der Sensoroberfläche kovalent zu verknüpfen, wurde vor der Beschichtung mit dem Polymer zunächst eine Silanschicht aufgebracht. Das hierfür verwendete Silan enthält Ethoxygruppen, welche als gute Abgangsgruppen bei der Substitutionsreaktion des Silans mit den OH-Gruppen der hydrophilen Sensoroberfläche fungieren. Außerdem besitzt das Silan eine endständige Aminofunktion, die aus sterischen Gründen idealerweise über eine Propylgruppe angebunden ist. Das bei solchen Anwendungen üblicherweise verwendete Aminopropyltriethoxysilan (APTES) kann jedoch durch seine drei Ethoxygruppen auf der Oberfläche quervernetzen. Um dies zu vermeiden, kann alternativ Dimethylaminopropylethoxysilan verwendet werden, was zu einer monomolekularen Schicht auf der Oberfläche führt. In beiden Fällen ist das Ergebnis der Silanisierung eine Funktionalisierung der Oberfläche mit endständigen Aminogruppen. Auf diese Silanschicht wird nun das Polyaddukt gegeben und getempert. Während der Polymerisation kommt es dann neben der Polyimidisierung zu einer Konkurrenzreaktion, indem die

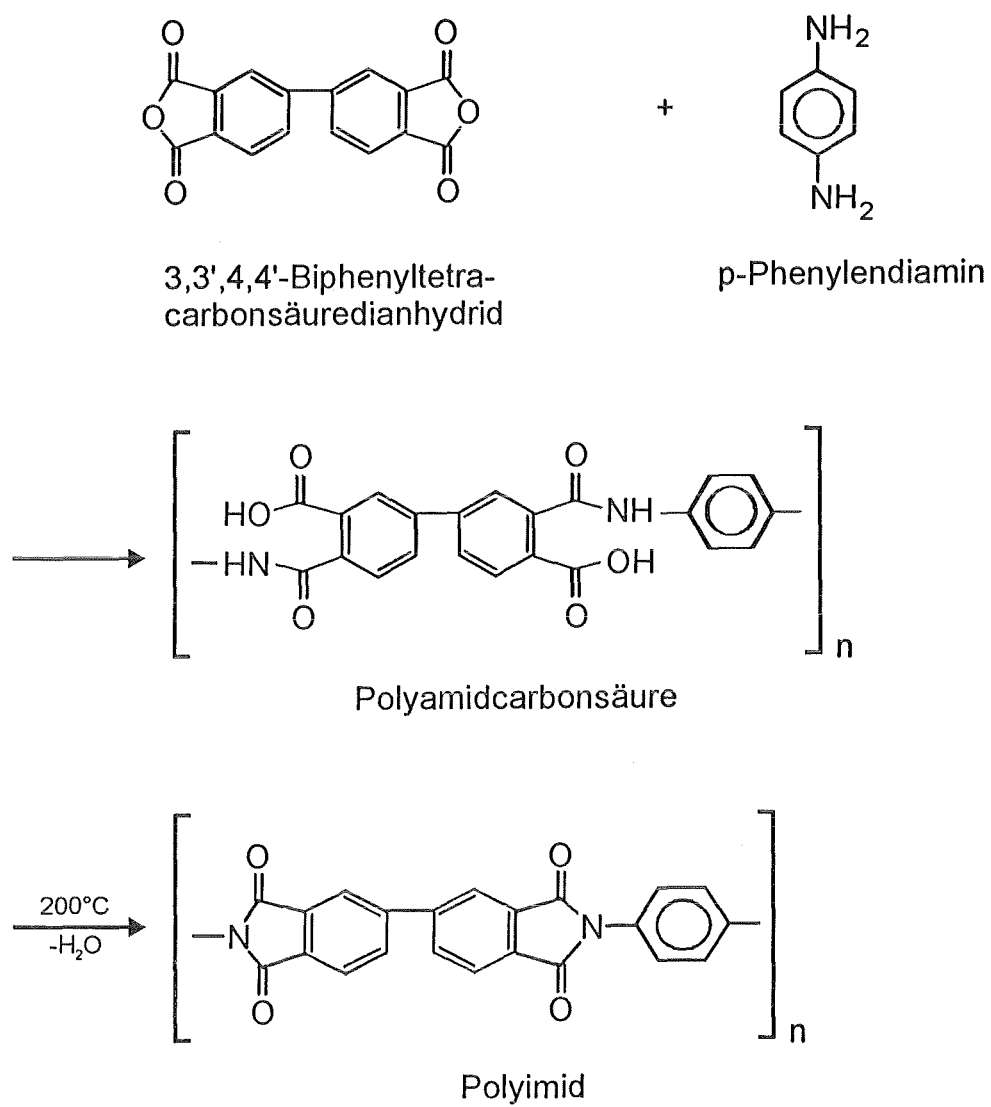


Abbildung 5.1: Reaktionsschema zur Ausbildung eines Polyimids

Aminogruppen der silanisierten Sensoroberfläche ebenfalls mit dem Polymer eine Imidfunktion ausbilden (siehe Abbildung 5.2) und auf diese Weise die kovalente Anbindung an die Trägeroberfläche gewährleisten.

5.2.2 Durchführung

1. Waschen der Sensoren

Die Sensoren wurden mit 50 μl Aceton bedeckt und anschließend das Lösungsmittel bei 2000 U/min 10 s lang abgeschleudert.

2. Silanisierung

Die Spin-Coating-Parameter zur Beschichtung von hydrophilen Oberflächen mit dem Promotor Aminopropyl-triethoxysilan wurden von der Fa. DuPont angegeben [Dup93]. Für das Dimethyl-aminopropyl-ethoxysilan wurden diese Parameter übernommen.

(a) Ansetzen des Silanisierungsreagens

5 μl Silan p.a. (Aminopropyl-triethoxysilan oder Dimethyl-aminopropyl-ethoxysilan) wurden mit 9.5 ml Methanol p.a. und 500 μl bidestilliertem Wasser gemischt und 15 Minuten gerührt. Die angesetzte Lösung wurde 12 h bei Raumtemperatur stehen gelassen.

(b) Beschichtung des OFW-Bauelements

Der Sensor wurde für 30 s mit 50 μl der Silanlösung beschichtet und anschließend wurde der Promotor bei 3000 U/min 30 s lang abgeschleudert.

3. Polymerkonzentration

Bei der Beschichtung von OFW-Bauelementen mit Polymer ist es einerseits notwendig, eine genügend hohe Polyadduktkonzentration zu wählen, um damit eine homogene Schicht zu erzielen, was für die chemische Resistenz maßgebend ist. Zum anderen ist es aber nicht möglich eine beliebig große Konzentration auf den Sensor aufzubringen, da ab einer gewissen Schichtdicke die Oberflächenwelle komplett gedämpft wird.

In der Literatur wird als geeignetes Lösungsmittel für Polyimid sowie die Monomeren N-Methylpyrrolidon angegeben [Yam89]. Als optimale Polymerkonzentration wurden 0.65 g/ml bestimmt.

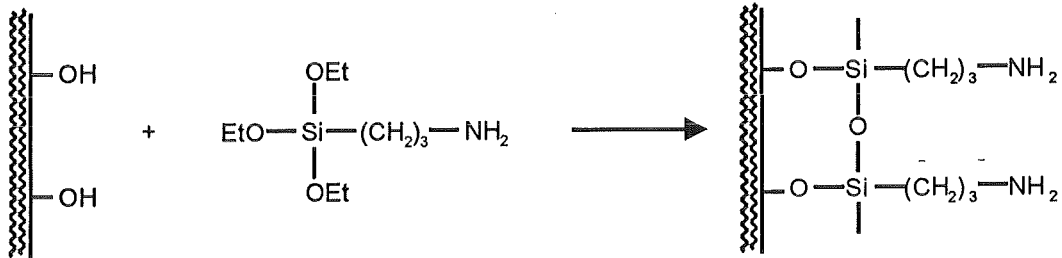
4. Aufbringen des Polymers

50 μl der verdünnten Polymermischung wurden auf den Sensor pipettiert und nach einer Einwirkzeit von 70 s abgeschleudert. Die Schleuderzeit betrug 30 s bei 5000 U/min.

5. Tempern

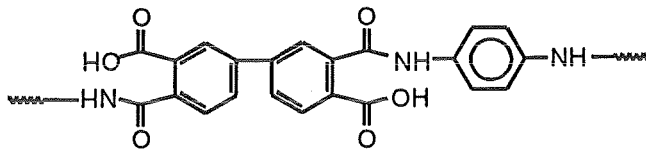
Der beschichtete Sensor wurde in einen nicht vorgewärmten Temperofen gebracht und von Raumtemperatur auf 200°C erhitzt. Das Bauelement wurde

Silanisierung der hydrophilen Oberfläche



Aminopropyl-triethoxy-Silan (APTES)

Zugabe des Vorpolymerisats



Temperschritt (200°C)

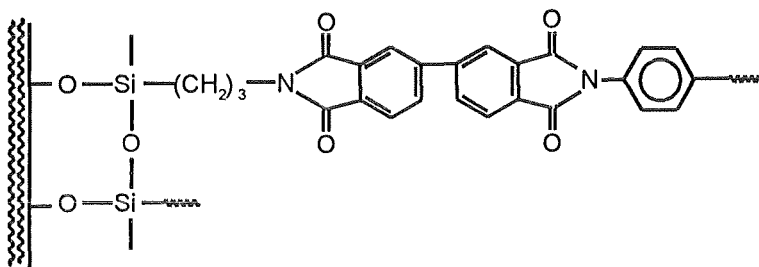


Abbildung 5.2: Kovalente Anbindung an hydrophile Oberflächen mit Hilfe einer dünnen Silanschicht

30 min bei dieser Temperatur im Ofen belassen, um das aufgebraute Polyaddukt in das gewünschte Polyimid umzuwandeln. Danach wurde für weitere 30 min die Temperatur auf 350°C erhöht, um das bei der Reaktion entstandene Wasser aus der Polymermatrix abzdampfen sowie die eventuell im Polymer eingeschlossenen Lösungsmittelmoleküle zu entfernen. Bei dem Temperprozeß wurden alle Pins der Bauelemente geerdet, um elektrischen Entladungen, die bei pyroelektrischen Substraten wie LiTaO_3 auftreten können [Pop92], vorzubeugen. Es kommt dann zur Gasentladung an den Kammelektroden und gegebenenfalls zu deren Beschädigung. Die Folge solcher Entladungen wäre eine Zerstörung der Interdigitaltransducer über die die Ladungen bei fehlender Erdung nicht abfließen können. Nach dem Tempern wurde der beschichtete Sensor langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

5.2.3 Dämpfungänderung bei der Schutzbeschichtung

Um die Beschichtung der Sensoren mit Polyimid zu kontrollieren, wurde die Änderung der akustischen und elektronischen Eigenschaften am Netzwerkanalysator verfolgt. Dazu wurde (wie in Kapitel 4.1 beschrieben) die Dämpfung bei einer durch die Oszillatorelektronik vorgegebenen Phasenverschiebung von -10° bestimmt. Nach jedem Beschichtungsschritt konnten an Hand einer Durchlaßkurve sowie dem zugehörigen Phasenverhalten des Sensors die einzelnen Stufen der Prozedur beobachtet werden (siehe Anhang B.2). Abbildung 5.3 zeigt den Verlauf der Dämpfung nach den einzelnen Beschichtungsschritten. Man erkennt, daß die Dämpfung des Bauteils durch die Silanisierung nicht verändert wird. Die Unterschiede zwischen einem unbeschichteten und einem silanisierten Sensor liegen im Bereich des Meßfehlers des Netzwerkanalysators (siehe Kapitel 4.1). Bringt man das Polyaddukt auf den Sensor, steigt die Dämpfung deutlich auf 6–7 dB an, was durch die hohe Viskosität des Polymers zu erklären ist. Nach dem Tempern sinkt der dB-Wert erwartungsgemäß auf ca. 2–3 dB, da der Aggregatwechsel flüssig/fest eine Änderung der akustischen Eigenschaften der Polymerschicht bedingt.

Die Beschichtung mit Polyimid konnte mit einer hohen Reproduzierbarkeit wiederholt werden. In der Regel kam es nur bei ca. 1–2 % der polyimidbeschichteten Sensoren zu einer Abweichung von den obengenannten 2.89 dB.

5.2.4 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie stellt eine schnelle Methode dar, die Homogenität der aufgebrauchten Polymerbeschichtungen zu beurteilen. Abbildung 5.4 oben zeigt einen 6300-fach vergrößerten Ausschnitt der unbeschichteten Interdigitalstrukturen, bei dem man leichte, herstellungsbedingte Unebenheiten an den Kanten der Elektroden erkennt. Das untere Foto zeigt einen entsprechenden Ausschnitt (8900-fach vergrößert) eines polyimidisierten Sensors. Die unebenen Elektrodenkanten erscheinen nach der Beschichtung geglättet; außerdem erkennt man deutlich die große Homogenität der Beschichtung.

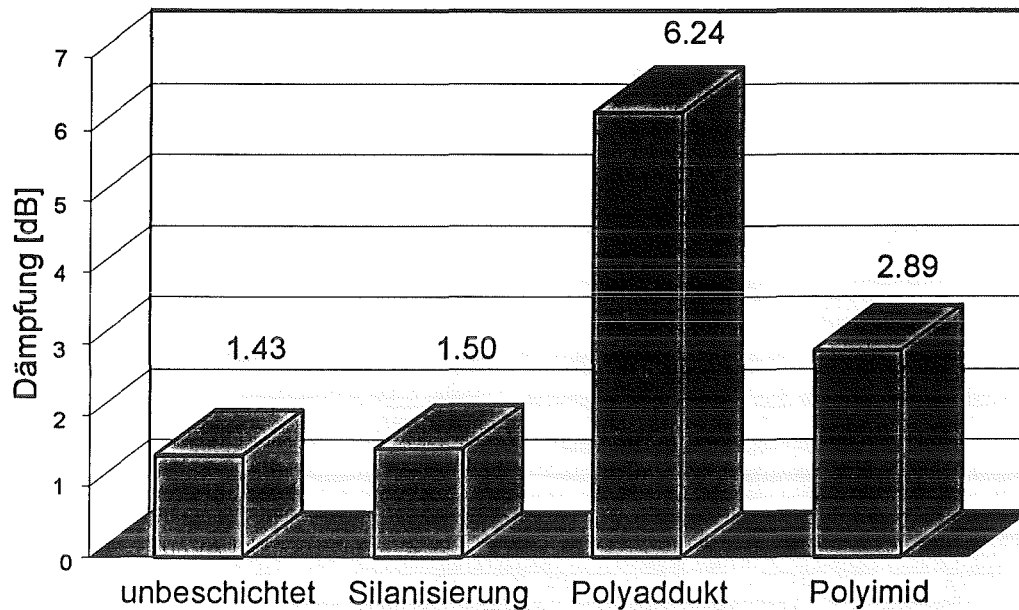
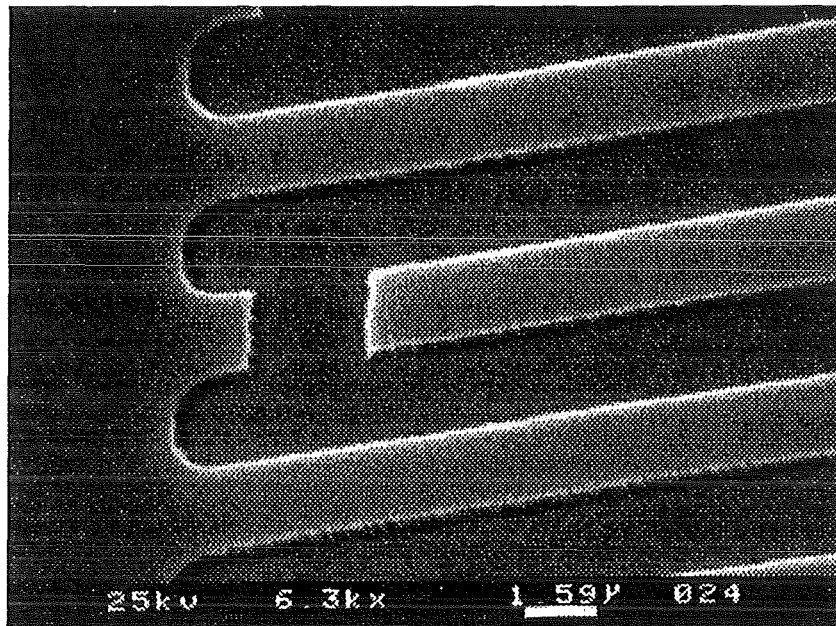


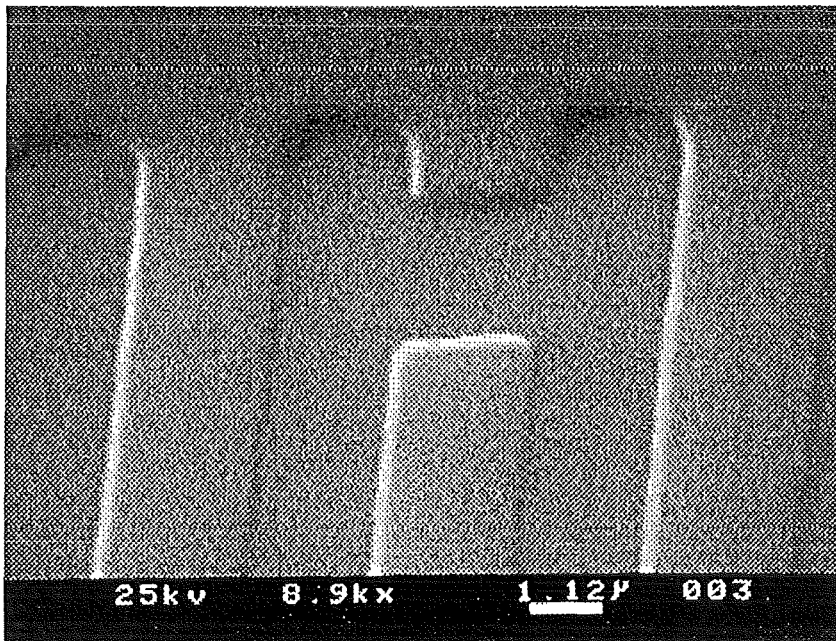
Abbildung 5.3: Dämpfung nach den einzelnen Beschichtungsschritten der Polyimidisierung

5.2.5 Chemische Resistenz der Schutzbeschichtung

Zur Untersuchung der chemischen Stabilität durch die aufgebraute Schutzschicht wurden die Sensoren mit 0.1 M Salzsäure beprobt (siehe Kapitel 5.1). Nachdem unter dem Mikroskop keinerlei Gasentwicklung bzw. Beschädigung der Interdigitaltransducer festzustellen war, wurde der Sensor in den Oszillatorschaltkreis eingebaut und mit Phosphatpuffer ($\sigma=3.1$ mS/cm) gespült, bis sich eine konstante Resonanzfrequenz einstellte. Bei der Beprobung mit Rinderserumalbumin konnte die erwartete Signaländerung, die durch unspezifisch abgeschiedenes Protein verursacht wird (siehe Kapitel 6.1), beobachtet werden (siehe Abbildung 5.5). Anschließend wurde der Sensor mit 7.5 mM ($\sigma=2.9$ mS/cm) Salzsäure behandelt. Diese Salzsäurekonzentration wurde auf Grund der Leitfähigkeitsabhängigkeit des Sensorsignals gewählt. Bei gleicher Leitfähigkeit von Puffer und Salzsäure sollten die elektrischen Einflüsse vernachlässigbar sein. Aus Abbildung 5.5 ist zu erkennen, daß bei Beprobung mit 7.5 mM HCl die Frequenz wieder ansteigt, was mit dem Ablösen des unspezifisch gebundenen Rinderserumalbumins erklärt werden kann. Die Resonanzfrequenz erreicht die Basislinie des Puffers nicht ganz, da die kleinere Leitfähigkeit der Salzsäure eine andere, nach unten verschobene Basislinie bedingt. Die polyimidisierten Sensoren hielten auch einer Beprobung mit 0.1 M Salzsäure stand. Das Sensorsignal wird dabei aber ausschließlich von der großen Leitfähigkeitsänderung, die durch die Salzsäure ($\sigma=38$ mS/cm) hervorgerufen wird, bestimmt. Bei einer wiederholten Abscheidung von Rinderserumalbumin auf dem mit 0.1 M Salzsäure gereinigten Sensor konnten in beiden Fällen (Spülen der Sensoren mit HCl der Kon-



unbeschichtet



polyimidisiert

Abbildung 5.4: Vergleich eines unbeschichteten mit einem polyimidisierten OFW-Bauelements im Rasterelektronenmikroskop (Ausschnitt mit 6300- bzw. 8900-facher Vergrößerung der Interdigitalstrukturen)

zentration 7.5 mM bzw. 0.1 M) wiederum 25 kHz Signalunterschied detektiert werden.

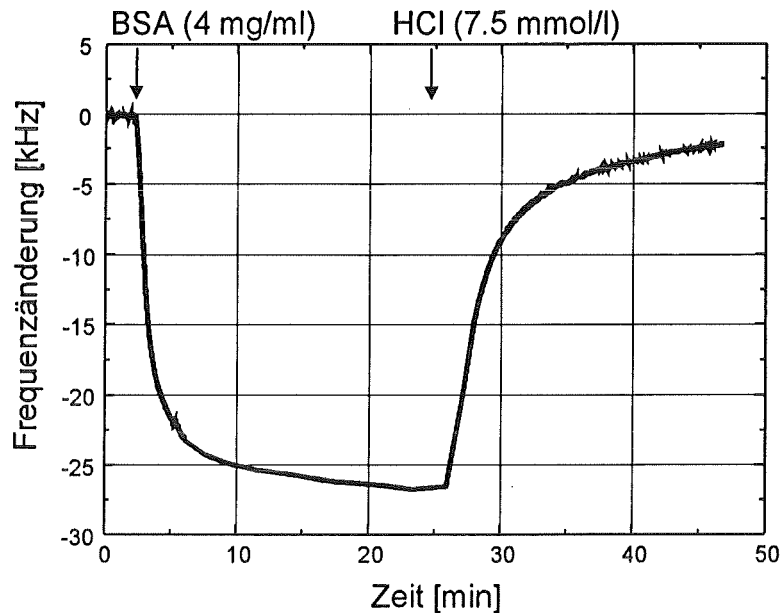


Abbildung 5.5: Unspezifische Abscheidung von Rinderserumalbumin und anschließendes Ablösen des Proteins mit Salzsäure auf einer Polyimidschicht

Daraus erkennt man zum einen, daß die Polyimidschicht die Aluminiumstrukturen vor dem Angriff der Säure schützt und zum anderen, daß es mit einer solchen Schutzbeschichtung möglich ist, die Sensoroberfläche zu regenerieren, solange die Moleküle unspezifisch an der Oberfläche haften. Der obengenannte Versuch (Spülen mit 0.1 M HCl) konnte bis zu fünf Mal wiederholt werden; erst dann kam es zu Beschädigungen, die in 95 % der Fälle an den Bonddrähten der OFW-Bauelemente lokalisiert waren. Die Transducerstruktur selbst schien unter dem Mikroskop weiterhin intakt zu sein.

Kapitel 6

Grundlegende Untersuchungen zum Sensorverhalten

Zur Charakterisierung der Sensoren wurden zunächst die beeinflussenden Größen untersucht, die sich bei einer Immunoreaktion ändern. Wie aus Gleichung (2.5) hervorgeht, sind das vor allem die Änderung der elektrischen Eigenschaften des Systems, also Leitfähigkeit und Dielektrizitätskonstante, die Viskosität des Analyten sowie die Massezunahme. Außerdem wurde das Sensorverhalten in Hinblick auf eine Änderung aller oben genannten Größen beobachtet.

6.1 Unspezifische Abscheidung von Protein auf einem unbeschichteten OFW-Bauelement

Die Experimente zur Untersuchung der unspezifischen Abscheidung von Protein auf der Sensoroberfläche wurden mit allen in Kapitel 4.1.1 aufgeführten Sensoren durchgeführt.

Zu Beginn der Arbeit sollte die Abscheidung von Proteinen auf der unbeschichteten Sensoroberfläche beobachtet werden. Um diesen Einfluß auf die OFW-Schallgeschwindigkeit zu untersuchen, wurde Rinderserumalbumin in einer Phosphatpufferlösung über die unbeschichtete Sensoren geleitet. Dabei scheidet sich das Protein unspezifisch auf der hydrophilen Sensoroberfläche ab. Durch diese Adsorption ändert sich vor allem die Massenbelegung auf dem Kristall, aber auch die Viskosität sowie die Oberflächenleitfähigkeit.

Um die elektrischen Einflüsse gering zu halten, wurde das Protein in 25 mM Kaliumphosphatpuffer gelöst und dadurch eine hohe Grundleitfähigkeit erzielt, die kleine Änderungen ausgleicht ($\Delta\sigma/\sigma_0 \approx 0$). Zur Unterscheidung von Viskositätseinfluß und Masseeinfluß sowie zur Charakterisierung der einzelnen Sensoren wurde dieser Versuch bei unterschiedlichen Arbeitsfrequenzen durchgeführt. Es standen dabei vier verschiedenen OFW-Bauelemente zur Verfügung, die einen Frequenzbereich von 145 MHz bis 470 MHz abdecken. Das jeweilige Sensorverhalten ist in Abbildung 6.1 dargestellt. Die Resonanzfrequenzänderung des 145 MHz-Sensors ist

in einem separaten Diagramm dargestellt, da die Signaländerung nur ca. 1.5 kHz beträgt.

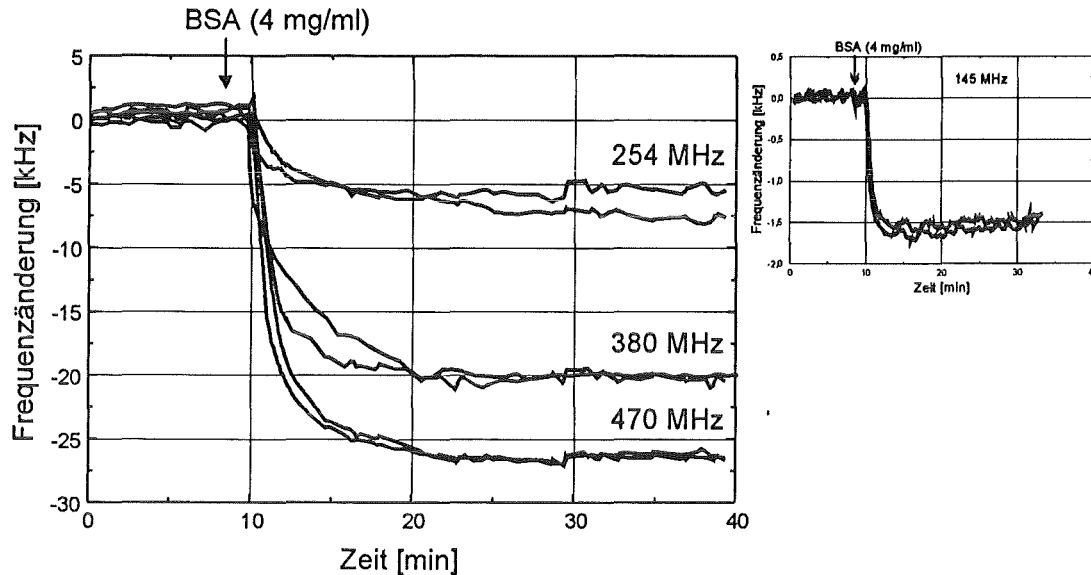


Abbildung 6.1: Frequenzänderung verschiedener OFW-Bauelemente (je zwei gleicher Grundfrequenz) bei unspezifischer Abscheidung von BSA

Da die relative Änderung der OFW-Schallgeschwindigkeit mit der relativen Frequenzänderung über Gleichung (2.4) verknüpft ist, wurde die relative Frequenzänderung ($\Delta f/f_0$), die durch unspezifische Proteinabscheidung hervorgerufen wurde, in Abbildung 6.2 gegen die Arbeitsfrequenz der Bauelemente aufgetragen.

Aus den Gleichungen (2.13) und (2.16) ergibt sich eine lineare Abhängigkeit der relativen Frequenzänderung von der Arbeitsfrequenz bei einer zunehmenden Massenbelegung bzw. eine Wurzelabhängigkeit von der Viskositätsänderung. In Abbildung 6.2 erkennt man einen guten linearen Zusammenhang in dem untersuchten Bereich. Dies deutet auf eine Dominanz des Masseinflusses auf die Oberflächenwelle hin. Allerdings müsste die gezeigte Kurve um mehrere Punkte erweitert werden, um dies mit letzter Sicherheit zu postulieren. Leider standen im Rahmen dieser Doktorarbeit nur vier verschiedene Sensortypen zur Verfügung.

Der 380 MHz-Sensor zeigte im Rahmen dieser Untersuchung das beste Signal zu Rauschverhältnis. Für die weiteren grundlegenden Untersuchungen von Oberflächenwellen sowie für die immunologischen Experimente wurden aus diesem Grund und unter Berücksichtigung der Dämpfungseigenschaften in Wasser (siehe Tabelle 4.1) diese Bauelemente ausgewählt. Alle weiteren Versuche, die im folgenden aufgeführt werden, wurden mit 380 MHz-Sensoren der Fa. Murata durchgeführt.

