

# **Herstellung und Charakterisierung lateral mikrostrukturierter Monofilme auf Silicium- und Glas-Chipoberflächen für die Anwendung in Bio- Chips**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

**Diplom-Chemiker Jörg Reichert**

geboren am 17. Juni 1970 in Kölleda

– überarbeitete Fassung –

**Gutachter:**

1. Prof. Dr. U.-W. Grummt  
(Friedrich-Schiller-Universität Jena)
2. Prof. Dr. J. M. Köhler  
(Technische Universität Ilmenau)
3. Prof. Dr. A. Hinnen  
(Clondiag Chip Technologies, Jena)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 09. Juli 2003

*Der unermesslich reichen, stets sich erneuernden Natur gegenüber wird der Mensch,  
soweit er auch in der wissenschaftlichen Erkenntnis fortgeschritten sein mag,  
immer das sich wundernde Kind bleiben  
und muss sich stets auf neue Überraschungen gefasst machen.*

Max Planck

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>Aufgabenstellung</b>	<b>3</b>
<b>Material und Methoden</b>	<b>5</b>
<b>1 Geräte, Chemikalien und Substrate</b>	<b>5</b>
<b>2 Präparation von kovalent gebundenen, selbst organisierten, organischen, monomolekularen Schichten auf Glas- und Siliciumoberflächen</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Vorbemerkung</b>	<b>7</b>
<b>2.2 Vorbehandlung der Substrate</b>	<b>7</b>
<b>2.3 Silanisierung</b>	<b>7</b>
2.3.1 Octadecylsilan-Monolayer (ODS)	8
2.3.2 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctylsilan-Monolayer (PFO)	8
2.3.3 1H,1H,2H,2H-Perfluordecylsilan-Monolayer (PFD)	8
<b>2.4 Charakterisierung der Oberflächen</b>	<b>8</b>
<b>3 Mikrostrukturierung der monomolekularen Oberflächenschichten</b>	<b>8</b>
<b>3.1 Vorbemerkung</b>	<b>8</b>
<b>3.2 Haftvermittler</b>	<b>9</b>
3.2.1 Polymethylmethacrylat-Lösung	9
3.2.2 Gelatine 60 vernetzt mit Glutaraldehyd	9
<b>3.3 Photolithographie</b>	<b>10</b>
<b>4 Herstellung von funktionellen Oberflächen-Spots zur Anbindung von Biomolekülen</b>	<b>11</b>
<b>4.1 Vorbemerkung</b>	<b>11</b>

---

<b>4.2</b>	<b>Vorbereitung der Substrate</b>	<b>12</b>
<b>4.3</b>	<b>Kopplungschemie homogene Oberflächen</b>	<b>12</b>
4.3.1	3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES)	12
4.3.2	3-Glycidoxypropyltriethoxysilan (GOPS)	12
4.3.3	1,3-Diaminopropan	12
4.3.4	1,4-Diaminobutan	13
4.3.5	1,6-Diaminohexan	13
4.3.6	Ethylenglycol	13
<b>4.4</b>	<b>Einstellung der OH-Gruppendichte auf Oberflächen</b>	<b>13</b>
<b>4.5</b>	<b>Einstellung der Aminogruppendichte auf Oberflächen</b>	<b>13</b>
<b>4.6</b>	<b>Charakterisierung</b>	<b>14</b>
4.6.1	Ankopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an Aminooberflächen	14
<b>5</b>	<b>Immobilisierung und Hybridisierung von DNA an Oberflächen</b>	<b>14</b>
<b>5.1</b>	<b>Vorbemerkung</b>	<b>14</b>
<b>5.2</b>	<b>Pufferlösungen</b>	<b>14</b>
5.2.1	Natriumphosphat-Puffer 0,1 M (pH 7,4)	14
5.2.2	20x Natriumcitrat-Puffer (SSC 20)	15
<b>5.3</b>	<b><i>onchip</i>-Synthese von DNA-Molekülen (capture probe) an Oberflächen</b>	<b>15</b>
<b>5.4</b>	<b>Hybridisierung von capture probe und target probe</b>	<b>17</b>
<b>6</b>	<b>Immobilisierung von Antikörpern und Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen an Oberflächen</b>	<b>18</b>
<b>6.1</b>	<b>Vorbemerkung</b>	<b>18</b>
<b>6.2</b>	<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>18</b>
6.2.1	Phosphate buffered saline (PBS)	18
6.2.2	Phosphat buffered saline mit Tween <sup>®</sup> 20 (PBS-T)	18
6.2.3	Natriumphosphat-Puffer (pH 6,5)	19
6.2.4	Natriumphosphat-Puffer / 1M NaCl (pH 7,2 )	19
6.2.5	Natriumacetat-Puffer / 0,15 M NaCl (pH 5,4)	19

---

<b>6.3</b>	<b>Verwendete Antigene, Antikörper und Kombinationen</b>	<b>19</b>
6.3.1	Primäre Antikörper	19
6.3.2	Sekundäre Antikörper	20
6.3.3	Antigene	21
<b>6.4</b>	<b>Antikörpervorbereitung</b>	<b>21</b>
6.4.1	Dialyse der Antikörper	21
6.4.2	Oxidation der Antikörper	21
6.4.3	Dialyse der oxidierten Antikörper	21
<b>6.5</b>	<b>Orientierte Anbindung von markierten, oxidierten Antikörpern</b>	<b>22</b>
6.5.1	Kombination	22
6.5.2	Anbindung der Antikörper	22
6.5.3	Reduktion der kovalent gebundenen oxidierten markierten Antikörper	22
<b>6.6</b>	<b>Aufbau des Sandwich: nicht markierte Antikörper mit markierten sekundären Antikörper</b>	<b>22</b>
6.6.1	Kombination	22
6.6.2	Anbindung der Antikörper	22
6.6.3	Reduktion der kovalent gebundenen oxidierten nicht markierten Antikörper	23
6.6.4	Inkubation mit markierten sekundären Antikörpern	23
<b>6.7</b>	<b>Aufbau des Sandwich: nicht markierte Antikörper mit Antigenen und markierten sekundären Antikörpern</b>	<b>23</b>
6.7.1	Kombinationen	23
6.7.2	Anbindung der Antikörper	24
6.7.3	Reduktion der kovalent gebundenen oxidierten nicht markierten Antikörper	24
6.7.4	Inkubation mit Antigenen	24
6.7.5	Inkubation mit markierten sekundären Antikörpern	24
<b>6.8</b>	<b>Detektion</b>	<b>25</b>
<b>7</b>	<b>Adsorption von Farbstoffen aus der Lösung an strukturierten Oberflächen</b>	<b>25</b>
<b>7.1</b>	<b>Chemikalien und Substrate</b>	<b>25</b>

---

7.2	<b>Adsorptionsverhalten in Abhängigkeit vom Lösungsmittel und Spülmedium</b>	27
7.3	<b>Adsorptionsverhalten in Abhängigkeit von der Konzentration der Farbstofflösungen</b>	27
7.4	<b>Adsorptionsverhalten in Abhängigkeit von der Adsorptionszeit</b>	27
<b>8</b>	<b>Polymerschichten auf Oberflächen für Fluoreszenzmessungen</b>	<b>27</b>
8.1	<b>Vorbemerkung</b>	27
8.2	<b>Chipvorbereitung</b>	28
8.3	<b>Polymer-Stammlösungen</b>	28
8.3.1	Polyvinylalkohol 22.000 (PVA 22), 2% (w/w)	28
8.3.2	Polyvinylalkohol 100.000 (PVA 100), 2% (w/w)	28
8.4	<b>Fluorescein eingebettet in Polymerschichten</b>	28
8.5	<b>Bestimmung des Fluoresceingehalts in PVA-Schichten</b>	29
<b>9</b>	<b>Auswertung Fluoreszenzmikroskopie</b>	<b>29</b>
9.1	<b>Auswerteverfahren bei der Fluoreszenzmikroskopie strukturierter Oberflächen</b>	29
9.2	<b>Quantifizierung durch Vergleich Schicht – Monolage</b>	30
	<b>Ergebnisse</b>	<b>31</b>
<b>1</b>	<b>Vorbemerkung zur Berechnung der Oberflächenspannung</b>	<b>31</b>
<b>2</b>	<b>Native Glas- und Si-Oberflächen</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>Hydrophile Glas- und Siliciumoberflächen</b>	<b>34</b>
3.1	<b>Reaktives Ionenätzen (RIE) mit Sauerstoff</b>	35
3.2	<b>Ätzen im Sauerstoffplasma-Stripper</b>	36
<b>4</b>	<b>Hydrophobe Self Assembled Monolayer auf Silicium- und Glasoberflächen</b>	<b>37</b>

---

4.1	Octadecyl-Monolagen	37
4.2	Perfluorooctyl- und Perfluordecyl-Monolagen	38
<b>5</b>	<b>Mikrostrukturierung der Self Assembled Monolayer auf Silicium- und Glasoberflächen</b>	<b>40</b>
5.1	Vorbemerkung	40
5.2	Schichtdicke der Haftvermittler	41
5.2.1	Polymethylmethacrylat als Haftvermittler	41
5.2.2	Gelatine 60 als Haftvermittler	41
5.3	Strukturierung des Photoresists AZ 1514 H	42
5.4	Ergebnisse Mikrostrukturierung	44
5.5	Benetzungsverhalten hydrophob/hydrophil mikrostrukturierter monomolekularer Oberflächen	45
<b>6</b>	<b>Bevorzugte Adsorption von Fluoreszenzfarbstoffen an mikrostrukturierte Self Assembled Monolayer (SAMs)</b>	<b>48</b>
6.1	Abhängigkeit der Adsorption vom Lösungs- und Spülmedium	49
6.2	Adsorptionsisotherme	52
6.3	Adsorption von Farbstoffgemischen	58
<b>7</b>	<b>Bindegruppen für Biomoleküle in mikrostrukturierten monomolekularen Schichten</b>	<b>59</b>
7.1	Amino-funktionalisierte Monolayer auf Silicium- und Glasoberflächen	59
7.2	Bindegruppenabstufung	62
<b>8</b>	<b>Immobilisierung von DNA an funktionalisierte Glasoberflächen</b>	<b>63</b>
8.1	Ethylenglycol-Monolayer	63
8.2	<i>onchip</i> -Synthese der DNA	64
8.3	Kontrolle der DNA-Dichte und alternative Markierungstechniken	66

---

<b>9</b>	<b>Proteine</b>	<b>69</b>
	<b>Diskussion</b>	<b>76</b>
<b>1</b>	<b>Chemische Oberflächenmodifizierung</b>	<b>76</b>
<b>2</b>	<b>Mikrostrukturierung</b>	<b>79</b>
<b>3</b>	<b>Funktionalisierte Bindspeck-Arrays zur Anbindung von Biomolekülen und ihre Anwendung in Bauelementen</b>	<b>83</b>
3.1	Diskussion zur Quantifizierung	83
3.2	Synthesestrategien	83
3.3	DNA-Immobilisierung an mikrostrukturierte monomolekulare Ethylenglycoloberflächen	85
3.4	Proteinanbindung an mikrostrukturierte monomolekulare Amino-oberflächen	90
<b>4</b>	<b>Adsorption</b>	<b>92</b>
	<b>Zusammenfassung</b>	<b>101</b>
	<b>Anhang</b>	<b>104</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>107</b>
	<b>Abkürzungen und Formelzeichen</b>	<b>118</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>119</b>

# Einleitung

Mikrostrukturierte Oberflächen finden zur Immobilisierung von DNA-Molekülen und Proteinen auf Grundlage der Vielzahl gleichzeitig beobachtbarer Bindungsereignisse und der hohen Spezifität der biomolekularen Interaktion eine breite Anwendung in vielen biotechnologischen Applikationen. Die Techniken der Immobilisierung von Biomolekülen auf Oberflächen und die Verwendung solcher mikrostrukturierten Chipträger haben sich bei der Detektion von Hybridisierungsereignissen und in der modernen Diagnostik bereits weitgehend etabliert.

Durch die Kombination verschiedener Mikrofabrikationsprozesse mit Verfahren der spezifischen chemischen Modifikation von Oberflächen zur biochemischen Konjugation und Immobilisierung von Proteinen und DNA wird der Aufbau von DNA- und Protein-Trägerchips auf Glas bzw. Silicium für die Detektion von biogenen Molekülen ermöglicht. Dabei werden mikrostrukturierte, hydrophobe Trägerchips mit hydrophilen Reaktionsarealen für die Anbindung von Biomolekülen entwickelt, wobei diese Moleküle mittels konventioneller Spottertechnik und ohne Proben-Übersprechen auf die aktiven Mikroareale aufgebracht werden können.

Bei der Herstellung und Anwendung von Mikroreaktoren und Bio-Chips sind dabei Aussagen über den chemischen Zustand der mikrostrukturierten Oberflächen von großer Bedeutung.<sup>[1-3]</sup> Insbesondere gilt das zum Beispiel bei der Bestimmung von Nachweisgrenzen und kinetischen Parametern bei der Immobilisierung und Interaktion von Biomolekülen. Die quantitative Bestimmung der Anzahl funktioneller Gruppen zur Anbindung von Biomolekülen an den Oberflächen ist dabei ebenso wichtig, wie quantitative Aussagen zur Besetzungsdichte der gebundenen biologisch relevanten Moleküle.

An homogenen monomolekularen Oberflächen werden verschiedene Methoden, wie Oberflächenplasmonen Resonanz Spektroskopie (SPR), Röntgen Photoelektronen Spektroskopie (XPS), Infrarot Spektroskopie (IR), Sekundär Ionen Massenspektrometrie (SIMS) oder Auger Elektronen Spektroskopie (AES), standardmäßig zur Oberflächencharakterisierung eingesetzt.

Zur schnellen und kostengünstigen Detektion von Bindungs- und Hybridisierungsereignissen werden Mikrospots heute weitgehend durch eine Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen untersucht. Die Detektion erfolgt dabei üblicherweise durch Fluoreszenzmikroskopie oder durch Auslesen der strukturierten

Chipoberflächen mit Fluoreszenzscannern. Aufgrund des Fehlens von geeigneten Fluoreszenzstandards ist es jedoch schwierig, quantitative Aussagen durch die Fluoreszenzmessungen zu treffen.

Die qualitative Charakterisierung mikrostrukturierter monomolekularer Oberflächen erweist sich mit den herkömmlichen Techniken ebenfalls als nicht trivial, wenn die Chipsubstrate bei nachfolgenden Prozessen weiter modifiziert werden sollen. Bisher erfolgte die qualitative Beurteilung von Oberflächenzuständen mikrostrukturierter Monolagen zur Produktkontrolle nach Oberflächenmodifizierungen standardmäßig durch eine kovalente Ankopplung von Fluoreszenzmarkern oder radioaktiven Markermolekülen. So werden zum Beispiel zur Überprüfung der Reaktivität von Bindespots Isothiocyanatderivate von Fluoreszenzfarbstoffen kovalent an Aminomodifizierte Oberflächen und an Aminospots gebunden. Nach dieser kovalenten Anbindung stehen die funktionellen Gruppen der Oberfläche jedoch nicht mehr für weitere Reaktionen und Kopplungsschritte mit Biomolekülen zur Verfügung. Zur Oberflächen- und Prozesskontrolle mikrostrukturierter monomolekularer Oberflächen, zum Beispiel während der Herstellung von Biochips, muss eine Charakterisierung schnell, selektiv, empfindlich und gleichzeitig reversibel erfolgen. Im Gegensatz zur kovalenten Anbindung ist es möglich, Farbstoffe durch nichtkovalente Wechselwirkungen an mikrostrukturierte monomolekulare Oberflächen zu adsorbieren. Die selektive Adsorption von Fluoreszenzfarbstoffen eröffnet die Möglichkeit, chemisch mikrostrukturierte Oberflächen schnell und zerstörungsfrei durch Fluoreszenzmikroskopie zu charakterisieren. Nach der Adsorption sind die Oberflächen weiteren Modifizierungen zugänglich, weil die Fluoreszenzfarbstoffe durch Spülprozesse schnell wieder entfernt werden können.

## Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten durch Kombination von oberflächenchemischen und mikrosystemtechnischen Methoden hydrophobe Monofilme auf Silicium- und Glasoberflächen hergestellt und durch Erzeugung von hydrophilen OH-Bindespots mikrostrukturiert werden. Im weiteren Verlauf sollten die OH-Chemotope für die Ankopplung von Biomolekülen durch oberflächenchemische Reaktionen zu Bindespots modifiziert werden. Im Vordergrund standen dabei Synthesen von monomolekularen Aminooberflächen für die Proteinanbindung und monomolekularen Oberflächen mit Ethylenglycol-Linkern für die DNA-Immobilisierung. Die Bindegruppendichte auf den Oberflächen sollte dabei gezielt eingestellt werden.

Die DNA sollte durch eine *onchip*-Synthese basenweise an den Ethylenglycol-Monolagen aufgebaut werden und Hybridisierungsereignisse mit fluoreszenzmarkierter komplementärer DNA im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Weiterhin sollte eine alternative Markierungsmethode mit Gold-Nanopartikeln durch AFM-Messungen untersucht werden.

Zum Aufbau von Protein-Arrays sollten Antikörper kovalent und gerichtet an monomolekulare Aminospots gebunden werden. Der Nachweis von spezifischen Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen an der Oberfläche sollte dabei durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen erbracht werden. Insbesondere sollte der miniaturisierte Immunoassay speziell bei der serologischen Bestimmung von *Salmonella* Isolaten getestet werden.

Neben der Charakterisierung der mikrostrukturierten molekularen Monofilme durch das Benetzungsverhalten, AFM, und Rasterelektronenmikroskopie standen fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen im Vordergrund. Dabei sollte im Rahmen dieser Arbeit mit mikrosystemtechnischen Dünnschicht-Techniken ein Fluoreszenzstandard entwickelt werden. Ziel der Arbeit war die quantitative Bestimmung von Bindegruppendichten und Biomolekülen in den strukturierten Monoschichten nach Anbindung von Fluoreszenzmarkern durch Fluoreszenzmikroskopie.

Ein weiterer Ansatz verfolgte die Adsorption von Fluoreszenzfarbstoffen an mikrostrukturierte monomolekulare Oberflächen. Dabei sollten die nichtkovalenten Wechselwirkungen der Farbstoffe, wie zum Beispiel Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und van der Waals Dispersionskräfte, elektrostatische

Wechselwirkungen und Ionenpaarbildung mit den Oberflächen genutzt werden, um die Farbstoffe bevorzugt zu adsorbieren. Die Affinität der Farbstoffe zu den chemisch unterschiedlich modifizierten Oberflächen soll gezielt durch die Wahl von Lösungs- und Spülmedien gelenkt werden. Ziel ist die Selektion der mikrostrukturierten Monoschichten durch die gesteuerte Adsorption von Fluoreszenzfarbstoffen und Farbstoffen im Gemisch zur schnellen Prozesskontrolle und Qualitätsüberwachung von Oberflächen.

# Material und Methoden

## 1 Geräte, Chemikalien und Substrate

Für die chemischen Oberflächenmodifizierungen wurden Silicium-Wafer (SICO Wafer GmbH Meiningen oder Richter Elektronik Erfurt) und Glas-Wafer (Jenaer Glaswerk GmbH) mit nachfolgenden Spezifikationen verwendet (Tab. 1).

Die Vereinzelung der Wafer zu Chips erfolgte durch Sägen mit einer Diamantsäge DAD 320 der Firma DISCO oder einer Seier 301 der Firma SEIER.

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Lösungsmittel vor der Verwendung destilliert und mittels Standardtechniken getrocknet.<sup>[4]</sup> Das Wasser zum Spülen der Oberflächen war deionisiert und wurde zusätzlich destilliert. Alle anderen Chemikalien waren, falls nicht extra aufgeführt, kommerziell verfügbar (Firma ABCR, FLUKA, ALDRICH, SIGMA, LANCASTER, MERCK) und wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

**Tab. 1:** Spezifikation der Substrate

	4'' Si-Wafer	2'' Si-Wafer	4'' Glas-Wafer
Durchmesser	100 mm	50 mm	100 mm
Type/Dopant	p/Bor	p/Bor	Borofloat 33
Orientierung	<100>	<100>	-
Widerstand	$\geq 1 \Omega \text{ cm}$	$\geq 1 \Omega \text{ cm}$	-
Dicke	525 $\mu\text{m}$		0,7 mm
Oberfläche	einseitig poliert	einseitig poliert	Flächen naturblank, Rand geschnitten

Zur Reinigung der Substrate wurde, wenn keine anderen Methoden angegeben wurden, ein saurer Reiniger oder ein alkalischer Hochdruckreiniger CTP 5 der Firma CONVAC verwendet.

Das Trocknen der Substrate durch Schleudern erfolgte mit einer Trockenschleuder MTS 6 oder MTS 4 von CONVAC. Die Photolack- und Polymerschichten wurde mit einer Lackschleuder CONVAC 1001 erzeugt.

Als Photolack wurde AZ 1514 H positiv resist von HOECHST verwendet. Die Belichtung des Photolacks erfolgte in einem Aligner AL 6-2 EVG von ELECTRONIC VISION bei

einer Wellenlänge von 365 nm. Der Photolack wurde mit AZ Developer von CLARIANT, 2 : 1 verdünnt mit Wasser (v/v), entwickelt und mit PRS 3000 Photo Resist Stripper von J. T. BAKER abgelöst.

Das Reaktive Ionenätzen (RIE) mit Sauerstoff erfolgte in einem Parallelplattenreaktor RIE 488 von SENTECH. Das Sauerstoffplasma-Strippen wurde in einem Mikrowellen Barell-Reaktor PlasmaStripper 200 G der Firma TECHNICS PLASMA GMBH durchgeführt. Die Schichtdicken der Polymere und des Photolacks wurden an einem Tencor P-2 Long Scan Profiler von TENCOR INSTRUMENTS bestimmt. Die Polymerschichten wurden dazu mit der Spitze einer Pinzette bis zum Substrat durchgeritzt. Bei einem Andruckgewicht von 5 mg wurde das Profil über 100 µm mit einer Scangeschwindigkeit von 200 µm/min aufgenommen. Die Spitze der Abtastnadel hatte einen Radius von 5 µm und einen Öffnungswinkel von 60°.

Die AFM-Messungen erfolgten an einem Dimension 3100 Atomic Force Microscope Nanoscope IIIa von DIGITAL INSTRUMENTS im tapping mode.

Die Raster Elektronen Mikroskopie (REM) wurde an einem Digital Scanning Microscope DCM 960 der Firma CARL ZEISS und am Jeol JSM 6700 F von JEOL LTD. durchgeführt.

Die Kontaktwinkel wurden mit einem OCA 15 der Firma DATA PHYSICS bei Raumtemperatur bestimmt und mit der Software SCA 20 von DATA PHYSICS ausgewertet. Zur Bestimmung der Kontaktwinkel und Berechnung der freien Oberflächenenergie [ $\text{mJ/m}^2$ ] bzw. entsprechend dazu der Grenzflächenspannungen [ $\text{mN/m}$ ] wurden die im Anhang Tab. 29 aufgeführten Lösungsmittel und deren physikalischen Parameter verwendet. Alle Kontaktwinkelangaben beziehen sich auf die statischen Kontaktwinkel, die am liegenden Tropfen (Sessile-Drop-Methode) durch die Young-Laplace-Methode (Young-Laplace fitting) bestimmt wurden.

Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte im Aufrichtverfahren mit einem Axiovert 100 von CARL ZEISS. Als Lichtquellen wurden eine Quecksilber-Kurzbogenlampe HBO 100 W/2 (ZEISS), eine Xenon-Kurzbogenlampe XBO 75 W/2 (ZEISS) und eine Lumatec Superlite SUV-DC-E der Firma LUMATEC GMBH mit einer DC Quecksilber-Höchstdrucklampe 200 W verwendet (Anhang Abb. 61). Als Filter zur Fluoreszenzanregung und Detektion kamen Filtersysteme von CARL ZEISS und AHF ANALYSENTECHNIK AG zum Einsatz (Anhang Abb. 62-Abb. 65). Die Detektion der Fluoreszenzemission erfolgte mit einer PCO SensiCam Long Exposure, 12 Bit Cooled Imaging CCD-Kamera von PCO COMPUTER OPTICS GMBH und wurde mit der Software SensiControl von PCO

COMPUTER OPTICS GMBH und Adobe Photoshop 5.0 von ADOBE SYSTEMS INCORPORATED ausgewertet.

Die Aufnahme der UV/Vis-Spektren erfolgte an einem V-530 UV/Vis Spectrophotometer der Firma JASCO. Die Fluoreszenzmessungen wurden am FP-6200 Spectrofluorometer der Firma JASCO durchgeführt.

## **2 Präparation von kovalent gebundenen, selbst organisierten, organischen, monomolekularen Schichten auf Glas- und Siliciumoberflächen**

### **2.1 Vorbemerkung**

Die Self Assembled Monolayer gehören zu einem der am nachhaltigsten untersuchten System der nichtbiologischen Selbstorganisation. Daher kann an dieser Stelle nur auf eine kleine Auswahl von Übersichtsartikeln und Reviews verwiesen werden.<sup>[5-12]</sup>

Bei der hier vorliegenden Arbeit wurden zum Aufbau der monomolekularen Schichten auf den Silicium- und Glassubstraten einige der zahlreichen literaturbekannten Methoden verwendet und nach eigenen Erfahrungen optimiert.<sup>[10,13-15]</sup>

### **2.2 Vorbehandlung der Substrate**

Generell wurden die Oberflächen vor der Silanisierung im alkalischen Hochdruckreiniger gereinigt. Danach wurden die Substrate im Sauerstoffplasma für 2 Minuten bei 50 W alternativ für 30 Minuten im Plasmastripper behandelt, um eine hohe Dichte an OH-Gruppen auf den Oberflächen zu erzeugen.

### **2.3 Silanisierung**

Frisch Sauerstoffplasma behandelte Oberflächen wurden ohne weitere Vorbehandlungen oder Waschprozesse zur Silanisierung benutzt. Ältere Sauerstoffplasma behandelte Oberflächen wurden vor dem Einsatz je 10 Minuten im Ultraschallbad mit Wasser, Ethanol und Aceton gereinigt. Anschließend wurden die Oberflächen 10 Minuten im Ultraschallbad in einem Gemisch aus Wasser : Salzsäure 37% : Wasserstoffperoxid 30% (1:1:1 [v/v]) aktiviert. Nach dem Spülen mit Wasser wurden die Substrate im Stickstoffstrom getrocknet oder trocken geschleudert.

### 2.3.1 Octadecylsilan-Monolayer (ODS)

Die nach 2.2 oder 2.3 aktivierten Oberflächen wurden bei Raumtemperatur unter trockenem Argon für 3 Stunden in einer 1 mM Lösung von Octadecyltrichlorsilan in frisch ketyliertem Toluol behandelt. Nach der Silanisierung wurden die Wafer je 2 mal für 10 Minuten mit trockenem Toluol, Ethanol und Wasser gewaschen und anschließend im Stickstoffstrom getrocknet oder trocken geschleudert.

### 2.3.2 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctylsilan-Monolayer (PFO)

Die nach 2.2 oder 2.3 aktivierten Oberflächen wurden bei Raumtemperatur unter trockenem Argon für 3 Stunden in einer 1 mM Lösung von 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyltrichlorsilan in Perfluorooctan oder n-Hexan (getrocknet über Molekularsieb 4 Å) behandelt. Nach der Silanisierung wurden die Wafer je 2 mal für 10 Minuten mit trockenem Hexan, trockenem Toluol, Ethanol und Wasser gewaschen und anschließend im Stickstoffstrom getrocknet oder trocken geschleudert.

### 2.3.3 1H,1H,2H,2H-Perfluorodecylsilan-Monolayer (PFD)

Die nach 2.2 oder 2.3 aktivierten Oberflächen wurden bei Raumtemperatur unter trockenem Argon für 3 Stunden in einer 1 mM Lösung von 1H,1H,2H,2H-Perfluorodecyltrichlorsilan in Perfluorooctan oder n-Hexan (getrocknet über Molekularsieb 4 Å) behandelt. Nach der Silanisierung wurden die Wafer je 2 mal für 10 Minuten mit trockenem Hexan, trockenem Toluol, Ethanol und Wasser gewaschen und anschließend im Stickstoffstrom getrocknet oder trocken geschleudert.

## 2.4 Charakterisierung der Oberflächen

Die Charakterisierung der Oberflächen erfolgte durch Kontaktwinkelmessungen, Rasterelektronenmikroskopie (REM), Ellipsometrie und Atomic Force Microscopy (AFM).

## 3 Mikrostrukturierung der monomolekularen Oberflächenschichten

### 3.1 Vorbemerkung

Aufgrund der mangelnden Lackhaftung des Photoresists auf den hydrophoben Substraten mussten die Oberflächen zuvor mit einem Haftvermittler beschichtet werden. Alle nachfolgend aufgeführte Arbeiten fanden in einem Reinraum der Reinraumklasse 100 unter Gelblicht statt.

### 3.2 Haftvermittler

#### 3.2.1 Polymethylmethacrylat-Lösung

0,845 g Polymethylmethacrylat (high mol. wt.) wurden in 162 ml Xylol unter Rühren mit aufgesetztem Rückflusskühler bei 70°C gelöst. Nach dem Erkalten wurden 38 ml <sup>tert.</sup>Butyl-Methylether zugeben und über Nacht über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Die Lösung wurde vom Niederschlag abgesaugt und durch einen 0,2 µm Teflon-Filter filtriert.

Die Wafer wurden vor dem Aufbringen des Haftvermittlers 20 Minuten bei 120°C getempert. Je nach Substratgröße wurde ein entsprechendes Volumen der Lösung in 10 s bei 600 rpm auf die hydrophoben Wafer aufgebracht und bei 3000 rpm weitere 30 s geschleudert (Tab. 2). Die Polymerschicht wurde danach 1 Minute bei 80°C auf der Hotplate getempert und anschließend 20 Minuten bei 80°C getrocknet.

**Tab. 2:** Beschichtungsprogramm Haftvermittler

Schritt	rpm	Beschleunigungszeit in s	Zeit in s
1	600	10	5
2	600	2	5
3	3000	10	30
4	50	10	5

#### 3.2.2 Gelatine 60 vernetzt mit Glutaraldehyd

Zur Herstellung der Lösung I wurden 22,2 g Gelatine 60 in 200 ml heißem Wasser gelöst, 1 g NaN<sub>3</sub> zugesetzt und heiß durch einen 0,6 µm Nylon-Filter filtriert. Für Lösung II wurden 20 ml Glutaraldehyd (50%,) in 180 ml Wasser gelöst und durch einen 0,2 µm Teflon-Filter filtriert.

Die Wafer wurden vor dem Aufbringen des Haftvermittlers 20 Minuten bei 120°C getempert. Je nach Substratgröße wurde ein entsprechendes Volumen aus gleichen Teilen von Lösung I und II Lösung auf den ruhenden hydrophoben Wafer aufgebracht, 10 s bei 500 rpm und weitere 30 s bei 3000 rpm geschleudert (Tab. 3). Die vernetzte Gelatineschicht wurde danach 1 Minute bei 80°C auf der Hotplate getempert und anschließend je 20 Minuten bei 80°C und 120°C getrocknet.

**Tab. 3:** Beschichtungsprogramm Gelatine

Schritt	rpm	Beschleunigungszeit in s	Zeit in s
1	600	10	5
2	600	2	5
3	3000	10	30
4	50	10	5

### 3.3 Photolithographie

Die Mikrostrukturierung der Self Assembled Monolayer erfolgte nach Standard-Strukturierungsprozessen der Mikrosystemtechnik.

Auf die vorbereiteten Wafer wurde ein Photoresist nach Standardbelackungsprogrammen aufgeschleudert (Tab. 4). Die erforderliche Schichtdicke variiert je nach Wahl der Drehzahl beim Schleudern sowie der Konzentration des eingesetzten Lackes und ist abhängig von den nachfolgenden Bearbeitungsschritten und der Größe der Mikrostrukturen.

Nach der Lackbeschichtung wurden die Wafer 1 Minute bei 80°C auf der Hotplate getempert und anschließend 20 Minuten bei 80°C getrocknet.

Die Belichtung des Photoresists erfolgte über Chrommasken mit einem Aligner bei einer Wellenlänge von 365 nm. Anschließend wurde die Lackschicht mit einem Standard Lackentwickler entwickelt und je 20 Minuten bei 80°C und 120°C getrocknet. Beim nachfolgenden Reaktiven Ionenätzen (RIE) im Sauerstoffplasma für 2 Minuten bei 50 W wurde unter den geöffneten Lackfenstern die kovalent gebundene Alkyl- bzw. Perfluoralkylmonolage entfernt und auf der Oberfläche des Substrates OH-Gruppen generiert.

Der Photolack diente auch nach der Plasmabehandlung als Schutzschicht und wurde erst nach dem Vereinzeln der Wafer in Chips mit einem Standard-Remover abgelöst. Eventuell verbliebene Reste der Gelatineschicht wurden in 50% Essigsäure im Ultraschallbad entfernt. Der PMMA-Haftvermittler wurde mit Aceton im Ultraschallbad abgelöst.

**Tab. 4:** Belackungsprogramme Convac

Programm	Schritt	rpm	Beschleunigungszeit in s	Zeit in s
1	1	600	10	5
	2	600	2	5
	3	2000	10	30
	4	50	10	5
2	1	600	10	5
	2	600	2	5
	3	3000	10	30
	4	50	10	5
3	1	600	10	5
	2	600	2	5
	3	4000	10	30
	4	50	10	5
4	1	600	10	5
	2	600	2	5
	3	5000	10	30
	4	50	10	5
5	1	600	10	5
	2	600	2	5
	3	6000	10	30
	4	50	10	5

## 4 Herstellung von funktionellen Oberflächen-Spots zur Anbindung von Biomolekülen

### 4.1 Vorbemerkung

Zur Herstellung der funktionalisierten Oberflächenspots für die Anbindung von Biomolekülen wurden zum Teil eigene Methoden erarbeitet und literaturbekannte Techniken modifiziert und nach eigenen Erfahrungen optimiert.

## 4.2 Vorbereitung der Substrate

Die Hydroxyoberflächen wurden vor der weiteren Funktionalisierung oder der Anbindung von Ankergruppen für Biomoleküle aktiviert. Um jedoch die hydrophobe Monolage zu erhalten, konnte die Aktivierung nicht wie nach 2.3 im Sauerstoffplasma erfolgen. Die strukturierten Oberflächen wurden der chemischen Modifizierung der OH-Chemotope je 10 Minuten im Ultraschallbad mit Wasser, Ethanol und Aceton gereinigt. Anschließend wurden die Oberflächen 10 Minuten im Ultraschallbad in einem Gemisch aus Wasser : Salzsäure 37% : Wasserstoffperoxid 30% (1:1:1 [v/v]) aktiviert. Nach dem Spülen mit Wasser wurden die Substrate im Stickstoffstrom getrocknet oder trocken geschleudert.

## 4.3 Kopplungschemie homogene Oberflächen

### 4.3.1 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES)

Die nach 4.2 aktivierten mikrostrukturierten Oberflächen wurden 3 Stunden bei 70°C unter trockenem Argon in einer 10 mM Lösung von 3-Aminopropyltriethoxysilan in frisch ketyliertem Toluol behandelt. Nach der Silanisierung wurden die Wafer je 2 mal für 10 Minuten mit trockenem Toluol und Ethanol gewaschen, kurz mit Wasser abgespült und anschließend im Stickstoffstrom getrocknet oder trocken geschleudert. Die Substrate wurden bis zur weiteren Modifizierung im Vakuum-Exsikkator über gekörntem CaCl<sub>2</sub> aufbewahrt.

### 4.3.2 3-Glycidoxypropyltriethoxysilan (GOPS)

Die nach 4.2 aktivierten mikrostrukturierten Oberflächen wurden über Nacht bei 70°C unter trockenem Argon in einer 10 mM Lösung von 3-Glycidoxypropyltriethoxysilan in frisch ketyliertem Toluol behandelt. Nach der Silanisierung wurden die Wafer je 2 mal für 10 Minuten mit trockenem Toluol und Ethanol gewaschen, kurz mit Wasser abgespült und anschließend im Stickstoffstrom getrocknet oder trocken geschleudert. Die Substrate wurden bis zur weiteren Modifizierung im Vakuum-Exsikkator über gekörntem CaCl<sub>2</sub> aufbewahrt.

