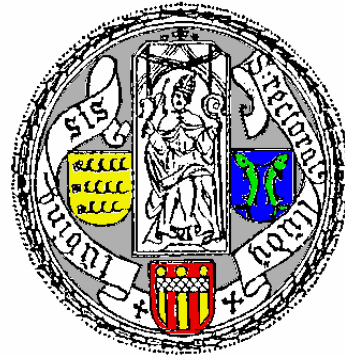


Reflektometrische und integriert optische Sensoren für die Bioanalytik



Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2005

vorgelegt von

Rüdiger Frank

aus Weildorf

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Dezember 2005

Dekan: Prof. Dr. Stefan Laufer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Günter Gauglitz

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Udo Weimar

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
I. Reflektometrische optische Biosensoren	5
2. Theoretische Einführung	7
2.1. Optische Grundlagen	7
2.1.1. Die Maxwell-Gleichungen	7
2.1.2. Ausbreitung des Lichts und seine Wechselwirkung mit Materie	9
2.1.3. Reflexion des Lichts an zwei Grenzflächen (Einfachschicht) .	13
2.1.4. Reflexion des Lichts in Multischichtsystemen	15
3. Materialien und Methoden	19
3.1. Materialien	19
3.1.1. Oberflächenmodifizierung von Glasoberflächen	19
3.1.2. Oberflächenmodifizierung von ITO- und Kunststoffoberflächen	21
3.2. Methoden	21
3.3. Ablauf einer Messung	23
4. Ergebnisse und Diskussionen	25
4.1. Die Analyse des RIfS-Detektionsprinzip	25
4.1.1. Das technische Vorgehen bei einer Messung mit RIfS	25
4.1.2. Die Auswertung des gemessenen Reflexionsspektrums	26
4.1.3. Hintergrund des RIfS-Detektionsprinzips	29
4.2. Die Detektion von Bindungsvorgängen mit einer Wellenlänge	32
4.3. Reflektivitäten an optischen Schichtsystemen	34
4.3.1. Betrachtung ausgewählter dielektrischer Schichtsysteme . .	34
4.3.2. Die Signaldynamik bei den ausgewählten Schichtsystemen .	39

4.3.3. Eventuelle Nachteile der Einwellenlängenmethode gegenüber RIfS	41
4.4. Erste Messungen mit der Einwellenlängenreflektometrie	41
4.4.1. Ermittlung der optimalen Wellenlängen	42
4.4.2. DNA-Hybridisierungen auf Interferenzglas	43
4.4.3. Messungen an Kunststoffsubstraten	45
4.4.4. Betrachtungen über Meßfehler und mögliche Verbesserungen der Meßapparatur	48
4.5. Funktionstest eines 1λ -Reflektometrie-Zweikanalaufbaus	49
4.6. Die Signaldynamik in Abhängigkeit vom Träger	50
4.6.1. Untersuchungen an Interferenzglas	52
4.6.2. Untersuchungen am Goethe-Glas	52
4.6.3. Untersuchungen an unbeschichteten Kunststoffträgern	52
4.6.4. Untersuchungen an mit ITO beschichtetem Bk7-Glas	52
4.6.5. Untersuchungen an optisch unvergütetem Bk7-Glas	58
4.6.6. Diskussion der gemessenen Signale	59
4.7. Schlußfolgerungen aus den Messungen	61
4.7.1. Abhängigkeiten der Signaldynamik	61
4.8. Potenzielle apparative Verbesserungen	66
4.8.1. Die Signaldynamik beim Fabry-Perot-Interferometer	66
4.8.2. Erhöhte Signaldynamik durch optimierten Einfallswinkel	70
II. Integriert optische Biosensoren	73
5. Grundlagen der Sensorik mit Evaneszenzfeldern	75
5.1. Strahlenoptische Einführung	75
5.1.1. Verhalten von Licht bei Totalreflexion	75
5.1.2. Der Schichtwellenleiter im geometrischen Modell	77
5.1.3. Phasenausbreitungskonstante und effektiver Brechungsindex	79
5.1.4. Grenzen des strahlenoptischen Modells	80
5.2. Die elektromagnetische Theorie des Wellenleiters	81
5.2.1. Die Maxwellgleichungen für Lichtwellenleiter	81
5.2.2. Grenzflächenbedingungen	82
5.2.3. Der Schichtwellenleiter im wellenoptischen Bild	83
5.2.4. Streifenwellenleiter	86
5.2.5. Ausbreitung von Licht in einem Wellenleiter	88

5.3. Sensorik mit integriert optischen Wellenleitern	88
5.3.1. Funktionsweise des Mach-Zehnder-Interferometers (MZI)	89
5.3.2. Theorie zur integriert optischen Sensorik	90
5.3.3. Optimiertes integriert optisches Sensordesign	95
6. Materialien und Methoden	99
6.1. Materialien	99
6.1.1. Design des Mach-Zehnder-Interferometers	99
6.1.2. Verwendete Chemikalien	101
6.2. Methoden	102
6.2.1. Verwendete Geräte	102
6.2.2. Der Mach-Zehnder Aufbau	102
7. Ergebnisse	105
7.1. Oberflächenmodifizierung der MZI-Oberfläche	105
7.1.1. Optimierung der Hydroxylierung	105
7.1.2. Silanisierung	108
7.1.3. Beschichtung mit Aminodextran (AMD)	108
7.1.4. Derivatisierung mit Atrazincapronsäure (ACA)	108
7.2. Erste Messungen	109
7.3. Verbesserte Messungen	112
7.4. Vergleich mit anderen integriert optischen Sensorsystemen	112
7.5. Zukünftige Verbesserungen des Sensors	114
7.5.1. Die Idee des elektrooptischen Demodulationsprinzips	115
8. Zusammenfassung	119
A. Optische Parameter der Materialien	123
A.1. Materialien mit Cauchy-Parametrisierung	123
A.2. Brechungsindextabellen	123
A.2.1. BK7-Glas	123
A.2.2. Amorphes Silizium	124
A.2.3. Aluminium	125

1. Einleitung

Das Interesse an Biosensoren für die Charakterisierung von biologischen Systemen wie z.B. die Detektion von Antigen-Antikörper oder DNA-DNA Wechselwirkungen ist seit mehreren Jahren ungebrochen und wird aufgrund neuer Forschungsfelder und erweiterten potentiellen Anwendungsmöglichkeiten weiter steigen. Speziell bei optischen Biosensoren gibt es bereits kommerziell erhältliche Geräte [1]-[4] für unterschiedliche Applikationen. Zudem werden weiterhin neue gerätechnische Lösungen für aktuelle Anwendungsfelder entwickelt. Generell kann man bei optischen Sensoren zwischen fluoreszenzbasierten Methoden, die mit farbstoffmarkierten Analyten arbeiten, und markierungsfreien Methoden unterscheiden. Diese markierungsfreien Methoden detektieren in der Regel direkt oder indirekt die Änderung einer physikalischen Größe, die durch die Anbindung von Analyten an die Sensoroberfläche hervorgerufen wird. Am weitesten verbreitet ist die Oberflächenplasmonenresonanz (**S**urface **P**lasmon **R**esonance) [5]. Diese Methode ist ein qualitativ sehr hochwertiges Werkzeug für die biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA), mit dem eine Vielzahl von Untersuchungen im Bereich von DNA-DNA, Protein-Protein und Antigen-Antikörper Wechselwirkungen veröffentlicht werden konnten [6]-[8]. Der schwedische Hersteller BiaCore [1] hat basierend auf SPR ein Gerät kommerzialisiert, mit dem sogar die markierungsfreie Detektion von kleinen Molekülen realisiert [9] werden konnte, die Methode selbst bietet also ein weites Einsatzfeld. Jedoch gibt es bis jetzt nur sehr wenige Ansätze für einen parallelisierten Aufbau [10]-[15]. Grund dafür ist unter anderem das Problem der Überlagerung von Plasmonenschwingungen auf der Metalloberfläche zwischen benachbarten Meßpunkten. Andere Meßprinzipien wie Gitterkoppler [17]-[22], „Resonant Mirror“ [16] oder integriert optische Verfahren wie das Mach-Zehnder Interferometer [23]-[25], das Young-Interferometer [26]-[28] oder das Phasendifferenz Interferometer [29]-[31] reagieren ebenfalls sehr sensibel auf kleinste Änderungen an der Sensoroberfläche (alle Prinzipien reagieren auf Änderungen des Brechungsindex in der unmittelbaren Umgebung der Sensoroberfläche), stellen den Anwender allerdings aufgrund ihrer aufwendigen Bauweise vor gewisse Probleme bei konkreten Aufgaben. Speziell bei parallelisierten Meßaufgaben wird

die Anwendbarkeit kritisch. Zudem sind alle bisher genannten Prinzipien gegen äußere Einflüsse wie z.B. Temperaturschwankungen sehr anfällig.

Die in unserem Arbeitskreis entwickelte Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS) [32]-[38] ist weit weniger temperaturabhängig und eine im Vergleich zu den vorherigen Prinzipien sehr robuste Methode. Verschiedenste Anwendungen sowie parallelisierte und miniaturisierte gerätetechnische Ausführungen bestätigen dennoch die Effizienz, die qualitativ hervorragenden Ergebnisse und die Vielseitigkeit dieser Methode, die auf der Detektion der Änderung der optischen Schichtdicke an der Sensoroberfläche beruht.

In der hier präsentierten Arbeit beschäftige ich mich mit den zwei wesentlichen optischen Grundprinzipien der oben genannten markierungsfreien Detektionsmethoden und deren Optimierung für die Biosensorik. Zum einen versuche ich, das prinzipielle Verhalten von reflektiertem Licht für Sensoranwendungen genau darzulegen. Nach einer theoretischen Einführung, einer präzisen Erläuterung des RIfS-Prinzips und weiteren Überlegungen wird sich zeigen, daß im Prinzip Reflektivitäten von nur einer Wellenlänge als Sensorsignal zur Detektion von Bindungsvorgängen ausreichend sind. Die Qualität der Messungen sowie die Übereinstimmung mit der etablierten RIfS-Methode werden dies beweisen. Zudem funktioniert das Prinzip der 1λ -Reflektometrie unabhängig vom Glasträger. Durch diese Universalität und Einfachheit der hier entwickelten Methode ist eine zukünftige Parallelisierung oder Miniaturisierung des Prinzips mit weit weniger technischem Aufwand verbunden als alle weiter oben erwähnten. Experimentelle Untersuchungen werden die Richtigkeit des vorgestellten Prinzips beweisen. Es werden weitere Rechnungen präsentiert, die zeigen werden, daß die Signaldynamik des Sensors neben einer geeigneten optischen Zusammensetzung des Trägers enorm von der geometrischen Randbedingung des Einfallswinkels des monochromatischen Lichts auf den Träger abhängt und entsprechend um ein Vielfaches vergrößert werden kann.

Zum anderen präsentiere ich mit einem rein brechungsindexsensitiven zweiten Sensor ein integriert optisches Mach-Zehnder Interferometer (MZI). Im Gegensatz zu anderen in unserer Gruppe schon verwendeten MZI wurden die Strukturen des Sensors optimal ihrem Einsatzfeld angepaßt. Dabei mußte auch wegen des unterschiedlichen Wellenleitermaterials ein modifiziertes Protokoll zur Oberflächenbelegung der selektiven Schicht entwickelt werden. Es wird gezeigt, daß die optimierte Struktur des MZI eine stark verbesserte Signaldynamik gegenüber bisher bei uns verwendeten integriert optischen Bauteilen und der 1λ -Reflektometrie aufweist. Allerdings muß dieser Vorteil durch einen erhöhten apparativen Aufwand

erkauft werden. Zudem liegt leider noch ein zu großes Rauschen auf den eigentlichen Meßkurven, das diesen Vorteil bisher praktisch zunichte macht. Eine verbesserte Meßtechnik, die hier vorgestellt wird, soll Abhilfe schaffen.

Zusammenfassend gesagt habe ich den stetigen Prozeß der Optimierung und Verbesserung der Sensoroberflächen bezüglich ihrer „chemischen“ Sensitivität, der in unserer Gruppe sehr erfolgreich vorangetrieben wird, auf die optischen und geometrischen Randbedingungen der hier besprochenen Sensorsysteme ausgedehnt. Genauso wichtig wie eine möglichst gut präparierte Sensoroberfläche für optimale Anbindung des gesuchten Analyten an dieselbe, ist eine möglichst gute optische Optimierung der Sensorumgebung für die Photonen als Meßsonden, um diese Anbindung optimal detektieren zu können. Nur die Kombination aus beiden Optimierungen verspricht einen Biosensor bei dem die Signale maximal sind. Daß man dabei mit manchen Methoden im Prinzip größere Signale erhält, andere dafür universeller einsetzbar sind, liegt in der Natur der unterschiedlichen Sensorprinzipien und rechtfertigt deren Existenz nebeneinander.

Teil I.

**Reflektometrische optische
Biosensoren**

2. Theoretische Einführung

2.1. Optische Grundlagen

2.1.1. Die Maxwell-Gleichungen

Die gesamte Theorie der elektromagnetischen Strahlung kann von den **Maxwell-schen Gleichungen** abgeleitet werden [39], [40]:

$$\vec{\nabla} \times \vec{E}(\vec{r}, t) = -\frac{\partial \vec{B}(\vec{r}, t)}{\partial t} \quad (2.1a)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{H}(\vec{r}, t) = \frac{\partial \vec{D}(\vec{r}, t)}{\partial t} + \vec{j}(\vec{r}, t) \quad (2.1b)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{D}(\vec{r}, t) = \rho(\vec{r}, t) \quad (2.1c)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{B}(\vec{r}, t) = 0 \quad (2.1d)$$

Hinzu kommen noch, falls sich Licht in Medien ausbreitet, die die Eigenschaften des Materials beschreibenden Gleichungen:

$$\vec{D}(\vec{r}, t) = \tilde{\epsilon}(\vec{r}, t) \vec{E}(\vec{r}, t) \quad (2.2a)$$

$$\vec{B}(\vec{r}, t) = \tilde{\mu}(\vec{r}, t) \vec{H}(\vec{r}, t) \quad (2.2b)$$

$$\vec{j}(\vec{r}, t) = \tilde{\sigma}(\vec{r}, t) \vec{E}(\vec{r}, t) \quad (2.2c)$$

\vec{E} ist der elektrische Feldvektor, \vec{D} die dielektrische Verschiebung, \vec{B} die magnetische Flußdichte, \vec{H} die magnetische Feldstärke, \vec{j} die Stromdichte, $\tilde{\sigma}$ die elektrische Leitfähigkeit, ρ die Ladungsträgerdichte, $\tilde{\epsilon}$ die Dielektrizitätskonstante und $\tilde{\mu}$ die magnetische Permeabilität. $\tilde{\epsilon}(\vec{r}, t)$, $\tilde{\mu}(\vec{r}, t)$ und $\tilde{\sigma}(\vec{r}, t)$ sind im allgemeinen Tensoren 2. Stufe. In vielen Fällen sind sie jedoch zeitunabhängig und die Materialien isotrop. Daraus folgt, daß sich die Tensoren zu skalaren Größen vereinfachen:

$$\tilde{\epsilon}(\vec{r}, t) \Rightarrow \epsilon = \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \quad (2.3a)$$

$$\tilde{\mu}(\vec{r}, t) \Rightarrow \mu = \mu_0 \cdot \mu_r \quad (2.3b)$$

mit $\epsilon_0 \approx 8,85 \cdot 10^{-12} \frac{\text{F}}{\text{m}}$ und $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} \frac{\text{N}}{\text{A}^2}$. Mit den eben gemachten Vereinfachungen und der Beschränkung auf elektrisch neutrale ($\rho = 0$) und nichtleitende Medien ($\sigma = 0$) kann man aus den Maxwell-Gleichungen die Wellendifferentialgleichungen herleiten:

$$\vec{\nabla}^2 \vec{E} = \mu\epsilon \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} \quad (2.4a)$$

$$\vec{\nabla}^2 \vec{B} = \mu\epsilon \frac{\partial^2 \vec{B}}{\partial t^2} \quad (2.4b)$$

Zusammen mit (2.1) sind die allgemeinen Lösungen dieser Gleichungen gekoppelte, raum- und zeitabhängige periodische Felder der Form:

$$\Psi(\vec{x}, t) = A_0 e^{i(\vec{k}\vec{x} - \omega t)} \quad (2.5)$$

Diese allgemeine Welleneigenschaft der elektromagnetischen Strahlung ist die wesentliche Grundlage für diese Arbeit. A_0 ist die Amplitude, \vec{k} der Wellenzahlvektor mit Betrag $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ und $\omega = 2\pi\nu$ die Kreisfrequenz der elektromagnetischen Welle. Die **Intensität** ist der zeitliche Mittelwert des Betrages des **Poyntingschen Vektors** [39]:

$$I := \langle S \rangle = \frac{c^2 \epsilon_0}{2} |\vec{E}_0 \times \vec{B}_0| = \frac{c\epsilon_0}{2} E_0^2 \quad (2.6)$$

Die Lichtgeschwindigkeit ergibt sich ebenfalls aus 2.1 zu

$$c = \frac{1}{\sqrt{\epsilon\mu}}. \quad (2.7)$$

Im Vakuum ($\epsilon = \epsilon_0, \mu = \mu_0$) ist die Lichtgeschwindigkeit

$$c_0 = \frac{1}{\sqrt{\epsilon_0\mu_0}} \quad (2.8)$$

Das Verhältnis der Lichtgeschwindigkeit im Vakuum zu der in Materie nennt man den **absoluten Brechungsindex** n [39]:

$$n := \frac{c_0}{c} = \sqrt{\frac{\epsilon\mu}{\epsilon_0\mu_0}} \quad (2.9)$$

2.1.2. Ausbreitung des Lichts und seine Wechselwirkung mit Materie

Im folgenden werden die für diese Arbeit wesentlichen Phänomene behandelt, die mit der Ausbreitung des Lichts und seiner Wechselwirkung mit Materie in Verbindung stehen. Dabei sind hier vor allem die Ausbreitungseigenschaften von Licht in Materie und sein Verhalten an Grenzflächen zweier unterschiedlicher Medien interessant. Eine hierfür grundlegende Eigenschaft wird durch das **Huygenssche Prinzip** beschrieben [39]:

Jeder Punkt auf einer primären Wellenfront dient als Ursprung von kugelförmigen sekundären Elementarwellen, so daß die primäre Wellenfront zu einer späteren Zeit die Einhüllende dieser Elementarwellen ist. Ferner schreiten die Wellen mit einer Geschwindigkeit und Frequenz fort, die gleich denen der Primärwelle in jedem Punkt im Raum sind.

Reflexion und Brechung

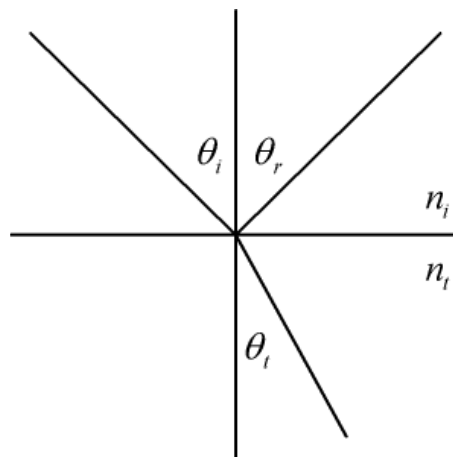


Abbildung 2.1.: Reflexion und Brechung einer ebenen Welle an der Grenzfläche zwischen zwei Schichten. Die Strahlen zeigen die Ausbreitungsrichtung der Welle und stehen senkrecht zur Wellenfront.

Aus dem Huygensschen Prinzip läßt sich das **Snelliussche Brechungsgesetz** herleiten. An der Grenzfläche zwischen zwei Medien gilt [39]:

$$\frac{\sin \theta_i}{\sin \theta_t} = \frac{c_i}{c_t} = \frac{n_t}{n_i}. \quad (2.10)$$

Licht, das von einem Medium mit Brechungsindex n_i unter dem Winkel θ_i zur Einfallsebene auf ein anderes Medium mit dem Brechungsindex n_t trifft, wird zum Teil unter dem Winkel θ_t gebrochen. Der andere Teil des Lichts wird nach dem **Reflexionsgesetz**

$$\theta_i = \theta_r \quad (2.11)$$

„Einfallswinkel=Ausfallswinkel“ reflektiert. Die Indices stehen für i =einfallende (engl.: incident), t =transmittierte und r =reflektierte Anteile der Größen an der Grenzfläche.

Reflexion des Lichts an einer Grenzfläche

Für die Gesamtintensität des Lichts gilt generell

$$1 = R + T + (A). \quad (2.12)$$

Das auf ein Medium einfallende Licht mit der Intensität 1 wird aufgeteilt in einen reflektierten (R), einen transmittierten (T) und einen absorbierten Teil (A). Die Absorption kann für dielektrische Medien vernachlässigt werden, wir beschränken uns vorerst auf die Reflexion und Transmission von Licht. Die Anteile der reflektierten und transmittierten Strahlung ergeben unter Einbeziehung von Grenzbedingungen an den Phasengrenzen der Medien die **Fresnelschen Gleichungen**. Dabei muß bei der einfallenden Strahlung zwischen senkrecht und parallel zur Einfallsebene polarisiertem Licht unterschieden werden. Es reicht wegen der Verknüpfung zwischen \vec{E} und \vec{B} die Beschränkung auf das \vec{E} -Feld. Für dielektrische Medien ($\mu_i \approx \mu_t \approx \mu_0$) gilt:

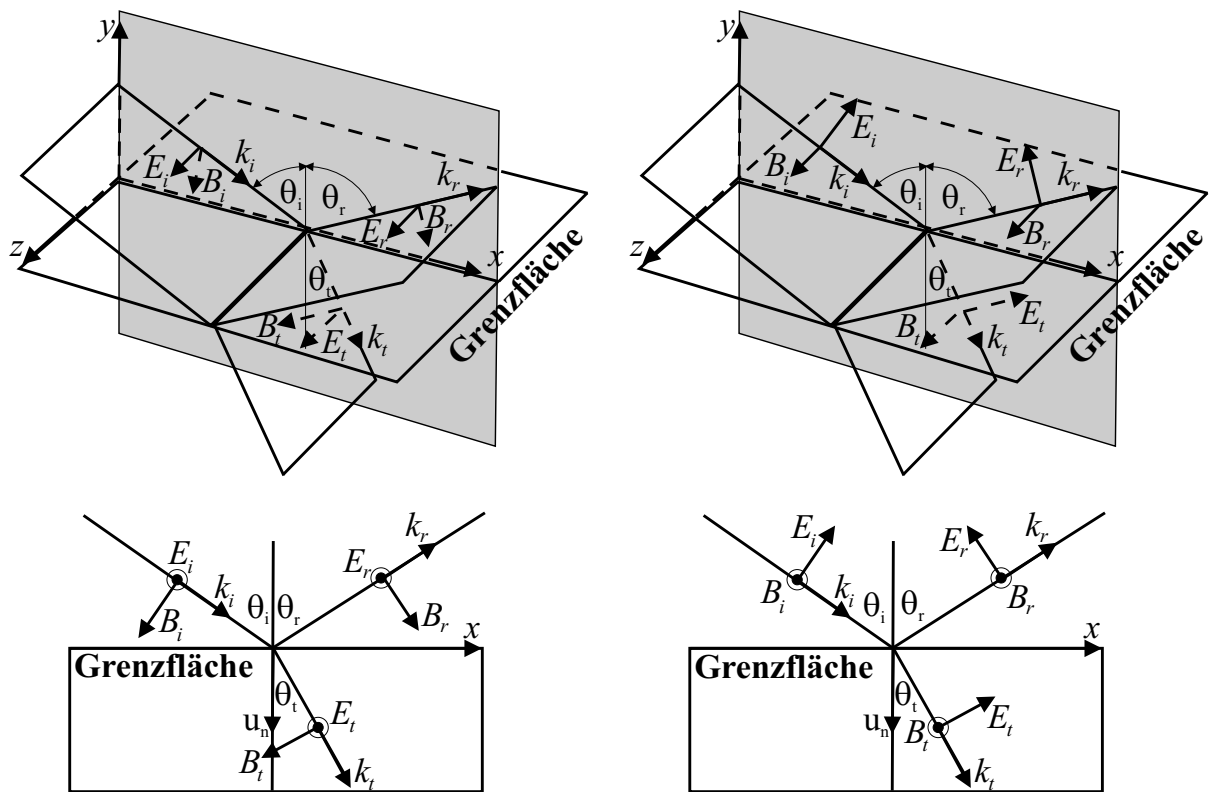
$$r_{\perp} = \left(\frac{E_{0r}}{E_{0i}} \right)_{\perp} = \frac{n_i \cos \theta_i - n_t \cos \theta_t}{n_i \cos \theta_i + n_t \cos \theta_t} \quad (2.13a)$$

$$t_{\perp} = \left(\frac{E_{0t}}{E_{0i}} \right)_{\perp} = \frac{2n_i \cos \theta_i}{n_i \cos \theta_i + n_t \cos \theta_t} \quad (2.13b)$$

$$r_{\parallel} = \left(\frac{E_{0r}}{E_{0i}} \right)_{\parallel} = \frac{n_t \cos \theta_i - n_i \cos \theta_t}{n_i \cos \theta_t + n_t \cos \theta_i} \quad (2.13c)$$

$$t_{\parallel} = \left(\frac{E_{0t}}{E_{0i}} \right)_{\parallel} = \frac{2n_i \cos \theta_i}{n_i \cos \theta_t + n_t \cos \theta_i} \quad (2.13d)$$

r_{\perp} und r_{\parallel} kennzeichnen die Amplitudenreflexionskoeffizienten, t_{\perp} und t_{\parallel} die Amplitudentransmissionskoeffizienten. Der Reflexionsgrad R und die Durchlässigkeit



(a) Ankommende Welle, deren \vec{E} -Feld senkrecht zur Einfallsebene steht.

(b) Ankommende Welle, deren \vec{E} -Feld in der Einfallsebene liegt.

Abbildung 2.2.: Geometrische Randbedingungen für die Polarisationsrichtungen des Lichts.

T ergeben sich durch

$$R_{\perp} = r_{\perp}^2 \tag{2.14a}$$

$$R_{\parallel} = r_{\parallel}^2 \tag{2.14b}$$

$$T_{\perp} = \left(\frac{n_t \cos \theta_t}{n_i \cos \theta_i} \right) t_{\perp}^2 \tag{2.14c}$$

$$T_{\parallel} = \left(\frac{n_t \cos \theta_t}{n_i \cos \theta_i} \right) t_{\parallel}^2 \tag{2.14d}$$

Es ist anzumerken, daß bei den Fresnelschen Formeln bereits die Phasenverschiebung ϵ von Licht bei Reflexionen an Grenzflächen enthalten ist. Im Falle $n_i > n_t$

und für alle Einfallswinkel $\theta_i > \theta_G$ läßt sich diese nach

$$\tan\left(-\frac{\epsilon_{\perp}}{2}\right) = -\frac{\sqrt{n_i^2 \sin^2 \theta_i - n_t^2}}{n_i \cos \theta_i} \quad (2.15a)$$

$$\tan\left(-\frac{\epsilon_{\parallel}}{2}\right) = -\frac{n_i \sqrt{\frac{n_i^2}{n_t^2} \sin^2 \theta_i - 1}}{n_t \cos \theta_i} \quad (2.15b)$$

berechnen. Da bei Einfallswinkeln für die \perp -Komponente bis zum Winkel der To-

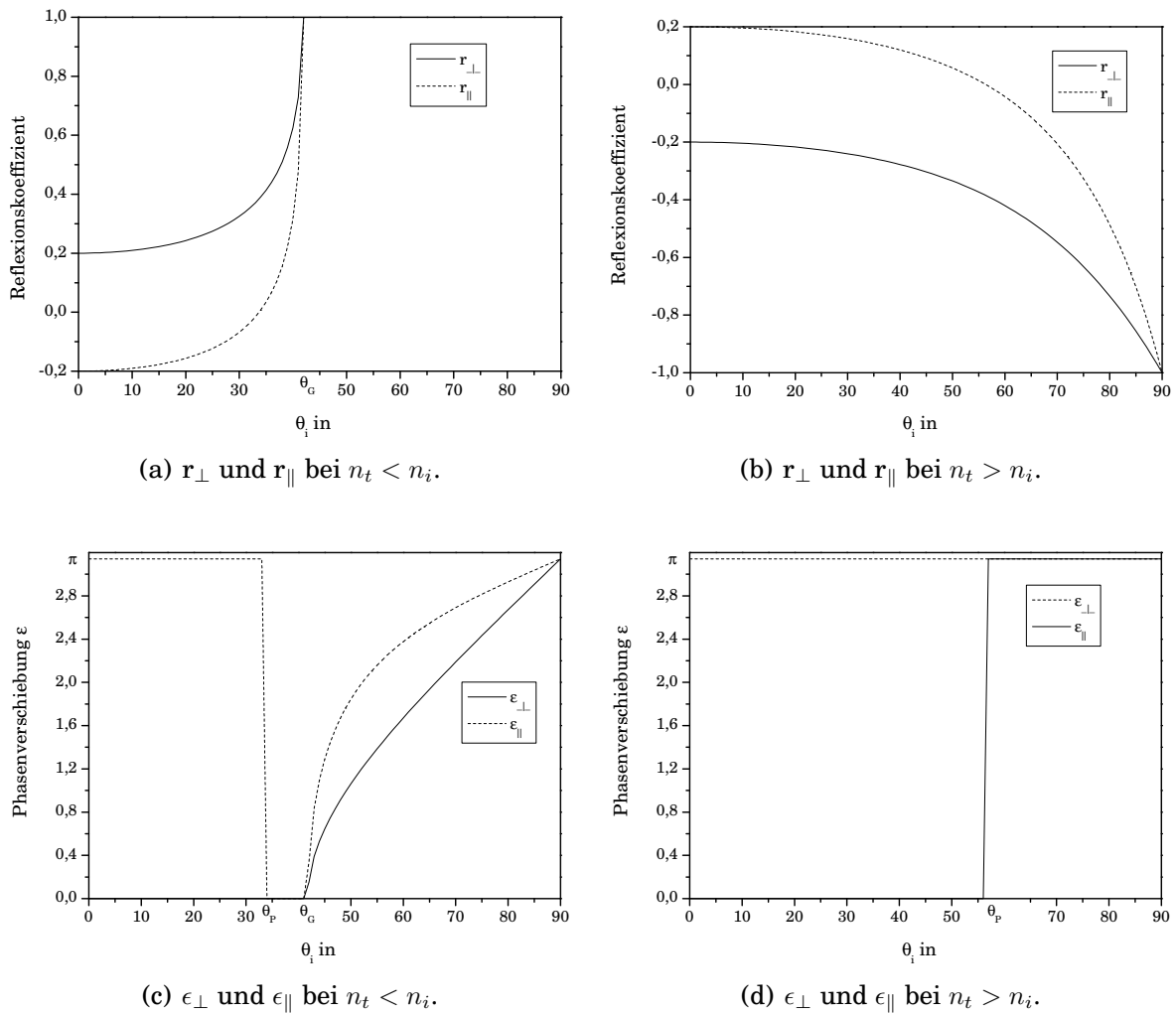


Abbildung 2.3.: Reflexionskoeffizienten und Phasenverschiebungen für die Grenzfläche zweier Schichten mit den Brechungsindices 1 und 1,5, je nachdem von welcher Seite die Strahlung kommt.

talreflexion $\theta_G = \arcsin \frac{n_t}{n_i}$ und für die \parallel -Komponente bis zum Brewsterwinkel $\theta_P = \arctan \frac{n_t}{n_i}$ die Faustregel Phasensprung π bei Reflexion am optisch dichteren

Medium und kein Phasensprung am optisch dünneren Medium gilt, wird diese Phasenverschiebung oft nur im Vorzeichen bemerkt. Aber gerade bei schiefem Lichteinfall oder Totalreflexion wird deutlich, daß die Reflexionskoeffizienten eigentlich komplexe Größen sind (siehe auch Abschnitt 5.1). In Abbildung 2.3 sind die Reflexionskoeffizienten und Phasen für beide Polarisationsrichtungen an einer Grenzfläche in Abhängigkeit des Einfallswinkels gezeigt. Anzumerken ist, daß die Phasensprünge in den Abbildungen 2.3(c) und 2.3(d) „künstlich“ sind und ihre Ursache im Nulldurchgang der Reflexionskoeffizienten haben.

2.1.3. Reflexion des Lichts an zwei Grenzflächen (Einfachschicht)

Stoßen drei optische Medien mit den Brechungsindices n_0 , n_1 und n_2 wie in Abbildung 2.4 aneinander, so treten zwei Grenzflächen auf, an denen das Licht gemäß den Fresnel-Formeln (2.13) teilweise reflektiert oder durchgelassen wird. Besitzen die beiden Grenzflächen einen Abstand von der Größenordnung der Lichtwellenlänge, so nennt man das mittlere Medium eine **dünne Schicht**. Im folgenden setzen wir eine dielektrische, planparallele und homogene Schicht voraus. Die beiden anderen Medien sollen absorptionsfrei und als unendlich ausgedehnt angenommen werden.

Senkrechter Lichteinfall

Eine ebene Lichtwelle mit Amplitude 1 fällt von unten senkrecht auf die Grenzfläche $z = 0$ auf (siehe Abbildung 2.4). Dort wird beim Punkt A gemäß (2.13) der Bruchteil $r_1 = \frac{n_0 - n_1}{n_0 + n_1}$ reflektiert. In die dünne Schicht dringt also eine Welle mit der Amplitude $\sqrt{1 - r_1^2}$ ein. An der zweiten Grenzfläche B wird der Bruchteil $r_2 = \frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2}$ reflektiert, so daß eine Welle mit der Amplitude $r_2 \cdot \sqrt{1 - r_1^2}$ zurück zur ersten Grenzfläche läuft. Hier wird bei C die Welle $-r_1 r_2 \sqrt{1 - r_1^2} e^{-i\Delta_1}$ reflektiert, die durchtretende Welle noch einmal um den Faktor $\sqrt{1 - r_1^2}$ geschwächt und

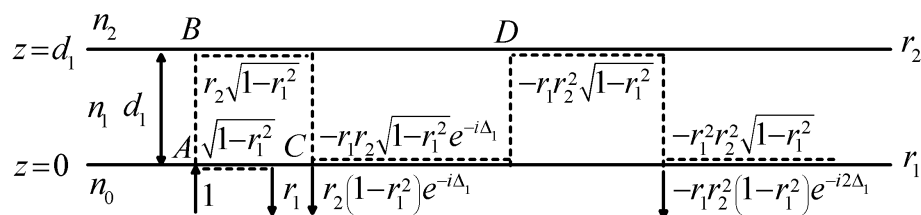


Abbildung 2.4.: Skizze zur Ableitung der Reflexionsformel an einer Einfachschicht bei senkrechtem Lichteinfall.

es tritt eine Welle der Amplitude $r_2(1 - r_1^2)$ nach unten aus. Diese Welle hat im Vergleich zur ersten Teilwelle zweimal die Schicht der optischen Dicke $n_1 d_1$ durchlaufen. Sie hat deshalb an der Bezugsfläche $z = 0$ gegenüber der ersten Teilwelle r_1 einen Gangunterschied von $2n_1 d_1$, so daß ihre Phase

$$\Delta_1 = \frac{4\pi}{\lambda} n_1 d_1 \quad (2.16)$$

wird. Diese beiden Wellen müssen nun nach Amplitude und Phase addiert werden: $r_1 + r_2(1 - r_1^2)e^{-i\Delta_1}$. Es ergibt sich bei Fortsetzung dieser Überlegungen schließlich eine unendliche Anzahl von Teilwellen, die alle, nach Amplitude und Phase addiert, die resultierende Welle nach Amplitude und Phase ergeben. Durch Umformen dieser geometrischen Reihe erhält man schließlich [41]

$$r e^{i\epsilon} = \frac{r_1 + r_2 e^{-i\frac{4\pi}{\lambda} n_1 d_1}}{1 + r_1 r_2 e^{-i\frac{4\pi}{\lambda} n_1 d_1}}. \quad (2.17)$$

Die meßbare Reflektivität R erhält man durch Multiplikation von Gleichung (2.17) mit ihrem konjugiert komplexen Wert:

$$R = |r e^{i\epsilon}|^2 = \frac{r_1^2 + r_2^2 + 2r_1 r_2 \cos \Delta_1}{1 + r_1^2 r_2^2 + 2r_1 r_2 \cos \Delta_1}. \quad (2.18)$$

Es sei hier noch angemerkt, daß die manchmal übliche Herleitung der Amplituden- und Phasenbedingung mit nur zwei Wellenzügen r_1 und r_2 nicht korrekt ist. Zwar findet man die Amplitudengleichung unter der Annahme $r_1 = r_2$, jedoch führt diese Vereinfachung zu einer leider falschen Vorstellung von dünnen Schichten und den dazugehörigen Interferenzeffekten [41].

Schräger Lichteinfall

Bei der Reflexion an einer Einfeldschicht bei schrägem Lichteinfall ändert sich Gleichung 2.16 zu [41]

$$\Delta_1 = \frac{4\pi}{\lambda} n_1 d_1 \cos \theta_1. \quad (2.19)$$

Diese Gleichung besagt, daß bei schrägem Lichteinfall der Gangunterschied kleiner ist als bei senkrechter Inzidenz. Bei der resultierenden Reflektivität muß wie bei den Fresnel-Gleichungen (2.13) zwischen R_{\perp} und R_{\parallel} unterschieden werden. In den Gleichungen (2.17) und (2.18) werden dabei zusätzlich zu (2.19) folgende Sub-

stitutionen vorgenommen:

$$\begin{aligned} r_1 &\Rightarrow r_{1\perp}, \\ r_2 &\Rightarrow r_{2\perp}, \\ R &\Rightarrow R_{\perp} = |r_{\perp} e^{i\epsilon_{\perp}}|^2 \end{aligned}$$

für senkrecht zur Einfallsebene polarisiertes Licht und

$$\begin{aligned} r_1 &\Rightarrow r_{1\parallel}, \\ r_2 &\Rightarrow r_{2\parallel}, \\ R &\Rightarrow R_{\parallel} = |r_{\parallel} e^{i\epsilon_{\parallel}}|^2 \end{aligned}$$

für parallel zur Einfallsebene polarisiertes Licht.

Absorptive Medien

Sollte die dünne Schicht oder das Umgebungsmedium nicht rein dielektrischer Natur sein, ist der Brechungsindex dieses Materials komplex:

$$\mathcal{N} = n - ik. \quad (2.20)$$

Um die Reflektivität von optischen Schichtsystemen mit komplexen Medien zu berechnen, wird formal in den Gleichungen 2.10, 2.13 und 2.19 der komplexe Brechungsindex eingesetzt und man erhält analog zu dielektrischen Systemen die Reflektivität durch die Betragsquadratbildung des komplexen Reflexionskoeffizienten. In [40] werden relativ genau die aus diesem Formalismus resultierenden Größen wie z.B. die einer komplexen Lichtgeschwindigkeit oder eines komplexen Brechungsgesetzes diskutiert und erläutert. Ein wichtiges Ergebnis aus diesen Untersuchungen ist die generelle Winkelabhängigkeit optischer Konstanten bei absorptiven Medien. Eine ausführlichere Darstellung der optischen Eigenschaften absorptiver Medien würde allerdings zu weit weg führen, da in dieser Arbeit lediglich die Reflektivität als interessante Meßgröße betrachtet wird.

2.1.4. Reflexion des Lichts in Multischichtsystemen

Zur Bestimmung der Reflektivitäten an Multischichtsystemen kann man ausgehend von der Reflektivität an Einzelschichtsystemen (Gleichung 2.18 für senkrechten Lichteinfall) mit der Methode nach Rouard [41], [42] oder Caballero [43]

die resultierenden Gleichungen bestimmen. Für ein dielektrisches Doppelschichtsystem (Reflexion an drei Grenzflächen) und senkrechtem Lichteinfall ergibt sich demnach

$$R = |re^{i\epsilon}|^2, \text{ mit}$$

$$re^{i\epsilon} = \frac{r_1 + r_2e^{-i\Delta_1} + r_3e^{-i(\Delta_1+\Delta_2)} + r_1r_2r_3e^{-i\Delta_2}}{1 + r_1r_2e^{-i\Delta_1} + r_1r_3e^{-i(\Delta_1+\Delta_2)} + r_2r_3e^{-i\Delta_2}}$$

wobei folgende Größen definiert sind als (2.21)

$$r_1 = \frac{n_0 - n_1}{n_0 + n_1}, \quad r_2 = \frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2}, \quad r_3 = \frac{n_2 - n_3}{n_2 + n_3}$$

$$\Delta_1 = \frac{4\pi}{\lambda}n_1d_1, \quad \Delta_2 = \frac{4\pi}{\lambda}n_2d_2.$$

Für ein dielektrisches Dreischichtsystem (Reflexion an drei Grenzflächen) gilt bei senkrechtem Lichteinfall

$$R = |re^{i\epsilon}|^2, \text{ mit}$$

$$re^{i\epsilon} = \frac{r_1 + r_2e^{-i\Delta_1} + r_3e^{-i(\Delta_1+\Delta_2)} + r_4e^{-i(\Delta_1+\Delta_2+\Delta_3)} + r_1r_2r_3e^{-i\Delta_2}}{1 + r_1r_2e^{-i\Delta_1} + r_1r_3e^{-i(\Delta_1+\Delta_2)} + r_1r_4e^{-i(\Delta_1+\Delta_2+\Delta_3)} + r_2r_3e^{-i\Delta_2} + r_1r_3r_4e^{-i\Delta_3} + r_1r_2r_4e^{-i(\Delta_2+\Delta_3)} + r_2r_3r_4e^{-i(\Delta_1+\Delta_3)}} + r_3r_4e^{-i\Delta_3} + r_2r_4e^{-i(\Delta_2+\Delta_3)} + r_1r_2r_3r_4e^{-i(\Delta_1+\Delta_3)}}$$

(2.22)

wobei folgende Größen definiert sind als

$$r_1 = \frac{n_0 - n_1}{n_0 + n_1}, \quad r_2 = \frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2}, \quad r_3 = \frac{n_2 - n_3}{n_2 + n_3}, \quad r_4 = \frac{n_3 - n_4}{n_3 + n_4}$$

$$\Delta_1 = \frac{4\pi}{\lambda}n_1d_1, \quad \Delta_2 = \frac{4\pi}{\lambda}n_2d_2, \quad \Delta_3 = \frac{4\pi}{\lambda}n_3d_3.$$

Herleitung von Reflektivitäten über Felder

Eine andere, elegantere aber wenig anschauliche Methode ist die Herleitung über elektrische und magnetische Felder und deren Grenzflächenbedingungen in den

verschiedenen optischen Bereichen. Diese fordern, daß die tangentialen Komponenten der elektrischen (\vec{E}) und magnetischen ($\vec{H} = \frac{\vec{E}}{\mu}$) Felder über die Grenzflächen stetig sind [39], [44]. Jede Welle E_{rI} , E'_{rII} , E_{tII} usw. stellt hier im folgenden

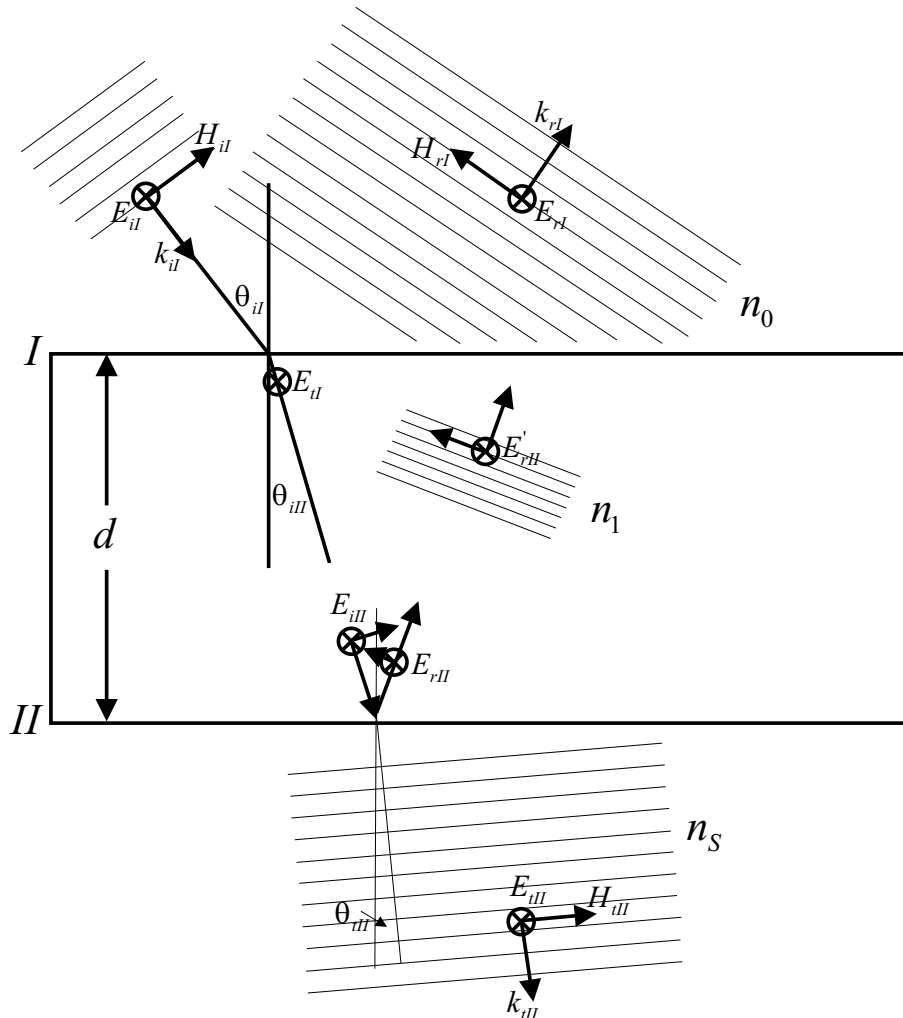


Abbildung 2.5.: Elektrische und magnetische Felder an den Grenzflächen.

die Resultierende aller möglichen Wellen dar, die in jenem Punkt im Medium in jene Richtung wandern. Der Summierungsprozeß ist bereits eingebaut. Für ein dielektrisches Schichtsystem bestehend aus p Schichten ergibt sich in der Matrixschreibweise

$$\begin{pmatrix} E_I \\ H_I \end{pmatrix} = \mathcal{M}_I \mathcal{M}_{II} \dots \mathcal{M}_p \begin{pmatrix} E_{(p+1)} \\ H_{(p+1)} \end{pmatrix} \quad (2.23)$$

Dabei ist

$$\mathcal{M} = \mathcal{M}_I \mathcal{M}_{II} \dots \mathcal{M}_p = \begin{bmatrix} m_{11} & m_{12} \\ m_{21} & m_{22} \end{bmatrix} \quad (2.24)$$

die charakteristische Transfermatrix des Systems. Die einzelnen Matrixelemente der Matrizen \mathcal{M}_j errechnen sich aus

$$\mathcal{M}_j = \begin{bmatrix} \cos k_0 h_j & \frac{(i \sin k_0 h_j)}{\Upsilon_j} \\ \Upsilon_j i \sin k_0 h_j & \cos k_0 h_j \end{bmatrix} \quad (2.25)$$

mit $\Upsilon_j = \sqrt{\epsilon_0/\mu_0} n_j \cos \theta_{i(I+j)}$ und $h_j = 2n_j d_j \frac{\cos \theta_{i(I+j)}}{2}$.