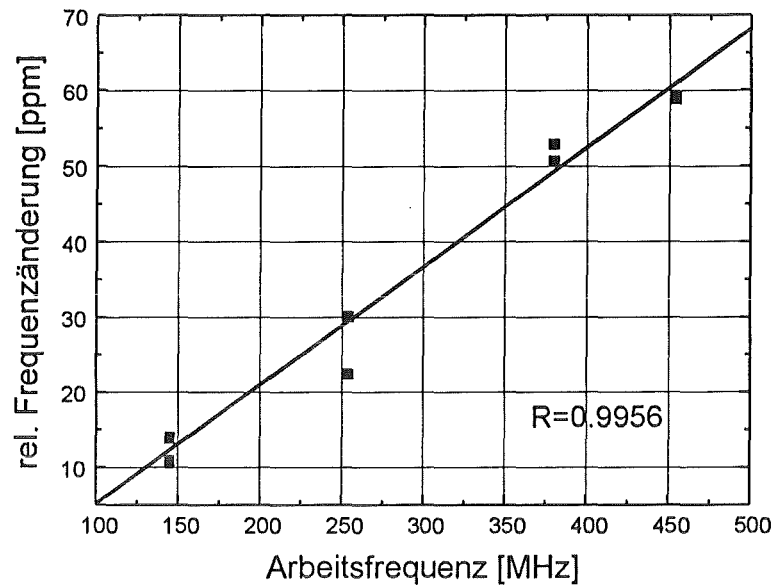


Abbildung 6.2: Relative Frequenzänderung der BSA-Abscheidung als Funktion der Arbeitsfrequenz

6.2 Einfluß elektrischer Größen auf die Resonanzfrequenz

Um die Abhängigkeit der Resonanzfrequenz von den elektrischen Einflußgrößen zu bestimmen, wurden verschiedene konzentrierte Pufferlösungen und damit Lösungen unterschiedlicher Leitfähigkeit über die Sensoren geleitet. Die Leitfähigkeit der Lösungen konnte mit Hilfe eines Konduktometers kontrolliert werden. Ein 25 mM Kaliumphosphatpuffer diente als Stammlösung mit einer Leitfähigkeit von 3.38 mS/cm. Dieser wurde dann um jeweils ein Zehntel mit bidestilliertem Wasser verdünnt und mit den verschiedenen Verdünnungen eine Meßreihe durchgeführt. Die Basislinie der Leitfähigkeitsmessungen wurde mit der Stammlösung bestimmt, so daß Leitfähigkeitsänderungen immer auf den 25 mM Phosphatpuffer bezogen wurden. Die Messungen wurden mit drei Sensoren durchgeführt, die alle nach der Polyimidisierung unterschiedliche Dämpfungen zeigten. Dadurch war es möglich den Einfluß der Dämpfung, die die Polyimidisierung verursacht, auf das Sensorsignal, das durch Leitfähigkeitsänderungen hervorgerufen wurde, zu beziehen.

In Abbildung 6.3 ist die Meßreihe dargestellt, die Daten der linearen Regression sind in Tabelle 6.2 angegeben.

Abbildung 6.3 zeigt einen linearen Zusammenhang zwischen Leitfähigkeitsvariation und Änderung der Resonanzfrequenz. Weiterhin ist zu erkennen, daß die drei Sensoren verschieden stark auf Leitfähigkeitsänderungen reagieren. Je größer die Dämpfung nach der Schutzbeschichtung, desto empfindlicher sind diese Sensoren bezüglich einer elektrischen Störung der Oberflächenwelle. Vergleicht man die in

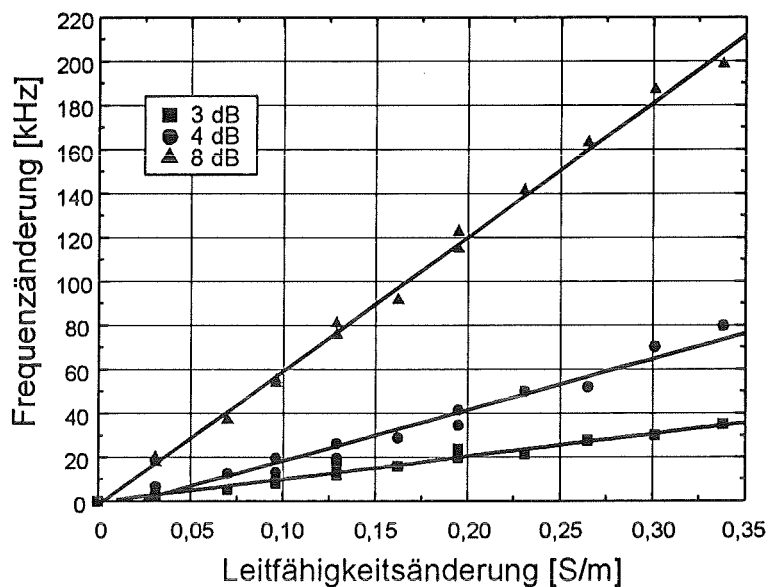


Abbildung 6.3: Frequenzänderung durch Leitfähigkeitsänderung der Pufferlösung

Tabelle 6.1: Statistische Daten der linearen Regression

Dämpfung [dB]	Achsenabschnitt [kHz]		Steigung [kHz/(S/m)]		Steigung [ppm/(S/m)]	Korrelationskoeffizient
	Wert	sd*	Wert	sd*		
3	-0.229	0.700	103.2	4.06	271.6	0.9886
4	-4.693	1.915	231.7	11.09	609.7	0.9832
8	-1.678	1.567	609.5	9.08	1603.9	0.9983

*Standardabweichung

Tabelle 6.2 angegebenen Steigungen mit dem Wert aus Kapitel 2.6.1, so ist zu erkennen, daß nur der Sensor mit einer Dämpfung von 3 dB dem Betrag nach dem theoretisch erwarteten Verhalten entspricht. Die Sensoren mit einer Dämpfung von 4 bzw. 8 dB konnten nicht mit der Theorie in Einklang gebracht werden.

Zur Erklärung dieses Verhaltens kann die Abhängigkeit der Dämpfung eines OFW-Bauelementes von der Dicke einer aufgetragenen Schicht herangezogen werden [Bar95]. Mit zunehmender Dämpfung wird danach auch die Polyimidschichtdicke größer und es kann zur Anregung von Love-Wellen kommen. Der in Kapitel 2.6.1 abgeleitete und in Gleichung (2.12) beschriebene Zusammenhang zwischen relativer Signaländerung und zunehmender Leitfähigkeit gilt aber streng nur für horizontal polarisierte Scherwellen.

Die Richtung der Signaländerung ist nicht allein durch die Leitfähigkeitsänderung in der Probelösung zu erklären. Sollte dies der einzige Einfluß auf die OFW-Schallgeschwindigkeit sein, dann wäre eine Abnahme der Resonanzfrequenz nach Gleichung (2.12) zu erwarten. Da die Bauelemente nicht nach dem Prinzip einer einfachen Verzögerungsleitung aufgebaut sind (siehe Kapitel 4.1.4), ist aber ein direkter Vergleich mit den in Kapitel 2.6.1 rechnerisch ermittelten Kurven nicht zulässig. Trotz der Abweichung vom theoretisch erwarteten Verhalten konnten die in Abbildung 6.3 angegebenen Kurven als Kalibriergeraden für Leitfähigkeitsänderungen in der Analytlösung verwendet werden.

Zur Beschichtung von Bauelementen mit Proteinen wurden ausschließlich Sensoren verwendet, deren Dämpfung nach der Passivierung mit Polyimid den Wert von 3.5 dB nicht überschritt, da auf Grund der begrenzten Verstärkerleistung der Oszillatorelektroniken bei möglichst kleinen Dämpfungen gearbeitet werden sollte. Bei den verwendeten Analytlösungen handelte es sich um Rinderserumalbumin (4 mg/ml) sowie Glucoseoxidase (0.667 mg/ml) in Phosphatpuffer gelöst. Das Rinderserumalbumin ändert die Leitfähigkeit der Pufferlösung um ca. $50 \mu\text{S}/\text{cm}$, die Glucoseoxidase um $260 \mu\text{S}/\text{cm}$. Das bedeutet, daß ein Sensor mit 3 dB Dämpfung bei einer Beprobung mit Rinderserumalbumin der obengenannten Konzentration eine Frequenzverschiebung von 0.5 kHz oder 1.32 ppm anzeigt, während die Beprobung mit Glucoseoxidase eine absolute Signaländerung von 2.7 kHz oder eine relative Frequenzverschiebung von 7.1 ppm bewirkt. Der Einfluß der Leitfähigkeitsänderung durch Beprobung mit Analyt kann folglich vernachlässigt werden, da bei einer Immunoreaktion ein um Faktor 100 größerer Frequenzunterschied detektiert wird (siehe Kapitel 7.1.4 und Kapitel 7.2.5.4).

6.3 Viskositätseinfluß auf die Resonanzfrequenz

Zur Bestimmung der Abhängigkeit des Sensorverhaltens von der Viskosität wurde ein Analytsystem gewählt, das bei beliebigem Mischungsverhältnis keine Änderungen der elektrischen Leitfähigkeit ergibt. Als geeignet erwies sich n-Oktan als Meßmedium, dessen Viskosität sukzessive durch Zugabe von kleinen Mengen an Silikonöl erhöht wurde. Die Viskositäten der verschiedenen Mischungen konnten mit einem

Ostwaldviskosimeter kontrolliert werden.

Um die Basislinie einzustellen, wurde n-Okтан über einen Sensor (3 dB) geleitet, so daß alle detektierten Frequenzänderungen durch Viskositätsunterschiede der Mischungen in Bezug auf n-Okтан entstanden.

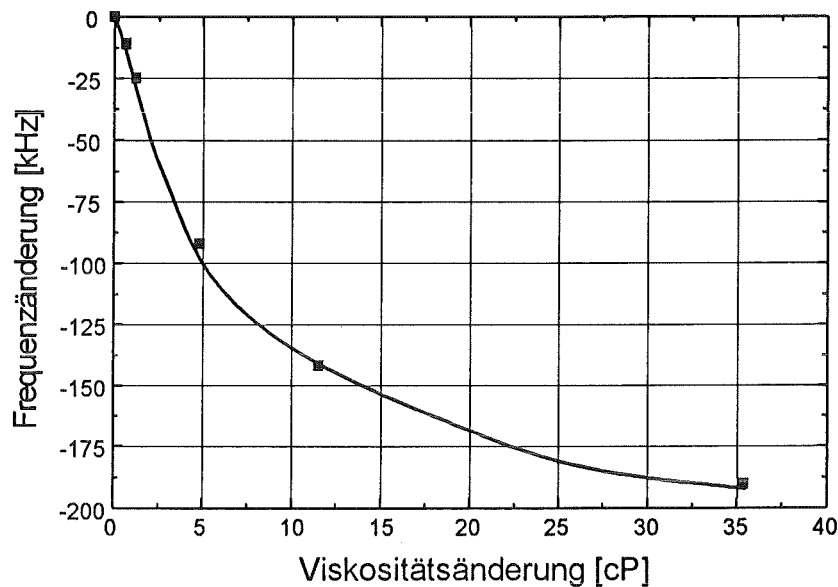


Abbildung 6.4: Frequenzänderung durch Viskositätsänderung der Analytlösung

Aus Abbildung 6.4 ist die theoretisch erwartete Wurzelabhängigkeit der Resonanzfrequenz von der Viskosität zu erkennen (siehe Kapitel 2.6.2). Die entstandenen Frequenzunterschiede liegen allerdings deutlich über den theoretisch erwarteten. Diese Diskrepanz kann hier nur so gedeutet werden, daß auf Grund des komplexen Designs (vgl. Abbildung 4.2) der verwendeten OFW-Bauelemente offensichtlich kein direkter Vergleich zwischen den in Abbildung 2.9 theoretisch bestimmten Kurven, denen eine ideale STW zugrunde liegt, und den experimentellen Ergebnissen aus Abbildung 6.4 gemacht werden darf.

Die Viskosität von Wasser beträgt bei 25°C 0.89 cP, ein Wert, der durch kleine Salzkonzentrationen nur unwesentlich beeinflusst wird. Ein Phosphatpuffer mit einer Ionenkonzentration von 25 mmol/l besitzt eine Viskosität von 0.909 cP. Auch die Einwaage von Rinderserumalbumin (4 mg/ml) bedingt keine wesentliche Änderung der Viskosität der Lösung ($\eta = 0.942$ cP). Der entstandene Viskositätsunterschied von 0.033 cP würde nach Abbildung 6.4 zu einer Frequenzänderung von 0.55 kHz¹ führen, was einer relativen Signaländerung von 1.44 ppm (vgl. mit Abbildung 2.9) entspricht. Damit kann der Viskositätseinfluß der Analytlösung auf die OFW-Schallgeschwindigkeitsänderung während der Immunoreaktion vernachlässigt werden.

¹Dieser Wert wurde mittels linearer Regression (Steigung: -19.2 kHz/cP, Korrelationskoeffizient: 0.9996) im Bereich kleiner Viskositäten bestimmt.

Kapitel 7

Immobilisierung von Proteinen auf OFW-Bauelementen

7.1 Cyanotransfertechnik

Auf Grund der chemischen Passivierung der Sensoren mit Hilfe einer Polyimid-schicht (siehe Kapitel 5.2) wurde nach Immobilisationsmethoden gesucht, die nicht auf OH-Gruppen angewiesen sind. Die im allgemeinen für Harze angewandte Cyanotransfertechnik erwies sich hierbei als geeignete Prozedur für schutzbeschichtete OFW-Bauelemente und wurde für das hier verwendete Polyimid als Oberflächenbeschichtungsmaterial optimiert.

Normalerweise stellt die Cyanotransfertechnik ein spezielles Verfahren, das von der klassischen BrCN-Immobilisierung abgeleitet wurde, dar, um Proteine kovalent auf hydrophilen Oberflächen (OH-Gruppen) abzuschneiden. Da die OH-Gruppen auf einer solchen Oberfläche nur schwach sauer sind ($pK_a \simeq 12$), werden diese bei der klassischen BrCN-Methode mit konzentrierter Natronlauge in Alkoxyionen überführt. Diese drastischen Bedingungen führen aber dazu, daß der Großteil (95 %) des BrCN mit NaOH zu Natriumcyanat verseift wird und nur noch ein kleiner Teil für die Aktivierung der Oberfläche zur Verfügung steht. Aus diesem Grund wird bei der klassischen BrCN-Reaktion mit einem hohen Überschuß an Bromcyan gearbeitet [Koh84].

Bei der Cyanotransfertechnik hingegen wird das Problem der geringen Säurestärke der OH-Gruppen umgangen, indem der Reaktionsmischung ein Übertragungsreagens zugesetzt wird, das durch Ausbildung eines Salzes die Elektrophilie von CN^+ erhöht. Dadurch verringern sich die benötigten basischen Bedingungen und die Nebenreaktion zu Cyanaten wird in den Hintergrund gedrängt. Triethylamin (TEA) erweist sich dabei als kostengünstiges und leicht zugängliches Reagens, das mit BrCN das N-Cyano-triethyl-ammonium-bromid-Salz ausbildet [Bra00]. Als Lösungsmittel wird ein Gemisch aus 60 Vol-% Aceton in Wasser verwendet, was bei Reaktionstemperaturen von $-15^\circ C$ ein Einfrieren der Lösung verhindert und außerdem die Verseifung der entstandenen Nitrilgruppen minimiert.

Allgemein führen beide Methoden zu hoch reaktiven Cyansäureestern, die entweder mit Wasser zu relativ stabilen Carbamaten verseift oder sofort mit Aminofunktionen beliebiger Proteine umgesetzt werden, woraus iso-Harnstoffderivate resultieren (siehe Abbildung 7.1). Ein Vergleich der beiden Methoden ist in [Koh83] angegeben.

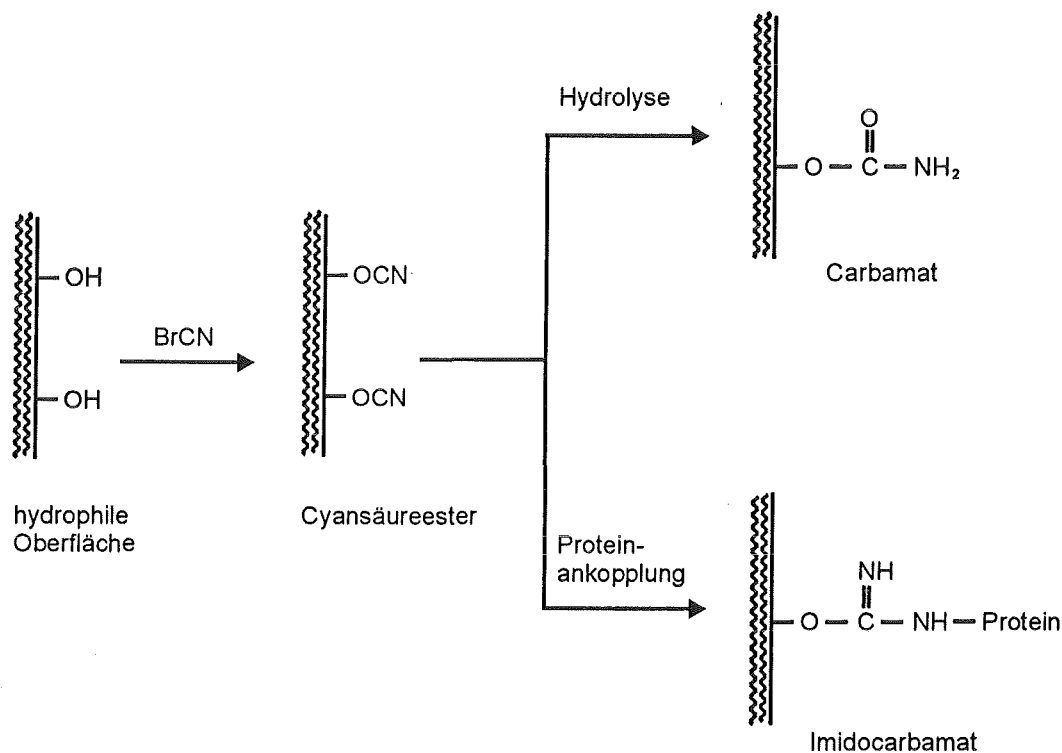


Abbildung 7.1: Aktivierung von hydrophilen Oberflächen mittels Bromcyan nach Kohn

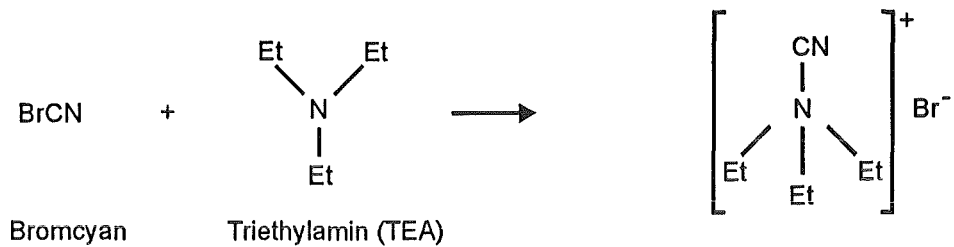
Nach der Polyimidisierung sind die OH-Gruppen auf der Oberfläche nicht mehr zugänglich. In diesem Fall konnte mit Hilfe der Cyanotransfertechnik dennoch eine Modifizierung der polyimidierten Sensoroberfläche erreicht werden. Die Imidgruppe des Polymers bot die nötige Angriffsstelle für das Ammoniumsalz.

7.1.1 Aktivierung von Polyimid

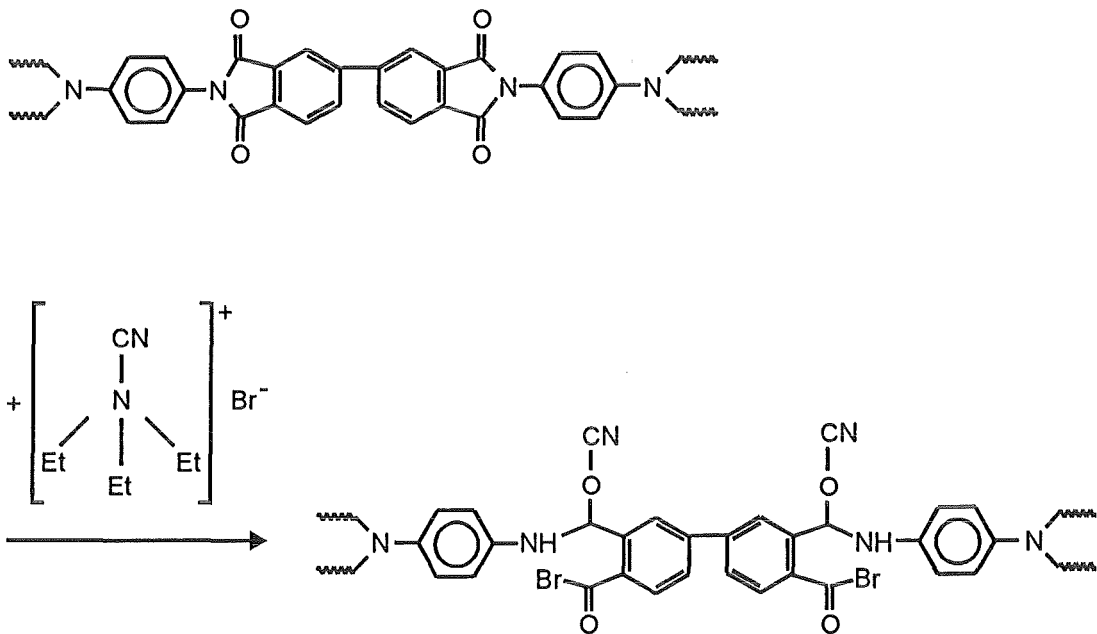
Das zur Schutzbeschichtung verwendete Polyimid wurde mittels Cyanotransfertechnik aktiviert. Mechanistische Vorschläge zur Umsetzung eines aromatischen Polyimids mit BrCN konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Denkbar ist aber der in Abbildung 7.2 dargestellte Reaktionsverlauf.

BrCN und Triethylamin bilden in basischen Medien Triethyl-Nitrilo-Ammoniumbromid [Bra00]. Das Bromidion kann dann den Carbonylkohlenstoff der Imidgruppe

Triethyl-cyano-ammoniumbromid



Umsetzung von Polyimid mit Triethyl-cyano-ammoniumbromid



Hydrolyse

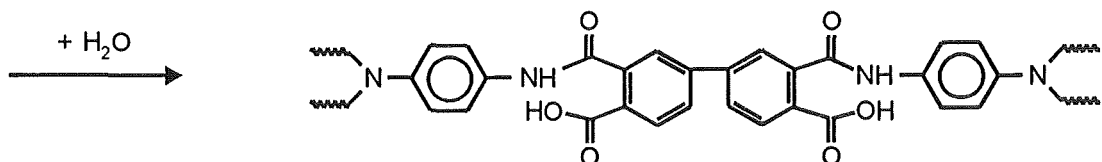


Abbildung 7.2: Reaktion von BrCN mit der polyimidisierten Sensoroberfläche

angreifen und es kommt zu einem Säurebromid, was unter wässrigen, basischen Bedingungen teilweise verseift wird. Die entstandene Carbonsäure kann dann nach Aktivierung durch ein Carbodiimid mit der Aminofunktion eines Proteins eine Peptidbindung eingehen. Für das CN^+ -Ion ist vor allem der Angriff am Sauerstoff an der dem Bromidangriff gegenüberliegenden Seite (siehe Abbildung 7.2) denkbar, wodurch eine Ringöffnung weiter begünstigt wird. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen erscheint es wahrscheinlich, daß die Reaktion über eine Abspaltung des CN^+ -Ions verläuft, woraus ein Säureamid resultiert.

7.1.2 Anbindung des Antikörpers über EDAC

Die Knüpfung einer Peptidbindung verläuft endergonisch, deshalb wird, um eine nennenswerte Ausbeute der Reaktion zu erhalten, die Carboxylgruppe aktiviert. In der Peptidchemie verwendet man zur Synthese von Polypeptiden meist Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder N-Ethyl-N'-Dimethyl-Aminopropyl-Carbodiimid (EDAC). Der Reaktionsmechanismus dieser Reaktion ist nicht genau geklärt, es wird aber ein Angriff der Carbonsäure am Carbodiimid vermutet [Vol88]. Dadurch entsteht eine aktivierte Carbonylgruppe, die dann mit der Aminogruppe einen Additions-Eliminierungsmechanismus eingehen kann (siehe Abbildung 7.3). Neben der gewünschten Peptidbindung entsteht ein Harnstoffderivat als Nebenprodukt.

7.1.3 Durchführung

Alle Modifikationen der Sensoroberfläche mittels Cyanotransfertechnik konnten in einem Becherglas durchgeführt. Die polyimidisierten OFW-Sensoren wurden auf einen Teflontisch mit Pinbohrungen gesetzt und der Tisch mit Hilfe eines Rührfisches und Magnetrührers gedreht. Vor der Umsetzung mit BrCN wurden die Sensoren einer Waschprozedur, die aus drei Schritten bestand, unterworfen:

- 20 min Waschen mit 40 ml bidestilliertem Wasser
- 20 min Waschen mit 40 ml einer Mischung aus 70 Vol-% bidestilliertem Wasser und 30 Vol-% Aceton p.a.
- 20 min Waschen mit 40 ml einer Mischung aus 40 Vol-% bidestilliertem Wasser und 60 Vol-% Aceton p.a.

Die letzte Waschlösung diente gleichzeitig als Reaktionsmedium und wurde mit einem Eisbad (500 g Eis) und NaCl (100 g) unter Rühren auf -15°C abgekühlt. Folgende Lösungen wurden frisch angesetzt:

1. Einwaage von 1 g BrCN in 10 ml Aceton p.a. (=1 mol/l)
2. Einwaage von 1.52 g Triethylamin (Puffersubstanz) in 10 ml Aceton p.a. (=2.5 mol/l)

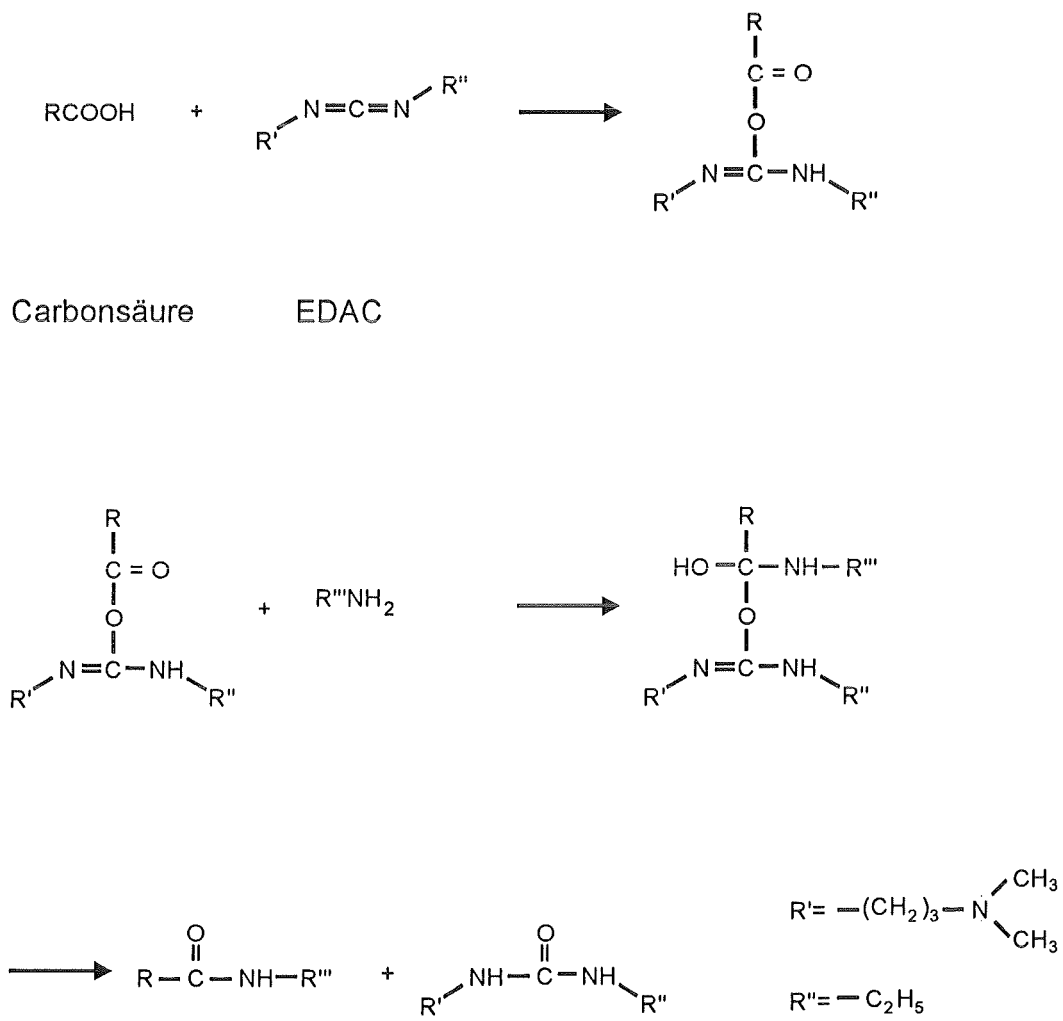


Abbildung 7.3: Aktivierung einer Carbonsäuregruppe mit EDAC und Ausbildung einer Peptidbindung

Zu den Sensoren wurden 10 ml der BrCN-Lösung innerhalb von 2 min zupipettiert, danach erfolgte die Zugabe der gleichen Menge von Triethylamin-Aceton-Mischung ebenfalls innerhalb von 2 min. Diese Reaktionsmischung wurde 15 min bei -15°C gerührt und anschließend die Teflonhalterung mit den Sensoren gründlich mit Wasser abgespült. Anschließend konnten die Sensoren in ein Becherglas mit 60 ml bidestilliertem Wasser überführt werden, wo sie über Nacht belassen wurden.

Zur Aktivierung der Carboxylgruppe wurde eine 0.5 molare N-Ethyl-N'-Dimethyl-Aminopropyl-Carbodiimidlösung verwendet [Min93]. 5 ml dieser Lösung wurden mit 100 μl monoklonalen Antikörpern ($=750 \mu\text{g}$) gemischt und anschließend mit der funktionalisierten Oberfläche zur Reaktion gebracht. Um pH-Wertänderungen während der Reaktion zu minimieren, wurde das Carbodiimid in Phosphatpuffer ($\text{pH} = 7$) gelöst.