### 4.3.3 1,3-Diaminopropan

Die nach 4.3.2 synthetisierten Epoxidoberflächen wurden für 2 Stunden bei 50°C mit 1,3-Diaminopropan überschichtet. Anschließend wurden die Substrate mit viel Wasser, Ethanol und nochmals Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen im Stickstoffstrom oder

durch Schleudern wurden die Oberflächen für weitere Synthesen verwendet oder im Vakuum-Exsikkator über gekörntem  $\text{CaCl}_2$  bis zur weiteren Modifizierung aufbewahrt.

#### 4.3.4 1,4-Diaminobutan

Die nach 4.3.2 synthetisierten Epoxidoberflächen wurden für 2 Stunden bei  $50^\circ\text{C}$  mit 1,4-Diaminobutan überschichtet. Anschließend wurden die Substrate mit viel Wasser, Ethanol und nochmals Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen im Stickstoffstrom oder durch Schleudern wurden die Oberflächen für weitere Synthesen verwendet oder im Vakuum-Exsikkator über gekörntem  $\text{CaCl}_2$  bis zur weiteren Modifizierung aufbewahrt.

#### 4.3.5 1,6-Diaminohexan

Die nach 4.3.2 synthetisierten Epoxidoberflächen wurden für 2 Stunden bei  $50^\circ\text{C}$  mit 1,6-Diaminohexan überschichtet. Anschließend wurden die Substrate mit viel Wasser, Ethanol und nochmals Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen im Stickstoffstrom oder durch Schleudern wurden die Oberflächen für weitere Synthesen verwendet oder im Vakuum-Exsikkator über gekörntem  $\text{CaCl}_2$  bis zur weiteren Modifizierung aufbewahrt.

#### 4.3.6 Ethylenglycol

Die nach 4.3.2 synthetisierten Epoxidoberflächen wurden für 2 Stunden bei  $50^\circ\text{C}$  mit Ethylenglycol überschichtet und eine katalytische Menge Schwefelsäure zugesetzt. Anschließend wurden die Substrate mit viel Wasser, Ethanol und nochmals Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen im Stickstoffstrom oder durch Schleudern wurden die Oberflächen für weitere Synthesen verwendet oder im Vakuum-Exsikkator über gekörntem  $\text{CaCl}_2$  bis zur weiteren Modifizierung aufbewahrt.

### 4.4 Einstellung der OH-Gruppendichte auf Oberflächen

Zur prozentualen Abstufung der OH-Gruppendichte auf den Oberflächen wurden Ethylenglycol und Ethanol im entsprechenden molaren Verhältnis von 0 – 1 nach 4.3.6 eingesetzt.

### 4.5 Einstellung der Aminogruppendichte auf Oberflächen

Zur prozentualen Abstufung der Aminogruppendichte auf den Oberflächen wurden jeweils die in 4.3.3 – 4.3.5 beschriebenen Diamine im entsprechenden molaren Verhältnis von 0 – 1 mit n-Propylamin oder n-Butylamin nach 4.3.3 – 4.3.5 eingesetzt.

## 4.6 Charakterisierung

Die Charakterisierung der Oberflächen erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie, Kontaktwinkelmessungen, Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Atomic Force Microscopy (AFM).

Zur Charakterisierung der Oberflächen durch Kontaktwinkelmessungen wurden alle beschriebenen Synthesen auch an unstrukturierten Oberflächen durchgeführt.

### 4.6.1 Ankopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an Aminooberflächen

Die Fluoreszenzmarkierung der primären Aminogruppen auf den Oberflächen erfolgte durch Reaktion mit Fluorescein-5-Isothiocyanat (FITC).

Dazu wurden 10 mg FITC in 1 ml trockenem DMSO gelöst und mit 10 ml 0,1 M Natriumhydrogencarbonatlösung (pH 8,5) verdünnt. Mit dieser Lösung wurden die Aminooberflächen unter Lichtausschluss 2 Stunden bei Raumtemperatur überschichtet.<sup>[16]</sup> Anschließend wurden die Substrate je 10 Minuten mit Natriumhydrogencarbonatlösung (pH 8,5) und Wasser gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

## 5 Immobilisierung und Hybridisierung von DNA an Oberflächen

### 5.1 Vorbemerkung

Die Synthese der Oligonucleotide wurde mit einem Expedite Nucleic Acid Synthesis System Model 8909 der Firma APPLIED BIOSYSTEMS Weiterstadt oder einem DNA-RNA-Synthesizer Model 394 (APPLIED BIOSYSTEMS) durchgeführt. Die 5'-O-(Dimethoxytrityl)-2'-desoxynucleosid-3'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)-phosphoramidite, die Aktivator-, Capping- und Oxidationslösungen sowie das 5'-Fluorescein-Phosphoramidit wurden von GLEN RESEARCH CORPORATION bezogen.

### 5.2 Pufferlösungen

#### 5.2.1 Natriumphosphat-Puffer 0,1 M (pH 7,4)

77,4 ml einer 1 M Dinatriumhydrogenphosphatlösung wurden mit 22,6 ml einer 1 M Natriumdihydrogenphosphatlösung im Maßkolben gemischt und mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.<sup>[17]</sup>

### 5.2.2 20x Natriumcitrat-Puffer (SSC 20)

175,3 g Natriumchlorid und 88,2 g Natriumcitrat wurden in 800 ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde mit einigen Tropfen einer 10 M Natriumhydroxidlösung auf pH 7 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt. Ausgehend von dieser 20x Lösung wurden die entsprechende Verdünnungen hergestellt.<sup>[17]</sup>

### 5.3 *onchip*-Synthese von DNA-Molekülen (capture probe) an Oberflächen

In einem herkömmlichen DNA-Synthesizer wurden Oligonucleotide mit unterschiedlichen Sequenzen direkt auf Glaschips (3 x 3 mm) mit Ethylenglycol-modifizierte Oberflächen (nach 4.3.6 oder nach 4.4) oder über einen oder zwei Ethylenglycol-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite-Spacer (PA 9) vom 3' zum 5'-Ende nach einem Standardprotokoll synthetisiert (Tab. 5 und Tab. 6). Der Kopplungsschritt der 5'-O-(Dimethoxytrityl)-2'-desoxynucleosid-3'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)-phosphoramidite wurde 5 mal um 30 s verlängert.

**Tab. 5:** Protokoll der Oligonucleotid-Synthese

Nr.	Bezeichnung	Chemikalien	Zeit in s
1	Deblocking	2-3% Trichloressigsäure	50
2	Coupling	PA 9 bzw. Desoxynucleosid	240
3	Capping	Acetanhydrid in Acetonitril 1-Methylimidazol in Acetonitril	15
4	Oxidation	0,05 M I <sub>2</sub> in THF/H <sub>2</sub> O/Pyridin	5
5	Capping	Acetanhydrid in Acetonitril 1-Methylimidazol in Acetonitril	15

Um den Verlauf der Synthese zu kontrollieren, wurde die DNA-Synthese in der gleichen Reaktionskammer simultan an einem herkömmlichen CPG-Support mit abspaltbarem Linker durchgeführt. Die Ausbeute der einzelnen Syntheseschritte wurde über den Trityl-Monitor verfolgt. Nach Abspaltung der Oligonucleotide vom CPG-Support wurden die Reinheit und die Ausbeute des Produktes durch HPLC bestimmt.

**Tab. 6:** *onchip*-Synthese von Oligonucleotiden auf Ethylenglycol-modifizierten Oberflächen

Nr.	Spacer (S)	Sequenz
E 130-18	-	3' – T – GGT GTA TGA GGA CGA AGT – 5'
E 131-12	-	3' – T – TCC AGC GGC GGG – 5'
E 141-35	-	3' – TTT TTT TTT TTT TTT GGG CGC CAC GGT GTT – 5'
E 152-12	-	3' – T – TCC AGC GGC GGG – 5'
E 153-20	-	3' – T – GG T GT ATG AAG GAC GGA AGT – 5'
E 151-20	1 x PA 9	3' – T – S – AC GAA AAT AGC CCG CCT TAC – 5'
E 154-20	2 x PA 9	3' – T – SS – AC GAA AAT AGC CCG CCT TAC – 5'
F 4253-32	-	3' – ACG AAA ATA GCC CGC CTT ACT CCA GCG GCG GG – 5'

Neben der Synthese von nicht markierter DNA wurden für Fluoreszenz-Untersuchungen auch 5'-Fluorescein-Phosphoramidit (6-FAM) markierte Oligonucleotide auf den Oberflächen synthetisiert (Tab. 7).

**Tab. 7:** *onchip*-Synthese von 5'-Fluorescein-Phosphoramidit markierten Oligonucleotiden auf Ethylenglycol-modifizierten Oberflächen

Nr.	Sequenz
<b>F 1</b>	– (6-FAM)
<b>F 2</b>	<sup>3'</sup> – G – (6-FAM) – <sup>5'</sup>
<b>F 3</b>	<sup>3'</sup> – GC – (6-FAM) – <sup>5'</sup>
<b>F 4</b>	<sup>3'</sup> – GCG T – (6-FAM) – <sup>5'</sup>
<b>F 5</b>	<sup>3'</sup> – GCG TGG AC – (6-FAM) – <sup>5'</sup>
<b>F 6</b>	<sup>3'</sup> – TAT ATA TAT ATA TAT – (6-FAM) – <sup>5'</sup>

#### 5.4 Hybridisierung von capture probe und target probe

Zur Charakterisierung der einzelsträngigen DNA auf den Oberflächen wurde die capture probe mit komplementärer und nicht-komplementärer Einzelstrang-DNA (target probe) hybridisiert. Dazu wurde die target probe in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer oder 3x SSC bis zu einer Konzentration von ~ 1 mM aufgenommen. In einem Thermoblock wurden die DNA-Oberflächen mit der Hybridisierungslösung 10 Minuten bei 85°C inkubiert und über Nacht langsam bis zur Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden die Oberflächen je 10 Minuten mit 0,1 M Natriumphosphat-Puffer oder 3x SSC und Wasser gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

Als target-probe-DNA wurde 3'-FAM markierte Sequenzen oder über 3'-Thiol an Gold-Nanopartikel (5-60 nm) gebundene Oligonucleotide eingesetzt (Tab. 8).

**Tab. 8:** Sequenzen der verwendeten target-probe-DNA

Name	Sequenz	komplementär zu
F 3385-15	5' – CCC GCG GTG CCA CAA – (6 FAM) – 3'	E 141-35
FN 7	5' – AGG TCG CCG CCC ADT CAG – (6 FAM) – 3'	E 152-12 E 131-12
A 3182-20	5' – TGC TTT TAT CGG GCG GAA TG – (6 FAM) – 3'	E 151-20 E 154-20 F 4253-32
S 3	5' – TGC TTT TAT CGG GCG GAA TG – Au – 3'	E 151-20 E 154-20 F 4253-32
S 1	5' – AGG TCG CCG CCC – Au – 3'	E 152-12 E 131-12
S 5	5' – CCA CAT ACT TCC TGC CTT CA – Au – 3'	E 153-20

## 6 Immobilisierung von Antikörpern und Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen an Oberflächen

### 6.1 Vorbemerkung

Alle nachfolgend verwendeten Puffer, Lösungen und Arbeitsgeräte wurden vor dem Einsatz sterilisiert.

### 6.2 Puffer und Lösungen

#### 6.2.1 Phosphate buffered saline (PBS)

4 g Natriumchlorid, 0,1 g Kaliumchlorid, 1,44 g Natriumhydrogenphosphat und 0,12 g Kaliumdihydrogenphosphat wurden in 400 ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde mit Salzsäure auf pH 7,4 korrigiert und auf 500 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

#### 6.2.2 Phosphat buffered saline mit Tween<sup>®</sup> 20 (PBS-T)

In 10 ml PBS wurden 5 mg Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween<sup>®</sup> 20) gelöst.<sup>[18]</sup>

### 6.2.3 Natriumphosphat-Puffer (pH 6,5)

Eine 0,1 M Lösung von di-Natriumhydrogenphosphat in Wasser und eine 0,1 M Lösung von Natriumdihydrogenphosphat in Wasser wurden bis zum Erreichen von pH 6,5 gemischt und auf das fünffache Volumen mit Wasser verdünnt.

### 6.2.4 Natriumphosphat-Puffer / 1M NaCl (pH 7,2 )

Eine 0,1 M Lösung von di-Natriumhydrogenphosphat in Wasser und eine 0,1 M Lösung von Natriumdihydrogenphosphat in Wasser wurden bis zum Erreichen von pH 7,2 gemischt. In dieser Lösung wurde Natriumchlorid gelöst bis zu einer Konzentration von 1 mol/l NaCl.

### 6.2.5 Natriumacetat-Puffer / 0,15 M NaCl (pH 5,4)

5 g Natriumhydroxid wurden in 250 ml destilliertem Wasser und 7,5 g Eisessig in 250 ml destilliertem Wasser gelöst. Beide Lösungen wurden bis zum Erreichen von pH 5,4 gemischt und Natriumchlorid bis zu einer Konzentration von 0,15 mol/l NaCl zugesetzt.

## 6.3 Verwendete Antigene, Antikörper und Kombinationen

Die Antikörper wurden hergestellt von SIFIN – INSTITUT FÜR IMMUNOPRÄPARATE UND NÄHRMEDIEN GMBH, Berlin. Die Antigene wurden bezogen von LABORDIAGNOSTIK GMBH, Leipzig und bei KPL, Guilford, UK mit Fluorescein markiert.

### 6.3.1 Primäre Antikörper

Es wurden hier monoklonale Antikörper, Immunoglobuline der Klasse M (IgM) stabilisiert mit Rinderserumalbumin (BSA) eingesetzt. Verwendet wurde mouse-IgM vom Zellkulturüberstand (Tab. 9).

**Tab. 9:** Spezifikation der primären Antikörper

mouse-IgM		
Antikörper		gegen
Enteroclon anti-Salmonella O4 (Ab-O4)	Salmonella O4	<i>Salmonella Thyphimurium</i>
Enteroclon anti-Salmonella O5 (Ab-O5)	Salmonella O5	<i>Salmonella Thyphimurium</i>
Enteroclon anti-Salmonella O7 (Ab-O7)	Salmonella O7	<i>Salmonella Choleraesuis</i>

### 6.3.2 Sekundäre Antikörper

Die verwendeten Antikörper wurden in Ziege produziert und zur Fluoreszenzdetektion mit Fluorescein konjugiert (Tab. 10).

**Tab. 10:** Spezifikation der sekundären Antikörper

Antikörper	gegen
Salmonella Common Structural Antigen (CSA-1)	Antigene Salmonella O-Guppen
Salmonella Common Structural Antigen, Fluorescein konjugiert (CSA-1*)	Antigene Salmonella O-Guppen
Anti- mouse IgM ( $\mu$ IgM)	Antikörper Ab-O4, Ab-O5, Ab-O7
Anti- mouse IgM, Fluorescein konjugiert ( $\mu$ IgM*)	Antikörper Ab-O4, Ab-O5, Ab-O7

### 6.3.3 Antigene

Als Antigene wurden Lipopolysaccharide (LPS) oder ganze hitzeabgetötete Zellen verwendet:

- *Salmonella Thyphimurium* LPS (STM-LPS), Gruppe B (O1, O4, O5, O12)
- *Salmonella Choleraesuis* LPS (SCS-LPS), Gruppe C1 (O6, O7)
- *Salmonella Thyphimurium* Vollantigen (STM-V), hitzeinaktiviert in physiologischer Natriumchlorid-Lösung, 0,1% NaN<sub>3</sub>
- *Salmonella Choleraesuis* Vollantigen (SCS-V), hitzeinaktiviert in physiologischer Natriumchlorid-Lösung, 0,1% NaN<sub>3</sub>

## 6.4 Antikörpervorbereitung

### 6.4.1 Dialyse der Antikörper

Die Antikörper wurden in Nanosept 10K Röhrchen (FILTRON) gegen 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,2) dialysiert. Zuvor wurden die Filtron-Röhrchen mit Puffer vorrotiert, um die Glycerolschutzschicht auf den Membranen zu entfernen und mit 500 µl destilliertem Wasser, 3000 rpm, 6 min., 4°C und 200 µl 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,2), 3000 rpm, 4 min., 4°C kalibriert.

Die Dialyse (80 µl Probe) erfolgte in 100 µl vorgelegtem Puffer, 8 min., 3000 rpm, 4°C.

### 6.4.2 Oxidation der Antikörper

In einem 200 µl Eppendorf-Tube wurden 100 µl Probe mit 20 µl Natriumphosphat-Puffer (pH 7,2) und 5,5 µl 0,2 M Natriumperiodat-Lösung in Wasser 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss leicht geschüttelt.

FITC-markierte Antikörper (200 µl Probe) wurden in 25 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,2) aufgenommen und mit 10 µl 0,2 M Natriumperiodat-Lösung in Wasser 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss leicht geschüttelt.

### 6.4.3 Dialyse der oxidierten Antikörper

Die oxidierten Antikörper (80 – 100 µl) wurden in Nanosept 10K Röhrchen bei 3000 rpm und 4°C gegen 200 µl 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,2) bis auf das Anfangsvolumen der Probe einrotiert (ca. 10 – 25 min.).

## 6.5 Orientierte Anbindung von markierten, oxidierten Antikörpern

### 6.5.1 Kombination

- CSA-1\*
- $\mu\text{IgM}^*$

### 6.5.2 Anbindung der Antikörper

Die nach 4.3.3 - 4.3.5 präparierten Aminooberflächen wurden über Nacht bei 4°C mit den oxidierten, markierten Antikörperlösungen in einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre inkubiert. Die Antikörperstammlösungen wurden zuvor mit PBS ca. 1000-fach verdünnt. Nach der Inkubation wurden die Oberflächen mit PBS gespült und sofort weiter bearbeitet.

### 6.5.3 Reduktion der kovalent gebundenen oxidierten markierten Antikörper

Nach dem Spülen der inkubierten Oberflächen mit PBS wurden die kovalent gebundenen oxidierten markierten Antikörper in einer 0,01%-igen Lösung von Natriumborhydrid in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 6,5) 1 Stunde bei 30°C reduziert. Nach dem Waschen der Substrate in der Reihenfolge mit PBS, PBS-T,<sup>[18]</sup> PBS und Wasser wurden die Oberflächen im Stickstoffstrom getrocknet und fluoreszenzmikroskopisch ausgelesen.

## 6.6 Aufbau des Sandwich: nicht markierte Antikörper mit markierten sekundären Antikörper

### 6.6.1 Kombination

- oxidierter Ab-O4 +  $\mu\text{IgM}^*$
- oxidierter Ab-O5 +  $\mu\text{IgM}^*$
- oxidierter Ab-O7 +  $\mu\text{IgM}^*$

### 6.6.2 Anbindung der Antikörper

Die nach 4.3.3 - 4.3.5 präparierten Aminooberflächen wurden über Nacht bei 4°C mit den oxidierten, nicht markierten Antikörperlösungen in einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre inkubiert. Die Antikörperstammlösungen wurden zuvor mit PBS ca. 1000-fach verdünnt. Nach dem Inkubieren wurden die Oberflächen mit PBS gespült und sofort weiter bearbeitet.

### 6.6.3 Reduktion der kovalent gebundenen oxidierten nicht markierten Antikörper

Nach dem Spülen der Oberflächen wurden die kovalent gebundenen oxidierten nicht markierten Antikörper in einer 0,01%-igen Lösung von Natriumborhydrid in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 6,5) 1 Stunde bei 30°C reduziert. Danach wurden die Substrate mit PBS und PBS-T gespült.<sup>[18]</sup> Um eine Adsorption der sekundären markierten Antikörper an den Oberflächen zu verhindern, wurden die Oberflächen mit BSA blockiert. Dazu wurden die Substrate 30 Minuten bei 37°C oder über Nacht bei 4°C mit PBS-T-BSA behandelt.<sup>[19]</sup> Anschließend wurden die Oberflächen mit PBS gewaschen und sofort mit den Antigenen inkubiert.

### 6.6.4 Inkubation mit markierten sekundären Antikörpern

Die nach 6.6.3 präparierten Oberflächen wurden 1 Stunde bei 37°C mit den sekundären Antikörperlösungen in einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre inkubiert. Die sekundäre Antikörperstammlösungen wurden zuvor mit PBS ca. 2500-fach verdünnt. Nach dem Waschen der Substrate in der Reihenfolge mit PBS, PBS-T,<sup>[18]</sup> PBS und Wasser wurden die Oberflächen im Stickstoffstrom getrocknet und fluoreszenzmikroskopisch ausgelesen.

## 6.7 Aufbau des Sandwich: nicht markierte Antikörper mit Antigenen und markierten sekundären Antikörpern

### 6.7.1 Kombinationen

- positive Proben:

▪ oxidierter Ab-O4	+	STM-LPS	+	CSA-1*
▪ oxidierter Ab-O4	+	STM-V	+	CSA-1*
▪ oxidierter Ab-O5	+	STM-LPS	+	CSA-1*
▪ oxidierter Ab-O4	+	STM-V	+	CSA-1*
▪ oxidierter Ab-O7	+	STM-LPS	+	CSA-1*
▪ oxidierter Ab-O4	+	STM-V	+	CSA-1*

- negative Proben (falscher Antikörper):

▪ oxidierter Ab-O10	+	STM-LPS	+	CSA-1*
▪ oxidierter Ab-O10	+	SCS-LPS	+	CSA-1*
▪ oxidierter Ab-O13	+	STM-LPS	+	CSA-1*
▪ oxidierter Ab-O13	+	SCS-LPS	+	CSA-1*

- negative Proben (falsches Antigen):
  - oxidiertes Ab-Ox + *E. coli* + CSA-1\*  
(x = 4, 5, 7, 10, 13)

#### 6.7.2 Anbindung der Antikörper

Die nach 4.3.3 - 4.3.5 präparierten Aminooberflächen wurden über Nacht bei 4°C mit den oxidierten, nichtmarkierten Antikörperlösungen in einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre inkubiert. Die Antikörperstammlösungen wurden zuvor mit PBS ca. 1000-fach verdünnt. Nach dem Inkubieren wurden die Oberflächen mit PBS gespült und sofort weiter bearbeitet.

#### 6.7.3 Reduktion der kovalent gebundenen oxidierten nicht markierten Antikörper

Die kovalent gebundenen oxidierten nicht markierten Antikörper wurden in einer 0,01%-igen Lösung von Natriumborhydrid in 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 6,5) 1 Stunde bei 30°C reduziert. Danach wurden die Substrate mit PBS und PBS-T gespült.<sup>[18]</sup> Um eine Adsorption der Antigene an den Oberflächen zu verhindern, wurden die Oberflächen mit BSA blockiert. Dazu wurden die Substrate 30 Minuten bei 37°C oder über Nacht bei 4°C mit PBS-T-BSA behandelt.<sup>[19]</sup> Anschließend wurden die Oberflächen mit PBS gewaschen und sofort mit den Antigenen inkubiert.

#### 6.7.4 Inkubation mit Antigenen

Die nach 6.7.3 präparierten Oberflächen wurden 1 Stunde bei 30°C mit den Antigenlösungen in einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre inkubiert. Die Antigenstammlösungen wurden zuvor mit PBS ca. 1000-fach verdünnt. Danach wurden die Substrate mit PBS und PBS-T gespült.<sup>[18]</sup> Um eine Adsorption der sekundären markierten Antikörper an den Oberflächen zu verhindern, wurden die Oberflächen wiederum mit BSA blockiert. Dazu wurden die Substrate 30 Minuten bei 37°C oder über Nacht bei 4°C mit PBS-T-BSA behandelt.<sup>[19]</sup> Anschließend wurden die Oberflächen mit PBS gewaschen und sofort mit den sekundären markierten Antikörpern inkubiert.

#### 6.7.5 Inkubation mit markierten sekundären Antikörpern

Die nach 6.7.4 präparierten Oberflächen wurden 1 Stunde bei 37°C mit den sekundären markierten Antikörperlösungen in einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre inkubiert. Die sekundäre Antikörperstammlösungen wurden zuvor mit PBS

ca. 2500-fach verdünnt. Nach dem Waschen der Substrate in der Reihenfolge mit PBS, PBS-T,<sup>[18]</sup> PBS und Wasser wurden die Oberflächen im Stickstoffstrom getrocknet und fluoreszenzmikroskopisch ausgelesen.

## **6.8 Detektion**

Die Charakterisierung der Oberflächen erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Atomic Force Microscopy (AFM).

# **7 Adsorption von Farbstoffen aus der Lösung an strukturierten Oberflächen**

## **7.1 Chemikalien und Substrate**

Die Adsorption von Fluoreszenzfarbstoffen aus der Lösung wurde an mikrostrukturierten, monomolekularen Perfluorooctyl- bzw. Octadecylschichten in Kombination mit OH- und Aminooberflächen auf Silicium untersucht. Die Präparation und Mikrostrukturierung der Oberflächen wurde wie beschrieben unter den Abschnitten 2 – 4 durchgeführt. Die Adsorption erfolgte an Oberflächen von Einzelchips (Größe: 3 x 6 mm).

Zur Adsorption wurden die in Tab. 11 aufgeführten Fluoreszenzfarbstoffe (je nach Löslichkeit) in Methanol, Ethanol, 1-Butanol, 1-Octanol, Cyclohexan und Essigsäureethylester eingesetzt. Als Spülmedium wurden Ethanol, 1-Butanol, 1-Octanol, Cyclohexan und Essigsäureethylester verwendet.

**Tab. 11:** Liste der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe bei den Adsorptionsexperimenten

lfd. Nr.	Name	Strukturformel	Herkunft
1	BJ 36		P. Czerney, Institut für Physikalische Chemie der FSU Jena
2	BJ 60		P. Czerney, Institut für Physikalische Chemie der FSU Jena
3	Coumarin 6		ALDRICH
4	Cy 3		P. Czerney, Institut für Physikalische Chemie der FSU Jena
5	CZ 71		P. Czerney, Institut für Physikalische Chemie der FSU Jena
6	CZ 83		P. Czerney, Institut für Physikalische Chemie der FSU Jena
7	DCM		RADIANT DYES CHEMIE
8	Fluorescein		ALDRICH
9	Na-Fluorescein		MERCK
10	Nile Blue A		ALDRICH
11	Oxazin 170		RADIANT DYES CHEMIE
12	Rhodamin B		ALDRICH

## **7.2 Adsorptionsverhalten in Abhängigkeit vom Lösungsmittel und Spülmedium**

Die Oberflächen der Chips wurden vor den Adsorptionsversuchen mit Wasser, Ethanol, Aceton und Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Das Adsorptionsverhalten der Farbstoffe wurde bei unterschiedlichen Kombinationen von Lösungsmittel und Spülmedium untersucht. Die etwa  $10^{-5}$  M Farbstofflösungen wirkten 10 s auf die Oberflächen ein. Danach wurden die Oberflächen 10 s mit dem Spülmedium gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Die Charakterisierung der Oberflächen erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie.

## **7.3 Adsorptionsverhalten in Abhängigkeit von der Konzentration der Farbstofflösungen**

Die Oberflächen der Chips wurden vor den Adsorptionsversuchen mit Wasser, Ethanol, Aceton und Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Das Adsorptionsverhalten wurde bei unterschiedlichen Konzentrationen der Farbstoffe in 1-Butanol untersucht. Die  $10^{-3}$  –  $10^{-7}$  M Farbstofflösungen wirkten 10 s auf die Oberflächen ein. Danach wurden die Oberflächen 10 s mit 1-Octanol gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Die Charakterisierung der Oberflächen erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie.

## **7.4 Adsorptionsverhalten in Abhängigkeit von der Adsorptionszeit**

Die Oberflächen der Chips wurden vor den Adsorptionsversuchen mit Wasser, Ethanol, Aceton und Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Das Adsorptionsverhalten wurde bei unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen und unterschiedlichen Adsorptionszeiten untersucht. Die Lösungen der Farbstoffe in 1-Butanol wirkten von 10 Sekunden bis 30 Minuten auf die Oberflächen ein. Danach wurden die Oberflächen 10 s mit 1-Octanol gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Die Charakterisierung der Oberflächen erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie.

# **8 Polymerschichten auf Oberflächen für Fluoreszenzmessungen**

## **8.1 Vorbemerkung**

Als Träger für die Polymerschichten wurden Standard-Deckgläser (ROTH) für die Mikroskopie aus reinweißem Glas (24 x 24 mm, Stärke 0,13 – 0,17 mm) der hydrolytischen Klasse 1 verwendet.

Das Aufschleudern der Polymere wurde in einem Reinraum der Reinraumklasse 100 durchgeführt. Die Polymerlösungen wurden vor dem Aufbringen auf die Substrate unter Reinraumbedingungen durch eine 0,2 µm Teflon-Membran filtriert.

Die verwendeten Lösungsmittel für die Polymere wurden, wenn nicht anders angegeben, vor ihrer Verwendung destilliert. Das Wasser zum Spülen der Substrate war deionisiert und wurde zusätzlich destilliert.

## **8.2 Chipvorbereitung**

Vor der Beschichtung wurden die Chips je 10 Minuten in der Reihenfolge mit Wasser, Ethanol und Aceton im Ultraschallbad gereinigt. Anschließend wurden sie noch für 30 Minuten bei 70°C mit einer 2% Deconex<sup>®</sup>-Lösung (BORER CHEMIE AG) im Ultraschallbad behandelt. Nach gründlichem Spülen mit viel Wasser wurden die Chips im Stickstoffstrom getrocknet.

## **8.3 Polymer-Stammlösungen**

### **8.3.1 Polyvinylalkohol 22.000 (PVA 22), 2% (w/w)**

In 1 Liter Wasser wurden 23 g Polyvinylalkohol 22.000 (Asche 2%, Viskosität [4% in H<sub>2</sub>O, 20°C]: 5 mPa s, Polymerisationsgrad 500, Hydrolysegrad 97,5 – 99,5 mol%) unter Erwärmen gelöst. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 145 ml Ethanol und 11,5 g DABCO zugegeben und die Lösung filtriert.

### **8.3.2 Polyvinylalkohol 100.000 (PVA 100), 2% (w/w)**

In 1 Liter Wasser wurden 23 g Polyvinylalkohol 100.000 (Asche 1%, Viskosität [4% in H<sub>2</sub>O, 20°C]: 35 – 45 mPa s, Polymerisationsgrad 2000, Hydrolysegrad 86 – 89 mol%) unter Erwärmen gelöst. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 145 ml Ethanol und 11,5 g DABCO zugegeben und die Lösung filtriert.

## **8.4 Fluorescein eingebettet in Polymerschichten**

Aus den Polymer-Stammlösungen wurden Maßlösungen mit unterschiedlichen Fluorescein-Konzentrationen hergestellt.

Vor dem Aufbringen des Polymers wurden die nach 8.2 gereinigten Chips 20 Minuten bei 80°C getempert. Die Fluorescein-Polymer-Maßlösung wurde in 10 s bei 500 rpm auf die Chips aufgebracht und bei 2000 – 6000 rpm weitere 30 s geschleudert (Tab. 12). Die Polymerschicht wurde danach 1 Minute bei 80°C auf der Hotplate getempert und anschließend 20 Minuten bei 80°C getrocknet.

**Tab. 12:** Schleuderprotokoll Polymere

Schritt	rpm	Beschleunigung in s	Zeit in s
1	600	10	5
2	600	2	5
3	2000 – 6000	10	30
4	50	10	5

### 8.5 Bestimmung des Fluoresceingehalts in PVA-Schichten

Zur Bestimmung der Fluorescein-Konzentration im Polymer wurde zunächst die Schichtdicke der Polymerschicht mit einem Micromap 512 der Firma ATOS (Gesellschaft für Angewandte Technologien und Optische Systeme) bestimmt und das Volumen der Polymerschicht berechnet. Anschließend wurde die PVA-Schicht und das eingebettete Fluorescein von den Glaschips abgelöst. Dazu wurden die zerkleinerten Chips 4 mal mit je 1 ml 0,1 M Natriumhydroxydlösung für 10 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden in einem Maßkolben mit 0,1 M Natriumhydroxydlösung auf 5 ml aufgefüllt. Danach wurde die Farbstoffkonzentration der Lösung durch Messung der UV-Absorption gegen eine Fluorescein-Standard-Konzentrationsreihe bestimmt. Anhand des vorher bestimmten Volumens der Polymerschicht wurde die Fluorescein-Konzentration im Polymer und die Anzahl der Fluorescein-Moleküle pro Fläche berechnet.

## 9 Auswertung Fluoreszenzmikroskopie

### 9.1 Auswerteverfahren bei der Fluoreszenzmikroskopie strukturierter Oberflächen

Die fluoreszierenden Mikrostrukturen und eine Referenzoberfläche ohne Farbstoffbelegung wurden mit einer CCD-Kamera aufgenommen und im Tagged Information File Format (TIFF, Farbtiefe 8 Bit, Farbdarstellung Graustufen) gespeichert. Die Belichtungszeiten richteten sich der Intensität des Fluoreszenzsignals der Probe. Die Auswertung der Fluoreszenzintensität erfolgte über die Grauwertverteilung einer 5 x 5 Pixel-Fläche nach Hintergrundsubtraktion der Referenz von der Probe. Der Durchschnitt der Grauwerte der Pixelfläche wurde durch die Belichtungszeit in Sekunden dividiert und ergab die relative Fluoreszenzintensität der Farbstoffe auf den Oberflächen.

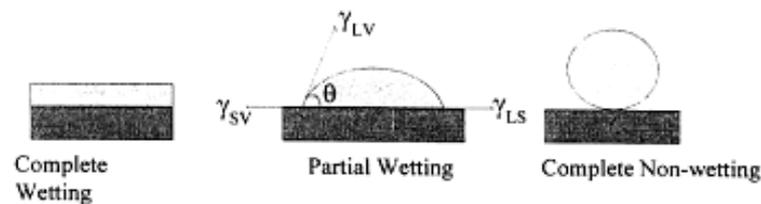
## **9.2 Quantifizierung durch Vergleich Schicht – Monolage**

Zur Bestimmung der Anzahl der Farbstoffmoleküle auf der Oberfläche wurden die nach 8.4 hergestellten Polymerschichten mit eingebetteten Fluoreszenzfarbstoffen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Abhängigkeit der relativen Fluoreszenz (siehe 9.1) wurde gegen die Anzahl der Farbstoffmoleküle/cm<sup>2</sup> graphisch dargestellt. Durch lineare Regression wurde den Messwerten des linear ansteigenden Abschnitts des Graphen eine lineare Funktion zugewiesen. Die Anzahl der Farbstoffmoleküle auf den Proben wurde durch Messung der relativen Fluoreszenz der Oberflächen und Vergleich mit der Ausgleichsgeraden bestimmt.

# Ergebnisse

## 1 Vorbemerkung zur Berechnung der Oberflächenspannung

Befindet sich ein Tropfen einer Flüssigkeit auf einer ebenen festen Oberfläche, so kommt es bei einer partiellen Benetzung zur Ausbildung eines Dreiphasenkontaktes auf der Festkörperoberfläche (Abb. 1).