Für die Amplitudentransmissions- und -reflexionskoeffizienten ergibt sich daraus

$$r = \frac{\Upsilon_0 m_{11} + \Upsilon_0 \Upsilon_p m_{12} - m_{21} - \Upsilon_p m_{22}}{\Upsilon_0 m_{11} + \Upsilon_0 \Upsilon_p m_{12} + m_{21} + \Upsilon_p m_{22}} \quad (2.26)$$

$$t = \frac{2\Upsilon_0}{\Upsilon_0 m_{11} + \Upsilon_0 \Upsilon_p m_{12} + m_{21} + \Upsilon_p m_{22}} \quad (2.27)$$

Um also r oder t für eine beliebige Konfiguration von Schichten zu finden, werden die charakteristischen Matrizen für jede Schicht berechnet, miteinander multipliziert und dann die resultierenden Matrixelemente in die obigen Gleichungen eingesetzt.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

Mit Ta₂O₅ und SiO₂ beschichtete Gläser wurden von Unaxis, Lichtenstein und mso-Jena, Jena bezogen. Mit Indiumzinnoxid (ITO) beschichtete BK7-Gläser wurden von der Merck KGaA, Darmstadt geliefert. Kunststoffträger bestehend aus einem Cyclo-Olefin Polymer wurden freundlicherweise von der Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen zu Testzwecken geliefert.

Die polyklonalen Anti-Atrazin-Antikörper (Anti-ACA) und Atrazin-capronsäure (2-Chlor-6-Isopropylamino-1,3,5-Triazin-2-(6.-amino)hexansäure)(ACA) wurden dankenswerterweise von Ram Abuknesa, Kings College, London zur Verfügung gestellt. Aminodextran (AMD) Amdex™ mit 170 K Dalton Molekulargewicht wurde von Helix Research Company, Springfield, OR, USA bezogen. Amino-funktionalisiertes Polyethylen Glycol (PEG) wurde von Rapp Polymere, Tübingen geliefert. Oligomere mit 50 Basenpaaren wurden von IBA, Göttingen gekauft. Allgemeine Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim oder Merck KGaA, Darmstadt bezogen.

3.1.1. Oberflächenmodifizierung von Glasoberflächen

Oberflächensilanisierung

Die Silanisierung dient der kovalenten Bindung von Aminodextran an die Glasoberfläche. Die D263 und BK7 Glasträger wurden zuerst zwei Minuten in 5 M NaOH gelegt, anschließend mit Wasser gespült und schließlich die Oberfläche mechanisch mit KIMTECH-Tüchern gereinigt (Kimberly-Clark, Reigate, UK). Danach wurden die Träger mit frischer Piranha Lösung (30 %-ige H₂O₂-Lösung und konzentrierter Schwefelsäure im Verhältnis 2:3) 30 Minuten lang in ein Ultraschallbad gelegt, um Silanol-Gruppen an die so präparierte Trägeroberfläche zu bekommen. Nach der Aktivierung wurden die Glasträger gründlich mit bidestilliertem Wasser gereinigt, mit Stickstoff getrocknet und anschließend sofort eine

Stunde lang mit 3-Glycidyloxypropyl-Trimethoxysilan (GOPTS) belegt. Danach wurden die Träger mit wasserfreiem Azeton gereinigt und mit Stickstoff getrocknet.

Oberflächenmodifikation mit Aminodextran und Atrazin

Die Kopplung von Aminodextran (AMD) in bidestilliertem Wasser an die silanisierete Oberfläche wurde durch Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Träger gründlich mit bidestilliertem Wasser gereinigt und mit Stickstoff getrocknet.

Atrazincaprinsäure ist ein Derivat des Atrazins, bei dem die Ethyl- durch eine Hexansäuregruppe ersetzt wurde. Dadurch kann ACA über eine Peptidbindung kovalent an die Aminogruppen des AMD binden. Dennoch ist das ACA dem Atrazin ähnlich genug, dass der Anti-Atrazin-Antikörper spezifisch daran bindet. Die kovalente Kopplung an die mit AMD modifizierte Trägeroberfläche wurde durch einen aktivierten Ester durchgeführt, erzeugt durch N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in trockenem N,N-Dimethylformamid (DMF). Diese Reaktion war nach einer Stunde abgelaufen. Dann wurden die Träger mit DMF und bidestilliertem Wasser gespült und schließlich wieder mit Stickstoff getrocknet. Diese so behandelten Träger tragen spezifische Bindungsstellen für Anti-Atrazin-Antikörper mit einer hohen Dichte und können sehr gut als Sensoroberflächen eingesetzt werden. Zusätzlich reduziert die Belegung mit Aminodextran unspezifische Bindungen an der Oberfläche [45].

Oberflächenbelegung mit Polyethylenglycol und DNA

Die Kopplung von Diaminopolyethylenglycol (PEG) als Lösung in Dichlormethan (DCM) an die silanierte Oberfläche wurde durch eine Inkubation über Nacht bei 70°C durchgeführt. Nach einem gründlichen Spülvorgang mit bidestilliertem Wasser und Trocknen mit Stickstoff wurde die aminofunktionalisierte Oberfläche mit Glutaranhydrid (GA) in einer N,N-Dimethylformamid-Atmosphäre (DMF) sechs Stunden lang belegt um Carboxylgruppen an der Oberfläche zu erhalten. Die kovalente Kopplung der aminoterminierten Einfachstrang-Oligomere an die modifizierte Trägeroberfläche wurde durch einen aktivierten Ester erreicht, der durch N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in wasserfreier N,N-Dimethylformamid-Atmosphäre (DMF) entsteht. Nachdem die Reaktion nach einer Stunde abgelaufen war, wurden die Träger mit DMF gespült und danach mit Stickstoff getrocknet. Danach sollten die Träger sofort weiterverarbeitet werden. Um eine hohe DNA-Belegung mit möglichst wenig Substanz auf dem Träger zu erhalten, wurden die Einfach-

strang-Oligomere auf die aktivierte Trägeroberfläche mit einem piezo-basierten Mikrodosiersystem gespottet (MicroDrop, Norderstedt) [46], [47].

Oberflächenbelegung mit Aminodextran und DNA

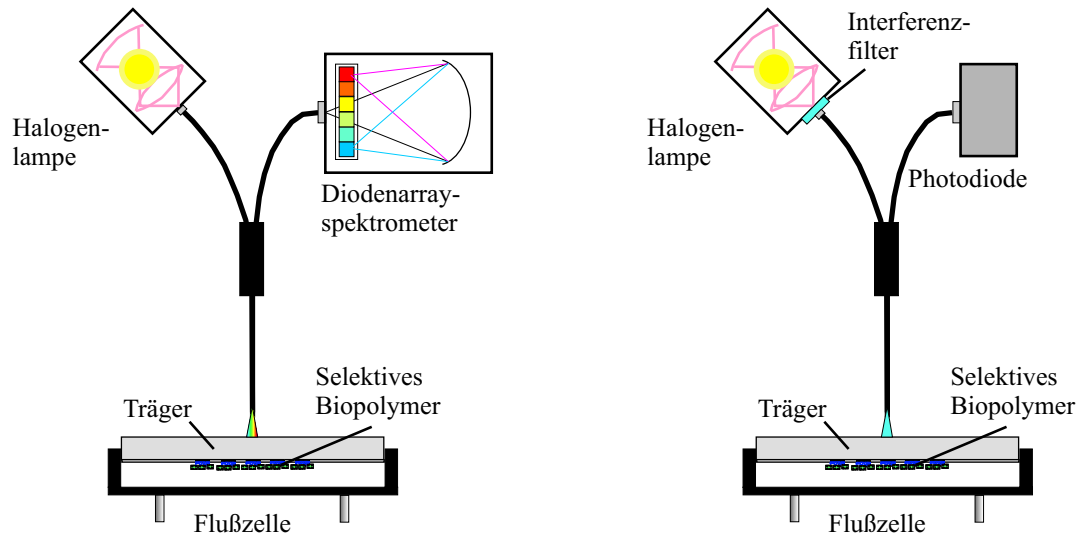
Die DNA wird nach der DMF-Behandlung wie im vorangegangenen Abschnitt gespottet.

3.1.2. Oberflächenmodifizierung von ITO- und Kunststoffoberflächen

Die Präparation und Charakterisierung von ITO- und Kunststoffoberflächen wurde freundlicherweise von Dipl. Biochem. Bernd Möhrle entwickelt und wird im Detail in [48] beschrieben.

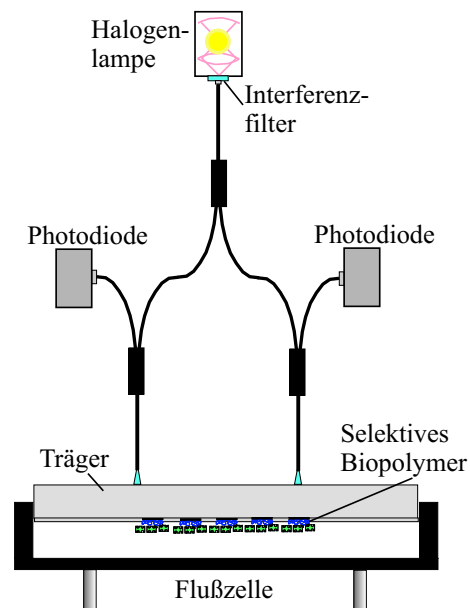
3.2. Methoden

Die für diese Arbeit verwendeten Messungen wurden mit verschiedenen Aufbauten durchgeführt. Sie bestehen alle aus einer Halogenlichtquelle, deren Spektrum für die Detektion mit einer Wellenlänge gegebenenfalls durch einen dazwischengeschalteten Interferenzfilter auf einen kleinen Wellenlängenbereich reduziert werden kann, einem oder mehreren Y-Polymerwellenleitern mit 1 mm Faserdurchmesser und einer Flußzelle. Als Detektoren wurden je nach Einsatzziel entweder ein Diodenzeilenspektrometer (ZEISS MCS 410), ein Lightwave-Multimeter (Newport 2832-C mit Si-Photodioden der Serie 818) mit einer Auflösung von 14,3 Bit oder Si-Photodioden von Newport der Serie 818 in Verbindung mit einem 20 Bit A/D-Konverter DDC112 (das in ein Evaluation Board DEM-DDC112U-C von Burr-Brown, jetzt Texas Instruments, integriert ist), verwendet.



(a) Faseroptischer Meßaufbau zur Bestimmung der optimalen Wellenlänge.

(b) Faseroptischer Meßaufbau für die Detektion von biochemischen Anbindungen an die Sensoroberfläche mit einer Wellenlänge.



(c) Faseroptischer Zweikanalaufbau für die 1λ -Reflektometrie.

Abbildung 3.1.: Schematische Zeichnungen der verwendeten Meßaufbauten.

3.3. Ablauf einer Messung

Der Ablauf einer Messung ist im Prinzip immer gleich, wenn auch manchmal mit unterschiedlichen Zeitanteilen einer Messung (Abbildung 3.2):

- Spülen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) bei $\text{pH}=7,4$.
- Starten der eigentlichen Messung. Der zu detektierende Analyt wird in PBS-Lösung über die Sensoroberfläche geleitet.
- Spülen mit PBS.
- Regeneration der Sensoroberfläche mit SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). SDS besteht aus mit doppelt gereinigtem Wasser auf 0,5 Volumen-% verdünntem und mit konzentrierter Salzsäure auf $\text{pH} = 1,8$ eingestelltem Natriumlaurylsulfat.
- Spülen mit PBS.

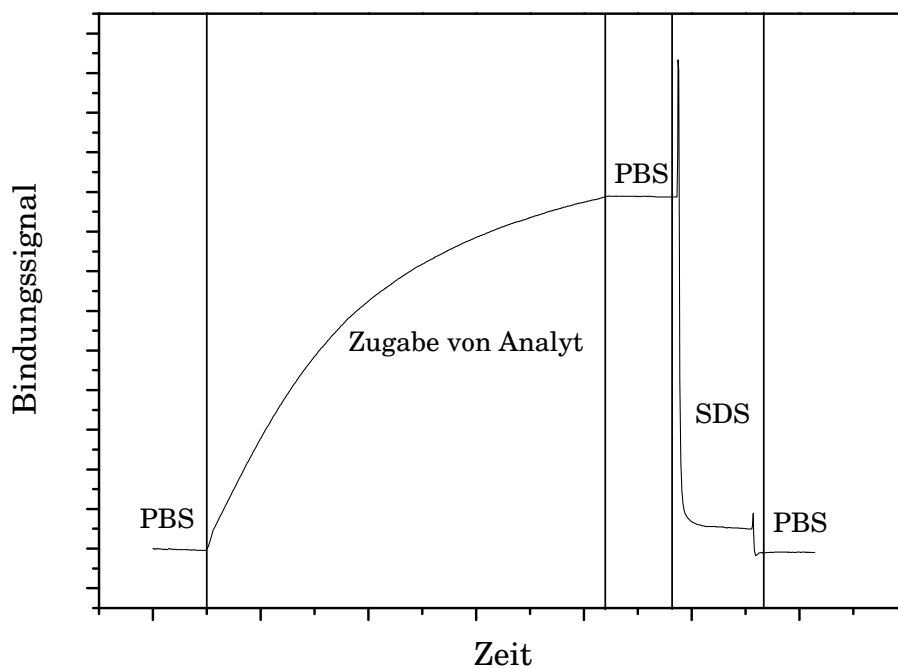


Abbildung 3.2.: Einzelne Schritte einer typischen Messung in dieser Arbeit.

4. Ergebnisse und Diskussionen

In diesem Kapitel soll zuerst eine Analyse der bereits etablierten RIfS-Technologie (unter anderem [38], [45]) erfolgen. Danach wird aus dieser Analyse ein mit nur einer Wellenlänge funktionierendes Reflexionsprinzip abgeleitet und vorgestellt werden. Soweit dies möglich ist, werden vergleichende Messungen zwischen RIfS und der Einwellenlängenreflektometrie präsentiert, um das neue Konzept der Einwellenlängenreflektometrie bezüglich seiner Einfachheit, seiner Vorzüge gegenüber RIfS und seiner Qualität der Meßwerte beurteilen zu können. Es wird hier bewußt nur das für das optische Detektionsprinzip relevante Vorgehen beschrieben. Die für eine notwendige und erfolgreiche Messung einer Bindungskurve ebenfalls unerläßliche Modifizierung des Sensors mit der richtigen Oberflächenchemie sowie die korrekte Einstellung der Fluidik werden hier an dieser Stelle der Übersichtlichkeit halber nachrangig behandelt. Vieles wurde auf diesem Sektor schon mehrfach ausführlich abgehandelt (z.B. [45], [49]). Für die Oberflächenmodifikation von Kunststoffträgern wurde dennoch ein neues Verfahren entwickelt. Die Einzelheiten darüber sind in Abschnitt 3.1.2 bzw. [48] aufgeführt.

4.1. Die Analyse des RIfS-Detektionsprinzip

4.1.1. Das technische Vorgehen bei einer Messung mit RIfS

Im folgenden wird nur das für optische Betrachtungen relevante Vorgehen einer RIfS-Messung aufgelistet. Es werden folgende optisch relevante Materialien verwendet (siehe auch Abbildung 3.1(a)):

- Eine Halogen-Weißlichtquelle mit einem Filter zur Absorption der Wärmestrahlung.
- Ein Y-Lichtwellenleiter zur Einkopplung des Lichts an den Glasträger und die Detektion des reflektierten Lichts mit einem Spektrometer.
- Ein sogenanntes Interferenzglasplättchen als Meßtransducer. Es besteht aus

einem D263-Glasträger, einer 10 nm dicken Schicht aus Ta_2O_5 , einer 330 nm dicken Schicht aus SiO_2 sowie der sensitiven Bioschicht.

- Ein sogenanntes Referenzplättchen, bestehend aus einem D263-Glasträger und einer 10 nm dicken Schicht aus Ta_2O_5 .
- Zur optischen Kontaktierung des Glasträgers mit der optischen Faser wird ein Immersionsöl verwendet.

Eine normale Messung mit RIfS in der Bioanalytik läuft dann folgendermaßen ab (siehe auch die Graphen in Abbildung 4.1):

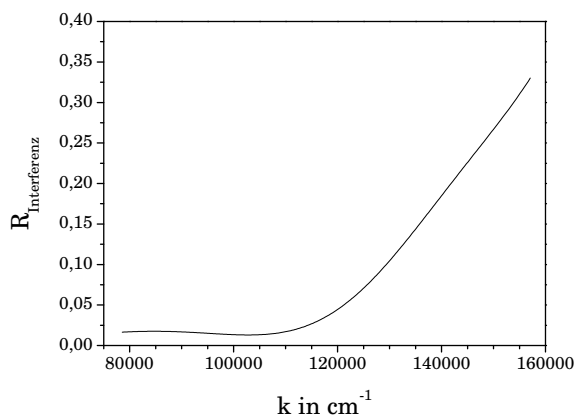
- Aufnahme eines Reflexionsspektrums mit einem sogenannten Referenzglasplättchen in PBS-Lösung.
- Austausch des Referenzglasplättchens durch ein Interferenzglasplättchen.
- Aufnahme eines Spektrums bei abgedunkelter Lichtquelle mit einem auch für die Messung verwendeten Interferenzglas, um ein Dunkelstromspektrum zu erhalten.
- Aufnahme der eigentlichen Messung mit Interferenzglas.

4.1.2. Die Auswertung des gemessenen Reflexionsspektrums

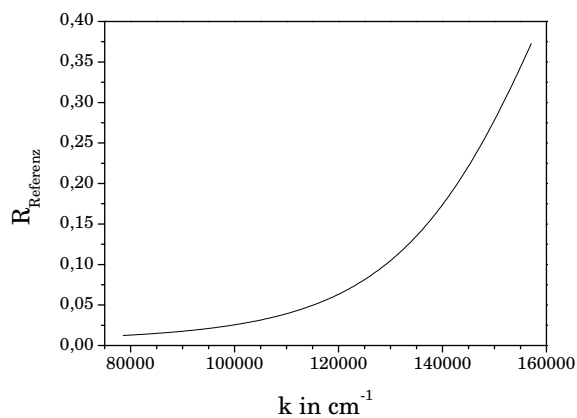
Nach der Messung wird folgendermaßen vorgegangen:

- Von dem am Interferenzglasplättchen gemessenen Reflexionsspektrum wird das Dunkelstromspektrum subtrahiert.
- Subtraktion des Dunkelstromspektrums vom Reflexionsspektrum am Referenzglasplättchen.
- Bildung des Quotienten aus dem Meßspektrum des Interferenzglasplättchens und dem Reflexionsspektrum des Referenzglasplättchens.

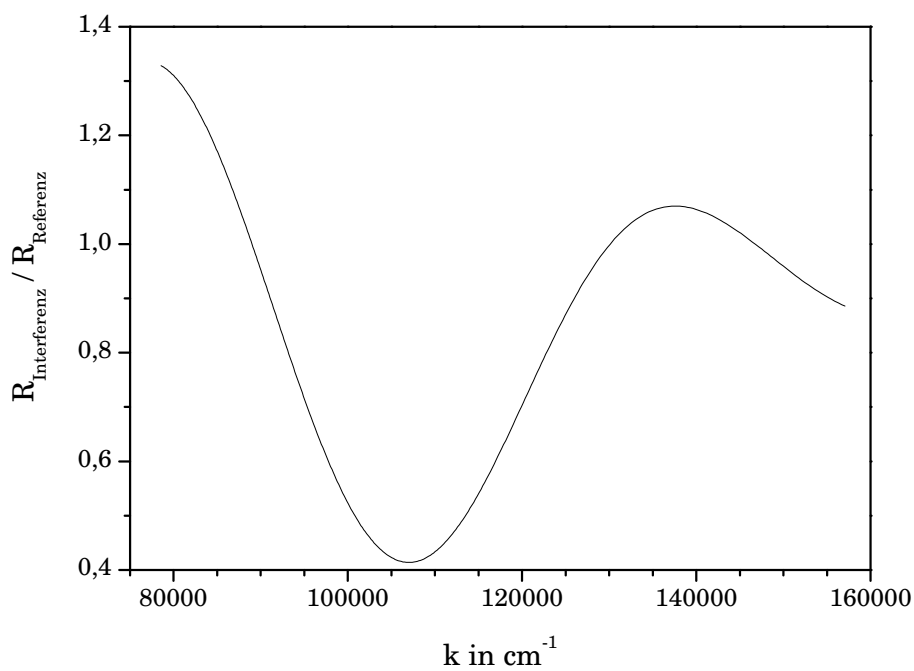
Nach dieser Prozedur, die fast automatisch vom Auswerteprogramm IFZ [45] durchgeführt wird, erhält man eine Kurvenschar der Quotienten der beiden Spektren aufgetragen gegen den Betrag des Wellenzahlvektors k . Anschließend werden die Minima der einzelnen Spektren durch einen Parabelfit bestimmt. Der erhaltene Wellenzahlwert der Minima wird in einen Wellenlängenwert umgerechnet. Die Bindungskurve erhält man gemäß [45] durch die Auftragung dieser Wellenlängenwerte gegen die Zeit (Abbildung 4.2). Dabei wird angenommen, daß die Änderung der Wellenlängenwerte proportional zur Änderung der optischen Schichtdicke ist.



(a) Reflexionsspektrum von Interferenzglas.

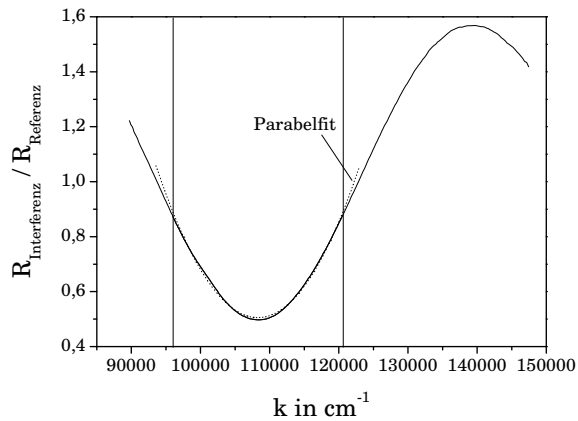


(b) Reflexionsspektrum von Referenzglas.

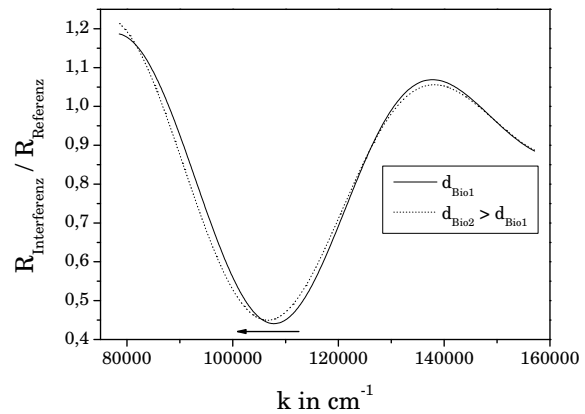


(c) Quotient aus den Reflexionsspektren von Interferenz- und Referenzglas.

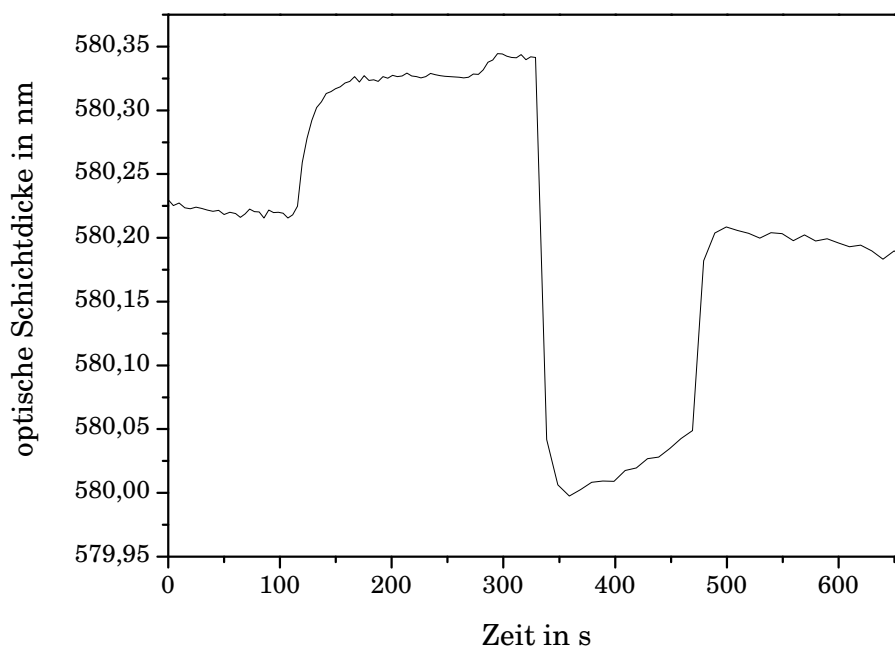
Abbildung 4.1.: Verarbeitung der Reflexionsspektren bei RfS. Die einzelnen Spektren sind simuliert.



(a) Aufnahme eines Interferenzspektrums während der Messung einer DNA-DNA-Wechselwirkung. Der markierte Bereich der Messung wird für den Parabelfit verwendet. Dieser ist ebenfalls eingezeichnet.



(b) Verschiebung des Interferenzspektrums bei einer Änderung der optischen Schichtdicke auf der Sensoroberfläche durch eine Bindungsreaktion. Die Verschiebung ist hier verstärkt dargestellt.



(c) Die Kinetik einer Bindung (hier DNA/OIA3 auf OIA4) kann durch Umrechnung des Betrags des Wellenzahlvektors k der Minima in Wellenlängewerte λ , aufgetragen gegen die Zeit, beobachtet werden.

Abbildung 4.2.: Die einzelnen Schritte vom Parabelfit zur Bindungskurve.

4.1.3. Hintergrund des RIfS-Detektionsprinzips

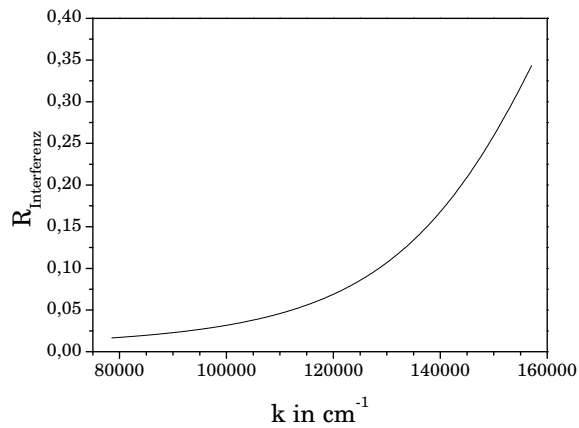
Die Notwendigkeit des Interferenzglases

Wie in den vorangehenden Abschnitten ausgeführt, arbeitet die RIfS-Detektionsmethode mit der Detektion der horizontalen Verschiebung einer Kurvenschar durch die Bestimmung eines Extremwertes jeder einzelnen Kurve mittels eines Parabelfits. Um aber überhaupt ein Interferenzspektrum in Parabelform zu erhalten, müssen Interferenzglasplättchen und Referenzglasplättchen mit relativ genau definierten optischen Schichten verwendet werden¹. Nur dann ist ein Parabelfit bei einem Teil des Spektrums überhaupt möglich. Diese notwendige Beschichtung der Glasträger stellt eine erhebliche Einschränkung der Anwendbarkeit des gesamten Systems in vielerlei Hinsicht dar. In Abbildung 4.3 ist z.B. die Auswirkung einer zu dünnen SiO₂-Schicht auf dem Interferenzglas auf das Interferenzspektrum dokumentiert.

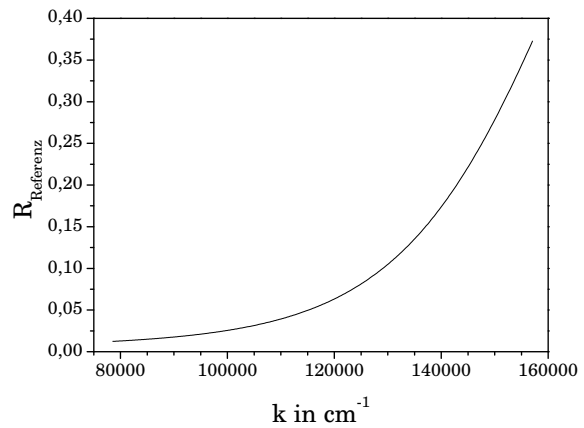
Verhalten von RIfS bei Änderung der Transducerkonfiguration

Eine wichtige Größe ist die Transferfunktion [50] oder Signaldynamik des RIfS-Prinzips, d.h. die Größe der Signaländerung in Bezug auf die Änderung der Schichtdicke der selektiven Oberfläche durch Anbindung des Analyten an die Glasträgeroberfläche. Dazu tragen wir die Lage der Minima gegen die Änderung der selektiven Schichtdicke über einen größeren Bereich auf. Man kann ganz deutlich die periodische Änderung der Lage der Minima erkennen. Die Transferfunktion ist also periodisch (siehe auch Abbildung 4.4). Betrachtet man dagegen die realen Schichtdickenänderungen, die im Bereich von einer Monolage liegen, so ist die Transferfunktion in sehr guter Näherung an jeder Stelle der Kurve linear. Nicht unabhängig vom Ausgangspunkt der Kurve ist allerdings die Größe der Signaldynamik $\partial R / \partial d_{\text{Polymer}}$. Die Verschiebung des Minimums ist zwar in guter Näherung stets proportional zur Änderung der Dicke der selektiven Schicht an die Sensoroberfläche, die Proportionalitätskonstante ist aber an jeder Stelle unterschiedlich. Diese Proportionalitätskonstante kann schon bei unterschiedlicher Oberflächenchemie auf gleichem Träger (z.B. PEG auf Interferenzglas oder AMD auf Interferenzglas) durchaus unterschiedlich sein. Eine mit RIfS gemessene optische Schichtdickenzunahme exakt einer realen Zunahme der optischen Schichtdicke auf der Sensoroberfläche zuzuordnen, wird in den meisten Fällen nicht der Wahrheit entsprechen.

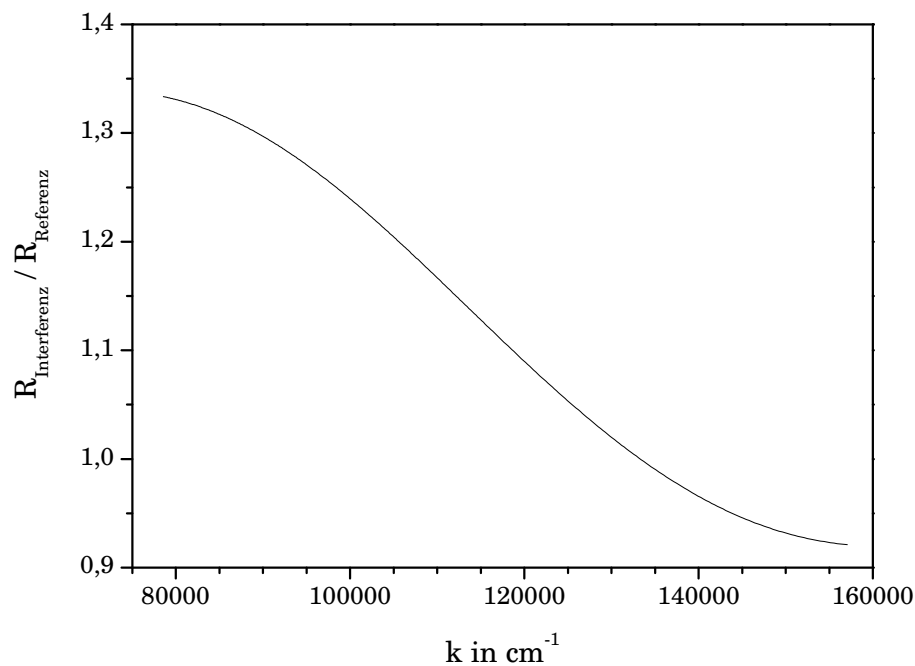
¹Natürlich sind auch andere Schichtsysteme denkbar und schon erfolgreich eingesetzt worden, die diese Forderung erfüllen [51]. In jedem Fall ist aber eine Beschichtung der Glasträger mit genau angepassten Parametern notwendig.



(a) Reflexionsspektrum von 10 nm Ta₂O₅ und 50 nm SiO₂ auf D263-Glas.



(b) Reflexionsspektrum von 10 nm Ta₂O₅ auf D263-Glas.



(c) Quotient aus den beiden Reflexionsspektren.

Abbildung 4.3.: Simulation des Interferenzspektrums mit einer 50 nm statt 330 nm dicken SiO₂-Schicht. Man kann erkennen, daß man eine gewisse minimale SiO₂-Schichtdicke braucht, um überhaupt ein Extremum zu erhalten, das man weiterverarbeiten kann.

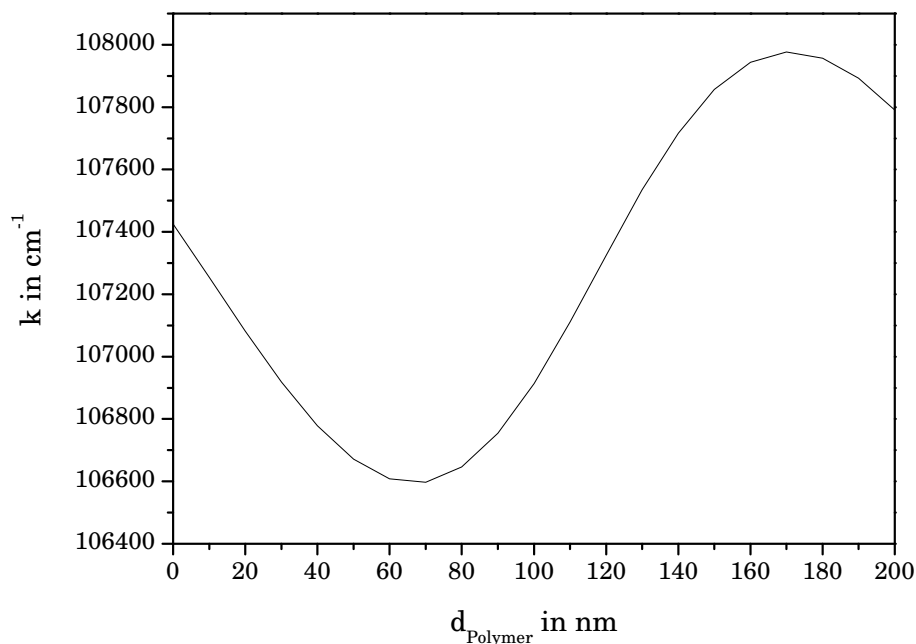


Abbildung 4.4.: Wellenzahl der Parabelfit-Minima in Abhängigkeit der Dicke der selektiven Schicht. In der Simulation wurde der Brechungsindex der selektiven Schicht mit $n=1,34$ konstant über den gesamten Spektralbereich angenommen.

Bei entsprechendem Schichtaufbau ist sogar unter Umständen auch eine Parabelverschiebung in die andere Richtung möglich. Ebenso ist auch bei unterschiedlichen Trägern (z.B. TiO_2 -Schicht bestimmter Dicke auf Glas) eine unterschiedliche Proportionalitätskonstante und Signaldynamik zu erwarten.

Betrachtung von RfS bei der Messung einer Bindungskurve

Rein optisch gesehen ändert sich bei der Anbindung eines Analyten an die Sensoroberfläche die Konfiguration des optischen Schichtsystems und dadurch die Reflektivität bei jeder einzelnen Wellenlänge. Die Änderung der Reflektivität ist dabei bei jeder Wellenlänge unterschiedlich groß und genau dies führt zu der Verschiebung des Interferenzspektrums. In Abbildung 4.5 ist die Änderung der Reflektivität ΔR in Abhängigkeit der Wellenzahl k einer realen Messung vor und nach einer Anbindung an die Sensoroberfläche aufgetragen. Man kann an der Abbildung folgende Tatsachen erkennen:

- Die Messung ist insgesamt nicht sehr rauscharm. Trotzdem können damit Wechselwirkungen an der Sensoroberfläche wie z.B. die DNA-DNA-Wechselwirkung in Abbildung 4.2(c) gemessen werden.

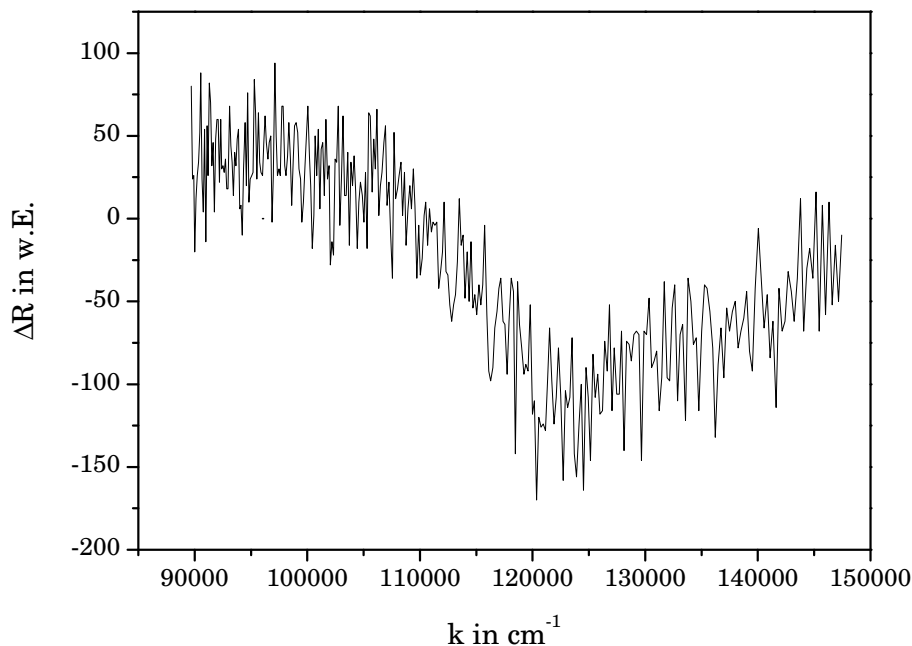


Abbildung 4.5.: ΔR zwischen einer OIA4-Oberfläche vor und nach einer Anbindung von DNA/OIA3 an die Sensoroberfläche aufgetragen gegen die Wellenzahl. OIA3 und OIA4 sind zueinander passende DNA-Stränge, die aneinander binden.

- Es gibt Wellenzahlbereiche, bei denen $\Delta R < 0$ und bei denen $\Delta R > 0$ ist. Folglich muß es wegen der Stetigkeit dieser Reflexionsfunktion $R = f(k)$ auch eine Wellenzahl geben, bei der $\Delta R = 0$ ist, also absolut unempfindlich ist gegenüber Schichtdickenänderungen an der Sensoroberfläche. Trotzdem werden diese Bereiche zur Auswertung herangezogen. Andererseits existieren Wellenzahlbereiche, bei denen $|\Delta R| = \max.$ ist.

Beide Erkenntnisse sind die Grundlage für den in den nächsten Abschnitten präsentierten Ansatz für eine andere Vorgehensweise in der Reflexionsdetektion.

4.2. Die Detektion von Bindungsvorgängen mit einer Wellenlänge

Im vorherigen Abschnitt wurde ΔR eines ganzen Spektrums vor und nach einer Anbindung aufgetragen. Betrachtet man jetzt allerdings nach Wellenlängen aufgelöst die Reflektivitäten während der DNA-Hybridisierung, so fällt auf, daß bei der Wahl einer geeigneten Wellenlänge die DNA-Hybridisierung, die in Abbildung 4.2(c) abgebildet ist, im Prinzip schon mit dieser beobachtet werden kann. Bei

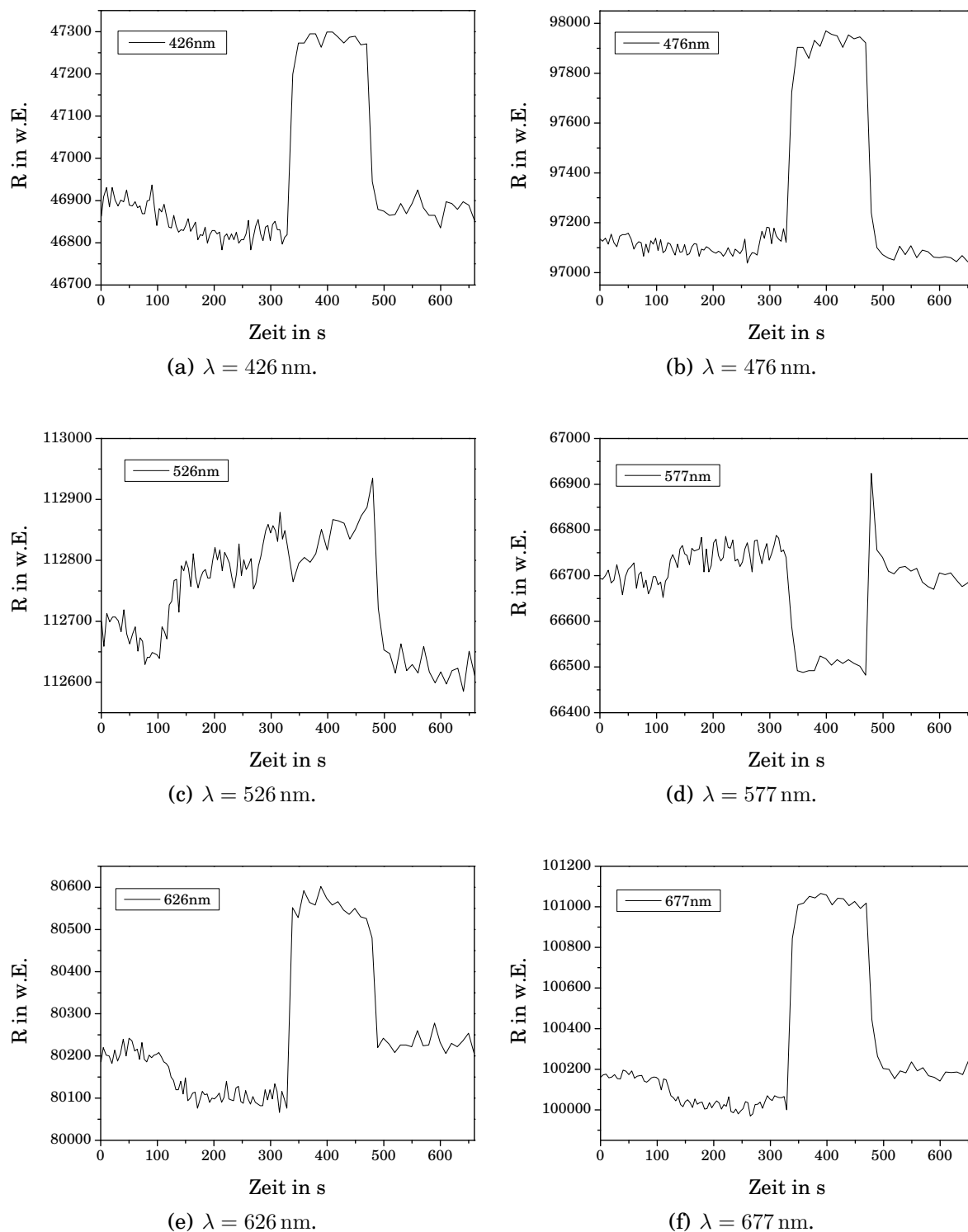


Abbildung 4.6.: Zeitlicher Verlauf der Reflektivität einzelner Wellenlängen während dem DNA-Hybridisierungsverlauf, der in Abbildung 4.2(c) dargestellt wird.

den dargestellten verschiedenen Reflektivitätsverläufen scheinen die Abbildungen 4.6(c) und 4.6(d) mit den Wellenlängen um 526 nm und 577 nm die vielversprechendsten Kurvenverläufe anzugeben, die der tatsächlichen Hybridisierungskurve in Abbildung 4.2(c) entsprechen. In Abschnitt 4.3 wird eine theoretische Erklärung den Grund der verschiedenen zeitlichen Kurvenverläufe liefern, so daß alle beobachteten Reflektivitäten in Abbildung 4.6 verstanden werden können. Hier soll vorerst noch graphisch die Übereinstimmung zwischen der konventionellen spektralen RfS-Auswertung und der Einwellenlängen-Reflexionsmethode bei ausgewählten Wellenlängen präsentiert werden. Man sieht in Abbildung 4.7 trotz des großen Rauschens bei den Messungen mit den einzelnen Wellenlängen einen eindeutigen Zusammenhang zwischen ΔR und der tatsächlichen Anbindung. Die Diskrepanz in der Übereinstimmung der Kurven ab $t \approx 330\text{ s}$ ist nicht so wichtig. Zu diesem Zeitpunkt beginnt die Regeneration mit der Injektion einer SDS-Regenerationslösung mit ganz anderen optischen Parametern als die PBS-Lösung, mit der die Anbindung detektiert wird. Zusätzlich findet während der Regeneration eine Ablösung der angebondenen DNA von der Sensoroberfläche statt, so daß es sehr schwierig ist, in diesem Zeitraum bei allen gemessenen Kurven überhaupt ein aufgenommenes Meßsignal, egal mit welchem Detektionsprinzip, richtig zu interpretieren.

4.3. Reflektivitäten an optischen Schichtsystemen

Wie wir in Abschnitt 4.2 gesehen haben, war es bei der behandelten DNA-Hybridisierung prinzipiell möglich, die Anbindung an die Sensoroberfläche auch nur mit einer Wellenlänge zu beobachten. Jetzt soll anhand optischer Rechnungen der theoretische Hintergrund dargelegt werden. Es werden hier im Grunde die Auswirkungen von Abschnitt 2.1.4 auf einzelne Wellenlängen diskutiert.