Nach dem Einbau der Sensoren in die Meßadapter erfolgte über Nacht die Beprobung der Bauelemente mit aktivierter Antikörperlösung. Danach wurde mit Phosphatpuffer die Basislinie aufgenommen und die Sensoren mit Analyt beprobt.

Die beschriebene Versuchsvorschrift kann zur kovalenten Fixierung von Immunglobulinen der Klasse G auf akustoelektrischen Sensoren verwendet werden [Wes95].

7.1.4 Immunoreaktion

In Abbildung 7.4 ist das Sensorverhalten bei der Immunoreaktion von kovalent immobilisierten anti-Glucoseoxidase Antikörpern mit dem Antigen Glucoseoxidase gezeigt. Dafür wurde ein Sensor mit Polyimid passiviert und das Polymer anschließend mit Bromcyan, wie in Kapitel 7.1.3 beschrieben, aktiviert. Danach erfolgte die Umsetzung mit Antikörpern, um das Protein kovalent zu binden. Nach der Einstellung der Basislinie mit Phosphatpuffer (PBS) führte die Zugabe von Glucoseoxidase zur gewünschten Immunoreaktion, die eine Frequenzänderung von ca. 200 kHz bewirkte.

Dabei handelt es sich allerdings sowohl um eine spezifische als auch um eine unspezifische Anlagerungen des Antigens am Sensor. Um den Effekt der unspezifischen Reaktion von der eigentlichen Immunoreaktion zu trennen, wurde ein analog beschichteter Sensor mit Rinderserumalbumin beprobt, sodaß für die Glucoseoxidase nur noch die antigenbindenden Stellen des Antikörpers zur Verfügung stehen (siehe Abbildung 7.5). Dies führte zu einer Frequenzabnahme von ca. 100 kHz. Die Zugabe des Antigens Glucoseoxidase ($666.7 \mu\text{g}/\text{ml}$) bewirkte anschließend eine weitere Erniedrigung der Resonanzfrequenz um ca. 75 kHz. Dies bedeutet, daß die unspezifische Reaktion in diesem Falle etwa die Hälfte des gesamten Signals ausmachte. Im Unterschied zu dem Experiment aus Abbildung 7.4 wurde jetzt eine um 25 kHz kleinere Frequenzänderung festgestellt. Der Grund dafür liegt vermutlich in einer fehlenden homogenen Antikörperschicht bzw. in der „falschen“ Orientierung der Immunglobuline. Allgemein litt die Reproduzierbarkeit der Beschichtung unter den vielen Arbeitsschritten, die zur Aktivierung der Polyimidschicht und der anschließenden Abscheidung von Antikörpern notwendig waren.

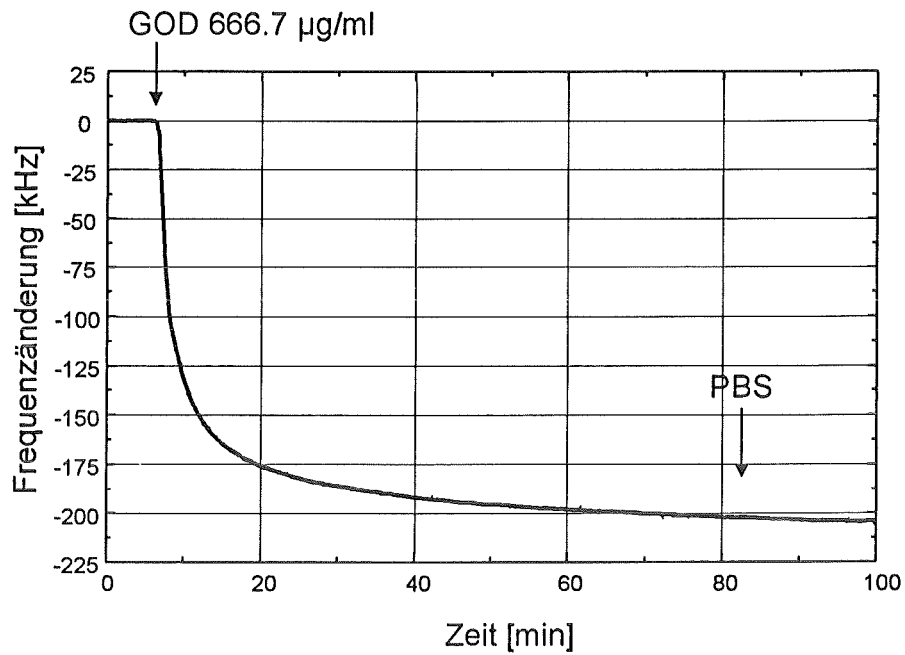


Abbildung 7.4: Immunreaktion von immobilisierten GOD-Antikörpern mit Glucoseoxidase

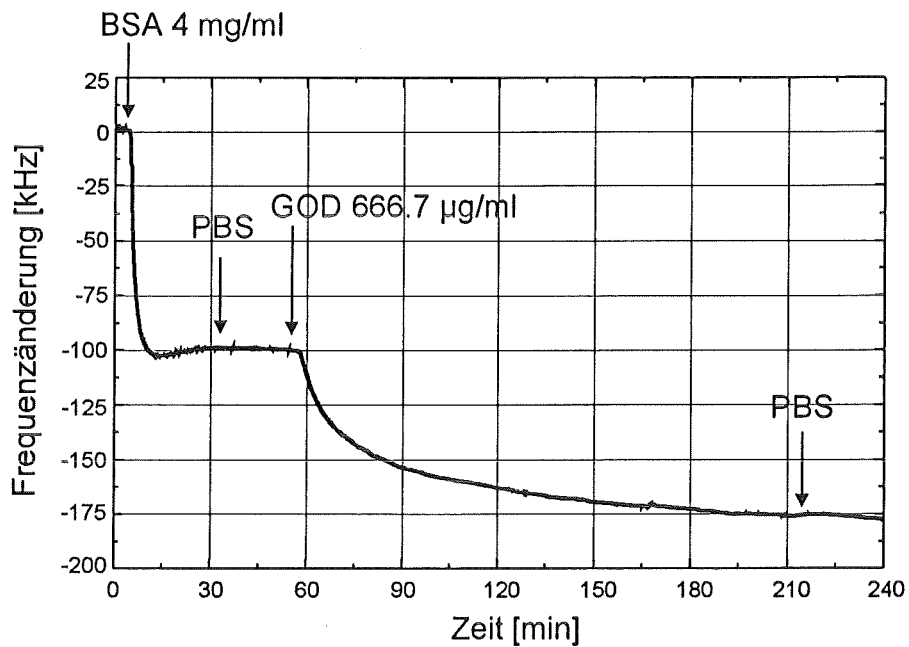


Abbildung 7.5: Unterdrückung der unspezifischen Adsorption durch Blocken der Bindungsstellen mit Rinderserumalbumin

7.1.4.1 Vergleichende Experimente

Um sicherzustellen, daß es sich bei den oben gezeigten Reaktionen auch wirklich um die Immunreaktion zwischen kovalent immobilisierten Antikörpern und dem Antigen handelt, wurden einige vergleichende Experimente durchgeführt, die in Abbildung 7.6 zusammengefaßt sind.

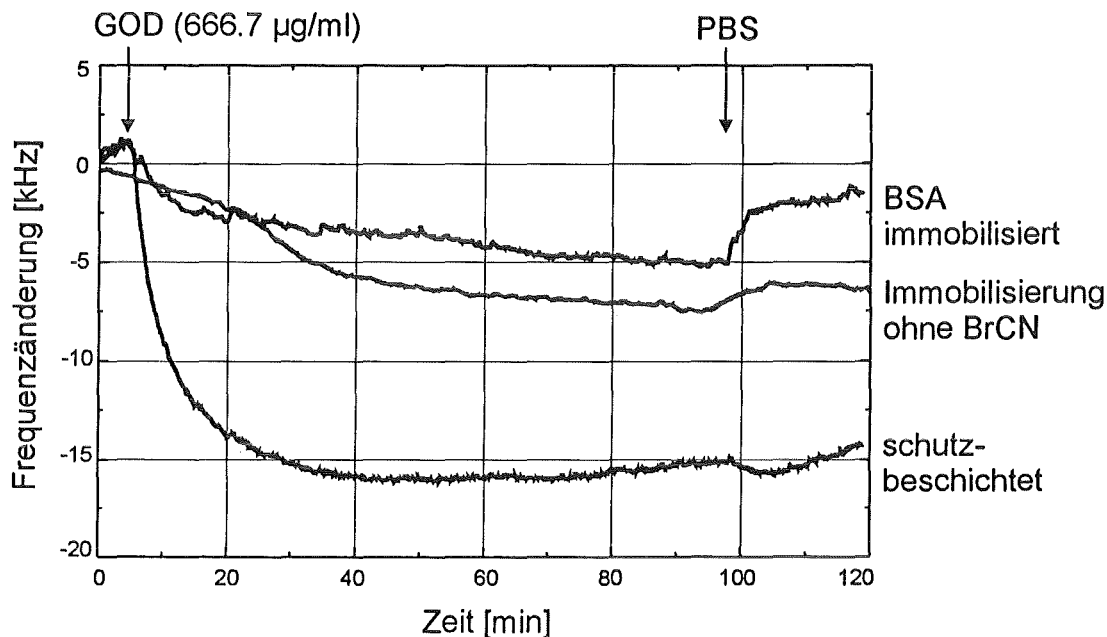


Abbildung 7.6: Kontrollversuche zur Immunreaktion nach Immobilisierung mittels Cyanotransfertechnik

Ein polyimidisierter Sensor (in Abbildung 7.6 mit 'schutzbeschichtet' bezeichnet) zeigt bei Beprobung mit Glucoseoxidase eine Frequenzänderung von 15 kHz, was auf unspezifische Adsorption des Antigens auf der hydrophilen Oberfläche zurückzuführen ist.

Die mittlere Kurve gibt das Sensorverhalten eines Bauelementes wieder, das nach der Polyimidisierung mit Antikörpern umgesetzt wurde, die Schutzschicht wurde allerdings nicht mit Bromcyan aktiviert. Nach dem Blocken mit Rinderserumalbumin war durch die Zugabe des Antigens lediglich eine Frequenzänderung von 6 kHz zu detektieren. Dies bedeutet, daß ohne eine BrCN-Aktivierung der Polyimidschicht tatsächlich keine Funktionalisierung der Oberfläche erreicht werden kann.

Ein Sensor, der nach der Schutzbeschichtung mit Bromcyan aktiviert, dann aber nicht mit Antikörpern, sondern mit Rinderserumalbumin beschichtet wurde (in Abbildung 7.6 mit 'BSA immobilisiert' gekennzeichnet), zeigt bei Zugabe des Antigens nur eine vernachlässigbare, irreversible Frequenzänderung von 1.9 kHz. Dies ist durch das Fehlen von Bindungsstellen auf der Sensoroberfläche zu erklären. Eine

kleine reversible Signaländerung wurde durch die Leitfähigkeitsänderung der BSA-Lösung hervorgerufen (siehe Kapitel 6.2).

7.1.5 Bestimmung der Glucoseoxidase-Aktivität

Bei der Aktivitätsbestimmung wurde auf die in Kapitel 4.2.1 beschriebene optochemische Methode zurückgegriffen. Glucoseoxidase katalysiert unter Sauerstoffverbrauch die Zersetzung von β -D-Glucose zu Gluconsäure und Wasserstoffperoxid. Das Wasserstoffperoxid wird enzymatisch mittels Peroxidase oxidativ mit einem Phenolderivat und 4-Aminophenazon gekoppelt, wobei ein roter Farbstoff mit Absorptionsmaximum bei 520 nm entsteht. Durch Beobachtung der Absorptionzunahme und Vergleich mit einer Kalibrierlösung kann der Glucoseoxidasegehalt auf dem Sensor ermittelt werden, da das Protein nach der Immunreaktion seine enzymatische Aktivität beibehält (siehe Kapitel 4.2). Das Protokoll des Assays ist in Anhang A.2 angegeben.

Nach der Immunreaktion wurden die Sensoren aus dem Meßadapter entfernt und jeweils 5 min lang mit einer Waschlösung aus 50 mM Phosphatpuffer, 150 mM NaCl sowie 0.2 Vol-% TWEEN 20 behandelt. Anschließend erfolgte der Transfer der Bauelemente in eine Küvette, die die nötigen Reagenzien für den enzymatischen Assay enthielten (siehe Anhang A.2). Abbildung 7.7 zeigt die Absorptionzunahme bei 520 nm für drei Sensoren in der jeweiligen Probelösung.

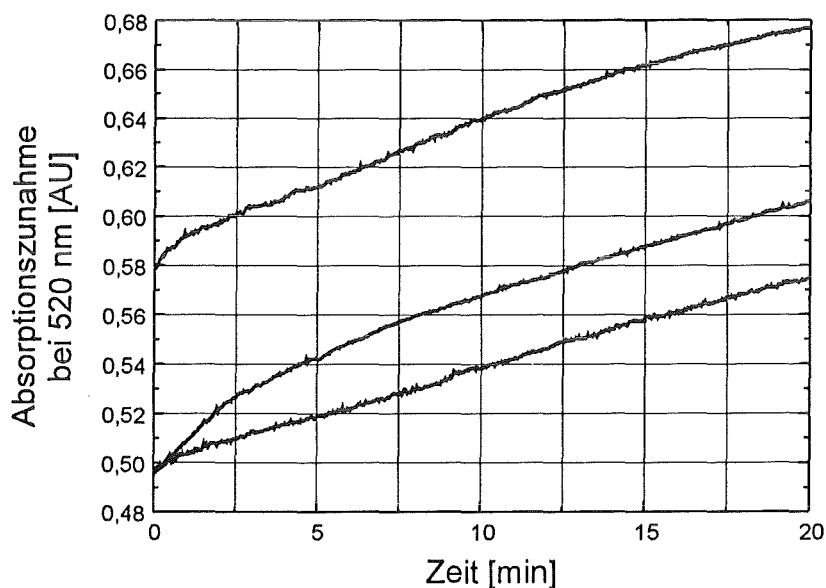


Abbildung 7.7: Detektion der enzymatischen Aktivität von Glucoseoxidase, die durch die Immunreaktion auf dem Sensor abgeschieden wurde

Die Steigungen der in Abbildung 7.7 angegebenen Kurven beträgt im Mittel 0.0042 Absorptionseinheiten pro Minute, was bei einem Vergleich der Glucoseoxidaseaktivität (siehe Anhang A.2) zu einer abgeschiedenen Glucosemasse von 31.7 ng führt. Sowohl bei der Schutzbeschichtung als auch bei der Cyanotransfertechnik wird jeweils der gesamte Sensor modifiziert, so daß die Immunreaktion auch auf dem Sensorgehäuse stattfindet. Da der gesamte Sensor in die Küvette eintaucht, wird außer der auf dem piezoelektrischen Substrat abgeschiedenen Menge an Glucoseoxidase auch noch Protein mitbestimmt, das auf dem Sensorgehäuse gebunden wurde. Dies bedeutet, daß die Signaländerung während der Immunreaktion von weniger als 31.7 ng Enzym hervorgerufen wurde.

Unter der Annahme, daß eine homogene Abscheidung auf der gesamten Sensoroberfläche stattfand, kann mittels eines Geometriefaktors die effektiv auf dem Substrat abgeschiedene Menge an Glucoseoxidase ermittelt werden. Der Quotient aus Substratoberfläche und Gehäuseoberfläche wurde als Geometriefaktor definiert. Die Substratoberfläche eines 380 MHz Baulements beträgt 2.3 mm² (siehe Abbildung 4.2), die Gehäusefläche eines TO39-Gehäuse wurde bei einem Durchmesser von 8 mm mit 50.3 mm² bestimmt. Somit ergibt sich ein Geometriefaktor von 0.046 und damit eine effektiv auf dem Substrat abgeschiedene Glucoseoxidase-masse von 1.45 ng.

7.1.6 Bestimmung der Sensorempfindlichkeit

Als mittlere Frequenzabnahme bei Beprobung mit 666.7 µg/ml Glucoseoxidase im Analytstrom (nachdem zuvor mit Rinderserumalbumin geblockt wurde) konnten 84.3 kHz bestimmt werden. Die auf dem Substrat abgeschiedene Menge an Glucoseoxidase wurde mit Hilfe eines Geometriefaktors zu 1.45 ng ermittelt (siehe Kapitel 7.1.5). Aus diesen Werten ergibt sich eine Empfindlichkeit des OFW-Sensors von 58.1 Hz/pg.

7.2 Photoimmobilisation

Immobilisationsmethoden, die auf einer photoinduzierten Reaktion beruhen, gewinnen gerade in der Sensortechnik immer mehr an Bedeutung. Die Möglichkeit auf kleinstem Raum eine definierte Menge an Biomolekülen abzuscheiden, eröffnet in Kombination mit photolithographischen Techniken eine Vielfalt neuer Wege.

7.2.1 Prinzip der Photoimmobilisation

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete photochemische Prinzip beruht auf der Derivatisierung von Proteinen mit photoreaktiven Gruppen. Diese Gruppen bilden je nach Art bei Bestrahlung Carbene oder Radikale, welche dann mit Matrixmolekülen bzw. Oberflächengruppierungen reagieren. Auf diese Weise ist es möglich beliebige Biomoleküle kovalent auf einem Festkörper anzubinden.

Durch den Einbau von Diazirinen als photoaktive Gruppe, entstehen nach Bestrahlung Carbene [Sig95]. Diese inserieren vorwiegend in C-H-Bindungen und generieren auf diese Weise eine kovalente Verknüpfung.

7.2.1.1 Derivatisierung von Rinderserumalbumin

Rinderserumalbumin, welches sich wegen seiner hohen Anzahl an Lysineinheiten besonders gut eignet, wird an den Lysingruppen mit dem Diazirin 3-Trifluoromethyl-3-(*m*-isothiocyanophenyl)-diazirin (TRIMID) (Synthese von TRIMID siehe [Bru81] und [Dol90]) derivatisiert [Gao94]. TRIMID spaltet unter Einstrahlung von Licht der Wellenlänge 348 nm Stickstoff ab, wobei es zur Carbenbildung kommt.

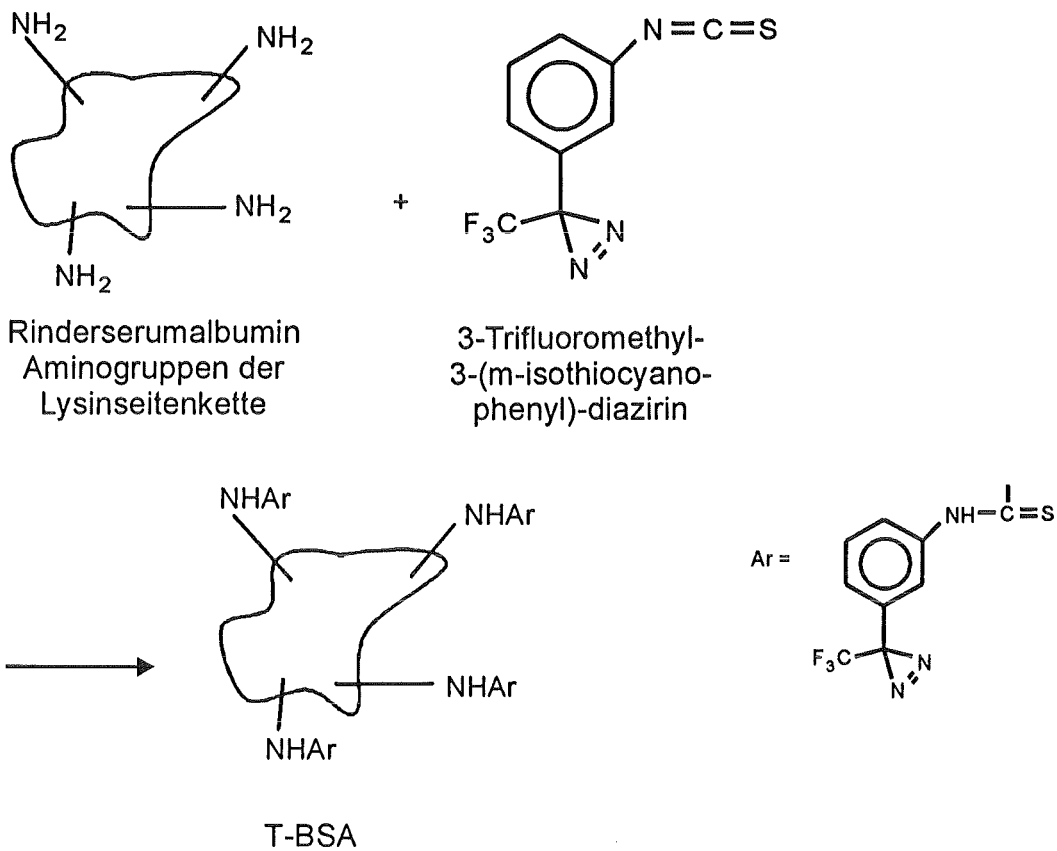
In Abbildung 7.8 ist die Modifikation von Rinderserumalbumin (T-BSA) und die Erzeugung des Triplettcarbens dargestellt. Üblicherweise gelingt es 8 bis 10 TRIMID-Einheiten an ein BSA-Molekül zu binden [Gao95].

7.2.1.2 Vergleich von direkter Anbindung eines Proteins und Coimmobilisierung

Mit photoaktiven Proteinen ist es möglich zwischen zwei Immobilisationsalternativen zu wählen. Zum einen kann das Molekül direkt an die Oberfläche gebunden und seine biologischen Eigenschaften nachgewiesen werden (direkte Anbindung). Zum anderen kann es als Photovernetzer fungieren, indem die Bestrahlung mit Licht und die daraus resultierenden Gruppen sowohl Verknüpfungen zur Oberfläche als auch zu einem zweiten Biomolekül bewirken (Coimmobilisierung). In diesem Fall werden dann die Eigenschaften des zweiten Biomoleküls untersucht. Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß mit ein und derselben Methode viele beliebige Proteine immobilisiert werden können. In Abbildung 7.9 sind die beiden Verfahren skizziert.

Bei der Coimmobilisierung wird eine Mischung aus Photovernetzer (T-BSA) und dem zu untersuchenden Biomolekül in einem bestimmten Verhältnis auf die

Umsetzung von BSA mit TRIMID



Carbenbildung

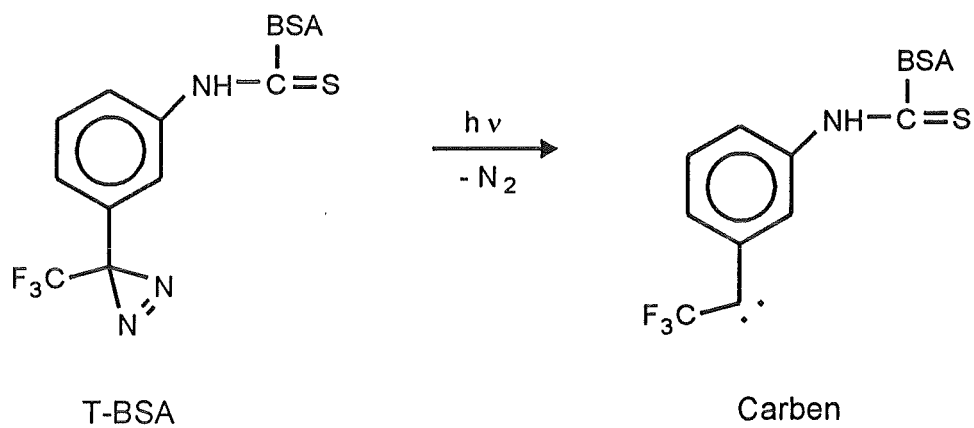
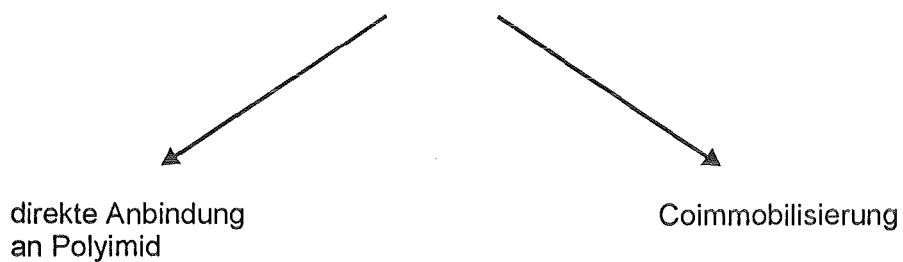
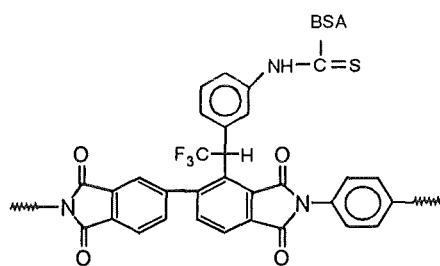


Abbildung 7.8: Modifikation von Rinderserumalbumin mit TRIMID und Ausbildung eines Carbens aus T-BSA durch Lichteinstrahlung

Mögliche Wege der Photoimmobilisation



Das Carben insertiert
in eine Kohlenstoffbindung.



T-BSA wird als Photovernetzer
verwendet. Das entstandene
Carben insertiert sowohl in
Polyimid als auch in ein
beliebiges Biomolekül.

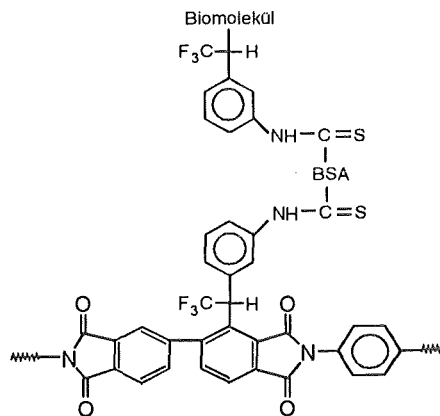


Abbildung 7.9: Mögliche Wege der Photoimmobilisation

Oberfläche aufgebracht und bestrahlt. Im Vergleich zu den etablierten Immobilisationsmethoden (siehe Kapitel 3.6) stellt dies eine äußerst einfache Prozedur dar. Nachteil ist jedoch die fehlende Ausrichtung der Biomoleküle, was gerade in der Immunochemie oft ein entscheidendes Problem darstellt. Sind beispielsweise die antigenbindenden Stellen des Antikörpers nicht in den Analytraum gerichtet, sondern in der Proteinmatrix eingebettet, so spielen Diffusionsprozesse in zunehmenden Maße eine Rolle.

7.2.2 Photoimmobilisation von Rinderserumalbumin

Die Frage nach der Durchführbarkeit der Photoimmobilisation auf OFW-Bauelementen wurde zuerst an dem immunologisch einfachen Beispiel der Reaktion zwischen polyklonalen Antikörpern gegen Rinderserumalbumin und immobilisiertem T-BSA untersucht. Zu diesem Zweck wurde versucht, T-BSA auf der polyimidierten Sensoroberfläche kovalent zu binden. Ausgehend von diesen grundlegenden Experimenten sollten Erfahrungen für die Photoimmobilisation von Glucoseoxidase bzw. anti-Glucoseoxidase gewonnen werden.

7.2.2.1 Durchführung der direkten T-BSA-Anbindung

Da Carbene auch mit Wasser reagieren, erwies sich der Wassergehalt der Proteinmatrix als Problem. Aus diesem Grund enthält die Standardmethode zur Anbindung von T-BSA an SiO_2 -, TiO_2 -, Si_3N_4 -Oberflächen einen Trockenschritt im Vakuumschrank, um den Wassergehalt der Probe zu minimieren [Sig92].

Diese Prozedur wurde zunächst auf die OFW-Sensoren angewandt und die beschichteten Sensoren beprobt. Dabei zeigte sich, daß die abgeschiedene Proteinmenge zu groß war: die Oberflächenwelle wurde so stark gedämpft, daß kein Resonanzverhalten des Bauelements beobachtet werden konnte. Aus den bisherigen Untersuchungen an OFW-Sensoren war bekannt, daß sich Rinderserumalbumin unspezifisch an Polyimid abscheidet (siehe Kapitel 5.2.5). Deshalb wurden 50 μl T-BSA mit einer Massenkonzentration von 2 mg/ml bei einer Inkubationszeit von 30 min auf den Sensor aufgebracht. Die hohe Proteinkonzentration sowie die lange Einwirkzeit sollten zur Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen führen, so daß sich das Protein an der Oberfläche des Sensors anreichert. Anschließend wurde der Sensor mit einer Quecksilberdampfampe 30 min belichtet. Nach der Belichtung wurde das Bauelement in den Oszillatorschaltkreis eingebaut und mit Phosphatpuffer bis zur Konstanz der Resonanzfrequenz gespült.

7.2.2.2 Immunologische Untersuchungen an T-BSA

Bei den immunologischen Untersuchungen an bromcyan-aktivierten Oberflächen wurden Antikörper immobilisiert und mit Antigenen beprobt (siehe Kapitel 7.1). Im Unterschied dazu wurde für die Messungen an photoimmobilisierten Proteinen die Beprobungsmethode prinzipiell geändert. Da es sich bei Antikörpern um sehr

teure Analyte handelt, wurden diese nur in geringen Mengen über die Sensoren geleitet. Aus diesem Grund wurde nach der Ventilumschaltung der Abfallstrom zurück in das Antikörpervorratsgefäß geleitet und der Analyt somit bis zur Einstellung einer konstanten Resonanzfrequenz im Kreis gepumpt. Durch diese Maßnahme wurde dem Analyten zusätzlich ca. 25–35 μl Puffer aus der Probekammer sowie den Zuleitungen zugemischt. Die durch Verdünnung entstandenen Meßfehler sind jedoch klein und bei allen Messungen etwa konstant.