**Abb. 1:** Benetzbarkeit einer Festkörperoberfläche durch eine Flüssigkeit ( $\theta$ : Kontakt- oder Randwinkel,  $\gamma_{sv}$ : Vektor der Oberflächenspannung der Festkörperoberfläche an der Oberfläche Festkörper/Gas,  $\gamma_{lv}$ : Vektor der Oberflächenspannung der Flüssigkeit an der Oberfläche Flüssigkeit/Gas,  $\gamma_{ls}$ : Vektor der Oberflächenspannung der Festkörperoberfläche an der Oberfläche Flüssigkeit/Festkörper)

Entsprechen den Vektorgesetzen folgt nach dem Parallelogramm der Kräfte die Young-Gleichung (Gl. 1-1).

$$\gamma_{sv} = \gamma_{ls} + \gamma_{lv} \cdot \cos \theta \quad \text{Gl. 1-1}$$

Der Kontaktwinkel  $\theta$  als Maß für die Benetzbarkeit der Festkörperoberfläche ist das Ergebnis der drei Vektoren in Form der spezifischen Oberflächen- und Grenzflächenspannungen. Wenn die Grenzflächenspannung  $\gamma_{sl}$  messbar wäre, könnte die Oberflächenspannung des Festkörpers nach Gl. 1-1 leicht bestimmt werden.<sup>[20]</sup>

1964 wurde von Zisman die kritische Oberflächenspannung als Kriterium zur Charakterisierung der Benetzbarkeit von Festkörperoberflächen eingeführt.<sup>[21]</sup> Dabei besteht bei niederenergetischen Festkörperoberflächen oberhalb einer kritischen Größe  $\gamma^c$  näherungsweise ein linearer Zusammenhang zwischen den Oberflächenspannungen

(bzw. Freien Oberflächenenergien) der Flüssigkeiten und dem Kosinus des Kontaktwinkels. Unterhalb von  $\gamma^c$  liegen die Messwerte auf dem Level  $\cos\theta = 1$  bzw.  $\theta = 0^\circ$ .<sup>[20]</sup> Das heißt, Flüssigkeiten spreiten auf den Festkörperoberflächen, wenn deren Oberflächenspannung  $\gamma_{lv}$  unterhalb von  $\gamma^c$  liegen. Wenn  $\gamma_{lv} > \gamma^c$  ist, bildet die Flüssigkeit einen Tropfen auf der Oberflächen, dessen Kontaktwinkel von der Oberflächenspannung  $\gamma_{lv}$  der Flüssigkeit abhängt.

Mit  $\gamma^c$  lässt sich die Young-Gleichung (Gl. 1-1) umformulieren (Gl. 1-2).

$$\gamma_{sv} - \gamma_{ls}^c = \gamma^c \cdot \cos\theta = \gamma^c \quad \text{Gl. 1-2}$$

Wenn  $\gamma_{ls}^c$  vernachlässigbar klein gegenüber der Oberflächenspannung  $\gamma_{sv}$  ist, kann man somit die Oberflächenspannung der Festkörper aus  $\gamma^c$  abschätzen.

Eine Näherung zur Berechnung der Freien Oberflächenenergie von Festkörperoberflächen nach Fowkes beruht auf der Annahme, dass sich die Freie Oberflächenenergie des Festkörpers und der Flüssigkeit aus den Anteilen der Dispersionswechselwirkung (d), der Dipol-Dipol-Wechselwirkung (p), der Dipol-induzierter Dipol-Wechselwirkung (i), Wasserstoffbrückenanteilen (h) und  $\pi$ -Bindungsanteilen ( $\pi$ ), elektrostatischen Wechselwirkungen (e) und Acceptor-Donor-Wechselwirkungen (ad) zusammensetzt.<sup>[22-24]</sup> Die Grenzflächenspannung  $\gamma_{ls}$  lässt sich nach Fowkes durch Gl. 1-3 beschreiben, wobei  $W_{A(ls)}$  die Adhäsionsarbeit ist Gl. 1-4.

$$\gamma_{ls} = \gamma_{sv} + \gamma_{lv} - W_{A(ls)} \quad \text{Gl. 1-3}$$

$$W_{A(ls)} = W_{A(ls)}^d + W_{A(ls)}^p + W_{A(ls)}^i + W_{A(ls)}^h + W_{A(ls)}^\pi + W_{A(ls)}^e + W_{A(ls)}^{ad} \quad \text{Gl. 1-4}$$

Owens und Wendt bestimmten die Freie Oberflächenenergie von Polymeren unter Berücksichtigung der Wasserstoffbrückenanteile<sup>[25]</sup> und Kaelble et al. bezogen die Dispersionsanteile und die polaren Grenzflächenwechselwirkungen mit ein, um die Adhäsionsarbeit zu berechnen.<sup>[26-28]</sup>

Nach Wu ist die Grenzflächenspannung der Oberfläche Flüssigkeit/Festkörper Ausdruck des harmonischen Mittels der Dispersionsanteile und der polaren Anteile.<sup>[29-34]</sup>

Ein weiteres, in der Literatur umstrittenes<sup>[35]</sup> Modell zur Berechnung der Freien Oberflächenenergie nach einer thermodynamischen Ableitung, ist das sogenannte „Equation of State“ von Neumann et al., nach dem die Oberflächenenergie an der Grenzfläche Festkörper/Flüssigkeit eine Funktion der absoluten Oberflächenenergien der Festkörper und der Flüssigkeitsoberfläche ist (Gl. 1-5).<sup>[36-41]</sup>

$$\gamma_{ls} = f(\gamma_l, \gamma_s) \quad \text{Gl. 1-5}$$

Eine Zusammenstellung der verschiedenen Modelle zur Berechnung der Freien Oberflächenenergie von Festkörperoberflächen findet sich bei Janzuk und Bialopiotrowicz.<sup>[42]</sup>

In Tab. 13 sind zu den Anwendungsbereichen der verschiedenen Modellen einige Beispiele aufgeführt.

**Tab. 13:** Anwendungsbereich der Modelle zur Berechnung der freien Oberflächenenergie

Methoden	Information	Anwendung	Beispiele
Zisman	kritische Oberflächenspannung	nichtpolare Festkörper	PE, PTFE, Wachse
Fowkes	disperse Anteile der freien Oberflächenenergie	nichtpolare Systeme	PE, PTFE, Wachse
Owens-Wendt-Rabel & Kaelble	disperse und polare Anteile der freien Oberflächenenergie	universell	Polymere, Beschichtungen, Lacke...
Wu (Harmonic Mean)	disperse und polare Anteile der freien Oberflächenenergie	niederenergetische Systeme	organische Lösungen, Polymere,
Equation of State	freie Oberflächenenergie	universell	Polymere, Beschichtungen, Lacke...

## 2 Native Glas- und Si-Oberflächen

In Tab. 14 sind die Kontaktwinkel der verschiedenen Lösungsmittel an den nativen Borofloat 33 Oberflächen zusammengefasst. Die berechneten Grenzflächenspannungen zeigt Tab. 15.

**Tab. 14:** Kontaktwinkel  $\theta$  verschiedener Lösungsmittel auf unbehandelten Glas- und Si-Substraten (Toleranz  $\pm 2^\circ$ )

Lösungsmittel	$\theta_{\text{Glas}}$ in $^\circ$	$\theta_{\text{Si}}$ in $^\circ$
Benzol	9	5
Diodmethan	46	52
DMF	4	15
DMSO	14	19
Ethylenglycol	25	51
Ethanol	0	0
Hexan	7	6
Wasser	35	71

**Tab. 15:** Grenzflächenspannung von nativen Glas- und Siliciumoberflächen

Methode		Glas	Silicium
Owens-Wendt- Rabel & Kaelble	Grenzflächenspannung	$55,22 \pm 0,17$ mN/m	$34,98 \pm 0,08$ mN/m
	polarer Anteil	34,66 mN/m	11,86 mN/m
	dispersiver Anteil	18,56 mN/m	23,13 mN/m
Wu's Harmonic Mean	Grenzflächenspannung	$59,46 \pm 0,14$ mN/m	$40,69 \pm 0,12$ mN/m
	polarer Anteil	33,04 mN/m	13,50 mN/m
	dispersiver Anteil	26,42 mN/m	27,19 mN/m
Equation of State	Grenzflächenspannung	$40,99 \pm 0,73$ mN/m	$34,06 \pm 0,34$ mN/m

## 3 Hydrophile Glas- und Siliciumoberflächen

Durch Ätzen im Sauerstoffplasma wurde auf den Oberflächen der Substrate eine hohe Dichte an OH-Gruppen erzeugt. Die OH-Oberflächen waren enorm hydrophil, so dass Kontaktwinkelmessungen mit einzelnen Flüssigkeiten an kürzlich Plasma behandelten

Substraten nicht möglich waren. Durch eine anschließende Behandlung der Oberflächen in Salzsäure/Wasserstoffperoxid im Ultraschallbad konnten die Kontaktwinkel von Wasser an den Grenzflächen noch weiter herabgesenkt werden. Nach längerem Luftkontakt der ungeschützten hydrophilen Grenzflächen stiegen die Kontaktwinkel von Wasser wieder an. Die OH-Oberflächen konnten aber durch Abspülen mit Ethanol oder Aceton und Aktivierung in Salzsäure/Wasserstoffperoxid wieder regeneriert werden. Als relatives Maß für die Dichte der OH-Gruppen auf den Oberflächen wurden der Kontaktwinkel von Wasser und der polare Anteil der Oberflächenspannung herangezogen. Es zeigte sich, dass die Dichte der OH-Gruppen auf den Oberflächen je nach verwendetem Substrat und je nach Methode der Plasmabehandlung variiert.

### 3.1 Reaktives Ionenätzen (RIE) mit Sauerstoff

In Tab. 16 sind die Kontaktwinkel der verschiedenen Lösungsmittel an Sauerstoffplasma geätzten Oberflächen zusammengefasst. Die berechneten Oberflächenspannungen zeigt Tab. 17.

**Tab. 16:** Kontaktwinkel  $\theta$  verschiedener Lösungsmittel an Sauerstoffplasma (RIE) behandelten Glas- und Siliciumoberflächen (Toleranz  $\pm 2^\circ$ )

Lösungsmittel	$\theta_{\text{Glas}}$ in $^\circ$	$\theta_{\text{Si}}$ in $^\circ$
Benzol	7	5
Diiodmethan	41	44
DMF	0	0
DMSO	2	2
Ethylenglycol	5	5
Ethanol	0	0
Hexan	7	6
Wasser	5	35

**Tab. 17:** Oberflächenspannung von Sauerstoffplasma (RIE) behandelten Glas- und Siliciumoberflächen

Methode		Glas	Silicium
Owens-Wendt- Rabel & Kaelble	Oberflächenspannung	$62,97 \pm 0,23$ mN/m	$54,56 \pm 0,20$ mN/m
	polarer Anteil	45,74 mN/m	35,38 mN/m
	dispersiver Anteil	17,23 mN/m	19,17 mN/m
Wu's Harmonic Mean	Oberflächenspannung	$70,10 \pm 0,17$ mN/m	$60,97 \pm 0,18$ mN/m
	polarer Anteil	43,18 mN/m	33,40 mN/m
	dispersiver Anteil	26,93 mN/m	27,57 mN/m
Equation of State	Oberflächenspannung	$45,27 \pm 1,37$ mN/m	$42,85 \pm 0,93$ mN/m

### 3.2 Ätzen im Sauerstoffplasma-Stripper

In Tab. 18 sind die Kontaktwinkel der verschiedenen Lösungsmittel an Sauerstoffplasma-Stripper geätzten Oberflächen zusammengefasst. Die berechneten Oberflächenspannungen zeigt Tab. 19.

**Tab. 18:** Kontaktwinkel  $\theta$  verschiedener Lösungsmittel an Sauerstoffplasma-Stripper behandelten Glas- und Siliciumoberflächen (Toleranz  $\pm 2^\circ$ )

Lösungsmittel	$\theta_{\text{Glas}}$ in $^\circ$	$\theta_{\text{Si}}$ in $^\circ$
Benzol	14,32	5,63
Diiodmethan	38,36	15,84
DMF	4,86	17,55
DMSO	0	0
Ethylenglycol	0	0
Ethanol	0	0
Hexan	8,48	6,95
Wasser	0	13,24

**Tab. 19:** Oberflächenspannung der Sauerstoffplasma-Stripper behandelten Glas- und Siliciumoberflächen

Methode		Glas	Silicium
Owens-Wendt- Rabel & Kaelble	Oberflächenspannung	63,09 ± 0,24 mN/m	60,62 ± 0,30 mN/m
	polarer Anteil	45,82 mN/m	41,66 mN/m
	dispersiver Anteil	17,27 mN/m	18,96 mN/m
Wu's Harmonic Mean	Oberflächenspannung	70,37 ± 0,18 mN/m	68,82 ± 0,24 mN/m
	polarer Anteil	43,27 mN/m	39,64 mN/m
	dispersiver Anteil	27,10 mN/m	29,18 mN/m
Equation of State	Oberflächenspannung	45,86 ± 4,06 mN/m	45,90 ± 1,60 mN/m

## 4 Hydrophobe Self Assembled Monolayer auf Silicium- und Glasoberflächen

### 4.1 Octadecyl-Monolagen

Die Octadecyl-Monolagen auf Glas und Silicium zeigten substratspezifisch keine Unterschiede der Kontaktwinkel und der Oberflächenspannung (Tab. 20 und Tab. 21).

Die Oberflächenspannung der Octadecyl-Monolayer betrug ~22 mN/m, die kritische Oberflächenspannung nach Zisman ~21 mN/m.

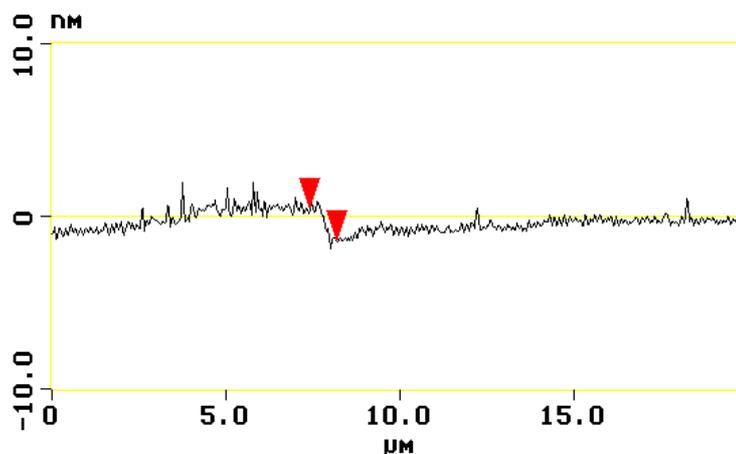
**Tab. 20:** Kontaktwinkel  $\theta$  verschiedener Lösungsmittel an Octadecyl-Monolagen (Toleranz ± 2°)

Lösungsmittel	$\theta$ in °
Benzol	19,12
DMF	49,42
DMSO	67,62
Ethanol	23,15
Hexan	9,87
Methanol	17,82
NMP	50,50
Wasser	98,27

**Tab. 21:** Oberflächenspannung der Octadecyl-Monolagen

	Methode	Oberflächenspannung
Zisman	Oberflächenspannung (kritische)	$20,93 \pm 0,01$ mN/m
Owens-Wendt-Rabel & Kaelble	Oberflächenspannung	$24,04 \pm 0,02$ mN/m
	polarer Anteil	2,03 mN/m
	dispersiver Anteil	22,01 mN/m
Wu's Harmonic Mean	Oberflächenenspannung	$18,19 \pm 0,14$ mN/m
	polarer Anteil	4,17 mN/m
	dispersiver Anteil	14,02 mN/m
Equation of State	Oberflächenspannung	$24,24 \pm 0,28$ mN/m

Die Stufenhöhe einer Kante vom Übergang einer Octadecyl-Monoschicht zur Si-OH Oberfläche wurde durch AFM-Aufnahmen mit  $\sim 1,9$  nm bestimmt (Abb. 2). Die Schichtdicke wurde durch ellipsometrische Messungen mit  $\sim 2$  nm bestätigt. REM und AFM Aufnahmen zeigten die Homogenität in der Topographie.

**Abb. 2:** AFM-Aufnahme der Stufe einer Octadecyl-Monoschicht zur Si-OH-Oberfläche auf Silicium

#### 4.2 Perfluoroctyl- und Perfluordecyl-Monolagen

Ebenso wie die Octadecyl-Monolagen auf Glas oder Silicium zeigten auch die Perfluoralkyl-Monolagen keine substratspezifischen Unterschiede der Kontaktwinkel und der Oberflächenspannung (Tab. 22 und Tab. 23). Des weiteren konnten auch keine

Unterschiede in der Oberflächenspannung und der Kontaktwinkel hinsichtlich zwischen Perfluorooctyl- und Perfluordecyltrichlorsilan festgestellt werden.

Die Oberflächenspannung der Perfluoralkyl-Monolayer betrug  $\sim 18$  mN/m, die kritische Oberflächenspannung nach Zisman  $\sim 11$  mN/m.

**Tab. 22:** Kontaktwinkel  $\theta$  verschiedener Lösungsmittel an Perfluoralkyl-Monolagen

Lösungsmittel	$\theta$ in $^\circ$
Benzol	55,50
DMSO	79,40
Ethanol	33,50
Hexan	33,50
Methanol	41,40
Wasser	106,80

**Tab. 23:** Oberflächenspannung der Perfluoralkyl-Monolagen

	Methode	Oberflächenspannung
Zisman	Oberflächenspannung (kritische)	$11,15 \pm 0,01$ mN/m
Owens-Wendt- Rabel & Kaelble	Oberflächenspannung	$17,97 \pm 0,01$ mN/m
	polarer Anteil	1,05 mN/m
	dispersiver Anteil	17,97 mN/m
Wu's Harmonic Mean	Oberflächenenergie (total)	$19,28 \pm 0,002$ mN/m
	polarer Anteil	4,02 mN/m
	dispersiver Anteil	15,26 mN/m
Equation of State	Oberflächenenergie (total)	$18,23 \pm 0,02$ mN/m

Durch ellipsometrische Untersuchungen wurde für eine Perfluordecyl-Monolage eine Schichtdicke von 1,6 nm gemessen.

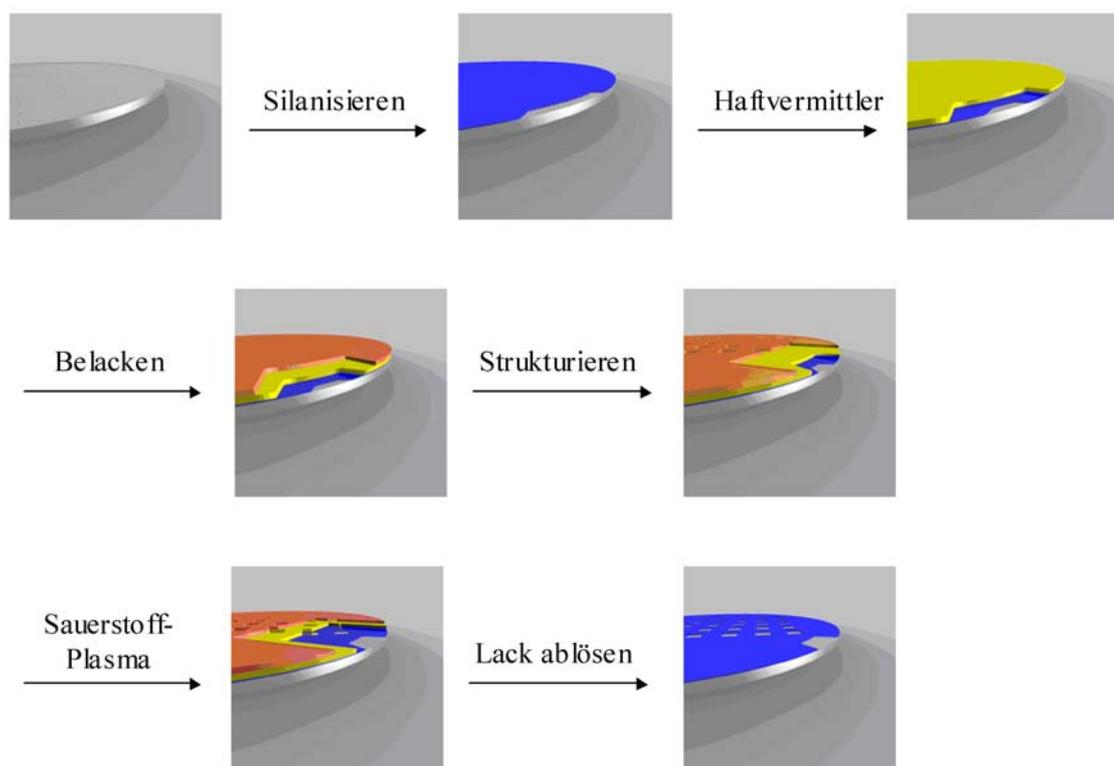
Die perfluorierten, monomolekularen Oberflächen waren bis etwa  $300$   $^\circ\text{C}$  stabil, danach begann eine thermische Zersetzung der Moleküle, die anhand der  $\text{F}^+$ -,  $\text{HF}^+$ -,  $\text{CF}_3^+$ - und  $\text{CF}_2\text{-CF}_3^+$ -Fragmente massenspektrometrisch nachgewiesen wurden.

## 5 Mikrostrukturierung der Self Assembled Monolayer auf Silicium- und Glasoberflächen

### 5.1 Vorbemerkung

Die Strukturierung von Oberflächenfilmen geschieht standardmäßig mit Hilfe einer photoaktiven Lackschicht, die üblicherweise auf die Oberflächen aufgeschleudert und über eine Chrommaske belichtet wird. Aufgrund der geringen Oberflächenenergie der hier präparierten Monofilme konnte die Lacklösung die Oberflächen der Substrate nicht genügend benetzen. Durch die mangelnde Lackhaftung ließen sich keine homogenen Lackschichten durch Aufschleudern erzeugen. Zur Verbesserung der Lackhaftung wurden die Substrate deshalb vor der Lackbeschichtung mit einem Haftvermittler beschichtet. Als geeignetste Systeme zum Aufschleudern homogener, dünner Haftvermittlerschichten auf hydrophobe Oberflächen erwiesen sich bei den Versuchsreihen eine 0,5%ige Lösung von Polymethylmethacrylat in Xylol/<sup>tert.</sup>Butyl-Methylether oder eine wässrige Lösung von Gelatine 60 die durch Glutaraldehyd vernetzte wurde.

Den gesamten Ablauf des Strukturierungsprozesses zeigt Abb. 3.

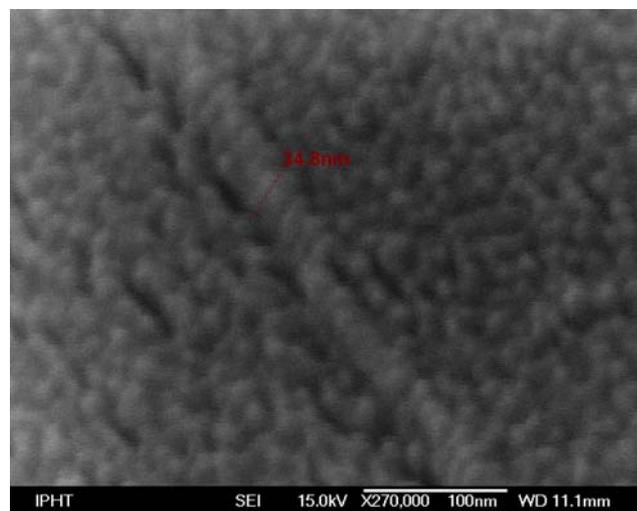


**Abb. 3:** Schematische Darstellung des Strukturierungsprozesses

## 5.2 Schichtdicke der Haftvermittler

### 5.2.1 Polymethylmethacrylat als Haftvermittler

Die Polymethylmethacrylatschichten dienten als Haftvermittler für den Photolack. Die Anforderung an den Haftvermittler war, homogene und dünne Schichten auszubilden. Das Aufschleudern bei 3000 rpm ergab optimale und homogene PMMA-Schichten mit ~35 nm Dicke (Abb. 4). Höhere Drehzahlen ließen das PMMA vom Substrat abreißen. Bei niedrigeren Drehzahlen kam es nicht zum Ausbilden von homogenen PMMA-Schichten.



**Abb. 4:** REM-Aufnahme einer angeritzten PMMA-Haftvermittlerschicht

### 5.2.2 Gelatine 60 als Haftvermittler

Um die Bedingungen zum Herstellen von homogenen, dünnen Gelatineschichten als Haftvermittler für den Photolack zu finden, wurden Gelatinelösungen verschiedener Konzentrationen bei unterschiedlichen Drehzahlen auf die hydrophoben Glas- und Siliciumsubstrate aufgeschleudert. Das Haftungsverhalten der Schichten hing dabei drastisch von der Anzahl der Umdrehungen des Substrates sowie von der Vernetzung und der Konzentration der Gelatine ab. Homogene Gelatineschichten konnten bei Einsatz von 10% Gelatine in Wasser und Quervernetzung mit Glutaraldehyd erreicht werden (Tab. 24). Die optimale Schleuderzahl lag bei 3000 rpm für 30 s. Bei höheren Drehzahlen kam es zum Abreißen der Gelatineschichten von den hydrophoben Oberflächen, bei niedrigeren Drehzahlen konnten hingegen keine festen Gelatineschichten erzeugt werden. Höher konzentrierte Lösungen ergaben inhomogene

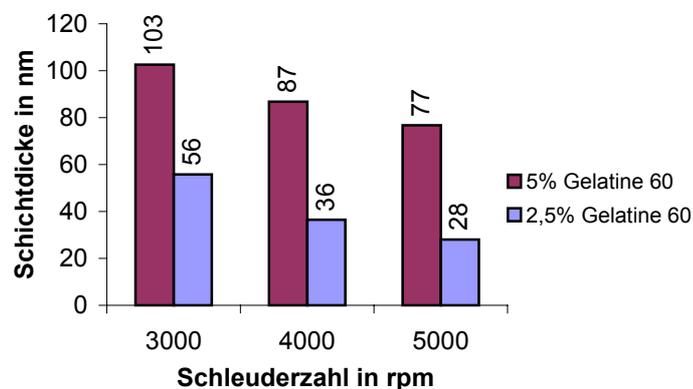
Gelatineschichten mit uneinheitlicher Schichtdicke. Konzentrationen von Gelatine kleiner als 5% führten aufgrund der schlechten Benetzung der hydrophoben Substrate zu keiner Schichtbildung.

**Tab. 24:** Schichtdicke von aufgeschleuderten Gelatineschichten (30 s, 3000 rpm) auf hydrophoben Substraten quervernetzt mit Glutaraldehyd

Konzentration Gelatine 60	Schichtdicke
5%	77 nm
10%	130 nm

Gelatine ohne Quervernetzung konnte ebenfalls aufgrund der schlechten Haftung auf den hydrophoben Substraten keine Schichten durch Aufschleudern ausbilden.

Für hydrophile Substrate war eine Quervernetzung der Gelatine nicht notwendig (Abb. 5).



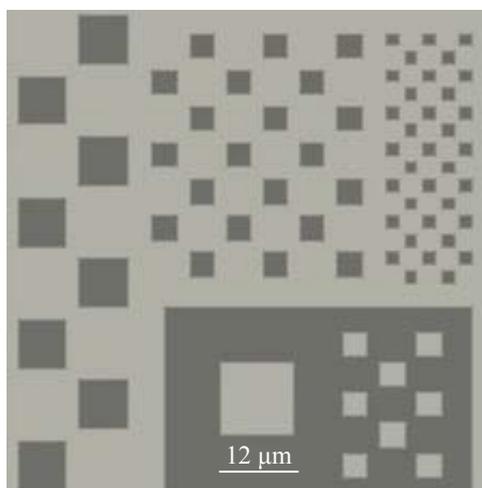
**Abb. 5:** Schichtdicke von aufgeschleuderten Gelatineschichten (30 s, 3000 rpm) auf hydrophilen Substraten

### 5.3 Strukturierung des Photoresists AZ 1514 H

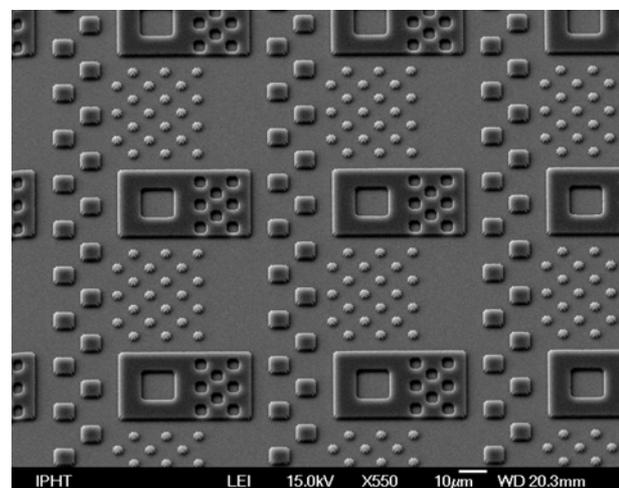
Bei der Entwicklung der belichteten Lackschicht kann es zu Abweichungen der von der Chrommaske übertragenen Struktur kommen. Durch diese Abweichungen treten in den lithographisch strukturierten Monolagen Maßverschiebungen auf. Aufgrund der geringen Abmessungen mikrolithographischer Strukturen bedeuten solche kleinen absoluten Verschiebungen von Kanten erhebliche relative Fehler. Die

Maßverschiebungen haben ihre Ursache in Unterätzungen beim isotropen Ätzen oder durch technologisch bedingte Mindestüberentwicklungszeiten des Photolacks zum Ausgleich von lokalen Unterschieden des Lackabtrages und von Materialdickeschwankungen. Sie werden bestimmt durch die Lackdicke, Lackdickenhomogenität, Lackempfindlichkeit (Charge, Alter), Lichtdosis, Dosisverteilung und den Lackentwickler (Konzentration, Temperatur, Konvektion).<sup>[43]</sup> Die Schichtdicken des Photolackes AZ 1514 H in Abhängigkeit von der Drehzahl und der Konzentration zeigt Tab. 25.

Die Mikrostrukturierung der Lackschicht erfolgte durch Belichten über eine Chrommaske und Entwicklung des Photoresist. Die verbliebene Lackstruktur diente beim anschließenden Reaktiven Ionenätzen (RIE) mit Sauerstoff als Schutzschicht für die darunter liegenden monomolekularen Schichten. Im Sauerstoffplasma hatte der Photoresist eine Ätzrate von  $\sim 120$  nm/min. Aufgrund dieser Materialabtragungen während des gesamten lithographischen Prozesses musste der Lack eine Schichtdicke von mindestens  $0,5\text{-}0,6$   $\mu\text{m}$  aufweisen. Bei dieser Lackdicke war es jedoch nicht mehr möglich, Strukturen von  $<4$   $\mu\text{m}$  mit der erforderlichen Maßhaltigkeit zu erzeugen. Strukturgrößen von  $2$   $\mu\text{m}$  ließen sich nicht mehr darstellen (Abb. 6 und Abb. 7).



**Abb. 6:** Maskenlayout der verwendeten Chrommaske (dunkel: Chromschicht, hell: Fenster)



**Abb. 7:** REM-Aufnahme eines strukturierten und Sauerstoffplasma geätzten AZ 1514 H Resists (Maske Abb. 6)

**Tab. 25:** Schichtdicken des Photolacks AZ 1514 H bei verschiedenen Konzentrationen und Drehzahlen

Photolack und Konzentration	rpm	Schichtdicke in $\mu\text{m}$
AZ 1514 H unverdünnt	3000	2,090
	5000	1,614
	6000	1,503
	7000	1,396
	8000	1,336
AZ 1514 H 24%	5000	1,140
AZ 1514 H 23%	3000	1,260
	4000	1,055
	5000	0,855
AZ 1514 H 18%	3000	0,685
	4000	0,621
	5000	0,532
	6000	0,518
AZ 1514 H 15%	3000	0,480
	4000	0,410
	5000	0,365
	7000	0,320
	8000	0,310
AZ 1514 H 14%	5000	0,300
AZ 1514 H 10%	3000	0,230
	4000	0,200
	5000	0,175

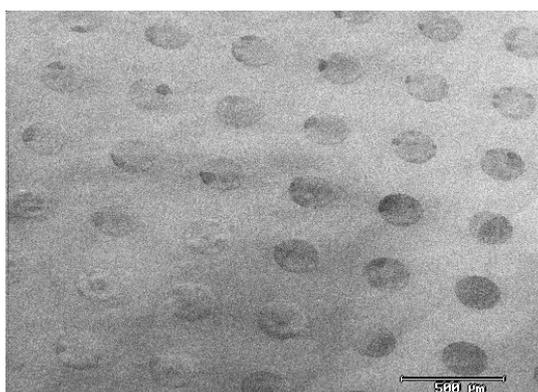
#### 5.4 Ergebnisse Mikrostrukturierung

Durch das Reaktive Ionenätzen (RIE) mit Sauerstoff wurden die monomolekularen Oberflächenfilme unter den geöffneten Lackfenstern entfernt und OH-Gruppen auf der Substratoberflächen generiert. Je nach verwendeter Maske bei der lithographischen

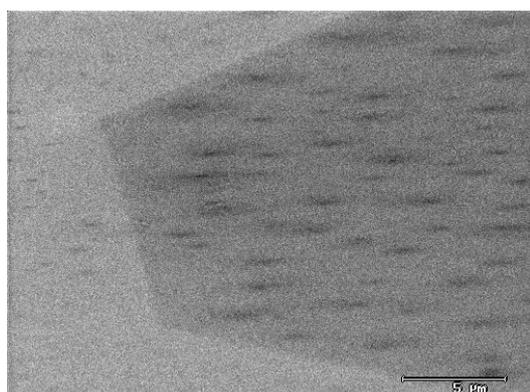
Strukturierung wurden auf den Oberflächen hydrophile OH-Chemotope in einer hydrophoben monomolekularen Umgebung erzeugt.

Die Stufenhöhe der Kante einer Octadecyl-Monolage wurde durch AFM-Aufnahmen mit  $\sim 1,9$  nm bestimmt (siehe Abb. 2 Seite 38).

Eine Octadecyl-Monoschicht von 1,9 nm Höhe sollte sich erwartungsgemäß nicht durch Raster Elektronen Mikroskopie detektieren lassen. Die REM-Aufnahmen zeigten jedoch einen deutlichen Kontrastunterschied zwischen einer Octadecyl-Schicht und einer OH-Oberfläche auf Silicium. Die im Bild hellere Octadecyl-Schicht scheint, effektiver als die dunkleren achteckigen OH-Spots Sekundärelektronen zu emittieren<sup>[44,45]</sup> oder die eingestrahnten Elektronen zurück zu streuen (Backscatter-Effekt) (Abb. 8 und Abb. 9). Die Verzerrung der regelmäßigen Achteckstruktur in Abb. 9 resultiert aus dem Anstellwinkel der Probe im Rasterelektronenmikroskop.



**Abb. 8:** REM-Aufnahme einer strukturierten ODS Monolage auf Silicium (ODS: hell, OH-Spots: dunkle Achtecke)

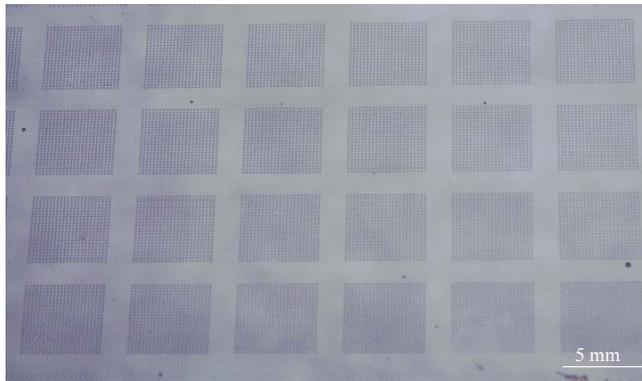


**Abb. 9:** REM-Aufnahme vom Ausschnitt eines achteckigen OH-Spots in einer ODS Monolage auf Silicium (ODS: hell, OH-Spot: dunkel)

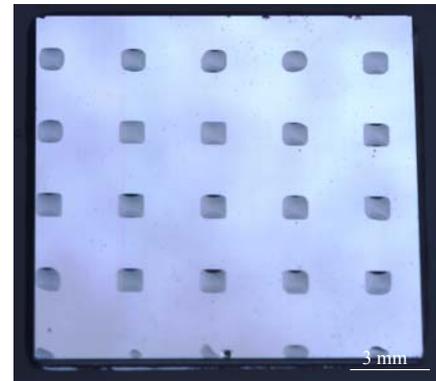
### 5.5 Benetzungsverhalten hydrophob/hydrophil mikrostrukturierter monomolekularer Oberflächen

Das Benetzungsverhalten von Wasser an den lateral mikrostrukturierten monomolekularen Oberflächen wird durch die Größe und den Abstand der Strukturen oder Strukturgruppen zueinander bestimmt. So wurden OH-Spots einer Größe bis zu  $100 \mu\text{m}$  und einer Rasterweite bis zu  $100 \mu\text{m}$  noch als einzelne Spots von Wasser benetzt und die OH-Oberflächen durch Ausbilden einer strukturierten Wasserschicht auf

dem Substrat abgebildet. Die umgebende Octadecylmonolage wurde von Wasser nicht benetzt (Abb. 10 und Abb. 11).