4.3.1. Betrachtung ausgewählter dielektrischer Schichtsysteme

In diesem Abschnitt werden die Eigenschaften verschiedener optischer Schichtsysteme bezüglich ihrer Signaldynamik diskutiert. Dabei gilt für jedes Schichtsystem folgende Aussage, die wesentlich ist für die Verwendung von Reflektivitäten in der Biosensorik:

Für jede Wellenlänge gilt eine periodische Variation der Reflektivität in Abhängigkeit von der Dicke der aufgetragenen Polymere unabhängig von der Wahl der optischen Vergütung des Trägers. Es ändert sich nur die Amplitude und die Phase der

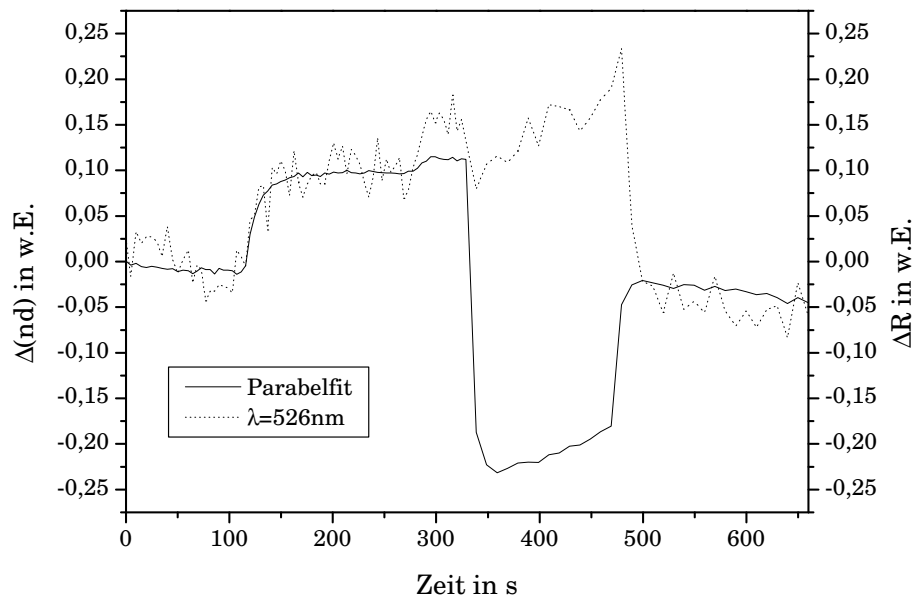
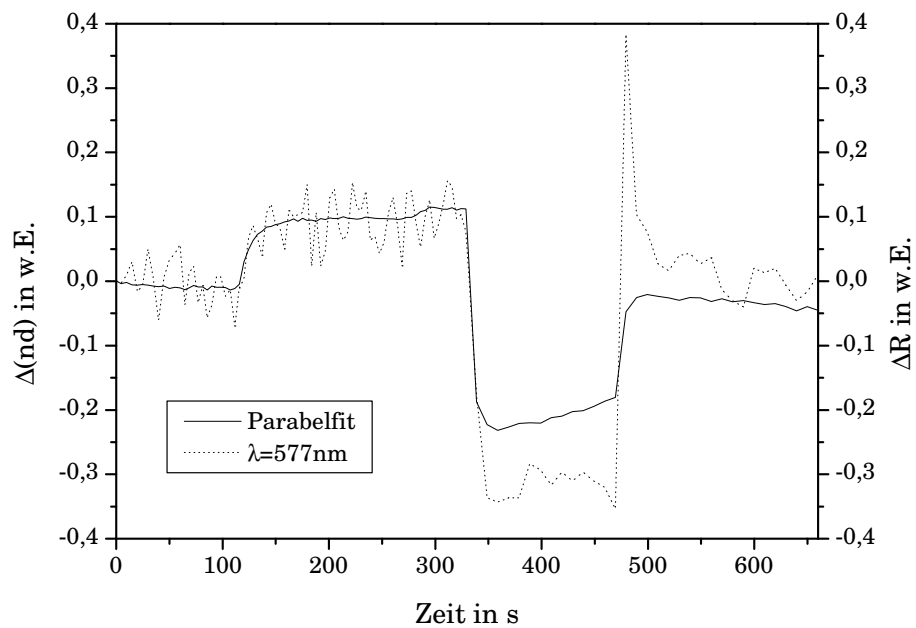
(a) $\lambda = 526 \text{ nm}$.(b) $\lambda = 577 \text{ nm}$.

Abbildung 4.7.: Vergleich der gemessenen Hybridisierungskurven der Wellenlängen 526 nm und 577 nm mit dem Parabelfit aus Abbildung 4.2(c). Die Reflektivitäten wurden in der Skalierung der RfS-Messung angepaßt, um den graphischen Vergleich möglich zu machen.

resultierenden reflektierten elektromagnetischen Welle.

In den folgenden Abbildungen wird diese Aussage veranschaulicht. Die Reflektivitäten wurden in wäßriger Umgebung und mit der Annahme eines Brechungsindex der Polymerschicht von $n_{Polymer} = 1,34$ berechnet. Zudem ist es wichtig zu wissen, daß die Dickenänderungen durch biochemische Anbindungen sich in einem Bereich von einigen wenigen Nanometern oder noch weniger abspielen.

Simulation an BK7-Glas

Man kann in Abbildung 4.8 ganz deutlich das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Wellenlängen auf ein Anwachsen der Polymerschicht beobachten. Abgesehen von den unterschiedlichen Ausgangsreflektivitäten bei $d_{Polymer} = 0$ nm, die vom wellenlängenabhängigen Brechungsindex des BK7-Substrats herrühren, sieht man das zu erwartende periodische Verhalten gemäß der hier geltenden Interferenzbedingung für konstruktive Interferenz $2nd = m \cdot \lambda$ mit $m \in \mathbb{N}$ für jede einzelne Wellenlänge. Man sieht ganz deutlich, daß bei Kenntnis der Ausgangsdicke der Polymerschicht die Signaldynamik durch eine geeignete Wahl der Wellenlänge optimiert werden kann. Bei Wahl der Wellenlänge, deren Reflexionskurve in 4.8 sich bei der Ausgangsdicke der Polymerschicht gerade im Wendepunkt befindet, ist die Empfindlichkeit maximal und gleichzeitig in sehr guter Näherung linear in Bezug auf die Änderung der Dicke der Polymerschicht. Insgesamt sind die Reflektivitäten mit Werten kleiner als 0,01 der eingestrahnten Intensität auf einem sehr niedrigen Niveau. Ich möchte hier nochmal unter Hinweis auf Abbildung 4.4 bekräftigen, daß der periodische Verlauf von $R_{\lambda}(d_{Polymer})$ kein Nachteil gegenüber RIfS ist. Vielmehr ist die Möglichkeit der Wahl einer optimalen Wellenlänge bei Kenntnis derselben ein Vorteil gegenüber RIfS. Dort werden alle Wellenlängen des Parabelfits für die Auswertung herangezogen, auch diejenigen, deren Reflektivität sich überhaupt nicht oder nur wenig ändert.

Simulation an Kunststoffträgern

Die optischen Eigenschaften des verwendeten Kunststoffträgers sind denen von BK7-Glas nicht zu verschieden. Falls keine anderen Effekte eine Rolle spielen, sollte man im Großen und Ganzen ein ähnliches Reflexionsverhalten wie in Abbildung 4.8 erhalten.

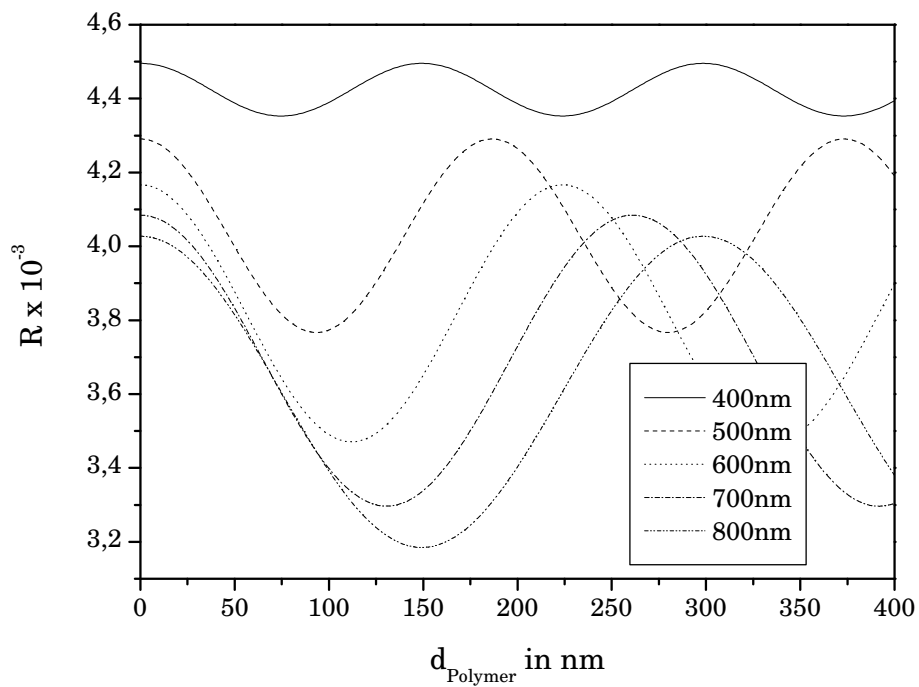
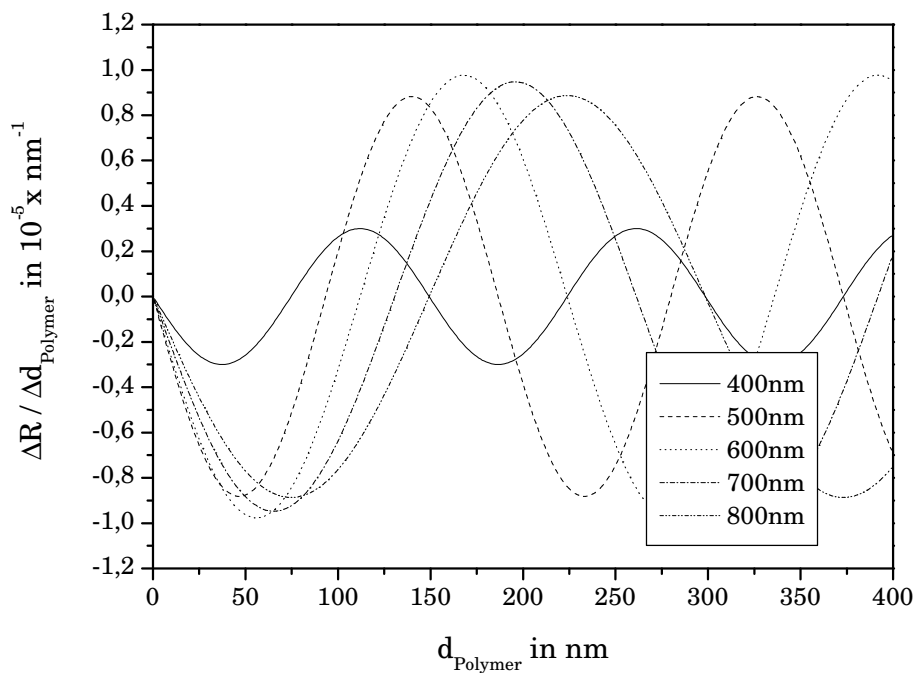
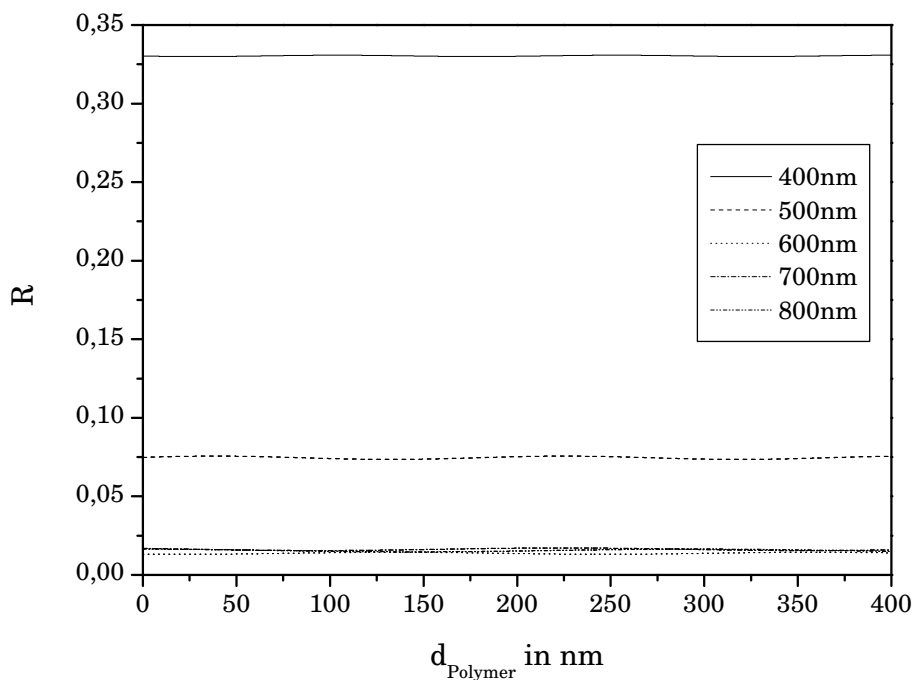
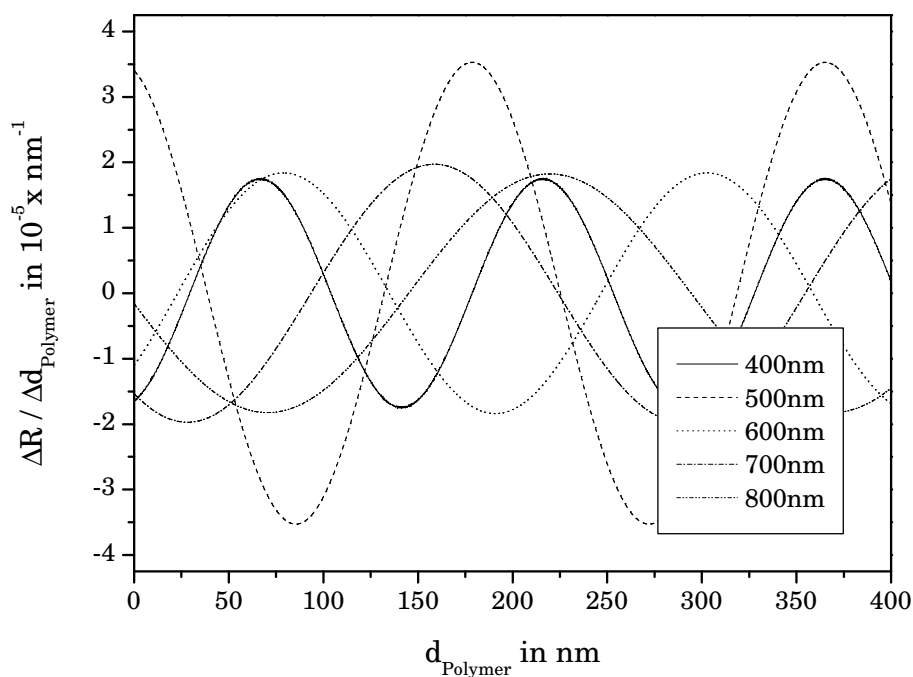
(a) $R_{\lambda}(d_{\text{Polymer}})$ an BK7-Glas bei senkrechtem Lichteinfall.(b) $\partial R / \partial d_{\text{Polymer}}$ an BK7-Glas bei senkrechtem Lichteinfall.

Abbildung 4.8.: Reflektivität und seine Ableitung verschiedener Wellenlängen in Abhängigkeit der Polymerschichtdicke an BK7-Glas.



(a) $R_{\lambda}(d_{\text{Polymer}})$ an Interferenzglas bei senkrechtem Lichteinfall.



(b) $\partial R / \partial d_{\text{Polymer}}$ an Interferenzglas bei senkrechtem Lichteinfall.

Abbildung 4.9.: Reflektivität und seine Ableitung verschiedener Wellenlängen in Abhängigkeit der Polymerschichtdicke an Interferenzglas.

Simulation an Interferenzglas

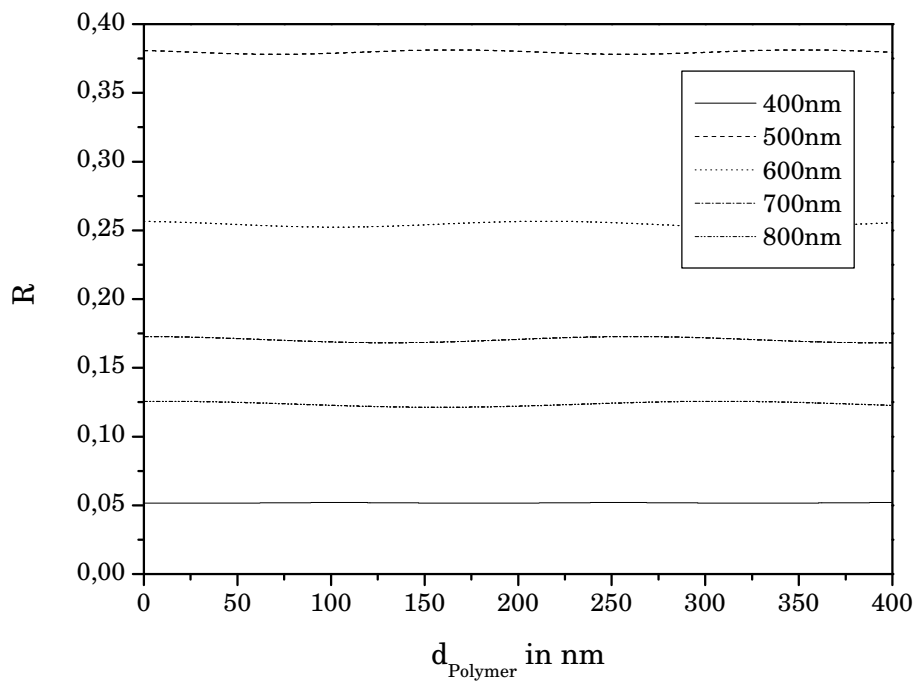
Bei der Simulation an Interferenzglas (D263 / 10 nm Ta₂O₅ / 330 nm SiO₂) ist im Unterschied zu BK7-Glasträgern eine zumindest für kleine Wellenlängen bis ca. 500 nm eine deutlich größere Reflektivität als bei unbeschichteten Glasträgern zu beobachten. Aber auch hier verlaufen die Reflektivitäten periodisch in Abhängigkeit der Polymerschichtdicke (Abbildung 4.9(a)). Die Periodizität von R ist aufgrund der großen Skala auf der Ordinate nur schwer zu erkennen. Klarer sehen kann man diese Eigenschaft in Abbildung 4.9(b). Somit ist auch hier bei Wahl einer geeigneten Wellenlänge ein optimaler linearer Zusammenhang zwischen R und $d_{Polymer}$ wie bei unbeschichteten Trägern möglich.

Simulation an Goethe-Glas

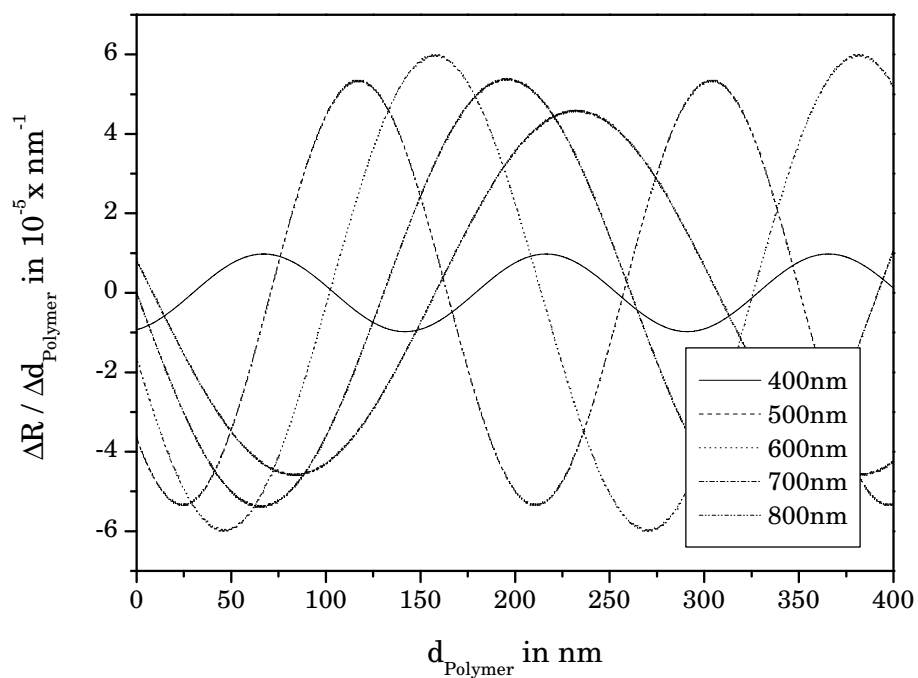
Die von einem ehemaligen Kollegen [52] in unserem Arbeitskreis wegen ihrer hohen Reflexionsverstärkung als Goethe-Glas bezeichneten Träger bestehen aus einem Substrat aus D263-Glas, einer 45 nm dicken Schicht aus Ta₂O₅ und einer 20 nm dicken SiO₂-Schicht. Bei diesem Schichtsystem ist der reflexionsverstärkende Effekt bei allen Wellenlängen im sichtbaren Bereich vorhanden. Ansonsten ist wie bei den vorher behandelten Schichtsystemen wiederum ein periodischer Kurvenverlauf von $R_\lambda(d_{Polymer})$ zu erkennen (Abbildung 4.10). Also ist auch hier bei Wahl einer geeigneten Wellenlänge ein optimaler linearer Zusammenhang zwischen R und $d_{Polymer}$ möglich.

4.3.2. Die Signaldynamik bei den ausgewählten Schichtsystemen

Neben den Reflexionsbetrachtungen sind vor allem die daraus resultierenden Signaldynamiken wichtig. Interessant ist dabei die in den Abbildungen 4.8, 4.9 und 4.10 präsentierte Tatsache, daß die maximal erreichbare Signaldynamik $\partial R / \partial d_{Polymer}$ in allen drei Graphen 4.8(b), 4.9(b) und 4.10(b) bei den behandelten Trägern bei weitem nicht so unterschiedlich ist wie die absoluten Reflektivitäten. Während R beim System D263 / 45 nm Ta₂O₅ / 20 nm SiO₂ theoretisch um fast zwei Größenordnungen größer sein kann als bei unbeschichtetem BK7-Glas, schrumpft der Vorteil bei Betrachten der berechneten Signaldynamik auf einen Faktor <10. Beide Effekte sind nicht zu vernachlässigen. So wird sich später zeigen, daß die absolute Intensität des mit dem verwendeten Aufbau detektierbaren reflektierten Lichts sich in Bereichen von höchstens einigen 100 nW bewegt. Eine möglichst große Reflektivität ist demnach zwar kein absolutes Muß, aber sicher-



(a) $R_{\lambda}(d_{\text{Polymer}})$ am Schichtsystem D263 / 45 nm Ta_2O_5 / 20 nm SiO_2 bei senkrechtem Lichteinfall.



(b) $\partial R / \partial d_{\text{Polymer}}$ am Schichtsystem D263 / 45 nm Ta_2O_5 / 20 nm SiO_2 bei senkrechtem Lichteinfall.

Abbildung 4.10.: Reflektivität und seine Ableitung verschiedener Wellenlängen in Abhängigkeit der Polymerschichtdicke an Goethe-Glas.

lich nicht von Nachteil. Zusätzlich ist als wesentliche Größe die Signaldynamik $\partial R/\partial d_{\text{Polymer}}$ beim Schichtsystem D263 / 45 nm Ta₂O₅ / 20 nm SiO₂ am größten. Ich möchte unbedingt bemerken, daß sich, aufgrund des einfachen optischen Modells und den allgemein ungenügenden Kenntnissen, wie sich die optischen Parameter bei einer Anbindung an die Sensoroberfläche tatsächlich ändern, die errechneten Werte für $\partial R/\partial d_{\text{Polymer}}$ nicht als Absolutmaß eignen. Man kann allerdings die an verschiedenen Trägersystemen simulierten Signaldynamiken miteinander vergleichen. Die Verhältnisse der Signaldynamiken stimmen dann auch, wie später gezeigt wird, mit den experimentellen Messungen gut überein. Die Rechnungen sind also durchaus geeignet für qualitative und in einem gewissen Rahmen auch quantitative Aussagen, ob und wieviel eine experimentelle Anordnung besser geeignet ist als eine andere. Dies reicht mir im momentanen Entwicklungsstadium dieser Untersuchungen absolut aus.

4.3.3. Eventuelle Nachteile der Einwellenlängenmethode gegenüber RIfS

Bis jetzt wurde theoretisch und experimentell die prinzipielle Möglichkeit einer reflektometrischen Detektion von biochemischen Anbindungen mit nur einer Wellenlänge verifiziert. Dabei muß man die Reflektivität dieser einen Wellenlänge sehr genau bestimmen. Äußere Störungen, die zur Folge haben, daß die Reflektivität des ganzen Spektrums angehoben wird, wie z.B. Intensitätsschwankungen der Lichtquelle, würden bei RIfS nicht ins Gewicht fallen, solange diese über das ganze Spektrum gleich groß wären (Abbildung 4.11). Bei der Reflexionsmessung mit nur einer Wellenlänge ist die Eliminierung von möglichen Intensitätsschwankungen z.B. durch einen zweiten Referenzpunkt möglich. Mit diesem könnte man noch zusätzliche weitere unspezifische Effekte ausschließen, die auch nicht mit RIfS von tatsächlichen Anbindungseffekten unterschieden werden können.

4.4. Erste Messungen mit der Einwellenlängenreflektometrie

Nachdem nun die Erklärung für das unterschiedliche Reflexionsverhalten der einzelnen Wellenlängen in Abbildung 4.6 im vorherigen Abschnitt geliefert wurde, wird jetzt versucht, mit verschiedenen Trägersubstraten biochemische Bindungskurven in qualitativ vergleichbarer Güte von RIfS aufzunehmen. Dabei wurde der

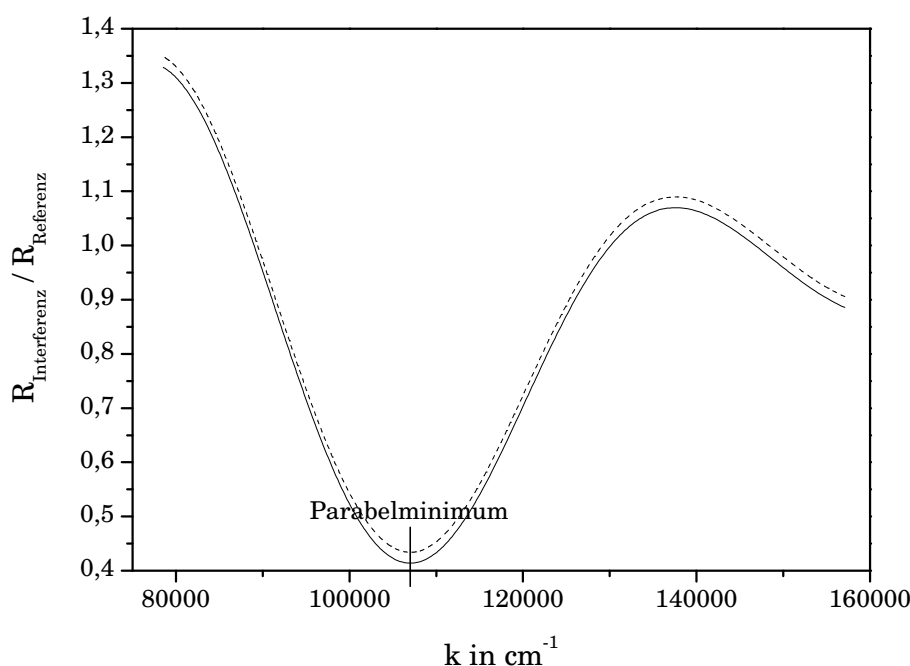


Abbildung 4.11.: Die RIfS-Methodik bleibt von möglichen Intensitätsschwankungen der Lichtquelle (in der Abbildung überzeichnet simuliert) unbeeinflusst. Mit nur einer Wellenlänge können diese Instabilitäten ohne Referenzierung nicht von tatsächlichen Effekten an der Sensoroberfläche unterschieden werden.

konventionelle Einkanal-RIfS-Aufbau zuerst in der Art verändert, daß als Detektionsquelle kein Spektrometer, sondern eine Photodiode mit vorgeschaltetem Interferenzfilter verwendet wurde (Abbildung 3.1(b)). Konkret wurde ein Lightwave-Multimeter 2832-C von Newport[®] verwendet. Dieses besitzt neben einer internen Meßbereichsumschaltung eine A/D-Wandlerkarte mit einer Auflösung von 20000. Ich möchte zeigen, daß man mit diesem einfachen Aufbau Bindungsvorgänge mit einer Wellenlänge genausogut detektieren kann wie unter Benutzung eines ganzen Spektrums, wenn diese Reflektivität einer Wellenlänge nur genau genug gemessen werden kann.

4.4.1. Ermittlung der optimalen Wellenlängen

Die optimalen Wellenlängen für die verschiedenen Substrate und deren Oberflächenmodifikationen werden experimentell bestimmt. Dabei wird das Substrat mit der jeweiligen Oberflächenchemie beschichtet und eine normale Bindungsreaktion spektral aufgelöst mit einem Spektrometer beobachtet. Zeitaufgelöste Betrachtung einzelner Wellenlängen ergeben dann Graphen, die denen der Abbildungen

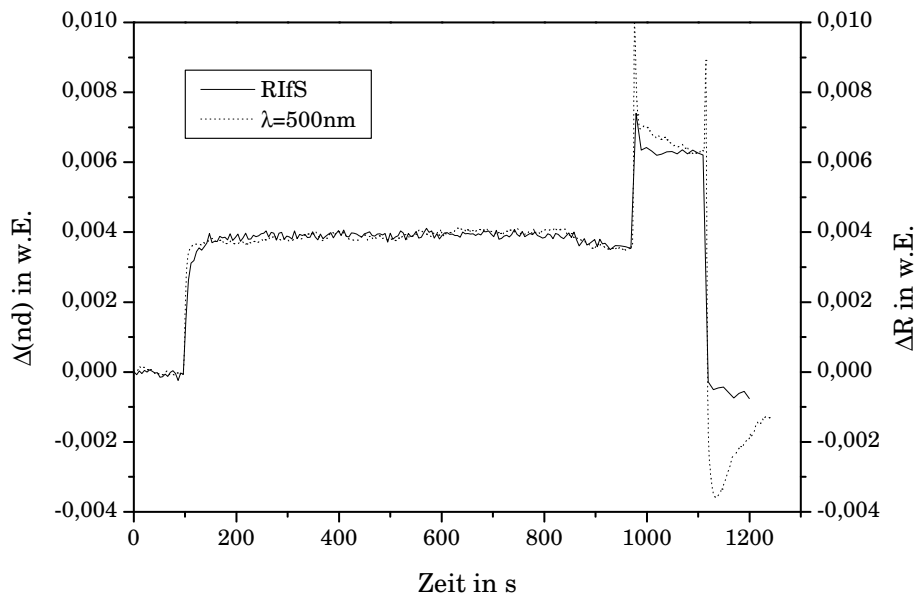
4.6 ähneln. Die optimale Wellenlänge ist dann diejenige, die den größten relativen Signalhub $\frac{|R_{final}-R_0|}{R_0}$ liefert:

$$\left(\frac{|R_{final}-R_0|}{R_0}\right)_\lambda = max. \quad (4.1)$$

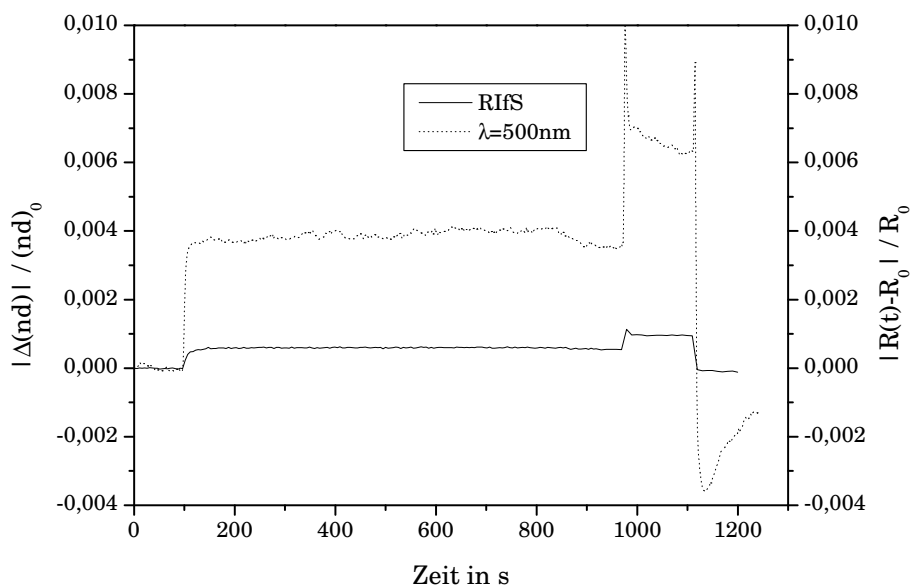
Dabei ist völlig unerheblich, ob die Signaländerung positiv oder negativ ist, ausschlaggebend ist der Betrag der Änderung. Mit Rücksicht auf von der Wellenlänge abhängiges Ansprechverhalten der Spektrometer und von der Wellenlänge abhängige Strahlungsintensitäten der Lichtquelle wurde der relative Signalhub zum besseren Vergleich zwischen den einzelnen Wellenlängen als Auswahlkriterium gewählt. Die Analyse wurde bei Wellenlängen zwischen 400 nm und 800 nm im Abstand von 50 nm durchgeführt. Der Grund dafür ist das Vorhandensein von Interferenzfiltern in diesem Wellenlängenabstand. Man wird aber auch später erkennen, daß dies völlig ausreichend ist. Dies ist gerade die Stärke der Methode. Man muß nicht auf 0,1 nm genau die Wellenlänge aussuchen. Es reicht ein ungefähres Abschätzen der optimalen Wellenlänge und ein Standard-Interferenzfilter mit einem Durchlaßfenster von einigen wenigen 10 nm. Auch die zweitbeste Wellenlänge liefert noch absolut brauchbare Ergebnisse, die den Vergleich mit RIfS nicht zu scheuen braucht. Nur durch die Toleranz, die diese Methode gewährt, ist diese auch für Reihenmessungen geeignet, da die optischen Eigenschaften der selektiven Oberflächen bei weitem nicht immer so gut reproduzierbar sind wie man sich das manchmal wünschen würde. Somit reicht im Normalfall eine einmalige Bestimmung einer optimalen Wellenlänge für ein optisches System, wobei zum optischen System das Substrat, eventuelle optische Vergütungsschichten, das selektive Biopolymer sowie das Umgebungsmedium gehören.

4.4.2. DNA-Hybridisierungen auf Interferenzglas

Zuerst sollen Vergleichsmessungen der Einwellenlängenreflektometrie mit dem herkömmlichen und etablierten RIfS-Prinzip auf Interferenzglas durchgeführt werden. Als biologisches Testsystem wird eine DNA-Hybridisierung detektiert. Die DNA am Träger wurde auf einer PEG-Oberfläche angebunden. Als optimale Wellenlänge wurde 550 nm bestimmt, wegen einer Beschädigung des Interferenzfilters für diese Wellenlänge wurde die Messung mit der Wellenlänge 500 nm durchgeführt. Beide Messungen wurden am gleichen Träger direkt hintereinander durchgeführt. Die Übereinstimmung der beiden Kurven in Abbildung 4.12(a) ist hervorragend und beweist die vorangegangenen Überlegungen. Um die Übereinstim-



(a) Vergleich RIfS und Einwellenlängenreflektometrie bei angeglicherer y-Skala.



(b) Vergleich RIfS und Einwellenlängenreflektometrie bei jeweils eigener relativer y-Skala.

Abbildung 4.12.: RIfS und Einwellenlängenreflektometrie im Vergleich anhand einer DNA-Messung.

mung graphisch zu überprüfen, wurden die y-Werte der RfS-Meßkurve mit einem Faktor skaliert. Trägt man die einzelnen Meßwerte allerdings nach der in Gleichung 4.1 beschriebenen relativen Signaländerung auf, so erkennt man, daß diese bei der Einwellenlängenreflektometrie einiges höher ist als bei RfS (Abbildung 4.12(b)). Dies liegt offensichtlich an der Wahl der optimierten Wellenlänge bei der Einwellenlängenreflektometrie.

4.4.3. Messungen an Kunststoffsubstraten

Ein wesentlicher Vorteil der Einwellenlängenreflektometrie gegenüber RfS wären mögliche Messungen auf ganz normalen, optisch unvergüteten handelsüblichen Trägermaterialien. Im folgenden wird als Trägermaterial ein Kunststoff auf Cyclo-Olefinbasis getestet, der von Greiner-Bioone in Objektträgerformat vertrieben wird. Das Interesse an Kunststoffmaterialien in der Bioanalytik ist wegen niedriger Kosten und seiner Ungefährlichkeit in Bezug auf Verletzungen in letzter Zeit stark gestiegen. Zeitaufgelöst markierungsfreie Bindungskinetiken mit diesen einfachsten Substraten aufnehmen zu können, wäre sicherlich weit mehr als nur von akademischem Interesse. Bei der alleinigen Betrachtung der optischen Brechungsindices der Träger sollte es keinen großen Unterschied zwischen Glas- und Kunststoffträgern geben, ein wesentlicher Unterschied könnte allerdings in der unterschiedlichen Oberflächenchemie liegen. Im folgenden werden erste Bindungskurven mit nur einer Wellenlänge präsentiert. Die optimale Wellenlänge des Systems Kunststoff/AMD wurde mit $\lambda = 650 \text{ nm}$ bestimmt. Abbildung 4.13 zeigt zwei DNA-Hybridisierungskurven mit unterschiedlichen DNA-Konzentrationen von $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ und $5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ in Lösung². Man erkennt ganz deutlich die langsamere Kinetik der DNA-Hybridisierung bei der niedrigen DNA-Konzentration. Damit konnte gezeigt werden, daß die Einwellenlängenreflektometrie auch ohne optische Zusatzschichten auf gänzlich unvergüteten Trägersubstraten für die Detektion von DNA-Hybridisierungen sehr gut funktioniert. Nächste Messungen wurden wiederum auf dem System Kunststoff/AMD, d.h. wieder mit der Wellenlänge $\lambda = 650 \text{ nm}$ durchgeführt, diesmal allerdings wurden Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen beobachtet. Rein optisch betrachtet wechselt man hier von sehr kleinen Änderungen der optischen Schichtdicke zu größeren Änderungen von $\Delta(nd)$. Als Beispielreaktion wurde eine Wechselwirkung zwischen Atrazin und einem Anti-ACA-Antikörper ausgesucht. Die Atrazinmoleküle sind an die Sensoroberfläche gebunden, die Anti-ACA-Antikörper befinden sich in Lösung. Abbildung

²Die Konzentrationen entsprechen bei dieser DNA $10 \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}}$ und $1 \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}}$

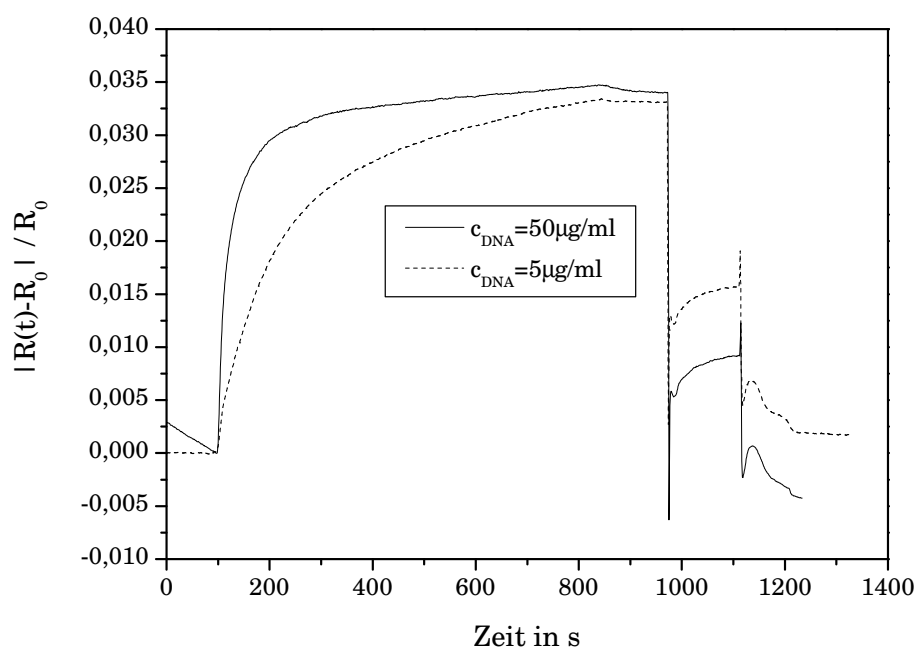


Abbildung 4.13.: DNA-Hybridisierungen zweier verschiedener Konzentrationen auf einem Kunststoffträger. Man erkennt ganz deutlich die zu erwartende langsamere Hybridisierung bei der Messung mit der niedrigeren DNA-Konzentration in der Probe.

4.14 zeigt die Bindungskurve einer solchen Antigen-Antikörper-Wechselwirkung mit einer recht hohen Anti-ACA-Konzentration. Wie erhofft funktioniert die Einwellenlängenreflektometrie auf optisch unbehandelten Trägersubstraten für die Detektion von Antigen-Antikörpern einwandfrei. Für eine semiquantitative Analyse des gesamten Detektionssystems wurde jetzt mit dem System Kunststoff/AMD eine Atrazin-Anti-ACA Bindung mit einer Antikörperkonzentration von $750 \frac{ng}{ml}$ ³ gemessen. Bei dieser Antikörperkonzentration wird erfahrungsgemäß eine massen-transportlimitierte Bindungskinetik erwartet, was zu einer linearen Änderung der optischen Schichtdicke (nd) führt. Anschließend wurde bei einer weiteren Messung Atrazin einer Konzentration von 316 ppb⁴ zur Antikörperlösung hinzugegeben, um die Bindung von Antikörpern an die Trägeroberfläche zu hemmen. Es sollte daher keine große Änderung der optischen Schichtdicke (nd) (also auch von R) zu beobachten sein. Aus Abbildung 4.15 kann man zwei Schlußfolgerungen ziehen:

1. Die gehemmte Bindung liefert in der Messung tatsächlich keine große Änderung von R . Der kleine Signalhub nach unten hat seine Ursache wahrscheinlich in Brechungsindexänderungen in der Probe. Damit ist gezeigt, daß die

³Entspricht $5 \frac{pmol}{ml}$ bei einer Molmasse des Antikörpers von $150000 \frac{g}{mol}$

⁴Entspricht $1,465 \frac{nmol}{ml}$ bei einer Molmasse des Atrazins von $216 \frac{g}{mol}$

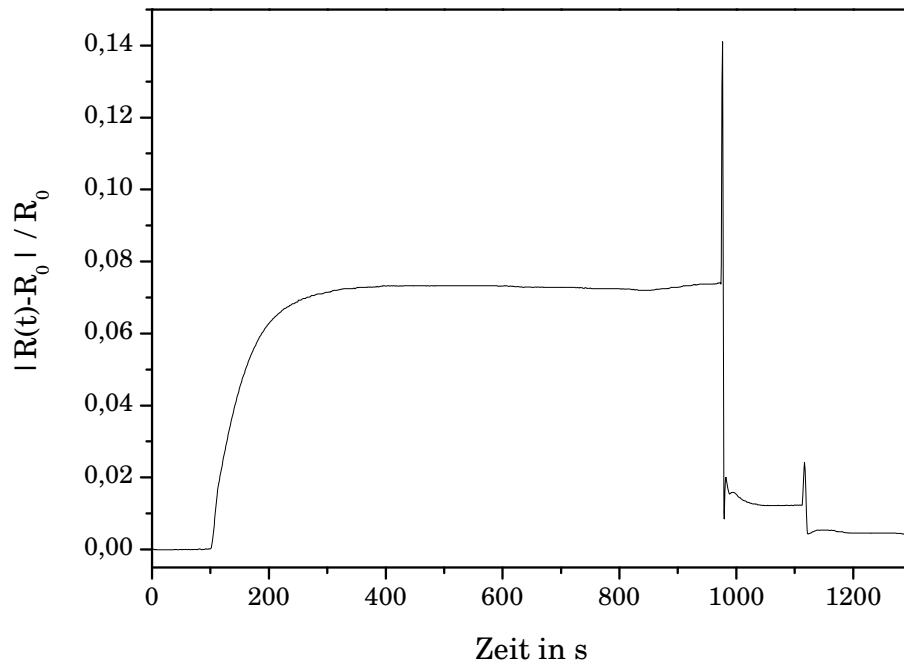


Abbildung 4.14.: Bindungskurve einer Atrazin-Anti-ACA Wechselwirkung. Die Atrazinmoleküle sind an die Trägeroberfläche gebunden, während die Antikörper sich in Lösung befinden.

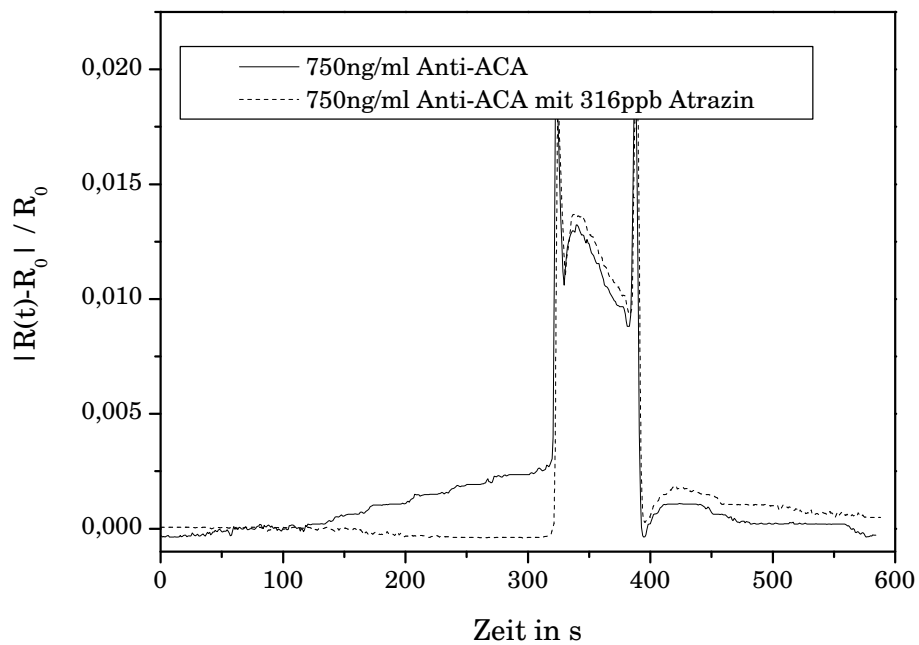


Abbildung 4.15.: Massentransportlimitierte Bindungskinetik von Anti-ACA an eine mit Atrazin modifizierte Kunststoffträgeroberfläche und eine gehemmte Bindung durch Zugabe von Atrazin in die Antikörperlösung.

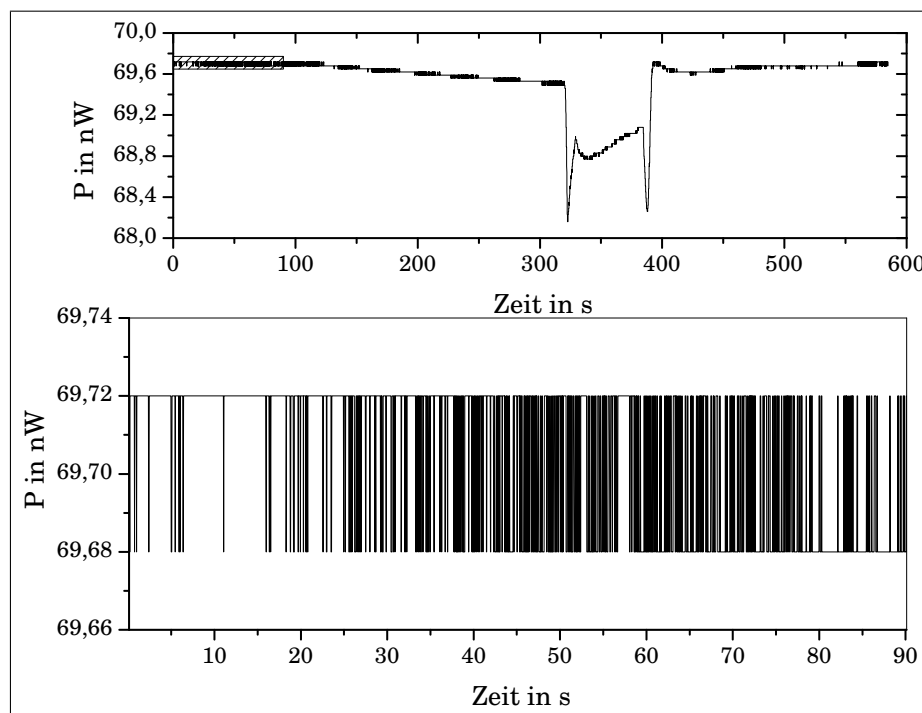


Abbildung 4.16.: Rohdaten der in 4.15 gezeigten Bindungskinetik mit einer Vergrößerung der Baseline.