Abbildung 7.10 zeigt eine Frequenzabnahme von ca. 260 kHz bei der Beprobung mit polyklonalen Antikörpern gegen Rinderserumalbumin eines mit T-BSA beschichteten Sensors. Ein ebenfalls mit T-BSA beschichteter Sensor weist dagegen wie erwartet bei Beprobung mit monoklonalen Antikörpern gegen Peroxidase (anti-POD) keine Frequenzänderung auf. Zum Vergleich wurde ein polyimidisierter Sensor, der nicht mit Protein beschichtet war, mit anti-BSA beprobt. Die Frequenzabnahme von 38 kHz liegt im Rahmen dessen, was man für die unspezifische Absorption von Proteinen an der Sensoroberfläche erwartet. Dieses Experiment zeigt, daß das immobilisierte Protein den polyklonalen Antikörper gegen BSA „erkennt“. Damit konnte demonstriert werden, daß die hier beschriebene Methode der Photoimmobilisation grundsätzlich für OFW-Bauelemente geeignet ist.

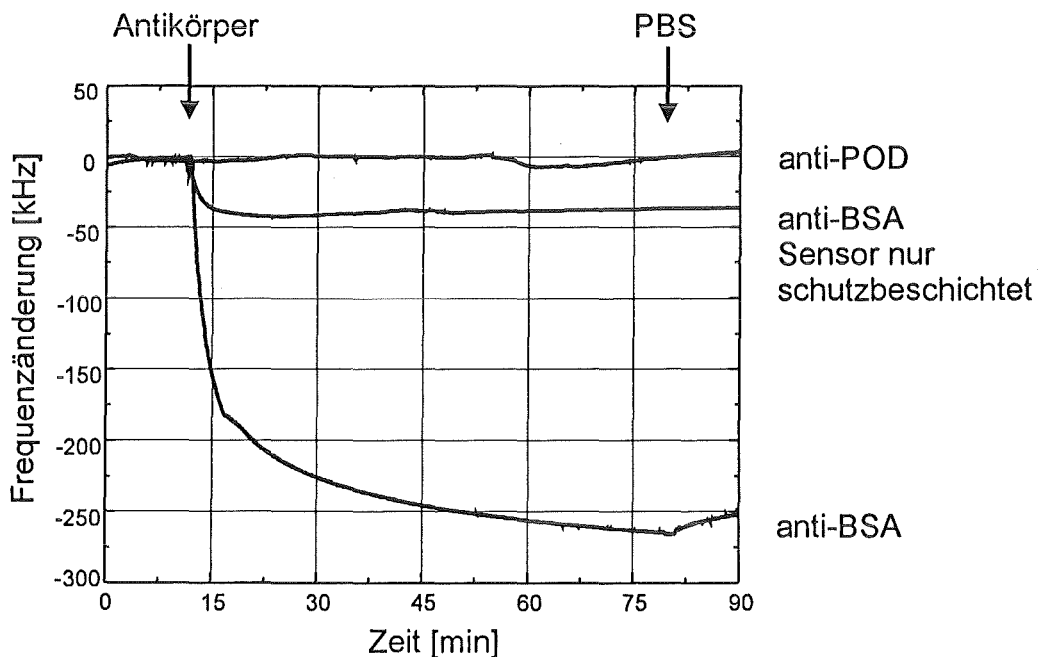


Abbildung 7.10: Immunoreaktion zwischen polyklonalen Antikörpern und immobilisiertem T-BSA sowie Kontrollexperimente

7.2.2.3 Konzentrationsreihe polyklonaler Antikörper gegen BSA

Die Immobilisation von T-BSA auf OFW-Bauelementen erfolgte wie in Kapitel 7.2.2.1 beschrieben. Die jeweils mit der gleichen Antigenmenge beschichteten Sensoren wurden anschließend mit unterschiedlichen Antikörpermengen beprobt.

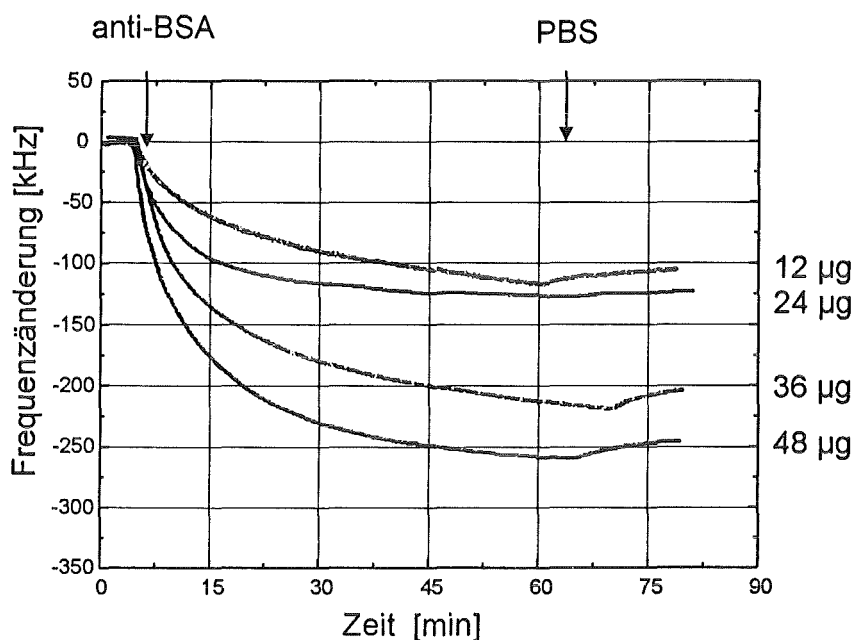


Abbildung 7.11: Konzentrationsreihe polyklonaler BSA-Antikörper

In Abbildung 7.11 sind einige der Sensorantworten bei der Immunreaktion dargestellt. Man erkennt, daß mit steigender Antikörpermenge im Analytstrom zum einen die Resonanzfrequenzänderung zunimmt und zum anderen dieser Signalunterschied immer schneller erreicht wird. Damit ergeben sich prinzipiell zwei Möglichkeiten der Auswertung: einerseits die Analyse der Frequenzänderung und andererseits die Interpretation der Anfangsgeschwindigkeit.

7.2.2.3.1 Auswertung der Frequenzänderung

Die Auswertung der Resonanzfrequenzänderung mit steigender Antikörpermenge ergibt den in Abbildung 7.12 gezeigten Kurvenverlauf.

Es ist ein linearer Anstieg mit steigender Antikörpermenge zu erkennen. Die Steigung der Kurve wurde durch lineare Regression bestimmt ($r=0.9827$) und es ergab sich daraus eine Sensorempfindlichkeit von 4 Hz/ng. Der Ordinatenabschnitt der Gerade erklärt sich aus der Tatsache, daß ein Proteins Serum auf Grund seiner Viskosität sowie durch Besetzung unspezifischer Bindungsstellen auch ohne Antikörper eine Frequenzänderung hervorruft.

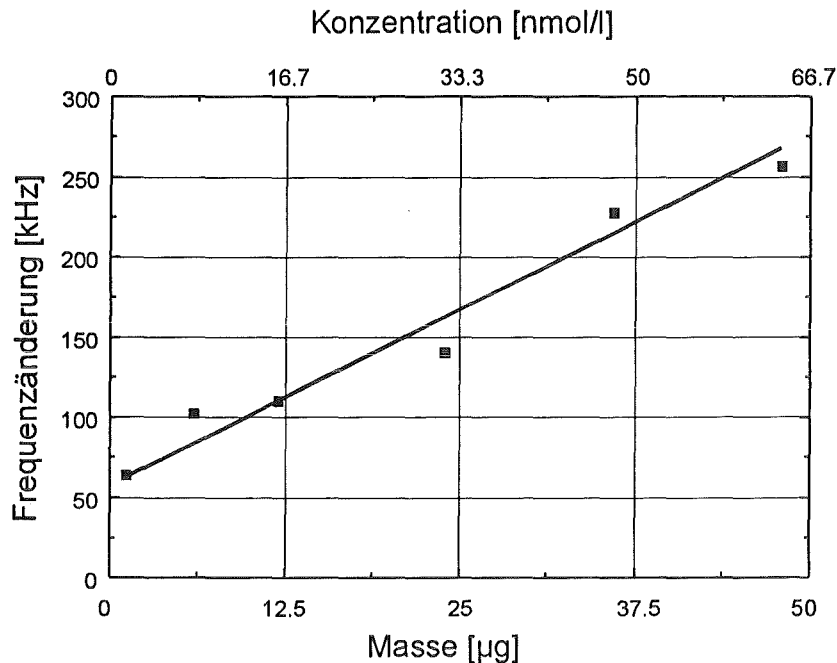


Abbildung 7.12: Resonanzfrequenzänderung durch die Immunreaktion als Funktion der BSA-Antikörper im Analytstrom

7.2.2.3.2 Auswertung der Anfangsgeschwindigkeit

Um die Korrelation zwischen Antikörpermenge und Reaktionsgeschwindigkeit zu bestimmen, wurde für jede Messung die Anfangsgeschwindigkeit der Immunreaktion ermittelt. Aus den Meßpunkten innerhalb der ersten Minute nach Analytzugabe konnte durch lineare Regression die Frequenzabnahme pro Zeiteinheit berechnet werden. Diese kurze Zeit wurde gewählt, damit Verdünnungen im Analytstrom durch den Wechsel auf das Kreispumpen (siehe Kapitel 7.2.2.2) nicht ins Gewicht fallen. Abbildung 7.13 zeigt das beschriebene Verfahren mit den dazugehörigen Regressionsdaten. Die Korrelationskoeffizienten waren bei allen ausgewerteten Kurven deutlich größer als 0.98.

Die so ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten korrelieren mit der zugegebenen Antikörpermenge. Abbildung 7.14 zeigt einen deutlich linearen Zusammenhang zwischen den beiden Größen ($r=0.9933$). Die Steigung der Korrelationsgerade betrug $18.17 \text{ Hz}/(\text{s } \mu\text{g})$.

7.2.2.4 Bestimmung der Nachweisgrenze

Für die Resonanzfrequenzänderung wurde die kleinste noch detektierbare Antikörpermenge bestimmt. Unter Einberechnung des dreifachen Rauschens ($3 \cdot 40 \text{ Hz}$) konnte mit Hilfe der Daten aus Kapitel 7.2.2.3.1 die Nachweisgrenze für polyklonale Antikörper gegen T-BSA (Molekulargewicht= 150000 g/mol) bestimmt werden [Sch92].

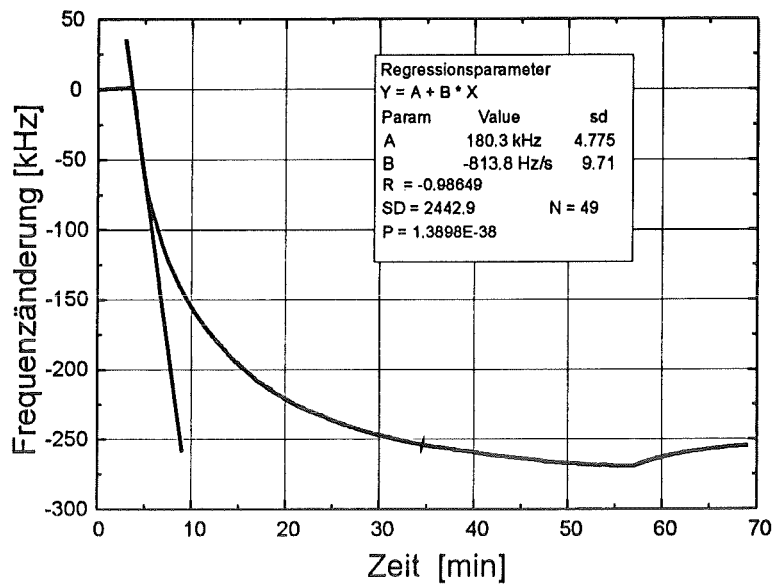


Abbildung 7.13: Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit der T-BSA-Immuno-reaktion, Analytkonzentration: 20 μ l anti-BSA

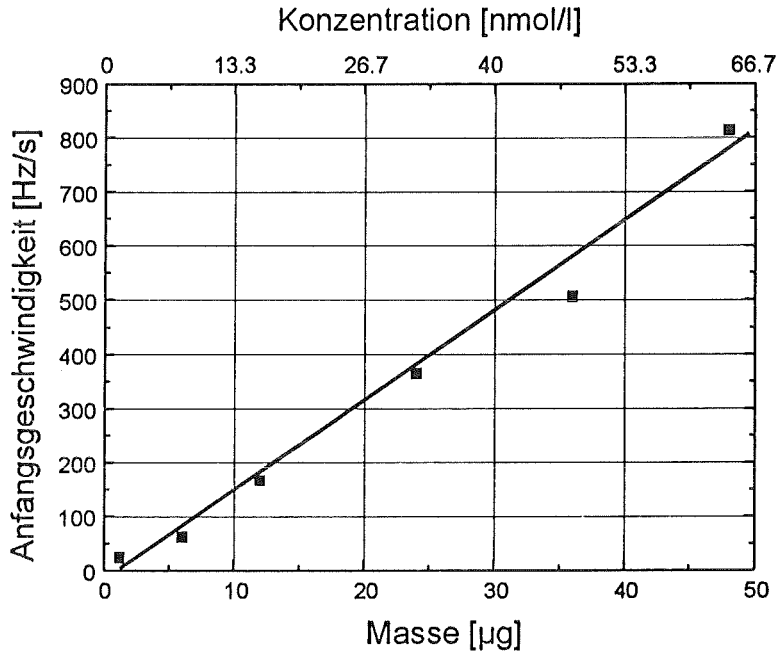


Abbildung 7.14: Anfangsgeschwindigkeit der Immunoreaktion als Funktion der Masse der polyklonalen BSA-Antikörper

Aus der linearen Regression der Daten von Abbildung 7.12 ergibt sich ein Achsenabschnitt von 63.417 kHz und eine Empfindlichkeit von 4 Hz/ng. Daraus resultiert eine Nachweisgrenze von 30 ng, was 0.2 pmol entspricht. Da die Antikörpermenge jeweils in 5 ml Phosphatpuffer gelöst wurde, ergibt dies eine Molarität von 40 pmol/l.

7.2.3 Regeneration der Sensoren

Die Anforderungen an einen Sensor beinhalten neben Sensitivität und Selektivität auch die Reversibilität. Dieser Aspekt spielt bei Immunosensoren allerdings eine untergeordnete Rolle, da biologisches Material nach der Immobilisierung nur bedingt stabilisiert werden kann. Dennoch ist es ein Ziel der Forschung, den Immunokomplex zu zerstören, ohne dabei die Erkennungszentren des immobilisierten Moleküls anzugreifen.

Da sich die verwendeten Sensoren auch nach der Polyimidisierung labil gegenüber den notwendigen pH-Wertänderungen erwiesen, konnten die üblichen Methoden zur Regeneration nicht angewandt werden¹.

Eine schonendere Methode ist die Ausnutzung des chaotropen Effekts. Dabei werden mit einer hochkonzentrierten Elektrolytlösung die hydrophoben Wechselwirkungen im Komplex gestört. Ionen, die die Proteindenaturierung beeinflussen, sind in der Hofmeister-Serie (siehe Kapitel 3.4) nach Stabilisierungseinfluß angeordnet. Zu den stabilisierenden Ionen gehören Dihydrogenphosphat, Sulfat, Ammonium sowie Kalium. Die denaturierenden Einflüsse werden durch Rhodanid, Perchlorat oder Iodid, bzw. durch die Kationen von Barium und Kalzium hervorgerufen. Für die Untersuchung der chaotropen Wirkung an proteinbeschichteten Oberflächenwellenelementen wurde Kaliumrhodanid verwendet.

Auf dem Sensor wurde jeweils T-BSA immobilisiert und anschließend mit 24 µg Antikörper beprobt; der Volumenstrom betrug 1 ml/min. Um den Komplex zwischen T-BSA und polyklonalen anti-BSA-Molekülen zu lösen, wurden die Sensoren nach der Immunoreaktion mit einer 3 M KSCN-Lösung beprobt. Das Verhalten der Sensoren während der Regeneration konnte auf Grund der hohen Ionenleitfähigkeit der Regenerationslösung nicht beobachtet werden. Nach einer definierten Zeit wurde das Bauelement wieder mit PBS beprobt und nach Signalkonstanz die gleiche Antikörpermenge über den Sensor geleitet, wie vor der Regeneration. Als Regenerationsrate wurde das Verhältnis der Frequenzänderungen definiert, das sich aus der Signalabnahme einer Immunoreaktion nach der Regeneration zu der Frequenzänderung, die durch die ursprüngliche Immunoreaktion bestimmt wurde, ergibt. In Abbildung 7.15 ist die Regenerationsrate gegen die Zeit aufgetragen, die der Sensor der KSCN-Lösung ausgesetzt war. Erste Versuche, bei denen nach der ersten Immunoreaktion die Regeneration durch Umschalten auf KSCN vorgenommen wurde, ergaben keinen Zusammenhang zwischen der Regenerationszeit und den Regenerationsraten.

¹Beispielsweise können Immunokomplexe zwischen Prostatakrebsantigenen und den zugehörigen monoklonalen Antikörpern mit Hilfe von Glycinpuffer (pH=2.3) vollständig gelöst und die immobilisierten Proteine wiederverwendet werden [Gao95].

Erst durch den Ausbau der Sensoren aus dem Meßadapter und Regeneration in einer separaten Meßanordnung konnte ein sinnvoller Zusammenhang erhalten werden. Die Ursache dafür liegt in der hohen Oberflächenaktivität von KSCN, wodurch es außerordentlich schwierig ist, Kaliumrhodanid aus der Apparatur vollständig zu entfernen.

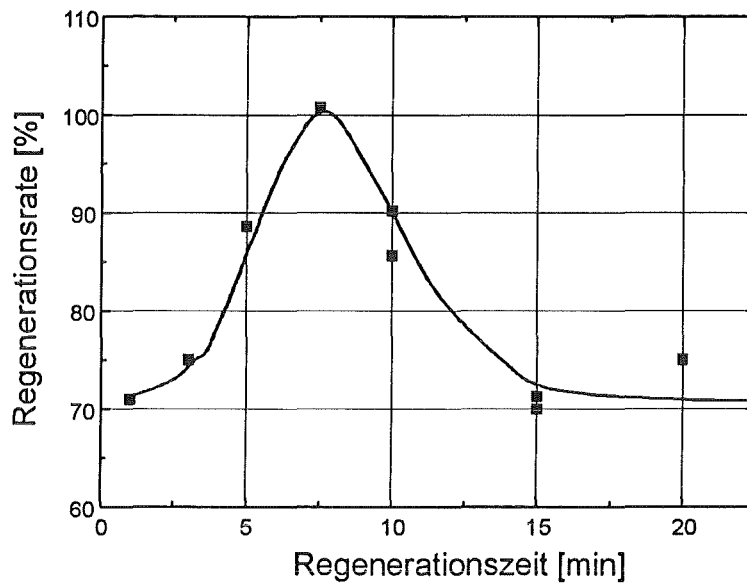


Abbildung 7.15: Bestimmung der optimalen Regenerationszeit des Antikörper-Antigen-Komplexes

Als optimale Regenerationszeit wurden 7.5 min bestimmt. Bei kürzeren Zeiten wird der Antikörper nicht vollständig vom Antigen gelöst, bei längeren Zeiten kann die Quartärstruktur der Proteine irreversibel verändert werden.

7.2.4 Coimmobilisierung von Glucoseoxidaseantikörpern

Die in Kapitel 7.2.1.2 vorgestellte Methode der Coimmobilisierung wurde an monoklonalen Antikörpern gegen Glucoseoxidase getestet. Mit diesem, im Vergleich zur Anbindung von Immunglobulinen durch die in Kapitel 7.1 beschriebene Cyanotransfertechnik einfachen Verfahren sollte es möglich sein, beliebige Immunglobuline der Klasse G auf analoge Weise zu immobilisieren und somit eine Beschichtungsserie aufzubauen.

7.2.4.1 Anbindung durch Coimmobilisierung

Bei der Anbindung von Glucoseoxidaseantikörpern wurde T-BSA als Photovernetzer eingesetzt. Dies hat einerseits den Vorteil, daß die unspezifischen Bindestellen auf der Sensoroberfläche durch T-BSA deutlich reduziert sein sollten und andererseits nur ein Protein mit TRIMID modifiziert werden muß, was dann mit beliebigen Antikörpern der Klasse G gemischt und immobilisiert werden kann. Entscheidend für die immunologischen Untersuchungen an coimmobilisierten binären Systemen ist das Masseverhältnis der beiden Proteine. In der Literatur wird für verschiedene Oberflächen ein Verhältnis von T-BSA zu Antikörper von 4:1 angegeben [Gao95].

7.2.4.1.1 Durchführung

Zur Beschichtung von OFW-Bauelementen wurden 50 μ l T-BSA (3 mg/ml) mit 5 μ l monoklonalen Antikörpern gegen Glucoseoxidase (7.5 mg/ml) gemischt (Vortex) und auf den Sensor pipettiert. Um eine Reaktion mit Wasser auszuschließen wurden die Bauelemente in einem Vakuumtrockenschrank 1 h bei Raumtemperatur und 2 mbar behandelt. Nach dieser Zeit erfolgte die Belichtung der Sensoren mittels einer Quecksilberdampfampe für 30 Minuten. Anschließend konnten die Bauelemente in die Meßadapter eingebaut und mit Phosphatpuffer bis zur Konstanz der Resonanzfrequenz gespült werden.

7.2.4.1.2 Immunoreaktion

Zunächst wurde der Sensor zur Absättigung der unspezifischen Bindestellen auf der Oberfläche mit Rinderserumalbumin (4 mg/ml) gespült und anschließend mit Glucoseoxidase (666.7 μ g/ml) beprobt. Das Blocken mit BSA verursachte eine Frequenzänderung von 10 kHz. In Abbildung 7.16 ist die Zugabe des Antigens dargestellt, die mit einer Signalverschiebung von 7.5 kHz verbunden ist.

Diese Untersuchungen zeigen im Vergleich zur Cyanotransfertechnik ein deutlich kleineres Signal bei Antigenbeprobung. Dies ist auf die kleinere Anzahl an Antikörpermolekülen auf der Sensoroberfläche zurückzuführen. Bei der Anbindung der Immunglobuline mit Hilfe der Coimmobilisation wird ein großer Teil der Oberfläche durch Rinderserumalbumin besetzt.

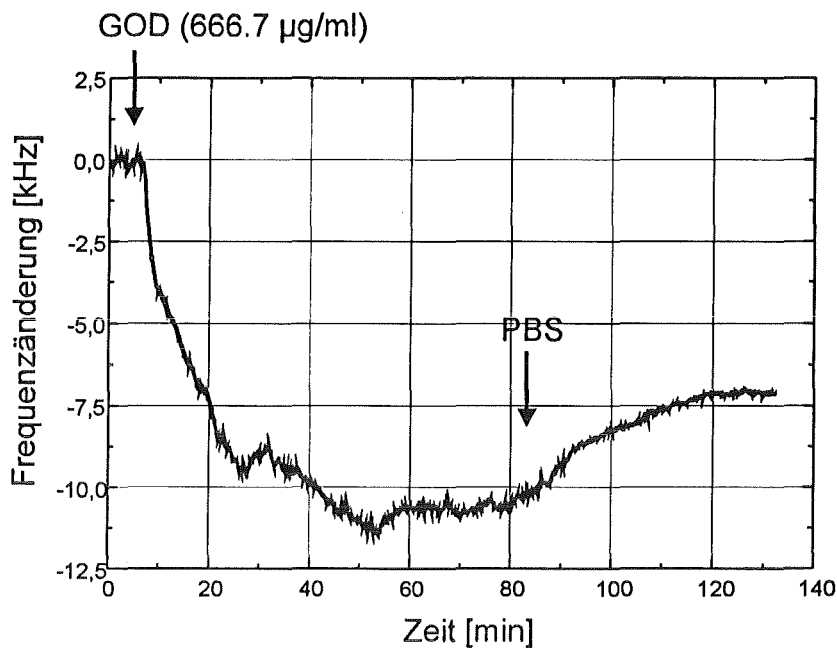


Abbildung 7.16: Immunreaktion von coimmobilisierten Glucoseoxidaseantikörpern mit Glucoseoxidase

7.2.5 Direkte Photoimmobilisation von Glucoseoxidase

7.2.5.1 Präparation und Charakterisierung von T-GOD

Da die immunochemischen Versuche mit coimmobilisierten Glucoseoxidaseantikörpern nicht den gewünschten Erfolg zeigten, wurde das Antigen Glucoseoxidase direkt mit TRIMID umgesetzt, um so zu einem photoreaktiven Protein zu gelangen. Den Antikörper selbst mit TRIMID zu modifizieren kam aus Kostengründen nicht in Betracht.

Synthese von T-GOD

Der Syntheseweg konnte nicht direkt von T-BSA auf T-GOD übertragen werden, da Glucoseoxidase das Coenzym FAD enthält (siehe Kapitel 4.2.1.1), das nicht kovalent an das Enzym gebunden ist. Die Umsetzung von GOD mit TRIMID erfolgte anfangs bei pH 11.4 durch Inkubation bei 50°C. Nach der Durchführung der Standardprozedur war Glucoseoxidase zwar mit TRIMID modifiziert, das Coenzym aber abgetrennt, was durch das UV-Spektrum nachgewiesen wurde. Es konnte eine Schulter bei 348 nm festgestellt werden, die FAD-Peaks bei 375 bzw. 450 nm waren nicht mehr zu erkennen. Deshalb wurde zunächst der Einfluß des pH-Werts sowie der Temperatur auf das Enzym untersucht:

- pH-Wert-Einfluß

Um die Wirkung des pH-Wertes auf Glucoseoxidase zu bestimmen, wurde das Enzym in wässrige Triethylaminlösung (0.1 Vol-%, TEA) von pH 11.4 gebracht (Proteinkonzentration = 5.7 mg/ml) und mehrere Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach der chromatographischen Abtrennung über einer PD10-Säule zeigte die Proteinfraction im UV-Spektrum die FAD-Peaks. Dies bedeutet, daß der erhöhte pH-Wert keinen Einfluß auf die enzymatische Aktivität von Glucoseoxidase besitzt und somit nicht denaturierend wirkt.

- Temperatureinfluß

Die Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Aktivität konnte in ähnlicher Weise bestimmt werden. Eine GOD-Lösung in TEA (pH=11.4) wurde 2 Stunden bei 50°C inkubiert und anschließend chromatographiert. Das UV-Spektrum der Proteinfraction zeigte keine FAD-Peaks mehr, diese waren erst einige Fraktionen später zu erkennen. Dies bedeutet, daß die hohe Temperatur für die Abtrennung des Coenzym verantwortlich war. Aus diesem Grund wurden Inkubationen für 2 h bei 37°C sowie über Nacht bei Raumtemperatur getestet.

Beide Prozeduren zeigten keine Abtrennung von FAD, was auch die Aktivitätsüberprüfung dokumentierte.

Nach diesen Voruntersuchungen wurde T-GOD nach folgender Vorschrift hergestellt:

- 242.36 mg GOD wurden in 42 ml 0.1 Vol-% TEA (in Wasser, pH=11.4) gelöst
- Zugabe von 17.5 mg TRIMID in 500 µl Chloroform
- Zugabe von 900 µl Ethanol (abs.)
- 2-3 min im Ultraschallbad beschallen, wobei eine milchig gelbe Suspension entstand
- 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubieren
- über eine G-25-Säule chromatographieren (vorher über Nacht mit Phosphatpuffer 1:100 equilibriert)

Bei der Chromatographie wurden 43 Fraktionen zu je 8 ml geschnitten. Von den einzelnen Fraktionen wurden jeweils 100 µl entnommen und auf das 10-fache verdünnt. Von diesen Lösungen konnten die Extinktionen des Proteins bei 280 nm sowie die FAD-charakteristischen Extinktionen bei 375 nm bzw. 450 nm bestimmt werden (siehe Abbildung 7.17).

Man erkennt, daß ein Teil des FAD's bei der Reaktion abgetrennt wurde, der Hauptanteil des Coenzym aber am Protein gebunden blieb. Es sind jedoch zwei unterschiedliche Spezies von Glucoseoxidase entstanden, die einen unterschiedlichen FAD-Gehalt aufweisen. Die Fraktionen mit dem höheren FAD-Anteil (Fraktion

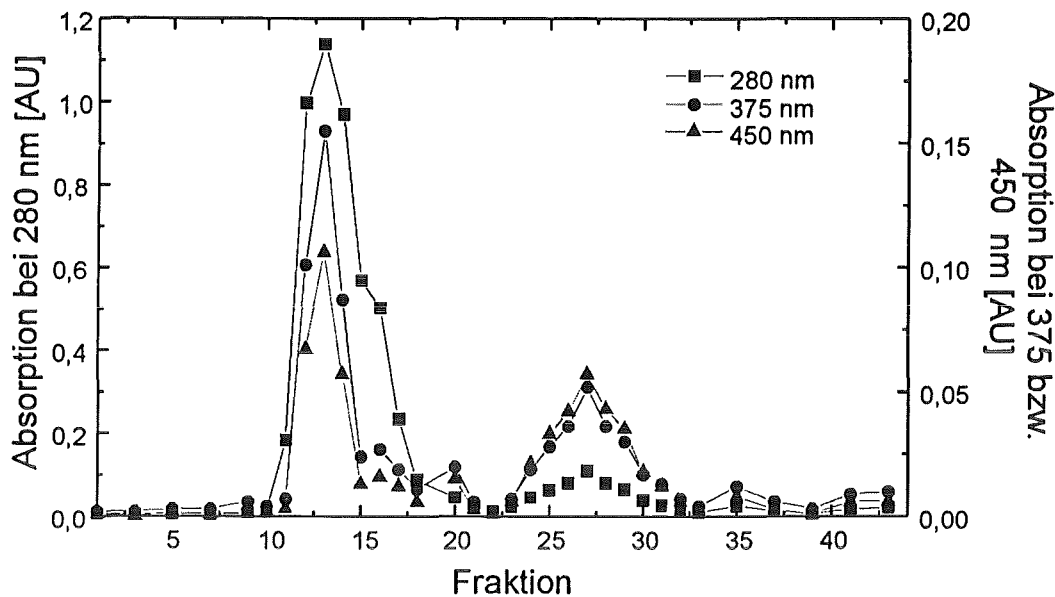


Abbildung 7.17: Extinktionen der Fraktionen nach der Chromatographie

12 und 13) wurden vereinigt und alle weiteren Untersuchungen beziehen sich auf diese Proteinlösung. Die Fraktionen mit dem niedrigeren FAD-Gehalt (Fraktion 14–16) wurden verworfen. Außerdem ist zu erkennen, daß in den Fraktionen 23–30 abgetrenntes FAD zu finden ist. Es handelt sich vermutlich um dem Enzympräparat zusätzlich zugesetztes FAD (siehe Anhang A.4.2).