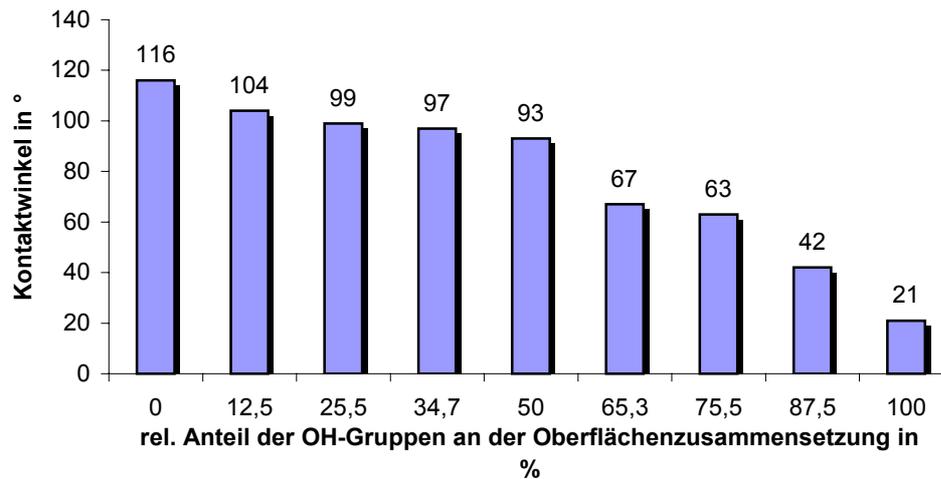
**Abb. 10:** Wasser benetzte OH-Spots in einer Octadecylmonolage auf Silicium (Spotgröße 100  $\mu\text{m}$ )



**Abb. 11:** Wasser benetzte OH-Spots in einer Octadecylmonolage auf Silicium

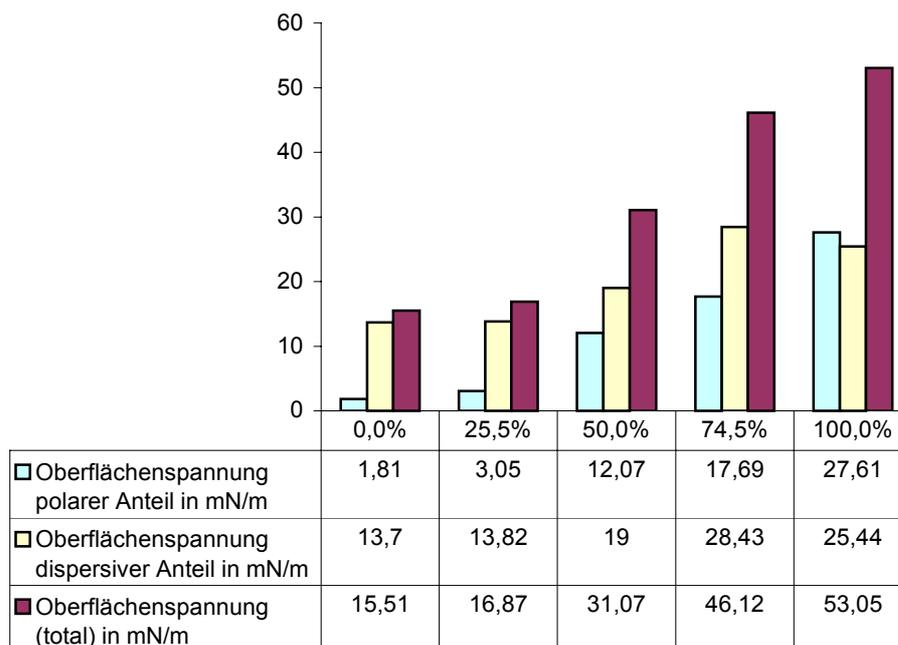
Oberflächen mit OH-Strukturen in einer Octadecyl- oder Perfluoralkylmonolage unter 100  $\mu\text{m}$  Größe oder einer Rasterweite von weniger als 100  $\mu\text{m}$  wurden durch Benetzen von Wasser nicht mehr differenziert. Sie zeigten das gleiche Benetzungsverhalten wie eine unstrukturierte Oberfläche mit unterschiedlichen Zusammensetzungen an polaren und unpolaren Molekülen.

Durch eine Mikrostrukturierung und Variation der Anzahl von OH-Spots in einer Alkyl- oder Perfluoralkylmonolage konnte der Flächenanteil der OH-Gruppen bezogen auf die gesamte Oberfläche gezielt eingestellt werden und damit das Benetzungsverhalten reguliert werden (Abb. 12).



**Abb. 12:** Kontaktwinkel von Wasser an einer strukturierten monomolekularen Perfluordecyl/OH-Oberfläche mit unterschiedlichem Verhältnis von OH- und Perfluordecylflächen

Mit zunehmendem Flächenanteil der OH-Gruppen sanken die Kontaktwinkel von Wasser an den Oberflächen, gleichzeitig stieg die mittlere Freie Oberflächenenergie an. Der im Verhältnis stärker ansteigende polare Anteil der Oberflächenenergie gewann mit steigendem Flächenanteil der OH-Gruppen mehr Einfluss auf die Freie Oberflächenenergie. Die Zahlenwerte der Größen lagen jedoch niedriger als die Oberflächenenergien von unbehandelten und Sauerstoffplasma geätzten Oberflächen (Abb. 13).



**Abb. 13:** Dispersive und polare Anteile der Freien Oberflächenspannung einer mikrostrukturierten Perfluorodecyl/OH-Oberfläche mit unterschiedlichem Verhältnis von OH- und Perfluorodecylflächen

## 6 Bevorzugte Adsorption von Fluoreszenzfarbstoffen an mikrostrukturierte Self Assembled Monolayer (SAMs)

In der Literatur ist weithin bekannt, dass Farbstoffmoleküle aus Lösungen an porösen und glatten Festkörperoberflächen<sup>[46-53]</sup> oder an SAMs<sup>[54,55]</sup> adsorbieren können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Adsorption von Fluoreszenzfarbstoffen an mikrostrukturierte monomolekulare Oberflächen untersucht. Bei den hier gewählten Methoden der Detektion wurde beobachtet, dass sich die Affinität der Farbstoffe zu den mikrostrukturierten, chemisch differenten Monolagen unterscheidet. So gelang es, die Farbstoffe an den Oberflächen bevorzugt nur an OH- und Amin- oder nur an ODS- bzw. Perfluorooctylbereiche zu adsorbieren. Die bevorzugte Adsorption an eine bestimmte Oberfläche ließ sich für die hier untersuchten Farbstoffe Rhodamin B, BJ 60, CZ 71, Oxazin 170 und Na-Fluorescein durch die Wahl der Lösungsmittel und Spülmedien steuern. Es wurde weiterhin beobachtet, dass auch die Änderung der Konzentration der Farbstofflösung einen Einfluss auf die Vorzugsrichtung der Adsorption an ausgewählte Oberflächen hatte.

---

Bei den Fluoreszenzfarbstoffen Coumarin 6, Nile Blue A, BJ 36 und CZ 83 konnte hingegen keine Adsorption aus der Lösung an die mikrostrukturierten Oberflächen beobachtet werden.

### **6.1 Abhängigkeit der Adsorption vom Lösungs- und Spülmedium**

Die Adsorption verschiedener Lösungen von Fluoreszenzfarbstoffen an OH-, Octadecyl- und Perfluordecylmonolagen auf Silicium wurde bei verschiedenen Kombinationen von den Lösungsmitteln und den Spülmedien Methanol, Ethanol, 1-Butanol, 1-Octanol, Cyclohexan und Essigsäureethylester untersucht.

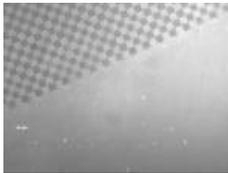
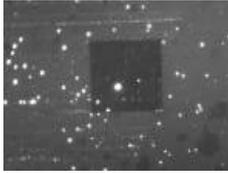
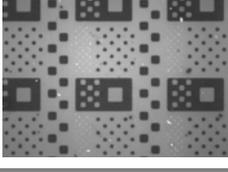
Durch das Abspülen der mikrostrukturierten Substrate mit Ethanol oder Methanol wurden die adsorbierten Farbstoffe abgelöst. Es konnte nach dem Spülen keine Fluoreszenz mehr auf den Oberflächen festgestellt werden.

Die in Tab. 26. aufgeführten Farbstoffe adsorbierten bevorzugt jeweils an eine bestimmte Oberfläche. Es ließ sich durch Änderungen in der Kombination von Lösungsmittel und Spülmedium keine bevorzugte Adsorption an andere Oberflächen beobachten.

Die Farbstoffe Rhodamin B, BJ 60 und CZ 71 adsorbierten bevorzugt an den hydrophoben Perfluorocetylmonolagen. Oxazin 170 hatte hingegen eine hohe Affinität zu den hydrophilen Oberflächen und bevorzugte die OH-Strukturen zur Adsorption.

Natrium-Fluorescein zeigte ein ähnliches Verhalten wie Oxazin 170 konnte aber zusätzlich zu den OH- noch auf NH<sub>2</sub>- und protonierten Aminooberflächen detektiert werden.

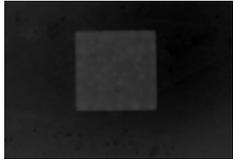
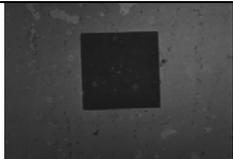
**Tab. 26:** Bevorzugte Adsorption von ausgewählten Farbstoffen an mikrostrukturierte monomolekulare Oberflächen<sup>a</sup>

Farbstoffe	Lösungsmittel / Spülmittel	Oberflächen-Kombination					Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Adsorption
		-OH	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	-NH <sub>2</sub>	ODS	PFO	
Rhodamin B	Methanol / Butanol	-	-	-	-	+	
	Ethanol / Butanol	-	-	-	-	+	
	Ethanol / Octanol	-	-	-	-	+	
	Butanol / Octanol	-	-	-	-	+	
	Cyclohexan / Cyclohexan	-	-	-	-	+	
BJ 60	Methanol / Butanol	-	•	•	-	(+)	
	Ethanol / Butanol	-	•	•	-	(+)	
	Butanol / Octanol	-	•	•	-	(+)	
CZ 71	Methanol / Butanol	-	•	•	-	(+)	
	Ethanol / Butanol	-	•	•	-	(+)	
	Butanol / Octanol	-	•	•	-	(+)	
Oxazin 170	Methanol / Butanol	+	-	-	-	-	
	Ethanol / Butanol	+	-	-	-	-	
	Butanol / Octanol	+	-	-	-	-	
Na- Fluorescein	Methanol / Butanol	+	+	+	-	-	
	Ethanol / Butanol	+	+	+	-	-	
	Ethanol / Octanol	+	+	+	-	-	
	Butanol / Octanol	+	+	+	-	-	

Eine Abhängigkeit der Adsorptionsaffinität von Spülmedium und Lösungsmittel zeigte sich beim Fluorescein. Die Adsorption von Fluorescein ließ sich durch die geeignete Auswahl des Spül- bzw. Lösungsmittels selektiv auf die OH-Oberflächen oder die Perfluoralkyl- und Octadecyloberflächen lenken. Durch Auftragen von Fluoresceinlösungen in Butanol und Spülen mit Octanol bzw. Lösung in Cyclohexan und Spülen mit Essigsäureethylester fand eine Adsorption bevorzugt an den hydrophoben Octadecyl- und Perfluoralkyloberflächen statt. Das Spülen mit Cyclohexan verschob die Adsorptionsaffinität zu den hydrophilen OH-Oberflächen (Tab. 27).

<sup>a</sup> positives Ergebnis: +, negatives Ergebnis: -, uneinheitliches Ergebnis: •

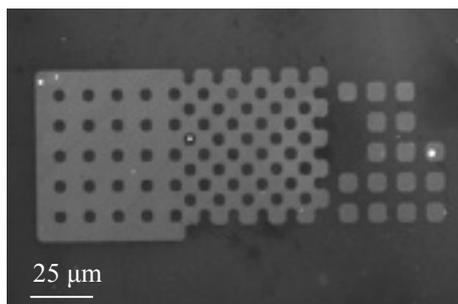
**Tab. 27:** Bevorzugte Adsorption von Fluorescein an mikrostrukturierte monomolekulare Oberflächen

Lösungsmittel / Spülmedium	Adsorption an	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Adsorption
Ethanol / Cyclohexan Cyclohexan (10% Ethanol) / Cyclohexan	OH	
Essigester (10% Ethanol) / Cyclohexan		
Butanol / Octanol Cyclohexan (10% Ethanol) / Essigester	ODS und PFO	

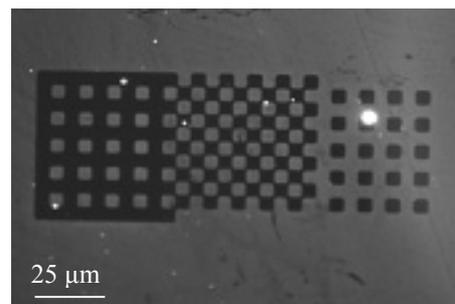
Coumarin 6, Nile Blue A, BJ 36 und CZ 83 konnten nach den Adsorptionsversuchen fluoreszenzmikroskopisch nicht reproduzierbar auf den Oberflächen nachgewiesen werden.

DCM adsorbierte nur aus einer Cyclohexanlösung und bei Verwendung von Cyclohexan als Spülmedium an Perfluorocetyloberflächen.

Ein komplexeres Verhalten wurde bei den Adsorptionsexperimenten mit Cy3 beobachtet. So zeigten die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen bei den niedrigen Konzentrationen von Cy3 in Butanol eine Farbstoffadsorption an den hydrophilen OH-Oberflächen (Abb. 14). Lösungen höherer Konzentration führten bei den Adsorptionsexperimenten zu einer Kontrastumkehr und zeigten im Fluoreszenzmikroskop eine Farbstoffadsorption an den hydrophoben Perfluorocetyloberflächen (Abb. 15). Diese Kontrastumkehr wurde etwa bei einer Konzentration von  $3 \cdot 10^{-4}$  mol/l Cy3 in Butanol beobachtet.



**Abb. 14:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der bevorzugten Adsorption von Cy3 an mikrostrukturierte monomolekulare OH-Oberflächen ( $c = 7,4 \cdot 10^{-5}$  mol/l in Butanol)



**Abb. 15:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der bevorzugten Adsorption von Cy3 an mikrostrukturierte monomolekulare Perfluorocyclohexyloberflächen ( $c = 7,4 \cdot 10^{-4}$  mol/l in Butanol)

## 6.2 Adsorptionsisotherme

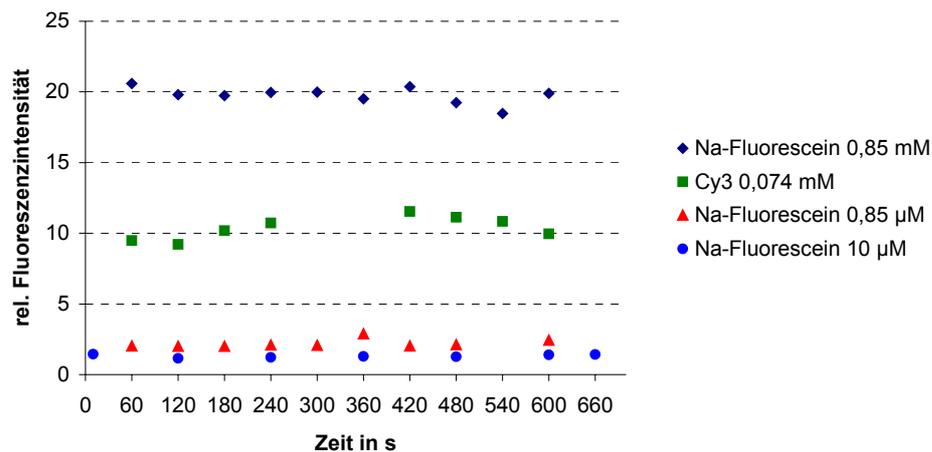
Unter der Annahme, dass alle Adsorptionsplätze äquivalent sind und die Adsorptionswahrscheinlichkeit nicht davon abhängt, ob die Nachbarplätze frei oder besetzt sind, besteht bei der Adsorption an feste Oberflächen ein dynamische Gleichgewicht<sup>[56]</sup> (Schema 1). Dieses Gleichgewicht lässt sich auch für die Adsorption von Fluoreszenzfarbstoffen aus der Lösung an Oberflächen übertragen.



**Schema 1:** Gleichgewicht der Adsorption und der Desorption

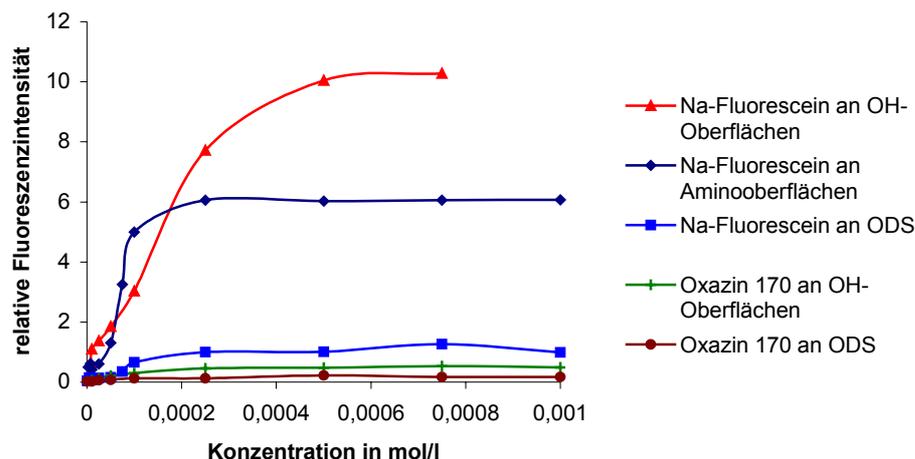
Durch Messung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten Farbstofflösungen ließen sich die kinetischen Parameter Gleichgewichtskonstante  $K$  und Besetzungsdichte  $\Theta$  der Farbstoffe an den Oberflächen bestimmen und die Adsorptionsisothermen berechnen.

Die Berechnung von Adsorptionsisothermen setzt jedoch voraus, dass das Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption eingestellt ist. Aus diesem Grunde wurden zur Überprüfung der Gleichgewichtseinstellung zeitabhängige Untersuchungen der Adsorption durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das Gleichgewicht schon nach 10 Sekunden Adsorptionszeit eingestellt ist und keine Zunahme der Fluoreszenzintensität mehr festgestellt werden konnte (Abb. 16).



**Abb. 16:** Relative Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Adsorptionszeit

Mit der Erhöhung der Konzentration der eingesetzten Farbstofflösungen stieg die relative Fluoreszenzintensität der adsorbierten Farbstoffe auf den Oberflächen stark an. Je nach Farbstoff erreichte sie ab einer bestimmten Konzentration eine Sättigung. Durch eine weitere Erhöhung der Konzentration konnte die Fluoreszenzintensität nicht weiter gesteigert werden (Abb. 17). Betrachtet man nur einen einzelnen Fluoreszenzfarbstoff, war die relative Fluoreszenzintensität im Sättigungsbereich abhängig von der Adsorption auf der Oberfläche. Sie variierte jedoch um Größenordnungen beim Vergleich mehrerer Farbstoffe. Zum einen unterschieden sich die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe hinsichtlich ihrer UV-Absorptions- und Fluoreszenz-Emissionsspektren. Weiterhin ist die Durchlässigkeit der verwendeten Filter und die Sensitivität der Digitalkamera nicht in allen Frequenzbereichen gleichwertig. Über den möglicherweise zusätzlichen Einfluss der Mikrostrukturen auf Fluoreszenzlöschung und Energietransferprozesse in den adsorbierten Schichten und die Fluoreszenzquantenausbeute der Farbstoffe an den Oberflächen kann jedoch hier keine Aussagen getroffen werden.



**Abb. 17:** Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität der adsorbierten Fluoreszenzfarbstoffe von der Konzentration der Farbstofflösung

In der graphischen Darstellung der Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität von der Konzentration der Farbstofflösung nach Abb. 17 ist ein leicht sigmoidaler Isothermenverlauf beobachtet worden, der auf eine Isotherme nach der Frumkin-Gleichung hindeuten<sup>[20]</sup> könnte (Gl. 6-1).

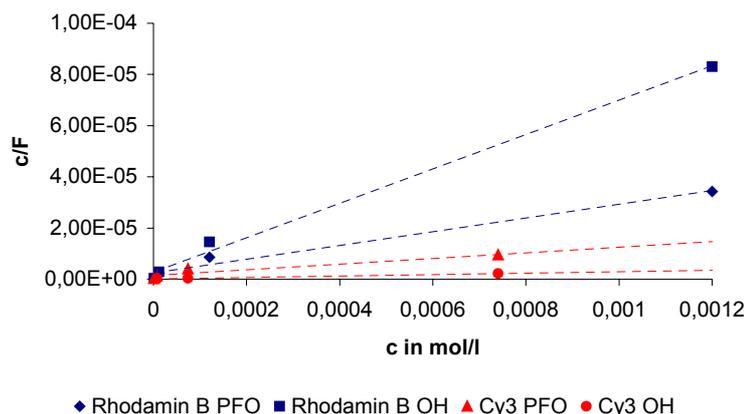
$$K \cdot c = \frac{\Theta}{1 - \Theta} \cdot e^{-2a_F \Theta} \quad \text{Gl. 6-1}$$

In der Literatur wird jedoch zur Beschreibung der Adsorption aus verdünnten Lösungen oft die Langmuirsche Adsorptionsisotherme<sup>[57]</sup> (Gl. 6-2) zu Grunde gelegt,<sup>[58]</sup> die durch eine lineare Regression nach Gl. 6-3 ausgewertet wird,<sup>[56]</sup> wobei  $F$  die relative Fluoreszenzintensität,  $F_\infty$  die relative Fluoreszenzintensität bei vollständiger Bedeckung und  $\Theta = F/F_\infty$  ist.

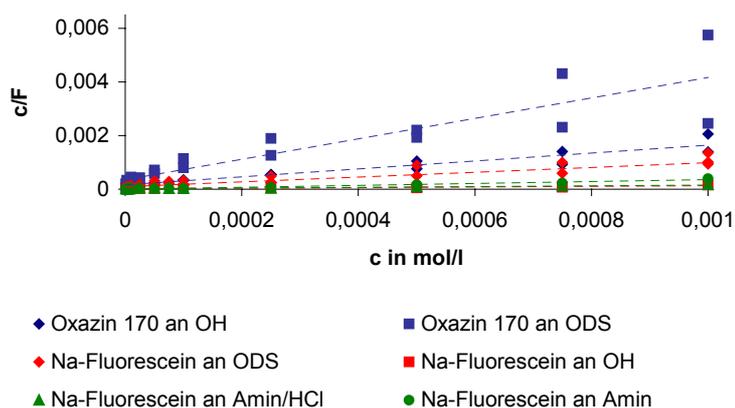
$$\Theta = \frac{K \cdot c}{1 + K \cdot c} \quad \text{Gl. 6-2}$$

$$\frac{c}{F} = \frac{c}{F_\infty} + \frac{1}{K \cdot F_\infty} \quad \text{Gl. 6-3}$$

Durch Auftragen von  $c/F$  gegen  $c$  nach Gl. 6-3 resultierte eine Gerade mit der Steigung  $1/F_\infty$  und dem Achsenabschnitt  $1/KF_\infty$  (Abb. 18 und Abb. 19).



**Abb. 18:** Lineare Darstellung der relativen Fluoreszenzintensität nach Gl. 6-3 für Rhodamin B und Cy3 auf OH- und Perfluoroctyloberflächen



**Abb. 19:** Lineare Darstellung der relativen Fluoreszenzintensität nach Gl. 6-3 für Oxazin 170 und Na-Fluorescein an OH-, Octadecyl- und Aminooberflächen

Bei der linearen Lösung der Langmuir Isotherme nach Gl. 6-3 können, besonders bedingt durch Messwertschwankungen und fehlerbehaftete Messwerte im unteren Konzentrationsbereich, erhebliche Fehler im Anstieg und Schnittpunkt der Ausgleichsgerade resultieren und damit zu großen Fehlern von  $K$  und  $F_{\infty}$  führen.

Deshalb wurden die Adsorptionskonstante  $K$  und die relative Fluoreszenzintensität  $F_{\infty}$  hier mit Hilfe der Software SigmaPlot<sup>[59]</sup> aus den experimentellen Daten direkt über eine Kurvenanpassung berechnet.

Aufgrund des nur geringen sigmoidalen Verlaufes der Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität von der Konzentration der Farbstofflösung (Abb. 17) wurde der Kurvenfit an die Langmuirfunktion angepasst (Gl. 6-2).

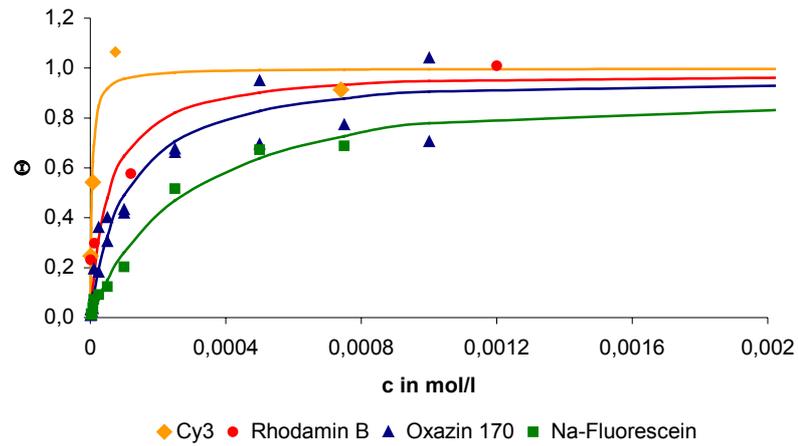
In Tab. 28 sind die relative Fluoreszenzintensität bei vollständiger Bedeckung  $F_{\infty}$ , die Konstante  $K$  und die molare Freie Standardadsorptionsenthalpie  $\Delta G_A^{\circ}$  der einzelnen Farbstoffe für die Adsorptionsgleichgewichte nach dem Langmuir-fitting dargestellt. Die molare Freie Standardadsorptionsenthalpie  $\Delta G_A^{\circ}$  berechnet sich nach Gl. 6-4.

$$\Delta G_A^{\circ} = -RT \cdot \ln K \quad \text{Gl. 6-4}$$

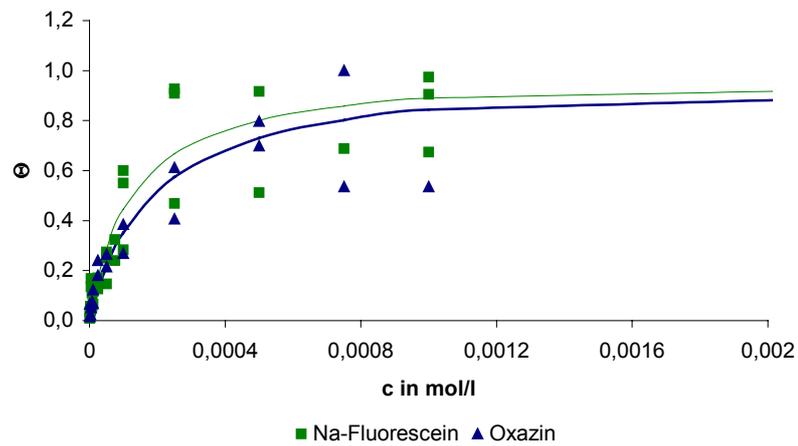
**Tab. 28:** Adsorptionsparameter der Fluoreszenzfarbstoffe bei  $T = 298 \text{ K}$  nach der Langmuir-Isotherme

	$F_{\infty}$	$K \text{ in } 10^3 \text{ l/mol}$	$-\Delta G_A^{\circ} \text{ in kJ/mol}$
<b>Na-Fluorescein</b>			
OH	$14,93 \pm 1,38$	$3,5 \pm 0,8$	$20,2 \pm 0,5$
Amin	$3,38 \pm 0,23$	$24,3 \pm 5,7$	$25,0 \pm 0,6$
Amin/HCl	$7,08 \pm 0,64$	$11,3 \pm 3,7$	$23,1 \pm 0,8$
ODS	$1,10 \pm 0,09$	$8,0 \pm 2,1$	$22,3 \pm 0,6$
PFO	$1,18 \pm 0,11$	$25,0 \pm 7,2$	$25,1 \pm 0,7$
<b>Oxazin</b>			
OH	$0,69 \pm 0,05$	$9,6 \pm 2,6$	$22,7 \pm 0,7$
ODS	$0,32 \pm 0,05$	$5,4 \pm 2,4$	$21,3 \pm 1,1$
<b>Cy3</b>			
OH	$31,29 \pm 3,43$	$222,7 \pm 135,4$	$30,5 \pm 1,5$
PFO	$118,74 \pm 16,64$	$2,6 \pm 0,9$	$19,4 \pm 0,9$
<b>Rhodamin B</b>			
OH	$14,31 \pm 3,14$	$18,4 \pm 17,9$	$24,3 \pm 2,4$
PFO	$41,09 \pm 5,33$	$4,6 \pm 2,1$	$20,9 \pm 0,7$

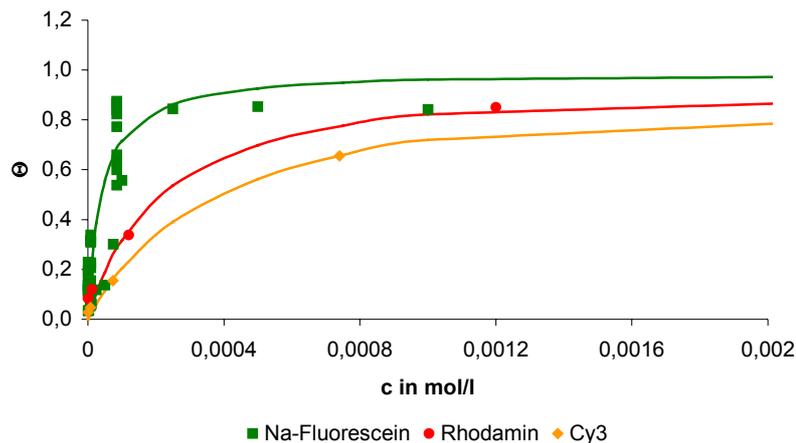
Die angepassten Langmuirschen Adsorptionsisothermen für die Adsorption der einzelnen Farbstoffe an den Oberflächen sind zusammen mit den experimentell ermittelten Werten in Abb. 20-Abb. 23 graphisch dargestellt.



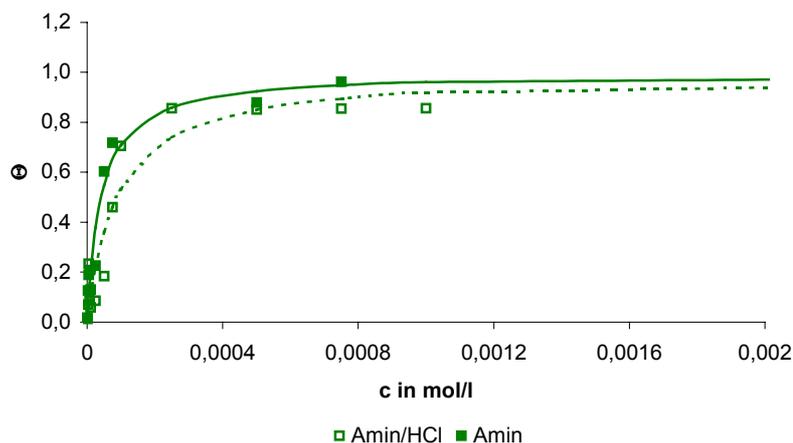
**Abb. 20:** Berechnete Langmuir Isotherme für die Adsorption von Cy3, Rhodamin B, Oxazin 170 und Na-Fluorescein an monomolekulare OH-Oberflächen auf Silicium



**Abb. 21:** Berechnete Langmuir Isotherme für die Adsorption von Oxazin 170 und Na-Fluorescein an monomolekulare Octadecyloberflächen auf Silicium



**Abb. 22:** Berechnete Langmuir Isotherme für die Adsorption von Na-Fluorescein, Cy3 und Rhodamin B an monomolekulare Perfluorocyclohexyloberflächen auf Silicium



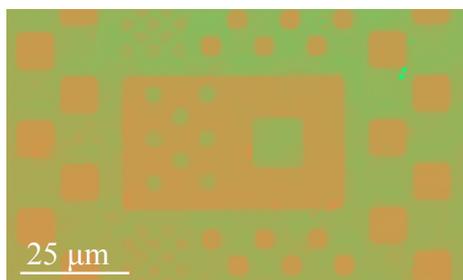
**Abb. 23:** Berechnete Langmuir Isotherme für die Adsorption von Na-Fluorescein an monomolekulare Amino- und protonierte Aminooberflächen auf Silicium

### 6.3 Adsorption von Farbstoffgemischen

Durch Anwendung der in Abschnitt 6.1 dargestellten Ergebnisse ließen sich mikrostrukturierte OH- und Octadecyloberflächen in Nachbarschaft selektiv in einem Schritt mit verschiedenen Farbstoffen aus Lösungen von Farbstoffgemischen belegen.

Abb. 24 zeigt eine nachbearbeitete Falschfarben-Darstellung der Adsorption von Na-Fluorescein und Cy3. Die beiden Farbstoffe wurden dabei im Gemisch aus einer butanolischen Lösung ( $c_{\text{Na-Fl.}} = 10^{-5} \text{ mol/l}$ ,  $c_{\text{Cy3}} = 10^{-5} \text{ mol/l}$ ) auf die mikrostrukturierte Oberfläche aufgetragen und mit Octanol abgespült. Na-Fluorescein adsorbierte dabei an

den OH-Oberflächen (grüne Fluoreszenz) und Cy3 an den Octadecyloberflächen (rote Fluoreszenz).



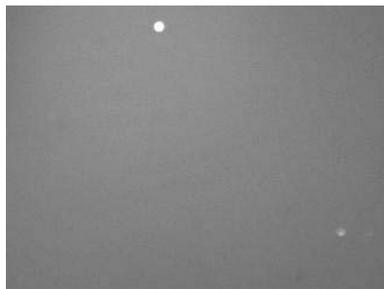
**Abb. 24:** Nachbearbeitete Falschfarben-Darstellung der bevorzugten Adsorption von Na-Fluorescein an mikrostrukturierten monomolekularen OH-Oberflächen (grün) und Cy3 an Octadecyloberflächen (orange)

## 7 Bindeguppen für Biomoleküle in mikrostrukturierten monomolekularen Schichten

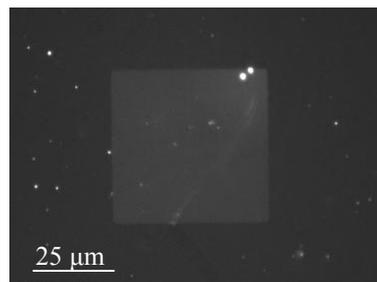
### 7.1 Amino-funktionalisierte Monolayer auf Silicium- und Glasoberflächen

Die Reaktion von 3-Aminopropyltriethoxysilan mit den aktivierten OH-Oberflächen führte auch unter trockener Argonatmosphäre und in wasserfreiem Toluol nicht zu monomolekularen Aminooberflächen. APTES hat auch in wasserfreier Umgebung durch die autokatalytisch wirkende Aminofunktion eine hohe Tendenz zur Polymerisation.<sup>[60]</sup> Bei Synthesen auf den mikrostrukturierten Glas- und Siliciumsubstraten überdeckte der gebildete Polysiloxanfilm auch die hydrophoben, nichtbindenden Bereiche der Oberfläche. Die vordefinierten Bindespots zur APTES-Ankopplung wurden nach einer FITC-Markierung nicht mehr beobachtet, statt dessen ergab sich eine homogene Verteilung der Fluoreszenzintensität auf der Oberfläche (Abb. 25).