Gesamtstabilität des Systems groß genug ist und daher keine eventuellen Schwankungen der Lichtquelle, wie in 4.3.3 beschrieben, die Messung beeinträchtigen.

2. Man erkennt bei der massentransportlimitierten Bindung gewisse Abstufungen in der gemessenen Reflektivität. Diese sind die Quantisierungsstufen der Detektionseinheit. Im Detail wird dies in Abschnitt 4.4.4 diskutiert.

4.4.4. Betrachtungen über Meßfehler und mögliche Verbesserungen der Meßapparatur

Im folgenden werden die Messungen aus Abbildung 4.15 genauer betrachtet. Durch Einstellung am verwendeten Lightwave-Multimeter konnten ca. 57 Messungen pro Sekunde gemacht werden. Die Mittelwerte der Messungen innerhalb einer Sekunde werden danach in die Graphen eingetragen. Für eine Analyse werden jetzt die Rohdaten der massentransportlimitierten Bindungskurve in Abbildung 4.16 gezeigt. Mit dem Lightwave-Multimeter ist es möglich, bei Eingabe der detektierten Wellenlänge die Leistung der reflektierten Strahlung mit kalibrierten Dioden

in nW anzugeben. Man erkennt, daß die Reflektivität mit zunehmender Anbindung kleiner wird, ein Ergebnis, das absolut konform mit den berechneten Vorhersagen ist (Abbildung 4.8(b)). Die wichtigste Erkenntnis an der Abbildung ist das deutlich erkennbare Quantisierungsrauschen des A/D-Wandlers. Zum einen ist damit eine hohe Gesamtstabilität des Systems gezeigt. Zum anderen ist erkennbar, daß die Schwachstelle des Systems momentan in der Auflösung des A/D-Wandlers liegt und dieser die Qualität der Ergebnisse limitiert.

Aufgrund dieser Konfiguration ist eine Fehlerabschätzung, wie sie bei Messungen mit Gauß-Verteilung gemacht wird, nicht möglich. Die Auflösung des A/D-Wandlers ist zu klein, um das Rauschen des Meßsignals aufzulösen. Der Fehler aller Einzelmessungen liegt daher bei 1 Digit, der Auflösung des A/D-Wandlers. Die Mittelwerte dieser Einzelmessungen liegen zwar näher am tatsächlichen Signal, dennoch kann der Fehler durch den Mittelwert nicht reduziert werden. Außerdem sind hier nur die Fehler des Meßsystems berücksichtigt. Unregelmäßigkeiten und Rauschen in anderen Teilen des Systems, wie z.B. im Flußsystem, werden damit nicht berücksichtigt. Den Fehler des ganzen Systems beschreibt man am besten mit dem Rauschen der Baseline.

Bei Messungen, die mit dem 20 Bit A/D-Wandler (um die 50-fach höhere Auflösung) durchgeführt wurden, kann die übliche Fehlerrechnung angewendet werden. Die Fehlerbalken sind allerdings so klein, daß man sie in den Grafiken nicht richtig darstellen kann. Zudem gilt auch hier, daß das Rauschen der Baseline den Fehler des ganzen Systems am besten beschreibt.

4.5. Funktionstest eines 1λ -Reflektometrie-Zweikanalaufbaus

Die bisher gezeigten Messungen wurden mit einem faseroptischen Einkanalaufbau durchgeführt. Für problematische Proben mit einem hohen Anteil unspezifischer Bindung ist eine parallel zum eigentlichen Meßpunkt durchgeführte Detektion eines Punktes der gleichen Oberflächenbeschaffenheit mit Ausnahme der Anwesenheit selektiver Strukturen sinnvoll. Deshalb wurde ein einfacher faseroptischer Zweikanalaufbau konzipiert (Abbildung 3.1(c)). Als Detektionssystem wurde hier nicht das Lightwave-Multimeter sondern die Anordnung um das Evaluation Board benutzt (Abschnitt 3.2).

Um die Funktionsfähigkeit des Zweikanalaufbaus unter Beweis zu stellen, wurde wiederum des biologische System Atrazin/Anti-ACA mit einer Anti-ACA Konzen-

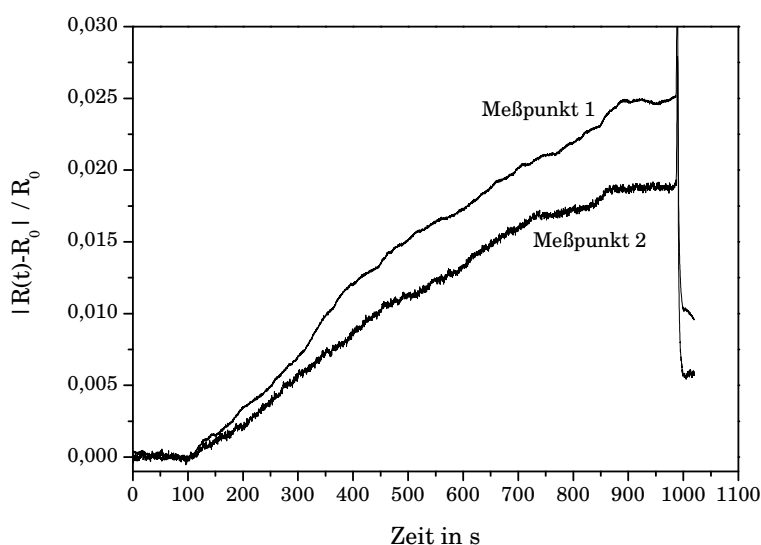


Abbildung 4.17.: Messungen mit einem Zweikanalaufbau am Atrazin/Anti-ACA System.

tration von $10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ verwendet. Es wurden die Oberflächen beider Meßpunkte mit Atrazin belegt. Als Träger wurde das optische Schichtsystem D263/ 45 nm Ta_2O_5 / 20 nm SiO_2 verwendet. Die beiden Meßpunkte bei diesem Aufbau liegen im Analytfluß direkt hintereinander. Zu erwarten ist bei beiden Punkten eine bindungslimitierte Reaktionskinetik. Am zweiten Meßpunkt ist die tatsächliche Antikörperkonzentration wegen der bereits erfolgten Anbindung von Antikörpern am ersten Meßpunkt geringer. Deshalb geht die Bindung am zweiten Meßpunkt langsamer in die Sättigung als beim ersten. In Abbildung 4.17 ist die gemessene Bindungskurve am Zweikanalaufbau zu sehen. Man kann wie erwartet die unterschiedlich schnelle Bindung aufgrund des Konzentrationsgradienten zwischen den beiden Meßpunkten erkennen. Würde man die Messung um einiges länger laufen lassen, müßten beide Meßpunkte eine gleich große relative Signaländerung liefern. Beim ersten Meßpunkt wäre das Gleichgewicht lediglich etwas früher eingestellt. Zu sehen ist auch ein erhöhtes Rauschen beim zweiten Meßpunkt, dessen Ursache wohl in der nicht so guten optischen Ankopplung des Lichtleiters an den Träger liegt.

4.6. Die Signaldynamik in Abhängigkeit vom Träger

Nachdem die Funktionsfähigkeit des Konzepts erfolgreich verifiziert, erste Messungen durchgeführt wurden (4.4), sowie die momentane Limitierung des Systems erkannt wurde (4.4.4), wird jetzt die Abhängigkeit der Signaldynamik von

verschiedenen Trägern untersucht. Bereits in den Simulationen 4.8(b), 4.9(b) und 4.10(b) haben die Amplituden von $\partial R/\partial d_{Polymer}$ verschiedene Größen. Es gilt jetzt diese theoretischen Vorhersagen qualitativ zu überprüfen. Als biologisches System wurde wiederum das Antigen/Antikörper-System Atrazin/Anti-ACA verwendet. Dabei wurde Atrazin über eine AMD-Schicht an den jeweiligen Träger kovalent angebunden. Detektiert wurde die Anbindung von Anti-ACA Antikörpern in Lösung an die Sensoroberfläche. Es wurden folgende Experimente an jedem Transducer durchgeführt:

- Eine Messung einer diffusionslimitierten Bindungskurve mit einer Anti-ACA-Konzentration von $10 \frac{\mu g}{ml}$.
- Eine Messung einer Bindungskurve mit einer Anti-ACA-Konzentration von $10 \frac{\mu g}{ml}$ gehemmt mit 1000 ppb Atrazin in der Lösung. Durch die Zugabe des Atrazins in der Lösung werden viele Antikörper mit dem Atrazin in der Lösung gebunden und können so nicht an die Atrazinmoleküle auf der Sensoroberfläche binden.
- Eine Messung einer massentransportlimitierten Bindungskurve mit einer Anti-ACA-Konzentration von $1 \frac{\mu g}{ml}$.
- Eine Messung mit Ovalbumin (OVA), um eventuelle unspezifische Bindungen zu detektieren.

Damit kann nun der Einfluß der verschiedenen Träger auf die relative Reflektivitätsänderung erfaßt und quantitativ verglichen werden. Zudem stellen die Detektion der gehemmten, der massentransportlimitierten Bindung sowie die Messung mit Ovalbumin noch einmal sicher, daß die über die Zeit gemessenen Intensitätsverläufe auch tatsächlich nur von den an der Sensoroberfläche stattfindenden Prozessen herrühren. Um einen besseren Vergleich der einzelnen Trägermaterialien untereinander und auch mit den Simulationen in den Abbildungen 4.8(b), 4.9(b) und 4.10(b) zu haben, wird auf der y-Achse nicht die relative Signaländerung $\frac{|R_{final}-R_0|}{R_0}$, sondern die Leistungsänderung $|P_{final} - P_0|$ des reflektierten Lichts dargestellt, die mit dem verwendeten Lightwave-Multimeter als Detektionseinheit gemessen werden kann. Der Betrag dieser Größe ist dabei so zu verstehen, daß ein + oder - so vorangestellt wird, daß die Auslenkung der Bindungskurve nach oben geht und nicht streng mathematisch alle Meßgrößen positiv gemacht werden. Man erhält dadurch einfach das gewohnte Bild bei Bindungskurven: steigendes Signal bei steigender Belegung.

4.6.1. Untersuchungen an Interferenzglas

Interferenzglas besteht aus einem Substrat aus D263-Glas, einer 10 nm dicken Schicht aus Ta_2O_5 und einer 330 nm dicken SiO_2 -Schicht. Es wurde mit der Wellenlänge $\lambda = 700 \text{ nm}$ gemessen. Die Leistungsänderung des reflektierten Lichts bei der Detektion von $10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Anti-ACA liegt bei ungefähr 5,4 nW. Die Messungen waren so stabil, daß wiederum die Auflösung des A/D-Wandlers die begrenzende Größe ist.

4.6.2. Untersuchungen am Goethe-Glas

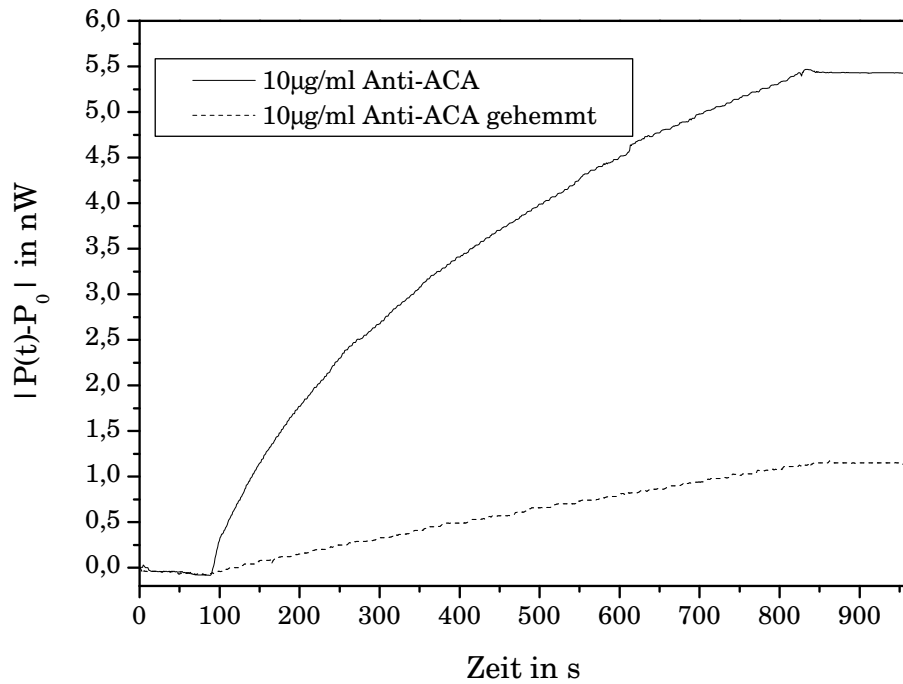
Es wurde mit der Wellenlänge $\lambda = 500 \text{ nm}$ gemessen. Die Leistungsänderung des reflektierten Lichts bei der Detektion von $10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Anti-ACA liegt bei ca. 26,7 nW (siehe Abbildung 4.19).

4.6.3. Untersuchungen an unbeschichteten Kunststoffträgern

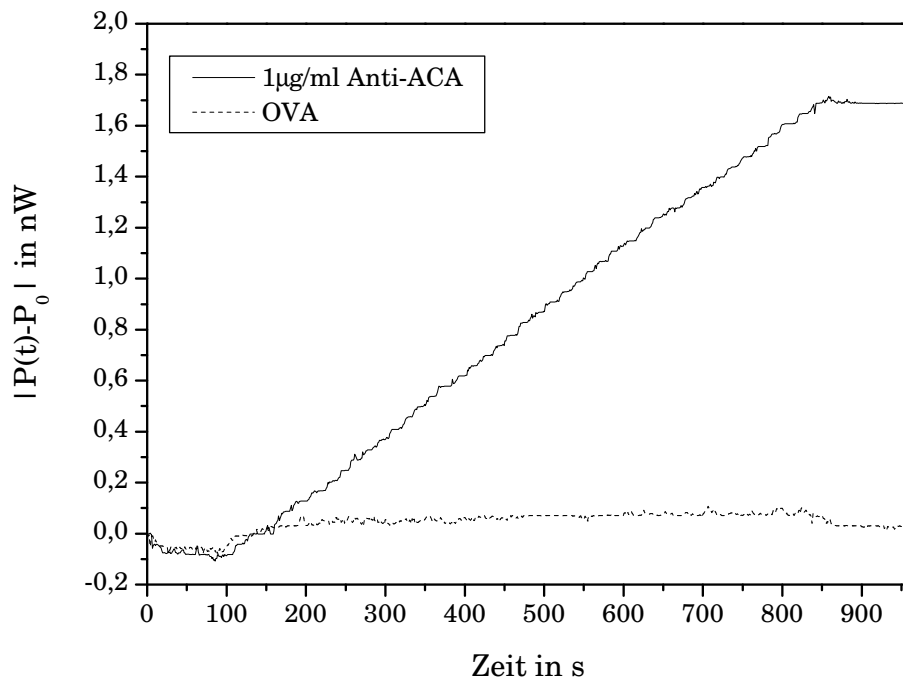
Mit der Wellenlänge $\lambda = 500 \text{ nm}$ wurde hier eine Leistungsänderung des reflektierten Lichts bei der Detektion von $10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Anti-ACA von ungefähr 2,15 nW gemessen.

4.6.4. Untersuchungen an mit ITO beschichtetem Bk7-Glas

Dieser Träger besteht aus einem Substrat aus BK7-Glas und einer 180nm dicken Schicht aus Indium-Zinnoxid (ITO). ITO ist ein transparenter Halbleiter, der z.B. als Elektrode auf sogenannten „Touch Screens“ als dünne Schicht aufgebracht wird [53]. Es wurde mit der Wellenlänge $\lambda = 500 \text{ nm}$ gemessen. Die Leistungsänderung des reflektierten Lichts bei der Detektion von $10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Anti-ACA liegt bei ungefähr 7,02 nW. Der Anteil von unspezifischen Bindungen scheint laut Abbildung 4.21(b) bei diesem Träger größer zu sein als bei Goethe- und Interferenzglas. Zudem ist die ITO-Schicht gegen die verwendete Regenerationsprozedur der Oberfläche nicht resistent, was in Abbildung 4.22(a) zu sehen ist [54]. Abgebildet sind dort noch einmal die massentransportlimitierte Bindung mit einer Anti-ACA Konzentration von $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ aus Abbildung 4.21 sowie eine gemessene Bindungskurve mit einer Anti-ACA Konzentration von $0,5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$. Zwischen beiden Messungen wurden verschiedene andere Messungen durchgeführt. Zu erwarten wäre eigentlich bei der Anti-ACA Konzentration von $0,5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ eine halb so große Steigung wie bei der Anti-ACA Konzentration von $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ aufgrund der Bindungskinetik. Da zeitlich zwischen beiden

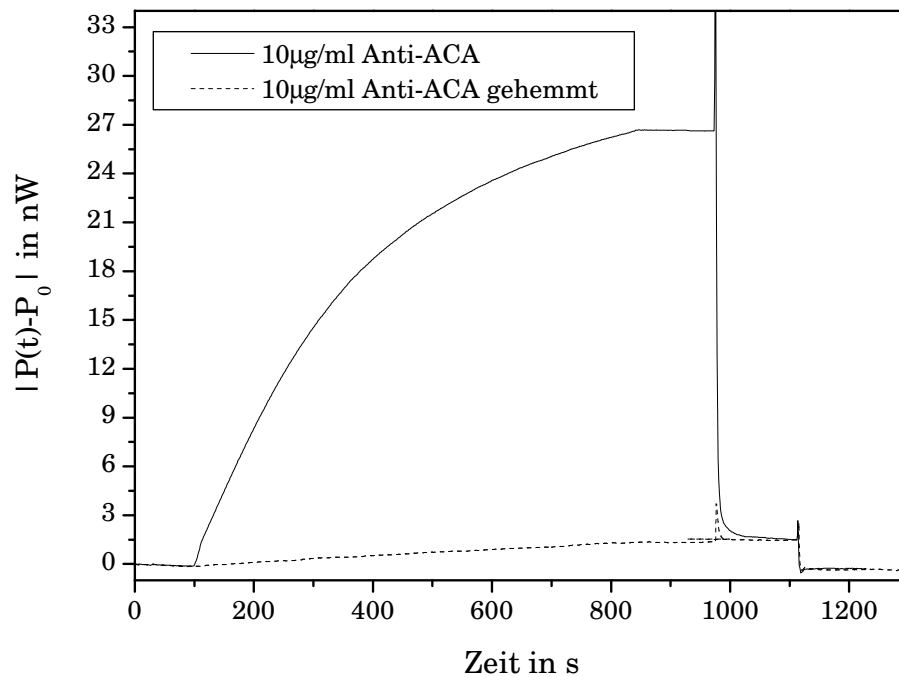


(a) Diffusionslimitierte Bindungskinetik mit einer Anti-ACA Konzentration von $10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ ($P_0 = 174,9 \text{ nW}$) und eine mit 1000 ppb Atrazin inhibierte Bindungskurve ($P_0 = 191,95 \text{ nW}$).

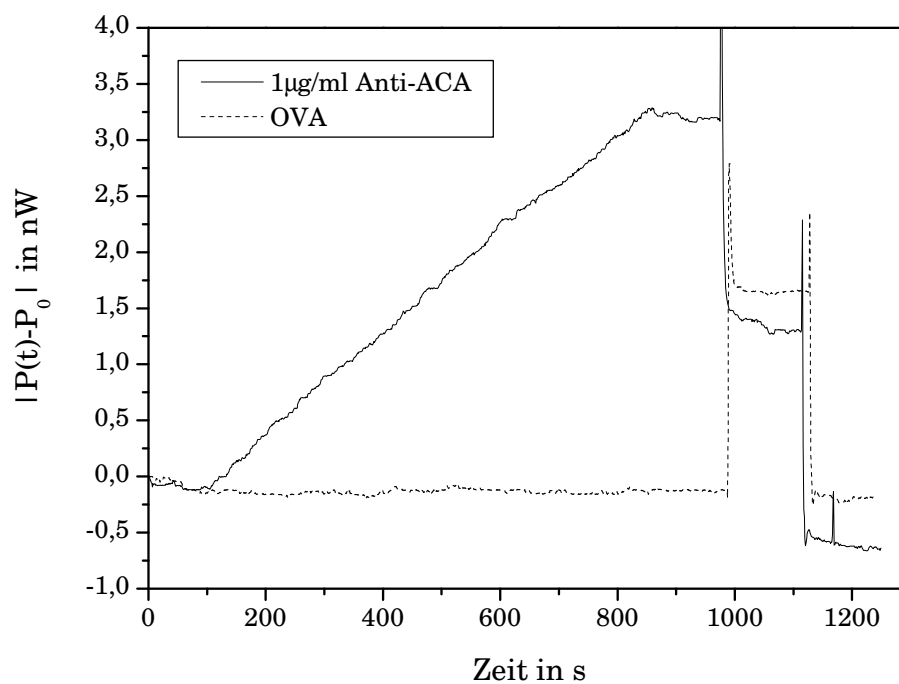


(b) Massentransportlimitierte Bindungskinetik mit einer Anti-ACA Konzentration von $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ ($P_0 = 191,75 \text{ nW}$) und Detektion möglicher unspezifischer Wechselwirkungen mit Ovalbumin (OVA) ($P_0 = 191,96 \text{ nW}$).

Abbildung 4.18.: Detektion von Anti-ACA mit dem System Interferenzglas/AMD.

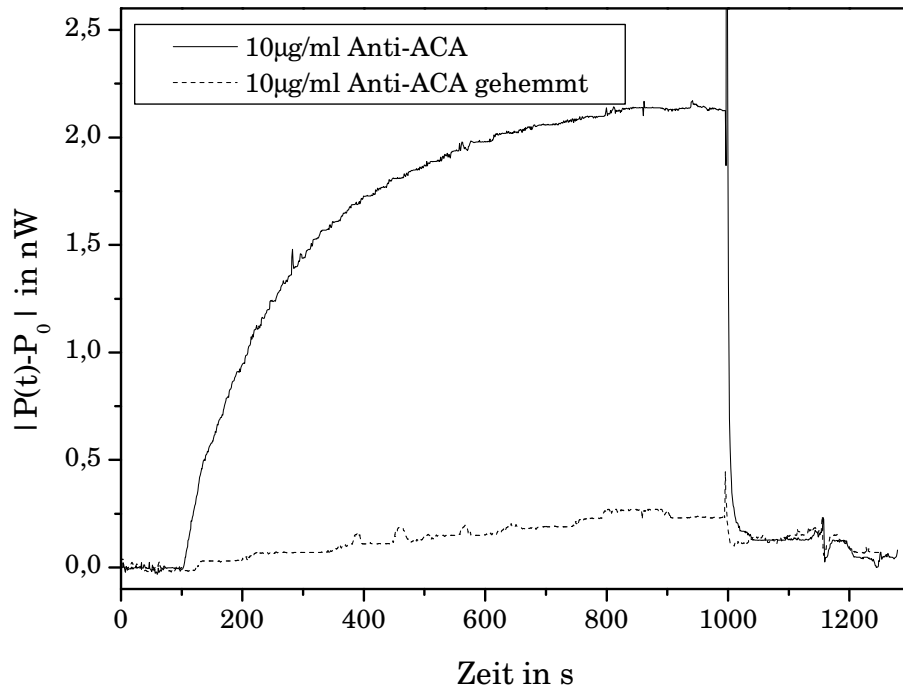


(a) Diffusionslimitierte Bindungskinetik mit einer Anti-ACA Konzentration von $10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ ($P_0 = 362,45 \text{ nW}$) und eine mit 1000 ppb Atrazin inhibierte Bindungskurve ($P_0 = 363,45 \text{ nW}$).

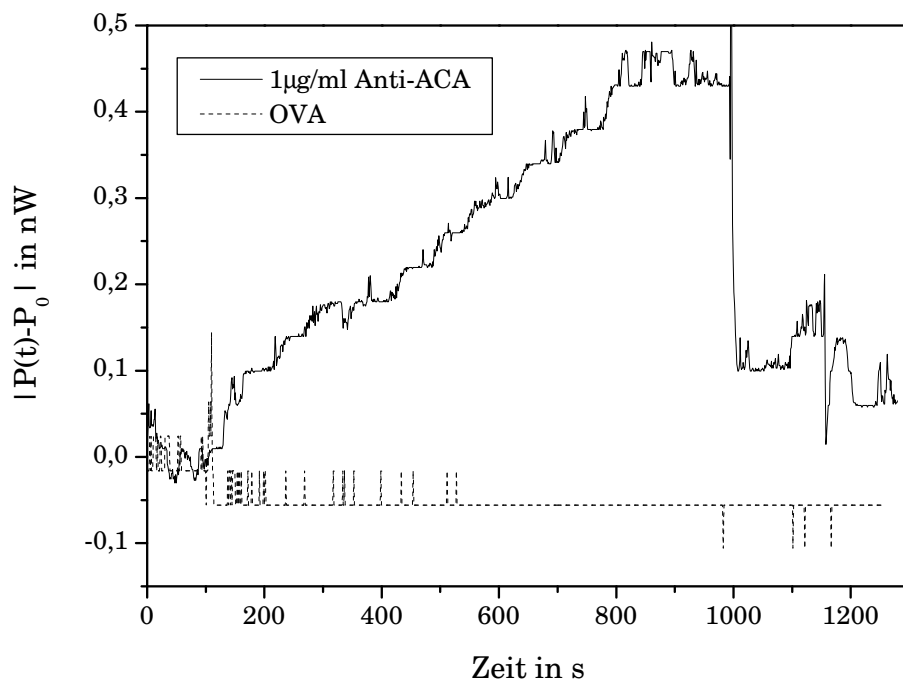


(b) Massentransportlimitierte Bindungskinetik mit einer Anti-ACA Konzentration von $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ ($P_0 = 362,82 \text{ nW}$) und Detektion möglicher unspezifischer Wechselwirkungen mit Ovalbumin (OVA) ($P_0 = 363,73 \text{ nW}$).

Abbildung 4.19.: Detektion von Anti-ACA mit dem System Goethe-Glas/AMD.

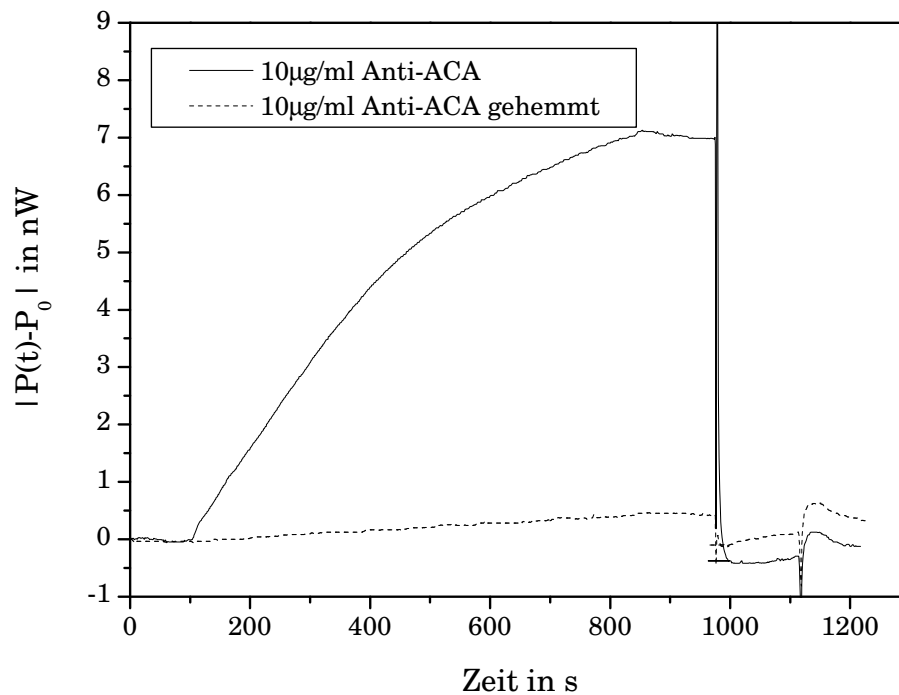


(a) Diffusionslimitierte Bindungskinetik mit einer Anti-ACA Konzentration von 10 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ ($P_0 = 73,81$ nW) und eine mit 1000 ppb Atrazin inhibierte Bindungskurve ($P_0 = 73,75$ nW).

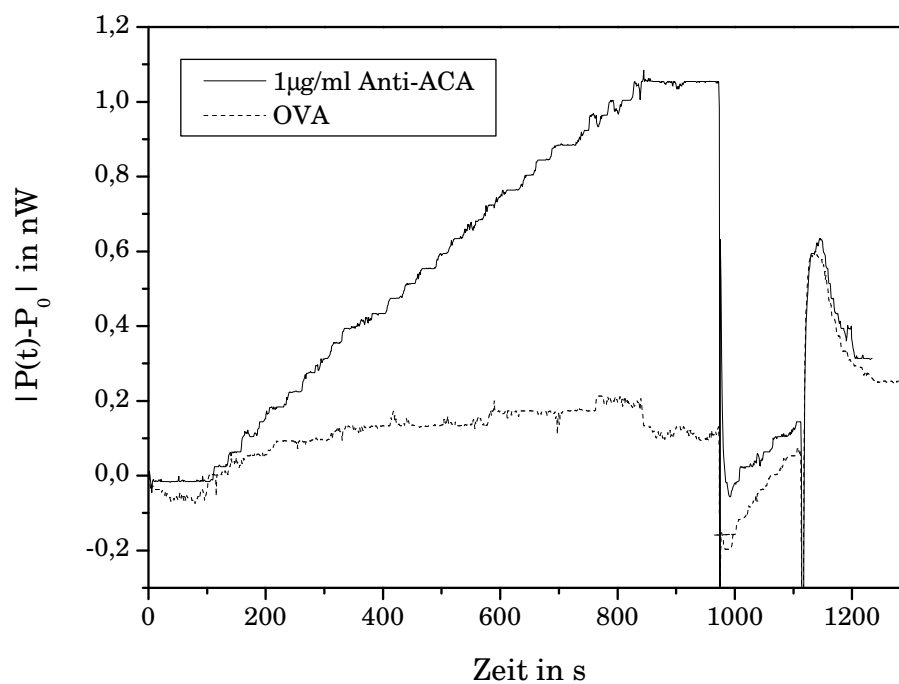


(b) Massentransportlimitierte Bindungskinetik mit einer Anti-ACA Konzentration von 1 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ ($P_0 = 73,80$ nW) und Detektion möglicher unspezifischer Wechselwirkungen mit Ovalbumin (OVA) ($P_0 = 73,76$ nW).

Abbildung 4.20.: Detektion von Anti-ACA mit dem System Kunststoff/AMD.

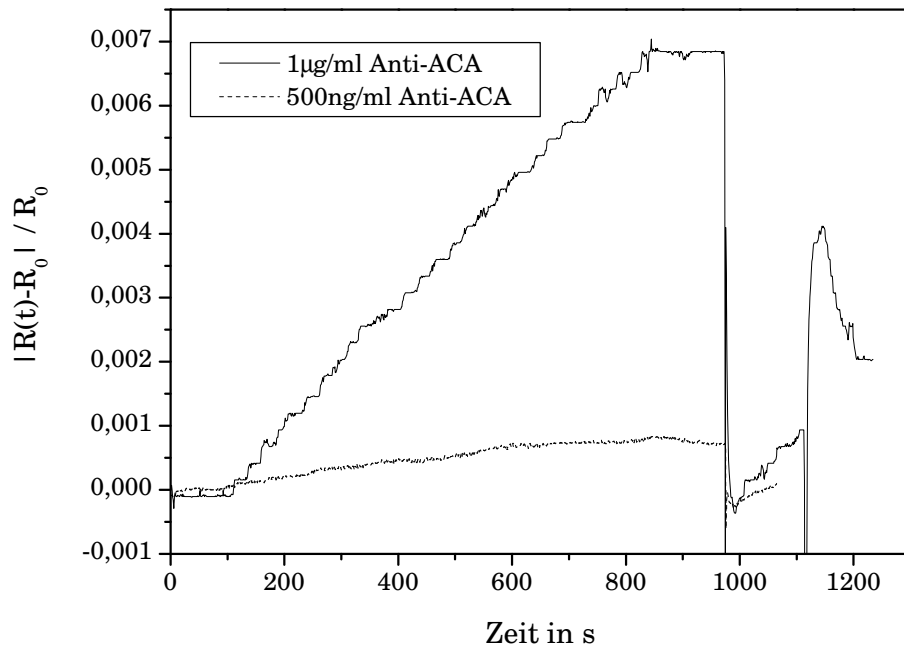


(a) Diffusionslimitierte Bindungskinetik mit einer Anti-ACA Konzentration von $10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ ($P_0 = 153,90 \text{ nW}$) und eine mit 1000 ppb Atrazin inhibierte Bindungskurve ($P_0 = 153,73 \text{ nW}$).

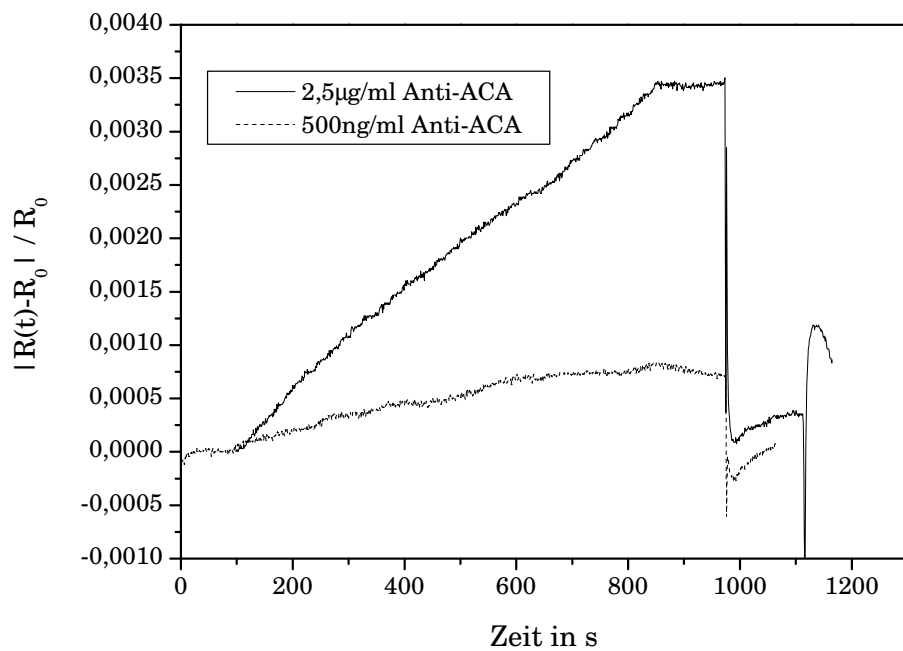


(b) Massentransportlimitierte Bindungskinetik mit einer Anti-ACA Konzentration von $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ ($P_0 = 154,04 \text{ nW}$) und Detektion möglicher unspezifischer Wechselwirkungen mit Ovalbumin (OVA) ($P_0 = 153,41 \text{ nW}$).

Abbildung 4.21.: Detektion von Anti-ACA mit dem System BK7/ITO/AMD.



(a) Dokumentation der Zerstörung der ITO-Schicht durch zwei zeitlich weit auseinanderliegende Messungen. Die Signaldynamik verändert sich mit der Zeit erheblich.



(b) Aufnahme zweier direkt hintereinander gemessenen massentansport-limitierten Bindungskinetiken.

Abbildung 4.22.: Aufnahme von Bindungskinetiken am System BK7-Glas/ITO/AMD zur Dokumentation der Langzeitstabilität derselben.

Messungen noch andere Tests durchgeführt wurden, macht sich die Zersetzung der ITO-Schicht hier bemerkbar. Die letztere Bindungskinetik wurde mit einer Detektionseinheit mit einer 20 Bit-Auflösung und nicht mit dem Lightwave-Multimeter gemessen (um die Auflösungsgrenze zu verbessern). Da mit dieser Einheit nur eine dem Photostrom proportionale Spannung und keine absolute Leistung gemessen werden kann, ist in dieser Abbildung auf der y-Achse die relative Signaländerung aufgetragen, um die beiden Kurven vergleichen zu können. Um zu untermauern, daß die Diskrepanz zwischen erwarteter und tatsächlich gemessener Kurve wirklich in der schleichenden Zerstörung der ITO-Schicht ihre Ursache hat, wird in Abbildung 4.22(b) eine direkt vor der Messung mit $0,5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Anti-ACA eine Messung mit $2,5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Anti-ACA präsentiert. Den Erwartungen entsprechend ist das Steigungsverhältnis zwischen beiden Kurven ungefähr 5.

4.6.5. Untersuchungen an optisch unvergütetem Bk7-Glas

Als Trägermaterial wurden hier zurechtgeschnittene Objektträger verwendet. Die

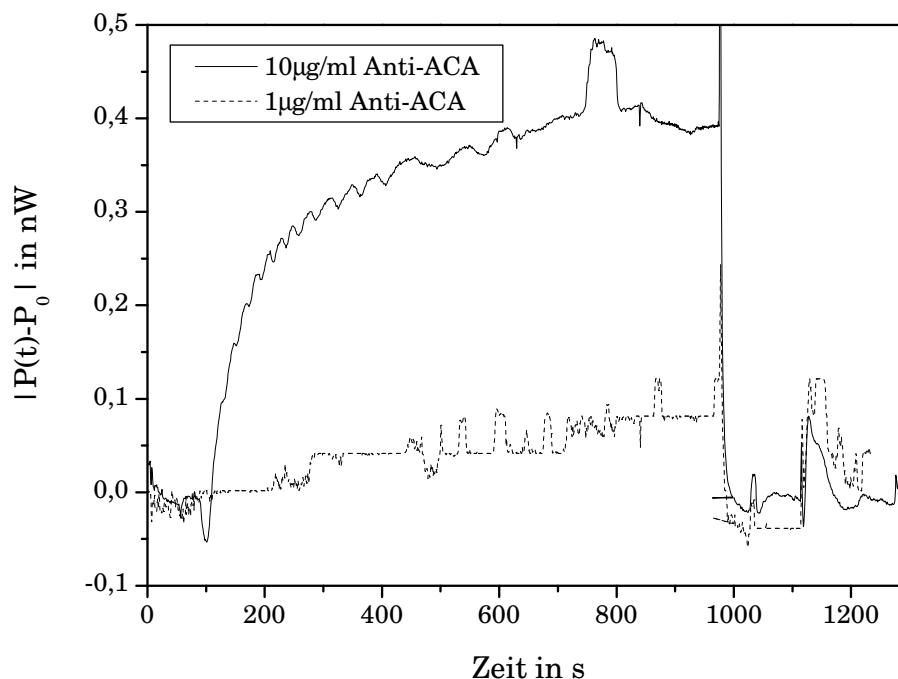


Abbildung 4.23.: Diffusionslimitierte Bindungskinetik mit einer Anti-ACA Konzentration von $10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ ($P_0 = 75,65 \text{ nW}$) und eine massentransportlimitierte Bindungskinetik mit einer Anti-ACA Konzentration von $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ ($P_0 = 72,87 \text{ nW}$) am System BK7-Glas/AMD.

Leistungsänderung des reflektierten Lichts bei der Detektion von $10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Anti-ACA

liegt bei ungefähr 0,40 nW. Wegen des sehr geringen Signalhubs und dem großen Rauschen wurde auf die Aufnahme von gehemmten Bindungskurven und Messungen mit OVA verzichtet. Überraschend ist hier neben dem sehr kleinen Signalhub vor allem das große Rauschen auf BK7-Glas. Dieser Effekt war kein Einzelfall, sondern war bei unterschiedlichen Chargen von oberflächenmodifizierten BK7-Trägern beobachtbar. Es scheint, daß die optischen Eigenschaften dieser Objektträger qualitativ bei weitem nicht so gut sind wie die der vorangegangenen Träger. Bei entsprechender Nachfrage bei einem Hersteller für optisch beschichtete Gläser [55] wurde mir in Bezug auf diese Vermutung zugestimmt. Dort wird nur poliertes BK7 Glas verwendet. Eventuell könnten auch bei der Dimensionierung der Glasplättchen Streuzentren durch Kratzer entstanden sein. Für eine endgültige Bestätigung dieser Aussage wären sicherlich noch weitere Untersuchungen notwendig.

4.6.6. Diskussion der gemessenen Signale

Es geht jetzt darum, die gemessenen verschieden hohen Signaländerungen bei den unterschiedlichen Trägermaterialien bei ansonsten gleichen Rahmenbedingungen qualitativ zu verstehen. Es werden die Trägersysteme verglichen, die vergleichbare optische Eigenschaften haben und zeitlich stabil sind. Es sind dies die Systeme Interferenzglas, Goethe-Glas sowie die Kunststoffträger. Das unvergütete BK7-Glas fällt wegen des noch unverstandenen hohen Rauschens beim direkten Vergleich raus. Ebenso nicht berücksichtigt werden kann mit ITO beschichtetes BK7-Glas wegen der chemischen Instabilität der ITO-Schicht gegenüber der Regenerationslösung.

Vergleich der Signalhöhen bei der massentransportlimitierten Bindungskinetik

Bei der Detektion von $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Anti-ACA werden nach der Theorie alle Antikörper, die durch die Diffusionsschicht gelangen, an die Sensoroberfläche gebunden. Da bei allen Trägern neben den gleichen Antikörpern die selbe Fluidik und das gleiche Flußprotokoll verwendet wurde, kann man durchaus annehmen, daß ziemlich genau jeweils die gleiche Anzahl von Antikörpern an die Sensoroberfläche anbindet und dadurch die gleiche Änderung der optischen Schichtdicke hervorruft. Ein unterschiedlicher Signalhub bei den einzelnen Trägern ist deshalb wohl relativ sicher in großem Maße allein von den optischen Parametern des Trägers abhängig. Aus Simulationen aus den Abbildungen 4.8(b), 4.9(b) und 4.10(b) lassen sich bei den jeweiligen gewählten optimalen Wellenlängen die anhand des gewählten (sehr ein-

	$ \partial R/\partial d_{\text{Polymer}} $ in nm^{-1}	$ \Delta P $ in nW ($c_{\text{Anti-ACA}} = 1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)	$ \Delta P $ in nW ($c_{\text{Anti-ACA}} = 10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)
Goethe-Glas ($\lambda = 500 \text{ nm}$)	$5,37 \cdot 10^{-5}$	3,198	26,662
Interferenzglas ($\lambda = 700 \text{ nm}$)	$1,97 \cdot 10^{-5}$	1,688	5,433
Kunststoff ($\lambda = 500 \text{ nm}$)	$0,882 \cdot 10^{-5}$	0,4376	2,154

Tabelle 4.1.: Gegenüberstellung von simulierten (1. Spalte) und gemessenen Reflektivitätsänderungen (2. und 3. Spalte) bei verschiedenen Trägern.

fachen) theoretischen Modells maximal möglichen Änderungen der Reflektivitäten ablesen. Der Vergleich mit den tatsächlich gemessenen Signalhüben aus den Abbildungen 4.18(b), 4.19(b) und 4.20(b) ist in Tabelle 4.1 dargestellt. Man kann bei Simulation und realer Messung qualitativ die gleiche Reihenfolge bezüglich der Signaldynamik der einzelnen Träger feststellen. So liefert Goethe-Glas den mit Abstand größten Signalhub vor Interferenzglas und unbeschichteten Kunststoffträgern. Auch quantitativ ist die Übereinstimmung von Theorie und Praxis überzeugend, wenn man die Einfachheit des theoretischen Modells und des verwendeten Meßaufbaus berücksichtigt. Abbildung 4.24 zeigt die auf den Kunststoffträger normierten berechneten und gemessenen Signaldynamiken.

Vergleich der Signalhöhen bei der diffusionslimitierten Bindungskinetik

Bei der Detektion von $10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Anti-ACA erreicht man der Theorie der Kinetik zufolge eine Sättigung der Bindungsstellen an der Sensoroberfläche. Neben den oben bereits angeführten vom Träger abhängigen unterschiedlich hohen Reflektivitätsänderungen spielt nun auch noch eine unterschiedlich gute Belegung der Sensoroberfläche mit der selektiven Struktur eine große Rolle beim letztendlichen Signalhub. Die gemessenen Leistungsänderungen aus den Abbildungen 4.18(a), 4.19(a) und 4.20(a) sind ebenfalls in Tabelle 4.1 aufgetragen. Auch hier ist die Reihenfolge der Träger bezüglich der Signaldynamik gleich wie bei der Detektion der massen-transportlimitierten Kinetik. Zu beobachten ist allerdings eine noch viel größere Signaldynamik von Goethe-Glas im Verhältnis zu den anderen verwendeten Trägern.

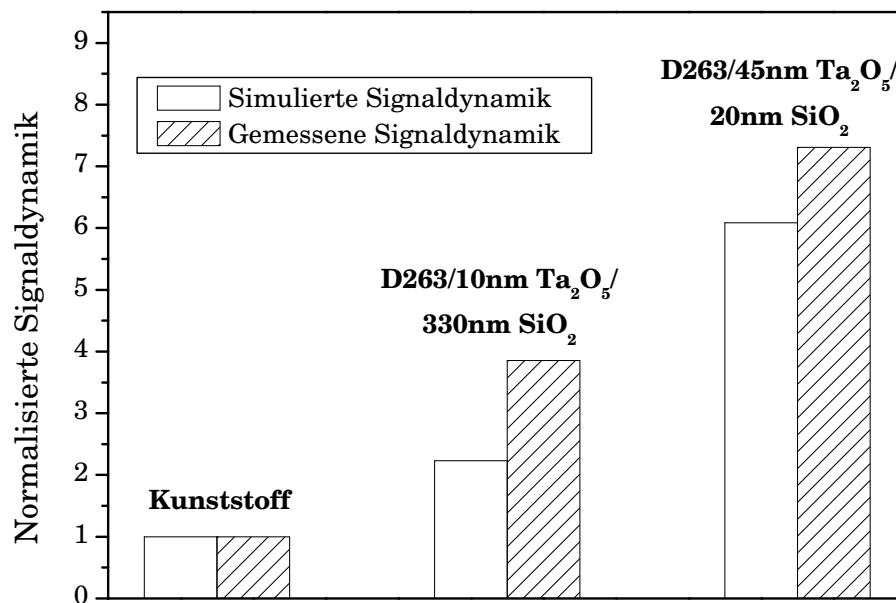


Abbildung 4.24.: Histogramm von auf den Kunststoffträger normierten berechneten und gemessenen Signaldynamiken der verschiedenen Träger-systeme zum graphischen Vergleich.