Proteinbestimmung nach Lowry

Eine Bestimmung der Proteinkonzentration ist mit der Methode nach Lowry möglich [Low51]. Dazu wurde ein speziell vorbereiteter BSA-Standard als Referenz vermessen (siehe Anhang A.1) und die Extinktionen des T-GOD darauf bezogen.

Für diese Untersuchung war eine Stammlösung aus 0.5 ml 2%-iger CuSO_4 -Lösung, 0.5 ml 2%-iger Tartratlösung und 49 ml 2%-iger Na_2CO_3 -Lösung in 0.1 M NaOH notwendig. Um die Proteinkonzentration der Fraktionen 12 und 13 zu bestimmen, wurden 100 μl mit PBS (1:100) auf 1 ml verdünnt und 6 Proben hergestellt, indem jeweils 10 μl , 20 μl und 30 μl auf 200 μl mit PBS (1:100) verdünnt wurden (Doppelbestimmung). Zu diesen Proben kam je 1 ml der Stammlösung hinzu, das Gemisch wurde 10 min stehen gelassen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 μl 0.5 N Folinlösung, die ein Extinktionsmaximum bei 578 nm erzeugt, was nach 30 min vermessen werden konnte. Die Reaktion beruht auf der Ausbildung eines Kupfer-Proteinkomplexes. Bei der Zugabe des Folin wird dieser Komplex dadurch gestört, daß das Tyrosin von dem im Folin enthaltenen Molybdat oxidiert wird. Dadurch kommt es zur Änderung der Absorption im untersuchten Wellenlängenbereich. Abbildung 7.18 zeigt die Meßpunkte sowie die Regressionsgerade, deren Korrelationskoeffizient größer 0.99 sein sollte, um von aussagekräftigen Messungen zu spre-

chen.

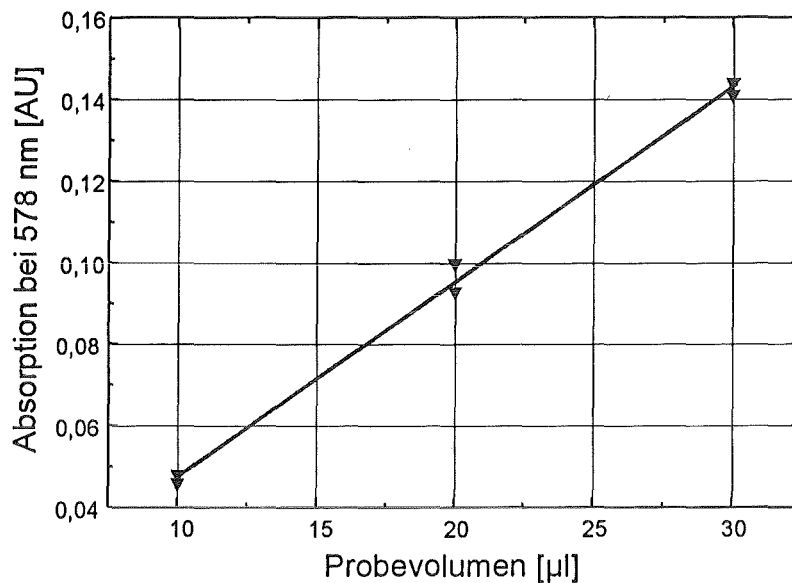


Abbildung 7.18: Bestimmung der Proteinkonzentration von T-GOD nach Lowry

Mit Hilfe des BSA-Standards konnte anschließend die Proteinmenge von T-GOD errechnet werden, indem die Volumina von T-GOD in die Regressionsgleichung für T-BSA eingesetzt wurden. Die Daten sind in Tabelle 7.1 zusammengefaßt:

Tabelle 7.1: Ergebnisse der Proteinbestimmung nach Lowry

Volumen [µl]	E ₅₇₈ [AU]	Masse [µg]	Prot.konz. [mg/ml]
10	0.048	4.05	0.405
10	0.046	3.86	0.386
20	0.100	9.02	0.451
20	0.093	8.35	0.418
30	0.141	12.95	0.431
30	0.144	13.23	0.441

Daraus ergibt sich unter Berücksichtigung der anfänglichen zehnfachen Verdünnung ein Mittelwert für die Proteinkonzentration von 4.22 mg/ml bei einer Standardabweichung von 0.0219.

Bestimmung des TRIMID-Gehalts in T-GOD

Der Trimidgehalt eines Proteins kann durch den Extinktionsunterschied einer Probe vor und nach dem Belichten bei 348 nm überprüft werden. Bei Glucoseoxidase stellt sich das Problem, daß die FAD-Moleküle in diesem Bereich ebenfalls Licht absorbieren, was den TRIMID-Peak überdeckt. Bei der Bestimmung des TRIMID-Anteils in T-GOD wurde die Tatsache ausgenutzt, daß das FAD nach einer Inkubation bei erhöhter Temperatur vom Enzym abgetrennt wird. Da der FAD-Peak die Absorptionsbande von TRIMID überlagert, wurde zur Detektion von TRIMID zunächst das FAD abgetrennt, indem das Protein (jeweils 500 μ l) 2 h bei 50°C inkubiert und anschließend die Lösung über eine PD10-Säule chromatographiert wurde. In der Enzymfraktion war danach nur noch der Proteinpeak bei 280 nm erkennbar. Die Proteinfraktion wurde dann in der Küvette 2 mal je 10 min belichtet und nach jeder Belichtung ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Man erkennt in Abbildung 7.19 deutlich eine Veränderung der Absorption zwischen 340 nm und 400 nm, also im Bereich der TRIMID-Bande.

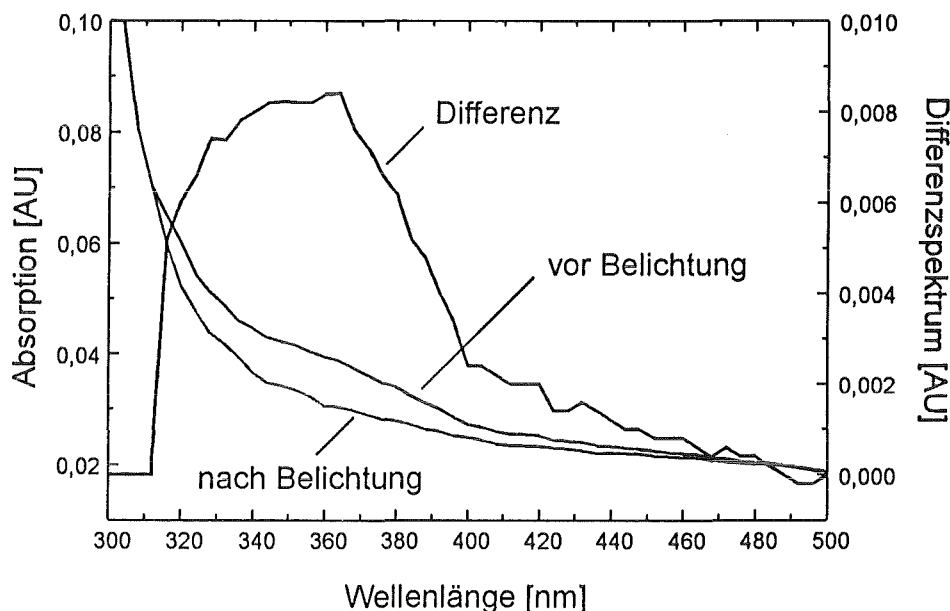


Abbildung 7.19: Bestimmung des TRIMID-Gehalts in T-GOD durch Bestimmung des Absorptionsunterschieds bei 348 nm vor und nach der Belichtung des Enzyms

Der Extinktionsunterschied vor und nach der Belichtung von Glucoseoxidase bei 348 nm beträgt 0.00824 Absorptionseinheiten. Der Extinktionskoeffizient von TRIMID beträgt 446 (M cm)^{-1} . Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet sich der TRIMID-Gehalt daraus zu 9.24 nmol. Da 500 μ l Enzym mit einem Proteingehalt von 4.22 mg/ml vermessen wurden, ergibt sich ein unterstöchiometrisches Verhältnis von 9.24 mol TRIMID pro 11.4 mol GOD.

Dieses Verhältnis konnte in der Arbeitsgruppe von Herrn Sigrist durch zwei Modifikationen der Präparationstechnik auf 6.5 mol TRIMID pro 1 mol GOD verbessert werden. Einerseits wurde dazu die Proteinlösung vor der Inkubation mit NaOH wieder auf einen pH-Wert von 11.4 eingestellt, nachdem er sich durch das Lösen von Glucoseoxidase erniedrigt hatte, andererseits wurde der Reaktionsmischung Glucose zugesetzt, was die enzymatisch aktiven Zentren schützt und einen Einbau des photoaktiven Moleküls an diesen Stellen unterbindet. Dies kann vor allem an der Zunahme der Aktivität der höher modifizierten T-GOD-Lösungen erkannt werden. Diese Schutzmaßnahme verhindert aber nicht die eventuelle Modifikation der immunochemisch aktiven Zentren der Antigenfunktion.

Enzymatische Aktivität von T-GOD

Die enzymatische Aktivität des modifizierten Proteins konnte spektroskopisch ermittelt werden. Dazu wurden 50 μl T-GOD, die 8.73 μg Protein enthielten, mittels des in Anhang A.2 beschriebenen Assays untersucht. Die Absorptionzunahme bei 520 nm ist in Abbildung 7.20 dargestellt.

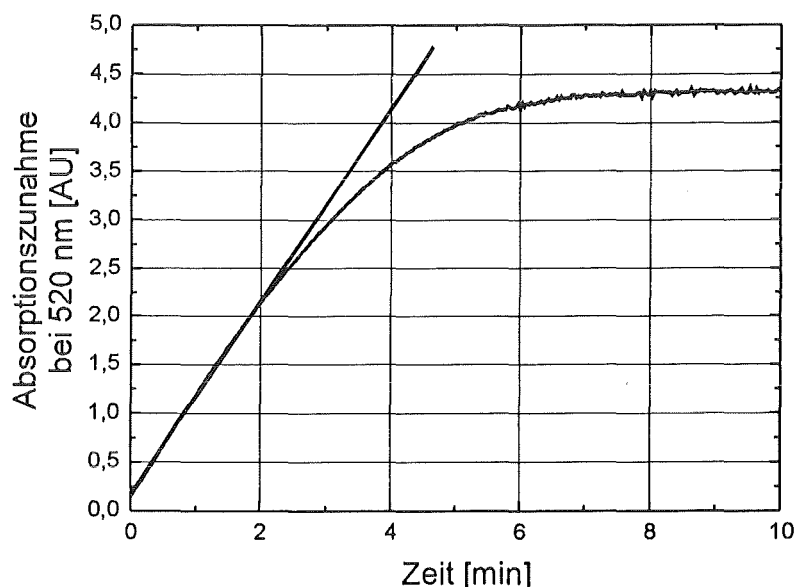


Abbildung 7.20: Detektion der enzymatischen Aktivität von T-GOD

Die Bestimmung der Absorptionzunahme mittels linearer Regression ergab für den ersten Kurvenabschnitt einen Wert von 0.989 min^{-1} . Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes kann daraus die spezifische Enzymaktivität der modifizierten Glucoseoxidase mit 34.92 units/mg bestimmt werden (siehe Anhang A.2).

7.2.5.1.1 Radioaktive Markierung von T-GOD und Charakterisierung von [^{14}C]-T-GOD

Um die Anbindung von T-GOD auf einer Oberfläche und im speziellen an Polyimid zu beobachten, wurde das erzeugte T-GOD mit [^{14}C] markiert. Dazu wurde die Glucoseoxidase zunächst reduktiv methyliert und immobilisiert.

Reduktive Methylierung von Glucoseoxidase

Bei der reduktiven Methylierung werden Aminofunktionen mit Formaldehyd umgesetzt und die entstehenden Schiffischen Basen reduziert [Jen79]. Diese hochspezifische Reaktion greift nur die ϵ -Aminogruppen der Lysineinheiten im Protein sowie den N-Terminus in der Aminosäuresequenz an. Um eine Denaturierung durch Zerstörung der Disulfidbrücken sowie die sofortige Reduktion des Formaldehyds zu vermeiden, wird als mildes Reduktionsmittel ein Cyanborhydrid verwendet, was zu N,N-Dimethylderivaten führt. Diese Methode eignet sich besonders zur radioaktiven Markierung von Proteinen, wenn [^{14}C]- oder [^3H]-Formaldehyd verwendet wird. Es resultiert eine nahezu vollständige Umsetzung bei Einsatz des sechsfachen Überschusses an Formaldehyd, bezogen auf die Proteinmasse.

Da die reduktive Methylierung in HEPES-Puffer (pH=7.5) abläuft, wurde 1 ml T-GOD (4.22 mg/ml) über einer PD10-Säule umgepuffert und die Proteinfraction zur radioaktiven Markierung verwendet. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

- 800 μl der Proteinfraction wurden in ein lichtgeschütztes Reaktionsgefäß gebracht (Schutz der TRIMID-Gruppe)
- Zugabe von 6.5 μl [^{14}C]-Formaldehyd (=200 nmol), mit einer Radioaktivität von 11.6 μCi
- Zugabe von 100 μl NaCNBH₃, (=240 mmol/l)
- auffüllen mit HEPES-Puffer auf 1 ml
- 3 h rühren bei Raumtemperatur
- das Produkt wurde über einer PD10-Säule chromatographiert, um überschüssiges Formaldehyd abzutrennen

Proteinbestimmung von [^{14}C]-T-GOD nach Lowry

Die T-GOD-Fraktion des radioaktiv markierten Enzyms wurde wie in Kapitel 7.2.5.1 beschrieben auf den Proteingehalt untersucht. Die Korrelation zwischen Absorptionseinheiten und Volumina ist in Abbildung 7.21 dargestellt, der Korrelationskoeffizient beträgt 0.9976. Die Daten sind in Tabelle 7.2 zusammengefaßt.

Daraus ergibt sich ein Mittelwert für die Proteinkonzentration von 0.915 mg/ml (Standardabweichung = 0.0424).

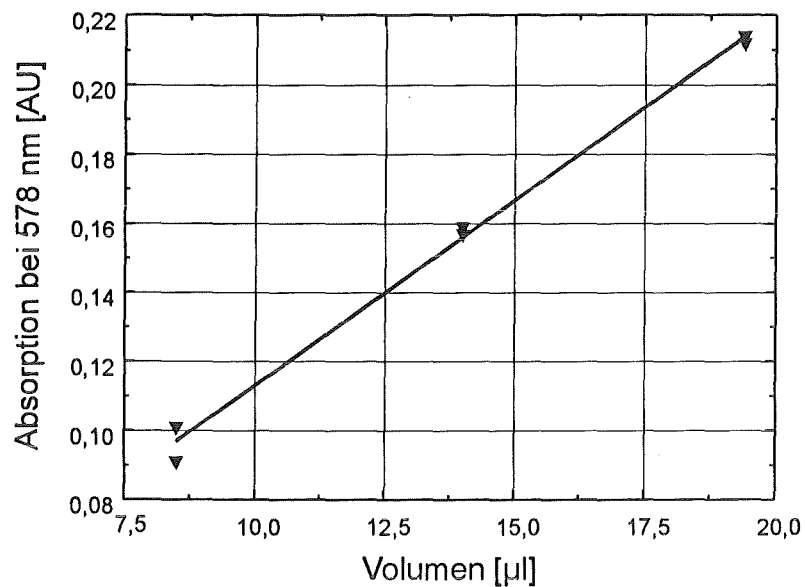


Abbildung 7.21: Bestimmung der Proteinkonzentration von $[^{14}\text{C}]\text{-T-GOD}$ nach Lowry

Tabelle 7.2: Ergebnisse der Proteinbestimmung von $[^{14}\text{C}]\text{-T-GOD}$ nach Lowry

Volumen [µl]	E_{578}	Masse [µg]	Prot.konz. [mg/ml]
8.5	0.101	7.89	0.928
8.5	0.091	6.98	0.821
14	0.157	12.98	0.927
14	0.159	13.17	0.941
19.5	0.214	18.17	0.932
19.5	0.216	18.35	0.941

Tabelle 7.3: Zusammenstellung der verwendeten Glasträger

^{14}C -T-GOD [μl]	Einwirkzeit	Belichtungsdauer [min]
50	30 min	0
50	30 min	30
30	über Nacht	0
30	über Nacht	30

Bestimmung des [^{14}C]-Anteils

Um den Grad der radioaktiven Modifizierung von T-GOD zu bestimmen, wurden jeweils 5 μl der einzelnen Fraktionen der [^{14}C]-T-GOD-Synthese mit 5 ml Szintillationslösung (siehe Anhang A.3) vermischt (Vortex) und die β -Strahlung bestimmt (Doppelbestimmung). In der Proteinfraction wurde eine Aktivität von 2793 dpm gefunden. Die Korrelation dieser Werte mit den Ergebnissen der Lowrybestimmung ergab 597 dpm/ μg Protein.

Nachweis der enzymatischen Aktivität von [^{14}C]-T-GOD

Die enzymatische Aktivität der radioaktiv markierten Proteinfraction wurde wiederum mittels des im Anhang A.2 beschriebenen Verfahrens bestimmt. Dazu wurden 20 μl dieser Fraktion mit HEPES auf 200 μl verdünnt und von 50 μl dieser Lösung die enzymatische Aktivität bestimmt (=4.6 μg). Die Auswertung ergab eine Absorptionzunahme von 0.27 min^{-1} , was einer spezifischen Enzymaktivität von 18.19 units/mg entspricht. Das bedeutet, daß selbst nach zwei Modifikationen des Proteins die enzymatische Aktivität noch vorhanden ist.

7.2.5.1.2 Anbindung von [^{14}C]-T-GOD an Polyimid

Um die Ankopplung des Proteins an Polyimid zu beobachten, wurden Deckplättchen aus Glas polyimidisiert, anschließend mit [^{14}C]-T-GOD beprobt und die Radioaktivität gemessen. Die Versuchsreihe beinhaltete vier verschiedene Behandlungsmöglichkeiten der Glasträger, die in Tabelle 7.3 zusammengefaßt sind. Auf die polyimidisierten Glasplättchen wurde das entsprechende Volumen des radioaktiv markierten Enzyms aufgebracht, nach einer definierten Einwirkzeit belichtet und anschließend gewaschen. Als Kontrollexperiment wurden analog behandelte, jedoch unbelichtete Plättchen mitgeführt.

Die Waschprozedur bestand aus fünfmaligem Spülen der Plättchen mit einer Lösung aus 50 mM PBS, 150 mM NaCl sowie 0.02 Vol-% TWEEN 20. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden die Abdeckplättchen in die Szintillationsröhren gebracht, mit 5 ml Szintillationslösung bedeckt und nach kurzem Mischen (Vortex) die β -Strahlung der polyimidisierten Glasträger bestimmt. In Abbildung 7.22 ist zu erkennen, daß die Belichtung nach 30 min Einwirken keine Anbindung an

das Polyimid bewirkt. Die Strahlung dieser Glasplättchen (angegeben in dpm = decompositions per minute) liegt etwa in der gleichen Größenordnung wie die der unbelichteten Kontrollproben. Erst nach wesentlich längeren Einwirkzeiten vor der Belichtung, die einen völlig eingetrockneten Proteinfilm zur Folge hatten, kommt es zur Anbindung des Proteins an das Polyimid, was durch die deutlich höhere Radioaktivität der entsprechenden Glasträger zu erkennen ist.

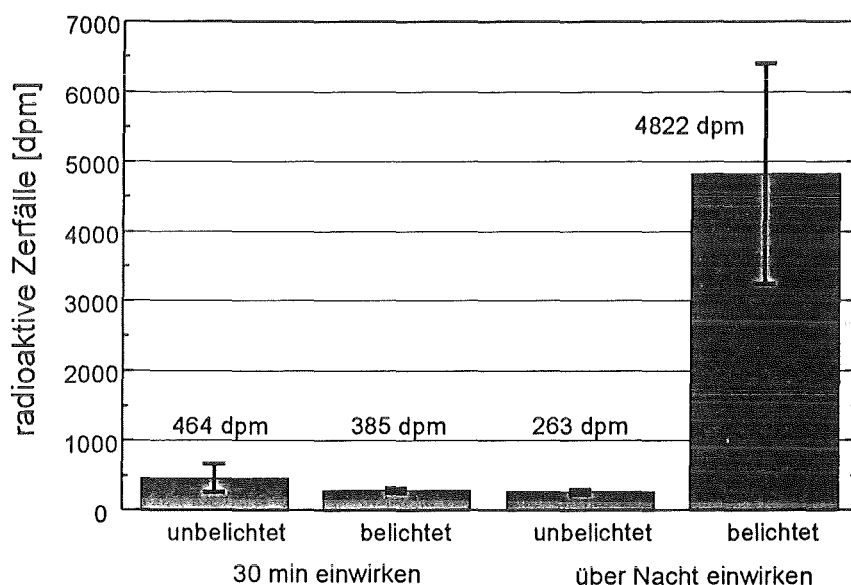


Abbildung 7.22: Radioaktive Zerfälle der unterschiedlich mit $[^{14}\text{C}]$ -T-GOD beschichteten polyimidisierten Glasträger (Darstellung mit Fehlerbalken)

Eine Photoimmobilisation von T-GOD auf Polyimid ist folglich möglich, sofern kein Wasser in der Proteinmatrix vorhanden ist. Bei Anwesenheit von Wasser ist der Modifizierungsgrad mit TRIMID zu gering, so daß alle durch Belichtung erzeugten Carbene mit Wasser abreagieren und es zu keiner meßbaren Anbindung an die Oberfläche kommt. Weiterhin zeigen diese Untersuchungen, daß die gewählte Waschprozedur geeignet ist, unspezifisch anhaftende Proteinmoleküle von der polyimidisierten Oberfläche zu entfernen sowie Restradioaktivität auszuwaschen.

Die geringe Anzahl der Messungen und die relativ großen Standardabweichungen lassen keinen exakten Schluß auf die quantitativ abgeschiedene Proteinmenge zu. Es ist lediglich eine Abschätzung der abgeschiedenen Proteinmenge sowie der spezifischen Oberflächenradioaktivität erlaubt. Die auf die Glasträger aufgetragenen Tropfen besaßen einen Durchmesser von 5 mm. Die mittlere Aktivität der Plättchen betrug 4822 dpm, was einer flächenbezogenen Aktivität von 246 dpm/mm² entspricht. Da das radioaktiv modifizierte Enzym eine Aktivität von 597 dpm/μg besitzt (siehe Kapitel 7.2.5.1.1), ergibt sich damit eine abgeschiedene Proteinmenge von ca. 8 μg. Die flächenbezogene Proteinmenge beträgt damit 0.41 μg/mm² oder 2.7 pmol/mm².

7.2.5.2 Immobilisation von T-GOD auf dem Sensor

Wie in Abbildung 7.22 zu erkennen ist, kommt es nur in Abwesenheit von Wasser zur Immobilisation auf der polyimidisierten Sensoroberfläche. Aus diesem Grund wurden die Sensoren 30 min in einem Vakuumtrockenschrank bei Raumtemperatur und 1 mbar behandelt und der eingetrocknete Enzymfilm anschließend mit einer Quecksilberdampfampe belichtet. Zur Immobilisierung wurde eine T-Glucoseoxidaselösung mit einem Proteingehalt von 1.92 mg/ml verwendet. Der TRIMID-Gehalt betrug 6.5 mol TRIMID pro mol Glucoseoxidase. Die unspezifischen Bindungsstellen konnten durch Beprobung der Sensoren mit einer Rinderserumalbuminlösung (4 mg/ml) blockiert werden, woran sich die Beprobung mit polyklonalen Antikörpern gegen Glucoseoxidase anschloß.

7.2.5.3 Optimierung der abgeschiedenen Menge an T-GOD

In ersten Versuchen wurden, wie in Kapitel 7.2.5.2 beschrieben 10 μl der oben genannten Enzymlösung (1.92 mg/ml) auf dem Sensor immobilisiert. Nach dem Blocken mit Rinderserumalbumin blieb jedoch die Immunantwort aus. Erst nach Erniedrigung der auf dem Sensor abgeschiedene Menge an Protein konnte die Immunreaktion beobachtet werden.

Die optimale Proteinkonzentration wurde durch sukzessive Verdünnung der Enzymlösung mit PBS (1:100) ermittelt, indem jeweils 10 μl der unterschiedlich verdünnten T-GOD-Lösungen auf den Sensor aufgebracht wurden. Nach der Belichtung wurde mit Phosphatpuffer bis zur Konstanz der Resonanzfrequenz gespült, mit BSA (4 mg/ml) geblockt und schließlich mit einer Analytlösung aus polyklonalen Antikörpern gegen Glucoseoxidase (400 μg bzw. 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$) beprobt. Abbildung 7.23 zeigt die jeweiligen Frequenzänderungen dieser Meßreihe. Ein Optimum ist bei einer Verdünnung der ursprünglichen T-GOD-Lösung von 1:125 zu erkennen. Der Kurvenverlauf läßt den Schluß zu, daß bei der Abscheidung einer zu großen Proteinmenge, die bei der Photoreaktion erzeugte Schicht aus Biomolekülen zu dick ist, so daß die Oberflächenwelle nicht durch die komplette sensitive Schicht dringen kann.

Als Ergebnis dieser Untersuchungen wurde die T-Glucoseoxidaselösung im Verhältnis 1:125 mit Phosphatpuffer (1:100) verdünnt, 10 μl dieser Lösung auf den Sensor gebracht und das Enzym, wie in Kapitel 7.2.5.2 beschrieben, immobilisiert. Mittels des in Anhang A.2 beschriebenen Verfahrens (Quantifizierung von Protein über dessen Enzymaktivität) konnte die auf der Oberfläche abgeschiedene Menge an Enzym spektroskopisch bestimmt werden. Die Zunahme der Absorption bei 520 nm ist für verschiedene Sensoren in Abbildung 7.24 angegeben. Daraus ergibt sich ein Mittelwert der Steigungen von 0.0021 Absorptionseinheiten pro Minute. Ein Vergleich mit der Aktivität der T-GOD-Lösung (siehe Kapitel 7.2.5.1) zeigt, daß diese Absorptionzunahme einer Proteinmasse auf dem gesamten Sensor von 18.5 ng entspricht.

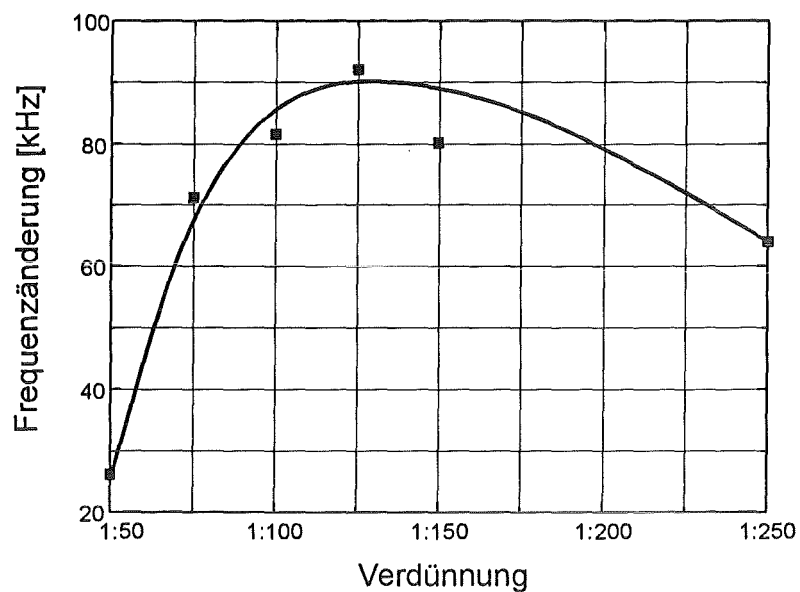


Abbildung 7.23: Bestimmung der optimalen Menge an abgeschiedenem T-GOD

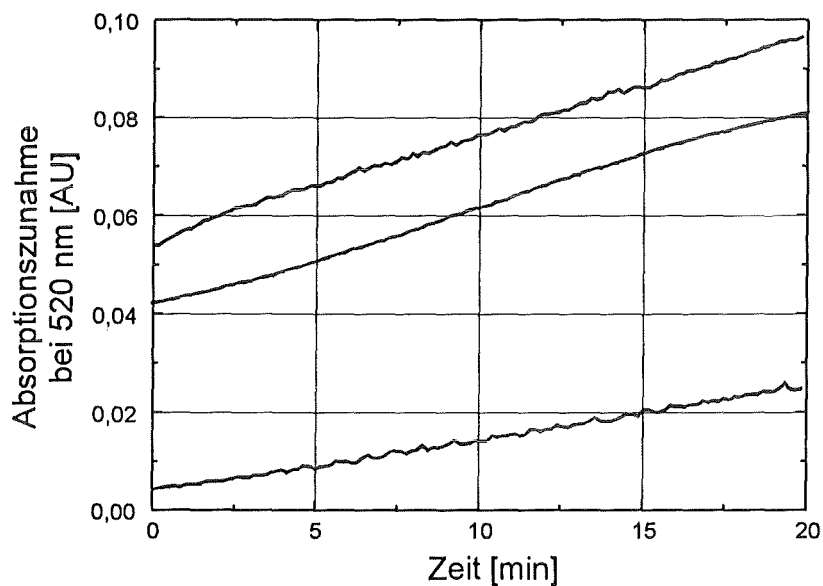


Abbildung 7.24: Absorptionszunahme bei 520 nm durch enzymatische Bildung eines Farbstoffes

7.2.5.4 Konzentrationsreihe

In gleicher Weise wie für das einfache System Rinderserumalbumin und polyklonale Antikörper gegen dieses Protein (siehe Kapitel 7.2.2.3) sollte auch für Glucoseoxidase und die zugehörigen Antikörper eine Konzentrationsreihe durchführbar sein und dafür die Empfindlichkeit sowie die Nachweisgrenze ermittelt werden können.