Nur bei Einsatz sehr verdünnter Reaktionslösungen von APTES auf den mikrostrukturierten Bindeflächen konnten nach Ankopplung von FITC die strukturierten Aminooberflächen im Fluoreszenzmikroskop erkannt werden (Abb. 26).



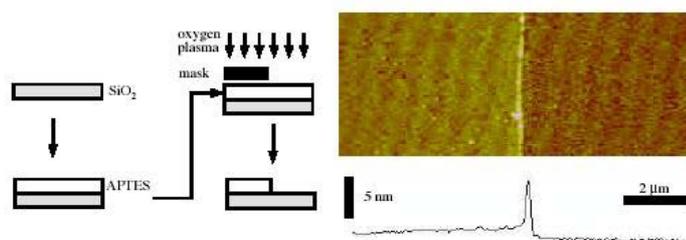
**Abb. 25:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines APTES-Polymers auf der Oberfläche nach Markierung mit FITC



**Abb. 26:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines APTES-Spots nach Markierung mit FITC

AFM-Messungen an einer durch Sauerstoff Plasma Ätzen erzeugten Ätzkante zeigten jedoch eine Schichtdicke von etwa 1,8 nm.<sup>[61]</sup> Bei einer monomolekularen Bedeckung werden Schichtdicken von etwa ~0,8 nm erwartet.

Um die Aminogruppen vor Nebenreaktionen mit dem Resist zu schützen, wurde die APTES-Schicht während der Strukturierung im Sauerstoffplasma nicht mit Photolack sondern mit einer Polymermaske aus PDMS abgedeckt. Von Resten dieser Polymermaske resultiert die hohe Struktur an der Ätzkante der APTES-Schicht zur Siliciumoberfläche (Abb. 27).



**Abb. 27:** Schematische Darstellung der Strukturierung der APTES-Schicht (links) und AFM-Aufnahme der Ätzkante des APTES-Layers auf Silicium (rechts)

Nach der Verringerung der Reaktionstemperatur auf 42°C fand keine Reaktion mit der Hydroxyloberfläche statt.

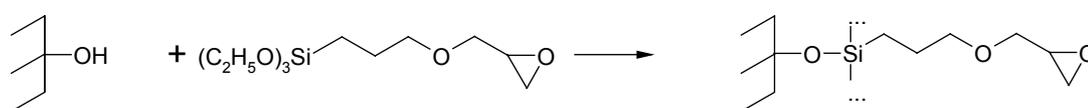
Eine alternative Synthesebedingung nach Guo<sup>[62]</sup> mit 1% APTES in 95% wässrigem Aceton führte schon nach 2 Minuten zum Abscheiden von sichtbaren Polysiloxanfilmen auf den Oberflächen.

Die Kontaktwinkel von Wasser an APTES-Oberflächen lagen bei 42°.

Zur Erzeugung monomolekularer Aminooberflächen wurde deshalb ein alternativer Syntheseweg nach einer modifizierten Vorschrift von Maskos und Southern<sup>[63]</sup> gewählt. Im Gegensatz zum APTES hat GOPS in wasserfreier Umgebung nicht die ausgeprägte Tendenz zur Polymerisation.

Durch die Reaktion von 3-Glycidoxypropyltriethoxysilan (GOPS) in ketyliertem Toluol mit den aktivierten OH-Oberflächen wurden monomolekulare Epoxyoberflächen erhalten (Schema 2).

Die Kontaktwinkelmessungen von Wasser ergaben auf den Epoxyoberflächen einen Wert von 70°.

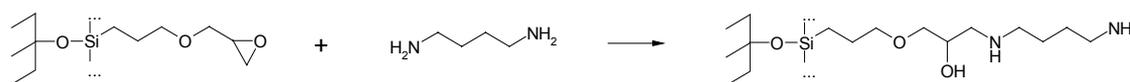


**Schema 2:** Erzeugung von monomolekularen Epoxyoberflächen auf Glas- und Siliciumsubstraten

Diese Oxirane sind auf Grund ihrer starken Ringspannung sehr reaktionsfähige Substanzen.<sup>[64]</sup> Dessen ungeachtet konnte nach dem moderaten Spülen mit Ethanol und destilliertem Wasser kein Verlust der Reaktivität der Oberflächen beobachtet werden. Bei Lagerung im Exsikkator über festem  $\text{CaCl}_2$  waren die GOPS-Oberflächen noch nach mehreren Wochen zur Umsetzung mit Nucleophilen geeignet. Bei  $-18^\circ\text{C}$  erhöhte sich die Lagerfähigkeit auf mehrere Monate.

Unter der katalytischen Wirkung von Säuren oder Basen reagieren Oxirane mit nucleophilen Reagenzien unter Öffnung des Epoxidringes.

So war es möglich, nach Schema 3 durch  $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion mit 1,3-Diaminopropan, 1,4-Diaminobutan und 1,6-Diaminohexan Aminooberflächen zu erhalten.

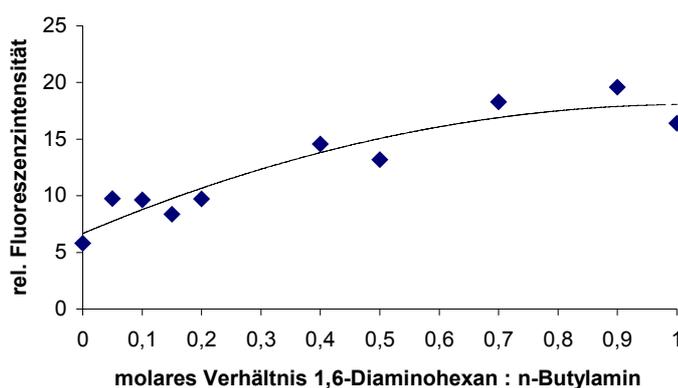


**Schema 3:** Ringöffnung des Oxirans durch  $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion mit 1,4-Diaminobutan

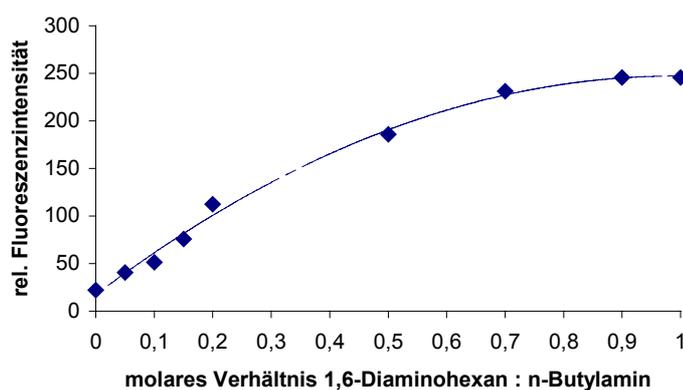
Durch die Aminierung wurden die Oberflächen im Vergleich zur Epoxyoberfläche hydrophiler. Der Kontaktwinkel von Wasser war dabei unabhängig vom eingesetzten Diamin und betrug wie bei den APTES-Schichten 42°.

## 7.2 Bindegruppenabstufung

Die Aminogruppendichte auf den Oberflächen ließ sich bei der Ringöffnungsreaktion des Oxirans durch Verdünnung des Diamins mit entsprechenden n-Alkylaminen im molaren Verhältnis von 0 – 1 einstellen. Nach Ankopplung von FITC an die Aminooberflächen konnte die Zunahme der Aminogruppendichte durch die Erhöhung der relativen Fluoreszenzintensität fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden (Abb. 28 und Abb. 29).



**Abb. 28:** Relative Fluoreszenzintensität einer FITC-markierten Aminooberfläche in Abhängigkeit von der Besetzungsdichte der Aminogruppen auf Silicium

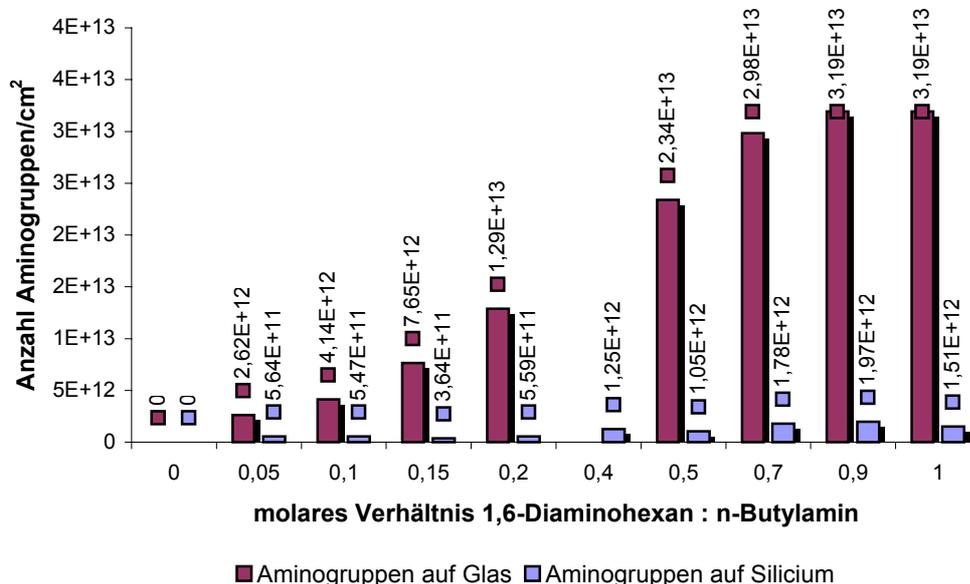


**Abb. 29:** Relative Fluoreszenzintensität einer FITC-markierten Aminooberfläche in Abhängigkeit von der Besetzungsdichte der Aminogruppen auf Glas

Die Anzahl der gekoppelten Farbstoffmoleküle wurde gegen das Referenzsystem bestimmt und betrug bei der höchsten Aminogruppendichte  $\sim 1,5 \cdot 10^{12}$  Moleküle/cm<sup>2</sup> für die Siliciumoberflächen und  $\sim 3,2 \cdot 10^{13}$  Moleküle/cm<sup>2</sup> für die Glasoberflächen. Die

Aminogruppendichte auf den Glas- bzw. Siliciumoberflächen unterschied sich dabei um den Faktor 20. Zum einen kann die Oberfläche von silikatischen Gläsern durch die Einwirkungen beim Polieren und bei der Reinigung Gelschichten aufweisen, die bis zu 1000 nm Dicke aufweisen können.<sup>[60]</sup> Die Gelschichten beeinflussen das chemische und physikalische Verhalten der Oberfläche sicher entscheidend. Zum anderen war die Oberflächenrauigkeit der Gläser höher als die der Siliciumwafer, die glattere Oberflächen aufwiesen.

Unter der Annahme, dass jede Aminogruppe mit FITC markiert wurde, ließ sich die Anzahl der Aminogruppen in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis des eingesetzten 1,6-Diaminohexan/n-Butylamin graphisch darstellen (Abb. 30).



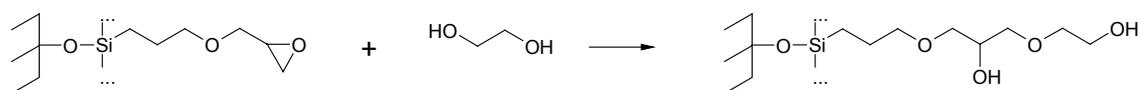
**Abb. 30:** Graphische Darstellung der Aminogruppenanzahl auf Glas- und Siliciumoberflächen in Abhängigkeit vom eingesetzten molaren Verhältnis 1,6-Diaminohexan : n-Butylamin

## 8 Immobilisierung von DNA an funktionalisierte Glasoberflächen

### 8.1 Ethylenglycol-Monolayer

Als Bindegruppen für die DNA-Immobilisierung wurden an den mikrostrukturierten Oberflächen Ethylenglycol-Monolagen synthetisiert. Ethylenglycol reagierte nach Schema 4 bei saurer Katalyse mit der Epoxyoberfläche und bildete eine

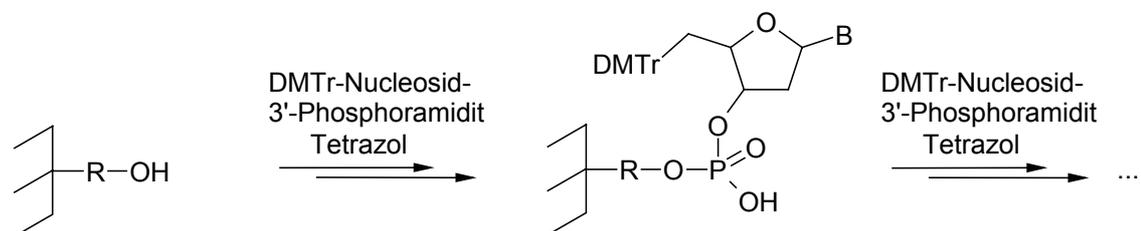
monomolekularen Ethylenglycoloberfläche. Der Randwinkel von Wasser auf den Ethylenglycoloberflächen betrug  $41^\circ$ .



**Schema 4:** Ringöffnung des Oxirans durch sauer katalysierte  $S_N2$ -Reaktion mit Ethylenglycol

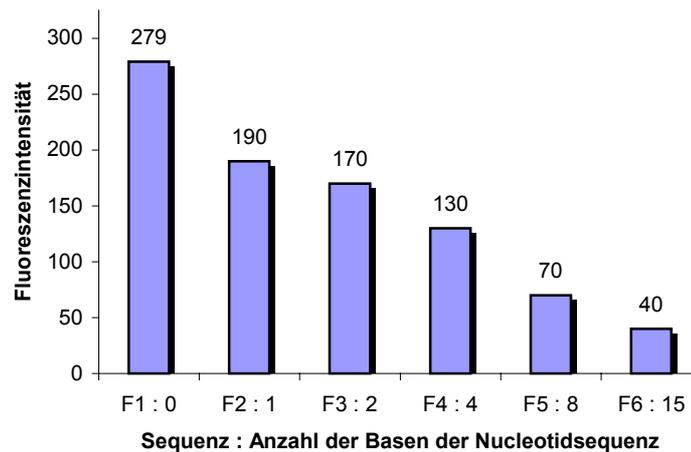
## 8.2 *onchip*-Synthese der DNA

Die Synthese der Oligonucleotidsequenzen erfolgte in einem DNA-Synthesizer direkt an die vorbereiteten Ethylenglycol-Monoschichten auf Glassubstraten. Durch die Standard-DNA-Synthese erfolgte der Aufbau der DNA-Sequenzen unterschiedlicher Basenzahl basenweise vom 3'- zum 5'-Ende nach Schema 5. Für Fluoreszenzuntersuchungen wurden die Oligomere am 5'-Ende mit 5'-Fluorescein-Phosphoramidit (6-FAM) markiert.



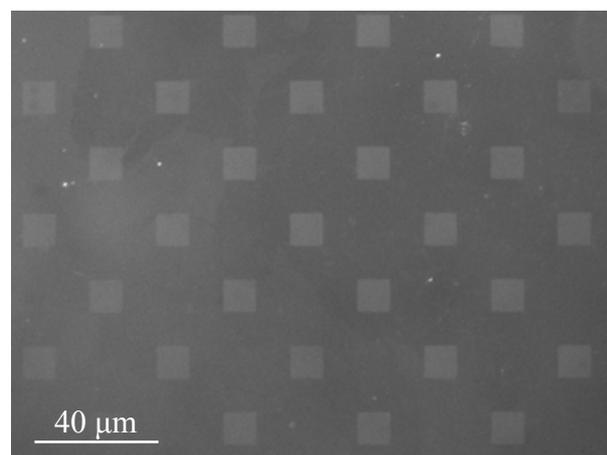
**Schema 5:** *onchip*-Synthese von Oligonucleotiden an den Ethylenglycol-Monolagen (DMTr: Dimethyltrityl-, B: Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin)

Wie erwartet zeigte sich, dass die Fluoreszenzintensität mit steigender Nucleotidanzahl der synthetisierten Oligonucleotide auf den Oberflächen sinkt. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität lässt sich auf unvollständige Reaktionen der Phosphoramidite während der Synthese zurückführen. Bei der Sequenz **F 6** (Tab. 7) wurde die Synthesezeit um den Faktor 5 verlängert. Damit erhöhte sich die Fluoreszenzintensität von anfänglich 0 auf 40 (Abb. 31).



**Abb. 31:** Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Basenzahl der *onchip*-synthetisierten Oligonucleotide auf Glas

Die Verlängerung der Reaktionszeiten während der *onchip*-Synthese ermöglichte es, lange einzelsträngige DNA bis zu einer Basenzahl von 52 auf den mikrostrukturierten Oberflächen zu synthetisieren und DNA-Arrays zu erzeugen. Durch Hybridisierung der immobilisierten DNA mit Fluorescein markierten komplementären Sequenzen konnte die DNA-Arrays im Fluoreszenzmikroskop ausgelesen werden (Abb. 32).



**Abb. 32:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines DNA-Arrays, Sequenz E 141-35 hybridisiert mit F 3385-15

Die Anzahl der hybridisierten fluoreszenzmarkierten DNA wurde gegen das Referenzsystem bestimmt und betrug  $\sim 1,8 \cdot 10^{11}$  Moleküle/cm<sup>2</sup> für die DNA-Arrays auf den Glasoberflächen.

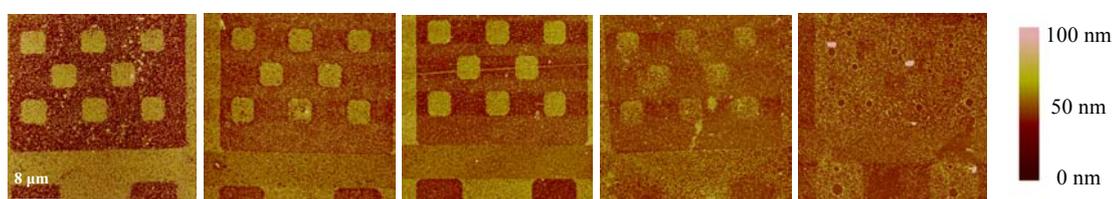
### 8.3 Kontrolle der DNA-Dichte und alternative Markierungstechniken

Durch die Variation der Ethylenglycol-Bindegruppendichte ließ sich die Bedeckung der Oberfläche durch die DNA-Moleküle kontrollieren.

Die Dichte der Ethylenglycol-Moleküle wurde dabei, wie im Fall der Aminooberflächen (7.2), bei der Ringöffnungsreaktion des Oxirans durch Verdünnung des Ethylenglycols mit Ethanol im molaren Verhältnis von 0 – 1 eingestellt. Nach der *onchip*-Synthese von DNA auf den Oberflächen mit abgestufter Bindegruppendichte wurden DNA-Oberflächen mit unterschiedlicher Bedeckungsdichte erhalten.

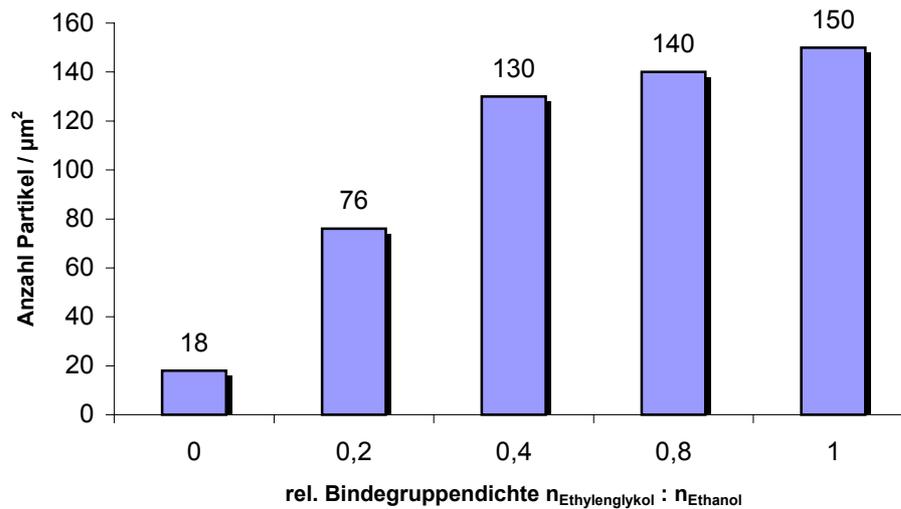
Die Experimente zur Verringerung der Bindegruppendichte ergaben, dass aufgrund der geringen Konzentration der einzelsträngigen DNA auf der Oberfläche eine Hybridisierung mit 6-FAM markierter komplementärer DNA nur noch bei der Maximalkonzentration fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden konnte. Bei niedrigeren Konzentrationen konnte keine Fluoreszenz mehr auf den Oberflächen festgestellt werden.

Um diese Hybridisierungsereignissen dennoch zu detektieren, wurde aufbauend auf Arbeiten von Elghanian<sup>[65]</sup> und Taton<sup>[66]</sup> ein sehr empfindlicher Nachweis mit kolloidalem Gold auf Oberflächen entwickelt.<sup>[67]</sup> Dazu wurde die komplementäre DNA nicht mit Fluoreszenzfarbstoffen sondern mit Gold-Nanopartikeln markiert und mit der auf der Oberfläche gebundenen Einzelstrang-DNA hybridisiert. Die Auswertung erfolgte durch AFM-Messungen (Abb. 33). Die Anzahl der Nanopartikel auf der Oberfläche war dabei abhängig von der Dichte der DNA-Moleküle pro Fläche und verringerte sich erwartungsgemäß mit verringerter Bindegruppen- oder DNA-Dichte (Abb. 34).



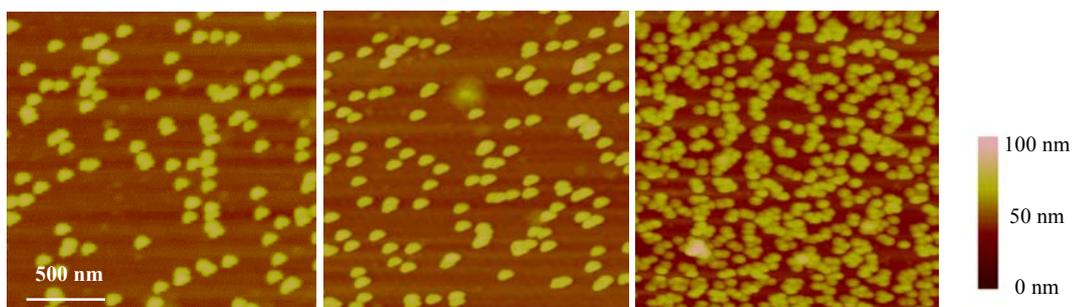
**Abb. 33:** AFM-Aufnahmen strukturierter, *onchip*-synthetisierter DNA-Oberflächen (Sequenz **E 151-20**) hybridisiert mit Gold-Nanopartikel (30 nm) markierter Komplementärsequenz **S 3** (2 OD), Bindegruppenabstufung von links nach rechts:

$$n_{\text{Ethylenglycol}} : n_{\text{Ethanol}} = 1; 0,8; 0,4; 0,2; 0$$

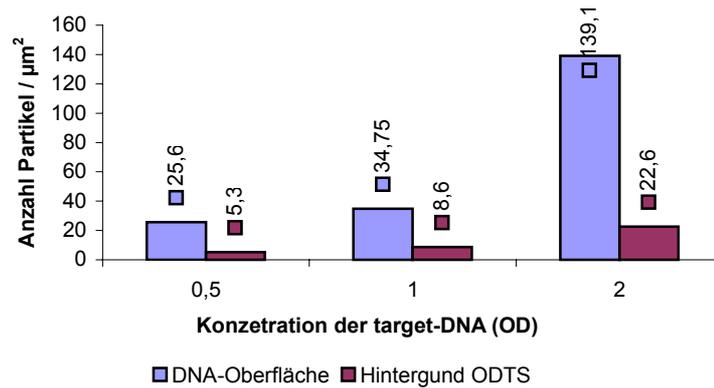


**Abb. 34:** Graphische Darstellung der Abhängigkeit der Partikeldichte von der DNA-Dichte auf Glasoberflächen

Die Partikeldichte ließ sich jedoch nicht nur mit der Dichte der DNA auf der Oberfläche variieren. Sie hing auch von der Hybridisierungskonzentration der Gold-Nanopartikel markierten target-DNA-Lösung ab. Mit steigender Konzentration der target-DNA erhöhte sich auch die Partikeldichte auf den Oberflächen (Abb. 35).

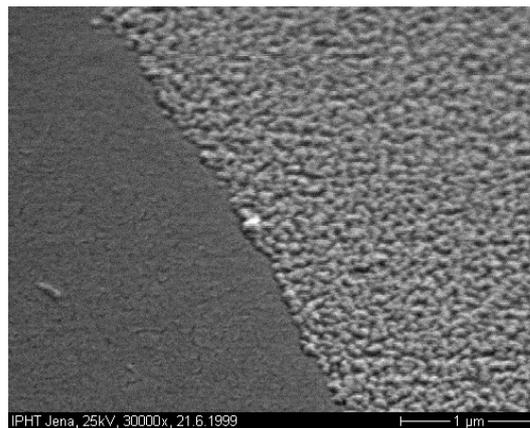


**Abb. 35:** AFM-Aufnahmen *onchip*-synthetisierter DNA-Oberflächen (Sequenz **E 151-20**) hybridisiert mit Gold-Nanopartikel (30 nm) markierter Komplementär-Sequenz **S 3**, Hybridisierungskonzentration von links nach rechts: 0,5; 1,0; 2,0 OD



**Abb. 36:** Graphische Darstellung der Abhängigkeit der Partikeldichte von der Hybridisierungskonzentration der target-DNA auf Glasoberflächen

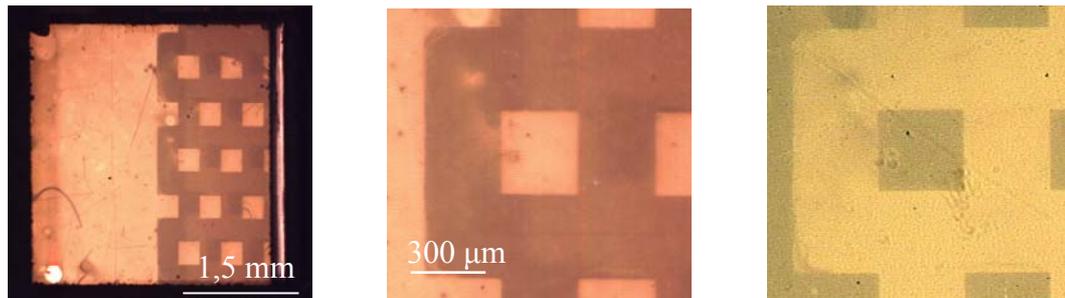
REM-Aufnahmen zeigten, dass sich die Gold-Kolloide auf der Oberfläche zu einer dichten Metallpartikel-Monolage anordneten (Abb. 37).



**Abb. 37:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Gold-Partikel-Monolage auf Glas

Durch die Ausbildung eines kolloidalen Metallfilms von Goldpartikeln auf den Glasoberflächen<sup>[68]</sup> ergab sich die Möglichkeit, die Hybridisierungsereignisse mit einem herkömmlichen Lichtmikroskop durch Transmissions- oder Reflexionsmessungen zu detektieren.<sup>[67]</sup> Abb. 38 zeigt eine photographische Übersichtsaufnahme eines Glas-Chips (3 x 3 mm) mit einer strukturierten DNA-Oberfläche (capture-Sequenz: **E 154-20**) hybridisiert mit Gold-Nanopartikel markierter Komplementärsequenz (target-Sequenz: **S 3**). Die Struktur des bei der Hybridisierung gebildeten kolloidalen Metallfilms wurde von der strukturierten capture-DNA-Oberfläche vorgegeben. Das sichtbare Licht

an diesem Kolloidfilm zeigt metallische Reflexion und erscheint etwas rötlicher als die Farbe von metallischen Goldschichten. Die mittlere Abbildung zeigt einen Ausschnitt des Chips im lichtmikroskopischen Auflichtverfahren. Die rechte Abbildung zeigt den selben Ausschnitt im lichtmikroskopischen Durchlichtverfahren. Durch die verringerte Transmission des sichtbaren Lichts erscheint der Metallfilm jetzt als dunkle bläuliche Struktur vor einem hellen Hintergrund.<sup>[69]</sup>

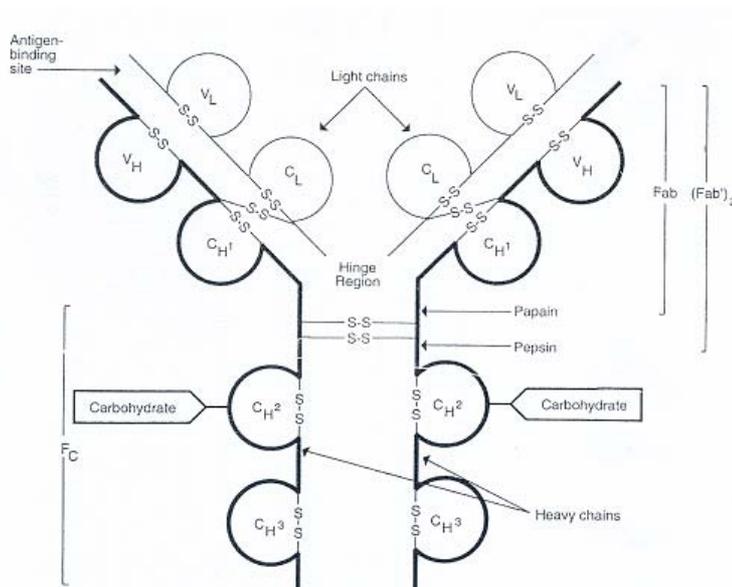


**Abb. 38:** Detektion von Hybridisierungsereignissen – Aufnahmen der Reflexion und Transmission an einem strukturierten kolloiden Metallfilm

## 9 Proteine

Die literaturbekannten Methoden nutzen die Aminogruppen der Lysin-Seitenketten zur Anbindung von Proteinen an Oberflächen.<sup>[70,71]</sup> Da die hier untersuchten Proteine Antikörper waren, schließt diese Methode jedoch nicht aus, dass gleichzeitig auch die Aminogruppen der Antigen-bindenden Bereiche zur Immobilisierung benutzt werden. Um eine Blockierung dieser Bereiche für spätere Antikörper-Antigen-Interaktionen zu verhindern, wurden die Antikörper hier über die Aldehydgruppen der oxidierten Kohlenhydrat-Seitenketten der Fc-Region an mikrostrukturierte Aminooberflächen durch Ausbildung einer Schiffischen Base gebunden.<sup>[18,72,73]</sup> Die Fc-Region befindet sich nahe der Hinge-Region zwischen dem C-terminus und der Antigen-bindenden Region (Abb. 39).

Durch die Anbindung der Immunoglobuline über die oxidierten Kohlenhydrat-Seitenketten blieb das Amino-terminale Ende der Polypeptid Ketten für die Antigen-Bindung unberührt, wie Qian<sup>[73]</sup> zeigte, und war von der Festkörperoberfläche abgewandt.

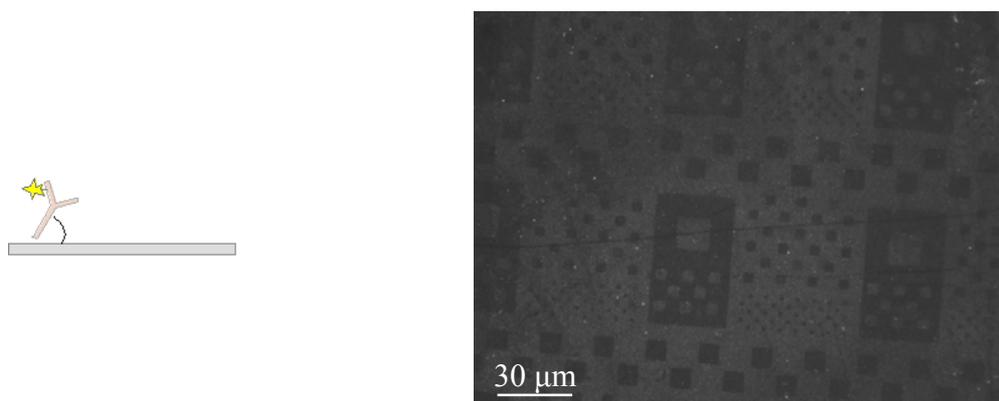


**Abb. 39:** Schematische Darstellung eines IgG-Moleküls

**Abb. 40:** Schematische Darstellung eines IgM-Moleküls

Die hier verwendeten monoklonalen Antikörper waren Immunglobuline M. IgM-Moleküle sind Pentamere und bestehen aus 5 IgG-Einheiten (Abb. 40). Die weiteren Abbildungen der Antikörper zeigen jedoch die vereinfachte schematische Darstellung als Monomer.

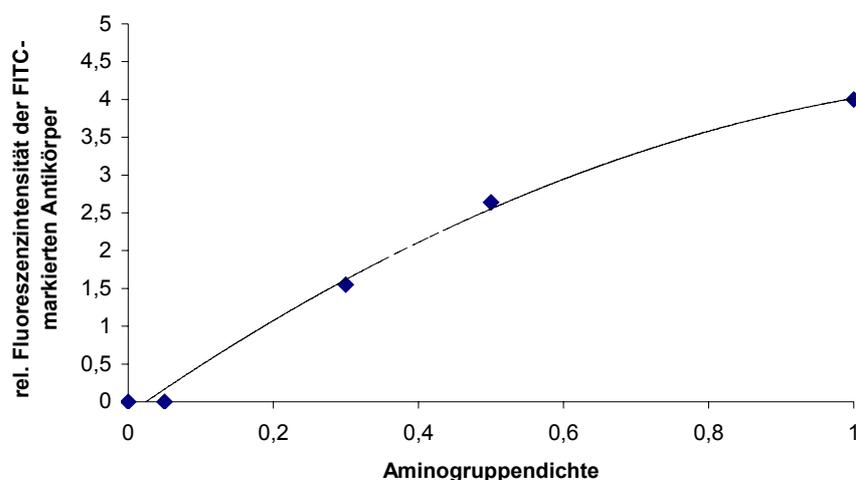
Die Immobilisierung von Antikörpern an die mikrostrukturierten Aminooberflächen wurde zunächst durch die Anbindung von Fluorescein-markierten Maus IgM erfolgreich getestet (Abb. 41).



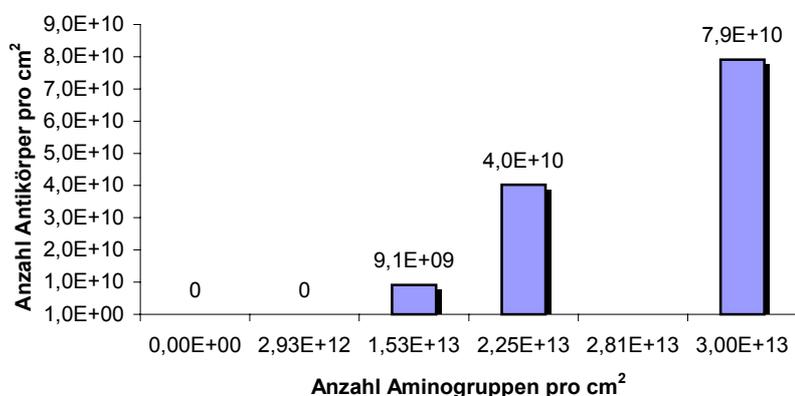
**Abb. 41:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Fluorescein-markierten Maus-Antikörpers  $\mu\text{IgM}^*$  anti-*Salmonella* O4 (*S. Typhimurium*), kovalent und gerichtet gebunden an eine Aminooberfläche; links: schematische Darstellung

Die Dichte der Antikörper auf der Oberfläche war abhängig von der Besetzungsdichte der Amino-Kopplungsgruppen. So nahm erwartungsgemäß die relative Fluoreszenzintensität der FITC-markierten Antikörper auf den Oberflächen mit sinkender Aminogruppenanzahl und damit mit sinkender Proteindichte ab (Abb. 42).