4.7. Schlußfolgerungen aus den Messungen

Wie im obigen Abschnitt 4.6.6 dargestellt, hängt die Signaldynamik in großem Maße von dem jeweiligen verwendeten Träger ab. Zu erkennen ist, daß optische Vergütungen einer Mindestdicke und mit hohem Brechungsindex (bei unseren Trägern Ta₂O₅) die Signaldynamik um weit mehr als eine Größenordnung erhöhen können. Die anschließend aufgebraachte SiO₂-Schicht dient beim Konzept der 1λ-Reflektometrie nur zur Immobilisierung der selektiven Schicht auf die Sensoroberfläche. Wenn die Auswahl der Wellenlänge variabel ist, spielt die Dicke der SiO₂-Schicht eine eher unwesentliche Rolle. Rein optisch gesehen verhält sich diese Schicht im wesentlichen additiv zur Dicke des selektiven Biopolymers. Bei einer vorgegebenen festen Wellenlänge könnte man die SiO₂-Schichtdicke für eine optimale Signaldynamik anpassen.

4.7.1. Abhängigkeiten der Signaldynamik

Zur Klärung der prinzipiellen Abhängigkeit der Signaldynamik vom Brechungsindex der optischen Vergütungsschicht und der Wellenlänge werden zunächst vereinfachte Modelle für Simulationen benutzt. Die Brechungsindices der optischen Schichten seien über den gesamten Wellenlängenbereich konstant. Es wird jeweils

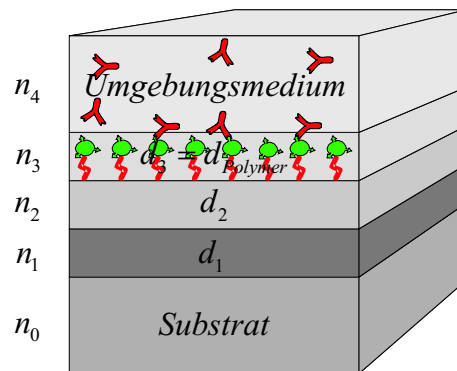


Abbildung 4.25.: Optisches Dreischichtmodell, das für die Simulationen der Signaldynamik in diesem Abschnitt verwendet wird.

ein optisches System mit zwei Vergütungsschichten angenommen. Für Schicht 2 wird ein konstanter Brechungsindex von $n_2 = 1,45$ und eine konstante Dicke von $d_2 = 20$ nm angenommen. Diese Festlegung auf 20 nm ist nicht zwingend notwendig, sondern eher eine willkürliche Größe. Man benötigt SiO_2 oder besser OH-Gruppen an der Oberfläche für eine chemische Anbindung des selektiven Biopolymers. Schicht 2 trägt dieser Tatsache Rechnung. Sie ändert auch nichts an der prinzipiellen Aussage der Untersuchungen. Für Schicht 0 als Substrat wird ein Brechungsindex von $n_0 = 1,5$, für Schicht 3 als selektives Biopolymer ein Brechungsindex von $n_3 = 1,34$ und für Schicht 4 als Umgebungsmedium ein Brechungsindex von $n_4 = 1,33$ festgelegt. Für Schicht 1 wird entweder ein Brechungsindex von $n_1 = 2,0$ oder ein noch höherer Brechungsindex von $n_1 = 4,0$ angenommen. Ziel ist, den prinzipiellen Einfluß des Brechungsindex einer optischen Vergütungsschicht auf die Signaldynamik zu dokumentieren (Abbildungen 4.26 und 4.27). Bei beiden Annahmen ($n_1 = 2,0$ oder $n_1 = 4,0$) wird die Signaldynamik bei den Wellenlängen 400, 600 und 800 nm untersucht. Man erkennt deutlich eine tendenziell größere maximale Signaldynamik bei kleineren Wellenlängen und optischen Schichten mit größerem Brechungsindex.

Wenn man allerdings von idealisierten zu optischen Modellen mit realen Schichten übergeht (Abbildung 4.28), ist der Vorteil von Schichten mit hohem Brechungsindex sowie der Einsatz kleiner Wellenlängen bezüglich einer größeren Signaldynamik nicht mehr unbedingt vorhanden. Es werden die simulierten Reflektivitäten R und deren partielle Ableitungen bezüglich der Änderung der Dicke der selektiven Schicht $\partial R / \partial d_{\text{Polymer}}$ von D263-Glassubstraten dargestellt, die mit einer variablen Ta_2O_5 -Schicht oder einer Schicht mit amorphem Silizium (großer Brechungsindex) beschichtet sind. Hinzu kommt eine SiO_2 -Schicht mit konstanter

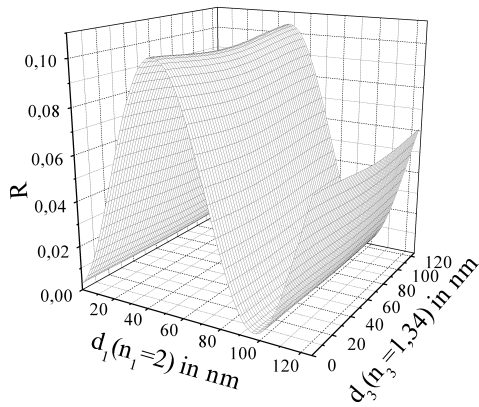
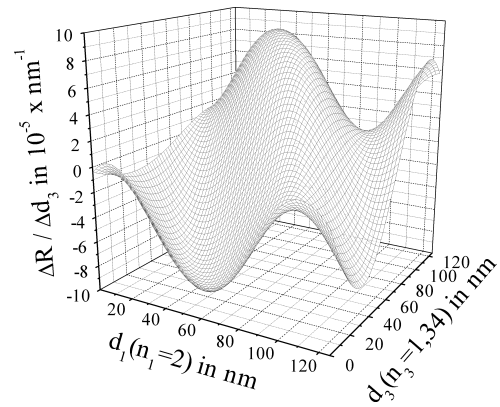
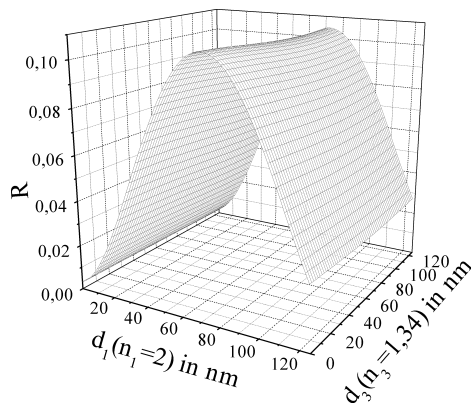
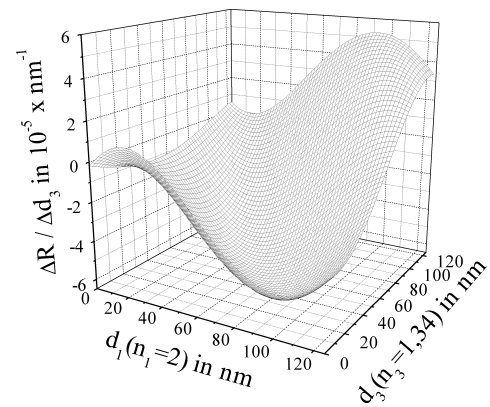
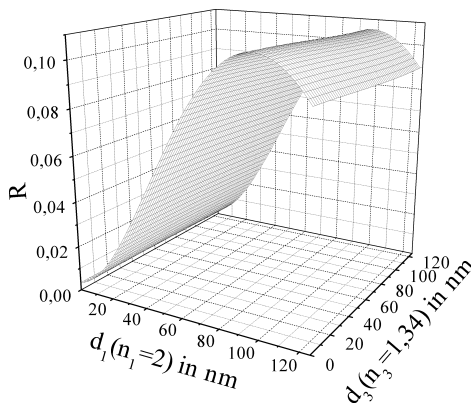
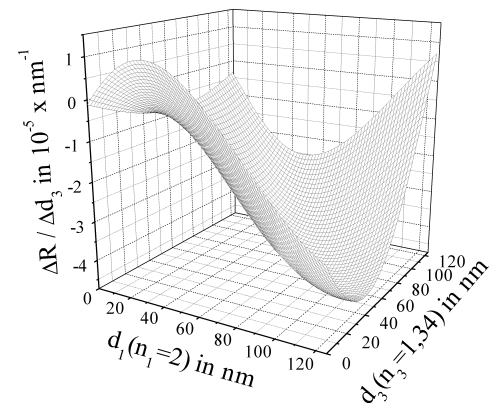
(a) R bei $\lambda = 400$ nm.(b) $\frac{\partial R}{\partial d_3}$ bei $\lambda = 400$ nm.(c) R bei $\lambda = 600$ nm.(d) $\frac{\partial R}{\partial d_3}$ bei $\lambda = 600$ nm.(e) R bei $\lambda = 800$ nm.(f) $\frac{\partial R}{\partial d_3}$ bei $\lambda = 800$ nm.

Abbildung 4.26.: Simulationen von R und $\frac{\partial R}{\partial d_3}$ verschiedener Wellenlängen eines vereinfachten Schichtmodells einer Dreifachschicht mit $n_1 = \text{const.} = 2,0$ und $d_2 = \text{const.} = 20\text{nm}$.

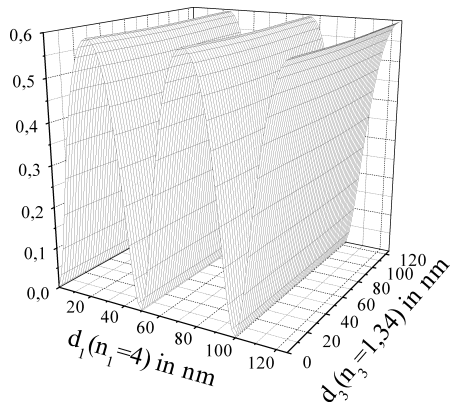
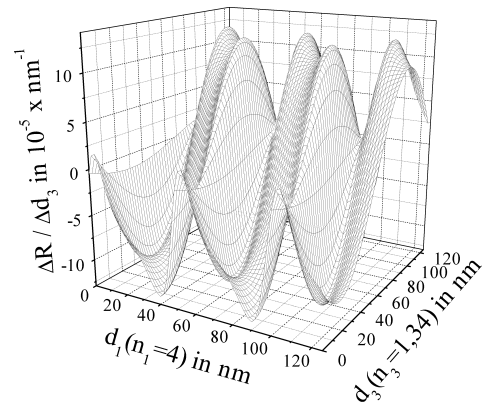
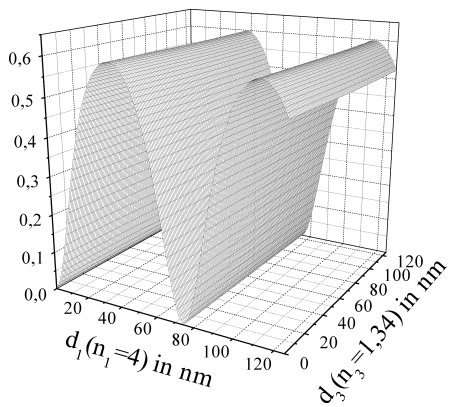
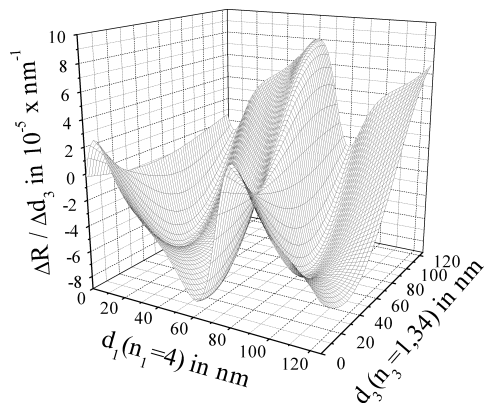
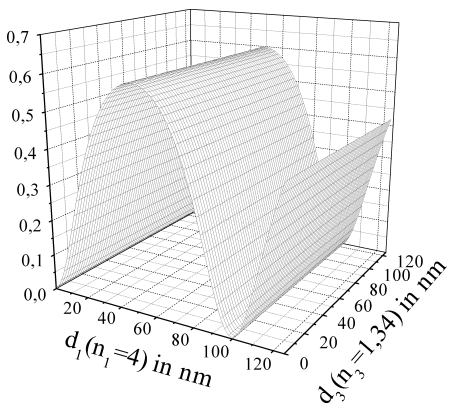
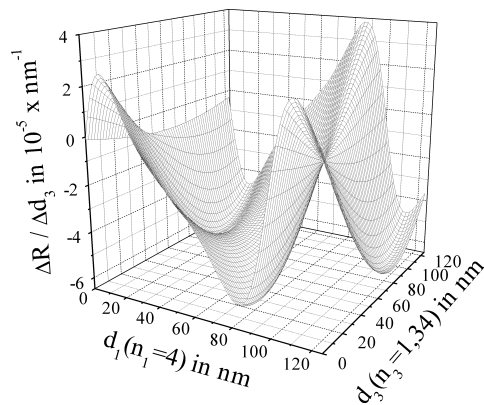
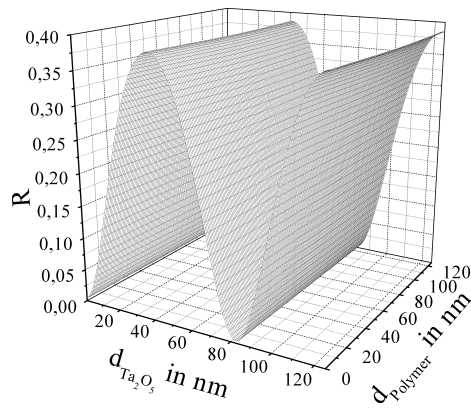
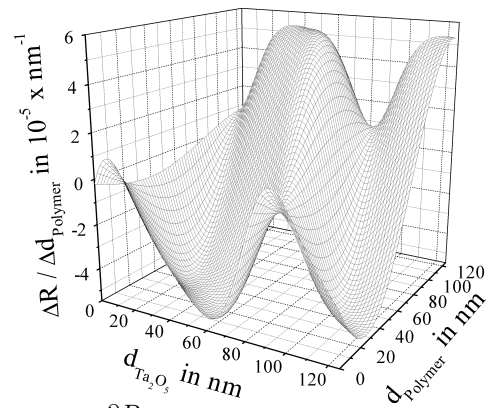
(a) R bei $\lambda = 400$ nm.(b) $\frac{\partial R}{\partial d_3}$ bei $\lambda = 400$ nm.(c) R bei $\lambda = 600$ nm.(d) $\frac{\partial R}{\partial d_3}$ bei $\lambda = 600$ nm.(e) R bei $\lambda = 800$ nm.(f) $\frac{\partial R}{\partial d_3}$ bei $\lambda = 800$ nm.

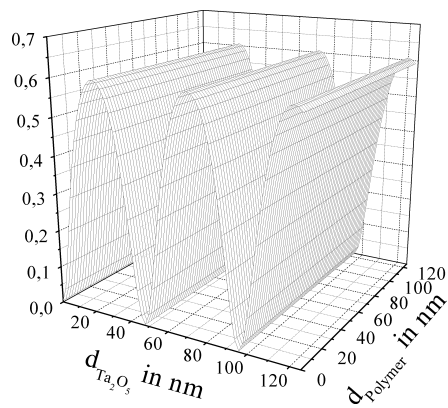
Abbildung 4.27.: Simulationen von R und $\frac{\partial R}{\partial d_3}$ verschiedener Wellenlängen eines vereinfachten Schichtmodells einer Dreifachschicht mit $n_1 = \text{const.} = 4,0$ und $d_2 = \text{const.} = 20$ nm.



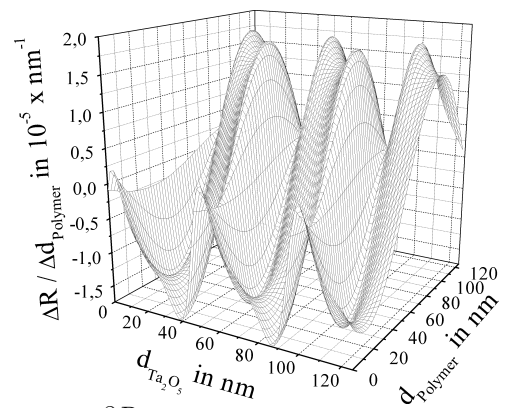
(a) R von Ta_2O_5 beschichtetem Glas bei $\lambda = 500$ nm.



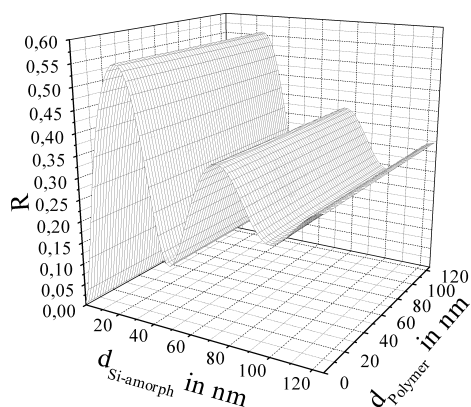
(b) $\frac{\partial R}{\partial d_{\text{Polymer}}}$ von Ta_2O_5 beschichtetem Glas bei $\lambda = 500$ nm.



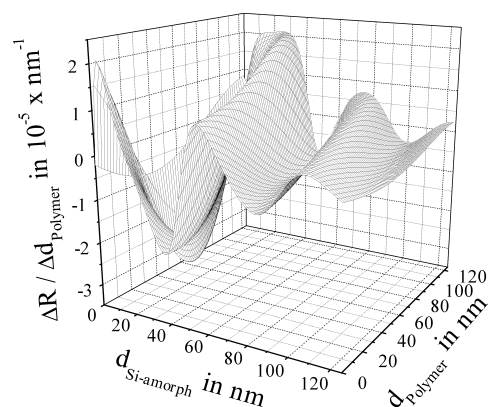
(c) R von Ta_2O_5 beschichtetem Glas bei $\lambda = 400$ nm.



(d) $\frac{\partial R}{\partial d_{\text{Polymer}}}$ von Ta_2O_5 beschichtetem Glas bei $\lambda = 400$ nm.



(e) R von mit amorphem Si beschichtetem Glas bei $\lambda = 500$ nm.



(f) $\frac{\partial R}{\partial d_{\text{Polymer}}}$ von mit amorphem Si beschichtetem Glas bei $\lambda = 500$ nm.

Abbildung 4.28.: Simulationen von R und $\frac{\partial R}{\partial d_{\text{Polymer}}}$ bei D263-Glas mit einer Ta_2O_5 -Schicht oder amorphem Silizium mit jeweils einer SiO_2 -Schicht konstanter Dicke (20 nm).

Schichtdicke von 20 nm. Die obersten beiden Graphen 4.28(a) und 4.28(b) zeigen R und $\partial R/\partial d_{\text{Polymer}}$ von Ta_2O_5 -beschichtetem Trägermaterial bei einer Wellenlänge von $\lambda = 500$ nm. Darunter (Abbildungen 4.28(c) und 4.28(d)) sind Simulationen desselben Trägers mit der Wellenlänge $\lambda = 400$ nm dargestellt. Man kann erkennen, daß bei diesem realen Schichtsystem die Signaldynamiken bei kleinem λ und großem n – im Gegensatz zum idealisierten Modell – nicht größer, sondern kleiner sind. Obwohl der Brechungsindex eines dielektrischen Materials bei kleinen Wellenlängen größer ist als bei größeren, bedeutet dies nicht unbedingt eine größere Signaldynamik bei kleinem λ . Grund dafür ist ein größeres n bei **allen** beteiligten Materialien bei kleinen Wellenlängen, deren Funktion $n(\lambda)$ jeweils spezifisch ist. Daraus resultieren dann auch unterschiedliche Verhältnisse zwischen den Brechungsindices der einzelnen Materialien. Man kann deshalb für den Realfall nicht einfach pauschalisieren wie im idealisierten vereinfachten Modell, sondern muß für die gegebenen Verhältnisse die beste Parameterkonfiguration jeweils neu bestimmen. Dabei ist in den dreidimensionalen Abbildungen der Signaldynamiken auch zu erkennen, daß es für die jeweiligen optischen Systeme unterschiedliche Parameterkonfigurationen mit ähnlich großen Signalhüben gibt. Bei einem mit amorphem Silizium vergüteten Träger ist bemerkenswert, daß aufgrund der mit dem hohen Brechungsindex verbundenen vorhandenen Absorption des Siliziums die Reflektivität insgesamt abnimmt, was natürlich auch Auswirkungen auf die Signaldynamik $\partial R/\partial d_{\text{Polymer}}$ des gesamten Systems hat (Abbildungen 4.28(e) und 4.28(f)). Die maximale Signaldynamik ist nicht annähernd so groß wie die des mit Ta_2O_5 beschichteten Trägermaterials. Ein Einsatz von sehr hochbrechenden Medien ist also wegen ihrer Absorption kaum lohnenswert. Zum besseren Überblick sind die relevanten Daten dieser Systeme in Tabelle 4.2 aufgelistet.

4.8. Potenzielle apparative Verbesserungen

Neben der angepaßten optischen Vergütung für eine Maximierung der Signaldynamik $\partial R/\partial d_{\text{Polymer}}$ könnte eine optimierte geometrische Anordnung in Kombination mit einer dafür angepaßten optischen Vergütung eine weitere Maximierung der Signaldynamik ergeben.

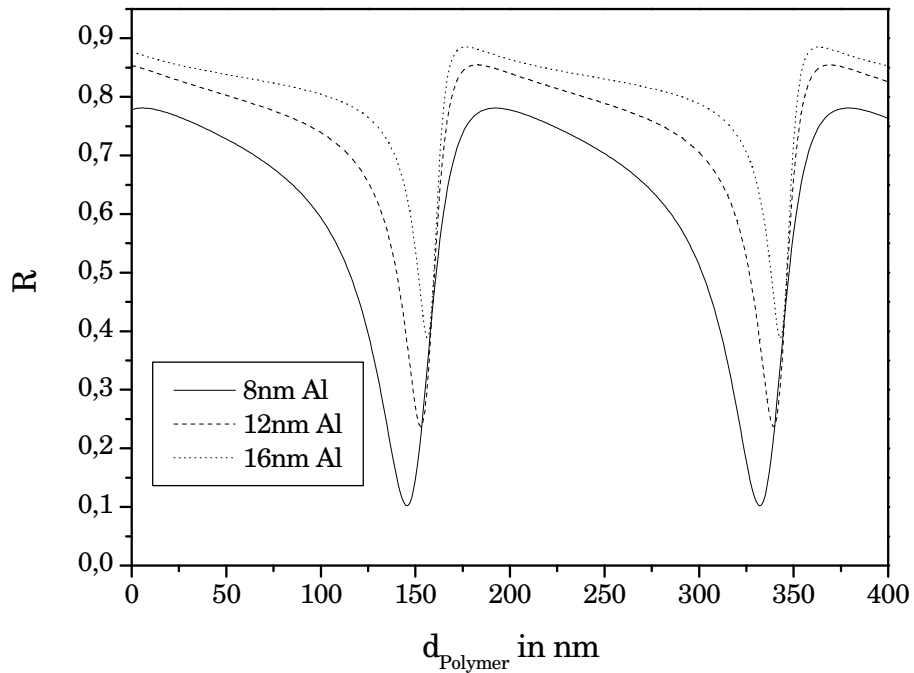
4.8.1. Die Signaldynamik beim Fabry-Perot-Interferometer

Ziel für solch eine reflektometrische Optimierung ist dabei die Annäherung an das bekannte Fabry-Perot-Interferometer [39], [56]. Ein optischer Fabry-Perot-Resona-

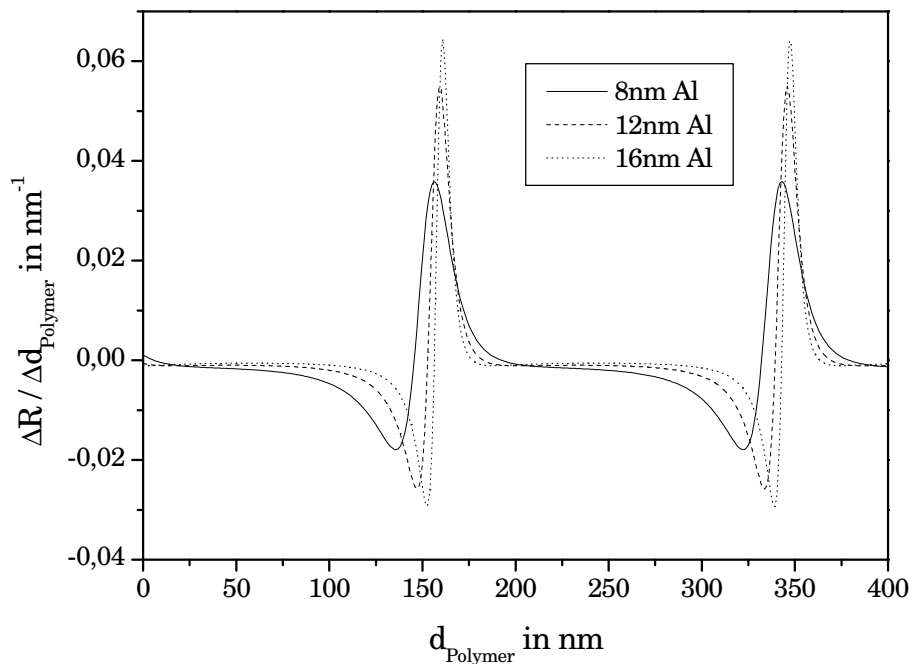
	Modell „n ₁ = 2“			Modell „n ₁ = 4“			Ta ₂ O ₅		Si
	400	600	800	400	600	800	400	500	
λ in nm	400	600	800	400	600	800	400	500	500
n ₀ ; k ₀	1,5; 0	1,5; 0	1,5; 0	1,5; 0	1,5; 0	1,5; 0	1,54; 0	1,53; 0	1,53; 0
n ₁ ; k ₁	2,0; 0	2,0; 0	2,0; 0	4,0; 0	4,0; 0	4,0; 0	4,14; 0	2,99; 0	4,98; 0,87
n ₂ ; k ₂	1,45; 0	1,45; 0	1,45; 0	1,45; 0	1,45; 0	1,45; 0	1,47; 0	1,46; 0	1,46; 0
n ₃ ; k ₃	1,34; 0	1,34; 0	1,34; 0	1,34; 0	1,34; 0	1,34; 0	1,34; 0	1,34; 0	1,34; 0
n ₄ ; k ₄	1,33; 0	1,33; 0	1,33; 0	1,33; 0	1,33; 0	1,33; 0	1,34; 0	1,33; 0	1,33; 0
d ₁ in nm	0 – 125	0 – 125	0 – 125	0 – 125	0 – 125	0 – 125	0 – 125	0 – 125	0 – 125
d ₂ in nm	20	20	20	20	20	20	20	20	20
d ₃ in nm	0 – 125	0 – 125	0 – 125	0 – 125	0 – 125	0 – 125	0 – 125	0 – 125	0 – 125
$\left \frac{\partial R}{\partial d_3} \right _{\max}$ in 10 ⁻⁵ · nm ⁻¹	9,05	6,12	4,61	12,13	8,09	6,07	1,74	5,37	3,47

Tabelle 4.2.: Maximale Signalhöhe bei vereinfachten idealisierten und realen Systemen zum Vergleich. Bei realen Schichtsystemen gilt der Vorteil kleinerer Wellenlängen und größerer Brechungsindices der optischen Zwischenschicht in Bezug auf die Signaldynamik nicht mehr unbedingt.

tor besteht aus zwei parallelen, reflektierenden, ebenen Spiegelflächen. Ein einfallender Lichtstrahl wird durch Vielfachreflexion an den Spiegelflächen in eine große Zahl von Einzelstrahlen mit konstantem Gangunterschied und abnehmender Intensität aufgespalten. Bei Überlagerung der einzelnen Lichtwellenbündel entstehen Intensitätsmaxima und -minima. Auf diese Weise entsteht bei Einsatz von Weißlicht ein spezifisches Interferenzspektrum, das charakteristisch für die Geometrie, die eingesetzten Materialien und den augenblicklichen Resonatorzustand ist. Der optische Unterschied zwischen einem Fabry-Perot-Interferometer und dem RIFS-System besteht also in den viel größeren Reflexionskoeffizienten durch die Metallschichten an den Grenzflächen beim Fabry-Perot-Resonator. Ansonsten ist der theoretische Hintergrund gleich. Wäre es experimentell möglich, eine Bioschicht so zwischen zwei dünne reflektierende Metallschichten zu bringen, daß einerseits Vielfachreflexionen wie beim Fabry-Perot-Interferometer, andererseits aber auch Schichtdickenänderungen des Biopolymers zwischen den beiden Metallschichten realisierbar wären, wäre die Anordnung stark verbessert. Zur Veranschaulichung der Signaldynamik einer Fabry-Perot-Anordnung bei einer Wellenlänge sind in Abbildung 4.29 die Reflektivitäten und deren partielle Ableitungen nach der Dicke des Polymers eines fiktiven Aufbaus simuliert. Zwar wurde wieder ein Dreischichtsystem wie in Abbildung 4.25 angenommen, jedoch sind mit n_0 und n_4 dieses Mal zwei Glasträger angenommen, auf die jeweils eine Aluminiumschicht aufgebracht wurde mit den Dicken 8 nm, 12 nm und 16 nm sowie dem Brechungsindex $n_1 = n_3 = n_{\text{Aluminium}}$. Als Biopolymer fungiert jetzt Schicht 2 mit $n_2 = 1,34$ und variabler Schichtdicke $d_2 = d_{\text{Polymer}}$. Man errechnet eine Signaldynamik, die im Gegensatz zu den bisherigen Simulationen der maximalen Signaldynamik tatsächlich gemessener Systeme (bei Goethe-Glas war die errechnete maximale Signaldynamik $\frac{\partial R}{\partial d_{\text{Polymer}}} = 5,35 \cdot 10^{-5}$) um drei Größenordnungen höher ist. Anschaulich ist dies so zu verstehen, daß bei dieser fiktiven Versuchsanordnung durch die verspiegelten Flächen zwischen dem Biopolymer die reflektierten Wellen höherer Ordnung nicht klein, sondern eine bedeutende Größe haben. Dadurch ergibt sich eine viel stärkere Interaktion des Lichts mit der selektiven Bioschicht. Die etwas unschöne Form der Reflektivitätskurve, die von der Airy-Formel (siehe unter anderem [39]) abweicht, rührt von der Absorption des Aluminiums her. Setzt man den Absorptionskoeffizienten in der Simulation gleich Null, so verschwindet diese Asymmetrie, man benötigt dann allerdings erheblich dickere Schichten, um ein vergleichbares Reflektivitätsverhalten zu erreichen (der Effekt, daß dünne absorbierende Schichten sich bezüglich der Reflektivität bis auf die Phase wie hochbrechende dielektrische Materialien verhalten, ist z.B. in [41] beschrieben).



(a) Simulierte Reflektivitäten einer Fabry-Perot-Anordnung mit unterschiedlichen Aluminiumschichtdicken.

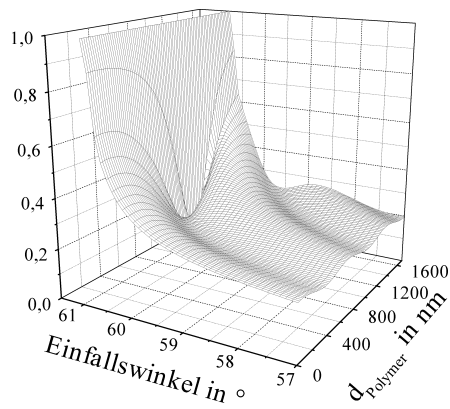
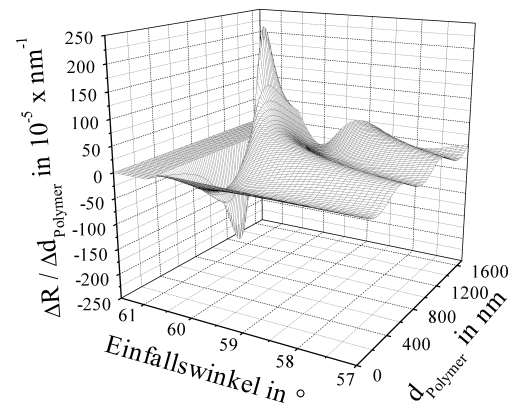


(b) Simulierte Signaldynamiken $\frac{\partial R}{\partial d_{\text{Polymer}}}$ verschiedener Aluminiumschichtdicken einer Fabry-Perot-Anordnung.

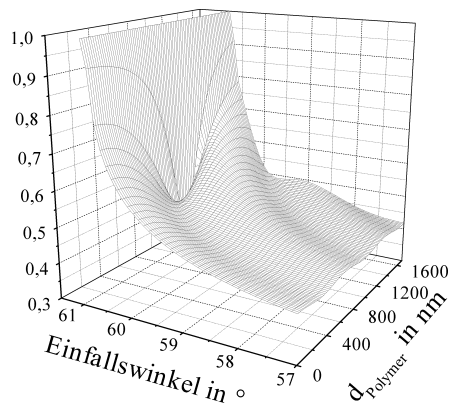
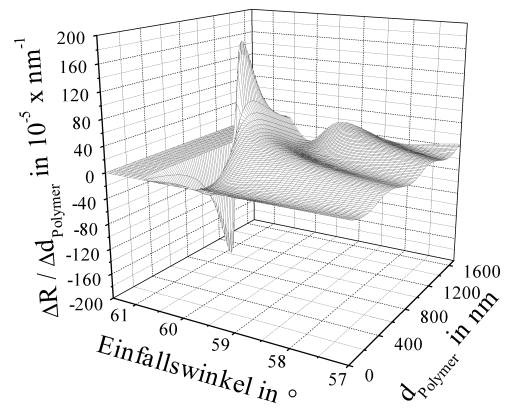
Abbildung 4.29.: Untersuchungen einer Fabry-Perot-Anordnung hinsichtlich ihrer theoretischen Signaldynamik.

4.8.2. Erhöhte Signaldynamik durch optimierten Einfallswinkel

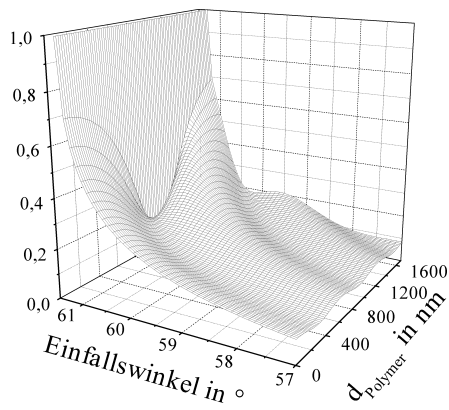
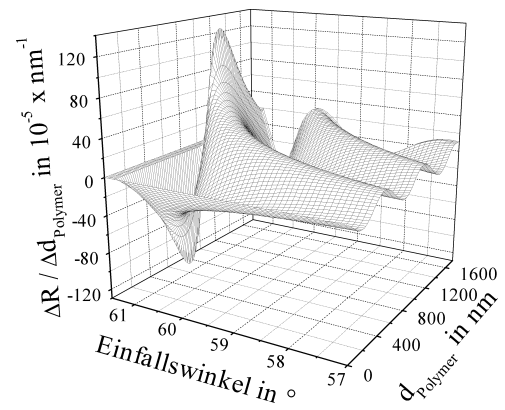
Die Rechnungen am vorangegangenen, so nicht realisierbaren Modell sind eine Motivation, die Winkelabhängigkeit der Signaldynamik bezüglich des Einfallswinkels des Lichts auch am hier benutzten Meßsystem wenigstens theoretisch zu untersuchen. Durch den geringen Brechungsindexunterschied an der Grenzfläche Biopolymer/Umgebungsmedium (weshalb bei dieser Konfiguration des Meßaufbaus die Signaldynamik eines Fabry-Perot-Interferometers auch nicht erreicht werden kann) kann eine größere Reflexion an dieser Grenzschicht nur durch einen schrägen Einfallswinkel erreicht werden. Im Zusammenhang mit dem jeweiligen verwendeten Trägermaterial müßte dann auch ein optimaler Einstrahlwinkel für maximale Signaldynamik existieren. In Abbildung 4.30 sind jeweils R und $\frac{\partial R}{\partial d_{\text{polymer}}}$ von Interferenzglas, Goethe-Glas und unbeschichtetem BK7-Glas mit veränderlichem Einfallswinkel zu sehen. Zum besseren Vergleich werden Simulationen an den gleichen Trägersystemen durchgeführt, die in den vorangegangenen Abschnitten benutzt wurden. Zu sehen ist bei allen drei Trägern ein ähnliches Reflexionsverhalten. Auch die maximalen Signalhübe sind relativ ähnlich und die Unterschiede betragen hier zwischen Interferenzglas, das jetzt bei schrägem Lichteinfall die größte maximale Signaldynamik aufweist, und BK7-Glas nur ungefähr einen Faktor 2. Die Tatsache, daß die größten Signalhübe erst bei einer Polymer-schichtdicke von ein paar hundert Nanometern erwartet werden würden, könnte man experimentell durch eine größere SiO_2 -Schichtdicke als additive Größe zum Biopolymer kompensieren. Zu sehen ist bei allen Graphen, daß der optimale Einfallswinkel jeweils kurz vor dem Grenzwinkel zur Totalreflexion liegt. Zudem ist die Toleranz für die Dicke des Biopolymers um in diesen maximalen Signalhub zu kommen, relativ klein. Gelänge es dennoch, diese Größen für einen geeigneten Träger experimentell optimal einzustellen, könnte der Signalhub theoretisch um ungefähr anderthalb Größenordnungen verbessert werden. Dazu wären allerdings relativ genaue Kenntnisse aller beteiligten Materialien, auch des Biopolymers, notwendig oder man müßte experimentell die optimalen Parameter herausfinden.

(a) R von Interferenzglas.

(b) Signaldynamik von Interferenzglas.

(c) R von Goethe-Glas.

(d) Signaldynamik von Goethe-Glas.

(e) R von BK7-Glas.

(f) Signaldynamik von BK7-Glas.

Abbildung 4.30.: Theoretische Untersuchungen zum Einfluß des Einfallswinkels auf Reflektivität und Signaldynamik von Interferenz-, Goethe- und BK7-Glas bei $\lambda = 500$ nm.

Teil II.

Integriert optische Biosensoren

5. Grundlagen der Sensorik mit Evaneszenzfeldern

5.1. Strahlenoptische Einführung

5.1.1. Verhalten von Licht bei Totalreflexion

Um ein Modell für die Lichtausbreitung im Wellenleiter zu erhalten, betrachtet man zunächst die Reflexion und Brechung von Licht an der Grenzfläche zweier isotroper, linearer dielektrischer Medien. Beschrieben wird dieses Verhalten durch das Snelliussche Brechungsgesetz, den Fresnel-Gleichungen für Reflexions- und Transmissionkoeffizienten und den Ausdrücken für die Phasenverschiebungen bei Reflexion aus Kapitel 2. Für optische Medien vereinfacht sich darüberhinaus die Maxwellrelation $n = \sqrt{\varepsilon_r \mu_r}$ (n = Brechungsindex, ε_r = relative elektrische Permeabilität, μ_r = relative magnetische Permeabilität zu $n = \sqrt{\varepsilon_r}$, da für diese $\mu_r = 1$ gilt [57]). Trifft ein Lichtstrahl auf die Grenzschicht zweier optischer Medien mit den Brechungsindices n_i und n_t , so gilt für die Reflexion Gleichung 2.11 und für die Brechung das Gesetz von Snellius (Gleichung 2.10). Für den Durchgang des Strahls vom optisch dünneren ins optisch dichtere Medium wird der gebrochene Strahl zum Lot hin, im umgekehrten Fall vom Lot weg gebrochen. Ab einem Winkel $\theta_t \geq 90^\circ$ tritt der Strahl nicht mehr ins angrenzende Medium, sondern wird ins Medium n_i zurückreflektiert, man spricht von Totalreflexion. Wie aus Gleichung 2.10 abzulesen ist, tritt dieser Fall ein für

$$\sin \theta_i \geq \frac{n_t}{n_i} = \sin \theta_G. \quad (5.1)$$

θ_G wird Grenzwinkel der Totalreflexion bezeichnet. Genau dies ist das Prinzip des Wellenleiters (siehe Abbildung 5.1). Ein Bereich mit Brechungsindex n_1 wird umgeben von einem Bereich niedrigerer Indices n_0 und n_2 . Wird nun Licht unter der Bedingung $\theta_1 > \theta_G$ ins Medium n_1 gekoppelt, ist es dort gefangen und wird geführt solange obige Bedingung erfüllt bleibt. Als Bedingung an den Einkoppelwinkel θ_0

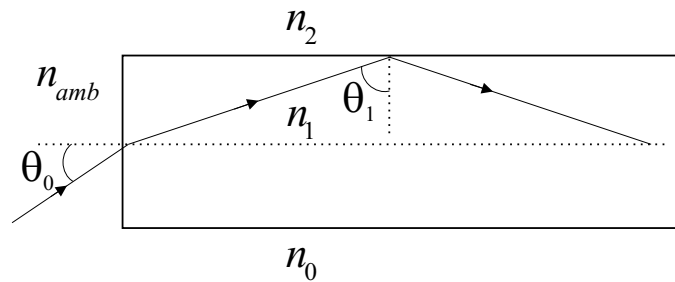


Abbildung 5.1.: Einkoppelbedingung für einen Wellenleiter.

aus dem Umgebungsmedium n_{amb} in den Wellenleiter ergibt sich aus den Gleichungen 2.10 und 5.1 für einen symmetrischen Wellenleiter ($n_0 = n_2$)

$$\theta_0 \leq \arcsin \left(\frac{\sqrt{n_1^2 - n_0^2}}{n_{amb}} \right). \quad (5.2)$$

Den Sinus dieses Akzeptanzwinkels nennt man die numerische Apertur:

$$NA = \sin \theta_0 = \left(\frac{\sqrt{n_1^2 - n_0^2}}{n_{amb}} \right). \quad (5.3)$$

Je größer der Brechungsindexunterschied zwischen Kern n_1 und Mantel n_0 ist, desto größer ist der Akzeptanzwinkel bzw. die numerische Apertur und desto einfacher kann die Lichteinkopplung erfolgen.

Wie später noch eingehender betrachtet wird, werden an den Grenzflächen Bedingungen an das \vec{E} - und \vec{H} -Feld gestellt, die dafür verantwortlich sind, daß die Felder bei Totalreflexion nicht abrupt auf Null abfallen, sondern mit einem Exponentialgesetz ins dünnere Medium hinein abklingen [58]. Dies führt darüberhinaus zu einer lateralen Verschiebung der reflektierten Welle (Goos Hänchen Verschiebung). Der Exponentialfaktor, mit dem die Amplitude ins optisch dünnere Medium abfällt, lautet

$$\exp \left(-k_0 n_1 \cdot \frac{\sqrt{\sin^2 \theta_1 - \sin^2 \theta_g}}{\sin \theta_g} x \right) \quad (5.4)$$

und hängt über θ_1 vom Polarisationszustand ab. Im strahlenoptischen Bild erscheint die Grenzschicht wegen des Eindringens des Feldes in die umgebende Schicht verbreitert und man spricht von der effektiven Dicke d_{eff} der Grenzschicht. In Abbildung 5.2 ist dies bildlich dargestellt. Das Evaneszenzfeld trägt außerdem Lichtleistung, die im Umgebungsmedium geführt wird. Der Einfluß des Umge-

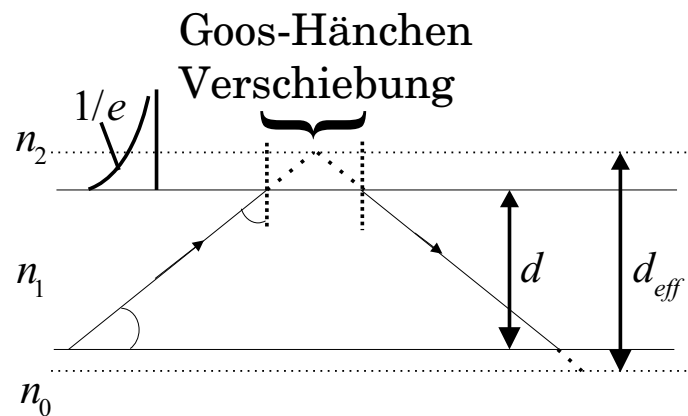


Abbildung 5.2.: Goos-Hänchen Verschiebung und effektive Dicke in einem Wellenleiter.

Die Phasenverschiebung bei Totalreflexion ist die Grundlage von Evaneszenzfeldsensoren und man ist bestrebt, diesen Leistungsanteil zu optimieren, um den Einfluß von außen auf die Lichtführung zu maximieren.

Abhängig von den Brechungsindexverhältnissen und dem Einfallswinkel tritt an der Grenzschicht eine polarisationsabhängige Phasenverschiebung des totalreflektierten Strahls auf [58]. Es gilt

$$\tan \frac{\Phi}{2} = \left(-\frac{\sqrt{\sin^2 \theta_1 - \sin^2 \theta_G}}{\cos \theta_1} \right) \quad (5.5a)$$

für senkrecht zur Einfallsebene polarisiertes Licht (s, TE, \perp) und

$$\tan \frac{\Phi}{2} = \left(-\frac{\sqrt{\sin^2 \theta_1 - \sin^2 \theta_G}}{\sin^2 \theta_G \cos \theta_1} \right) \quad (5.5b)$$

für parallel zur Einfallsebene polarisiertes Licht (p, TM, \parallel). Die beiden vorangegangenen Ausdrücke lassen sich aus den Fresnelschen Gleichungen 2.13 für den Spezialfall der Totalreflexion ableiten [41]. Diese unterschiedliche Phasenverschiebung der orthogonalen Feldkomponenten führt dazu, daß bei Totalreflexion linear polarisiertes Licht in elliptisch polarisiertes Licht überführt wird, wenn seine Schwingungsebene nicht gerade senkrecht oder parallel zur Einfallsebene steht.