Dazu wurden die Sensoren wie in Kapitel 7.2.5.2 beschrieben mit T-Glucoseoxidase über eine photoinitierte Reaktion beschichtet und zunächst mit Rinderserumalbumin (4 mg/ml) gespült, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Da die Sensoren im Durchfluß mit dem Protein beprobt wurden, zeigten sie unterschiedliche Abscheidungsgeschwindigkeiten, die dann aber alle zu einer (innerhalb eines Fehlerbereichs von 10 %) Frequenzänderung von 35 kHz gelangten (Abbildung 7.25).

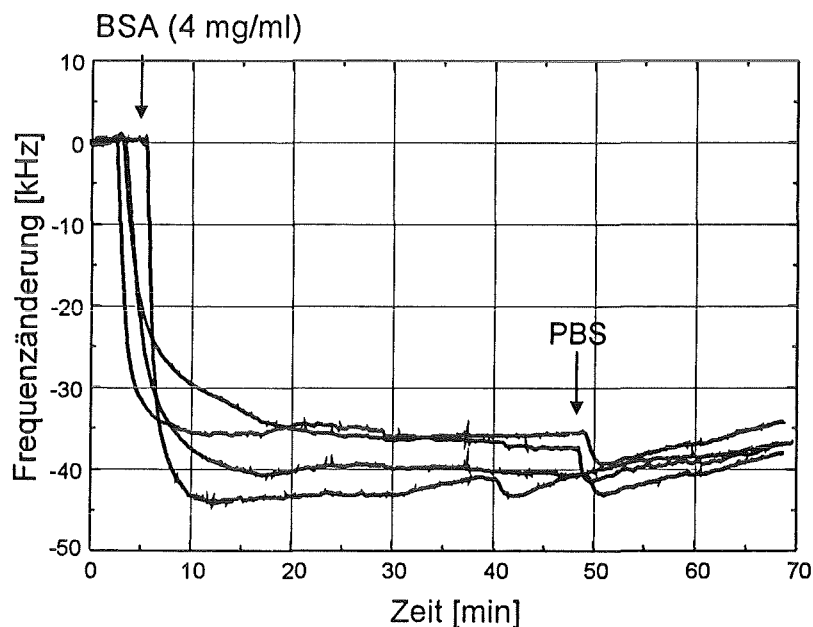


Abbildung 7.25: Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen auf dem OFW-Bauelement durch Beprobung mit Rinderserumalbumin

Die so vorbehandelten Sensoren wurden dann einzeln mit Antikörperlösung beprobt, wobei der Analyt im Kreis über die Sensoren geleitet wurde. Dabei wurden jeweils unterschiedliche Antikörpermengen in 5 ml Phosphatpuffer gelöst und über die Sensoren geleitet. Die Konzentrationsreihe, die in Auszügen in Abbildung 7.26 dargestellt ist, beinhaltet einen Bereich von 2–200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (entspricht 10–1000 μg). Wie bei dem BSA-System sind verschiedene Frequenzabnahmen sowie eine unterschiedliche Anfangsgeschwindigkeiten der Immunreaktionen zu erkennen.

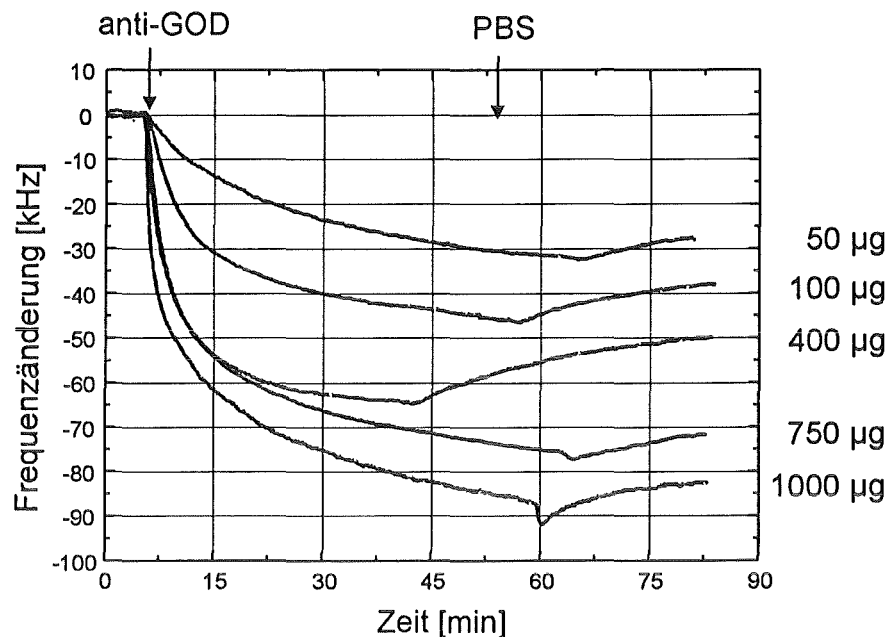


Abbildung 7.26: Konzentrationsreihe polyklonaler Antikörper gegen Glucoseoxidase, gemessen mit T-GOD beschichteten Bauelementen (mit BSA geblockt)

7.2.5.4.1 Auswertung der Resonanzfrequenz

Die Änderung der Resonanzfrequenz des Oszillators wurde in gleicher Weise, wie in Kapitel 7.2.2.3.1 beschrieben, ausgewertet und in Abbildung 7.27 wiedergegeben. Damit ergibt sich eine Empfindlichkeit von $58.8 \text{ Hz}/\mu\text{g}$ (Korrelationskoeffizient = 0.9908).

7.2.5.4.2 Auswertung der Anfangsgeschwindigkeit

Auch die Anfangsgeschwindigkeit der Immunreaktion wurde, wie in Kapitel 7.2.2.3.2 angegeben, ausgewertet. Dabei ergab sich der in Abbildung 7.28 dargestellte Zusammenhang.

Die Anfangsgeschwindigkeit korreliert wesentlich schlechter als die Änderung der Resonanzfrequenz mit der Masseänderung im Analytstrom ($r=0.9822$). Die Steigung der Regressionsgerade beträgt $4.92 \text{ Hz}/(\text{s } \mu\text{g})$.

7.2.5.5 Bestimmung der Nachweisgrenze

Aus Kapitel 7.2.5.4.1 gehen die Daten der linearen Regression hervor. Die Empfindlichkeit beträgt $58.8 \text{ Hz}/\mu\text{g}$, der Achsenabschnitt wurde mit 27.1 kHz bestimmt. Mit diesen Werten wurde, wie in Kapitel 7.2.2.4, die Nachweisgrenze für polyklonale Antikörper gegen Glucoseoxidase zu $2 \mu\text{g}$ bzw. 13.6 pmol bestimmt. Da die jeweilige

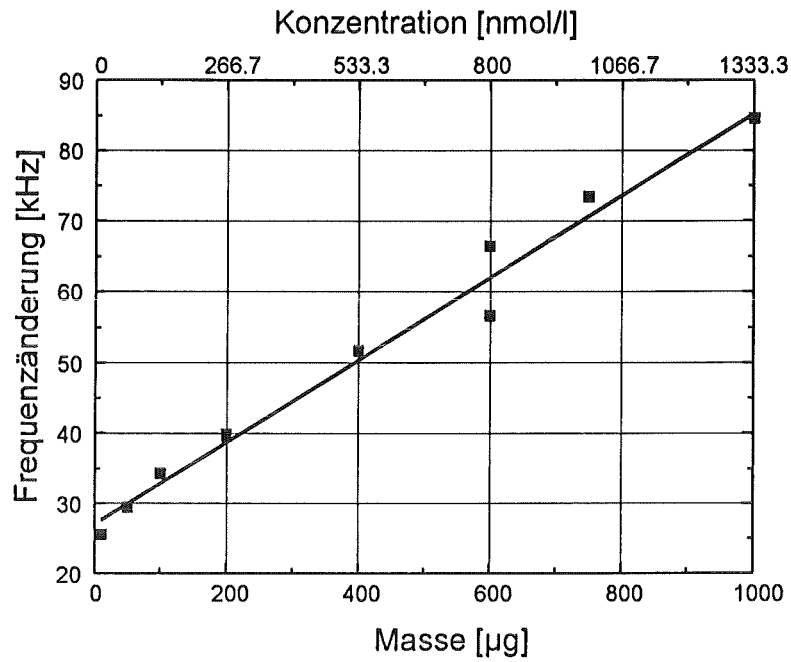


Abbildung 7.27: Resonanzfrequenzänderung als Funktion der Masse an Antikörper im Analytstrom

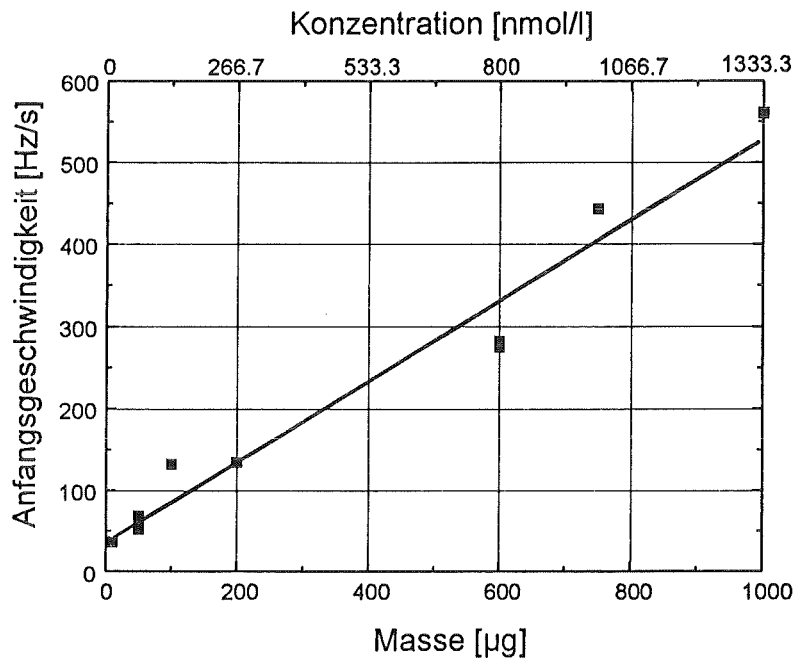


Abbildung 7.28: Auswertung der Anfangsgeschwindigkeit der Immunreaktion

Antikörpermenge in 5 ml Phosphatpuffer eingewogen wurde, entspricht dieser Wert einer minimal detektierbaren Konzentration von 2.7 nmol/l.

7.2.5.6 Beprobung mit monoklonalen Antikörpern

Nachdem die immunologischen Untersuchungen an polyklonalen Antikörpern aus einem Proteins Serum heraus erfolgreich verliefen, sollten auch monoklonale Antikörper gegen Glucoseoxidase getestet werden. Ebenso wie bei den Untersuchungen am Proteins Serum wurden zunächst mit Rinderserumalbumin die unspezifischen Bindungsstellen besetzt und anschließend mit einer hohen Konzentration (750 μg) an Antikörper im Analytstrom beprobt. Abbildung 7.29 zeigt keine signifikante Frequenzänderung bei Zugabe des monoklonalen Antikörpers.

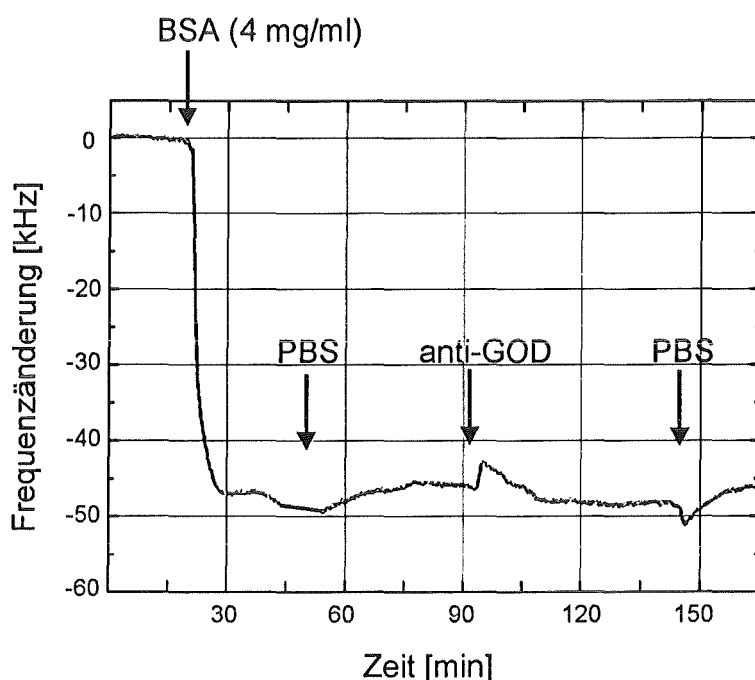


Abbildung 7.29: Beprobung eines T-GOD beschichteten Sensors mit 750 μg monoklonalen Antikörpern nach anfänglichem Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit BSA

Dieses Ergebnis läßt sich damit erklären, daß die monoklonalen Antikörper hochspezifisch auf die Antigenepitope reagieren. Durch die Modifikation des Glucoseoxidasemoleküls mit TRIMID kann es zur Veränderung der Erkennungssequenz kommen, der monoklonale Antikörper kann folglich nicht nachgewiesen werden.

7.3 Vergleich der Ergebnisse der Cyanotransfer- technik mit denen der Photoimmobilisation

Die in diesem Kapitel dargestellten Immobilisationsmethoden für Proteine auf OFW-Bauelementen sind in Tabelle 7.3 gegenübergestellt.

Tabelle 7.4: Vergleich der verwendeten Immobilisationstechniken

	Cyanotransfer- technik	direkte Photoimmob. von T-BSA	direkte Photoimmob. von T-GOD
Empfindlichkeit	58 100 Hz/ng	4 Hz/ng	0.059 Hz/ng
Nachweisgrenze	—	40 pmol/l	2.7 nmol/l
Reproduzier- barkeit	niedrig	hoch	hoch
Zeitaufwand	hoch	gering	gering
Übertragbarkeit auf andere Proteine	gegeben	Modifikation des Proteins notwendig	
Gefährlichkeit der verwendeten Chemikalien	sehr hoch	gering	gering

In Tabelle 7.3 fallen insbesondere die unterschiedlichen Sensorempfindlichkeiten auf. Die mit Abstand größte Sensitivität findet man bei den bromcyan-aktivierten Sensoren. Dabei ist zu beachten, daß im Falle der Cyanotransfertechnik die Sensoren im Durchfluß beprobt wurden. Die auf dem Sensor abgeschiedene Menge an Glucoseoxidase, die zur Berechnung der Sensorempfindlichkeit notwendig war, konnte aus diesem Grund nicht direkt ermittelt werden, sondern mußte durch Messung der enzymatischen Aktivität bestimmt werden (siehe Kapitel 7.1.5). Dies bedeutet, daß das Enzym erst nach der Immunreaktion mit dem immobilisierten Antikörper und vor allem nach einer Waschprozedur auf seine biokatalytischen Eigenschaften untersucht wurde. Diese Waschprozedur kann unter Umständen bereits den Immunkomplex

angreifen und so GOD-Moleküle, die eine Frequenzänderung verursachten, von der Sensor- bzw. Substratoberfläche herunterlösen. Daraus resultiert ebenfalls eine kleinere Enzymmenge und damit verbunden eine scheinbar höhere Empfindlichkeit. Im Gegensatz dazu wurde die Analytmenge bei der Photoimmobilisation direkt eingewogen, wobei die Gehaltsangaben der Hersteller als richtig vorausgesetzt wurden. Die dadurch entstandenen Dosierfehler sind im Vergleich zu den obengenannten Unwägbarkeiten der Cyanotransfertechnik jedoch klein.

Ein weiterer Grund für die geringere Sensitivität der Photoimmobilisationsmethoden im Vergleich zur Cyanotransfertechnik könnte auch in der unterschiedlichen Art der verwendeten Immunglobuline liegen. Die bei der Cyanotransfertechnik immobilisierten monoklonalen Antikörper wurden mit der reinen Antigenlösung (Glucoseoxidase in Phosphatpuffer) beprobt. Die polyklonalen Antikörper, die bei der Photoimmobilisation verwendet wurden, waren hingegen Bestandteil eines Proteinserums, was den „realen“ Meßbedingungen nahe kommt. Dadurch bestand hier die Möglichkeit zu zusätzlichen Reaktionen von anderen, im Serum enthaltenen Immunglobulinen. Solche „fremden“ Proteine können neben der Viskosität auch die Oberflächendichte des Systems merklich ändern. Dies wird auch durch die Tatsache gestützt, daß nach der Immunoreaktion beim Spülen mit Phosphatpuffer unterschiedliche reversible Frequenzänderungen beobachtet wurden (siehe Abbildung 7.26).

Es ist nicht überraschend, daß die Empfindlichkeit der T-BSA-beschichteten Sensoren gegenüber ihren polyklonalen Antikörpern deutlich über der mit T-GOD beschichteten Bauelemente und ihrem korrespondierenden Immunglobulin liegt. Im Falle des Rinderserumalbumins wurde auf eine Unterdrückung der unspezifischen Adsorption des Proteins verzichtet. Dies bedeutet, daß sowohl spezifische als auch unspezifische Bindungsanteile der Immunoreaktion durch die Messung berücksichtigt werden, woraus höhere Signale resultieren, was die in Tabelle 7.3 gezeigten Auswirkungen auf die Empfindlichkeit und auf die Nachweisgrenze besitzt. Auf eine Unterdrückung der unspezifischen Adsorption wurde aus zwei Gründen verzichtet. Zum einen dienten die Experimente ursprünglich dazu, grundlegende Erfahrungen mit der Photoimmobilisationstechnik zu sammeln, die dann später bei der geplanten Coimmobilisierung zum Einsatz kommen können. Zum anderen diente gerade Rinderserumalbumin typischerweise zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen. Das Ausweichen auf ein anderes Protein hätte einen Vergleich mit den bis dato durchgeführten Versuchen nicht zugelassen.

Ein entscheidender Nachteil der Cyanotransfertechnik gegenüber der Photoimmobilisation war die schlechte Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse. Dies lag hauptsächlich an den vielen Arbeitsschritten, die zum Aufbringen einer Immunglobulinschicht notwendig sind. Damit einher ging der hohe Zeitaufwand dieser Methode. Vom gekauften Bauelement bis zum fertigen Immunosensor verging eine Arbeitswoche (Schutzbeschichtung, Aktivierung der Polyimidschicht, Immobilisation der Antikörper, Immunoreaktion). Im Unterschied dazu dauerte eine Proteinbeschichtung durch Photoimmobilisation nur ca. 2 h.

Durch die Art der Beprobung bei der Cyanotransfertechnik (Analyt wird im Durchfluß über die Sensoren geleitet) ergab sich immer die gleiche Menge an ab-geschiedenem Antigen. Diese Tatsache sowie die schlechte Reproduzierbarkeit ver-hindern eine Berechnung der Nachweisgrenze für Glucoseoxidase im Falle der Cya-notransfertechnik.

Eine Übertragbarkeit der Methodik ist prinzipiell bei beiden Verfahren gege-ben. Während jedoch bei der Cyanotransfertechnik ein beliebiges Immunglobulin der Klasse G kovalent fixiert werden kann, muß bei der direkten Photoimmobilisa-tion entweder das Antigen oder der Antikörper mit einer photoreaktiven Gruppe modifiziert werden.

Allgemein ist trotz der geringeren Empfindlichkeit die Photoimmobilisation der Cyanotransfertechnik vor allem wegen der hohen Reproduzierbarkeit sowie der Durch-führbarkeit der Messung in realen Meßmedien vorzuziehen.

Kapitel 8

Voruntersuchungen mit einem miniaturisierten Aufbau

Im folgenden sind einige Aspekte zusammengefaßt, die die Perspektive der OFW-Sensoren bei immunochemischen Anwendungen darstellen.

8.1 Einsatz eines kompakten Sensorarrays

Gegen Ende dieser Arbeit konnte auf ein kompaktes Sensorarray zurückgegriffen werden, das in dieser Form bereits in der Gassensorik mit Oberflächenwellenbauelementen eingesetzt wird [Rap95]. Es handelt sich dabei um einen radialen Sensorkopf mit 8 beschichteten Sensoren und einem polyimidisierten Referenzsensor. In dem Sensorkopf ist für jeden Oszillator ein Hochfrequenzmischer vorgesehen, der die Resonanzfrequenz des Sensors mit dem Referenzbauelement mischt und die Differenzfrequenz ausgibt. Neben der Miniaturisierung besitzt dieses Sensorarray darüberhinaus den Vorteil, daß die Mischfrequenzen im Bereich von 1 Hz bis maximal 16 MHz liegen und somit keine Hochfrequenztechnik außerhalb des eigentlichen Sensormoduls notwendig ist. Nach einer einfachen digitalen Frequenzzählung können die Meßdaten daher über eine serielle Schnittstelle durch einen beliebigen Rechner verarbeitet werden.

8.2 Beprobung mittels Fließinjektionsanalyse

Um die Ergebnisse in der Praxis anzuwenden, müssen vor allem die Probevolumina verringert werden. Für biochemische Anwendungen und im speziellen immunochemische Untersuchungen sind 5 ml Analyt eine kostspielige und deshalb meist nicht realisierbare Forderung. Diese Problematik kann mit Hilfe einer Fließinjektionsanalyse (FIA) umgangen werden. Erste Ergebnisse zeigten bereits die Anwendbarkeit dieser Beprobungstechnik für OFW-Bauelemente. Für die folgenden Experimente wurde das obengenannte Sensorarray verwendet. Zunächst konnte eine

Leitwertänderung der Pufferlösung dadurch simuliert werden, daß in den Volumenstrom von Phosphatpuffer (0.92 mS/cm) 30 μ l eines höher konzentrierten Puffers (3.3 mS/cm) injiziert wurden. Daraus resultierte zunächst eine reversible Zunahme der Resonanzfrequenz. Nach einiger Zeit wurde die höhere Ionenkonzentration wieder ausgewaschen. Dieses Verhalten und die sehr gute Reproduzierbarkeit der Messung ist in Abbildung 8.1 dargestellt.

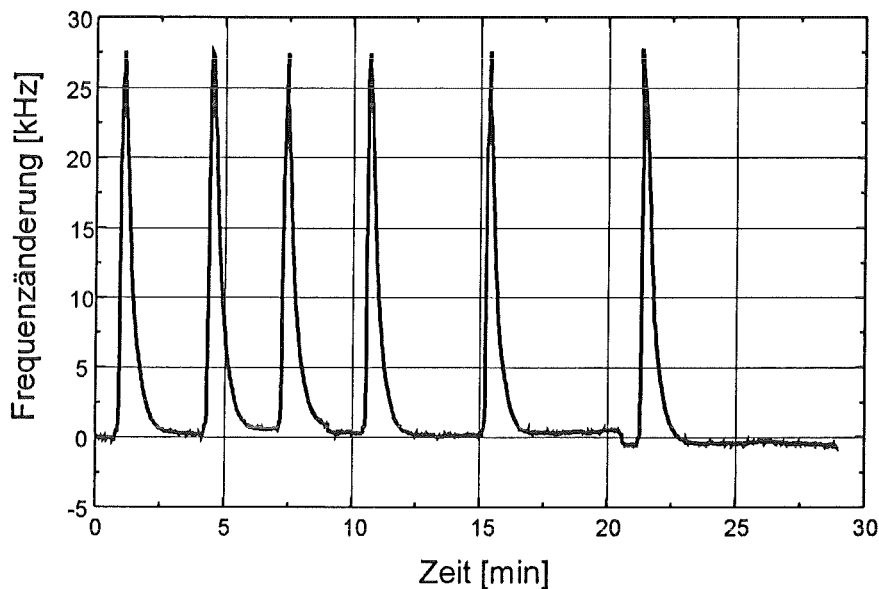


Abbildung 8.1: Änderung der Resonanzfrequenz durch Einspritzen einer Pufferlösung mit höherem Leitwert

In Abbildung 8.2 ist die Beprobung eines polyimidisierten Sensors mit jeweils 30 μ l Rinderserumalbumin (4 mg/ml) dargestellt. Die Basislinie wurde mit Phosphatpuffer (0.92 mS/cm) eingestellt. Es ist die sukzessive Frequenzabnahme durch unspezifische Abscheidung des Proteins auf der Sensoroberfläche zu erkennen. Die Änderung der Resonanzfrequenz wird mit zunehmender Anzahl an Injektionen immer kleiner und geht schließlich gegen Null.

Diese Voruntersuchungen zeigen, daß es prinzipiell möglich sein sollte, ein Sensorarray in Kombination mit einer miniaturisierten Fließinjektionsanalyse aufzubauen, um zu einem kompakten Biosensorsystem zu gelangen.

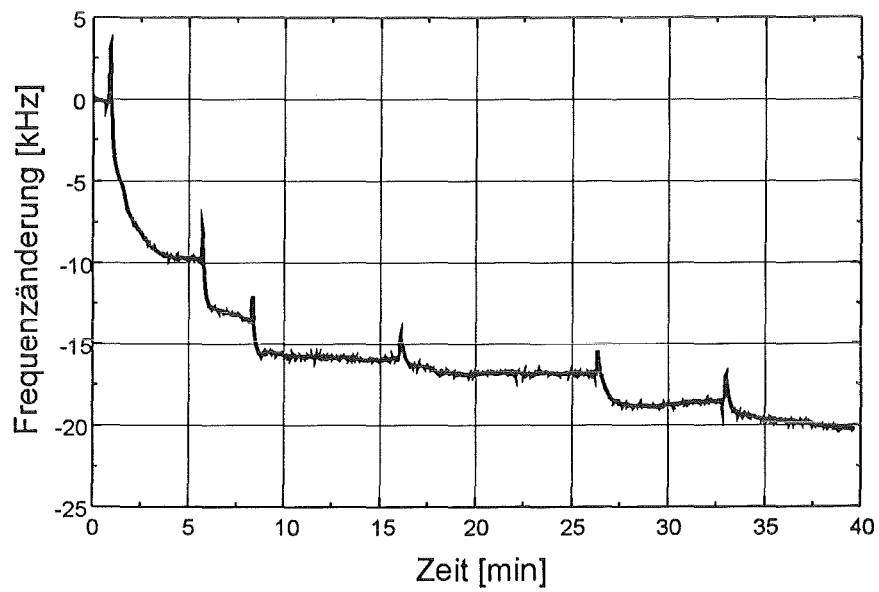


Abbildung 8.2: Unspezifische Abscheidung von Rinderserumalbumin auf einem polyimidisierten Sensor

Kapitel 9

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Biosensors auf der Basis kommerzieller OFW-Bauelemente, wie sie in der modernen Telekommunikation zum Einsatz kommen. Durch die Auswahl von piezoelektrischen Substraten auf der Basis von 36° -rot Y,X LiTaO₃ und der dabei verwendeten horizontal polarisierten Scherwellen konnte der Betrieb in wässrigen Lösungen ermöglicht und dies für immunochemische Untersuchungen ausgenutzt werden.

Die in der Industrie als Massenware erhältlichen Bauelemente sind mit Interdigitalstrukturen aus Aluminium versehen, da sich diese wegen ihrer außerordentlich guten akustischen Eigenschaften besonders eignen. Für chemische Anwendungen allerdings ist die geringe Stabilität des Aluminiums gegenüber Säuren und Laugen problematisch. Ein wichtiger Schritt hin zu einem Biosensor war die Entwicklung einer geeigneten Schutzbeschichtung mit Polyimid, die es zum einen erlaubte, die OFW-Bauelemente für längere Zeit in wässrigen phosphathaltigen Medien zu betreiben und zum anderen gleichzeitig als Basis für Immobilisationsversuche diente. Zudem war es möglich unspezifisch an der Oberfläche anhaftende Proteine mit Salzsäure wieder abzulösen und den Sensor somit zu regenerieren. Diese Passivierungsmethode konnte nach Optimierung der Beschichtungsparameter mit einer hohen Genauigkeit reproduziert werden.

Die hohe Reproduzierbarkeit der Beschichtung von OFW-Bauelementen mit Polyimid sowie die gute chemische Stabilität gegenüber Säuren und Laugen der passivierten Sensoroberfläche legen eine weitere Verwendung dieser Schutzbeschichtung nahe. Eine mögliche Weiterentwicklung kann in Form einer Kombination aus Schutzbeschichtung und photoreaktivem Reagens gesehen werden. Durch Einbau von Benzophenongruppen in die Polyimidstruktur kann man durch Belichtung zu einem radikalbildenden Polymer gelangen [Sca88], das in ersten Experimenten die gleichen Passivierungseigenschaften aufwies wie das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Polyimid.

Mit Hilfe polyimidisierter Sensoren war es möglich das Sensorverhalten in Hinblick auf Leitfähigkeits- und Viskositätsänderungen zu untersuchen und zu charakterisieren. Auf der Basis der polyimidisierten Sensoroberfläche ist es außerdem gelungen Proteine mittels zweier verschiedener Immobilisationsmethoden kovalent

zu fixieren.