Unter der Annahme, dass auf Grund der Pentamerstruktur der Antikörper jedes Protein mit fünf Molekülen Fluorescein markiert war, wurde die Anzahl der kovalent gebundenen IgM-Moleküle in Abhängigkeit von der Anzahl der Amino-Kopplungsgruppen auf den Oberflächen gegen das Referenzsystem bestimmt (Abb. 43).

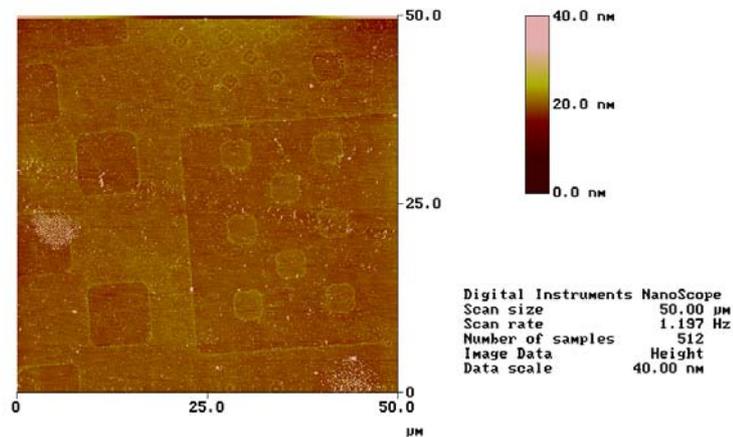


**Abb. 42:** Relative Fluoreszenzintensität von kovalent gebundenen Antikörpern an Aminooberflächen in Abhängigkeit von der Aminogruppendichte



**Abb. 43:** Anzahl der kovalent gebundenen Antikörper an Aminooberflächen in Abhängigkeit von der Aminogruppendichte

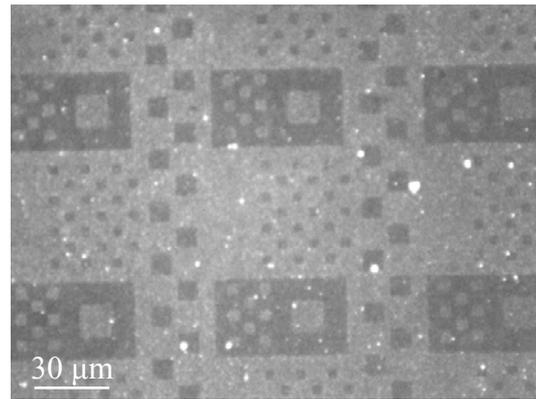
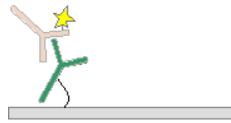
Die Schichtdicke des kovalent gebundenen Proteinlayers wurde durch AFM-Messungen mit etwa 3,5 nm bestimmt. Die Höhe liegt damit nicht im erwarteten Bereich für das Pentamer IgM, dessen Höhe etwa der doppelten des IgG-Moleküls von 16-19 nm<sup>[74]</sup> betragen sollte. Die Proben wurden am AFM jedoch in vollkommen getrocknetem Zustand der Proteine vermessen (Abb. 44).



**Abb. 44:** AFM-Aufnahme des Fluorescein-markierten Maus-Antikörpers  $\mu\text{IgM}^*$  anti-*Salmonella* O4 (*S. Typhimurium*), kovalent und gerichtet gebunden an eine Aminooberfläche

Wie die Ergebnisse der nachfolgenden Untersuchungen zeigten, blieb die ursprüngliche Struktur der Antikörper und damit die biologische Aktivität auch nach der Anbindung an die Oberflächen erhalten.

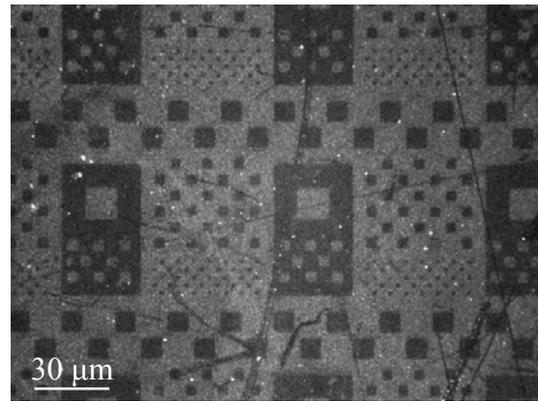
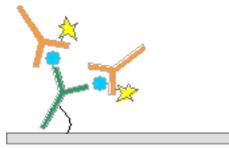
Für diese Experimente wurden primäre nicht-markierte Antikörper an die Aminooberflächen gekoppelt und der Erhalt der biologischen Aktivität durch die Anbindung von spezifischen fluoreszenz-markierten sekundären Antikörpern nachgewiesen (Abb. 45).



**Abb. 45:** Fluoreszenzmikroskopische Detektion des Maus-Antikörpers  $\mu\text{IgM}^*$  anti-*Salmonella* O4 (*S. Thyphimurium*), kovalent und gerichtet gebunden an eine Aminooberfläche durch spezifische Interaktion mit Fluorescein-markierten, sekundären anti-Maus  $\mu\text{IgM}^*$  Antikörpers aus Ziege; links: schematische Darstellung

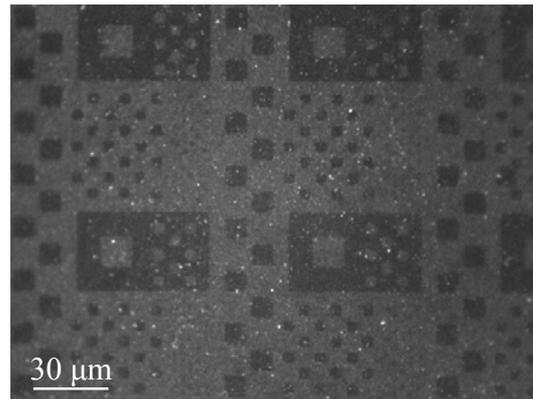
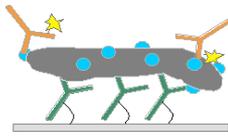
Die Ergebnisse aus den vorangegangenen Experimenten machten es möglich, die an den Oberflächen gebundenen primären capture Antikörper auf ihre Affinität gegen Antigene zu prüfen. Neben verschiedenen Serovaren von *Salmonella Thyphimurium* und *Salmonella Choleraesuis* und unterschiedlichen Negativ-Kontrollen mit Antiseren und Antigenen konnte der Ansatz für ein Modell-System zur serologischen Differenzierung von *Salmonella* Isolaten oder Antikörpern im Serum oder Fleisch entwickelt werden.<sup>[75]</sup> Dazu wurden primäre Antikörper, z. B. Maus anti-*Salmonella* O4 und Maus anti-*Salmonella* O7 kovalent und gerichtet an die Aminooberflächen gebunden und anschließend mit den zugehörigen spezifischen Antigenen inkubiert. Die Bildung der Antikörper-Antigen-Komplexe konnte durch Anbindung des spezifischen Fluorescein-markierten sekundären Antikörpers anti-Maus CSA-1\* aus Ziege detektiert werden (Abb. 46).

Durch vorhergehende Experimente mit verschiedenen Spül- und Waschvorgängen und eingesetzten Konzentrationen der Proteine konnten einerseits die unspezifischen Wechselwirkungen der Antikörper und Antigene untereinander und andererseits die unspezifischen Bindungen an die hydrophoben Bereiche der strukturierten Oberflächen verringert werden. Die optimale Konzentration für die LPS Antigene lag bei 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und die beste Verdünnung für die sekundären Antikörper bei 1:2000. Den Wasch-Puffern wurde Tween 20 zugesetzt, um die unspezifischen Bindungen der Proteine an den Oberflächen zu verhindern.<sup>[76]</sup> Der Zusatz von BSA zum PBS-T-Puffer blockierte die hydrophoben Oberflächen und inhibierte die Adsorption von Antigenen.<sup>[19]</sup>

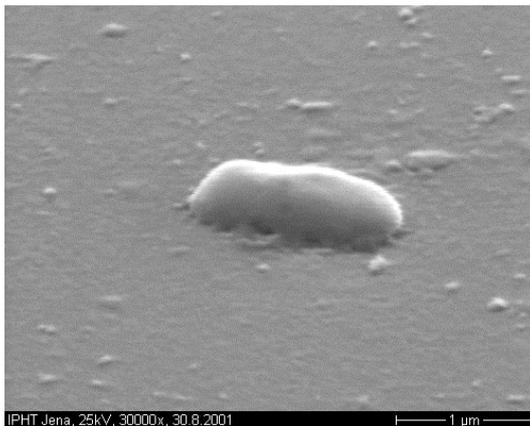


**Abb. 46:** Fluoreszenzmikroskopische Detektion des Antikörper-Antigen-Komplexes durch FITC-markierten sekundären Antikörper (primärer Antikörper: Maus-Antikörper  $\mu$ lgM anti-*Salmonella* O4 (*S. Thyphimurium*); Antigen: STM-LPS O4; Fluorescein-markierter sekundärer Antikörper: CSA-1\*), links: schematische Darstellung

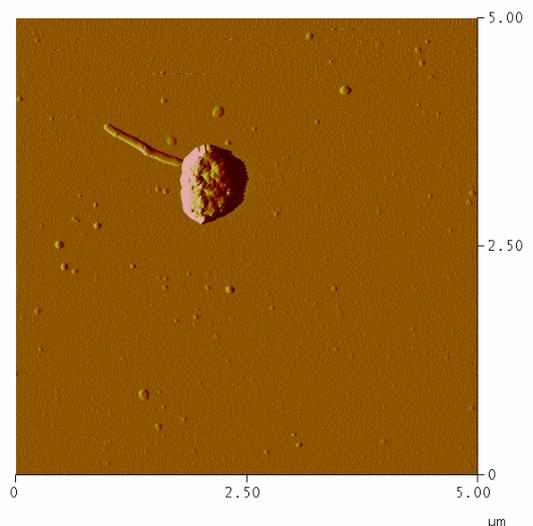
Mit diesem Testsystem konnten nicht nur die Lipopolysaccharide als Antigene erkannt werden, sondern auch ganze denaturierte *Salmonella*-Zellen. Die strukturierte Zellschicht wurde durch Anbindung von CSA-1\* fluoreszenzmikroskopisch detektiert und die Topographie einzelner Zellen mit AFM und REM aufgenommen (Abb. 47-Abb. 49).



**Abb. 47:** Fluoreszenzmikroskopische Detektion des Antikörper-Antigen-Komplexes durch FITC-markierten sekundären Antikörper (primärer Antikörper: Maus-Antikörper  $\mu$ IgM anti-*Salmonella* O4 (*S. Thyphimurium*); Antigen: STM-V denaturierte Zellen *Salmonella Thyphimurium* Vollantigen; Fluorescein-markierter sekundärer Antikörper: CSA-1\*), links: schematische Darstellung



**Abb. 48:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer einzelnen *Salmonella Thyphimurium* Zelle vom Beispiel in Abb. 47



**Abb. 49:** AFM-Aufnahme einer einzelnen *Salmonella Thyphimurium* Zelle vom Beispiel in Abb. 47

Die Negativ-Kontrollen mit Kombinationen von falschen Antikörpern oder Antigenen ließen bei der fluoreszenzmikroskopischen Detektion keine Bindungsereignisse erkennen.

---

# Diskussion

## 1 Chemische Oberflächenmodifizierung

Self Assembled Monolayers (SAMs) sind molekulare Anordnungen an Oberflächen, die sich spontan durch Eintauchen der entsprechenden Substrate in Lösungen von oberflächenaktiven Stoffen in einem organischen Lösungsmittel (auch aus der Gasphase) an der fest-flüssigen Grenzphase ausbilden<sup>b</sup>.<sup>[5-7,77-80]</sup>

Die SAMs der hier verwendeten Alkyltrichlor- oder Alkyltrialkoxysilane erforderten hydroxylierte Oberflächen.

Neben den in der Literatur bekannten und schon vielseitig untersuchten Einflüssen auf die Selbstorganisation wie Reaktionstemperatur,<sup>[81,82]</sup> Konzentration und Feuchtigkeit,<sup>[82-84]</sup> wurde im Rahmen dieser Arbeit festgestellt, dass die Vorbehandlung der Substrate einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität der hydrophoben Monolagen hatte. Je hydrophiler und damit je höher die OH-Gruppendichte der eingesetzten vorbehandelten Oberflächen war, desto hydrophobere Eigenschaften hatten die synthetisierten Octadecyl- oder Perfluorooctyl-Monolagen. Für die Bildung von dichten Alkyl- oder Perfluoralkylsilan-Monoschichten war es daher vorteilhaft, eine hohe Dichte von OH-Gruppen auf den Oberflächen zu erzeugen.

Im Vergleich zu den nativen und unbehandelten Oberflächen konnte die OH-Gruppendichte durch verschiedene Oberflächenbehandlungen erhöht werden.

Die höchste OH-Gruppendichte wurde dabei durch die beiden Sauerstoffplasma-Ätzverfahren und anschließender Behandlung der Oberflächen mit Salzsäure/Wasserstoffperoxid im Ultraschallbad erreicht. Die Glasoberflächen zeigten beim Vergleich der Plasmabehandlung durch RIE oder im Stripper keine Unterschiede in der Oberflächenenergie und in ihrem polaren Anteil. Jedoch unterschieden sie sich im Benetzungsverhalten von hydrophilen Lösungsmitteln. Nach dem Plasmastricken spreiteten Wasser, DMSO, Ethanol und sogar Ethylenglycol auf den Oberflächen. Dieses Verhalten konnte bei den RIE behandelten Glasoberflächen nur bei DMF und Wasser beobachtet werden. Bei den Siliciumoberflächen konnte die Oberflächenenergie durch Plasmastricken im Vergleich zur RIE noch etwas erhöht werden. Der Anstieg ist hier auf eine Erhöhung des polaren Anteils der Oberflächenenergie zurückzuführen, was

---

<sup>b</sup> Anm.: SAMs können sich auch an fest-gasförmigen Grenzflächen ausbilden. Die Ausbildung von SAMs aus der Gasphase war hier aber nicht Gegenstand der Untersuchungen.

Ausdruck für eine höhere OH-Gruppendichte ist. Ebenso wurde an den Siliciumoberflächen nach dem Plasmastrippen eine deutliche Abnahme des Randwinkels von Wasser im Vergleich zu den RIE behandelten Oberflächen beobachtet.

Randwinkelmessungen an den Glas- und Siliciumsubstraten zeigten weiterhin, dass alternative Methoden zur Erhöhung der OH-Gruppendichte wie Plasmaätzen mit Argon-Ionen,<sup>[85]</sup> Behandlung mit Caroscher Säure,<sup>[9]</sup> Piranha-Lösung,<sup>[86]</sup> Natriumhydroxid/Salzsäure,<sup>[87]</sup> Salzsäure/Chloroform<sup>[88]</sup> oder Ammoniaklösung/Wasserstoffperoxid<sup>[89]</sup> nicht so erfolgreich waren, wie die Sauerstoffplasma-Ätzverfahren.

Zhuravlev<sup>[90]</sup> bestimmte die OH-Gruppendichte von vollständig hydroxylierten Siliciumoberflächen mit  $4,9 \cdot 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ . Der Hydroxylgehalt von Glas wurde am Beispiel von Aerosil mit  $5,2 \cdot 10^{14} \text{ cm}^{-2}$  bestimmt.<sup>[60]</sup> Eine direkte Bestimmung der OH-Gruppendichte erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nicht. Zur Abschätzung der Hydroxylkonzentration auf den Oberflächen wurden deshalb die polaren Anteile der molaren Freien Oberflächenenergie und das hydrophile Verhalten über die Randwinkel von Wasser herangezogen.

Die Bildung der hydrophoben monomolekularen Schichten ist im Wesentlichen durch die Reaktion der Alkyltrichlor- oder Alkyltrialkoxysilane mit den OH-Gruppen der Oberfläche beeinflusst. Die weitere Reaktion von Spuren von Wasser an der Oberfläche führt zur Ausbildung eines zweidimensionalen Polysiloxan-Netzwerkes, das kovalent an den Oberflächen-Silanol-Gruppen über Si-O-Si-Bindungen gebunden ist.<sup>[6]</sup> Die Schwierigkeit bei der Herstellung der SAMs von Alkyltrichlorsilanen liegt in der sorgfältigen Kontrolle des erforderlichen Wassergehaltes der Reaktionslösung.<sup>[82-84]</sup> Ein zu hoher Feuchtigkeitsanteil lässt die Silane in der Lösung polymerisieren und führt zur Abscheidung von dicken Polysiloxanfilmen auf den Oberflächen. In vollkommen wasserfreier Umgebung hingegen ist die Bildung der Self Assembled Monolayers nur unvollständig und lückenhaft.<sup>[11,91]</sup> McGovern et al. fanden einen optimalen Wassergehalt für die Reaktion von  $8,3 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$  Wasser pro 100 ml Lösungsmittel.<sup>[92]</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass eine Kontrolle des Wassergehaltes auch auf einfachere Weise möglich ist.

Die Polymerisation der Silane wurde immer durch den Einsatz von wasserfreien, ketylierten Toluol als Lösungsmittel verhindert. Die Umsetzung der Trichlorsilane mit den Substratoberflächen fand stets unter trockener Argonatmosphäre statt. Anfangs wurden die Synthesen nur in vorher ausgeheizten Reaktionsgefäßen und mit

Substrathaltern und Substraten, die bei 120°C getempert waren, durchgeführt. Wie Wassermann et al.<sup>[11]</sup> und Le Grange et al.<sup>[91]</sup> beschrieben, wurden anscheinend nur unvollständige Monolagen erhalten. Die Oberflächen waren zwar hydrophob, jedoch lagen die Randwinkel von Wasser an den Octadecyloberflächen gerade bei etwa 90°.

Später wurden die Substrate und Substrathalter vor dem Einsatz nicht mehr getempert und die Synthesen in nichtausgeheizten Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Materialien wurden nach dem Waschen mit Wasser nur im Stickstoffstrom trocken geblasen und verwendet. Auf dispersen Siliciumdioxid sind bei Raumtemperatur und unter atmosphärischen Bedingungen (relative Luftfeuchte 50%) ca. 6 Moleküle Wasser pro nm<sup>2</sup> adsorbiert.<sup>[60]</sup> Der Eintrag der adsorbierten Wassermenge an den Oberflächen der Substrate und Geräte in das ketylierte Lösungsmittel führte nicht zur Polymerisation der Silane in der Lösung, erwies sich dennoch anscheinend als ausreichend zur Quervernetzung der an der Oberfläche kovalent gebundenen Silane zur Bildung des zweidimensionalen Polysiloxan-Netzwerkes. Die so gebildeten monomolekularen Alkylschichten waren homogener, dichter und hydrophober als die vorher beschriebenen. Die Randwinkel von Wasser erreichten nun etwa 100°.

Perfluorooctyltrichlorsilan und Perfluordecyltrichlorsilan waren hinsichtlich der Polymerisation in der Reaktionslösung noch empfindlicher gegen Feuchtigkeit als das Octadecyltrichlorsilan. Selbst in ketyliertem Toluol konnte eine Polymerisierung nicht verhindert werden und die Polysiloxane fielen aus der Toluollösung aus. Hier konnten homogene Monolagen durch eine Umsetzung der Substrate in Perfluorocetan, getrocknet über Molsieb 4Å, erhalten werden.

Die theoretisch erwartete Schichtdicke einer Perfluordecylmonolage von etwa 1,5 nm wurde durch ellipsometrische Messungen bestätigt. Hier wurde eine Schichtdicke von 1,6 nm gemessen.

Die geringe Oberflächenspannung der monomolekularen Octadecyloberflächen von etwa 19 mN/m und der Perfluoralkyloberflächen von etwa 18 mN/m spricht für hochgeordnete CH<sub>3</sub>- bzw. CF<sub>3</sub>-Oberflächen.<sup>[5]</sup>

Unter der Annahme, dass die Alkylketten der Octadecylmonolage in einer *all-trans* Konformation axial angeordnet sind und senkrecht auf der Oberfläche stehen, beträgt die erwartete Höhe einer Octadecylmonolage 2,6 nm. Die Alkylketten sollten aber einen Neigungswinkel von ≤15° aufweisen,<sup>[93]</sup> was die theoretische Höhe der Monolage um etwa 0,08 nm auf 2,52 nm reduziert. Eine equatoriale Anordnung der Alkylketten

erfordert einen Neigungswinkel von  $\geq 30^\circ$ .<sup>[5]</sup> Damit würde sich die theoretische Höhe um 0,35 nm auf 2,25 nm reduzieren.

Die festgestellte Höhe der hier synthetisierten Octadecylmonolagen betrug nur etwa 2 nm. Die deutlich verminderte Höhe der monomolekularen Schicht scheint, auf eine lückenhafte oder unvollständige Bedeckung hinzudeuten. Solche lückenhaften Octadecylmonolagen wurden bereits von Cohen und Wassermann diskutiert. Cohen schlug vor, dass die Struktur dieser Schichten aus Inseln von dicht gepackten Alkylketten besteht, die in ihrer vollen Länge gerade von der Oberfläche abweisen.<sup>[94]</sup> Der von Cohen favorisierten Inselstruktur wurde von Wassermann widersprochen. Er beschrieb die Struktur der unvollständigen Monolayer durch ein „uniform model“.<sup>[95]</sup> Dabei sind ungeordnete Moleküle gleichmäßig über die Oberfläche des Substrates verteilt. Die daraus resultierende Ordnung der Struktur ist ähnlich der einer Flüssigkeit und die Schichtdicke geringer als die von vollständigen Monolayern.

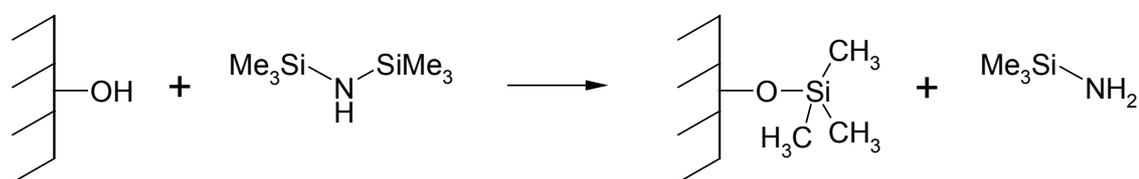
Bei AFM-Untersuchungen an den hier synthetisierten Octadecyloberflächen konnten keine Inselstrukturen detektiert werden. Die Aufnahmen zeigten stattdessen homogene Schichten und scheinen somit, das von Wassermann et al. beschriebenen „uniform model“ zu bestätigen.

## 2 Mikrostrukturierung

Die Mikrostrukturierung der molekularen Monofilme erfolgte mit Hilfe einer photolithographischen Technik, wie sie heute standardmäßig in der Halbleitertechnologie zur Herstellung von integrierten Schaltkreisen und Computer-Mikrochips benutzt wird.<sup>[96]</sup> Das wesentliche Element dieser Technologie ist eine strahlungsempfindliche Resistschicht, die in den gewünschten Bereichen so bestrahlt wurde, dass in einem geeigneten Entwickler nur die bestrahlten (oder unbestrahlten) Bereiche entfernt wurden. Die so entstandene strukturierte Resistschicht diente als Maske bei dem darauffolgenden Ätzprozess im Sauerstoffplasma (RIE), bei dem die Struktur in die darunterliegende organische Monoschicht übertragen wurde. Für weitere detaillierte Informationen zur Lithographie sei an dieser Stelle auf die Literatur verwiesen.<sup>[97-99]</sup>

Die optimale Haftung des Photolackes auf den Oberflächen während des gesamten Prozessverlaufs war dabei ein entscheidendes Kriterium für den Erfolg der Mikrostrukturierung. Oxidische Oberflächen sind gewöhnlich mit einer Schicht von physisorbierten Wassermolekülen bedeckt, die es Lösungsmitteln oder Wasser erlauben,

während der Lackentwicklung in die Grenzfläche zwischen Lack und Substratoberfläche einzudringen. Die eingelagerten Lösungsmittel führen dann bei der Entwicklung zum Ablösen der Photolackschicht von den Oberflächen. Zur Unterstützung der Lackhaftung werden die Substrate daher in der Halbleitertechnologie vor der Beschichtung bei 100-200°C im Vakuum getempert, um adsorbiertes Wasser zu entfernen. Zusätzlich wird nach der Temperung Hexamethyldisilazan (HMDS) als Haftvermittler auf die Oberflächen aufgebracht. HMDS bildet einen wasserabweisenden Film auf den oxidischen Oberflächen<sup>[100]</sup> (Schema 6). Diese HMDS-Schicht verhindert, dass die Entwicklerlösung die Resistschicht unterwandert und zum Ablösen des Photolackes führt.



**Schema 6:** Mechanismus der Silylierung von Silicium mit HMDS

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Octadecyl- und Perfluoralkylmonoschichten sollten die Adsorption von Wasser im Grunde von Anfang an verhindern. Jedoch kam es auch hier zu Haftungsproblemen des Photolackes. Aufgrund der geringen Grenzflächenspannung der Octadecyl- und Perfluoralkylmonoschichten wurde eine Adhäsion des Photoresists bereits beim Aufschleudern verhindert. Somit war hier der Einsatz eines Haftvermittlers erforderlich, der auf den hydrophoben Monoschichten haftet und bestmögliche Benetzungseigenschaften für den Photolack aufweist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten als Haftvermittler für die hydrophoben Monolagen erfolgreich Polymethylmethacrylat- oder Gelatinefilme eingesetzt werden. Beide Filme zeichnete eine homogene Schichtbildung aus. Durch die geringe Dicke der erzeugten Haftvermittlerschichten waren die Maßverschiebungen infolge von Materialdickeschwankungen in Bezug zur Größe der erzeugten Mikrostrukturen unbedeutend.

Gegen die verwendeten Chemikalien bei der photolithographischen Entwicklung der Lackschichten waren beide Polymerfilme resistent. Ablösungserscheinungen oder das Eindringen von Wasser und Lösungsmitteln in die Grenzfläche zum Lack bzw. zur Substratoberfläche wurden nicht beobachtet. Ebenso konnten keine negativen Einflüsse

der Haftvermittlerschichten bei der Plasmastrukturierung der Monoschichten festgestellt werden. Durch die hohen Ätzraten der Polymere wurde die Haftvermittlerschicht im Sauerstoffplasma (RIE) vollständig abgetragen, so dass die Strukturierung der organischen Monolagen nicht zu Strukturdefekten durch eventuell noch aufliegende PMMA- oder Gelatinereste führte.

Nach dem Lackablösen erwies sich die Entfernung der Haftvermittler als problemlos. Die PMMA-Schicht wurde schon durch einfaches Spülen mit Aceton vollständig gelöst. Die quervernetzte Gelatineschicht konnte durch Ultraschallbehandlung in 50%iger Essigsäure abgelöst werden.

Die Kontaktwinkel von Flüssigkeiten an chemisch heterogenen Oberflächen, die z. B. anteilig aus  $f_1$  hydrophilen und aus  $f_2$  hydrophoben Gruppen bestehen, lassen sich nach der Cassie-Gleichung vorhersagen<sup>[101]</sup> (Gl. 2-1).

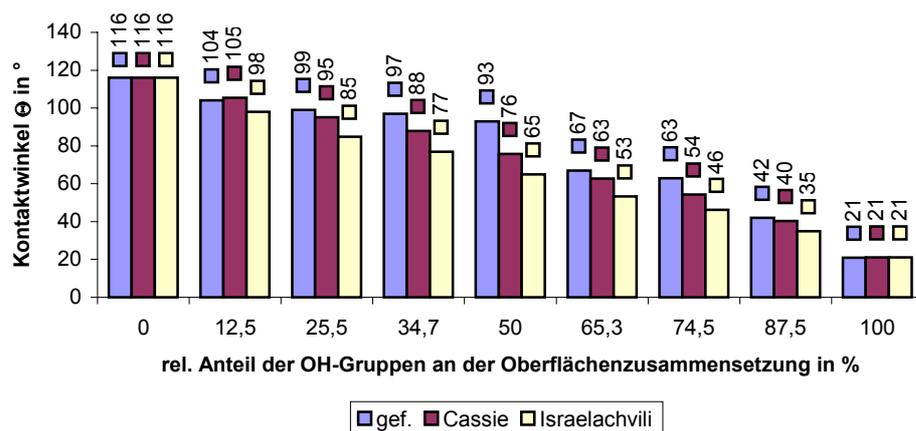
$$\cos \theta = f_1 \cdot \cos \theta_1 + f_2 \cdot \cos \theta_2 \quad \text{Gl. 2-1}$$

Dabei sind  $\theta_1$  und  $\theta_2$  die Kontaktwinkel der reinen homogenen Oberfläche 1 und 2.

Nach Israelachvili<sup>[102]</sup> gilt diese Gleichung streng genommen nicht, wenn die Heterogenität der Oberfläche in atomarer oder molekularer Dimension liegt. Unter Berücksichtigung der van der Waals Wechselwirkungen und elektrostatischen Kräfte<sup>[103]</sup> sollten die Kontaktwinkel solcher chemisch heterogenen Oberflächen besser durch Israelachvili-Gleichung<sup>[102]</sup> beschrieben werden (Gl. 2-2).

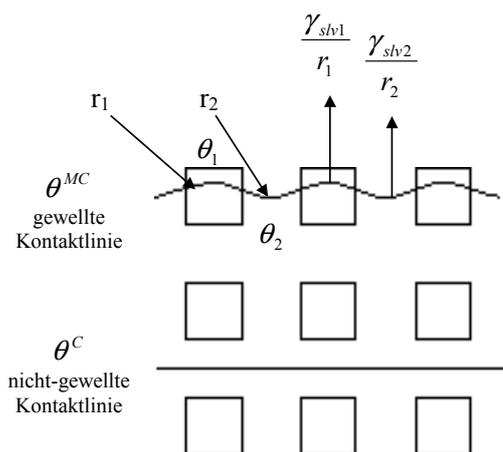
$$(1 + \cos \theta)^2 = f_1 \cdot (1 + \cos \theta_1)^2 + f_2 \cdot (1 + \cos \theta_2)^2 \quad \text{Gl. 2-2}$$

In Abb. 50 sind die experimentell ermittelten Kontaktwinkel von Wasser an einer mikrostrukturierten Perfluordecyl/OH-Oberfläche unterschiedlicher Zusammensetzung mit den nach Cassie und Israelachvili berechneten Kontaktwinkeln dargestellt. Der Vergleich von Gl. 2-1 und Gl. 2-2 zeigt, dass bei gleichen Werten von  $\theta_1$ ,  $\theta_2$ ,  $f_1$  und  $f_2$  nach der Cassie-Gleichung (Gl. 2-1) immer höhere Kontaktwinkel vorhergesagt werden als nach der Israelachvili-Gleichung (Gl. 2-2). Die theoretisch berechneten Werte liegen jedoch nach beiden Gleichungen unter den experimentell ermittelten Randwinkeldaten.



**Abb. 50:** Graphische Darstellung der gefundenen und nach Cassie und Israelachvili berechneten Kontaktwinkel von Wasser an einer mikrostrukturierten Perfluordecyl/OH-Oberfläche mit unterschiedlichem Verhältnis von OH- zu Perfluordecylflächen

Untersuchungen von Drelich et al.<sup>[104]</sup> zur Benetzung mikrostrukturierter heterogener Oberflächen von hydrophoben und hydrophilen SAMs auf Goldoberflächen zeigten, dass bei einer mikroskopischen Betrachtung die Drei-Phasen-Kontaktlinie der Flüssigkeit an den Mikrostrukturen durch den Wechsel der freien Oberflächenenergie im Drei-Phasen-System (in der Literatur als line tension  $\gamma_{slv}$  bezeichnet<sup>[104]</sup>) gekrümmt wird (Abb. 51).



**Abb. 51:** Drei-Phasen-Kontaktlinie von Flüssigkeiten an hydrophilen Quadraten in einer hydrophoben Umgebung (aus Drelich et al.<sup>[104]</sup>)

Die Berücksichtigung der gewellten Drei-Phasen-Kontaktlinie an heterogenen Oberflächen führt zu einer modifizierten Cassie-Gleichung (Gl. 2-3).

$$\cos \theta^{MC} = f_1 \cdot \cos \theta_1 + f_2 \cdot \cos \theta_2 - \frac{1}{\gamma_{lv}} \cdot \left( \frac{f_1 \cdot \gamma_{slv1}}{r_1} - \frac{f_2 \cdot \gamma_{slv2}}{r_2} \right) \quad \text{Gl. 2-3}$$

Im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch keine mikroskopischen Randwinkeluntersuchungen durchgeführt. Das von Drelich et al. beschriebene Phänomen der Krümmung der Drei-Phasen-Kontaktlinie konnte daher mit den hier gewählten Methoden nicht beobachtet werden. Die untere Grenze für die heterogenen Strukturen die eine gewellte Drei-Phasen-Kontaktlinie bewirken, wird zwischen 10 und 1000 Å vermutet.<sup>[104]</sup>

### 3 Funktionalisierte Bindsplot-Arrays zur Anbindung von Biomolekülen und ihre Anwendung in Bauelementen

#### 3.1 Diskussion zur Quantifizierung

Zur quantitativen Bestimmung der Anzahl der oberflächengebundenen Fluoreszenzfarbstoffmoleküle wurde deren relative Fluoreszenzintensität mit einer fluoresceinhaltigen Polyvinylalkoholschicht auf Standard-Deckgläschen verglichen. Die relative Fluoreszenzintensität des Polyvinylalkohol-Standards war dabei in den Größenordnungen der Fluoreszenz von monomolekularen Fluoresceinschichten direkt proportional zur Anzahl der eingebetteten Fluoresceinmoleküle im Polymer. Die Proportionalität blieb auch bis zu einer noch erfassbaren Schichtdicke von wenigen Nanometern erhalten. Unter der Annahme, dass sich die Fluoreszenzquantenausbeute von Fluorescein in Polyvinylalkohol beim Übergang von einer wenigen Nanometer dicken Schicht zu einer monomolekularen oder wenige Moleküle dicken Schicht auf der Oberfläche nicht ändert, wurde die Anzahl der oberflächengebundenen Fluoresceinmoleküle fluoreszenzmikroskopisch gegen den Polyvinylalkohol-Standard bestimmt.

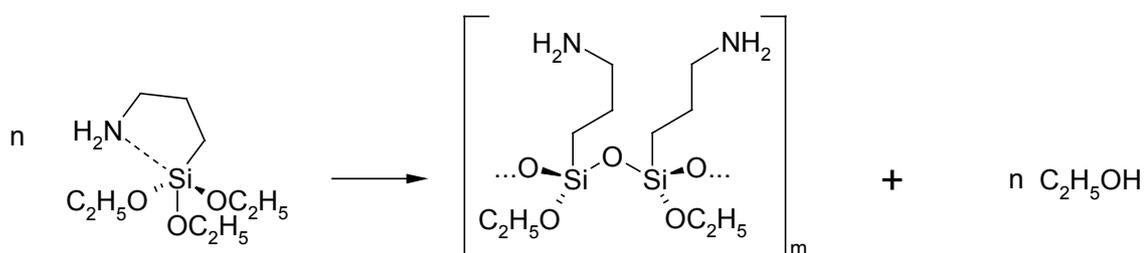
Der Vergleich der so auf den Oberflächen ermittelten Moleküldichten/cm<sup>2</sup> mit Literaturdaten<sup>[60,90,105-107]</sup> scheint diese Annahme zu rechtfertigen.

#### 3.2 Synthesestrategien

Bei der Anbindung von Biomolekülen an Glasoberflächen wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurden zur Herstellung von Proteinarrays Antikörper über eine Aldehydfunktion der oxidierten Kohlenhydratseitenketten durch Bildung einer Schiffschens Base an Aminospots gekoppelt. Die Herstellung der DNA-Arrays hingegen

wurde durch eine basenweise *onchip*-Synthese an Ethylenglycol funktionalisierten Mikrospots realisiert.