5.1.2. Der Schichtwellenleiter im geometrischen Modell

Einer der einfachsten Wellenleitertypen ist der planare Schichtwellenleiter. Die Lichtausbreitung wird häufig dargestellt aus einer Mischung des anschaulichen

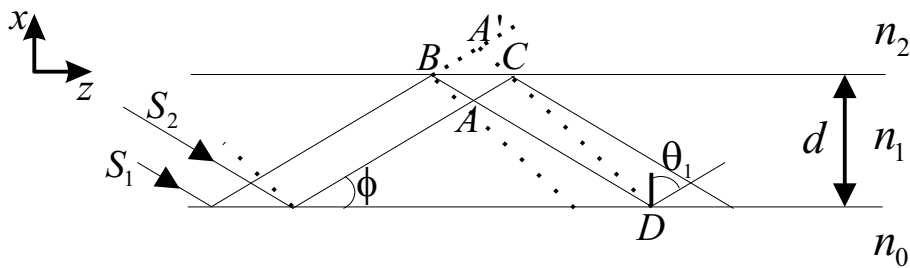


Abbildung 5.3.: Führung eines optischen Bündels in einer höherbrechenden Schicht infolge Totalreflexion.

strahlenoptischen Modells, in dem das Licht sich auf „Zick-Zack-Kurs“ im Wellenleiter ausbreitet und dem wellenoptischen Modell, das die physikalischen Gesetzmäßigkeiten mit Hilfe der Maxwellgleichungen beschreibt. Wie oben schon erwähnt, ist dabei nur Licht ausbreitungsfähig, wenn einerseits die Bedingungen der Totalreflexion gegeben sind und andererseits sich ein stationäres Intensitätsmuster, bestehend aus einer oder mehreren Moden, ausbilden kann. Die zweite Bedingung stellt eine Anforderung an die Phasenlage des Strahls. Die Strahlen müssen sich nach zweimaliger Reflexion an den Grenzschichten phasenrichtig zu einem ganzzahligen Vielfachen von 2π addieren um konstruktiv zu interferieren. Wie in Abbildung 5.3 skizziert, besitzen Strahl S_1 und S_2 in den Punkten A und B sowie in C und D gleiche Phase (sie liegen auf der gleichen Phasenfront), sind dorthin aber unterschiedliche Weglängen gelaufen. Der optische Wegunterschied beträgt

$$\overline{BA'} = 2d \cos \theta_1 = 2d \sin \phi, \quad (5.6)$$

was eine geometrische Phasendifferenz von

$$\delta_{Geom} = \frac{2\pi n_1}{\lambda} 2d \sin \phi \quad (5.7)$$

hervorrufen. Zusätzlich treten bei der Totalreflexion an den Grenzflächen noch die Phasensprünge aus Gleichung 5.5a und 5.5b auf. Die Bedingung für die Ausbreitungsfähigkeit einer Mode ergibt sich dann aus der Lösung der folgenden transzendenten sogenannten Modengleichung:

$$\delta_{Geom} + \Phi_{1,0} + \Phi_{1,2} = 2m \cdot \pi, \quad (5.8)$$

wobei $m \in \mathbb{N}_0$ die Anzahl der Knoten der Feldverteilung im Wellenleiter wiedergibt und zur Numerierung der Mode verwendet wird. $\Phi_{1,0}$ und $\Phi_{1,2}$ sind die Phasen-

verschiebungen an der jeweiligen dielektrischen Grenzschicht. Sie sind für s- und p-polarisiertes Licht jeweils verschieden (siehe Gleichungen 5.5a und 5.5b). Für jedes m wird also nach Lösungen θ_1 gesucht, die wegen der verschiedenen Ausdrücke für die Phasenschiebungen für die TE- und TM-Mode verschieden sein werden. Geschlossene Lösungen existieren nicht und müssen numerisch gefunden werden. Gleichung 5.8 gilt in dieser Form außerdem nur für Schichtwellenleiter und ist im allgemeinen schwierig anzuwenden auf Streifenwellenleiter mit Gradientenprofilen oder auf Wellenleiter mit diffundierten Brechungsindexprofilen, bei denen es keine definierte Grenzschicht zwischen Kernbereich und Substrat gibt. Wellenleiter, für die nur eine Lösung für ein m (bei gegebener Wellenlänge) pro Polarisationszustand existiert, heißen monomodig. Die längste Wellenlänge die geführt werden kann, bezeichnet man als cutoff Wellenlänge.

5.1.3. Phasenausbreitungskonstante und effektiver Brechungsindex

Die Ausbreitung der Moden wird zumeist durch die Wellenzahl oder Phasenausbreitungskonstante in z-Richtung β charakterisiert:

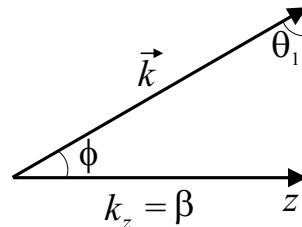


Abbildung 5.4.: Skizze zur Definition der Phasenausbreitungskonstante.

$$\beta = k_z = k_1 \sin \theta_1 = k_1 \cos \phi = k_0 n_1 \cos \phi = k_0 N \quad (5.9)$$

k_0 ist die Wellenzahl im Vakuum. Der Wert für β liegt zwischen dem der Ausbreitungskonstanten für die reinen unendlich ausgedehnten Umgebungsmedien k_{z0} und k_{z2} und dem Kernmedium k_{z1} . Es gilt die Ungleichung

$$k_{z0}, k_{z2} \leq \beta \leq k_{z1} \quad (5.10)$$

Gleichheit wird nur dann erreicht, wenn Kern- und Umgebungsmedium den gleichen Wert erreichen, der wellenleitende Charakter geht dann verloren und das

Licht kann sich frei ausbreiten. Gleichung 5.9 stellt die Definitionsgleichung für den effektiven Brechungsindex N dar. Er ist definiert als das Verhältnis der Ausbreitungskonstanten β der Mode im Medium zur Vakuumsausbreitungskonstanten k_0 . Er ist genauso wie die Ausbreitungskonstante für jede Mode unterschiedlich. Einflußfaktoren sind neben äußeren Parametern wie Temperatur, Druck und Lichtwellenlänge die Brechungsindexverhältnisse im und um den Wellenleiter sowie die geometrischen Abmessungen des Wellenleiters. Die Modengleichung 5.8 läßt sich mit Hilfe der Gleichungen 5.5a, 5.5b, 5.7 und 5.9 zu

$$dk_0\sqrt{n_1^2 - N^2} - \arctan\left(\frac{N^2 - n_0^2}{n_1^2 - N^2}\right)^{\frac{1}{2}} - \arctan\left(\frac{N^2 - n_2^2}{n_1^2 - N^2}\right)^{\frac{1}{2}} = m \cdot \pi \quad (5.11)$$

umformulieren. Mit den Abkürzungen

$$k_{z,1} = k_0\sqrt{n_1^2 - N^2} \quad (5.12a)$$

für die wellenleitende Schicht und

$$k_{z,0} = k_0\sqrt{N^2 - n_0^2} \quad (5.12b)$$

$$k_{z,2} = k_0\sqrt{N^2 - n_2^2} \quad (5.12c)$$

für die Schichten mit Evaneszentfeldanteil kommt man schließlich nach einigen Umformungen auf [58]:

$$\tan(k_{z,1}d - m\pi) = \frac{k_{z,1}(k_{z,0} + k_{z,2})}{k_{z,1}^2 - k_{z,0}k_{z,2}} \quad (5.13)$$

Gleichung 5.13 ist eine Bestimmungsgleichung für N bzw. β und hat nur diskrete Lösungen, zu denen die jeweiligen Wellenleitermoden gehören.

5.1.4. Grenzen des strahlenoptischen Modells

Für das strahlenoptische Modell wird angenommen, daß sich Licht im Wellenleiter in ebenen Wellen ausbreitet. Diese Annahme setzt voraus, daß die Dicke der wellenführenden Schicht viel größer ist als die Wellenlänge: $d_1 \gg \lambda$. Dies ist bei unseren integriert optischen Sensoren nicht der Fall. Wir müssen also Korrekturen dieses Modells erwarten. Dennoch ist das Modell es wert betrachtet zu werden, da es sehr anschaulich ist und man neue Größen wie z.B. die Phasenausbreitungskonstante verständlich einführen kann.

5.2. Die elektromagnetische Theorie des Wellenleiters

Die strahlenoptische Behandlung des Wellenleiter ist anschaulich in der Interpretation. In der Praxis gelangt man aber schnell an die Grenzen der Anwendbarkeit dieses geometrischen Modells, wenn z.B. nichtkonstante Gradientenprofile vorliegen und das geführte Licht gekrümmte Bahnen beschreibt. Geometrische Phasenunterschiede und Phasensprünge sind nicht oder nur schwer bestimmbar, die Gleichung 5.8 ist in dieser einfachen Form nicht mehr anwendbar. Die physikalisch korrekte und allgemeine Behandlung realer Wellenleiter ist im wellenoptischen Modell auszuführen, dessen Grundlage die Maxwellgleichungen sind. Lösungen werden in der Regel durch numerische Verfahren gesucht, die zum Teil eng auf bestimmte Problemstellungen zugeschnitten sind. Im nachfolgenden wird der allgemeine Ansatz für die wellenoptische Behandlung dargelegt.

5.2.1. Die Maxwellgleichungen für Lichtwellenleiter

Die Maxwellgleichungen in ihrer allgemeinen Form wurden schon in Gleichung 2.1 beschrieben. Für die Herleitung der Wellengleichung für Lichtleiter nehmen wir folgende Vereinfachungen an [58]:

- Die Medien sind isotrop: $\tilde{\epsilon}(\vec{r}, t) \Rightarrow \epsilon = \epsilon_0 n^2$, $\tilde{\mu}(\vec{r}, t) \Rightarrow \mu$.
- Die Materialien sind diamagnetisch: $\mu = \mu_0$.
- Es gibt keine freien Ladungsträger: $\rho = 0$.
- Die Medien sind elektrische Isolatoren: $\sigma = 0$.

Dadurch nehmen die Maxwell-Gleichungen die folgende Gestalt an:

$$\vec{\nabla} \times \vec{E}(\vec{r}, t) = -\mu_0 \frac{\partial \vec{H}(\vec{r}, t)}{\partial t} \quad (5.14a)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{H}(\vec{r}, t) = \epsilon_0 \frac{\partial \left(n^2(\vec{r}) \vec{E}(\vec{r}, t) \right)}{\partial t} \quad (5.14b)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \left(n^2(\vec{r}) \vec{E}(\vec{r}, t) \right) = 0 \quad (5.14c)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{H}(\vec{r}, t) = 0 \quad (5.14d)$$

Wendet man außerdem auf Gleichung 5.14a die Rotation an, erhält man mit Hilfe von Gleichung 5.14b

$$\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E}(\vec{r}, t)) = -\mu_0 \vec{\nabla} \times \frac{\partial \vec{H}(\vec{r}, t)}{\partial t} = -\mu_0 \epsilon_0 n^2(\vec{r}) \frac{\partial^2 \vec{E}(\vec{r}, t)}{\partial t^2}. \quad (5.15)$$

Mit der Vektoridentität

$$\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{A}) = \vec{\nabla} (\vec{\nabla} \cdot \vec{A}) - \Delta \vec{A} \quad \text{mit } \vec{A} \text{ als beliebigem Vektor} \quad (5.16)$$

und Gleichung 5.14c folgt dann aus Gleichung 5.15

$$\Delta \vec{E}(\vec{r}, t) + \vec{\nabla} \left(\frac{\vec{E}(\vec{r}, t) \cdot \vec{\nabla} n^2(\vec{r})}{n^2(\vec{r})} \right) + k^2 n^2(\vec{r}) \vec{E}(\vec{r}, t) = 0. \quad (5.17)$$

Gleichung 5.17 ist die vektorielle Wellengleichung für das elektrische Feld in einem Wellenleiter. Um die entsprechende vektorielle Wellengleichung für das magnetische Feld zu erhalten, geht man ganz analog vor. Die Rotation auf Gleichung 5.14b angewandt, ergibt unter Verwendung von Gleichungen 5.14d und 5.16

$$\Delta \vec{H}(\vec{r}, t) + \frac{1}{n^2(\vec{r})} (\vec{\nabla} n^2(\vec{r})) \times (\vec{\nabla} \times \vec{H}(\vec{r}, t)) + k^2 n^2(\vec{r}) \vec{H}(\vec{r}, t) = 0. \quad (5.18)$$

Mit den oben ausgeführten Annahmen kann man also die Bedingungen für das \vec{E} - und \vec{H} -Feld entkoppeln, die Lösungen sind allerdings nicht unabhängig voneinander. Wenn man eine Lösung für einen Feldvektor erhalten hat, berechnet man den anderen über die Maxwell-Gleichungen.

5.2.2. Grenzflächenbedingungen

Für elektromagnetische Felder gelten beim Übergang eines Medium 1 in ein Medium 2 allgemein gültige Bedingungen. In unserem Fall von homogenen isotropen Medien ohne Raumladungen lauten die Bedingungen:

$$E_{t,1} = E_{t,2} \quad (5.19a)$$

$$\epsilon_1 E_{n,1} = \epsilon_2 E_{n,2} \quad (5.19b)$$

$$H_{t,1} = H_{t,2} \quad (5.19c)$$

$$\mu_1 H_{n,1} = \mu_2 H_{n,2}. \quad (5.19d)$$

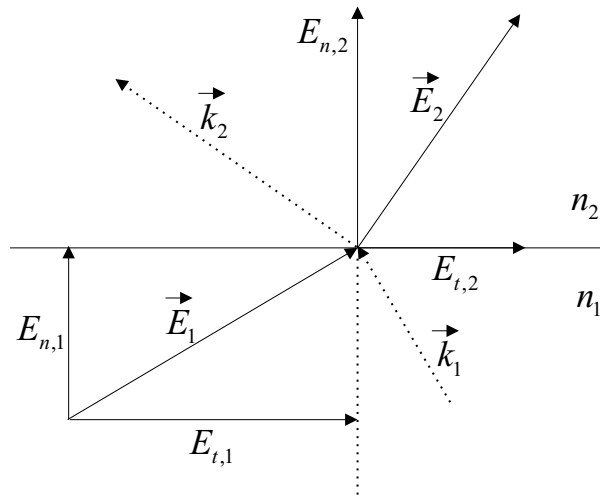


Abbildung 5.5.: Grenzflächenverhalten des elektrischen Feldes an einer dielektrischen Grenzschicht.

Dabei stehen die Indizes t und n für die Tangential- bzw. die Normalkomponente des jeweiligen Feldes in Bezug auf die Grenzfläche. Die Verhältnisse sind in Abbildung 5.5 für das E -Feld nochmals verdeutlicht. Die Ausbreitungsrichtung \vec{k} des Lichtstrahls ist gestrichelt eingezeichnet.

5.2.3. Der Schichtwellenleiter im wellenoptischen Bild

Ein einfacher Schichtwellenleiter besteht z.B. aus einer schichtförmigen Anordnung von drei verlustfreien Medien unterschiedlicher Brechzahl, bei denen sich der Brechungsindex nur in einer Richtung ändert ($n(\vec{r}) = n(x)$). Wegen der Translationssymmetrie in y -Richtung gilt $\frac{\partial}{\partial y} = 0$. Das Licht wird dabei nur in z -Richtung geführt. In den einzelnen Medien ist zudem $\nabla n^2(x) = 0$. Wir setzen nun für die Zeitabhängigkeit der Feldstärken $e^{i\omega t}$ und nutzen die Ausbreitung des Lichts in z -Richtung aus:

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}(x, y) \cdot e^{i(\omega t - \beta z)} \quad (5.20a)$$

$$\vec{H}(\vec{r}, t) = \vec{H}(x, y) \cdot e^{i(\omega t - \beta z)} \quad (5.20b)$$

$\beta = k_0 N$ ist wieder die Phasenausbreitungskonstante in z -Richtung. Die Annahme der obigen Zeitabhängigkeit bedeutet keine Einschränkung, da das Superpositionsprinzip für alle linearen optischen Effekte gilt und damit andere Zeitabhängigkeiten über eine Fourierzerlegung nach unterschiedlichen ω_j in gleicher Weise behandelt werden können. Mit der Zeitabhängigkeit der Feldstärken aus Gleichung

5.20 lassen sich die Gleichungen 5.14a und 5.14b zu

$$\vec{\nabla} \times \vec{E}(\vec{r}) = -i\omega\mu_0\vec{H}(\vec{r}) \quad (5.21a)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{H}(\vec{r}) = i\omega\epsilon_0 n^2(\vec{r})\vec{E}(\vec{r}) \quad (5.21b)$$

umformen [58], [59]. Bei einem planaren Schichtwellenleiter unterscheidet man zwischen elektromagnetischen Wellen mit keiner longitudinalen elektrischen (TE) Komponente in z-Richtung ($E_z = 0$) und keiner longitudinalen magnetischen (TM) Komponente in z-Richtung ($H_z = 0$).

Die Wellengleichung für die TE-Mode

Mit $E_z = 0$ und der Translationssymmetrie $\frac{\partial}{\partial y} = 0$ folgt aus den Gleichungen 5.21 $E_x = E_z = H_y = 0$ die Wellengleichung für E_y :

$$\frac{\partial^2 E_y}{\partial x^2} + (k^2 n^2 - \beta^2) E_y = 0 \quad (5.22)$$

Die Wellengleichung für die TM-Mode

Analog folgt mit $H_z = 0$ und der Translationssymmetrie aus den Gleichungen 5.21 $E_y = H_x = H_z = 0$ die Wellengleichung für H_y :

$$\frac{\partial^2 H_y}{\partial x^2} + (k^2 n^2 - \beta^2) H_y = 0 \quad (5.23)$$

Bemerkenswert für diesen Spezialfall ist die mögliche Separierung der vektoriel- len Feldgleichungen in zwei skalare Wellengleichungen. Aus der Kenntnis je einer Komponente E_y , bzw. H_y aus den skalaren Wellengleichungen lassen sich die ande- ren via Maxwellgleichungen bestimmen. Diese Zerlegung ist nur für ganz wenige Wellenleiterstrukturen möglich, wie hier für den Schichtleiter oder auch für span- nungsfreie Glasfasern mit kreisrundem Querschnitt. Im ersten Fall ist die Bezeich- nung der entsprechenden Moden als TE- oder TM-Mode üblich, im zweiten sind es LP-Moden. Sie werden auch als skalare Moden bezeichnet¹. Die Wellengleichungen können ebenso als Eigenwertgleichungen interpretiert werden. Es existieren nur bestimmte Eigenwerte β , deren Eigenfunktionen einer Mode entsprechen. Für den

¹Im allgemeinen Fall werden die orthogonalen Grundmoden hybrid sein, d.h. E- und H-Feld lassen sich nicht mehr in obiger Weise separieren. Dadurch ist eine andere Nomenklatur der Moden nötig. Allerdings ist der Sprachgebrauch selbst in Veröffentlichungen etwas lax, und es wird auch bei Streifenwellenleitern schlicht von TE- und TM-Moden gesprochen (und entsprechend gerechnet). Es soll hier daran angeschlossen werden.

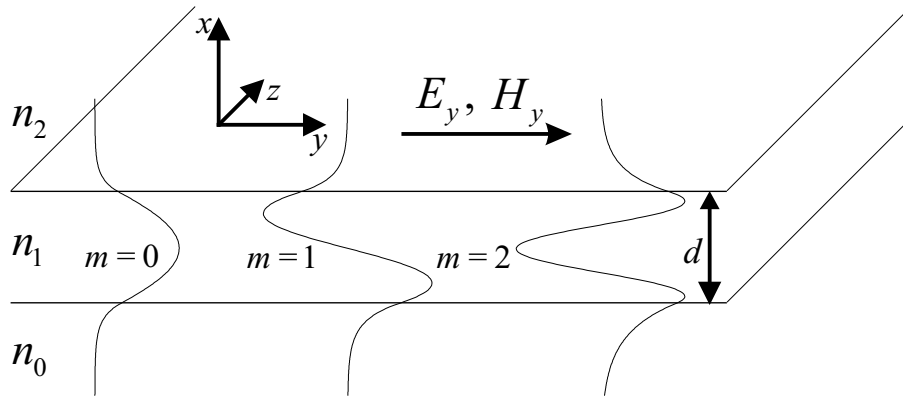


Abbildung 5.6.: Feldverteilung für die ersten TE- und TM-Moden in einem Schichtwellenleiter.

konkreten Fall eines Schichtwellenleiters mit konstanten Brechungsindizes werden die Gleichungen 5.22 und 5.23 auf die drei Brechungsindexbereiche getrennt angewandt. Sie werden dann unter Beachtung der Randbedingungen (Gleichungen 5.19) gelöst [58]. Die daraus resultierenden Bestimmungsgleichungen für β stimmen für die TE-Mode exakt mit Gleichung 5.13 überein [58]. Das strahlenoptische und wellenoptische Modell liefern also in diesem einfachen Fall tatsächlich das gleiche Ergebnis. Insgesamt ergibt sich als Modengleichung

$$\tan(k_{z,1}d - m\pi) = \frac{k_{z,1}(k_{z,0} + k_{z,2})}{k_{z,1}^2 - k_{z,0}k_{z,2}} \quad (5.24a)$$

für die TE-Mode und

$$\tan(k_{z,1}d - m\pi) = \frac{\frac{k_{z,1}}{n_1^2} \left(\frac{k_{z,0}}{n_0^2} + \frac{k_{z,2}}{n_2^2} \right)}{\frac{k_{z,1}^2}{n_1^4} - \frac{k_{z,0}}{n_0^2} \cdot \frac{k_{z,2}}{n_2^2}} \quad (5.24b)$$

für die TM-Mode.

In Abbildung 5.6 sind die transversalen Feldverläufe der ersten drei Moden in einem Schichtwellenleiter skizziert. Es gilt, daß das Evaneszentfeld umso schneller abklingt, je kleiner die Modenzahl und je größer der Brechungsindexunterschied zwischen Kern und Umgebung ist. Die effektive Dicke läßt sich über die in einem

Schichtwellenleiter geführte Leistung berechnen zu [58]

$$d_{eff} = d + \frac{1}{k_{z,0}} + \frac{1}{k_{z,2}} \quad (5.25a)$$

für die TE-Mode und

$$d_{eff} = d + \frac{1}{k_{z,0} \left(\frac{N^2}{n_0^2} + \frac{N^2}{n_1^2} - 1 \right)} + \frac{1}{k_{z,2} \left(\frac{N^2}{n_2^2} + \frac{N^2}{n_1^2} - 1 \right)} \quad (5.25b)$$

für die TM-Mode. Bei Wellenleitern mit Gradientenprofil sind die skalaren Wellengleichungen 5.22 und 5.23 nur in Ausnahmefällen integrabel, so z.B. für parabolische Gradientenprofile. Zum Auffinden von Lösungen werden Testfeldverteilungen konstruiert. Nach Einsetzen in die Wellengleichungen wird überprüft, ob die resultierenden Differentialgleichungen geschlossen lösbar sind.

5.2.4. Streifenwellenleiter

Für Streifenwellenleiter lassen sich die Maxwellgleichungen ebenfalls nicht exakt in skalare Gleichungen überführen. Wie nachfolgend gezeigt wird, kann man dennoch zu Lösungen kommen, wenn zusätzliche Bedingungen an den Wellenleiter gestellt werden. Liegt die effektive Ausbreitungskonstante relativ weit oberhalb der Grenzausbreitungskonstante, spricht man von stark führenden Wellenleitern. Hier können verschiedene Näherungen [60], [61] angewandt werden, um an die Feldverteilung zu kommen. Für eine effektive Ausbreitungskonstante, die nur knapp über der Grenzausbreitungskonstante liegt, handelt es sich um schwach führende Wellenleiter. Integriert optische Evaneszenzfeldsensoren gehören normalerweise zu dieser Art Wellenleiter. Dabei kann die sogenannte „weakly guiding“ Näherung durchgeführt werden. In der vollständigen Vektorwellengleichung 5.17 bzw. 5.18 mischen die Terme mit $\frac{\nabla n^2(\vec{r})}{n^2(\vec{r})}$ die x- und y-Komponenten der Felder. Diese Mischterme sind im vorliegenden Fall aber klein und werden vernachlässigt. Damit wird man auf die sogenannte reduzierte Vektorwellengleichung geführt [62]. Da aus den Maxwellgleichungen bei vollständiger Kenntnis eines Feldvektors der andere gefunden werden kann, genügt die Angabe der Gleichungen für eine Feld-

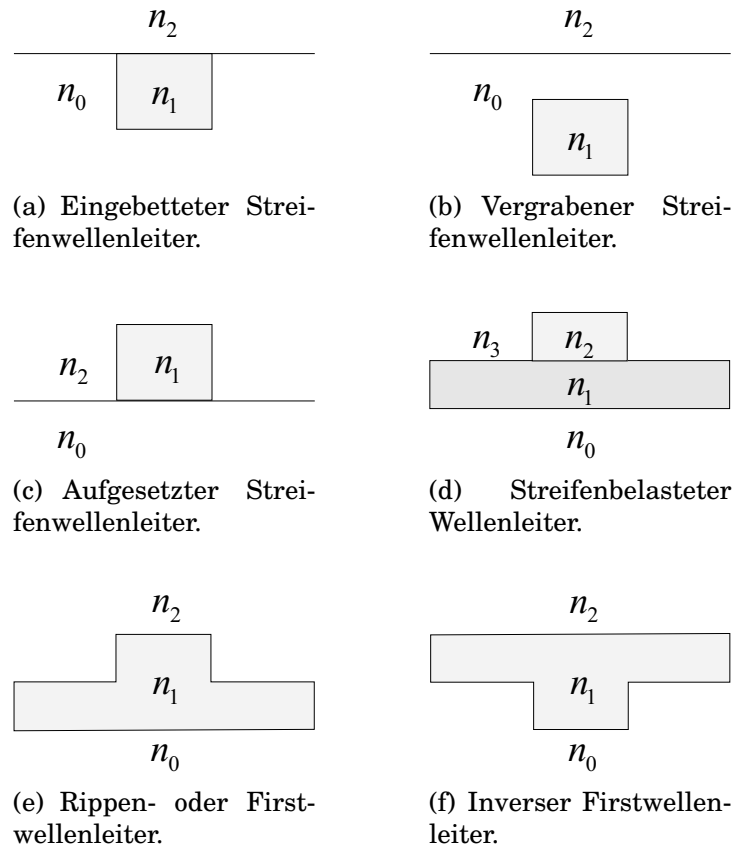


Abbildung 5.7.: Querschnittsformen verschiedener Streifenwellenleiter.

komponente. Die reduzierten Vektorwellengleichungen lauten nun

$$(\Delta_t + k_0^2 n^2(x, y) - \beta_x^2) E_x(x, y) = -\frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{E_x(x, y)}{n^2(x, y)} \frac{\partial n^2(x, y)}{\partial x} \right) \quad (5.26a)$$

$$(\Delta_t + k_0^2 n^2(x, y) - \beta_y^2) E_y(x, y) = -\frac{\partial}{\partial y} \left(\frac{E_y(x, y)}{n^2(x, y)} \frac{\partial n^2(x, y)}{\partial y} \right), \quad (5.26b)$$

wobei für die Felder $\propto e^{i(\beta z - \omega t)}$ angenommen wurde und $k_0 = \frac{\omega}{c}$, $\beta = k_0 N$ und $\Delta_t = \partial_x^2 + \partial_y^2$ gelten. Die beiden Phasenkonstanten in Gleichung 5.26a und 5.26b sind im allgemeinen verschieden und repräsentieren die beiden Polarisationszustände, die auch mit quasi-TE- (HE_x -) und quasi-TM- (HE_y -) Moden bezeichnet werden. Ändert sich der Brechungsindexverlauf im Kern über den Bereich einer Wellenlänge wenig, können darüberhinaus auch noch die rechten Seiten der Gleichungen 5.26a und 5.26b vernachlässigt werden und man erhält die homogenen

Helmholtz-Gleichungen:

$$(\Delta_t + k_0^2 n^2(x, y) - \beta_x^2) E_x(x, y) = 0 \quad (5.27a)$$

$$(\Delta_t + k_0^2 n^2(x, y) - \beta_y^2) E_y(x, y) = 0. \quad (5.27b)$$

Die Gleichungen 5.26 und 5.27 sind Ausgangspunkt verschiedener Näherungsverfahren wie die effektive Indexmethode [63], [64], die Variationsmethode [65], die Methode der transversalen Resonanz [66] oder die Methode der finiten Elemente [67], [68], [69], die hier aber nicht näher beschrieben werden sollen, da dieses Gebiet vom eigentlichen Fokus dieser Arbeit zu sehr abweicht. Vielmehr will ich im folgenden Abschnitt 5.3 auf ein optimiertes Design der Wellenleiterstrukturen für die Sensorik eingehen.

5.2.5. Ausbreitung von Licht in einem Wellenleiter

Neben der Kenntnis der Moden, d.h. die Ausbildung der elektromagnetischen Welle in den Querdimensionen x und y ist für integriert optische Strukturen auch die Ausbreitung der Welle längs des Wellenleiters in z -Richtung wichtig. Gerade bei Verzweigungs- oder Kopplungsstrukturen bei integriert optischen Chips, an denen eine elektromagnetische Welle aufgeteilt wird, spielen für die Konstruktion genaue Simulationen eine wichtige Rolle. Eine Näherungsmethode hierfür ist die BPM (Beam Propagation Method) [70], die hier ebenfalls nicht näher diskutiert werden soll, da sie vom eigentlichen Thema der Arbeit zu stark abweicht.

5.3. Sensorik mit integriert optischen Wellenleitern

Wie vorhin beschrieben wurde, existiert bei jeder in einem Lichtleiter geführten elektromagnetischen Welle ein evaneszentes Feld, das aus dem hochbrechenden wellenleitenden Medium herausragt. Ändern sich jetzt in diesem „Einflußgebiet“ optische Parameter des Superstrats, z.B. durch Schichtdickenänderungen an der Sensoroberfläche, so ändert sich der effektive Brechungsindex N des gesamten Wellenleiters. Diese Änderung kann mit verschiedenen Konzepten experimentell erfaßt werden. In der Literatur sind unter anderem Gitterkoppler [18], [20], [22], Polarisationsinterferometer [29], [31], Young-Interferometer [26], [28] oder auch das hier verwendete integriert optische Mach-Zehnder-Interferometer [23], [71], [72] erwähnt.

5.3.1. Funktionsweise des Mach-Zehnder-Interferometers (MZI)

Abbildung 5.8 zeigt schematisch die Funktionsweise des Mach-Zehnder Interferometers. Die Intensität I_0 des eingekoppelten kohärenten Lichts wird in einem

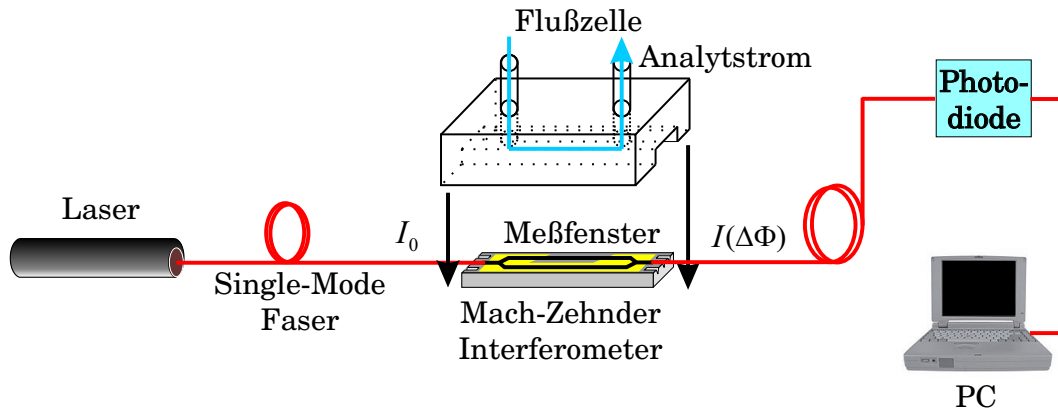


Abbildung 5.8.: Prinzipielle Funktionsweise eines Mach-Zehnder Interferometers in der Sensorik.

Y-Verzweiger auf dem Chip aufgeteilt und dann in zwei separaten Lichtleiterarmen geführt. Die beiden Lichtleiter unterscheiden sich in der Weise, daß einer der beiden Arme mit einer dicken Schicht (normalerweise SiO_2) bedeckt ist, so daß die darin geführte elektromagnetische Welle unbeeinflusst gegenüber Änderungen der Umgebung ist. Beim anderen Arm wird dagegen ein Meßfenster in die Deckschicht geätzt. Hier kommt das evaneszente Feld der geführten Welle direkt mit dem Umgebungsmedium in Kontakt und reagiert dementsprechend auch auf Änderungen desselben. Ändern sich z.B. durch Anbindung an der Sensoroberfläche die optischen Eigenschaften des Superstrats, verändert sich auch der effektive Brechungsindex N des Wellenleitersystems und somit die Lichtgeschwindigkeit im Meßfensterbereich des Wellenleiters. Daraus resultiert vor der Wiedervereinigung eine relative Phasenverschiebung der beiden geführten Wellen in den jeweiligen Armen zueinander. Es ergibt sich bei einem optimal symmetrischen MZI eine kohärente Überlagerung der beiden Strahlen gemäß [58]

$$I(\Delta\Phi) = \frac{I_0}{2} (1 + \cos(\Delta\Phi)) = \frac{I_0}{2} (1 + \cos(k_0 L (N_{meas} - N_{ref}))), \quad (5.28)$$

deren resultierende Intensität $I(\Delta\Phi)$ schließlich mit einer Photodiode detektiert wird. Man kann in Gleichung 5.28 erkennen, daß die Phasenverschiebung $\Delta\Phi$ von folgenden Größen abhängig ist:

- proportional zur Wellenzahl im Vakuum $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda_0}$,

- proportional zur Meßfensterlänge L ,
- $\Delta\Phi$ ist abhängig vom effektiven Brechungsindex des Meßarms N_{meas} .

Prinzipiell könnte man also durch ein möglichst langes Meßfenster sowie mit einer kohärenten Lichtquelle kleiner Wellenlänge die Signaldynamik erhöhen. Die Wahl der Wellenlänge hängt von der Verfügbarkeit, der gerätetechnischen Details wie z.B. Strahlstabilität sowie den Kosten der verfügbaren Laser ab. Für eine Verlängerung des Meßfensters gibt es ebenfalls – allerdings technisch aufwendige und hier noch nicht realisierte – Ideen. Weit mehr Potential hat zudem die Optimierung der geometrischen Strukturen des Wellenleiters in der Weise, daß die Anlagerung eines Analyten an die Sensoroberfläche eine möglichst große Änderung von N_{meas} hervorruft.

5.3.2. Theorie zur integriert optischen Sensorik

Zu der Optimierung von wellenleitenden Strukturen für die Sensorik sind bereits Arbeiten veröffentlicht [73],[74]. Dabei beschränken sich beide auf Schichtwellenleiter und beide Arbeiten unterscheiden zwischen dem Einsatz von Wellenleitern als Refraktometer und als Sensor mit einer dünnen immobilisierten Schicht, deren Änderung der optischen Eigenschaften detektiert werden soll. Dabei geht [73] semi-klassisch und relativ anschaulich vor, während [74] das Problem relativ abstrakt behandelt, mit seiner normalisierten Methode allerdings auch allgemein gültige Aussagen erhält². Dennoch beschränke ich mich hier auf die Darstellung von [73], da sie anschaulicher ist und sich leichter ein Bezug zur Sensortechnologie in Teil I dieser Arbeit herstellen läßt. Natürlich sind die resultierenden Ergebnisse beider theoretischen Ansätze gleich.

Die Modengleichungen für Drei- und Vierschichtwellenleiter

Ausgehend von Gleichung 5.8 kann die Modengleichung für einen Dreischichtwellenleiter, bestehend aus einem Substrat mit Brechungsindex n_S , dem wellenleitenden Film F der Dicke d_F und dem Brechungsindex n_F sowie dem Umgebungs- oder Covermedium C mit dem Brechungsindex n_C (siehe Abbildung 5.9) geschrieben werden als

$$\Phi_3 \equiv 2k_{z,F}d_F + \Phi_{F,S} + \Phi_{F,C} = 2\pi m. \quad (5.29)$$

²Für Leser, die die Abhandlung von [74] nachvollziehen möchten sei angemerkt, daß sich in der zitierten Veröffentlichung leider Fehler eingeschlichen haben. Nach einer persönlichen Kontaktaufnahme mit dem Autor der Publikation wurden mir die korrigierten Formeln per Post zugeschickt. Die korrigierten Formeln in anderer Form sind auch in [75] veröffentlicht.

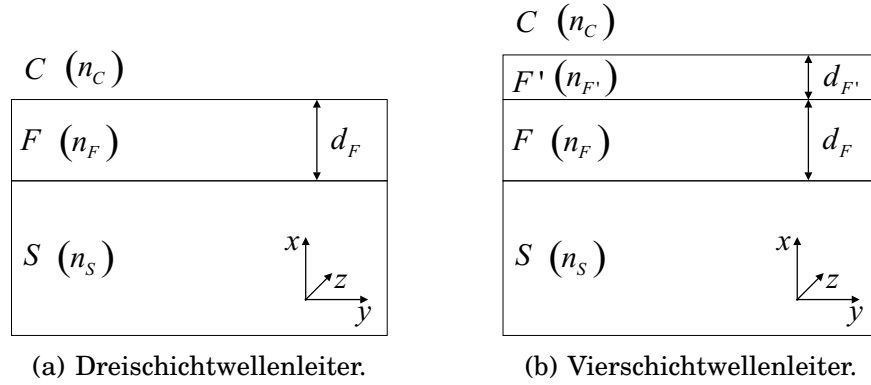


Abbildung 5.9.: Drei- und Vierschichtwellenleitermodelle zur Berechnung von Signaldynamiken.

Dabei ist $m \in \mathbb{N}_0$, $k_{z,F} = k_0 \sqrt{n_F^2 - N^2}$ mit $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$ und $N = \frac{k_z}{k_0}$ als dem effektiven Brechungsindex der geführten Welle [76], [77]. Diese Beziehung kann auch aus den Gleichungen 5.6, 5.7 und 5.9 hergeleitet werden. $\Phi_{F,S}$ und $\Phi_{F,C}$ sind die Phasenverschiebungen bei Totalreflexion an den Grenzschichten Film-Substrat und Film-Cover. Die Fresnelschen Reflexionskoeffizienten an den Grenzschichten F-J (wobei $J = S, C$) aus Gleichung 2.13 kann man als

$$r_{F,J} = \frac{\left(\frac{k_{z,F}}{n_F^{2\rho}} - \frac{k_{z,J}}{n_J^{2\rho}} \right)}{\left(\frac{k_{z,F}}{n_F^{2\rho}} + \frac{k_{z,J}}{n_J^{2\rho}} \right)} \quad (5.30)$$

schreiben. Analog zur vorigen Gleichung ist $k_{z,J} = k \sqrt{n_J^2 - N^2}$. Für die Variable ρ gilt $\rho = 0$ für TE- und $\rho = 1$ für TM-Moden. Für $N > n_J$ ergibt sich Totalreflexion ($|r_{F,J}|^2 = 1$) und das elektromagnetische Feld im Medium J ist evaneszent, d.h. es ist $k_{z,J} = ik \sqrt{N^2 - n_J^2}$ sowie $r_{F,J}$ eine komplexe Größe $r_{F,J} = e^{i\Phi_{F,J}}$ mit einer Phasenverschiebung $\Phi_{F,J}$. Diese lässt sich schreiben als

$$\Phi_{F,J} = 2 \arctan \left(i \frac{1 - r_{F,J}}{1 + r_{F,J}} \right) = -2 \arctan \left(\left(\frac{n_F}{n_J} \right)^{2\rho} \frac{|k_{z,J}|}{k_{z,F}} \right). \quad (5.31)$$

Für einen Vierschichtwellenleiter bestehend aus dem Substrat S, dem wellenleitenden Film F, einer zusätzlichen dünnen Schicht F' mit dem dazugehörigen Brechungsindex $n_{F'}$ und der Dicke $d_{F'}$ und dem Covermedium C lautet die Modengleichung

$$\Phi_4 \equiv 2k_{z,F}d_F + \Phi_{F,S} + \Phi_{F',C} = 2\pi m. \quad (5.32)$$

Dabei wurde angenommen, daß die Schichten F und F' zusammen die wellenleitenden Strukturen sind. Die Phasenverschiebung $\Phi_{F,F',C}$ für interne Totalreflexion an der Grenzschicht F,F'-C erhält man aus dem dazugehörigen Reflexionskoeffizienten

$$r_{F,F',C} = \frac{r_{F,F'} + r_{F',C} e^{2ik_{z,F'}d_{F'}}}{1 + r_{F,F'}r_{F',C} e^{2ik_{z,F'}d_{F'}}}, \quad (5.33)$$

wobei wiederum $k_{z,F'} = k\sqrt{n_{F'}^2 - N^2}$ ist und $r_{F,F'}$, $r_{F',C}$ die Reflexionskoeffizienten an den Grenzschichten F-F' und F'-C sind. Gleichung 5.33 ist analog zu Gleichung 2.17, nur daß hier natürlich ein schräger Lichteinfall vorhanden ist. Weil wiederum das elektromagnetische Feld im Medium C evaneszent ist, kann $r_{F,F',C} = e^{i\Phi_{F,F',C}}$ geschrieben werden mit

$$\Phi_{F,F',C} = 2 \arctan \left(i \frac{1 - r_{F,F',C}}{1 + r_{F,F',C}} \right) = 2 \arctan \left(i \frac{1 - r_{F,F'}}{1 + r_{F,F'}} \cdot \frac{1 - r_{F',C} e^{2ik_{z,F'}d_{F'}}}{1 + r_{F',C} e^{2ik_{z,F'}d_{F'}}} \right). \quad (5.34)$$

Hierbei kann man $r_{F',C} = e^{(i\Phi_{F',C} - \bar{\Phi}_{F',C})}$ schreiben, wobei $\bar{\Phi}_{F',C} \geq 0$ sein muß wegen $|r_{F',C}| = e^{-\bar{\Phi}_{F',C}} \leq 1$. Damit kann Gleichung 5.34 folgendermaßen geschrieben werden:

$$\Phi_{F,F',C} = 2 \arctan \left(\left(\frac{n_F}{n_{F'}} \right)^{2\rho} \frac{k_{z,F'}}{k_{z,F}} \tan \left(k_{z,F'}d_{F'} + \frac{\Phi_{F',C} + i\bar{\Phi}_{F',C}}{2} \right) \right) \quad (5.35)$$

Die Gleichungen 5.34 und 5.35 gelten sowohl für evaneszente als auch für ebene Wellen im Medium F'. Im Falle überlagerter ebener Wellen in F' ist $r_{F',C} = 1 \Rightarrow \bar{\Phi}_{F',C} = 0$. Im Falle eines evaneszenten Feldes in F' (d.h. $k_{z,F'} = i|k_{z,F'}|$) kann man aus Gleichung 5.30 $\Phi_{F',C} = 0$ für $n_{F'} < n_C$ und $\Phi_{F',C} = \pi$ für $n_{F'} > n_C$ schließen. Mit der Relation $\tanh z = -i \tan(iz)$ formuliert man dann Gleichung 5.35 um in

$$\Phi_{F,F',C} = 2 \arctan \left(\left(\frac{n_F}{n_{F'}} \right)^{2\rho} \frac{k_{z,F'}}{k_{z,F}} \left(\tanh \left(|k_{z,F'}|d_{F'} + \frac{\bar{\Phi}_{F',C}}{2} \right) \right)^\sigma \right), \quad (5.36)$$

wobei

$$\left(\tanh \left(\frac{\bar{\Phi}_{F',C}}{2} \right) \right)^\sigma = \left(\frac{n_{F'}}{n_C} \right)^{2\rho} \frac{|k_{z,C}|}{|k_{z,F'}|} = \left(\frac{n_{F'}}{n_C} \right)^{2\rho} \sqrt{\frac{N^2 - n_C^2}{N^2 - n_{F'}^2}} \quad (5.37)$$

mit $\sigma = 1$ für $n_{F'} < n_C$ und $\sigma = -1$ für $n_{F'} > n_C$ ist. Im Grenzfall einer dünnen Schicht F' (d.h. $d_{F'} \ll \lambda$) kann Gleichung 5.33 in erster Näherung zu

$$r_{F,F',C} \cong \frac{r_{F,F'} + r_{F',C} (1 + 2ik_{z,F'}d_{F'})}{1 + r_{F,F'}r_{F',C} (1 + 2ik_{z,F'}d_{F'})} \quad (5.38)$$

entwickelt werden. Erweitern wir den Ausdruck auf der rechten Seite von Gleichung 5.38 in Zähler und Nenner mit $1 + r_{F,F'}r_{F',C} (1 - 2ik_{z,F'}d_{F'})$ und vernachlässigen Terme 2. Ordnung von $d_{F'}$ erhalten wir

$$r_{F,F',C} \cong \frac{r_{F,F'} + r_{F',C}}{1 + r_{F,F'}r_{F',C}} \cdot \left(1 + i \frac{2r_{F',C} (1 - r_{F,F'}^2)}{(1 + r_{F,F'}r_{F',C}) (r_{F,F'} + r_{F',C})} k_{z,F'} d_{F'} \right) \quad (5.39)$$

Mit Hilfe der Gleichungen 5.30 und 5.33 kann gezeigt werden, daß der Term vor der großen Klammer sich zu $r_{F,C}$ vereinfachen läßt. Der Ausdruck in der großen Klammer selbst ist in 1. Näherung der Taylor-Entwicklung einer Exponentialfunktion identisch. Daher kann Gleichung 5.39 ausgedrückt werden als

$$r_{F,F',C} \cong r_{F,C} e^{i \frac{2r_{F',C} (1 - r_{F,F'}^2)}{(1 + r_{F,F'}r_{F',C}) (r_{F,F'} + r_{F',C})} k_{z,F'} d_{F'}} \quad (5.40)$$

Weil das elektromagnetische Feld in F eine Überlagerung von ebenen Wellen und in C eine evaneszente Welle ist, können wir $r_{F,F',C} = e^{i\Phi_{F,F',C}}$ und $r_{F,C} = e^{i\Phi_{F,C}}$ schreiben. Wir erhalten damit und mit Gleichung 5.40

$$\Phi_{F,F',C} \cong \Phi_{F,C} + \frac{2r_{F',C} (1 - r_{F,F'}^2)}{(1 + r_{F,F'}r_{F',C}) (r_{F,F'} + r_{F',C})} k_{z,F'} d_{F'}. \quad (5.41)$$

Setzen wir nun noch die Reflexionskoeffizienten aus Gleichung 5.30 in Gleichung 5.41 ein, erhalten wir

$$\Phi_{F,F',C} \cong \Phi_{F,C} + 2k_{z,F'} \left(\frac{n_{F'}}{n_F} \right)^{2\rho} \frac{\frac{k_{z,F'}^2}{n_{F'}^{4\rho}} - \frac{k_{z,C}^2}{n_C^{2\rho}}}{\frac{k_{z,F'}^2}{n_F^{4\rho}} - \frac{k_{z,C}^2}{n_C^{4\rho}}} d_{F'}. \quad (5.42)$$

Mit $N = \frac{k_z}{k_0}$ erhalten wir schließlich

$$\Phi_{F,F',C} \approx \Phi_{F,C} + 2k_{z,F'} \frac{n_{F'}^2 - n_C^2}{n_F^2 - n_C^2} \cdot \left(\frac{\left(\frac{N}{n_C} \right)^2 + \left(\frac{N}{n_{F'}} \right)^2 - 1}{\left(\frac{N}{n_C} \right)^2 + \left(\frac{N}{n_F} \right)^2 - 1} \right)^\rho d_{F'} \quad (5.43)$$

Dabei ist $\rho = 0$ für TE- und $\rho = 1$ für TM-Moden. Für dünne Schichten ($d_{F'} \ll \lambda$) auf einem wellenleitenden Film kann also die Modengleichung 5.32 ähnlich der

eines Dreischichtwellenleiters geschrieben werden:

$$\Phi_4 \cong 2k_{z,F} (d_F + \Delta d_F) + \Phi_{F,S} + \Phi_{F,C} \cong 2\pi m, \quad (5.44)$$

mit

$$\Delta d_F = \frac{n_{F'}^2 - n_C^2}{n_F^2 - n_C^2} \cdot \left(\frac{\left(\frac{N}{n_C}\right)^2 + \left(\frac{N}{n_{F'}}\right)^2 - 1}{\left(\frac{N}{n_C}\right)^2 + \left(\frac{N}{n_F}\right)^2 - 1} \right)^\rho d_{F'}. \quad (5.45)$$

Gleichung 5.44 hat die Form der Modengleichung 5.29 eines Dreischichtwellenleiters mit der Filmdicke $(d_F + \Delta d_F)$, allerdings hängt Δd_F im allgemeinen vom effektiven Brechungsindex N und der Polarisation ab. Nur im Spezialfall $n_{F'} = n_F$ ergibt sich $\Delta d_F = d_{F'}$.