Die durch eine bromcyan-aktivierte Polyimidschicht angebondenen monoklonalen Antikörper gegen Glucoseoxidase zeigten mit dem Antigen die gewünschte Immunreaktion. Da das Antigen nach der Komplexierung durch das Immunglobulin seine enzymatische Aktivität beibehält, konnte darüber hinaus die durch die Immunreaktion abgeschiedene Menge an Glucoseoxidase quantifiziert werden. Ein OFW-Sensor, der durch die Cyanotransfertechnik mit Antikörpern beschichtet wurde, zeigte eine außerordentlich große Empfindlichkeit von 58 Hz/pg. Die Immobilisationsprozedur kann auf beliebige Immunglobuline der Klasse G angewendet werden. Allerdings litt die Reproduzierbarkeit des Sensorsignals unter den vielen Arbeitsschritten, die zur Herstellung des Immunosensors mittels Cyanotransfertechnik notwendig sind. Als weiterer Nachteil einer Immobilisierung auf der Basis einer bromcyan-aktivierten Polyimidschicht bleibt schließlich noch die große Giftigkeit sowie die Explosivität von BrCN-Lösungen zu nennen.

Die Photoimmobilisation zeichnete sich hingegen durch einfache Durchführbarkeit sowie große Umweltverträglichkeit der verwendeten Chemikalien aus. Durch die einmalige Modifikation eines Proteins ist es möglich das komplementäre Biomolekül zu detektieren. Die Derivatisierung mit einem carbenerzeugenden Reagens verlief hierbei über eine einfache Einzugsynthese, die Aufarbeitung erfolgte ebenfalls über einfache Standardmethoden. Die Synthese des Diazirins TRIMID, das von der Arbeitsgruppe Sigrist zur Verfügung gestellt wurde, ist hingegen sehr arbeitsintensiv. Allerdings wurde außerordentlich wenig TRIMID zur Modifizierung eines Proteins benötigt.

Die Anbindung von photoreaktiven Proteinen an Polyimid konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen und die Erhaltung der immunologischen sowie im Falle der modifizierten Glucoseoxidase auch der enzymatischen Aktivität gezeigt werden. Die Untersuchungen an dem System Rinderserumalbumin und polyklonale Antikörper gegen dieses Protein dienten zum Nachweis der prinzipiellen Anwendbarkeit der Photoimmobilisation auf polyimidbeschichteten OFW-Bauelementen.

Nachdem die Experimente der Coimmobilisierung nicht den gewünschten Erfolg zeigten, wurde Glucoseoxidase mit TRIMID modifiziert und charakterisiert. Nach der Beschichtung von OFW-Sensoren mit T-GOD konnte die Immunreaktion mit polyklonalen Antikörpern gegen GOD beobachtet werden. Es ergab sich für diese Immunglobuline eine Nachweisgrenze von 2.7 nmol/l. Diese liegt im Bereich der Nachweisgrenze des optischen Gitterkopplers (2 nmol/l siehe Kapitel 3.7.2.2), aber eine Größenordnung über der der Oberflächen Plasmonen Resonanz (0.23 nmol/l, siehe Kapitel 3.7.2.1). Dabei ist allerdings zu beachten, daß diese Nachweisgrenze für ein anderes immunochemisches System bestimmt wurde.

Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß die Anfangsgeschwindigkeit der Immunreaktion mit zunehmender Antikörpermasse linear zunimmt. Dadurch ist es möglich die Messung bereits nach wenigen Minuten zu beenden, da aus der Geschwindigkeit der Signalabnahme bereits Aussagen über die im Analyten enthaltene Antikörpermenge getroffen werden könnten. Es war somit nicht notwendig die Gleichgewichtseinstellung, die im allgemeinen erst nach 60 min erreicht war, abzu-

warten. Zudem ist anzumerken, daß die polyklonalen Antikörper dabei in einem Proteins Serum angeboten wurden, was den realen Versuchsbedingungen einer späteren Anwendung entsprechen würde.

Die Reproduzierbarkeit der Signalabnahme war im Falle der Immobilisierung durch eine photoinduzierte Reaktion deutlich höher als bei der Cyanotransfertechnik. Die Immunreaktion zwischen modifizierter Glucoseoxidase und monoklonalen Antikörpern gegen dieses Enzym konnte nicht beobachtet werden. Dies legt den Schluß nahe, daß die immunologische Erkennungssequenz von Glucoseoxidase Ly-singruppen enthält, die bei der Derivatisierung mit TRIMID ebenfalls modifiziert wurden. Durch die Ausrichtung monoklonaler Antikörper auf genau eine Stelle des Antigens bleibt dann die Ausbildung eines Immunokomplexes aus. Diese Problem könnte man umgehen, indem die Derivatisierung von Glucoseoxidase in Anwesenheit von monoklonalen Antikörpern gegen GOD durchgeführt wird. Durch diese Maßnahme sollte dann das immunologische Erkennungszentrum durch den Antikörper besetzt sein und die Modifikation des Enzyms an dieser, für die Immunokomplexbildung wichtigen Stelle, somit unterbunden werden.

Literaturverzeichnis

- [Abe93] F. Aberl, H. Wolf. HIV serology using piezoelectric immunosensors. *Eurosensors*, VII, 1993.
- [Arm72] K. Armstrong, M. Noall, J. Stouffer. Dextran-linked insulin: A soluble high molecular weight derivative with biological activity in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 47(2):354–360, 1972.
- [Aul90] B. Auld. *Acoustic Fields and Waves in Solids*. Krieger Publishing Company, Malabar, Florida, 1990.
- [Bae92] R. Baer, C. Flory, M. Tom-Moy, D. Solomon. STW-chemical sensors. *IEEE Ultrasonics Symposium*, pages 1–6, 1992.
- [Bal89] D. Ballantine, H. Wohltjen. Surface Acoustic Wave. *Anal. Chem.*, 61(11):704–715, 1989.
- [Bar95] N. Barié. Untersuchung an UV-vernetzten Polysiloxanen als Beschichtungsmaterialien für akustische Oberflächenwellenbauelemente. *Diplomarbeit, Universität Karlsruhe*, 1995.
- [Bau91] S. Baudner. Immunochemische Methoden in der Lebensmittelanalytik. *Lebensmittelchemie*, 45, 1991.
- [Bie94] F. Bier, R. Jockers, R. Schmid. Integrated optical immunosensor for s-triazine determination: Regeneration, calibration and limitations. *The Analyst*, 119:437–441, 1994.
- [Ble68] J. Bleustein. A new surface wave in piezoelectric materials. *Appl. Phys. Letters*, 13(12):412–413, 1968.
- [Bra00] J. Braun. Die Einwirkung von Bromcyan auf tertiäre Amine. *Chemische Berichte*, 33:1438–1453, 1900.
- [Bra93] W. Brandes, H.-E. Maschke, T. Scheper. Specific flow injection sandwich binding assay for IgG using protein A and a fusion protein. *Anal. Chem.*, 65:3368–3371, 1993.

- [Bru81] J. Brunner, G. Semenza. Selective labeling of hydrophobic core of membranes with 3-(trifluoromethyl)-3-(m-[¹²⁵I]iodophenyl)diazirine, a carbene-generating reagent. *Biochem.*, 20:7174-7182, 1981.
- [Cal86] G. Calabrese, H. Wohltjen, M. Roy. A study of SAW delay line behavior in liquids. *Ultrasonics Symposium*, pages 607-610, 1986.
- [Cho77a] Y. Cho, J. Bailey. Enzyme immobilization on activated carbon: Alleviation of enzyme deactivation by hydrogen peroxide. *Biotech. and Bioeng.*, 19:769-775, 1977.
- [Cho77b] Y. Cho, J. Bailey. Glucoamylase and glucose oxidase preparations and their combined application for conversion of maltose to gluconic acid. *Biotech. and Bioeng.*, 19:185-198, 1977.
- [Cla72] J. Clamp, I. Johnson. *Glycoproteins*, chapter 6, page 612 ff. Elsevier, Amsterdam, 1972.
- [Cur80] M. Curie, P. Curie. Développement par compression de l'électricité polaire dans les cristaux hémihédres à faces inclinées. *Bull. Soc. Min. Paris*, 3:90-93, 1880.
- [Dah94] R. Dahint, Grunze, F. Josse, J. Renken. Acoustic plate mode sensor for immunochemical reactions. *Anal. Chem.*, 66(18):2888-2892, 1994.
- [Dav94] B. Dave, B. Dunn, J. Selverstone, J. Zink. Sol-gel encapsulation methods for biosensors. *Anal. Chem.*, 66 A(22):1120-1127, 1994.
- [Dix79] M. Dixon, E. Webb. *Enzyme Cofactors*, chapter 9, page 469 ff. The Chauncer Press Ltd., Bungay Suffolk, 1979.
- [Dol90] M. Dolder, H. Michel, H. Sigrist. 3-(trifluoromethyl)-3-(m-isothiocyanophenyl)diazirine: Synthesis and chemical characterization of a heterobifunctional carbene-generating crosslinking reagent. *J. of Prot. Chem.*, 9(4):407-415, 1990.
- [Dor84] G. Dormàn, G. Prestwich. Benzophenone photophores in biochemistry. *Biochem.*, 33:5661-5673, 1984.
- [Dro79] J. Drobnik, V. Saudek, F. Scek, J. Kalal, V. Vojtisek, M. Barta. Enzyme immobilization techniques on poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) carrier with penicillin amidase as model. *Biotech. and Bioeng.*, 26:1317-1332, 1979.
- [Dro82] J. Drobnik, V. Saudek, F. Scek, J. Labsky, H. Kudlvasrova. The activation of hydroxy groups of carriers with 4-nitrophenyl and N-hydroxysuccinimidyl chloroformates. *Biotech. and Bioeng.*, 24:487-493, 1982.

- [Dua94] C. Duan, M. Meyerhoff. Separation-free sandwich enzyme immunoassays using microporous gold electrodes and self-assembled monolayer/immobilized capture antibodies. *Anal. Chem.*, 66(9):1369–1377, 1994.
- [Dup93] Dupont. Persönliche Mitteilungen. 1993.
- [Far78] G. Farnell. *Types and properties of surface waves*, volume 24. Springer Verlag, Berlin, 1978.
- [Flo87] C. Flory, R. Baer. Surface Transverse Wave mode analysis and coupling to interdigital transducers. *Ultrasonics Symposium*, pages 313–318, 1987.
- [Fou90] N. Foulds, J. Frew, M. Green. *Biosensors, a practical approach*. Oxford University Press, New York, 1990.
- [Frö84] H.-J. Fröhlich. *Taschenbuch der Akustik*. VEB Verlag Technik Berlin, Berlin, 1984.
- [Gao94] H. Gao, E. Kislig, N. Oranth, H. Sigrist. Photolinker polymer mediated immobilization of monoclonal antibodies, F(ab')₂ and F(ab') fragments. *Biotech. Appl. Biochem.*, 20:251–263, 1994.
- [Gao95] H. Gao, M. Saenger, R. Luginbühl, H. Sigrist. Immunosensing with photo-immobilized immunoreagents on planar optical wave guides. *Biosens. Bioelec.*, 10:317–328, 1995.
- [Gau94] G. Gauglitz, J. Ingenhoff. Design of new integrated optical substrates for immuno-analytical applications. *Fres. J. Anal. Chem.*, 349:355–359, 1994.
- [Gen93] A. Gentzkow, H.-D. Feucht, H. Formanek, G. Wanner. New method of enzyme immobilization for biosensors. *The 7th International Conference on Solid-State Sensors and Actuators*, pages 568–570, 1993.
- [Gie93] T. Giesler, J.-U. Meyer. Electrostatic and capacitive detection of flexural plate-waves. *Sensors and Actuators A*, 1993.
- [Gra91] J. Grate, M. Abraham. Solubility interactions and the design of chemically selective sorbent coatings for chemical sensors and arrays. *Sensors and Actuators B*, 3:85–111, 1991.
- [Gui89] G. Guilbault, J. Luong, E. Prusak-Sochaczewski. Immobilization methods for piezoelectric biosensors. *Biotech.*, 7:349–351, 1989.
- [Har88] E. Harlow, D. Lane. *Antibodies a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988.

- [Has94] K. Hashimoto, M. Yamaguchi. Bleustein-Gulyaev-Shimizu wave propagating under metallic gratings of finite thickness. *Jpn. J. of Appl. Phys., Part 1*, 33(5B):3026-3030, 1994.
- [Jen79] N. Jentoft, D. Dearborn. Labeling of proteins by reductive methylation using sodium cyanoborohydride. *J. of Biol. Chem.*, 254(11):4359-4365, 1979.
- [Jos87] F. Josse, Z. Shana. Acoustoionic interaction of SH surface waves with dilute ionic solutions. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*, 38(3):297-304, 1987.
- [Jos88] F. Josse, Z. Shana. Analysis of shear horizontal surface waves at the boundary between a piezoelectric crystal and a viscous fluid medium. *J. Acoust. Am.*, 84(3):978-984, 1988.
- [Kak94] T. Kaku, H. Karan, Y. Okamoto. Amperometric glucose sensors based on immobilized glucose oxidase-polyquinone system. *Anal. Chem.*, 66(8):1231-1235, 1994.
- [Kön93] B. König, M. Grätzel. Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of human erythrocytes. *Anal. Chim. Acta*, 276:329-333, 1993.
- [Köß94] C. Kößlinger, S. Drost, F. Aberl, H. Wolf. Quartz crystal microbalance for immunosensing. *Fres. J. Anal. Chem.*, 349:349-354, 1994.
- [Koh83] J. Kohn, M. Wilchek. *Activation of polysaccharide resins by CNBr*. Wiley (Interscience), New York, 1983.
- [Koh84] J. Kohn, M. Wilchek. The use of cyanogen bromide and other novel cyanylating agents for the activation of polysaccharide resins. *Appl. Biochem. Biotech.*, 9:285-305, 1984.
- [Kon92] J. Kondoh, S. Shiokawa. Measurements of conductivity and pH of liquid using surface acoustic wave devices. *Jpn. J. of Appl. Phys.*, 31(31-1):82-84, 1992.
- [Kon93] J. Kondoh, S. Shiokawa. A liquid sensor based on a shear horizontal SAW-device. *Elec. and Comm. in Jpn, Part 2*, 76(2):69-82, 1993.
- [Kon94] J. Kondoh, Y. Matsui, S. Shiokawa, W. Wlodarski. Enzyme-immobilized SH-SAW biosensor. *Sensors and Actuators B*, 20:199-203, 1994.
- [Kos93] P. Kostial, J. Machalikova, F. Cernobila. Using an immersion surface acoustic wave sensor for liquid testing. *J. Phys. III France*, 3:355-362, 1993.

- [Kur93] S. Kurosawa, E. Nemoto, M. Muratsugu, N. Kamo. Viscosity sensor in solutions using a piezoelectric quartz crystal. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, 42(11):910–914, 1993.
- [Lan93] G. Lang, A. Brecht, G. Gauglitz. Funktionalisierung einer Siliziumdioxid-Oberfläche zur Immobilisierung von Haptenen. *Sensor 93 – Kongreßband*, II:187–194, 1993.
- [Lee78] C.-Y. Lee. Biochemical studies of soluble and immobilized aldehyde dehydrogenase from yeast. *J. of Solid-Phase Biochem.*, 3(1):71–83, 1978.
- [Lew77] M. Lewis. Surface skimming bulk waves. *Ultrasonics Symposium Proceedings*, pages 744–752, 1977.
- [Loc90] L. Locasio-Brown, A. Plant, R. Durst, M. Brizgys. Radiometric and fluorimetric determination of aminosilanes and protein covalently bound to thermally pretreated glass substrates. *Anal. Chim. Acta*, 228:107–116, 1990.
- [Lov11] A. Love. *Some Problems in Geodynamics*. University Press, Cambridge, 1911.
- [Low51] O. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr, R. Randall. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. of Biol. Chem.*, 193:265–275, 1951.
- [Maq94] A. Maquieira, H. Elmahadi, R. Puchades. Immobilized cyanobacteria for on-line trace metal enrichment by flow injection atomic absorption spectrometry. *Anal. Chem.*, 66(21):3632–3638, 1994.
- [Mas64] W. Mason. *Use of piezoelectric crystals and mechanical resonators in filters and oscillators*, volume 1a. Academic Press, New York, 1964.
- [Mel83] S. Mellis, J. Baenziger. Structures of the o-glycosidically linked oligosaccharides of human IgD. *J. of Biolog. Chem.*, 258(19):11557–11563, 1983.
- [Min93] M. Minnuni, M. Mascini. Detection of pesticide in drinking water using real-time biospecific interaction analysis (bia). *Analytical Letters*, 26(7):1441–1460, 1993.
- [Mit94] K. Mitsubayashi, K. Yokoyama, T. Takeuchi, I. Karube. Gas-phase biosensor for ethanol. *Anal. Chem.*, 66(20):3297–3302, 1994.
- [Mog94] G. Moges, G. Johansson. Flow injection assay for the neurotoxin β -ODAP using an immobilized glutamate oxidase reactor with prereactors to eliminate glutamate interferences. *Anal. Chem.*, 66(21):3834–3839, 1994.
- [Mur87] H. Muramatsu, M. Dicks, E. Tamiya, I. Karube. Piezoelectric crystal biosensor modified with protein A for determination of immunoglobulins. *Anal. Chem.*, 59(23):2760–2763, 1987.

- [Mur93] M. Muratsugu, F. Ohta, Y. Miya, T. Hosokawa, S. Kurosawa. Quartz crystal microbalance for the detection of microgram quantities of human serum albumine. *Anal. Chem.*, 65(20):2933–2937, 1993.
- [Nak88] S. Nakamoto, N. Ito, T. Kuriyama, J. Kimura. A lift-off method for patterning enzyme-immobilized membranes in multi-biosensors. *Sensors and Actuators*, 13:165–172, 1988.
- [Ngo80] T. Ngo, H. Lenhoff. Immobilization of enzymes through activated peptide bonds of protein supports. *J. of Appl. Biochem.*, 2:373–379, 1980.
- [Niw93] O. Niwa, Y. Xu, B. Halsall, W. Heineman. Small-volume voltammetric detection of 4-aminophenol with interdigitated array electrodes and its application to electrochemical enzyme immunoassay. *Anal. Chem.*, 65(11):1559–1563, 1993.
- [Nom92] T. Nomura, T. Yasuda, S. Furukawa. Liquid sensor using two-port surface acoustic wave resonator. *Jpn. J. of Appl. Phys.*, 31(31-1):78–81, 1992.
- [Nom93] T. Nomura, T. Yasuda, S. Furukawa. Surface acoustic wave liquid sensors based on one-port resonator. *Jpn. J. of Appl. Phys.*, 32(5B):2372–2375, 1993.
- [Pal93] D. Palmer, T. Edmonds, N. Seare. Flow-injection for theophylline. *Analytical Letters*, 26(7):1425–1439, 1993.
- [Pla93] A. Plant, M. Gray, J. Hubbard. A fokker-plant description of multivalent interactions. *Biophys. Chem.*, 48:75–89, 1993.
- [Ple86] V. Plesskii, Y. Ten. Influence of viscous loading of the surface of an acoustic line on the propagation of shear subsurface waves. *Sov. Phys. Acoust.*, 32(2):121–124, 1986.
- [Pop92] Y. Poplavko, M. Ilchenko, L. Pereverzeva. Pyroelectric response of piezoelectrics. *Ferroelectrics*, 134:207–212, 1992.
- [Por59] R. Porter. The hydrolysis of rabbit γ -globulin antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.*, 73:119–126, 1959.
- [Pru90] E. Prusak-Sochaczewski, J. Luong. A new approach to the development of a reusable piezoelectric crystal biosensor. *Analytical Letters*, 23(3):401–409, 1990.
- [Rap91] M. Rapp. *Chemische Sensorik mit akustischen Oberflächenwellen*. Universität Heidelberg, 1991.
- [Rap95] M. Rapp. Chemical und biochemical sensorsystems based on surface acoustic wave devices. *Sensor '95*, 1995.

- [Ray85] Lord Rayleigh. On waves propagated along the plane surface of an elastic solid. *Proceedings of the London Mathematical Society*, 17:4–11, 1885.
- [Ric85] A. Ricco, S. Martin, T. Zipperian. Surface acoustic wave gas sensor based on film conductivity changes. *Sensors and Actuators*, 8:319–333, 1985.
- [Ric93] A. Ricco, S. Martin. Multiple-frequency SAW devices for chemical sensing and materials characterization. *Sensors and Actuators B*, 10:123–131, 1993.
- [Roe83] E. Roederer, G. Bastiaans. Microgravimetric immunoassay with piezoelectric crystals. *Anal. Chem.*, 55(55):2333–2336, 1983.
- [Rus94] A. Russell, D. Doughty, D. Ballantine, R. Hart. Frequency and attenuation response of acoustic plate mode devices coated with porous oxide films. *Anal. Chem.*, 66(19):3108–3116, 1994.
- [Sak77] Y. Sakamoto, Y. Akanuma, K. Kosaka, B. Jeanrenaud. Comparative effects of native insulin and insulin-dextran complexes on the metabolism of adipose tissue. *Biochimica et Biophysica Acta*, 498:102–113, 1977.
- [Sat93a] T. Sato, H. Okajima, Y. Kashiwase, R. Motegi, H. Nakajima. Shear horizontal acoustic plate mode viscosity sensor. *Jpn. J. of Appl. Phys.*, 32(5B):2392–2395, 1993.
- [Sat93b] M. Sato, T. Yamamoto, M. Takeuchi, K. Yamanouchi. Humidity sensitivity of lamb waves on composite Polyimide/ZnO/Si₃N₄ structure. *Jpn. J. Appl. Phys.*, 32, Part 1(5B):2380–2383, 1993.
- [Sau59] G. Sauerbrey. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik*, 155:206–222, 1959.
- [Sca88] J. Scaiano, A. Becknell, R. Small. Photochemistry of a benzophenone-containing bisimide: a model for inherently photosensitive polyimides. *J. of Photochem. and Photobiol.*, 44:99–110, 1988.
- [Sch91] F. Scheller, R. Hintsche, D. Pfeiffer, F. Schubert, K. Riedel, R. Kindervater. Biosensors: Fundamentals, applications and trends. *Sensors and Actuators B*, 4:197–206, 1991.
- [Sch92] G. Schwedt. *Taschenatlas der Analytik*. Thieme Verlag, Stuttgart, 1992.
- [Sha87] D. O'Shannessy, R. Quarles. Labeling of the oligosaccharides moieties of immunoglobulins. *J. of Immun. Methods*, 99:153–161, 1987.
- [Sha94] Z. Shana, F. Josse. Quartz crystal resonators as sensors in liquids using the acoustoelectric effect. *Anal. Chem.*, 66(13):1955–1964, 1994.

- [She93] D. Shen, W. Zhu, S. Yao. Behaviour of a series piezoelectric sensor in electrolyte solution. *Anal. Chim. Acta*, 276:87–97, 1993.
- [Shi92] S. Shiokawa, J. Kondoh, S. Sato, M. Sudoh. Conductometric titration using saw sensor in liquid. *Technical Digest of the 11th Sensor Symposium*, pages 189–192, 1992.
- [Sig92] H. Sigrist, H. Gao, B. Wegmüller. Light-dependent, covalent immobilization of biomolecules on 'inert' surfaces. *Biotechn.*, 10:1026–1028, 1992.
- [Sig95] H. Sigrist, A. Collioud, J.F. Clémence, H. Gao, R. Luginbühl, M. Sängler, G. Sundarababu. Surface immobilization of biomolecules by light. *Opt. Eng.*, 34(8):2339–2348, 1995.
- [Ste91] E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, C. Urbaniczky. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *J. of Coll. and Inter. Sci.*, 143(2):513–526, 1991.
- [The89] G. Thews, E. Mutschler, P. Vaupel. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 1989.
- [Tom95] M. Tom-Moy, R. Baer, D. Spira-Solomon, T. Doherty. Atrazine measurements using surface transverse wave devices. *Anal. Chem.*, 67(9):1510–1516, 1995.
- [Voe92] D. Voet, J. Voet. *Biochemie*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1992.
- [Vol88] P. Vollhardt. *Organische Chemie*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1988.
- [Wes95] T. Wessa, M. Rapp. Verfahren zum Beschichten akustoelektrischer Sensoren. *Patent P4418926.5*, 1995.
- [Whi87] R. White, P. Wicher, S. Wenzel, E. Zellers. Plate-mode ultrasonic oscillator sensors. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control.*, UFFC-34:162–171, 1987.
- [Wil82] M. Wilchek. Immobilization of enzymes and affinity ligands onto agarose via stable and uncharged carbamate linkages. *Biochem. Intern.*, 4(6):629–635, 1982.
- [Yam89] T. Yamashita, H. Higuchi, K. Horie, I. Mita. Photocrosslinking reaction of polyimide containing benzophenone unit. *J. of Photopol. Sci. and Techn.*, 2(1):41–42, 1989.

- [Yon93] B. Yon-Hin, M. Smolander, T. Crompton, R. Lowe. Covalent electropolymerization of glucose oxidase in polypyrrole. Evaluation of methods of pyrrole attachment to glucose oxidase on the performance of electropolymerized glucose sensors. *Anal. Chem.*, 65(15):2067–2071, 1993.
- [Züh95] J. Zühlke, D. Knopp, R. Niesser. Sol-gel glass as a new support matrix in immunoaffinity chromatography. *Fres. J. of Anal. Chem.*, 352:654–659, 1995.

Anhang A

Biochemischer Anhang

A.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach der Methode von Lowry wurde wie in Kapitel 7.2.5.1 beschrieben durchgeführt. Bei dieser Reaktion ändert sich die Absorption der Lösung bei 578 nm. Die Absorptionsänderung der modifizierten Glucoseoxidase wurde auf einen genau definierten BSA-Standard (0.4 mg/ml) zurückgerechnet. Die Kurve in Abbildung A.1 zeigt die Zunahme der Absorption mit steigender Proteinmasse für diesen BSA-Standard, die Regressionsgerade sowie die statistischen Daten.

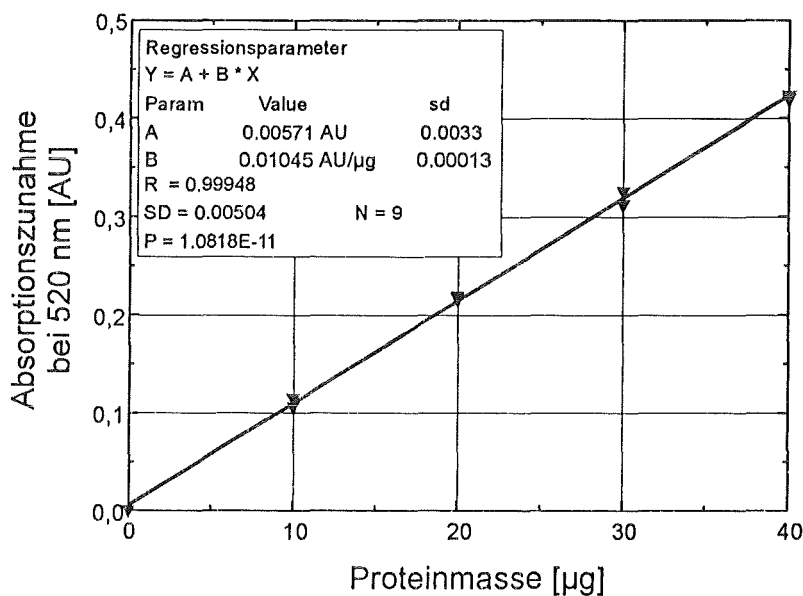


Abbildung A.1: BSA-Standard zur Proteinbestimmung nach Lowry

A.2 Aktivitätsbestimmung mittels enzymatischem Assay

Zur Durchführung der Aktivitätsüberprüfung wurden folgende Lösungen angesetzt:

- Lösung 1
53 mg 3,5-Dichlor-2-Hydroxy-Benzosulphonsäure werden in Wasser (bidest.) gelöst und mit 1 M NaOH auf pH=7 gebracht. Dann werden 3 mg Peroxidase (Meerrettich) zugegeben und auf 10 ml mit Wasser aufgefüllt.
- Lösung 2
16.2 mg 4-Aminophenazon werden in 10 ml Wasser gelöst.
- Lösung 3
1.4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 700 mg NaH_2PO_4 sowie 37.2 mg EDTA werden in 100 ml Wasser gelöst. Es sollte sich ein pH-Wert von 7 (+/- 0.1) einstellen.
- Lösung 4
1.8 g β -D-Glucose werden in 10 ml Wasser gelöst.

In eine Küvette werden dann

- 1.55 ml von Lösung 3
- 0.2 ml von Lösung 4
- 0.2 ml von Lösung 1
- 50 μl von Lösung 2

gegeben und nach guter Durchmischung (Vortex) der Hintergrund bei 520 nm vermessen.