Eine in der Literatur weit verbreitete Methode zur Erzeugung von Aminooberflächen auf Glas- und Silicium ist die Umsetzung der hydroxylierten Oberflächen mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES).<sup>[62,88,108-114]</sup> Die Verwendung von APTES zur Bildung monomolekularer Filme hat jedoch einen entscheidenden Nachteil, da die Aminogruppe im Silan autokatalytisch bei der Polysiloxanbildung wirkt.<sup>[60]</sup> Durch intra- oder intermolekulare Wechselwirkung der Aminogruppe mit dem Siliciumatom bildet sich ein pentakoordinierter Übergangszustand<sup>[109]</sup> mit einer hohen Reaktivität gegenüber Nucleophilen (Schema 7).



**Schema 7:** Mechanismus der Polymerisierung von APTES nach Kanan<sup>[109]</sup>

So schied sich bei allen Umsetzungen der mikrostrukturierten Substrate mit APTES in Toluol ein dichter Polysiloxanfilm auf den Oberflächen ab der die darunterliegenden Mikrostrukturen komplett überdeckte.

Um die Mikrostrukturierung zu erhalten und monomolekulare Aminospots zu erzeugen, wurde der alternative Syntheseweg über die Epoxy-modifizierte Oberflächen mit anschließender Ringöffnung durch Diamine gewählt. Zum Schutz des Oxirans wurden hier jedoch die literaturbekannten Oberflächenmodifizierungen mit Zusätzen von Essigsäure,<sup>[115]</sup> der Umsetzung in wässrigem Natriumacetat-Puffer<sup>[116]</sup> oder Isopropanol/Wasser<sup>[117]</sup> unter Rückfluss nicht durchgeführt. Die Reaktion des 3-Glycidoxypropyltriethoxysilanes (GOPS) mit den OH-Spots erfolgte stattdessen nach einer modifizierten Vorschrift von Maskos und Southern<sup>[63]</sup> in wasserfreiem Toluol.

Der Syntheseweg über die Ringöffnung des Epoxids ermöglichte es gleichzeitig, die Aminogruppendichte auf den Oberflächen durch Konkurrenz-Reaktion des Diamins und eines n-Alkylamins im molaren Verhältnis von 0 – 1 gezielt einzustellen. Die Zunahme der Anzahl der Aminogruppen auf den Oberflächen konnte nach Ankopplung von

Fluoresceinisothiocyanat (FITC) fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden. Dabei ist bei einem Einsatz von Diamin zu Amin im molaren Verhältnis bis etwa 0,4 eine lineare Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität beobachtbar. Danach tritt die relative Fluoreszenzintensität allmählich in eine Sättigung ein. Ab einer molaren Zusammensetzung von Diamin zu Amin von etwa 0,8 war die maximale Fluoreszenzintensität erreicht und blieb auch nach weiterer Erhöhung des Aminogruppenanteils auf der Oberfläche konstant. Unter der Annahme, dass jede Aminogruppe auf der Oberfläche mit FITC markiert wurde, ergaben quantitative Untersuchungen für diese und höhere Zusammensetzungen eine Aminogruppendichte von etwa  $3 \cdot 10^{13}$  Aminogruppen/cm<sup>2</sup> bzw. FITC-Moleküle/cm<sup>2</sup> auf den Glasoberflächen und etwa  $2 \cdot 10^{12}$  auf Siliciumoberflächen. Aufgrund des höheren Platzbedarfes von Fluorescein im Vergleich zum Alkylamin lässt sich vermuten, dass die Glasoberflächen mit etwa  $3 \cdot 10^{13}$  gebundenen Molekülen FITC gesättigt ist und es somit ab der molekularen Aminogruppenbesetzungsdichte 0,8 zu keiner weiteren Steigerung der relativen Fluoreszenzintensität kommen kann. Weiterhin wäre es denkbar, dass infolge des verringerten zwischenmolekularen Abstandes der Moleküle Fluoreszenz-Energietransferprozesse stattfinden.

Auf den Glasoberflächen lässt sich die um den Faktor 20 deutlich höhere relative Fluoreszenzintensität vermutlich auf Ausbildung von Gelschichten und höhere Oberflächenrauigkeit zurückführen, die eine Vergrößerung der Oberfläche im Vergleich zum Silicium zur Folge haben. Ferner ist bekannt, dass die Fluoreszenz von Molekülen, die in geringem Abstand zu Metalloberflächen stehen, durch Elektronenübergänge gelöscht werden kann. Die Vermutungen wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht.

Ein weiterer Vorteil der Epoxy-modifizierten mikrostrukturierten Oberflächen zeigte sich in der leichten Zugänglichkeit bei der Herstellung von Bindespots zur DNA-Immobilisierung. Durch die sauer katalysierte Ringöffnung des Oxirans mit Ethylenglycol wurde ein OH-linker für die *onchip*-Synthese der DNA erhalten.<sup>[63]</sup> Auch hier konnte die Konzentration des Linkers auf der Oberfläche durch Verdünnung des Ethylenglycols mit Ethanol im molaren Verhältnis von 0 – 1 eingestellt werden.

### **3.3 DNA-Immobilisierung an mikrostrukturierte monomolekulare Ethylenglycoloberflächen**

Zur Immobilisierung von DNA an Festkörperoberflächen und dem Aufbau von DNA-Arrays existieren in der Literatur bereits eine Vielzahl von Veröffentlichungen. Nature

Genetics publizierte zu diesem Thema 1999 die Spezialausgabe „The Chipping Forecast“.<sup>[118]</sup> Sie beinhaltet eine umfassende Sammlung von Review-Artikeln zu unterschiedlichen Aspekten von der Herstellung und Immobilisierung der DNA bis zur Anwendung von DNA-Chips.

Im Wesentlichen werden bei der Anordnung von Oligonucleotiden auf Oberflächen zu DNA-Arrays zwei Strategien verfolgt. Ein Ansatz ist die Immobilisierung und das Arrangement von vorgefertigten Oligonucleotiden zu DNA-Arrays. Bei der zweiten Methode werden die Oligonucleotide *onchip* an festgelegte Bereiche der Oberflächen synthetisiert.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden einzelsträngige Oligonucleotide in einem herkömmlichen DNA-Synthesizer durch *onchip*-Synthese (Literatur oft *insitu*-Synthese) basenweise vom 3'- zum 5'-Ende direkt an Ethylenglycol-Bindespots auf Glasoberflächen synthetisiert. Durch zusätzliches Einfügen von einem und zwei Ethylenglycol-[2-cyanoethyl-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite-Spacern (PA 9) sowie eines 15-fachen Thymin-Spacers wurde der Abstand der Oligonucleotide zur Oberfläche variiert.

Shchepinov et al. fanden bei Untersuchungen zur Hybridisierung von DNA, die über verschieden lange Spacer an Amino-funktionalisierten Polypropylen gebunden war, eine optimale Spacerlänge von 40 Atomen.<sup>[119]</sup>

Bei den hier synthetisierten DNA-Oberflächen konnte diese Tendenz nach einer Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierter komplementärer DNA nicht beobachtet werden. Stattdessen ergab sich anfangs eine ausgeprägte Abhängigkeit von der Anzahl der Synthesestufen bzw. der Nucleotidanzahl der immobilisierten DNA bei der *onchip*-Synthese. Wie Fluoreszenzmessungen an *onchip*-synthetisierter Einzelstrang-DNA mit Fluoreszenzmarkern zeigte, nahm mit steigender Nucleotidanzahl die Fluoreszenzintensität ab, was sich auf unvollständige Reaktionen der Phosphoramiditbausteine während der Synthese zurückführen ließ. Nach Verlängerung der Reaktionszeiten während der *onchip*-Synthese wurde auch dieser Trend nicht mehr so ausgeprägt beobachtet. Auf diese Weise gelang es, Oligonucleotide mit bis zu 52 Basen an den monomolekularen Ethylenglycoloberflächen zu synthetisieren. Nach Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierter komplementärer DNA war fluoreszenzmikroskopisch nur noch ein leichter Abfall der relativen Fluoreszenzintensität mit steigender Basenanzahl feststellbar.

Die *onchip*-Synthese der DNA an Oberflächen hat gegenüber der Immobilisierung von vorgefertigten Oligonucleotiden eine Reihe von Vorteilen. So ist die Ausbeute der an der Oberfläche angebondenen DNA bei der *onchip*-Synthese sehr hoch und die DNA-Oberflächen oder DNA-Spots zeichnen sich zudem durch eine hohe und gleichmäßige Anordnung der Moleküle aus.<sup>[120]</sup> Die hier gewählte *onchip*-Synthese hat jedoch auch einen entscheidenden Nachteil. Mit dieser Methode ist es nicht möglich, DNA-Bibliotheken aufzubauen, da an jedem Bindespot im ganzen Array die gleiche DNA-Sequenz synthetisiert wird. Sie erlaubt aber den schnellen Aufbau von großen DNA-Arrays in einigen wenigen Kopplungsschritten und eignet sich daher für Untersuchungen und zur Charakterisierung von DNA-DNA-Wechselwirkungen oder Wechselwirkungen der DNA mit anderen (Bio)Molekülen.

Die DNA-Dichte auf den Oberflächen ließ sich über die Ethylenglycol-Bindegruppendichte variieren. Während der sauer katalysierten Ringöffnungsreaktion des Oxirans wurde der molare Anteil des Ethylenglycols auf der Oberfläche durch Konkurrenzreaktion mit Ethanol verdünnt. Nach der *onchip*-Synthese der Oligonucleotide wurden DNA-Oberflächen mit unterschiedlicher DNA-Dichte erhalten. Durch Hybridisierung mit der 6-FAM markierten komplementären DNA konnte bei der höchsten Bedeckungsdichte durch Messung der relativen Fluoreszenzintensität im Fluoreszenzmikroskop eine Oberflächenbeladung von etwa  $1,8 \cdot 10^{11}$  hybridisierten Molekülen/cm<sup>2</sup> bestimmt werden. Diese Menge liegt im Bereich der Erwartungen. Nach eigenen Erfahrungen verringert sich bei den einzelnen Synthesestufen an den Oberflächen die Anzahl der funktionalisierten Oberflächengruppen von den Hydroxylgruppen ( $5 \cdot 10^{14}$  cm<sup>-2</sup>) über GOPS/Ethylenglycol bzw. Amino-Gruppen ( $3,2 \cdot 10^{13}$  cm<sup>-2</sup>) stets um etwa eine Größenordnung. Daher sind vermutlich nach der *onchip*-Synthese etwa  $10^{12}$  Moleküle/cm<sup>2</sup> an der Glasoberfläche gebunden.

Diese Anzahl widerspricht entschieden den Ergebnissen von Maskos und Southern. Sie bestimmten für ein DNA-Molekül nach der *onchip*-Synthese über GOPS und Ethylenglycol eine Fläche von  $39,1 \text{ \AA}^2$ ,<sup>[63]</sup> das entspricht einer Besetzung von  $2,5 \cdot 10^{14}$  DNA-Molekülen/cm<sup>2</sup>. Allerdings erscheint diese von Maskos und Southern angegebene Größenordnung verglichen mit der OH-Gruppendichte von etwa  $5 \cdot 10^{14}$  cm<sup>-2</sup> auf hydroxylierten Glas- und Siliciumoberflächen<sup>[60,90]</sup> nicht realistisch.

So wurde auch von Steel et al. durch elektrochemische Quantifizierung nach Anbindung thiolisierter DNA an Goldoberflächen eine Besetzungsdichte von  $(1-10) \cdot 10^{12}$  Molekülen/cm<sup>2</sup> bestimmt.<sup>[107]</sup> Halliwell und Mitarbeiter<sup>[105]</sup> konnten über

Bildung von Disulfidbrücken mit 3-Mercaptopropyloberflächen  $3,8 \cdot 10^{12}$  Moleküle thiolisierter DNA pro  $\text{cm}^2$  immobilisieren, von denen noch  $5 \cdot 10^{10}$  Moleküle nach einer Hybridisierung erfasst wurden. O'Donnell-Maloney et al.<sup>[106]</sup> fanden bei der Anbindung von Amino-modifizierter DNA an Epoxy-modifizierte Siliciumoberflächen eine Besetzungsdichte von  $6 \cdot 10^{12}$ . Bei den hier ermittelten Größenordnungen lässt sich daher eher eine Übereinstimmung mit den Angaben von O'Donnell-Maloney feststellen.

Nach der Verringerung der DNA-Dichte konnte aufgrund der geringen Konzentration der einzelsträngigen DNA auf der Oberfläche fluoreszenzmikroskopisch keine Hybridisierung mehr nachgewiesen werden.

Ein neuer Ansatz zum Nachweis von Hybridisierungsereignissen wurde 1997 in der Arbeitsgruppe von Mirkin und Letsinger entwickelt. Sie nutzten die Farbänderung von Gold-Nanopartikel markierter DNA zur Beobachtung der Hybridisierung in Lösung.<sup>[65]</sup> Nach einer Silberverstärkung konnte diese Technik auch benutzt werden, um Bindungsereignisse an kombinatorischen DNA-Arrays mittels eines herkömmlichen Flachbettscanners auszulesen.<sup>[66]</sup>

Aufbauend auf diese Arbeiten wurde hier ein neues Verfahren zur Detektion spezifischer molekularer Bindungen auf Grundlage optischer Visualisierung von Gold-Nanopartikel markierten DNA-Molekülen auf mikrostrukturierten Glassubstraten entwickelt.<sup>[121]</sup>

Der Nachweis von Hybridisierungsereignissen durch die Markierung mit Nanopartikeln erwies sich als sehr empfindliche Methode. Mit diesem Verfahren konnten auch DNA-DNA-Wechselwirkungen an Oberflächen mit sehr geringer DNA-Dichte durch AFM ausgelesen werden, bei denen durch eine Fluoreszenzmarkierung keine Signale mehr erhalten wurden. Das Hintergrundsignal ist durch die geringe Neigung zu unspezifischen Bindungen (z. B. DNA-DNA-Fehlpaarung oder Adsorption an Oberflächen) im Vergleich zum hohen spezifischen Signal klein.

Bei Anbindung der Goldpartikel an die Oberfläche sind vermutlich mehrere DNA-Moleküle beteiligt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch nicht untersucht, wie viele Moleküle an der Oberfläche zur Hybridisierung eines Gold-Nanopartikels nötig sind.

Die Verringerung der DNA-Konzentration auf der Oberflächen war mit einer Abnahme der Partikeldichte verbunden. Quantitative Aussagen zur Anzahl der DNA-Moleküle auf der Oberfläche wurden hier mit dieser Methode nicht getroffen. Sie sind Untersuchungsgegenstand einer anderen Arbeit.

Bei hohen DNA-Dichten auf den Oberflächen führt die Hybridisierung mit Gold-Nanopartikel markierter komplementärer DNA zu einem dicht gepackten Goldkolloid-Film auf der Oberfläche.

Die Reflexion des Partikelfilms ist vergleichbar mit der von gesputterten Goldschichten. Im Durchlicht erscheinen die Kolloidschichten leicht bläulich. Dieses Verhalten deutet darauf hin, dass die Partikel in engem Kontakt zueinander sind.<sup>[122]</sup> Bei geringen Partikeldichten und großen Abständen der Partikel zueinander ist das scharfe Oberflächen Plasmonen Resonanz Band bei 520-530 nm mit einer Absorption von grünem Licht verbunden. Die Kolloide erscheinen dann in der Transmission rot, weil praktisch keine Licht mit Wellenlängen >600 nm absorbiert wird. Die schwache Transmission von blauem Licht zwischen 400 und 500 nm wird dabei durch die starke rote Transmission überdeckt. Bei höheren Partikeldichten und geringeren Abständen der Partikel zueinander kommt es wegen Oberflächen Plasmonen Kopplungen zu einer Bandverbreiterung und höheren Absorption von rotem Licht. Die jetzt etwa gleiche Transmission von blau und rot führt zu einer violetten Farbwahrnehmung. Bei sehr starken Kopplungen absorbiert das Plasmonen Band alle Wellenlängen über 550 nm und die beobachtete Transmission ist blau. Die starke Absorption von rot und grün ist gleichzeitig mit einer starken Reflexion der entsprechenden Wellenlängen verbunden, wodurch die Kolloidschicht die metallische Farbe des Goldes erhält.<sup>[122]</sup>

Im Vergleich zur herkömmlichen Fluoreszenzdetektion zeigt die Markierung mit Gold-Nanopartikeln in der DNA-Chiptechnologie eine Reihe von Vorteilen.

Die Nanopartikel erlauben einen einfachen optischen Nachweis in Reflexion und/oder Transmission.<sup>[66,121]</sup>

Dabei wird nur ein einfaches Lichtmikroskop mit einer Weißlichtquelle benötigt. Selbst für kleine DNA-Spots (4  $\mu\text{m}$ ) braucht man nur sehr kurze Belichtungszeiten.<sup>[123]</sup> Die langfristige Stabilität erlaubt zudem Wiederholungsmessungen und Aufnahmen mit hoher Lichtintensität ohne Beeinträchtigung des Signals und gewährleistet eine Archivierung der Proben.

Durch die Nutzung der Goldpartikelmarkierung konnte ein Affinitätssensor zum Nachweis biologischer und chemischer Spezies entwickelt werden, der insbesondere für Aufgaben in der kombinatorischen Chemie, für diagnostische Aufgaben, wie etwa in der Medizin oder zur Entwicklung neuer Wirkstoffe, z. B. für Medikamente oder selektiv wirkende Pflanzenschutzmittel, Verwendung finden kann.<sup>[124]</sup>

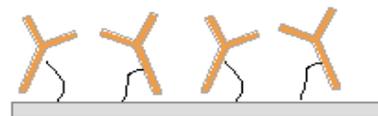
### 3.4 Proteinnanbindung an mikrostrukturierte monomolekulare Amino-oberflächen

In den letzten Jahren wurde die Wirkstoffsuche in der klinischen und pharmazeutischen Industrie durch die Anwendung von miniaturisierten Bioassays revolutioniert.<sup>[125-130]</sup> Der Immunoassay ist durch seine hohe Spezifität eine der bedeutendsten analytischen Methoden bei biochemischen Untersuchungen und in der klinischen Diagnose. Die herkömmlichen immunologischen Nachweismethoden erfordern jedoch lange Analysezeiten und teure Reagenzien in relativ großer Menge. Dieser Nachteil konnte durch die Miniaturisierung und die Integration der Immunoassays auf mikrostrukturierte Chipoberflächen umgangen werden.

Zur Testung eines miniaturisierten Immunoassays wurden zunächst FITC-markierte anti-Maus IgM über die Aldehydgruppe der oxidierten Kohlenhydratseitenkette kovalent und gerichtet an mikrostrukturierte Aminooberflächen gebunden. Mit dieser Methode wurde verhindert, dass die Antigen-bindende Region der Proteine blockiert wird.<sup>[73]</sup> Es konnten somit mehr freie Bindestellen für die Antigenerkennung auf den Oberflächen bereitgestellt werden als es z. B. bei einer Anbindung über die Aminogruppen der Lysinseitenketten,<sup>[70,71]</sup> über die Carboxylenden der Peptidketten oder durch Reduktion der Disulfidbrücken möglich ist, bei der die Antikörper zufällig auf der Oberfläche orientiert sind (Abb. 52 und Abb. 53).



**Abb. 52:** Ungerichtete Anbindung der Proteine

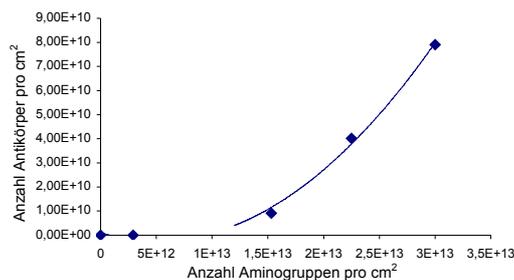


**Abb. 53:** Gerichtete Anbindung der Proteine

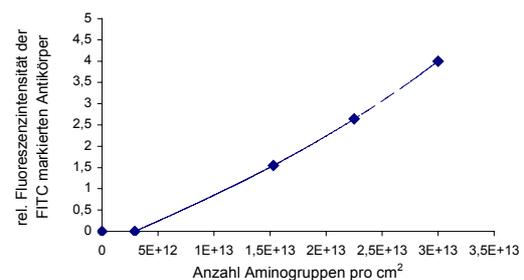
Die größte Proteindichte wurde bei dieser Anbindungsmethode erst bei der höchsten Zahl der Aminogruppen auf der Oberfläche erreicht (Abb. 54). Unerwarteter Weise konnte kein Sättigungsverlauf dieser Funktion festgestellt werden, wie bei der Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität der FITC-markierten Antikörper von der molaren Aminogruppendichte (Abb. 42). Die Anzahl der kovalent gebundenen Antikörper fällt nahezu linear mit der zahlenmäßigen Verringerung der Aminogruppen ab und nähert sich schließlich allmählich dem Wert Null. Ebenso steigt die relative Fluoreszenz der gebundenen Antikörper mit der Anzahl der Aminogruppen auf der

Oberfläche linear an (Abb. 55). Der leicht sigmoidale Kurvenverlauf der beiden Abbildungen resultiert aus der zugrunde gelegten polynomischen Ausgleichsfunktion. Messtechnisch war der untere Konzentrationsbereich durch fluoreszenzmikroskopische Detektion nicht mehr erfassbar, so dass keine Aussagen über den wahren Kurvenverlauf in diesem Bereich getroffen werden können.

Für den linearen Verlauf der Funktion spricht, dass die Anzahl der Proteine auf der Oberfläche anscheinend kinetisch durch die geringe Konzentration an FITC-markierten Antikörpern in den Antikörperstammlösungen begrenzt wurde. Das beobachtete Sättigungsverhalten der relativen Fluoreszenzintensität in Abb. 42 resultierte aus der Art der graphischen Darstellung der Aminogruppendichte über die relative molare Zusammensetzung der Oberfläche. Die Proteindichte auf den Oberflächen kann somit noch durch eine Erhöhung der Antikörperkonzentration bei der kovalenten Anbindung gesteigert werden.



**Abb. 54:** Anzahl der kovalent gebundenen Antikörper an Amino-oberflächen in Abhängigkeit von der Aminogruppendichte

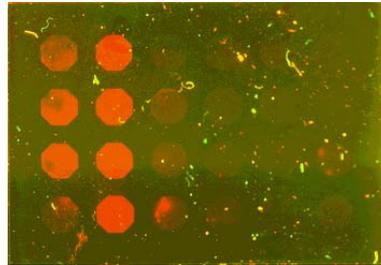


**Abb. 55:** Relative Fluoreszenzintensität der kovalent gebundenen Antikörper in Abhängigkeit von der Aminogruppendichte

Der Erhalt der biologischen Aktivität der kovalent angebotenen Antikörper an der Oberfläche konnte durch Ankopplung eines fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers sowie durch den Aufbau eines primärer Antikörper – Antigen – sekundärer Antikörper-Komplexes gezeigt werden.<sup>[131]</sup>

Es konnte nachgewiesen werden, dass sich der hier vorgestellte miniaturisierte Chipaufbau zum immunologischen Nachweis von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen bei biochemischen Untersuchungen und in der klinischen Diagnose eignet. Der Immunoassay auf den mikrostrukturierten Oberflächen wurde erfolgreich

bei der serologischen Bestimmung von *Salmonella* Isolaten eingesetzt und mit einem Chipreader ausgelesen (Abb. 56).<sup>[132]</sup>



**Abb. 56:** Positive und negative Immunreaktionen auf einem Immunochip-Array zur Bestimmung verschiedener Antigene von *Salmonella Choleraesuis*

#### 4 Adsorption

Die Adsorption von Farbstoffen in Lösungen an Festkörperoberflächen wurde bisher von vielen Arbeitsgruppen untersucht.<sup>[46,47,49-52,54,133-139]</sup> Eine Vielzahl der Arbeiten auf diesem Gebiet beschäftigte sich mit der Adsorption von Farbstoffen an Membranfiltern,<sup>[140]</sup> oxidischen Nanopartikeln,<sup>[48,141]</sup> Polymeren<sup>[51,142]</sup> oder von ganzen Zellen<sup>[143-145]</sup> und Biomolekülen wie zum Beispiel DNA<sup>[133,146]</sup> und Proteinen<sup>[147-151]</sup> an Oberflächen.

Farbstoffe wurden unter anderem benutzt, um die Polarität von organischen und anorganischen Oberflächen zu bestimmen<sup>[49,52]</sup> oder wurden an Self Assembled Silanmonolayer adsorbiert.<sup>[47,152]</sup>

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde das Adsorptionsverhalten von Fluoreszenzfarbstoffen in Lösung an mikrostrukturierte monomolekulare Oberflächen untersucht. Dabei sollten die von Rosen<sup>[153]</sup> klassifizierten Adsorptionsmechanismen<sup>c</sup> unter dem wesentlichen Einfluss von Lösungs- und Spülmittel-Kombination und Oberflächeneigenschaft auch zur bevorzugten Adsorption der Fluoreszenzfarbstoffe an mikrostrukturierte Oberflächen führen.

---

<sup>c</sup> Anm.: Rosen klassifizierte die Adsorptionsmechanismen von ionischen und nichtionischen Tensiden und nicht von Farbstoffen. Einige der Mechanismen sollten aber auch für die Adsorption von Fluoreszenzfarbstoffen aus verdünnten Farbstofflösungen gültig sein.

---

Insbesondere sollte das gelten für:

- Ionenpaarbildung – Adsorption von ionischen Farbstoffmolekülen an freie Stellen der entgegengesetzt geladenen Oberfläche, die nicht von Gegenionen besetzt sind
- Wasserstoffbrückenbindungen
- Polarisierung von  $\pi$ -Elektronen – durch attraktive Wechselwirkungen zwischen elektronenreichen Farbstoffmolekülen und positiv geladenen Oberflächen
- attraktive Wechselwirkung von van der Waals Dispersionskräften
- Adsorption durch hydrophobe Wechselwirkungen

Im Unterschied zur Gasadsorption ist die feste Oberfläche bei der Adsorption eines flüssigen Mehrkomponentensystems immer vollständig belegt.<sup>[58]</sup> Die bevorzugte Adsorption der Fluoreszenzfarbstoffe an den mikrostrukturierten Oberflächen machte sich deshalb erst durch die Verdrängung der Farbstoffe durch das Lösungs- bzw. Spülmedium bemerkbar. Besonders ausgeprägt zeigte dieses Verhalten beim Fluorescein, das sich in sowohl in polaren als auch unpolaren Lösungsmittel durch unpolare Spülmedien von den hydrophoben unpolaren Oberflächen verdrängen ließ, polare verdrängten es hingegen von den hydrophilen polaren Oberflächen. Das hier beobachtete bevorzugte Adsorptionsverhalten von Fluorescein, scheint durch das Zusammenspiel der Polaritäten des Farbstoffes, des Spülmediums und der mikrostrukturierten Oberflächen bestimmt zu sein. Dieses Verhalten entspricht in etwa dem erwarteten aus der Adsorptionschromatographie, bei der ein adsorbierter Stoff durch ein Lösungsmittel vom Adsorbens verdrängt wird, wenn dieses eine höhere Affinität zum Adsorbens aufweist (elutrope Reihe).

Eine solche ausgeprägte Tendenz von der Abhängigkeit der Adsorption vom Spülmedium wurde bei den Farbstoffen Rhodamin B, BJ 36, CZ 71 und DCM nicht mehr beobachtet. Im Unterschied zum Fluorescein konnten sie nicht auf den polaren Hydroxyoberflächen adsorbiert werden, sondern fanden sich nur auf den unpolaren Perfluoralkyloberflächen. Elektrostatische Wechselwirkungen der Kationen Rhodamin B und CZ 71 oder polare Wechselwirkungen der hydrophilen Gruppen aller Moleküle mit den OH-Gruppen der Hydroxyoberflächen scheinen sich hier nicht, dominierend auf eine Adsorption an den polaren Oberflächen auszuwirken. Die Adsorption an die Perfluoralkyloberflächen spricht eher für Wechselwirkungen der

hydrophoben Oberfläche mit den hydrophoben Gruppen der Moleküle durch schwache van der Waals Kräfte. Die wahrscheinlichen hydrophoben Wechselwirkungen konnten im Fall von Rhodamin B und DCM aber nicht durch den Einsatz des unpolaren Cyclohexans als Spülmittel gebrochen werden.

Mit Verwendung der ähnlichen Benzopyrylium-Farbstoffe BJ 36 und CZ 83 sowie des Benzopyranderivates Coumarin 6 und des Phenoxazins Nile Blue A konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse bei den Adsorptionsversuchen erzielt werden.

Der anionische Farbstoff Na-Fluorescein sowie das kationische Oxazin 170 besitzt eine starke Neigung zu den hydrophilen Oberflächen. Gleichzeitig wurde aber auch eine schwache Adsorption auf den hydrophoben Octadecyl- und Perfluoralkyloberflächen beobachtet. Starke elektrostatische und polare Wechselwirkungen scheinen der Adsorption auf den polaren Oberflächen den Vorrang, vor den unpolaren Oberflächen mit hydrophoben oder van der Waals Wechselwirkungen zu geben. Das anionische Na-Fluorescein hatte zudem eine hohe Affinität zu den  $\text{NH}_2$ - und den protonierten Aminooberflächen. Dafür könnte im Gegensatz zum kationischen Oxazin zusätzlich zu den elektrostatischen auch ionische Wechselwirkungen des elektronenreichen Farbstoffmoleküls mit der protonierten Aminooberfläche verantwortlich sein.

Bei der Betrachtung der Adsorptionsisotherme, die durch die Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität von der Konzentration resultiert, fällt die leicht sigmoidale Form und schwache Ausbildung einer Stufe auf. Die Adsorptionsisotherme folgt demnach nicht streng der Langmuir-Isotherme, sondern ist mit einer kleinen Abweichung vom Langmuir-Verhalten verbunden. Der Anstieg der Funktion wird über einen kleinen Konzentrationsbereich immer steiler. Das bedeutet, dass bei der Adsorption anfangs neu ankommende Moleküle um so leichter einen Adsorptionsplatz finden, je mehr Moleküle schon adsorbiert sind, oder dass sie um so fester gehalten werden bzw. die Bindungsenergie steigt, je mehr Moleküle schon da sind. Bei einem ausgeprägten sigmoidalen Verlauf der Isotherme spricht man vom sogenannten S-Typ der Adsorptionsisotherme<sup>d</sup>. Dieser kann durch die starke Konkurrenz der Lösungsmittelmoleküle begründet werden.<sup>[58]</sup> Dabei kann es z. B. durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu einer kooperativen Adsorption und besonderen

---

<sup>d</sup> Anm.: Die in der Literatur als S-Typ beschriebenen Isothermen sind durch einen deutlichen sigmoidalen Verlauf gekennzeichnet, der viel stärker ausgeprägt ist, als die hier experimentell erhaltenen Isothermen. Nach Giles et al. kann man die Adsorptionsisothermen in 4 Klassen mit bis zu 5 Untergruppen einteilen.<sup>[160]</sup> Eine Übersicht dazu findet sich bei M. J. Schwuger.<sup>[58]</sup>

Affinität zwischen den polaren Gruppen der Oberfläche und der Farbstoffmoleküle kommen. Die Ausbildung der schwachen Stufe kann möglicherweise auf die Ausrichtung der bereits adsorbierten Moleküle aus einer flachen in eine senkrechte Lage zurückgeführt werden.<sup>[154]</sup> Zu Beginn adsorbieren die Moleküle bis zum Erreichen des Plateaus flach aufliegend an der Oberfläche. Bei weiter steigender Konzentration beginnen sich die Moleküle aufzurichten. Das ist wieder mit einem steiler werdenden Anstieg der Funktion verbunden. Gleichzeitig kann auch hier wieder eine kooperative Adsorption durch die Ausbildung von Aggregaten mit gleichmäßig hintereinander gestaffelten und miteinander in Wechselwirkung tretenden  $\pi$ -Systemen eintreten.

Die Ausbildung einer stufenförmigen Adsorptionsisotherme kann allerdings auch ein Hinweis auf eine Mehrschichtadsorption sein. Die zweite Schicht ist dabei in der Regel nur über schwache Wechselwirkungen gebunden und kann deshalb durch Desorption leicht wieder entfernt werden,<sup>[58]</sup> so dass sich hier eine Polyadsorbatschicht nach dem der Adsorption gefolgt Spülprozess nicht mehr bemerkbar machen sollte. Bei einer Mehrschichtadsorption ist die ausgebildete Stufe in der Regel viel ausgeprägter als im hier vorliegenden Fall.<sup>[20,58]</sup> Zudem zeigten auch AFM-Aufnahmen keine Hinweise auf das Vorliegen einer Polyadsorbatschicht.

Weiterhin soll hier angemerkt werden, dass auch die mögliche Ausbildung von dimeren Molekülanordnungen der Farbstoffe in Lösung einen Einfluss auf den Verlauf der Adsorptionsisotherme haben kann. Mit den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Methoden konnten jedoch die vorangestellten Vermutungen nicht untersucht werden. Wegen der Vielfalt der möglichen Variablen ist es daher schwierig, eine kompakte Beschreibung der Adsorption der Fluoreszenzfarbstoffe an der flüssig/festen Grenzfläche zu geben.

Aufgrund des nur leicht sigmoidalen Verlaufs der Adsorptionsisotherme schien es vertretbar, die experimentellen Daten nach der Langmuir-Isotherme auszuwerten.