Signaldynamiken von Wellenleitern für die Biosensorik

Mit den in Abschnitt 5.3.2 erhaltenen Modengleichungen wollen wir nun die Signaldynamik eines integriert optischen Wellenleiters berechnen. Im Falle der Biosensorik, d.h. einem Sensor, der mit einer dünnen sensitiven Schicht bedeckt ist und an der der Zielanalyt anbindet, wird es Ziel sein, die Größe $\frac{\partial N}{\partial d_{F'}}$ zu maximieren. Vereinfachend wird angenommen, daß der sensitive Film F' zusammen mit den daran angebondenen Analyten eine homogene optische Schicht ergeben mit der Dicke $d_{F'}$ und dem Brechungsindex $n_{F'}$. Wir erhalten die Signaldynamik aus der vereinfachten Modengleichung 5.44 für den Grenzfall dünner sensitiver Schichten. Aus Gleichung 5.32 läßt sich

$$\frac{\partial \Phi_4}{\partial d_{F'}} \Big|_{d_{F'}=0} = \frac{\partial \Phi_{F,F',C}}{\partial d_{F'}} \Big|_{d_{F'}=0} \quad (5.46)$$

ableiten, wobei sich $\frac{\partial \Phi_{F,F',C}}{\partial d_{F'}}$ aus der Ableitung von Gleichung 5.43 errechnet und

$$\frac{\partial \Phi_4}{\partial N} \Big|_{d_{F'}=0} = \frac{\partial \Phi_3}{\partial N} \quad (5.47)$$

für den Grenzfall $d_{F'} = 0$ ist. Für alle Modengleichungen gilt

$$\Phi(d_{F'}, N(d_{F'})) = 2\pi m \quad (5.48)$$

Daraus folgt

$$\frac{\partial \Phi}{\partial d_{F'}} + \frac{\partial N}{\partial d_{F'}} \cdot \frac{\partial \Phi}{\partial N} = 0 \Rightarrow \frac{\partial N}{\partial d_{F'}} = - \frac{\frac{\partial \Phi}{\partial d_{F'}}}{\frac{\partial \Phi}{\partial N}} \quad (5.49)$$

Setzt man die Lösungen aus Gleichung 5.46, 5.47 in Gleichung 5.49 ein, erhält man die Signaldynamik für die Anbindung an die Sensoroberfläche

$$\frac{\partial N}{\partial d_{F'}} = \frac{n_F^2 - N^2}{N d_{eff}} \cdot \frac{n_{F'}^2 - n_C^2}{n_F^2 - n_C^2} \cdot \left(\frac{\left(\frac{N}{n_C}\right)^2 + \left(\frac{N}{n_{F'}}\right)^2 - 1}{\left(\frac{N}{n_C}\right)^2 + \left(\frac{N}{n_F}\right)^2 - 1} \right)^\rho \quad (5.50)$$

mit $\rho = 0$ für die TE- und $\rho = 1$ für die TM-Mode.

5.3.3. Optimierte integriert optisches Sensordesign

Gleichung 5.50 ist der Ausgangspunkt für die weitere Diskussion eines optimierten integriert optisches Sensordesigns. Dabei lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

- Die größte Signaldynamik wird mit TE₀- oder TM₀- monomodigen Wellenleitern erzielt.
- Die maximale Signaldynamik ist bei der TM₀-Mode generell ein wenig größer als bei der TE₀-Mode.
- Eine große Signaldynamik $\left(\frac{\partial N}{\partial d_{F'}}\right)$ wird bei kleinen effektiven Wellenleiterdicken d_{eff} erreicht. Dabei gilt nach [77], [59] für die minimale Dicke der TE₀-Mode $(d_{eff})_{min} \approx 0,7\lambda (n_F^2 - n_S^2)^{-\frac{1}{2}}$. Dieses Minimum liegt ungefähr bei der doppelten Größe der cutoff Wellenleiterdicke. Die Berechnung dieser Größe kann jedoch nur ein grober Anhaltspunkt sein, sowohl in Bezug auf die tatsächlich minimale effektive Dicke als auch auf die Wellenleiterdicke d_F mit der größten Signaldynamik.
- Verbunden mit der geeigneten Wellenleiterdicke d_F führt eine große Differenz $(n_F - n_S)$ zwischen dem Brechungsindex des Wellenleiters F und des Substrats S zu einer hohen Signaldynamik.
- Die Signaldynamik ist bei kleinen Wellenlängen höher als bei großen Wellenlängen.

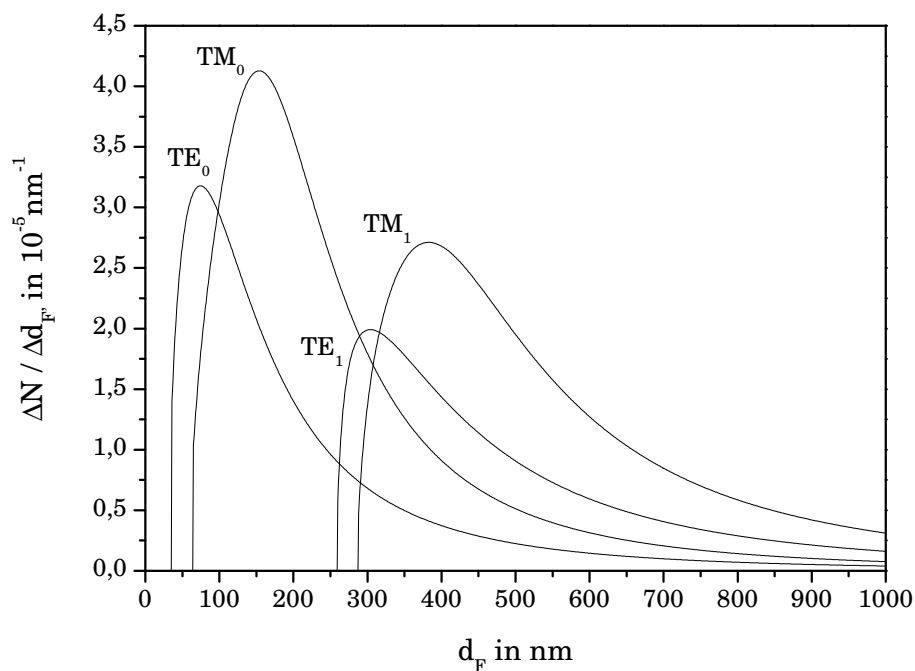
- Für dicke (multimodige) Wellenleiter gilt $d_{eff} \approx d_F$, die Signaldynamik verhält sich in diesem Bereich umgekehrt proportional zur Wellenleiterdicke:

$$\left(\frac{\partial N}{\partial d_{F'}} \right) \sim \frac{1}{d_F}.$$

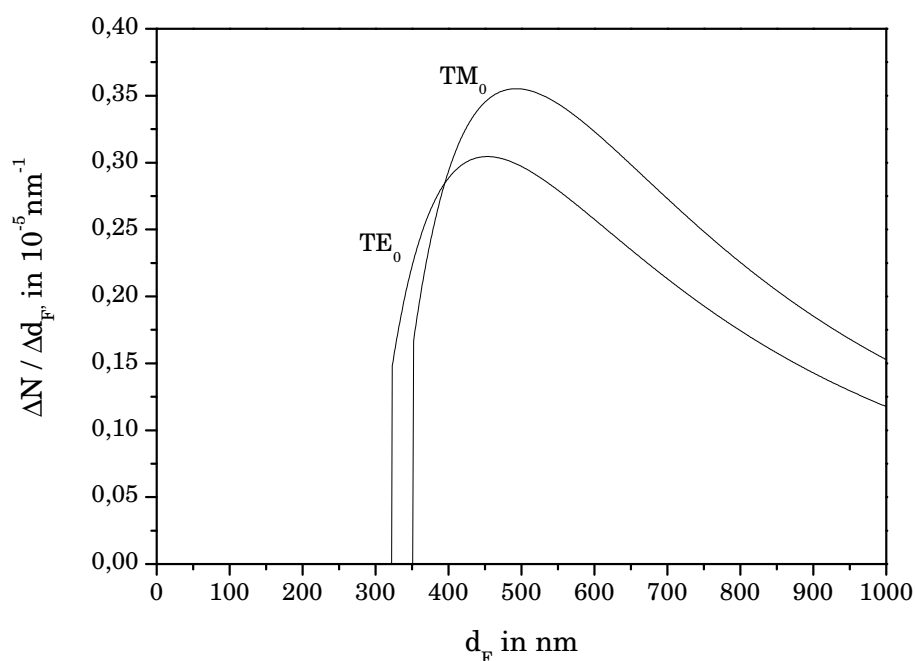
Zur Illustration dieser Ergebnisse präsentiere ich zwei Grafiken mit den berechneten Signaldynamiken $\frac{\partial N}{\partial d_{F'}}$ als Funktion der Wellenleiterdicke d_F aus Gleichung 5.50. Bis auf das wellenleitende Material sind beide Systeme identisch. Als Substrat dient SiO_2 mit einem Brechungsindex von $n_S = 1,457$, der Brechungsindex des Biopolymers wurde mit $n_{F'} = 1,34$ und das Superstrat mit H_2O und $n_C = 1,33$ angenommen. Als Brechungsindex des Wellenleiters wurde einmal $n_F = 2,012$ und einmal $n_F = 1,5$ verwendet. Die für die Berechnung verwendete Wellenlänge ist mit $\lambda = 632,8\text{nm}$ Licht eines He-Ne Lasers. Man erkennt sehr deutlich, wie notwendig es für eine große Signaldynamik ist, hochbrechendes Wellenleiternmaterial in Verbindung mit einer optimalen Wellenleiterschichtdicke zu verwenden. In Tabelle 5.1 sind die optimalen Schichtdicken für eine maximale Signaldynamik der jeweiligen Moden aufgelistet. Es werden außerdem die nach der Theorie von [74] ermittelten optimalen Schichtdicken für das jeweilige Wellenleitersystem angegeben. Man erkennt die sehr gute Übereinstimmung beider Theorien bei den TE-Moden. Die Abweichung bei den TM-Moden läßt sich eventuell durch eine Vereinfachung bei der Theorie nach [74] erklären, die bei dieser Polarisationsrichtung gemacht werden muß.

n_S	n_F	n_C	Mode	optimales d_F in nm nach Tiefenthaler-Lukosz	optimales d_F in nm nach Parriaux
1,457	2,012	1,33	TE ₀	74	74
1,457	2,012	1,33	TM ₀	154	145
1,457	2,012	1,33	TE ₁	304	304
1,457	2,012	1,33	TM ₁	383	368
1,457	1,5	1,33	TE ₀	453	453
1,457	1,5	1,33	TM ₀	493	468

Tabelle 5.1.: Ermittelte optimale Schichtdicken für die höchste Signaldynamik der verschiedenen Moden.



(a) $\frac{\partial N}{\partial d_{F'}}$ bei einem Schichtwellenleiter mit $n_S = 1,457$, $n_F = 2,012$, $n_{F'} = 1,34$, $n_C = 1,33$ und einer Wellenlänge von $\lambda = 632,8\text{nm}$.



(b) $\frac{\partial N}{\partial d_{F'}}$ bei einem Schichtwellenleiter mit $n_S = 1,457$, $n_F = 1,5$, $n_{F'} = 1,34$, $n_C = 1,33$ und einer Wellenlänge von $\lambda = 632,8\text{nm}$.

Abbildung 5.10.: Signaldynamiken bei Schichtwellenleitern in Abhängigkeit der Wellenleiterdicke d_F .

6. Materialien und Methoden

6.1. Materialien

6.1.1. Design des Mach-Zehnder-Interferometers

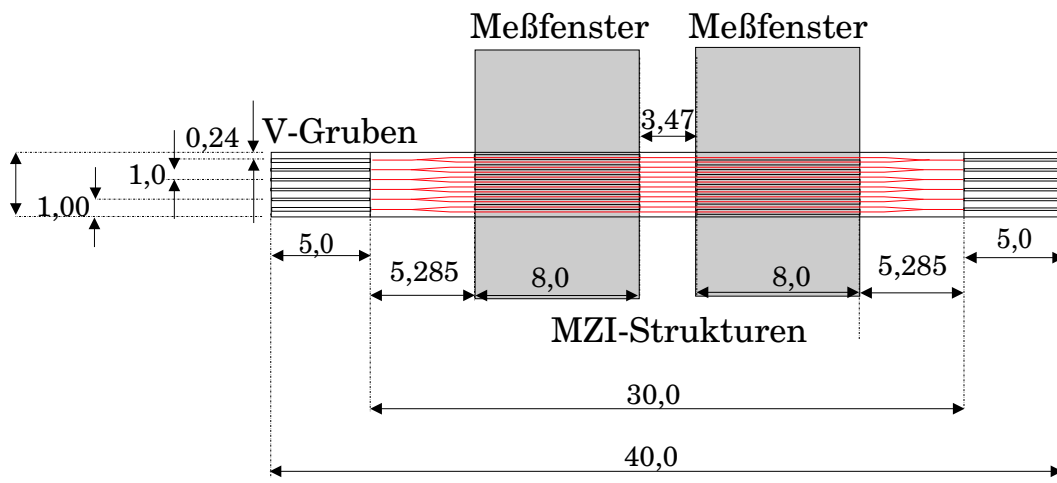


Abbildung 6.1.: Dimensionierungen eines Mach-Zehnder Interferometer Chips (in mm).

Ich beschränke mich bei der Diskussion des in dieser Arbeit verwendeten Mach-Zehnder-Interferometers wiederum auf die für die Sensorik relevanten Eigenschaften des Sensorchips. Rechnungen wie z.B. die genaue Führung der elektromagnetischen Welle im Lichtleiter wurden von mir nicht gemacht, da diese bereits vom Hersteller LioniX BV [78] mit seiner langjährigen Erfahrung im Bereich der integrierten Optik durchgeführt wurden.

Der verwendete Mach-Zehnder-Interferometer Chip wurde in Siliziumoxinitrid-Technologie (SiON) [79] hergestellt. Seine geometrischen Dimensionen wurden so konzipiert, daß sein Einsatz für biosensorische Anwendungen in wäßrigen Medien mit der TE_0 -Mode von He-Ne-Laserlicht ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) optimiert wurde (siehe Abschnitt 5.3.3). Gerade dies sowie die ausgesprochene Expertise in der integrierten

Optik waren der Grund, LioniX BV als Partner für dieses Aufgabengebiet hinzuzuziehen.

Auf einem Siliziumsubstrat (in 11010 Orientierung) wurde eine $1,25\ \mu\text{m}$ dicke

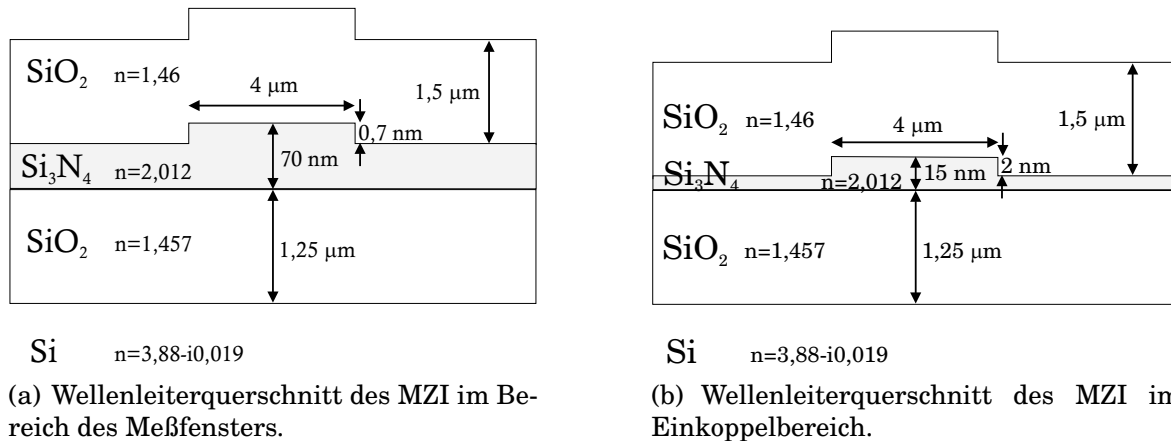


Abbildung 6.2.: Wellenleiterquerschnitte des MZI Chips im Bereich des Meßfensters und des Einkoppelbereichs.

SiO_2 -Schicht mit Brechungsindex $n_S = 1,457$ mit einem CVD-Verfahren abgeschieden. Darauf wurde wiederum mit einem CVD-Prozeß ein Rippenwellenleiter aus Si_3N_4 (Brechungsindex $n_F = 2,012$) abgeschieden und photolithografisch erstellt. In der SiON-Technologie ist Si_3N_4 das Material mit dem höchstmöglichen Brechungsindex. Bis auf den sensorisch wichtigen Bereich des $8\ \text{mm}$ langen Meßfensters ist der ganze Sensor mit einer ca. $1,5\ \mu\text{m}$ dicken Passivierungsschicht aus SiO_2 versehen. Auf einem Sensorchip befinden sich sechs Mach-Zehnder-Strukturen. Die Dicke der Pufferschicht von $1,25\ \mu\text{m}$ wurde bewußt gewählt: die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes der TM_0 -Mode ist größer als die der TE_0 -Mode. Das evaneszente Feld der TM_0 -Mode reicht bei dieser Pufferschichtdicke in das Silizium hinein, wo es dann absorbiert und somit die TM_0 -Mode über die ganze Wellenleiterlänge schließlich herausgefiltert wird. Aufgrund dieser Filtereigenschaft wurde der TE_0 -Mode der Vorzug gegeben über der prinzipiell empfindlicheren TM_0 -Mode gegeben [72]. Zudem sind an beiden Wellenleiterarmen des Mach-Zehnder-Interferometers Meßfenster angebracht. Hintergrund dafür ist eine integrierte Referenzierung im Interferometer. Man behandelt oberflächenchemisch beide Meßfenster bis auf die Anbindung der selektiven Strukturen gleich. Diese werden nur bei einem Meßfenster immobilisiert. Damit können eventuelle unspezifische Anbindungen, die an beiden Meßfenstern stattfinden, herausreferenziert werden. Zu Beginn und am Ende der integrierten Wellenleiter jedes Chips sind V-Gruben in

das Si-Substrat geätzt, um die Justierung und Fixierung der Glasfasern an das MZI zu vereinfachen. Außerdem wurde die Dimensionierung der Streifenwellenleiterstruktur am Anfang des Chips so vollzogen, daß die Einkopplung des Lichts von der Single-Mode Glasfaser in den Chip hinein verbessert wird [72], [77]. Eine detaillierte Beschreibung des hier verwendeten Sensors ist in [72] beschrieben.

6.1.2. Verwendete Chemikalien

Für die Modifizierung des Mach-Zehnder Interferometer wurden folgende Chemikalien verwendet:

- Standardchemikalien und Biochemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Fluka, Neu-Ulm, Merck, Darmstadt oder Sigma-Aldrich, Deisenhofen bezogen.
- 3-Glycidyloxypropyl-Trimethoxysilan (GOPTS) und Diisopropylcarbodiimid (DIC) wurden von der Firma Fluka, Neu-Ulm bezogen.
- Aminodextran (AMD) Amdex™ mit 170K Dalton Molekulargewicht wurde von Helix Research Company, Springfield, OR, USA bezogen.
- Anti-Atrazin-Antikörper (Anti-ACA) IgG aus Schafen und Atrazin-capronsäure (2-Chlor-6-Isopropylamino-1,3,5-Triazin-2-(6.-amino)hexansäure) (ACA) stammen von Prof. Dr. Ram Abuknesha, Department of Life Sciences, Kings College, London.
- PBS=Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung): 8,76 g (150 mM) NaCl und 1,36 g (10 mM) KH_2PO_4 in doppelt gereinigtem Wasser (18,2 $M\Omega \cdot \text{cm}$) bei pH = 7,4. Vorrat als 10-fach konzentrierte Lösung bei pH = 6,8. Wird zur Benutzung als Spüllösung mit doppelt gereinigtem Wasser verdünnt und entgast.
- SDS = Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumlaurylsulfat) mit doppelt gereinigtem Wasser auf 0,5 Volumen-% verdünnt und mit konzentrierter Salzsäure auf pH = 1,8 eingestellt wird entgast als Regenerationslösung verwendet.

Die Prozedur der Oberflächenmodifizierung wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und ist in Abschnitt 7.1 beschrieben.

6.2. Methoden

6.2.1. Verwendete Geräte

Für die Charakterisierung von behandelten Si_3N_4 -Oberflächen wurden ein Spektrellellipsometer ES4G des Herstellers SOPRA, Paris und ein Kontaktwinkelgerät CAM^o200 der Firma KSV, Helsinki benutzt.

6.2.2. Der Mach-Zehnder Aufbau

Für den verwendeten Messaufbau wurden folgenden Geräte verwendet:

- Ein polarisierter Helium-Neon-Laser ($\lambda = 632,8\text{nm}$) mit einer Ausgangsleistung von 7 mW von JDS Uniphase, San Jose, USA.
- Ein Laser-Faser-Einkoppeladapter, gekoppelt mit einem Faraday-Isolator (Typenbezeichnung: HPUC-23-633-S-2.7AS-15+ISOL) von OZ Optics, Ottawa, Kanada.
- Ein Polarisationscontroller für 633 nm von Thorlabs GmbH, Karlsfeld.
- Single-Mode Lichtwellenleiter FS-SN-3224 und Multi-Mode Lichtwellenleiter GIF 625 von Thorlabs GmbH, Karlsfeld.
- Mach-Zehnder-Interferometer Chips, hergestellt von Lionix BV, Enschede, Niederlande.
- Ein Lightwave-Multimeter 2832-C mit Si-Photodioden der Serie 818 von Newport, Darmstadt.
- Ein Mikropositioniersystem Melles-Griot NanoMax HS von Melles Griot, Bensheim, Deutschland.
- Ein x-y-z-Positionierer von Photon Control und ein x-y-z-Positionierer von Melles Griot, Bensheim, Deutschland.
- Ein Flußzellensystem, gefertigt von der institutseigenen Werkstatt.
- Ein Zweispritzendispenser Microlab 500B mit 100 μl -Spritzen und ein 8-Wege-Ventil mit Mittenanschluss MVP von Hamilton, Martinsried, Deutschland.

- Optischer Kleber Norland Optical Adhesive 81 von Thorlabs GmbH, Karlsfeld.
- UV75 Curing Light von Thorlabs GmbH, Karlsfeld.

Das polarisierte Licht des He-Ne-Lasers wird über den Einkoppeladapter in eine Single-Mode Faser eingekoppelt. Der Faraday-Isolator [40] dient dazu, durch einen Permanentmagneten die Polarisationsrichtung der von der Faser rückreflektierten Strahlung um insgesamt 90° gegenüber des vom Laser kommenden Lichts zu drehen. Diese so gedrehte Strahlung wird dann von einem vor den Magneten vorgeschalteten Polarisationsfilter absorbiert und kann nicht mehr in den Laser gelangen und dort zu größeren Instabilitäten der Laserleistung führen. Das in der Faser geführte Licht wird durch einen Polarisationscontroller geleitet. Mit diesem kann man durch mechanische Verdrehung der Single-Mode Faser die Polarisationsrichtung des geführten Lichts in die für den MZI-Chip optimale Ebene drehen. Schließlich wird das Licht in das Mach-Zehnder-Interferometer eingekoppelt. Um dies möglichst verlustfrei zu erreichen, wird die Faser relativ zum Chip optimal justiert und dann mit einem UV-Kleber fixiert. Ausgekoppelt wird das Licht am anderen Ende des Chips über eine Multimode-Faser, die ebenfalls in eine V-Grube geklebt wurde. Die Intensität des Lichts am Ende der Multimode Faser wird dann schließlich mit dem Lightwave-Multimeter gemessen.

7. Ergebnisse

7.1. Oberflächenmodifizierung der MZI-Oberfläche

Für sensorische Anwendungen in der flüssigen Phase ist eine kovalente Bindung der Beschichtung an die Wellenleiteroberfläche notwendig. Allerdings sind die in unserem Arbeitskreis etablierten Verfahren zur Beschichtung von Sensoroberflächen darauf ausgelegt, kovalente Bindungen an Glas (Siliziumdioxid) zu erzeugen, d.h sie setzen die Existenz bzw. Erzeugbarkeit von Hydroxy-Gruppen an der Oberfläche voraus. Bei der Literaturrecherche zur Beschichtung von Siliziumnitrid ergab sich nur ein Artikel [80], der die kovalente Bindung von Biomolekülen an Siliziumnitrid beschreibt. Allerdings wird im angegebenen Artikel die Bindung photochemisch erhalten. Da photochemische Prozeduren unter Umständen teuer und aufwendig sind, wurde versucht, auf der Nitridoberfläche eine dünne Oxidschicht zu erzeugen, um dann mit leicht abgewandelten bereits etablierten Standard-Methoden der Oberflächenchemie auf Glas weiterarbeiten zu können. Mit der hier ermittelten Prozedur gelang dies mit gutem Erfolg. Sie ist ebenfalls im Detail in der von mir betreuten Arbeit [81] dokumentiert.

7.1.1. Optimierung der Hydroxylierung

Um einen möglichst schonenden Prozeß für die Erzeugung von Hydroxy-Gruppen an die Wellenleiteroberfläche zu finden, wurden unterschiedliche Prozeduren an Silizium-Waferstücken, die mit 70 nm Siliziumnitrid durch einen CVD-Prozess beschichtet waren, durchgeführt. Das Si_3N_4 auf den Silizium-Stücken wurde mit dem gleichen Prozeß auf der gleichen Maschine abgeschieden, die auch für die Herstellung der MZI benutzt wurde. Folgende Behandlungen wurden an den Si_3N_4 -Oberflächen getestet:

- Reinigung mit einer RCA1-Lösung (der Prozeß wurde nach Radio Corporation of America benannt, wo er wohl erstmals verwendet wurde). Die Plättchen werden 10 Minuten bei 80°C in einer Lösung aus H_2O_2 , NH_4OH und H_2O im

Verhältnis 1:1:5 gereinigt.

- Reinigung mit Piranha-Lösung. Die Plättchen werden 15 min in einem Ultraschallbad in einer Lösung aus H_2SO_4 konz. und H_2O_2 im Verhältnis 2:1 gereinigt.
- Oxidation mit Sauerstoffplasma. Zur Oxidation werden die trockenen Chips nach der Vorreinigung mit RCA in eine offene Petrischale gegeben und in einen Sauerstoffplasmaverascher (Plasma System 100-E der Technics Plasma GmbH) gestellt. Dort wird der Chip dem O_2 -Plasma 30 Minuten lang bei 300 W und einem Sauerstoffdruck von 0,8 mbar ausgesetzt.

Als Vergleich für die Kontaktwinkelmessungen dienten ein handelsüblicher Glasobjektträger und ein nur mit nativem Oxid beschichtetes Siliziumplättchen, die beide mit Piranha gereinigt wurden. Vor und nach jedem Schritt wurden sowohl Kontaktwinkelmessungen als auch Messungen mit einem spektralen Ellipsometer durchgeführt. Ein kleiner Kontaktwinkel von Wasser auf der Oberfläche bedeutet in unserem Fall eine große Anzahl von Hydroxy-Gruppen an der Oberfläche (andere mögliche polare Gruppen sollten bei diesen Prozessen nicht entstehen) [82]. Die ellipsometrischen Messungen dienen dazu herauszufinden, wie schonend ein Prozess für die Si_3N_4 -Schicht verläuft. Als ellipsometrisches Schichtmodell wurde Silizium als Substrat, eine 2 nm dicke native SiO_2 -Schicht und schließlich das abgeschiedene Si_3N_4 angenommen. Nach dem Oxidationsvorgang wurde eine zusätzliche Schicht aus SiO_2 angenommen. Die Ergebnisse der verschiedenen Prozeduren sind in Tabelle 7.1 zu sehen. Es zeigt sich, daß die O_2 -Plasma-Prozedur laut Ellipsometerdaten am schonendsten für die Si_3N_4 -Schicht ist und laut Kontaktwinkelmessungen am effektivsten für die Bildung von Hydroxy-Gruppen auf der Oberfläche ist. Der Kontaktwinkel ist beinahe so klein wie der auf normalen Glas nach einer Reinigung mit Piranha. Der Nitridabtrag ist sehr gering. Nebenbei ist Tabelle 7.1 auch zu entnehmen, daß sich der Chip bei der 12-stündigen Behandlung mit RCA stark verändert zu haben scheint. Physikalisch ist ein Aufwachsen einer SiO_2 -Schicht um die 30 nm ohne gleichzeitigen Abtrag der Si_3N_4 -Schicht kaum möglich, dennoch ist eindeutig, daß mit der Oberfläche während dieser naßchemischen Behandlung von zwölf Stunden einiges passiert sein muß. Eine genauere Analyse wurde jedoch nicht vorgenommen, da diese Prozedur aufgrund der starken Oberflächenveränderungen ohnehin nicht ausgewählt wurde.

Oberfläche	vor Prozedur		Prozedur	nach Prozedur	
	Kontaktwinkel	Ellipsometrie		Kontaktwinkel	Ellipsometrie
Si ₃ N ₄	60°	2nm SiO ₂ + 70,36nm Si ₃ N ₄	10 min RCA + O ₂ -Plasma	6°	2nm SiO ₂ + 69,62nm Si ₃ N ₄ + 3,34nm SiO ₂
Si ₃ N ₄	62°	2nm SiO ₂ + 72,48nm Si ₃ N ₄	10 min RCA bei 110°C	35° – 40°	2nm SiO ₂ + 69,97nm Si ₃ N ₄ + 0,24nm SiO ₂
Si ₃ N ₄	62°	2nm SiO ₂ + 70,87nm Si ₃ N ₄	12 h RCA bei 70°C	10°	2nm SiO ₂ + 67,29nm Si ₃ N ₄ + 31,63nm SiO ₂
Si ₃ N ₄	60°	2nm SiO ₂ + 72,25nm Si ₃ N ₄	15 min Piranha	30°	2nm SiO ₂ + 70,32nm Si ₃ N ₄ + 2,0nm SiO ₂
Glas	40°	–	15 min Piranha	< 5°	–
Si	50°	–	15 min Piranha	25°	–

Tabelle 7.1.: Vergleich verschiedener Hydroxylisierungsmethoden in Bezug ihrer Effektivität und ihrer Auswirkungen auf das Substrat. Grau unterlegt ist die Glasreferenz sowie die schonende und effektive Prozedur mit O₂-Plasma

7.1.2. Silanisierung

Die Silanisierung dient der kovalenten Bindung von Aminodextran über die Silanschicht an den Wellenleiter. In [45] wurde für Glasoberflächen gezeigt, dass nur bei kovalenter Anbindung eine ausreichende Stabilität gegenüber der Regeneration gegeben ist. Aus diesem Grund wird sie in dieser Arbeit auch für Siliziumnitrid verwendet. Als Silanisierungsreagenz dient GOPTS. Die Chips werden in eine leere verschließbare Glaskammer gelegt. Mit einer Eppendorf-Pipette wird so viel GOPTS auf den Chip gegeben, dass die zu silanisierende Fläche damit bedeckt ist (ca. 10 μ l bei den MZI-Chips). Der Aufbau der MZI-Chips mit den Gräben an den Enden der V-Gruben bietet den Vorteil, dass sich das GOPTS bei vorsichtigem Aufgeben in der Mitte der Chips nur bis zu diesen Gräben ausbreitet und dann aufgrund der Oberflächenspannung stehen bleibt. Der Glasbehälter wird verschlossen und eine Stunde stehen gelassen. Anschließend werden die Chips vorsichtig herausgenommen, mit trockenem Aceton (< 0,1 % H₂O) gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Da die Oberfläche jetzt hydrolyseempfindlich ist, muss zügig weiterverarbeitet werden (Luftfeuchtigkeit!).

7.1.3. Beschichtung mit Aminodextran (AMD)

Die silanisierten Chips werden in eine verschließbare Glaskammer auf Abstandshalter (z.B. Plastikdeckel) gegeben, deren Boden mit Wasser bedeckt ist, um eine Sättigung der Kammer mit Wasserdampf zu erreichen. Die Chips werden dann wieder mit einer Eppendorf-Pipette komplett mit einer Lösung von AMD in Wasser (Massenverhältnis 1:8) bedeckt. Aminodextran ist Dextran, in dem Teile der Hydroxy- durch Aminogruppen ersetzt sind. Im hier verwendeten sind dies im Mittel 66 Aminogruppen pro Dextranmolekül bei einem Molgewicht des Dextrans von 170000. Mit geschlossenem Deckel darf die Reaktion zwei Stunden ablaufen, bevor die Chips herausgenommen werden. Reste des Beschichtungsmittels werden mit bidestilliertem Wasser abgespült und die Chips im Stickstoffstrom getrocknet.

7.1.4. Derivatisierung mit Atrazincaprionsäure (ACA)

Atrazincaprionsäure ist ein Derivat des Atrazins, bei dem die Ethyl- durch eine Hexansäuregruppe ersetzt wurde. Dadurch kann ACA über eine Peptidbindung kovalent an die Aminogruppen des AMD binden. Dennoch ist das ACA dem Atrazin ähnlich genug, dass der Anti-Atrazin-Antikörper spezifisch daran bindet. Die Chips kommen in eine Kammer analog der bei der Beschichtung mit AMD, diesmal

wird eine DMF (N,N'-Dimethylformamid) gesättigte Atmosphäre bereitgestellt. Eine Lösung aus 1 mg ACA, 10 μl DMF (trocken, < 0,1% H₂O) und 1,5 μl Diisopropylcarbodiimid (DIC) wird auf den zu derivatisierenden Teil des Chips gegeben und mit einem Glasplättchen abgedeckt. Hierbei dient das Glasplättchen zur gleichmässigen Verteilung der Derivatisierungslösung bei gleichzeitiger Verminderung der notwendigen Derivatisierungsmenge. Eine Abdeckung bei der Beschichtung mit AMD ist nicht sinnvoll, da sonst die Gefahr besteht, daß Chip und Glasplättchen zusammenkleben und sich nur schwer wieder trennen lassen. Der verwendete MZI-Chip könnte dabei zerstört werden. Um zu verhindern, dass Derivatisierungslösung auf den nicht zu derivatisierenden Teil des Chips fließt, kann dieser einseitig etwas unterlegt und das Glasplättchen so aufgelegt werden, daß überschüssige Lösung von der Mitte weg fließt. Nachdem über Nacht (15 h) derivatisiert wurde, wird das Glasplättchen entfernt, die Chips herausgenommen, mit DMF gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. In dieser Form ist die Beschichtung im trockenen Zustand mehrere Wochen haltbar.

7.2. Erste Messungen

Zur Charakterisierung des neuen Sensors wurde als biologisches Testsystem wiederum Atrazin/Anti-ACA verwendet. Wiederum wurde wie bei dem in Teil I entwickelten Sensorsystem Atrazin an die Sensoroberfläche kovalent angebunden und Anti-ACA Antikörper als Analyt verwendet. Die Bindungsreaktionen wurden zur leichteren Charakterisierung des Sensors im massentransportlimitierten Kinetikbereich detektiert. Um dies zu garantieren, wurden Antikörperkonzentrationen von höchstens 2,5 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ in Lösung verwendet. Eine erste hier präsentierte Messung ist in Abbildung 7.1 gezeigt. Nach Gleichung 5.28 sollte das Meßsignal durch die Anlagerung des Antikörpers an das Meßfenster cosinusförmig moduliert werden und eine Modulationstiefe in der Größenordnung der Höhe des Meßsignals besitzen. Beides ist hier nur begrenzt erfüllt. Die Modulationstiefen der einzelnen Extrema sind zu gering und in ihrer Höhe uneinheitlich. Dieser unerwünschte Effekt kommt durch Überlagerung von externem Licht, das sich im System, aber nicht im Wellenleiter befindet und dem im Wellenleiter geführten und für die Sensorik interessanten Licht zustande. Um zu überprüfen, ob dieses doch sehr unregelmäßige Signal tatsächlich von der Anbindungsreaktion herrührt, wurden den einzelnen Extrema der Meßkurve Parabeln einbeschrieben und deren Scheitelpunkte aus den bestimmten Kurvenparametern berechnet. Trägt man diese Phasen (die

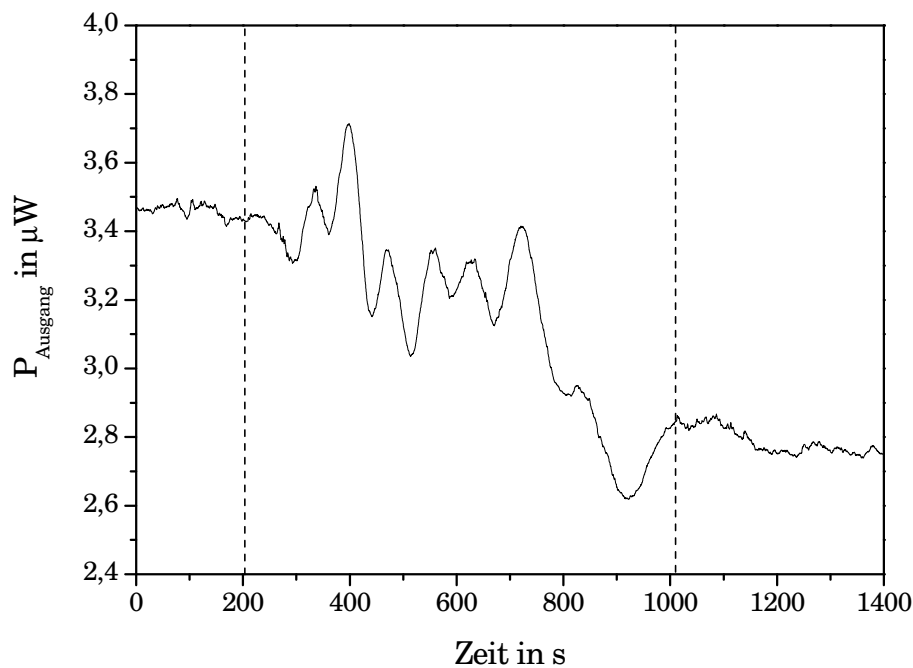


Abbildung 7.1.: Detektion einer Bindungskinetik mit einer Anti-ACA-Konzentration von $2 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$.

Phasenänderung zwischen jedem Extremum beträgt π) gegen die so ermittelten Zeitpunkte der Extrema auf, so erhält man die in Abbildung 7.2 dargestellte relativ überzeugende Linearität zwischen Phasenverschiebung und Zeit, wie es von einer massentransportkontrollierten Bindungskinetik zu erwarten ist. Außerdem kann man trotz dieser nicht vollständigen Einkopplung in den Wellenleiter erkennen, daß die Phasenänderung, d.h. die absolute Anzahl der Modulationen bei diesem Sensor, die durch die Anbindung des Analyten an die Sensoroberfläche hervorgerufen werden, im Vergleich zu RfS und der 1λ -Reflektometrie um ein Vielfaches größer ist. Diese überragende Signaldynamik wird allerdings leider durch ein sehr großes Rauschen zunichte gemacht. So ist es nur sehr schwer möglich, überhaupt den Anfangszeitpunkt der Bindungsreaktion zu bestimmen. Um dies zu verdeutlichen, wird in Abbildung 7.3 eine Messreihe mit vier verschiedenen Anti-ACA Konzentrationen gezeigt. Zwar steigt, wie erwartet bei massentransportlimitierten Bindungskinetiken, die Phasenänderung pro Zeit in etwa linear mit der Antikörperkonzentration in der Lösung an, dennoch kann man erkennen, daß das Rauschen im Verhältnis zur Modulationstiefe des Signals so groß ist, daß eine exakte quantitative Analyse nur sehr schwer möglich ist.

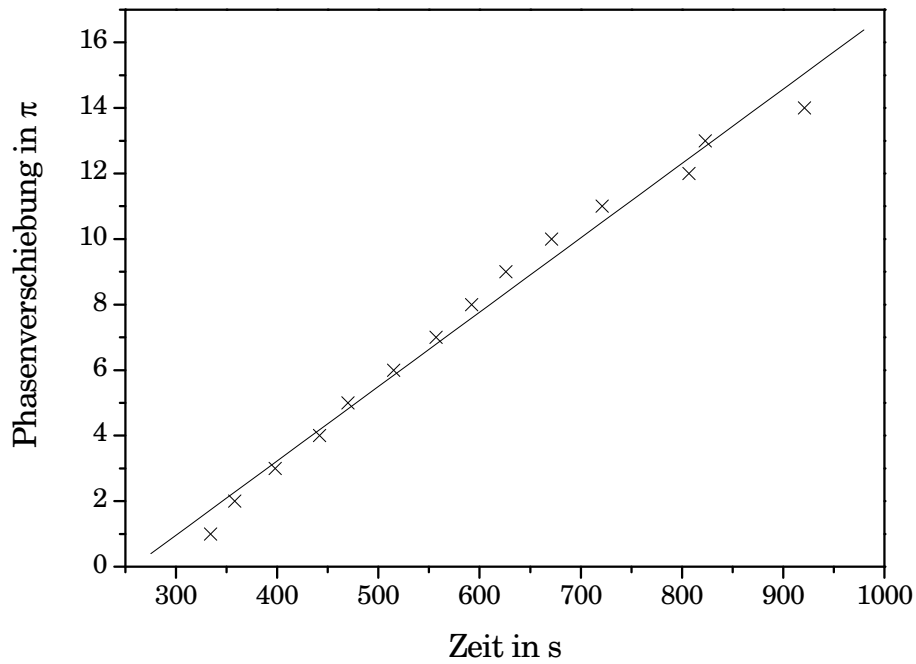


Abbildung 7.2.: Auftrag der Extrema aus Abbildung 7.1 gegen die Zeit inklusive einem Linearfit.

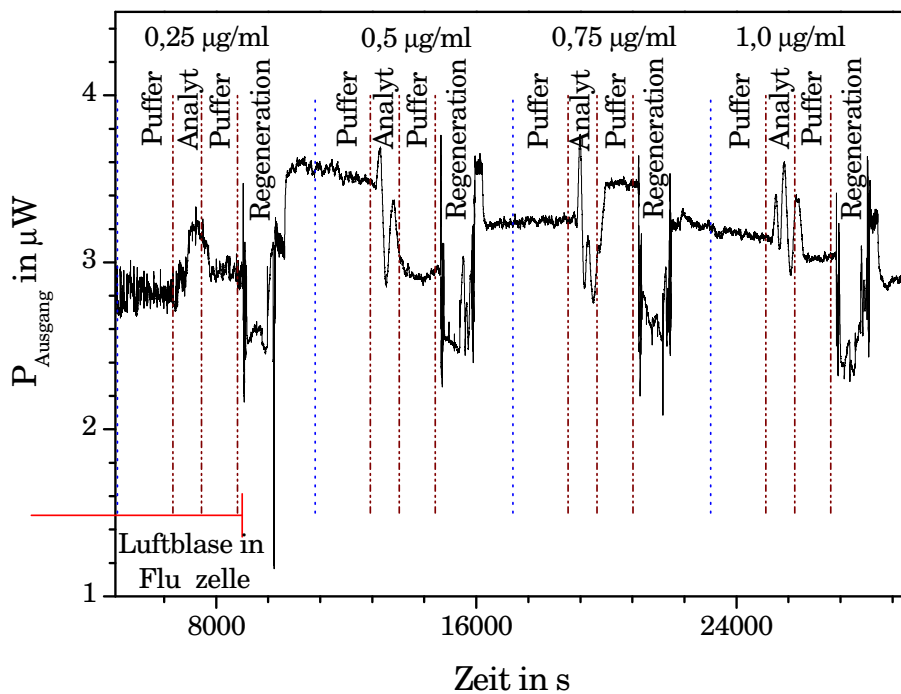


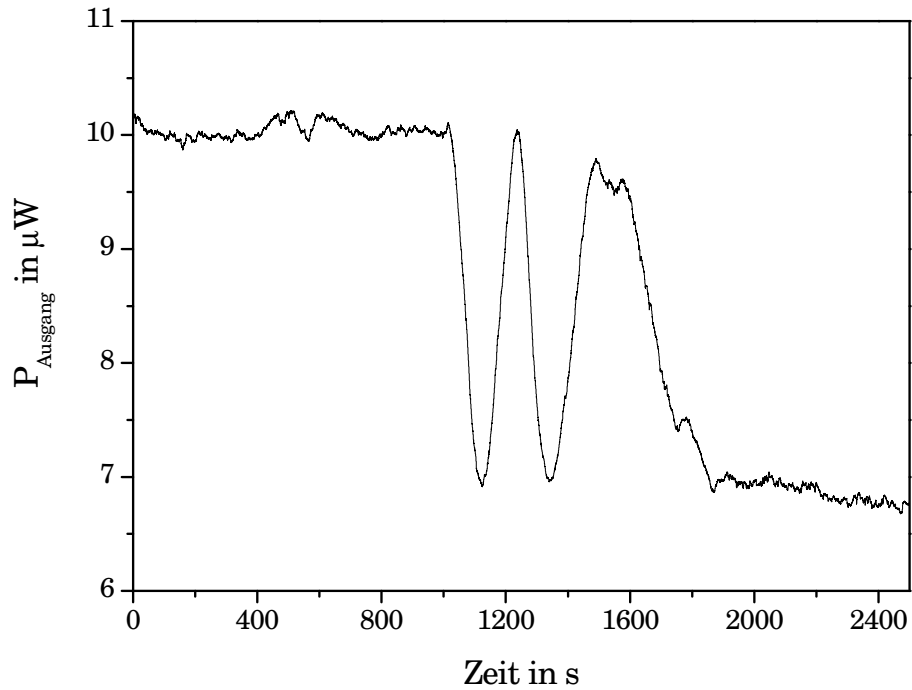
Abbildung 7.3.: Untersuchungen zur Linearität der Phasenänderung mit verschiedenen Anti-ACA-Konzentrationen.