Dann gibt man 50 μl einer angemessen verdünnten GOD-Lösung hinzu und mißt die Absorptionsänderung bei 520 nm innerhalb der ersten Minuten. Bei hohen Glucoseoxidasekonzentrationen genügen 2 Minuten, bei den auf dem Sensor abgelesenen Mengen wurde 10–20 Minuten lang gemessen. Der Extinktionskoeffizient des entstehenden Farbstoffs beträgt $13300 (\text{M cm})^{-1}$. Damit ist es möglich die spezifische Enzymaktivität der Glucoseoxidaselösung zu bestimmen. Diese wird in „units/mg“ angegeben. Dabei ist eine „unit“ wie folgt definiert: Eine „unit“ oxidiert 1 μmol β -D-Glucose pro Minute bei pH=5.1 ($T=35^\circ\text{C}$). Da zur Erzeugung von 1 mol des roten Farbstoffs 2 mol Wasserstoffperoxid notwendig sind, entspricht die gemessene Zunahme des Chromophors 0.5 units pro Minute. Die spezifischen Aktivitäten der verwendeten Enzyme sind in Tabelle A.1 angegeben.

$$[\text{Farbstoff}] = \frac{\Delta A \cdot V}{\epsilon \cdot d}$$

A.2. AKTIVITÄTSBESTIMMUNG MITTELS ENZYMATISCHEM ASSAY 127

- [Farbstoff] = erzeugte Farbstoffkonzentration [mol/min]
- ΔA = Absorptionsänderung pro Minute [min^{-1}]
- V = Reaktionsvolumen (=2.05 ml)
- ϵ = Extinktionskoeffizient des Farbstoffs (=13300 (M cm) $^{-1}$)
- d = Küvettenlänge (=1cm)

Mit dieser Methode wurde die enzymatische Aktivität der verwendeten Glucoseoxidaselösungen bestimmt. In Abbildung A.2 ist das Verhalten der Lösung, die zur Photoaktivierung verwendet wurde, dargestellt. Abbildung A.3 zeigt die Aktivität der Glucoseoxidaselösung, die als Antigen für die immunologischen Untersuchungen an bromcyan-aktivierten Sensoren benutzt wurde. Durch den linearen Teil der Kurve wurde mittels linearer Regression jeweils eine Gerade bestimmt. Diese diente als Kalibriergerade zur Detektion der enzymatischen Aktivität der jeweiligen Glucoseoxidase auf dem Sensor.

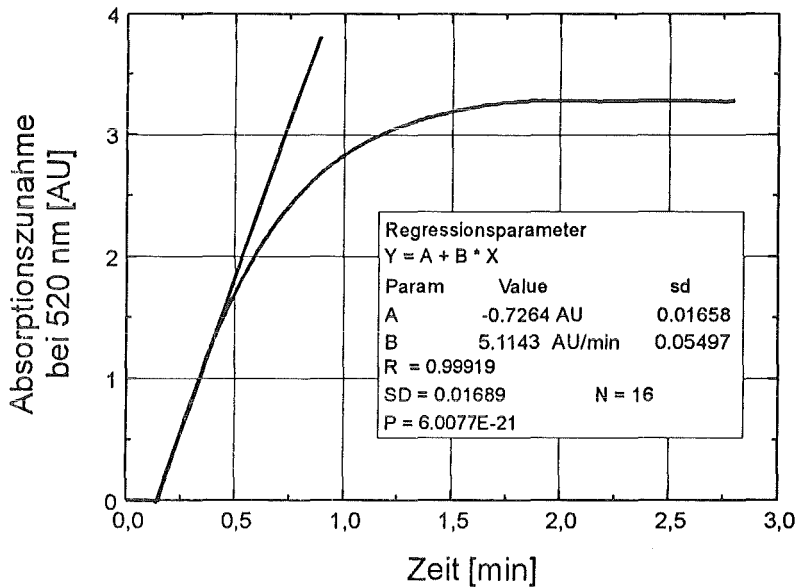


Abbildung A.2: Aktivitätsbestimmung der Glucoseoxidase (G-2133), die zur Derivatisierung mit TRIMID verwendet wurde. Einwaage: 16.5 μg

Aus diesen beiden Abbildungen ist zu erkennen, daß die Glucoseoxidase, die zur Modifikation mit TRIMID verwendet wurde, bei etwa gleicher Einwaage doppelte enzymatische Aktivität besitzt. Dies korreliert mit dem Gehalt an Coenzym im Gesamtprotein. Um die enzymatische Aktivität eines Proteins künstlich zu erhöhen, wird diesem freies Coenzym, in diesem Fall FAD, zugesetzt.

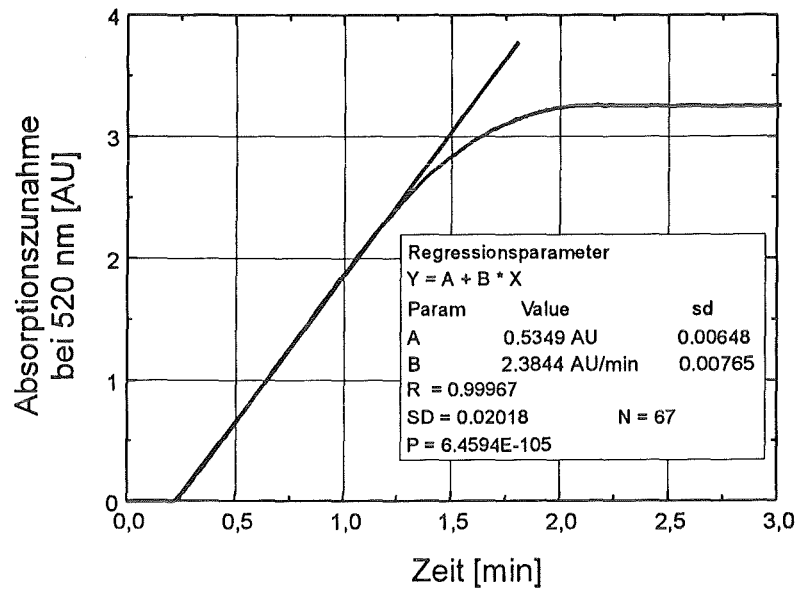


Abbildung A.3: Aktivitätsbestimmung der Glucoseoxidase (G-6641), die als Antigen verwendet wurde. Einwaage: 18 μg

Tabelle A.1: Spezifische Enzymaktivität der verwendeten Glucoseoxidase

GOD	ΔA [min^{-1}]	[Farbstoff] [$\mu\text{mol}/\text{min}$]	[β -D-Glucose] [$\mu\text{mol}/\text{min}$]	spez. Aktivität [units/mg]
G-6641*	2.3844	0.3675	0.735	44.54
G-2133*	5.1143	0.7883	1.577	87.59

* siehe Anhang A.4.2

A.3 Bestimmung der radioaktiven Zerfälle

Die durch den radioaktiven Zerfall freigesetzten Elektronen werden von Akzeptormolekülen aufgenommen und weitergeleitet. Die verwendete Szintillationslösung hatte folgende Zusammensetzung:

- 1080 ml Toluol p.a.
- 5.4 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO)
- 0.2 g 2,2'-p-Phenyl-bis-5-Phenyloxazol (POPOP)
- 920 ml Triton
- 40 ml Eisessig

Die Elektronen werden zunächst von Toluol, dann von PPO und schließlich von POPOP aufgenommen. Dieses angeregte Molekül emittiert dann eine Strahlung, die von einem Photomultiplier detektiert werden kann. Unter „decompositions per minute“ versteht man die Anzahl der Zerfälle, die bei hundertprozentiger Quantenausbeute gemessen werden könnten.

A.4 Biochemikalien

A.4.1 Antikörper

- monoklonale Antikörper gegen Glucoseoxidase
 - Bezeichnung : monoklonale anti-Glucoseoxidase
 - Tier : Maus
 - Firma : Sigma Immuno Chemicals
 - Produktnummer : G-5399
 - spez. Proteingehalt : 7.5 mg/ml
 - Stabilisator : 0.1 % Natriumazid
 - Titer : 1:20000
- monoklonale Antikörper gegen Peroxidase
 - Bezeichnung : monoklonale anti-Peroxidase
 - Tier : Maus
 - Firma : Sigma Immuno Chemicals
 - Produktnummer : P-2419
 - spez. Proteingehalt : 7.5 mg/ml
 - Stabilisator : 0.1 % Natriumazid
 - Titer : 1:5000

- polyklonale Antikörper gegen Glucoseoxidase
 - Bezeichnung : polyklonale anti-Glucoseoxidase
 - Tier : Ziege
 - Firma : ANAWA
 - Produktnummer : 4665-7504
 - spez. Proteingehalt : 10 mg/ml
 - Gesamtproteingehalt : 40-70 mg/ml
 - Stabilisator : 0.05 % Natriumazid
 - Titer : 1:400

- polyklonale Antikörper gegen Rinderserumalbumin
 - Bezeichnung : polyklonales anti-Rinderserumalbumin
 - Tier : Kaninchen
 - Firma : Sigma Immuno Chemicals
 - Produktnummer : B-1520
 - spez. Proteingehalt : 2.4 mg/ml
 - Gesamtproteingehalt : 60 mg/ml
 - Stabilisator : 0.1 % Natriumazid
 - Titer : 1:8

A.4.2 Antigene

- Rinderserumalbumin
 - Bezeichnung : Rinderserumalbumin (BSA)
 - Firma : Serva Feinbiochemica
 - Produktnummer : 11840-11928
 - Fraktion : V

- Glucoseoxidase, verwendet als Antigen für Cyanotransfertechnik
 - Bezeichnung : Glucoseoxidase
 - Herkunft : Aspergillus niger
 - Typ : II-S
 - Firma : Sigma Immuno Chemicals
 - Produktnummer : G-6641
 - enzym. Aktivität : 48400 units/g
 - Katalasegehalt : ≤ 0.7 %

- Glucoseoxidase, verwendet zur Umsetzung mit TRIMID
 - Bezeichnung : Glucoseoxidase
 - Herkunft : Aspergillus niger
 - Type : VII
 - Firma : Sigma Immuno Chemicals
 - Produktnummer : G-2133
 - enzym. Aktivität : 162000 units/g
 - Katalasegehalt : 1 %

Anhang B

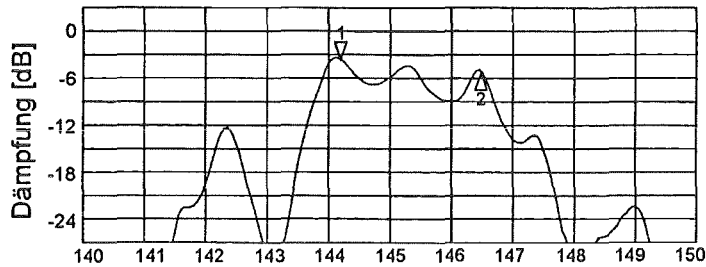
OFW–Bauelemente Anhang

B.1 Übertragungskennlinien der OFWB's

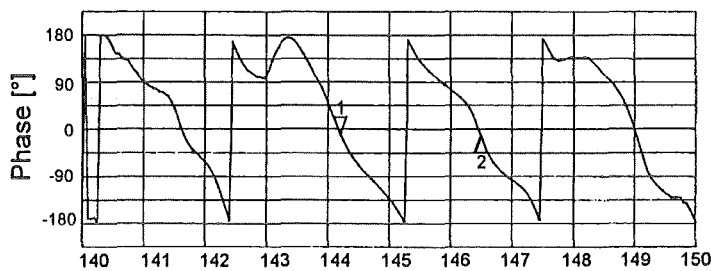
Die Charakterisierung der akustischen Eigenschaften der verschiedenen OFW–Bauelemente erfolgte durch die Aufnahme eines Transmissionsspektrums sowie dem zugehörigen Phasenverlauf am Netzwerkanalysator. Die Marker wurden jeweils auf eine Phasenlage von -10° gesetzt, um so die jeweilige Dämpfung zu bestimmen. Zunächst erfolgte die Messung an Luft, anschließend wurden auf den Sensor $50 \mu\text{l}$ Wasser gegeben und die Messung wiederholt. Die aufgenommenen Kurven sind in den Abbildungen B.1–B.4 gezeigt.

Hitachi HS 158 - 145 MHz

Betrieb an Luft



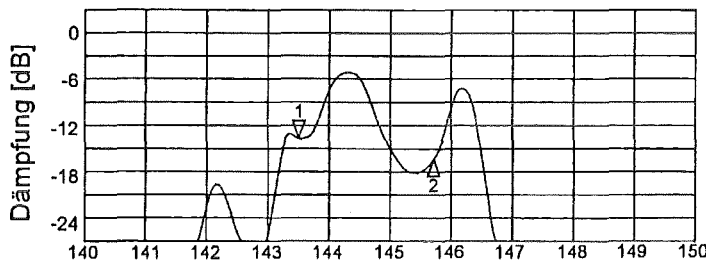
1: -3.56 dB
144.198 MHz
2: -5.07 dB
146.474 MHz



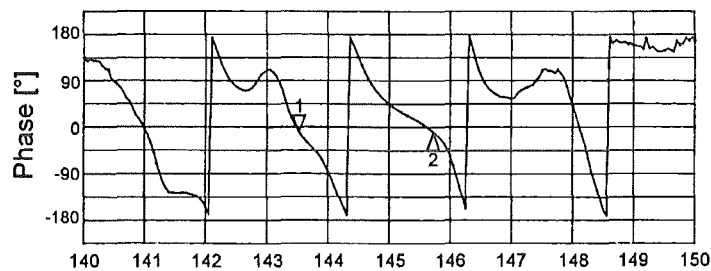
1: -10.58°
144.198 MHz
2: -10.41°
146.474 MHz

Frequenz [MHz]

Betrieb in Wasser



1: -13.7 dB
143.515 MHz
2: -16.31 dB
145.715 MHz



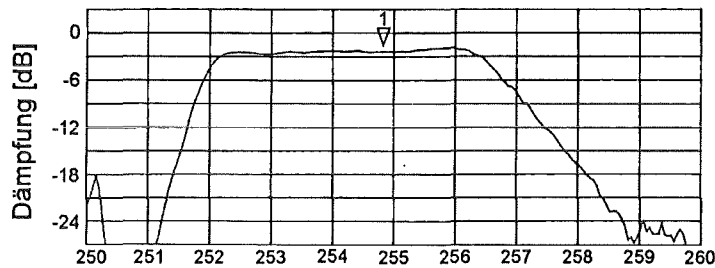
1: -10.43°
143.515 MHz
2: -10.32°
145.715 MHz

Frequenz [MHz]

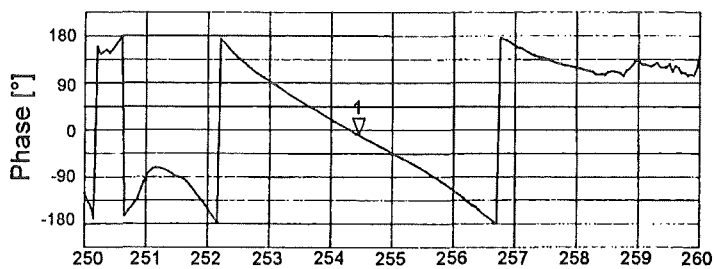
Abbildung B.1: Übertragungskennlinien der 145 MHz Bauelemente an Luft und in Wasser

Murata SAF 254 - 254 MHz

Betrieb an Luft



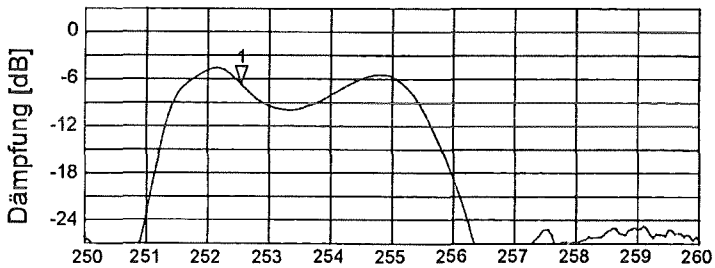
1: -2.32 dB
254.449 MHz



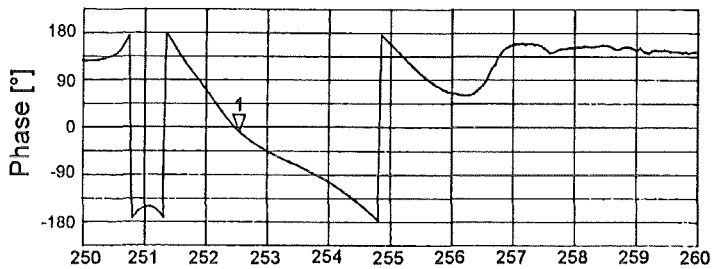
1: -10.04°
254.449 MHz

Frequenz [MHz]

Betrieb in Wasser



1: -6.67 dB
252.535 MHz



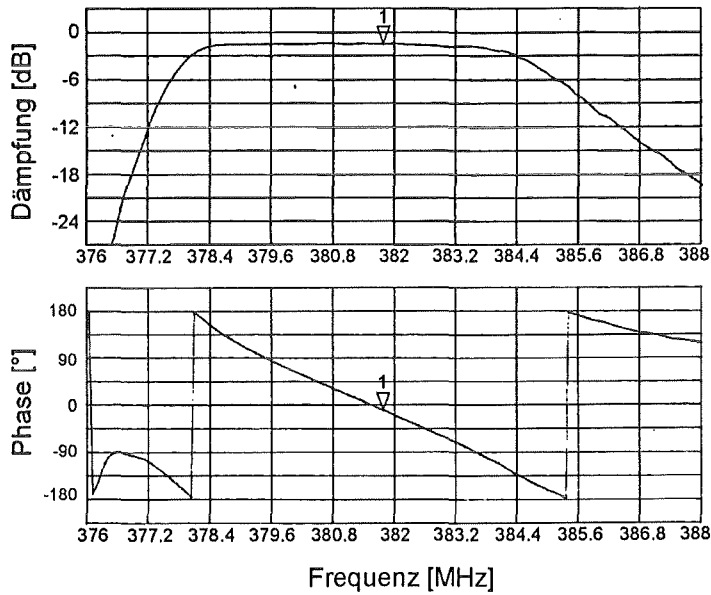
1: -9.78°
252.535 MHz

Frequenz [MHz]

Abbildung B.2: Übertragungskennlinien der 254 MHz Bauelemente an Luft und in Wasser

Murata SAF 380 - 380 MHz

Betrieb an Luft



Betrieb in Wasser

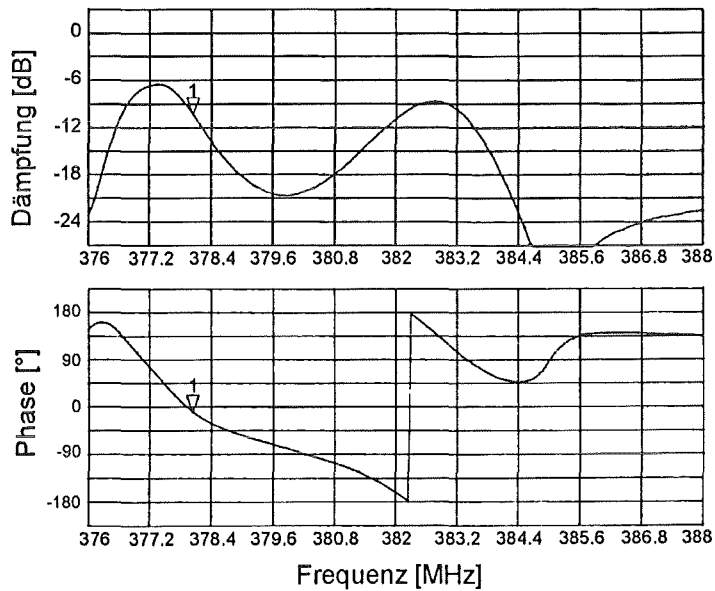
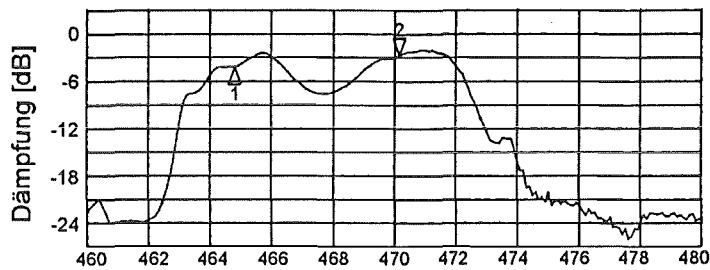


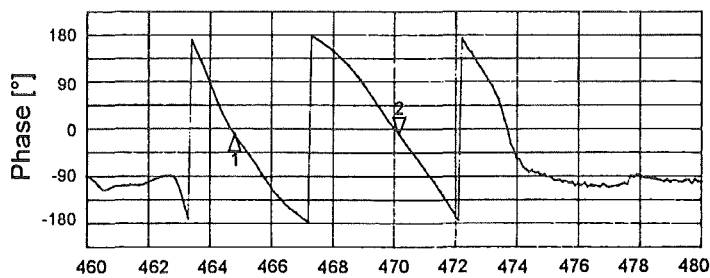
Abbildung B.3: Übertragungskennlinien der 380 MHz Bauelemente an Luft und in Wasser

Siemens B4514 - 471 MHz

Betrieb an Luft



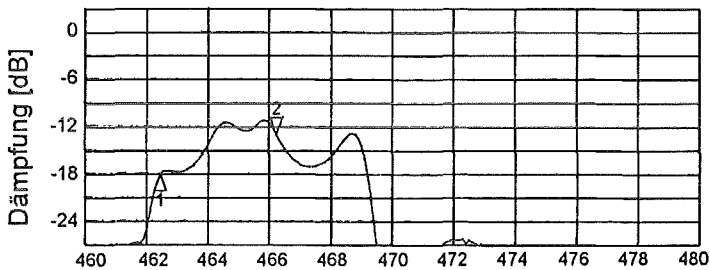
- 1: -4.18 dB
464.786 MHz
- 2: -2.69 dB
470.154 MHz



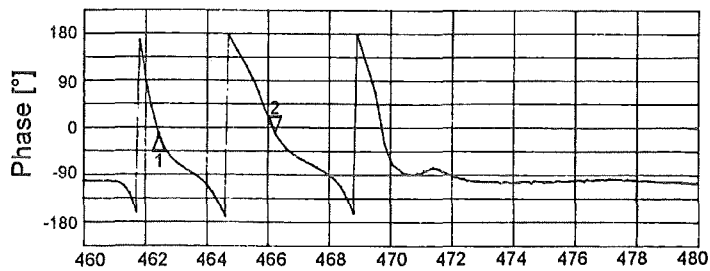
- 1: -10.09°
464.786 MHz
- 2: -10.54°
470.154 MHz

Frequenz [MHz]

Betrieb in Wasser



- 1: -18.1 dB
462.426 MHz
- 2: -13.17 dB
466.236 MHz



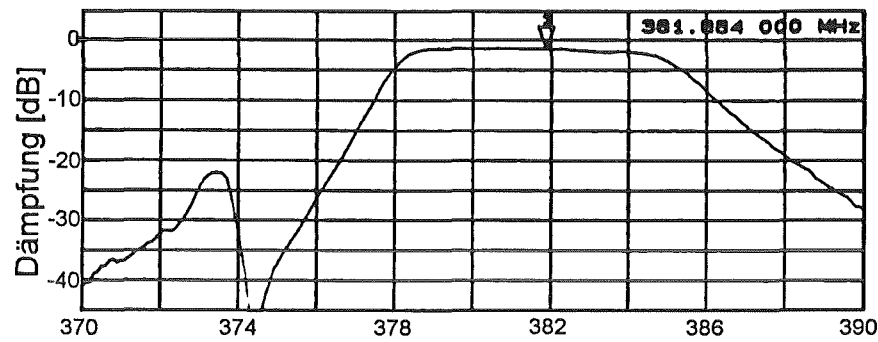
- 1: -10.67°
462.426 MHz
- 2: -10.55°
466.236 MHz

Frequenz [MHz]

Abbildung B.4: Übertragungskennlinien der 471 MHz Bauelemente an Luft und in Wasser

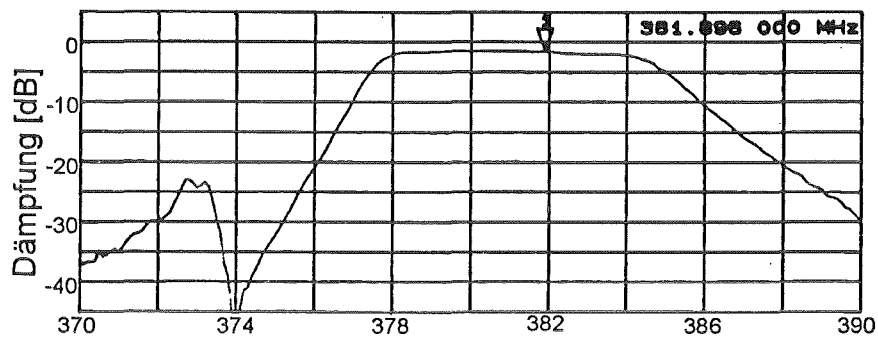
B.2 Übertragungskennlinien bei der Polyimidbeschichtung

Zur Überprüfung der Polyimidisierung wurde während der Beschichtung nach jedem Arbeitsschritt die Dämpfung des Bauelements bei einer Phasenlagen von -10° ($\pm 0.3^\circ$) bestimmt. Es wurden ausschließlich 380 MHz Sensoren schutzbeschichtet. Die Übertragungskennlinien dieser Sensoren nach den einzelnen Beschichtungsschritten sind in Abbildung B.5 gezeigt.



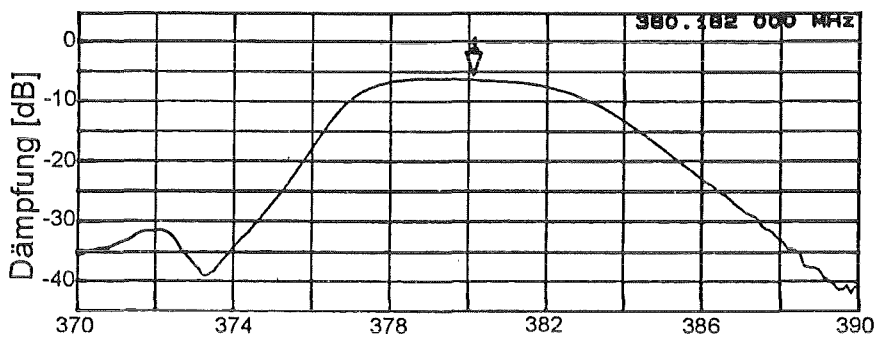
gewaschen

1: -1.4276 dB



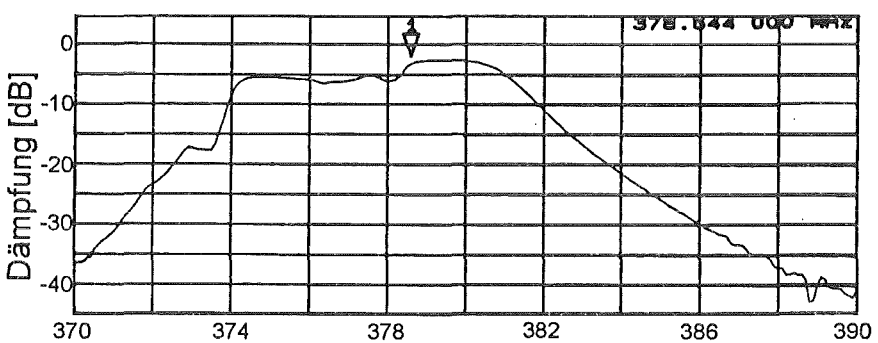
Silanisierung

1: -1.5037 dB



Polyaddukt

1: -6.2352 dB



getempert

1: -2.8915 dB

Frequenz [MHz]

Abbildung B.5: Änderung des Übertragungsverhaltens bei der Polyimidbeschichtung

Anhang C

Abkürzungen und Symbole

C.1 Symbolverzeichnis

a_0, a_1, \dots		Temperaturkoeffizienten
ΔA		Absorptionsänderung
C, C_{Steif}		Elastizitätstensor
c'_{44}		elastische Konstante
d		optische Weglänge
D		elektrische Verschiebung
$f, f_0, \Delta f$	Hz	Resonanzfrequenz
h	m	Schichtdicke
i		komplexe Zahl
K_a	l/mol	Affinitätskonstante
k_a	mol/l	Geschwindigkeitskonstante der Immunokomplexbildung
k_d	(mol/l) ²	Geschwindigkeitskonstante der Immunokomplexdissoziation
k		Wellenvektor
m	kg	Masse
P	J / (m s)	Leistungsflußdichte
T	K	Temperatur
T_S		Spannungstensor
$v, v_0, \Delta v$	m/s	Oberflächenwellenschallgeschwindigkeit
V		Volumen
x_1, x_2, x_3		Auslenkungen der Oberflächenteilchen in die Raumrichtungen

α	dB	Dämpfung
β		Ausbreitungskonstante
ε		Dielektrizitätskonstante
ε_P^T		Dielektrizitätskonstante des Substrats
$\varepsilon_l, \varepsilon_l'$		Dielektrizitätskonstante der Lösung
η	kg/(m s)	Viskosität
μ'		Lamé-Konstante
ρ	kg/m ³	Dichte
σ	S/m	spezifische Leitfähigkeit
Φ	V	elektrostatishes Potential
ω	Hz	Kreisfrequenz

C.2 Abkürzungsverzeichnis

APM	Akustischer Plattenmodensensor
APTES	Aminopropyl-triethoxy-silan
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumine“)
CDR	komplementaritätsbestimmende Regionen
CVD	Chemical Vapor Deposition
DCC	Dicyclohexyl-carbodiimid
DK	Dielektrizitätskonstante
EDAC	N-Ethyl-N'-Dimethyl-aminopropyl-carbodiimid
Fab	Fragment eines Immunglobulins, das die antigenbindenden Stellen trägt
FAD, FADH ₂	Flavinadenindinukleotid in oxidiert und reduzierter Form
Fc	kristallisierendes Fragment eines Immunglobulins
FIA	Fließinjektionsanalyse
GOD	Glucoseoxidase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
HPSW	Horizontal polarisierte Scherwelle
IDT	Interdigitaltransducer
IgG	Immunglobulin G
K	Kopplungsfaktor
PBS	Phosphatpuffer
PECVD	Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition
POD	Peroxidase
POPOP	2,2'-p-Phenyl-bis-5-phenyloxazol
PPO	2,5-Diphenyloxazol
OFW	Oberflächenwelle
OFWB	Oberflächenwellenbauelement
RW	Rayleighwelle
SMA	Hochfrequenzanschlüsse
SSBW	„Surface Skimming Bulk Wave“
STW	Transversale Oberflächenwelle
T-BSA, T-GOD	mit TRIMID modifizierte Proteine
TEA	Triethylamin
TRIMID	3-Trifluoromethyl-3-(m-isothiocyanophenyl)-diazirin
TWEEN 20	hydrophiles Detergens