7.3. Verbesserte Messungen

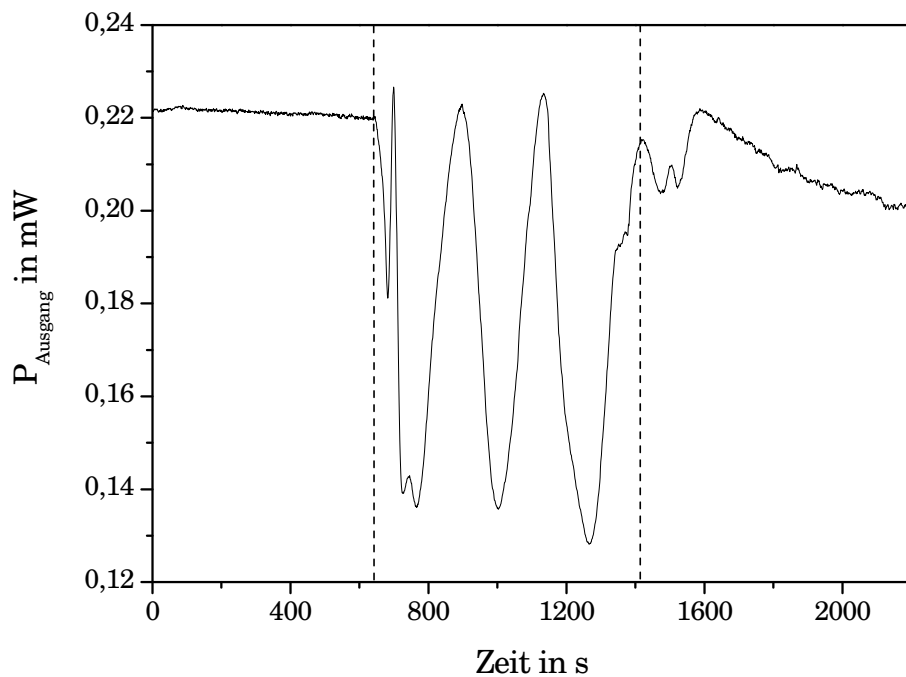
Bei größerer Einkoppeleffizienz wird die Modulationstiefe des Signals größer und gleichmäßiger, der Anteil von unerwünschtem Licht im System wird geringer, die Gesamtintensität nimmt zu. Man kann in den Abbildungen 7.4 deutlich eine cosinusförmige Modulation erkennen. Zudem sinkt das Signal/Rausch Verhältnis bei einer verbesserten Einkopplung enorm. Es ist aber auch hier erkennbar, daß das Rauschen im Vergleich zu RIfS und der 1λ -Reflektometrie neben der größeren Signaldynamik ebenfalls um einiges größer ist. Während beim MZI das Rauschen im Prozentbereich liegt, werden bei RIfS und der 1λ -Reflektometrie schon Bindungsreaktionen in diesem Bereich gemessen. Dies zeigt das große Potential dieses integriert optischen Mach-Zehnder-Interferometers, wenn man das Rauschen, dessen Ursache im übrigen hauptsächlich in der Intensitätsstabilität des im Wellenleiter geführten Laserlichts liegt, in den Griff bekommen würde. Gleichzeitig wird allerdings auch die Schwierigkeit einer optimalen Einkopplung bei solchen beschichteten Wellenleiterstrukturen sichtbar. Die mechanische Empfindlichkeit der Sensorchips, dazu noch eine aufmontierte Flußzelle und schließlich das Ankleben der Faser zusammen gesehen, stellen einen recht hohen experimentellen Aufwand im Vergleich zur RIfS-Methodik dar.

7.4. Vergleich mit anderen integriert optischen Sensorsystemen

Um zu zeigen, daß die Konstruktion eines MZI nach den in Abschnitt 5.3.3 ermittelten optimalen Parametern gegenüber den bisher in Tübingen verwendeten MZI eine größere Signaldynamik bringt, stellen wir die Messungen des neuen MZI einer Messung aus [25] gegenüber. Obwohl die Messungen nicht 1:1 verglichen werden können, kann man dennoch qualitativ sehr gut erkennen, daß bei beiden Antigen-Antikörper Bindungsreaktionen in der Signaldynamik erhebliche Unterschiede zwischen den verschiedenen MZI bestehen. Während bei dem in dieser Arbeit behandelten MZI Intensitätsmodulationen von mehreren π bei der Anbindung von Antikörpern an die Sensoroberfläche auftreten bei Antikörperkonzentrationen, die eine massentransportlimitierte Kinetik erlauben (bis $2,5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$), ist in Abbildung 7.5 eine diffusionslimitierte Bindungskinetik mit vielfach höherer Antikörperkonzentration zu sehen, ohne daß dabei Intensitätsmodulationen über mehrere π zu beobachten sind. In dieser Hinsicht macht sich die optimierte Geometrie und



(a) Detektion einer Bindungskinetik mit einer Anti-ACA-Konzentration von $2 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ bei einer verbesserten Einkopplung ($P \approx 7 - 10 \mu\text{W}$).



(b) Detektion einer Bindungskinetik mit einer Anti-ACA-Konzentration von $2,5 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ bei einer nochmals verbesserten Einkopplung ($P \approx 150 - 220 \mu\text{W}$).

Abbildung 7.4.: Abhängigkeit des Signal-Rausch-Verhältnisses und der Signaldynamik von der Einkoppeleffizienz.

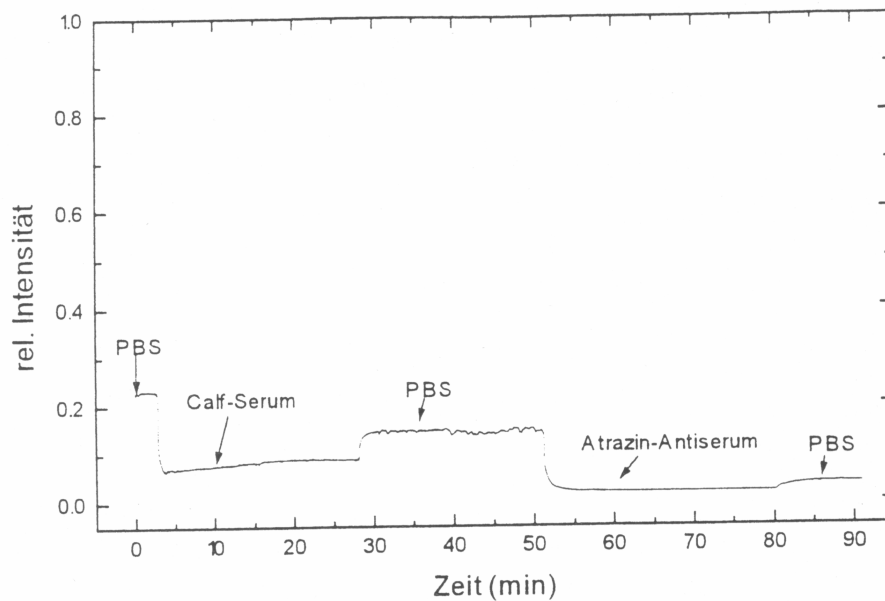


Abbildung 7.5.: Kopie einer Antigen-Antikörper-Messung eines in unserem Arbeitskreis früher verwendeten MZI [25].

der erhöhte technische Aufwand, den man unter anderem beim Einkoppeln ohne Zweifel hat, bezahlt. In [81] wurden weitere Sensorsysteme anderer Gruppen ([19], [21], [23], [26], [27]) mit unserem Sensor, soweit dies möglich war, verglichen (man muß hinzufügen, daß wir im Gegensatz zu manch anderen Systemen die selektive Schicht kovalent an die Sensoroberfläche angebunden und im Fluß gemessen haben). Dabei stellte sich heraus, daß die Signaldynamik anderer Systeme vergleichbar groß waren, wenn sie in gleicher Weise für biosensorische Anwendungen optimiert wurden. Ansonsten war die Signaldynamik unseres Sensors größer.

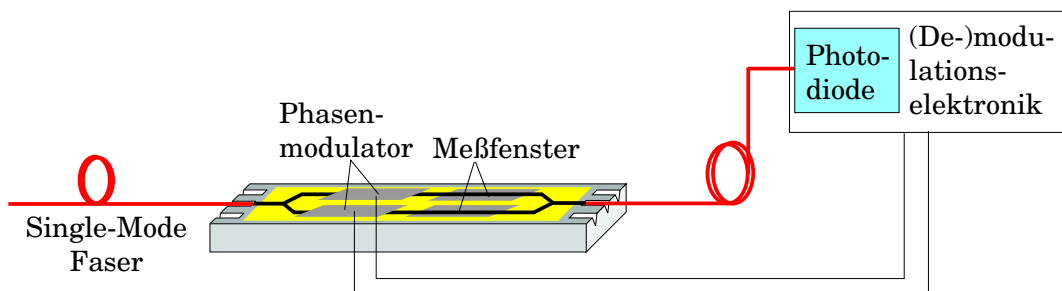
7.5. Zukünftige Verbesserungen des Sensors

In Abschnitt 7.3 sowie in Langzeitmessungen wird die ungenügende zeitliche Stabilität des im Wellenleiter geführten Laserlichts als ein großes Hindernis für ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis identifiziert. Man versucht daher mit einem elektrooptischen (De-)modulationsprinzip [72] von der bisherigen Umwandlung der von der Anbindung an die Sensoroberfläche hervorgerufenen Phasenverschiebung in eine Leistungs- oder Intensitätsänderung $\Delta\Phi \Rightarrow \Delta I$ wegzukommen zu einer Zeitdetektion $\Delta\Phi \Rightarrow \Delta t$, die besser gemessen werden kann.

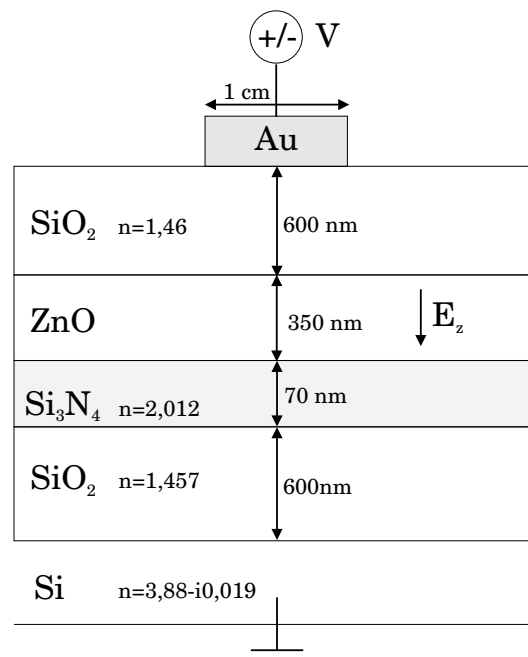
7.5.1. Die Idee des elektrooptischen Demodulationsprinzips

Es soll hier nicht die exakte Beschreibung dieses Prinzips hergeleitet werden, sondern nur die Idee dahinter plausibel gemacht werden. Die Beschreibung des Modulationsprinzips für diesen Sensor ist in [72] im Detail beschrieben, eine Übersicht über verschiedene elektrooptische Prinzipien kann in [83] nachgelesen werden.

Das Mach-Zehnder-Interferometer mit ZnO-Elektroden



(a) Schema eines MZI mit einer elektrooptischen Einheit.



(b) Querschnitt durch ein MZI mit elektrooptischer Einheit.

Abbildung 7.6.: Mach-Zehnder Interferometer mit einer elektrooptischen (De-)modulationseinheit.

Um ein elektrooptisches Modulationsprinzip überhaupt anwenden zu können, muß das Sensordesign entsprechend angepaßt werden. Zu diesem Zweck wird auf bei-

den Wellenleiterarmen jeweils noch ein elektrooptischer Phasenmodulator in Form einer ungefähr 350 nm dicken ZnO-Schicht und einer Gold-Elektrode aufgedampft [72], [84], [85]. Ein Schema dieser Anordnung ist in Abbildung 7.6 gezeigt. Bei Anlegen einer Spannung an die ZnO-Schicht werden die optischen Eigenschaften dieser Schicht verändert, was beim Mach-Zehnder Interferometer schließlich zu einer Phasenverschiebung führt.

Das elektrooptische Demodulationsprinzip

Mit dem gerade beschriebenen Mach-Zehnder Interferometer werden nun Messungen folgendermaßen durchgeführt [72]:

- An die ZnO-Elektrode wird eine Dreiecksspannung angelegt. Die Frequenz der Spannung liegt im Bereich von 10 Hz, die Amplitude wird so eingestellt, daß nach einer Halbperiode die Phasenverschiebung 2π am MZI auftritt. Es ist jetzt nicht mehr eine Langzeitstabilität des Lasers notwendig, man setzt jetzt nur noch eine Intensitätsstabilität über einen Zeitraum von ungefähr 0,1 s voraus, was viel leichter zu erreichen ist. Wichtig aber ist, daß die Amplitude der angelegten Spannung immer so über eine entsprechende Steuerung geregelt wird, daß man immer eine konstante Phasenverschiebung im Interferenzsignal von 2π hat.
- Durch die Elektronik werden die Wendepunkte des Intensitätssignals des MZI auf 0 gesetzt.
- Danach wird das Signal digitalisiert. Dabei ist der Wert 0 die Digitalisierungsschranke, alle Werte <0 werden zu 0 und alle Werte >0 werden auf ein Standard TTL-Level (z.B. 5 V) gesetzt. Der Beginn eines TTL-Signals wird als Startpunkt für die Zeitmessung verwendet.
- Die zeitliche Länge des TTL-Signals während einer Halbperiode der Dreiecksspannung $\frac{1}{2} \cdot T_{\Delta}$ bleibt immer konstant. Sie ist immer $\frac{1}{4} \cdot T_{\Delta}$.
- Wenn jetzt über eine Anbindung von Analyt an die Sensoroberfläche eine weitere Phasenverschiebung am MZI induziert wird, beginnt das Interferenzmuster und das TTL-Signal zu „laufen“. Dabei werden für jeden Durchlauf einer Halbperiode der Dreiecksspannung zweimal die Wendepunkte passiert. Man kann somit durch eine abrupte Änderung der gemessenen Zeit auf eine Phasenverschiebung von 2π schließen.

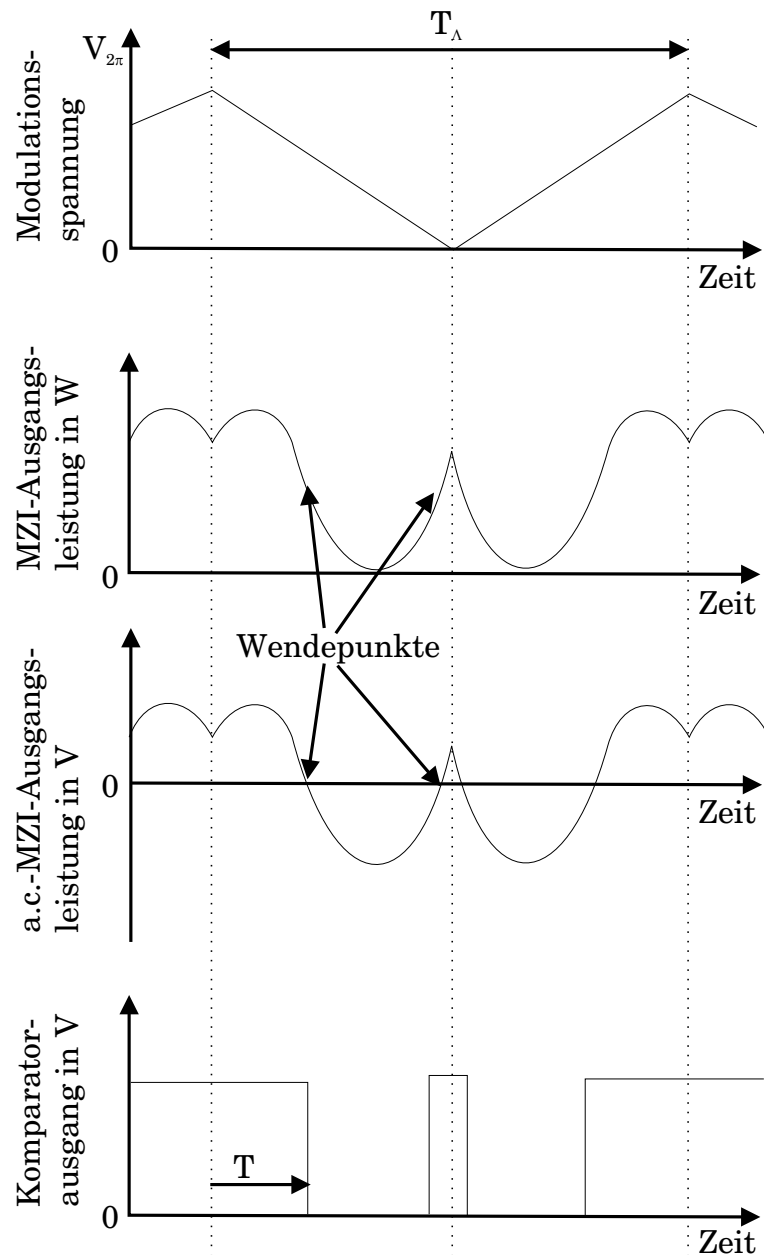


Abbildung 7.7.: Skizze zum elektrooptischen Demodulationsprinzip.

Somit läßt sich insgesamt die relative Phasenverschiebung mit dem elektrooptischen Demodulationsprinzip zu

$$\Delta\varphi = \left(\frac{T}{T_\Lambda}\right) 4\pi + m \cdot 2\pi \quad (7.1)$$

mit $m \in \mathbb{N}_0$ bestimmen. An Gleichung 7.1 kann man ganz klar erkennen, daß zur Bestimmung der entstehenden Phasenverschiebung durch eine Anbindung an den Meßarm des MZI im Prinzip Zeiten gemessen werden. Zeitliche Intensitätsstabilitäten der Laserlichtquelle sind nur noch im Bereich von T_Λ notwendig, nicht mehr über viele Minuten oder gar Stunden. Zudem ist die Signaldynamik über einen sehr weiten Bereich linear. Allerdings ist der technische Aufwand nochmals um einiges größer. Auf Messungen mit MZI mit diesem neuen Konzept darf man gespannt sein. Sie werden zur Zeit vorbereitet.

8. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden theoretisch und experimentell zwei verschiedene Sensorsysteme behandelt. Zum einen wurde die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS) im Detail untersucht, eine Methode die empfindlich auf Änderungen der optischen Schichtdicke an der Sensoroberfläche reagiert. Ausgehend von dieser seit vielen Jahren etablierten und in verschiedensten Anwendungen bestätigten Methode wurde festgestellt, daß man Reflektivitäten für die Detektion von bioanalytischen Wechselwirkungen auch in anderer Weise nutzen kann. Beim RIfS-Prinzip wird großer Wert auf die spektrale Detektion des reflektierten Lichts gelegt. Für die Auswertung dieses Interferenzspektrums mit einem Polynomfit zweiter Ordnung muß ein spezielles optisches Schichtsystem verwendet werden. Durch diese Einschränkungen (spektrale Detektion und Einsatz von bestimmten Trägern) werden andere Aspekte von Reflektivitäten nicht berücksichtigt. Diese Einschränkungen wurden bei den Untersuchungen dieser Arbeit aufgehoben. Dabei wurde festgestellt, daß es möglich ist, Bindungsreaktionen mit nur einer Wellenlänge und trägerunabhängig zu detektieren. Die Signaldynamik allerdings ist von der verwendeten Wellenlänge und der Wahl des Trägers abhängig. Diese Untersuchungen wurden experimentell bestätigt. Damit wurde nachgewiesen, daß Biosensorik mit einem überaus einfachen Prinzip auf unterschiedlichsten Trägern betrieben werden kann. Es wurden auf unterschiedlichen Trägersystemen sowohl Antigen-Antikörper Wechselwirkungen als auch DNA-DNA Hybridisierungen mit der Methode der 1λ -Reflektometrie erfolgreich detektiert. Dabei war die Qualität der Messungen absolut vergleichbar mit der seit vielen Jahren etablierten RIfS-Methodik. Die Einfachheit und die Universalität dieser 1λ -Reflektometrie versprechen eine vielseitige Anwendung der Methode für verschiedenste Einsatzgebiete. So ist eine Miniaturisierung oder Parallelisierung dieses Prinzips aufgrund seiner Einfachheit technisch relativ einfach zu realisieren. Es ist weder eine Winkel- noch eine spektrale Auflösung erforderlich, deren Realisierung besonders bei parallelisierten Ansätzen technologisch aufwendig ist. Außerdem ist durch die bestehende Trägerunabhängigkeit der Methode eine Kopplung mit anderen Prinzipien leichter vorstellbar.

Neben der Trägerabhängigkeit der Signaldynamik wurde auch deren Abhängigkeit vom Einfallswinkel des Lichts untersucht. Simulationen ergeben eine Erhöhung der Signaldynamik um ungefähr einen Faktor 50. Die optimierte Anpassung des Einfallswinkels hat viel mehr Potential als die des optischen Trägersystems. Weitergehende experimentelle Untersuchungen zu dieser theoretischen Aussage wären sicherlich interessant.

Als zweites Sensorprinzip wurde ein integriert optisches Mach-Zehnder Interferometer untersucht. Analog zu den bei der Entwicklung der 1λ -Reflektometrie gemachten Untersuchungen zur Optimierung des Sensorprinzips wurde auch hier der Fokus auf eine Maximierung der Signaldynamik gelegt. Gemäß der Theorie wurden optimierte integriert optische MZI eines ausgesuchten Herstellers verwendet, deren Dimensionierungen für biosensorische Anwendungen angepaßt wurden. Aufgrund der daraus resultierenden Wahl des Wellenleitermaterials (Si_3N_4) mußte ein neues Protokoll für die kovalente Anbindung der selektiven Schicht an die Sensoroberfläche erarbeitet werden. Durch den Einsatz eines materialschonenden Sauerstoffplasmas ist es gelungen, die Si_3N_4 -Oberfläche erfolgreich zu hydroxilisieren. Dadurch war es möglich, die bei uns bereits bestehende und seit vielen Jahren erprobte Oberflächenchemie auf SiO_2 in vielen Teilen zu übernehmen und es konnten Messungen an kovalent an die Sensoroberfläche gebundene selektiven Schichten im Analytfluß durchgeführt werden. Die Ergebnisse am Antigen-Antikörper System Atrazin/Anti-ACA weisen eine im Vergleich zu RIfS und auch zur 1λ -Reflektometrie um Größenordnungen höhere Signaldynamik dieses optimierten integriert optischen Sensors auf. Leider muß an dieser Stelle hinzugefügt werden, daß bisher auch das Rauschen des Sensorsystems noch so groß ist, daß dieser Vorteil gegenüber den anderen Methoden zunichte gemacht wird. Eine wesentliche Ursache dieses großen Rauschens ist die relativ geringe Leistungsstabilität der Laserlichtquelle. Um unabhängig von dieser Größe zu werden, werden neue Mach-Zehnder Interferometer mit einer elektrooptischen Komponente eingesetzt. Mit einem Modulationskonzept ist nicht mehr die Lichtleistung die relevante zu messende Größe, sondern es werden Zeiten gemessen.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit die beiden verschiedenen Detektionsprinzipien Reflektometrie und integrierte Optik behandelt. Für beide Prinzipien wurden die optimalen äußeren Parameter und Dimensionierungen der jeweiligen Sensorchips ausgewählt, um im Anwendungsgebiet Biosensorik Bindungsereignisse mit einer möglichst großen Signaldynamik zu detektieren. Dabei wurde mit der 1λ -Reflektometrie ein neues Konzept entwickelt, das einfach ist und sehr gute Meßergebnisse liefert. Zudem wurde gezeigt, welches großes Potential prinzipiell in

integriert optischen Biosensoren steckt, aber auch welche Hindernisse noch überwunden werden müssen.

A. Optische Parameter der Materialien

A.1. Materialien mit Cauchy-Parametrisierung

Der Brechungsindex $n(\lambda)$ lässt sich für einige dielektrische Materialien durch die empirisch entwickelte Cauchy-Gleichung beschreiben:

$$n(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda^2[\text{nm}]} + \frac{C}{\lambda^4[\text{nm}]} + \dots \quad (\text{A.1})$$

Die Größen A, B, C, \dots heißen Cauchy-Parameter. Generell reichen die ersten beiden oder drei Parameter für eine gute Annäherung an den tatsächlichen Brechungsindexverlauf.

	A	B in nm ²	C in nm ⁴
D263	1,51055	$4,65424316 \cdot 10^3$	$5,702996263956 \cdot 10^7$
Ta ₂ O ₅	2,18853	0	$5,0055939162 \cdot 10^{10}$
SiO ₂	1,44759	$3,6818914 \cdot 10^3$	0
H ₂ O	1,32841	$1,31227235 \cdot 10^3$	$4,98449202538 \cdot 10^7$

Tabelle A.1.: In Simulationen verwendete Cauchy-Parameter.

A.2. Brechungsindextabellen

A.2.1. BK7-Glas

λ in nm	n	k	λ in nm	n	k	λ in nm	n	k
210,14	1,63056	0	213,76	1,62349	0	217,51	1,61689	0
221,39	1,61074	0	225,42	1,60499	0	229,59	1,59961	0
233,92	1,59457	0	238,42	1,58983	0	243,10	1,58538	0

247,96	1,58119	0	253,02	1,57723	0	258,29	1,57348	0
263,79	1,56993	0	269,52	1,56657	0	275,51	1,56337	0
281,77	1,56033	0	288,33	1,55743	0	295,19	1,55466	0
302,39	1,55201	0	309,95	1,54948	0	317,90	1,54705	0
326,26	1,54473	0	335,08	1,54250	0	344,39	1,54036	0
354,23	1,53830	0	364,65	1,53633	0	375,70	1,53443	0
387,44	1,53261	0	399,94	1,53085	0	413,27	1,52917	0
427,52	1,52755	0	442,79	1,52600	0	459,19	1,52450	0
476,85	1,52307	0	495,92	1,52169	0	516,58	1,52036	0
539,04	1,51909	0	563,55	1,51786	0	590,38	1,51668	0
619,90	1,51554	0	652,53	1,51444	0	688,78	1,51337	0
729,29	1,51232	0	774,87	1,51129	0	826,53	1,51027	0
885,57	1,50924	0	953,69	1,50817	0	1033,17	1,50705	0
1127,09	1,50583	0	1239,80	1,50444	0			

Tabelle A.2.: Verwendete optische Parameter von BK7-Glas.

A.2.2. Amorphes Silizium

λ in nm	n	k	λ in nm	n	k
206,75	1,10678	3,01087	211,09	1,16577	3,11234
216,26	1,25622	3,23362	221,63	1,34757	3,32437
227,38	1,46080	3,40787	233,57	1,58304	3,49016
239,90	1,73147	3,56259	246,42	1,89596	3,64796
253,65	2,08411	3,72795	261,27	2,30196	3,80160
269,51	2,53103	3,83926	277,79	2,77403	3,86262
286,91	3,04821	3,85046	296,32	3,33967	3,82041
307,09	3,65738	3,74383	317,99	4,00371	3,60082
329,95	4,34034	3,39921	342,26	4,64239	3,17257
357,09	4,86741	2,90153	371,93	5,02355	2,61217
387,77	5,12891	2,25661	406,05	5,17584	1,90901
425,64	5,17421	1,61190	447,60	5,13743	1,34244
470,92	5,07095	1,09120	497,55	4,97857	0,86520
527,53	4,86738	0,66786	562,46	4,75200	0,49055
600,42	4,61728	0,33003	644,55	4,47205	0,21974

λ in nm	n	k	λ in nm	n	k
693,07	4,34163	0,11835	751,11	4,20609	0,04516
824,41	4,08913	0,03246			

Tabelle A.3.: Verwendete optische Parameter von amorphem Silizium.

A.2.3. Aluminium

λ in nm	n	k	λ in nm	n	k
206,63	0,13000	2,39000	210,14	0,13400	2,44000
213,76	0,13900	2,49000	217,51	0,14400	2,53000
221,39	0,14900	2,59000	225,42	0,15500	2,64000
229,59	0,16200	2,70000	233,92	0,16800	2,76000
238,42	0,17600	2,82000	243,10	0,18300	2,88000
247,96	0,19000	2,94000	253,02	0,19700	3,01000
258,29	0,20500	3,07000	263,79	0,21300	3,15000
269,52	0,22300	3,22000	275,51	0,23300	3,30000
281,77	0,24400	3,38000	288,33	0,25500	3,47000
295,19	0,26700	3,55000	302,39	0,28000	3,64000
309,95	0,29400	3,74000	317,90	0,31000	3,84000
326,26	0,32600	3,95000	335,08	0,34400	4,06000
344,39	0,36400	4,17000	354,23	0,38500	4,30000
364,65	0,40700	4,43000	375,70	0,43200	4,56000
387,44	0,46000	4,71000	399,94	0,49000	4,86000
413,27	0,52300	5,02000	427,52	0,55800	5,20000
442,79	0,59800	5,38000	459,19	0,64400	5,28000
476,85	0,69500	5,80000	495,92	0,75500	6,03000
516,58	0,82600	6,28000	539,04	0,91200	6,55000
563,55	1,02000	6,85000	590,38	1,15000	7,15000
619,90	1,30000	7,48000	652,53	1,49000	7,82000
688,78	1,74000	8,21000	729,29	2,14000	8,57000
774,87	2,63000	8,60000	826,53	2,74000	8,31000
885,57	2,24000	8,21000	953,69	1,47000	8,95000
1033,17	1,26000	12,00000	1127,09	1,20000	11,20000
1239,80	1,21000	12,50000	1377,56	1,26000	14,00000
1549,75	1,44000	16,00000	1771,14	1,77000	18,30000

λ in nm	n	k	λ in nm	n	k
2066,33	2,27000	21,40000			

Tabelle A.4.: Verwendete optische Parameter von Aluminium.

Literaturverzeichnis

- [1] Biacore International AB, Rapsgatan 7, SE-75450 Uppsala. www.biacore.com
- [2] Analytik Jena AG, Konrad-Zuse-Straße 1, 07745 Jena. www.analytik-jena.de/
- [3] F. Hoffmann-La Roche Ltd, Diagnostics Division, Grenzacherstrasse 124 CH-4070 Basel. www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/lightcycler/
- [4] Fluoroscans Ascent, LabSystems, Finland.
- [5] B. Liedberg, C. Nylander, and I. Lundström, *Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing*, Sens. Actuators B 4 (1983), 299-304.
- [6] G. Gauglitz, *Direct optical sensors: principles and selected applications*, Anal. Bioanal. Chem. 381 (2005), 141-155.
- [7] R. Karlsson, *SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas*, J. Mol. Recognit. 17 (2004), 151-161.
- [8] S. Loefas, *Monitoring biomolecular interactions: observing real-time molecular binding with surface plasmon resonance*, Biochemist 26 (2004), 27-29.
- [9] Pharmacia Biosensors Sweden, BIA J. 2 (1995), 5.
- [10] N. Bassil, E. Maillart, M. Canva, Y. Levy, M.-C. Millot, S. Pissard, R. Narwa, and M. Goossens, *One hundred spots parallel monitoring of DNA interactions by SPR imaging of polymer-functionalized surfaces applied to the detection of cystic fibrosis mutations*, Sens. Actuators B 94 (2003), 313-323.

- [11] J. Homola, *Surface plasmon resonance biosensors for multianalyte detection*, Chemical Sensors (2004), 20(Suppl. B), 200-201.
- [12] C. Boozer, Q.-M. Yu, S.-F. Chen, C.-Y. Lee, and J. Homola, *Surface functionalization for self-referencing surface plasmon resonance (SPR) biosensors by multi-step self-assembly*, Sens. Actuators B 90 (2003), 22-30.
- [13] J. Homola, *Present and future of surface plasmon resonance biosensors*, Anal. Bioanal. Chem. 377 (2003), 528-539.
- [14] J. S. Shumaker-Parry, R. Aebersold, and C. T. Campbell, *Parallel, quantitative measurement of protein binding to a 120-element double-stranded DNA array in real time using surface plasmon resonance microscopy*, Anal. Chem. 76 (2004), 2071-2082.
- [15] G. J. Wegner, A. W. Wark, H. J. Lee, E. Codner, T. Saeki, S. Fang, and R. M. Corn, *Real-Time Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements for the Multiplexed Determination of Protein Adsorption / Desorption Kinetics and Surface Enzymatic Reactions on Peptide Microarrays*, Anal. Chem. 76 (2004), 5677-5684.
- [16] R. Cush, J. M. Cronin, W. J. Stewart, C. H. Maule, J. Molloy, and N. J. Goddard, *The resonant mirror: a novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions. Part I: principle of operation and associated instrumentation*, Biosens. Bioelectron. 8 (1993), 347-354.
- [17] D. Clerc and W. Lukosz, *Integrated-Optical Output Grating Coupler as Bio-Chemical Sensor*, Sensors and Actuators B 18-19 (1994), 581-586.
- [18] D. Clerc and W. Lukosz, *Real-time analysis of avidin adsorption with an integrated-optical output grating coupler: adsorption kinetics and optical anisotropy of adsorbed monomolecular layers*, Biosensors & Bioelectronics 12 (1997), 185-194.
- [19] J. Vöros, J.J. Ramsden, G. Csúcs, I. Szendrő, S.M. De Paul, M. Textor, N.D. Spencer, *Optical grating coupler biosensors*, Biomaterials 23 (2002), 3699-3710.
- [20] R. Horvath, G. Fricsovszky and E. Papp, *Biophysical application of the optical waveguide lightmode spectroscopy*, Cellular & Molecular Biology Letters 2001, 6:348-350.

- [21] W. Lukosz, *Integrated optical chemical and direct biochemical sensors*, Sensors and Actuators B 29 (1995), 37-50.
- [22] A. Brandenburg and A. Gombert, *Grating couplers as chemical sensors: a new optical configuration*, Sensors and Actuators B17 (1993), 35-40.
- [23] B. Drapp, J. Piehler, A. Brecht, G. Gauglitz, B.J. Luff, J.S. Wilkinson, J. Ingenhoff, *Integrated Optical Mach-Zehnder Interferometers as Simazine Immunoprobes*, Sens. Actuators B39 (1997), 277-282.
- [24] J. Ingenhoff, *Integrierte Optik-Bausteine in der Sensorik*, Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1994.
- [25] B. Drapp, *Berechnung optimaler Brechzahlprofile integriert optischer Mach-Zehnder Bausteine für die Anwendung als Biosensor und deren Vermessung*, Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1994.
- [26] A. Brandenburg, R. Krauter, C. Künzel, M. Stefan, H. Schulte, *Interferometric sensor for detection of surface-bound bioreactions*, Applied Optics, Vol.39 (2000), 6396-6405.
- [27] C. Hänel, *Parameteroptimierung für zwei Verfahren zur markierungsfreien Analyse biomolekularer Verbindungen*, Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2003.
- [28] A. Brandenburg, *Differential refractometry by an integrated-optical Young interferometer*, Sensors & Actuators B 38-39 (1997), 266-271.
- [29] W. Lukosz, Ch. Stamm, H.R. Moser, R. Ryf and J. Dübendorfer, *Difference-Interferometer with New Phase-Measurement Method as Integrated-Optical Humidity and Bio-Sensor*, Sensors and Actuators B, 38-39 (1997), 316-323.
- [30] A. Klotz, *Modellierung, Aufbau und Charakterisierung eines integriert optischen und faseroptischen Polarisationsinterferometers*, Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1995.
- [31] A. Klotz, A. Brecht, G. Gauglitz, *Channel waveguide mode beat interferometer*, Sens. Actuators B39 (1997), 310-315.

- [32] W. Nahm and G. Gauglitz, *Thin polymer films as sensors for hydrocarbons*, GIT Fachzeitschrift fuer das Laboratorium, 34(1990), 889-893.
- [33] A. Brecht, G. Gauglitz, and W. Nahm, *Interferometric measurements used in chemical and biochemical sensors*, *Analisis*, 20(1992), 135-140.
- [34] M. Rothmund, A. Brecht, G. Berthel, D. Gräfe, A. Schütz, and G. Gauglitz, *Label-free binding assay with spectroscopic detection for pharmaceutical screening*, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 359 (1997), 15-22.
- [35] M. Sauer, A. Brecht, K. Charisse, I. Stemmler, G. Gauglitz, and E. Bayer, *Interaction of Chemically Modified Antisense Oligonucleotides with Sense DNA: A Label-Free Interaction Study with Reflectometric Interference Spectroscopy*, *Anal. Chem.* 71 (1999), 2850-2857.
- [36] F. Yu, D.-F. Yao, and W.-P. Qian, *Reflectometry Interference Spectroscopy in Detection of Hepatitis B Surface Antigen*, *Clin. Chem.* 46 (2000), 1489-1491.
- [37] G. Gauglitz, *Multiple reflectance interference spectroscopy measurements made in parallel for binding studies*, *Rev. Sci. Instrum.* 76 (2005), 062224/1 - 062224/10.
- [38] A. Brecht, *Interferenzspektroskopische Untersuchung von Affinitätsreaktionen*, Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1993.
- [39] E. Hecht, *Optik*, Aus dem Engl. von Anna Schleitzer. 3., vollst. überarb. Aufl. - München ; Wien : Oldenbourg, 2001.
- [40] L. Bergmann, C. Schaefer, *Lehrbuch der Experimentalphysik*, Band 3 (3,9): Optik / Hrsg. Heinz Niedrig. 9. Aufl. - Berlin : de Gruyter, 1993.
- [41] H. Anders, *Dünne Schichten für die Optik*, Stuttgart : Wiss. Verl. Ges., 1965.
- [42] A. Vasícek, *Optics of thin films*, Amsterdam : North-Holl., 1960.
- [43] D.L. Caballero, *JOSA* 39 (1949), 1038.
- [44] G. R. Fowles, *Introduction to modern optics*, New York : Holt, Rinehart and Winston, 1968.

- [45] J. Piehler, *Thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit direkten optischen Transducern*, Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1997.
- [46] U. Schobel, *Aufbau, Charakterisierung und Optimierung eines homogenen Fluoroimmunoassays für die Affinitätsanalytik in Nanolitervolumina*, Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1999.
- [47] A. Jung, *Parallele, markierungsfreie Detektion biomolekularer Wechselwirkungen an Mikroarrays*, Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2003.
- [48] B. Moehrle, Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, wird veröffentlicht.
- [49] O. Birkert, *Markierungsfreies Hochdurchsatzscreening mittels reflektometrischer Interferenzspektroskopie*, Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2001.
- [50] J. Fraden, *Handbook of modern sensors*, 3. ed. - New York, NY ; Berlin ; Heidelberg : Springer, 2004.
- [51] K. Länge, *Einsatz der Fließ-Injektions-Analyse in markierungsfreien Bindungsassays*, Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2000.
- [52] D. Nopper, *Charakterisierung neuartiger sensitiver Materialien für optische Sensoren in flüssiger Phase*, Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2000.
- [53] *Coatings For Flat Panel Displays*, Datenblatt von Merck Display Technologies, Taiwan.
- [54] Persönliche Mitteilung von Dipl. biochem. Bernd Möhrle und Dipl. math. Michael Kumpf.
- [55] Telefonische Auskunft eines Mitarbeiters von mso-jena. mso jena Mikroschichtoptik GmbH, Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena.
- [56] H. Fouckhardt, *Photonik: eine Einführung in die integrierte Optoelektronik und technische Optik*, Stuttgart : Teubner, 1994.

- [57] M. Born, *Optik : ein Lehrbuch der elektromagnetischen Lichttheorie*, 2. Aufl. - Berlin : Springer, 1965.
- [58] W. Karthe, R. Müller, *Integrierte Optik*, 1. Aufl. - Leipzig : Akad. Verl.-Ges. Geest und Portig, 1991.
- [59] T. Tamir, E. Garmire, *Integrated optics*, Berlin ; Heidelberg : Springer, 1975.
- [60] E.A. Marcatili, *Dielectric rectangular waveguide and directional coupler for integrated optics*, Bell Syst. Techn. J. 48 (1969), 2071-2102.
- [61] J.E. Goell, *A circular-harmonic computer analysis of rectangular dielectric waveguides*, Bell Syst. Techn. J. 48 (1969), 2133-2166.
- [62] K.S. Chiang, *Review of numerical and approximate methods for the modal analysis of general optical dielectric waveguides*, Optical and Quantum Electronics, Vol. 26, 1994, 113-134.
- [63] G.B. Hocker, W.K. Burns, *Mode dispersion in diffused channel waveguides by the effective index method*, Appl. Opt. 16 (1977), 113-118.
- [64] D. Marcuse, *Theory of Dielectric Optical Waveguides, Second Edition*, Boston, Academic Press, 1991.
- [65] H.F. Taylor, *Dispersion characteristics of diffused channel waveguides*, IEEE J. Quant. Electron. QE-12 (1976), 748-752.
- [66] J. Ctyroky, M. Hofmann, J. Janta, J. Schröfel, *3-D analysis of LiNbO₃: Ti channel waveguides and directional couplers*, IEEE J. Quant. Electron. QE-20 (1984), 400-409.
- [67] T.P. Young, *Design of integrated optical circuits using finite elements*, Proc. IEEE 135 pt. A(3) (1988), 135-144.
- [68] T.P. Young, G.A. Armstrong, W.P. Smith, *Semiconductor finite elements for integrated optics*, Proc. Top. Meet. Integr. Guided Wave Opt. IGWO '88, Santa Fe, 1988.
- [69] R.V. Mustacich, *Scalar finite element analysis of electrooptic modulation in diffused channel waveguides and poled waveguides in polymer thin films*, Appl. Opt. 27 (1988), 3732-3737.

- [70] W.P. Huang, C.L. Xu, *Simulation of Three-Dimensional Optical Waveguides by a Full-Vector Beam Propagation Method*, IEEE Journal of Quantum Electronics, Vol. 29, 1993, 2630-2649.
- [71] B. Drapp, *Modellierung und Charakterisierung von integriert-optischen Wellenleitern im Zusammenwirken mit Polymerfilmen und flüssigkristallinen Schichten für die Umweltanalytik*, Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2001.
- [72] R.G. Heideman, P.V. Lambeck, *Remote opto-chemical sensing with extreme sensitivity: design, fabrication and performance of a pigtailed integrated optical phase-modulated Mach-Zehnder interferometer system*, Sensors and Actuators B 61 (1999), 100-127.
- [73] K. Tiefenthaler and W. Lukosz, *Sensitivity of Grating Couplers as Integrated Optical Chemical Sensors*, J. Opt. Soc. Am., B 6 (1989), 209-220.
- [74] O. Parriaux, G.J. Veldhuis, *Normalised analysis for the sensitivity optimisation of integrated optical evanescent wave sensors*, Journal of Lightwave Technology 16 (1998), 573-582.
- [75] V. Brioude and O. Parriaux, *Normalised analysis for the design of evanescent-wave sensors and its use for tolerance evaluation*, Optical and Quantum Electronics 32 (2000), 899-908.
- [76] G. Hunsperger, *Integrated Optics: Theory and Technology*, Springer-Verlag, Berlin, 1982.
- [77] H. Kogelnik, in *Integrated Optics*, Vol. 7 of Topics in Applied Physics, Springer-Verlag, Berlin, 1982, pp. 13-81.
- [78] LioniX BV, PO Box 456, 7500 AH Enschede, The Netherlands. www.lionixbv.nl/
- [79] K. Worhoff, *Optimised LPCVD SiO_xN_y-waveguides covered with calixarene for non-critically phase-matched second harmonic generation*, PhD Thesis, University of Twente, 1996.
- [80] H. Gao, R. Luginbühl, H. Sigrist, *Bioengineering of silicon nitride*, Sensors and Actuators B 38-39 (1997), 38-41.

- [81] G.P. Burth, *Aufbau und Test integriert-optischer Mach-Zehnder Interferometer zur Detektion von Schadstoffen in Wasser*, Zulassungsarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2004.
- [82] W. Göpel, Ch. Ziegler, *Einführung in die Materialwissenschaften: Physikalisch-chemische Grundlagen und Anwendungen*, Teubner Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1996.
- [83] T.J. Ikkink, *Interferometric interrogation concepts for integrated electro-optical sensor systems*, PhD Thesis, University of Twente, 1998.
- [84] H.H.P.Th. Bekman, K.W. Benoit, J.L.L. Joppe, *Post-deposition annealing of RF-sputtered zinc-oxide films*, Applied Surface Science 70/71 (1992), 347-350.
- [85] R.G. Heideman, P.V. Lambeck, J.G.E. Gardeniers, *High quality ZnO layers with adjustable refractive indices for integrated optics applications*, Optical Materials 4 (1995), 741-755.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Günter Gauglitz, für die interessante Aufgabenstellung, das fortwährende Vertrauen in meine Arbeiten sowie die vielfältigen Einsichten und Erfahrungen, die ich im Beantragen und Bearbeiten verschiedener Projekte gewinnen durfte.

Herrn Prof. Dr. Chassé gilt mein Dank für die freundliche Übernahme des Vorsitzes bei meiner Disputation.

Herrn Priv. Doz. Dr. Weimar danke ich für die Übernahme der Berichterstattung. Bei Herrn Prof. Dr. Zimmermann und Herrn Prof. Dr. Eibl möchte ich mich für die Teilnahme als Kommissionsmitglieder bei meiner Disputation bedanken.

Dieter Fröhlich danke ich vielmals für die zahlreichen, kritischen und sehr konstruktiven Diskussionen, für die er sich immer Zeit nahm und die mich in meiner Arbeit enorm weiterbrachten.

Außerordentlich bedanken möchte ich mich bei Bernd Möhrle für die biochemische Präparation der Kunststoff- und Glasträgeroberflächen sowie die Unterstützung bei den Messungen, die die Etablierung der 1λ -Reflektometrie erst möglich machten.

Kerstin Kröger sage ich Dank ich für Messungen von DNA-DNA-Hybridisierungen am RfS-System für die Charakterisierung desselben.

Philipp Burth und Thorsten Laib danke ich für die Unterstützung bei Messungen am Mach-Zehnder Interferometer.

Jochen Mehne spreche ich meinen Dank aus für die große Hilfe bei der Oberflächenmodifikation der Mach-Zehnder Interferometer sowie die gute Zusammenarbeit.

Bei Thorsten Laib und Matthias Vollprecht bedanke ich mich für die Entlastung bei der Bearbeitung des EU-Projektes MENDOS.

Bei Dominik Furin bekunde ich meinen Dank für seine Programmierfähigkeit und Hilfe bei der Umsetzung des Workpackage 8 im EU-Projekt MENDOS.

Der Feinmechanischen Werkstatt des Instituts, insbesondere Herrn Seidel, möchte

ich für die Unterstützung bei der Konstruktion und bei der Anfertigung der Einzelanfertigungen für meine Versuchsaufbauten danken.

René Heideman von der LioniX BV danke ich für die Unterstützung bei der Etablierung der Mach-Zehnder Interferometer in unserem Arbeitskreis.

Ein besonderer Dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Gauglitz für die gute Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft, die einen großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit haben.

Der gesamten Arbeitsgruppe um Herrn Priv.-Doz. Dr. Udo Weimar danke ich sehr für die exzellente kollegiale Zusammenarbeit im Verfügungsgebäude.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Familie für die stetige Unterstützung und ihr andauerndes Interesse bedanken.

Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren:

M. Baumann, A. Buchmann, H.D. Ebert, A. Fäßler, H. Fischer, G. Gauglitz, K.H. Gaukler, F. Gönnenwein, P. Grabmayr, F. Hasselbach, R. Hübener, J. Ihringer, E. Kasper, H. Kaul, D. Kern, B. Kümmerer, E. Lindner, O. Lutz, G. Mertens, H. Müther, W. Nakel, E. Plies, H. Pfister, W. Prandl[†], E. Schmid, E. Schweda, A. Schwenk, G. Staudt, G. Wagner, M. Wolff.

Lebenslauf

Name: Rüdiger Frank

Geburtsdatum: 31. Mai 1973

Geburtsort: Tübingen

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1979-1983 Grundschule Haigerloch
1983-1989 Progymnasium Haigerloch
1989-1992 Gymnasium Hechingen
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium: Oktober 1992-März 1999 Studium der Physik an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Diplomarbeit am Institut für Kristallographie, Universität Tübingen. Titel: *Konstruktion, Aufbau und Optimierung eines Aufbaus zur Untersuchung des Riesenmagnetwiderstandes an $Ho_xCa_{1-x}MnO_3$.*

Praktika: August und September 1996 Praktikant in der Verfahrensentwicklung bei der Mercedes-Benz AG in Sindelfingen.
15. April-3. September 1999 Praktikant bei der Robert-Bosch GmbH in Gerlingen.

Promotion: Dezember 1999-November 2005 bei Prof. Dr. Günter Gauglitz am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Universität Tübingen. Titel: *Reflektometrische und integriert optische Sensoren für die Bioanalytik.*