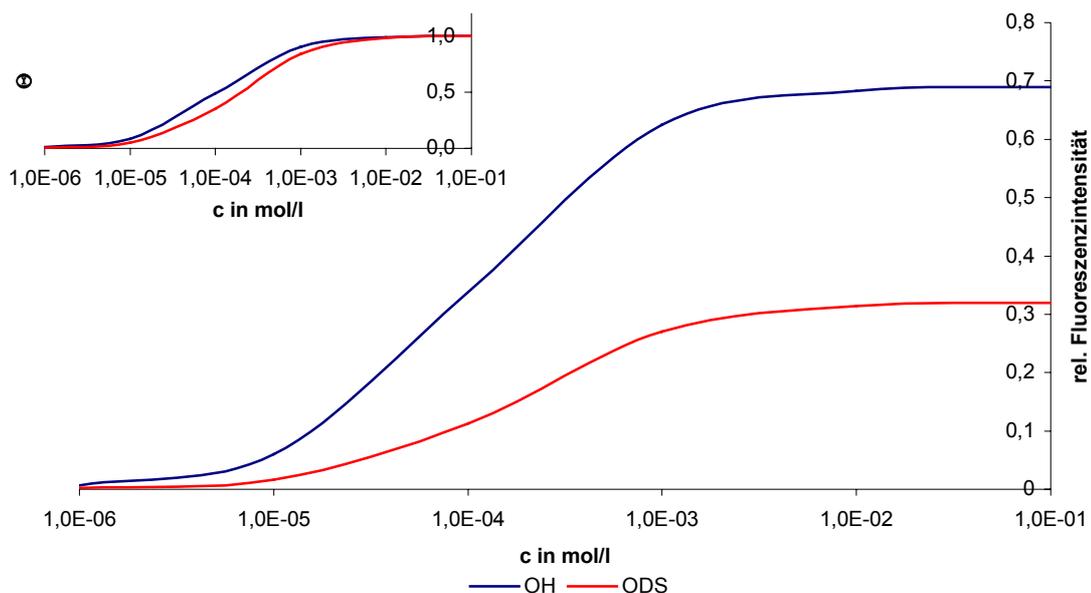
Die zum Teil sehr hohen Werte der Adsorptionskonstanten  $K$  zeigen ebenso wie die starken Anstiege der Adsorptionsisothermen in den kleinen Konzentrationsbereichen die hohe Affinität der Fluoreszenzfarbstoffe zu den monomolekularen Filmen. Dennoch scheinen die ermittelten Adsorptionskonstanten, vermeintlich im Gegensatz zu den beobachteten Adsorptionsverhalten zu stehen. So haben sie z. B. für die Adsorption von Na-Fluorescein an die Octadecyl- und Perfluorocetyloberflächen höhere Werte als für die OH-Oberflächen, obwohl eine Adsorption bevorzugt an den Hydroxyloberflächen beobachtet wurde. Die Werte für  $F_{\infty}$  bestätigen jedoch die Beobachtungen. Das gleiche

Verhalten zeigt sich auch bei den anderen Farbstoffen. Durch die logarithmische Darstellung der Langmuir-Isotherme wird dieses Verhalten interpretierbar. Der Verlauf der Funktion aus Gl. 4-1 zeigt in Übereinstimmung mit der Langmuir-Isotherme (Gl. 4-2), dass bei der Annäherung an die maximale Besetzung mit  $\Theta = 1$  bei höher werdenden Werten von  $K$  die notwendige Konzentration  $c$  kleiner wird.

$$\Theta = \frac{F}{F_{\infty}} = f(c) \quad \text{Gl. 4-1}$$

$$\Theta = \frac{Kc}{1 + Kc} \quad \text{Gl. 4-2}$$

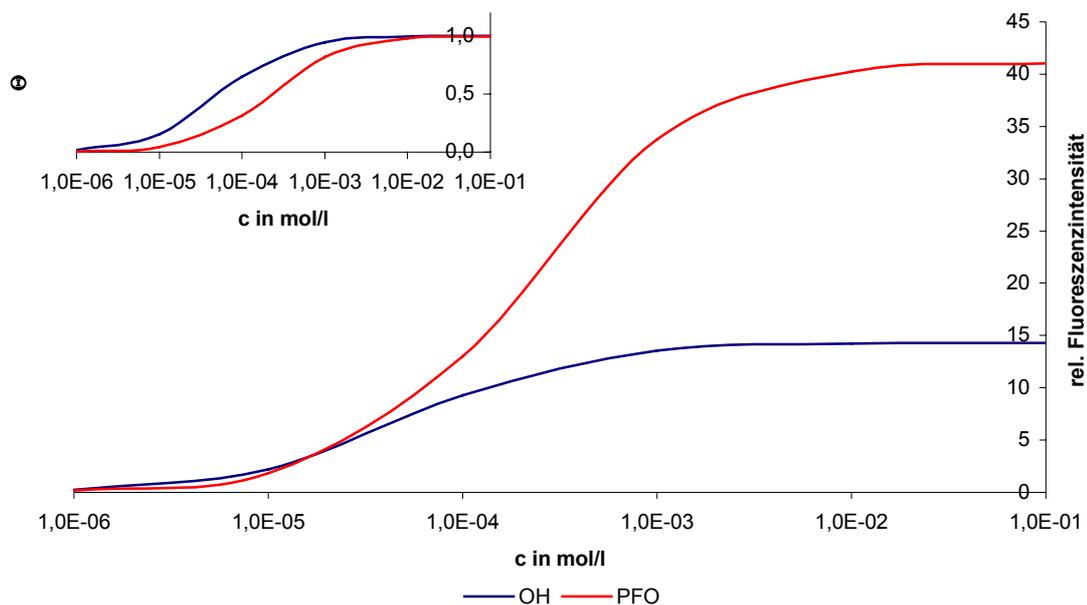
Am Beispiel der Adsorption Oxazin 170 wird deutlich, dass das präferentielle Adsorptionsverhalten des Farbstoffes an den verschiedenen monomolekularen Oberflächen nicht von der Adsorptionskonstante bestimmt wird. Die Adsorptionskonstanten sind für die Adsorption an die Octadecylsilan- und Hydroxyoberflächen annähernd gleich. Das fluoreszenzmikroskopisch beobachtete Adsorptionsverhalten ist vielmehr Ausdruck der relativen Fluoreszenzintensität des Farbstoffes an der Oberfläche (Abb. 57).



**Abb. 57:** Logarithmische Darstellung der Langmuirschen Adsorptionsisotherme für die Adsorption von Oxazin 170 an monomolekulare Octadecyl- und OH-Oberflächen

Unter der Voraussetzung, dass die Fluoreszenz nicht durch den Einfluss der Oberflächen oder der Moleküle untereinander gelöscht wird, scheinen den Farbstoffen, je nach Oberfläche eine unterschiedliche Anzahl von Adsorptionsplätzen zur Verfügung zu stehen. Diese Beobachtung spricht für die vorangestellten Vermutungen bei der Diskussion der leicht sigmoidalen Form der experimentell gefundenen Adsorptionsisotherme. Es lässt sich vermuten, dass die Farbstoffmoleküle an der Octadecyloberfläche durch dominierende hydrophobe Wechselwirkungskräfte flach aufliegend adsorbiert sind, während sie an der Hydroxyloberfläche durch die Wechselwirkung der polaren Molekülanteile mit den OH-Gruppen aufgerichtet werden. Durch den geringeren Flächenbedarf in der aufrechten Position können mehr Moleküle an der Oberfläche gebunden werden als in der flach aufliegenden Position, wodurch die Fluoreszenzintensität erhöht wird.

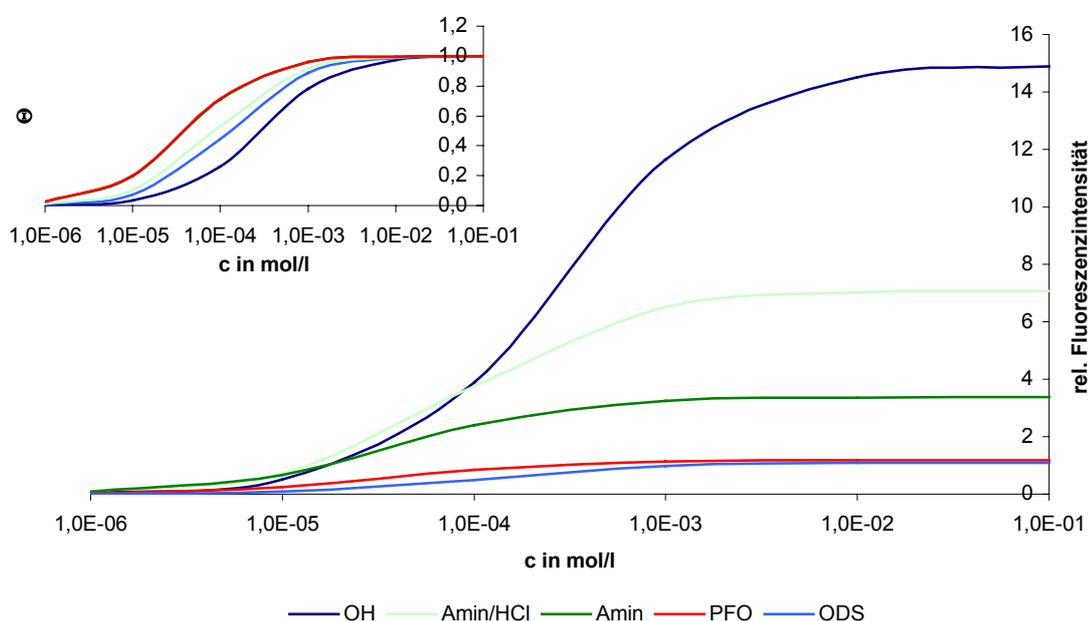
Ein ähnliches, allerdings umgekehrtes Verhalten, wird bei der Adsorption von Rhodamin B an Perfluorooctyl- und OH-Oberflächen (Abb. 58) beobachtet.



**Abb. 58:** Logarithmische Darstellung der Langmuirschen Adsorptionsisotherme für die Adsorption von Rhodamin B an monomolekulare Perfluorooctyl- und OH-Oberflächen

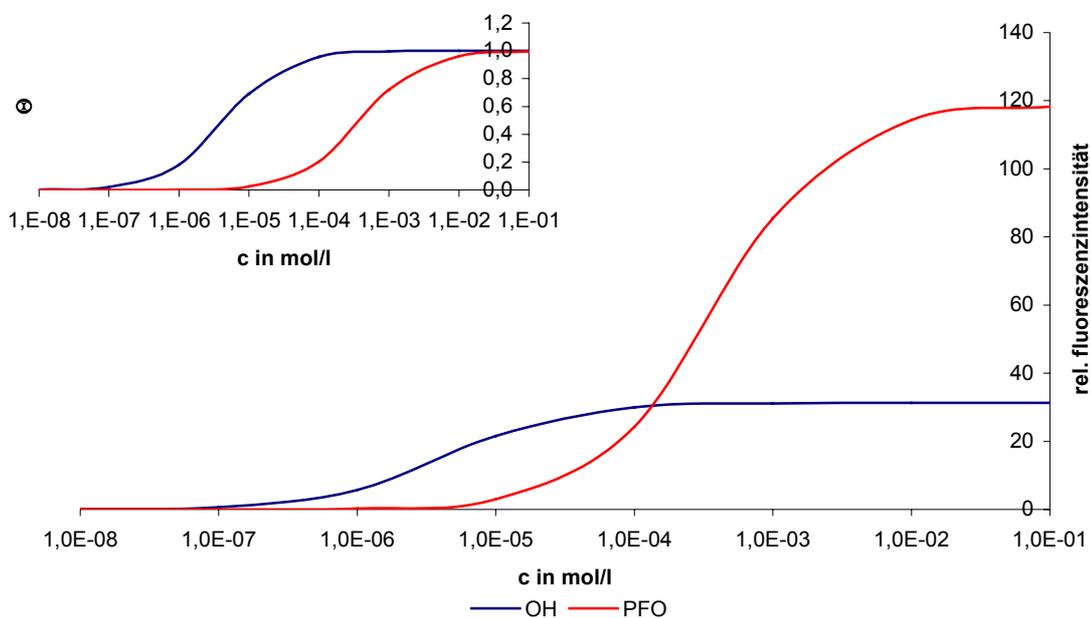
Die Adsorptionskonstanten  $K$  für die Adsorption von Na-Fluorescein weisen für bestimmte Oberflächenkombinationen schon höhere Unterschiede als in den vorangegangenen Beispielen auf. Das fluoreszenzmikroskopisch beobachtbare

Adsorptionsverhalten wird daher zunehmend auch durch den Einfluss von  $K$  bestimmt. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen an den Oberflächenkombinationen OH/PFO, OH/ODS, ODS/NH<sub>2</sub> bzw. ODS/NH<sub>3</sub><sup>+</sup> wurde die Adsorption von Na-Fluorescein stets bevorzugt an den polaren Oberflächen beobachtet. Der Einfluss der Adsorptionskonstante war durch die große Differenz der relativen Fluoreszenzintensität bei  $\Theta = 1$  auf den gewählten Oberflächenkombinationen noch nicht bemerkbar (Abb. 59). Wählt man jedoch die Oberflächenkombination NH<sub>3</sub><sup>+</sup>/OH zur Adsorption von Na-Fluorescein, wird der Unterschied zwischen den Adsorptionskonstanten für die beiden Oberflächen größer und die Differenz der relativen Fluoreszenzintensität bei  $\Theta = 1$  kleiner. Die beiden Isothermen haben einen gemeinsamen Schnittpunkt bei einer Farbstoffkonzentration von etwa 10<sup>-4</sup> mol/l. Das bedeutet, bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung würde man für eine Farbstoffkonzentration >10<sup>-4</sup> mol/l die bevorzugte Adsorption von Na-Fluorescein an den OH-Oberflächen beobachten. Bei Konzentrationen <10<sup>-4</sup> mol/l adsorbiert Na-Fluorescein bevorzugt an der NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-Oberfläche.



**Abb. 59:** Logarithmische Darstellung der Langmuirschen Adsorptionsisotherme für die Adsorption von Na-Fluorescein an monomolekulare Octadecyl-, Perfluorooctyl-, NH<sub>2</sub>-, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>- und OH-Oberflächen

Noch viel ausgeprägter als beim Na-Fluorescein zeigte sich dieses Verhalten bei der Adsorption von Cy 3 an OH- und Perfluoroctyloberflächen. Die Adsorptionskonstanten des Farbstoffes an den beiden Oberflächen unterscheiden sich um mehr als eine Größenordnung. Die relative Fluoreszenzintensität ist für die Perfluoroctyloberfläche bei  $\Theta = 1$  mehr als doppelt so hoch als für die OH-Oberfläche. Bei den Adsorptionsexperimenten wurde deshalb im Fluoreszenzmikroskop eine konzentrationsabhängige Kontrastumkehr beobachtet. Bis zu einer Konzentration von etwa  $10^{-4}$  mol/l adsorbierte Cy 3 bevorzugt an den OH-Oberflächen, bei höheren Konzentrationen an den Perfluoroctyloberflächen (Abb. 60).



**Abb. 60:** Logarithmische Darstellung der Langmuirschen Adsorptionsisotherme für die Adsorption von Cy 3 an monomolekulare Perfluoroctyl- und OH-Oberflächen

Die bei den Adsorptionsexperimenten erlangten Ergebnisse lassen sich bei Charakterisierung von Oberflächen anwenden. Die Fluoreszenzfarbstoffe adsorbieren aus der flüssigen Phase selektiv an Oberflächen. Die Affinität der Farbstoffe lässt sich dabei durch die Wahl der Lösungs- und Spülmedien beeinflussen. Die hier vorgestellten Methoden eignen sich zum zerstörungsfreien Charakterisieren chemisch mikrostrukturierter Oberflächen. Durch einfache Spülprozesse ist eine schnelle Desorption möglich, da die Farbstoffe an den Oberflächen nichtkovalent binden. Die Oberflächen sind daher weiteren Prozessen und chemischen Modifizierungen

zugänglich, so dass die durch Adsorption von Fluoreszenzfarbstoffen eine schnelle Prozesskontrolle und Qualitätsüberwachung von Oberflächen möglich ist.

Bei der Herstellung von DNA- und Protein-Chips wurde die hier erarbeitete Methode regelmäßig zur Oberflächen- und Prozesskontrolle der mikrostrukturierten monomolekularen Schichten eingesetzt.

## Zusammenfassung

Für die Anwendung in Protein- und DNA-Chips wurden im Rahmen dieser Arbeit lateral mikrostrukturierte molekulare Monofilme auf Glas- und Siliciumoberflächen untersucht. Dazu wurden mit literaturbekannten Self Assembly Techniken Octadecyl- und Perfluoroctylsilan-Monolagen auf den Glas- und Siliciumsubstraten erzeugt. Die Bildung der SAMs wurden dabei durch eigene Methoden ergänzt und optimiert. So wurde festgestellt, dass eine hohe Konzentration von Hydroxylgruppen auf den Substratoberflächen eine Voraussetzung für die Ausbildung von dichten hydrophoben Monoschichten bei der Anbindung der Silane ist. Durch Kontaktwinkelmessungen und Bestimmung der molaren Freien Oberflächenspannungen konnte gezeigt werden, dass die hier eingesetzten Sauerstoffplasma-Ätzverfahren bei der Generierung von OH-Gruppen auf den Glas- und Siliciumoberflächen als viel effektiver sind, als die in der Literatur beschriebenen nasschemischen Verfahren. Der notwendige Feuchtigkeitsgehalt bei der Silanisierung, der zur Ausbildung eines zweidimensionalen Polysiloxan-Netzwerkes führt, konnte dabei auf einfacher Weise durch den Eintrag von adsorbierten Wasser an den Oberflächen kontrolliert werden. Mit dieser Methode werden homogenere, dichtere und hydrophobere monomolekulare Alkyl- und Perfluoralkylschichten erzeugt. Durch Randwinkelmessungen, Bestimmung der molaren Freien Oberflächenenergie und insbesondere durch AFM-Messungen und Ellipsometrie wurde die Homogenität der Monofilme nachgewiesen.

Für die Herstellung von Bio-Chips wurden die hydrophoben Monolagen mikrostrukturiert und hydrophile OH-Spots auf den Oberflächen erzeugt. Dabei wurden im Rahmen dieser Arbeit Haftvermittlersysteme aus dünnen Polymethylmethacrylat- und Gelatinefilmen entwickelt, die ein sicheres Anhaften des Photolacks auf den hydrophoben Monoschichten während des lithographischen Prozesses gewährleisten.

Bei den Untersuchungen zur selektiven Adsorption von Fluoreszenzfarbstoffen an die mikrostrukturierten Oberflächen konnte ein Verfahren zur schnellen Prozesskontrolle und Qualitätsüberwachung bei der Herstellung von chemisch modifizierten und mikrostrukturierten Monoschichten erarbeitet werden. Dabei wurden die nichtkovalenten Wechselwirkungen der Farbstoffe, wie zum Beispiel Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und van der Waals Dispersionskräfte, elektrostatische Wechselwirkungen und Ionenpaarbildung mit den chemisch unterschiedlichen Oberflächen genutzt, um die Farbstoffe bevorzugt zu

adsorbieren. Die Affinität der Fluoreszenzfarbstoffe zu den mikrostrukturierten Monolagen ließ sich dabei durch die Wahl der Lösungs- und Spülmedien selektiv beeinflussen, die Bindekonstanten der Farbstoffe liegen im Bereich von  $10^3 - 10^5$ .

Zur quantitativen Bestimmung von Bindegruppendichten und Besetzungsdichten von funktionellen Gruppen und Biomolekülen auf Oberflächen wird hier ein neuer Fluoreszenzstandard für die Fluoreszenzmikroskopie vorgestellt. Dieser Fluoreszenzstandard basiert auf einem mikrosystemtechnisch hergestellten dünnen Polyvinylalkoholfilm auf Glas mit einer definierten Anzahl von eingebetteten Fluoresceinmolekülen. Durch den Einsatz des Fluoreszenzstandards wurde die Anzahl der Aminogruppen und Biomoleküle in den monomolekularen Oberflächenschichten der Bio-Chips quantitativ ermittelt und durch den Vergleich mit Literaturangaben bestätigt.

Zur Herstellung von Aminooberflächen wird hier ein neuer Weg über die Ringöffnungsreaktion von Epoxy-modifizierten Oberflächen beschrieben. Im Gegensatz zur weit verbreiteten APTES-Methode, konnten über diesen Syntheseweg monomolekulare Aminooberflächen erhalten werden. Die Aminogruppendichte wurde auf Glasoberflächen mit etwa  $3 \cdot 10^{13} \text{ cm}^{-2}$  und auf Siliciumoberflächen mit etwa  $2 \cdot 10^{12} \text{ cm}^{-2}$  bestimmt. Mit der hier beschriebenen Methode konnte die Aminogruppendichte auf den Glas- und Siliciumoberflächen gezielt eingestellt werden.

Die Aminospots dienen zum Aufbau eines Immunoassays auf den mikrostrukturierten Oberflächen. Antikörper wurden kovalent und gerichtet an die Aminospots angekoppelt. Durch die gerichtete Anbindung konnten für die Antigenerkennung mehr freie Bindestellen auf den Oberflächen zur Verfügung gestellt werden, als durch die bekannten alternativen Methoden der ungerichteten Anbindung der Antikörper. Über die Anzahl der bei der Antikörperanbindung zur Verfügung stehenden Aminobindegruppen wurde die Antikörperdichte auf den Oberflächen arrangiert und betrug bis zu  $7,9 \cdot 10^{10} \text{ Antikörper/cm}^2$ . Der Erhalt der biologischen Aktivität der angekoppelten Antikörper wurde durch den Aufbau eines primärer Antikörper – Antigen – sekundärer Antikörper-Komplexes bestätigt. In diesem Zusammenhang konnte am Beispiel der serologischen Differenzierung von *Salmonella* Isolaten gezeigt werden, dass sich der hier vorgestellte miniaturisierte Chipaufbau zum immunologischen Nachweis von Antigen-Antikörper-Interaktionen eignet.

Durch eine basenweise *onchip*-Synthese an Ethylenglycol-Bindespots, die nach einer abgewandelten Literaturvorschrift an den monomolekularen Epoxy-modifizierten

Oberflächen synthetisiert wurden, konnten einzelsträngige Oligonucleotide mit bis zu 52 Basen aufgebaut werden. Die DNA-Dichte wurde über die Kontrolle der Ethylenglycol-Bindegruppendichte eingestellt und durch Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierter komplementärer DNA bestimmt. Dabei wurde eine maximale Beladung von etwa  $1,8 \cdot 10^{11}$  doppelsträngigen DNA-Molekülen/cm<sup>2</sup> erreicht.

Im Rahmen der Arbeiten zu den DNA-Arrays wurde ein neues Verfahren zur Detektion spezifischer molekularer Bindungen auf der Grundlage der optischen Visualisierung von Gold-Nanopartikel markierten DNA-Molekülen auf mikrostrukturierten monomolekularen Oberflächen entwickelt. Die Bindungsereignisse werden dabei einfach in der optischen Reflexion oder der Transmission von sichtbarem Licht nachgewiesen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Nanopartikelmarkierung der DNA eine höchst empfindliche Methode zum Nachweis von Hybridisierungsereignissen bei sehr geringer DNA-Dichte auf den Oberflächen ist. Der Nachweis der Hybridisierung auf den Oberflächen wurde dabei durch AFM-Messungen bestätigt.

# Anhang

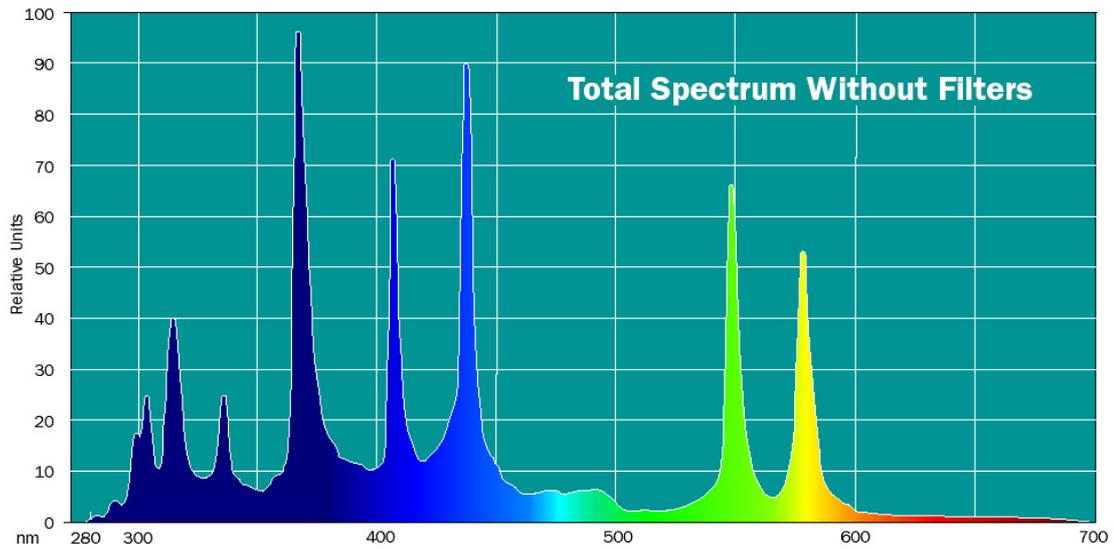


Abb. 61: Lampenspektrum der Lumatec SUV-DC-E

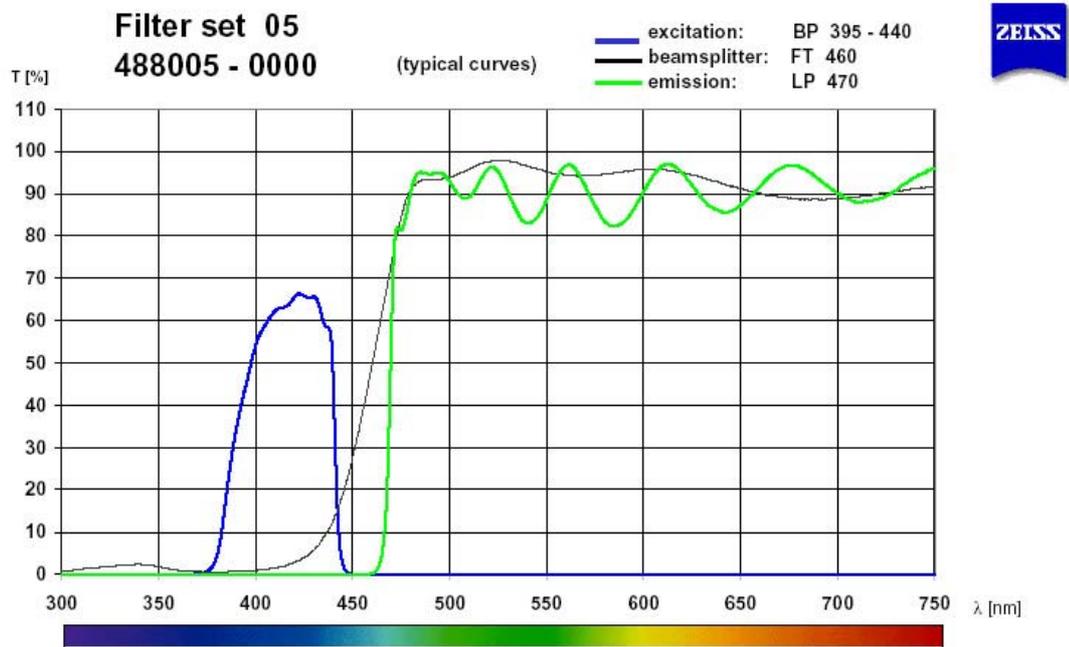


Abb. 62: Kennlinie Zeiss-Filtersystem 395 – 440

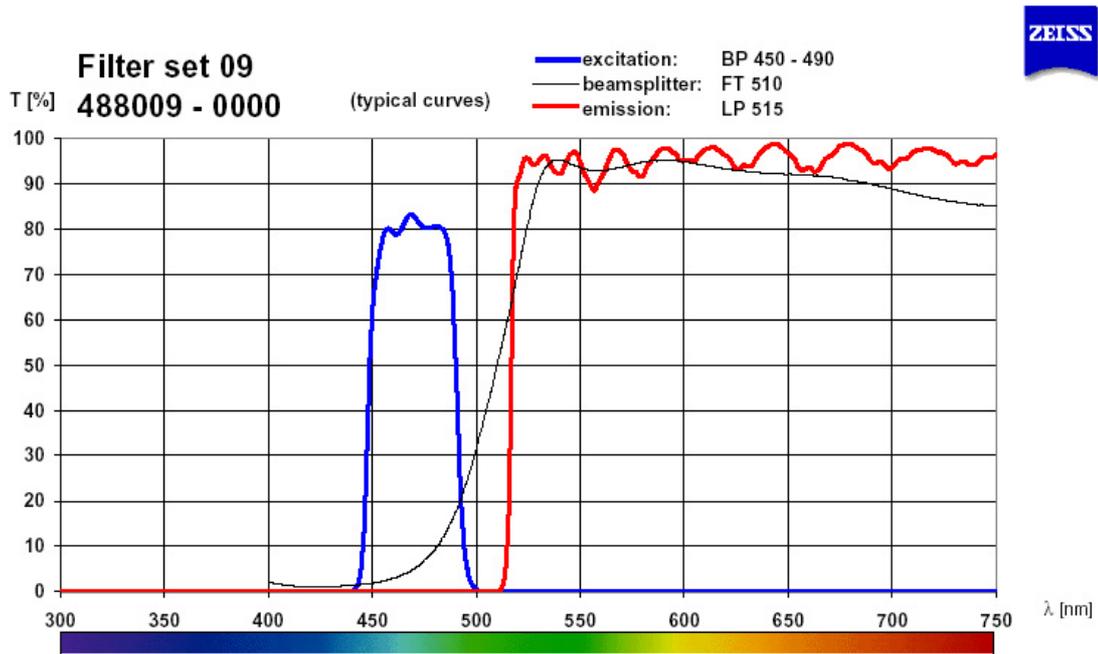


Abb. 63: Kennlinie Zeiss Filtersystem FITC

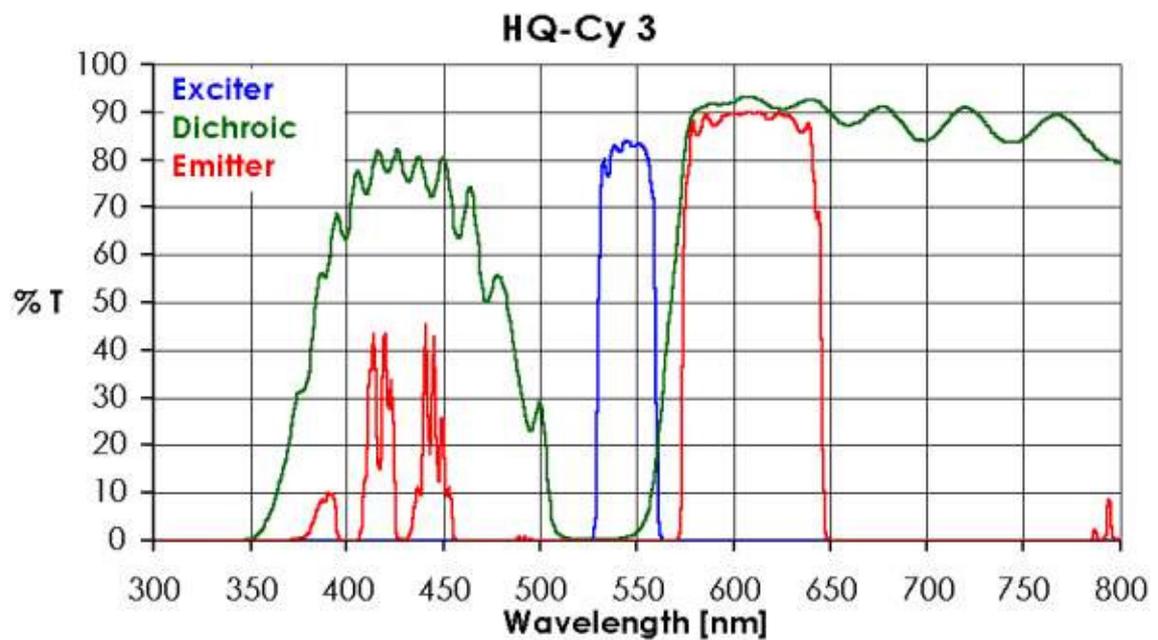
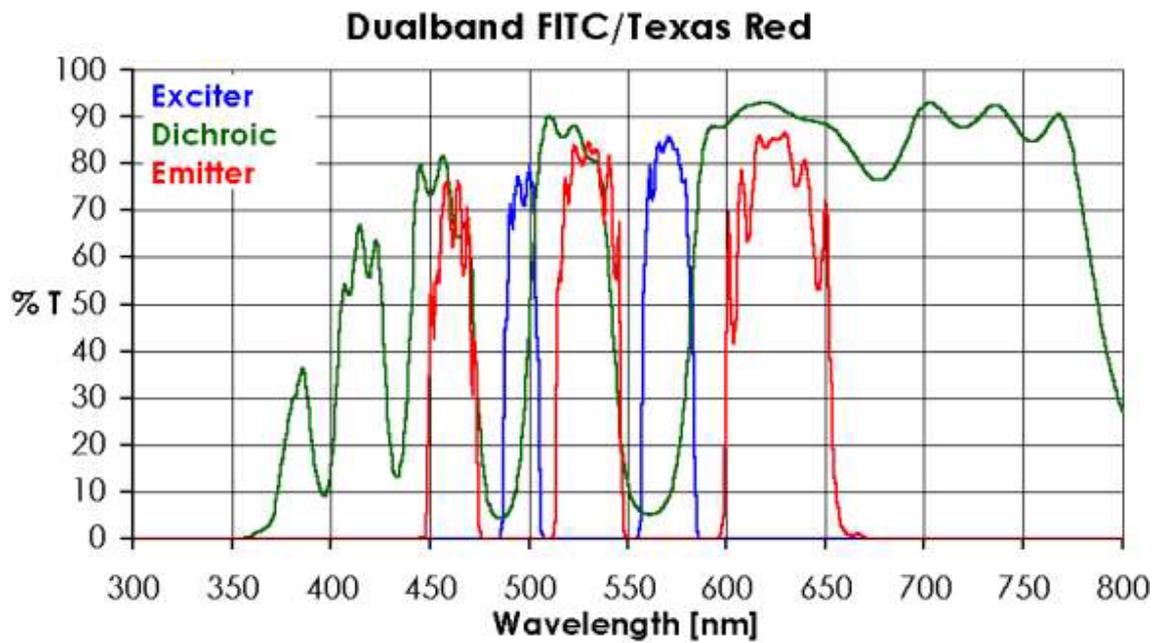


Abb. 64: Kennlinie AHF-Filtersystem Cy 3



**Abb. 65:** Kennlinie AHF-Filtersystem FITC/Texas Red

**Tab. 29:** Oberflächenspannungen ausgewählter Flüssigkeiten

Lösungsmittel	Oberflächenspannung in mN/m		
	gesamt	dispersiv	polar
Benzol <sup>[42]</sup>	28,88	27,08	1,80
Diiodmethan <sup>[155]</sup>	50,80	50,80	0,00
DMF <sup>[156]</sup>	37,30	32,42	4,88
DMSO <sup>[156]</sup>	43,54	34,86	8,68
Ethylenglycol <sup>[155]</sup>	47,70	30,90	16,80
Ethanol <sup>[157]</sup>	23,70	19,30	4,40
Hexan <sup>[158]</sup>	18,43	18,43	0,00
Methanol <sup>[157]</sup>	23,70	16,70	7,00
NMP <sup>[159]</sup>	40,79	29,21	11,58
Wasser <sup>[155]</sup>	72,80	21,80	51,00

---

## Literaturverzeichnis

- [1] R. J. Lipshutz, D. Morris, M. Chee, E. Hubbel, M. J. Kozal, N. Sha, N. Shen, R. Yang, S. P. A. Fodor, *Micro System Technology: A Powerful Tool for Biomolecular Studies.*, Birkhaeuser, Basel, Boston, New York, 1999.
- [2] S. P. A. Fodor, *Science*, **277**, (1997), 393.
- [3] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, P. P. Brown, *Science*, **270**, (1995), 467.
- [4] Autorenkollektiv, *Organicum*, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1990.
- [5] A. Ulman, *An Introduction to Ultrathin Organic Films - From Langmuir-Blodgett to Self-Assembly*, Academic Press Inc., San Diego, 1991.
- [6] A. Ulman, *Characterization of Organic Thin Films*, Butterworth-Heinemann, Boston, London, Oxford, Singapore, Sydney, Toronto, Wellington, 1994.
- [7] A. Ulman, *Chemical Reviews*, **96**, (1996), 1533.
- [8] D. L. Allara, N. A. Parikh, F. Rondelez, *Langmuir*, **11**, (1995), 2357.
- [9] N. A. Parikh, D. L. Allara, I. B. Azouz, F. Rondelez, *Journal of Physical Chemistry*, **98**, (1994), 7577.
- [10] N. A. Parikh, M. A. Schivley, E. Koo, K. Seshadri, D. Aurentz, K. Mueller, D. L. Allara, *Journal of The American Chemical Society*, **119**, (1997), 3135.
- [11] S. R. Wassermann, Y.-T. Tao, G. M. Whitesides, *Langmuir*, **5**, (1989), 1074.
- [12] J. Sagiv, *Journal of The American Chemical Society*, **102**, (1980), 92.
- [13] H. Brunner, T. Vallant, U. Mayer, H. Hoffmann, *Surface Science*, **368**, (1996), 279.
- [14] A. Y. Fadeev, T. J. McCarthy, *Langmuir*, **16**, (2000), 7268.
- [15] H. Hoffmann, U. Mayer, H. Brunner, A. Krischanitz, *Vibrational Spectroscopy*, **8**, (1995), 151.

- 
- [16] R. P. Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, Molecular Probes Inc., Eugene, USA, 2002.
- [17] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [18] M. Nisnevitch, M. Kolog-Gulco, D. Trombka, B. S. Green, M. A. Firer, *Journal of Chromatography B*, **738**, (2000), 217.
- [19] W. P. Qian, B. Xu, L. Wu, C. X. Wang, Z. D. Song, D. F. Yao, Z. H. Lu, Y. Wie, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, **35**, (2001), 419.
- [20] H.-D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2002.
- [21] W. A. Zisman, "Relation of Equilibrium Contact Angle to Liquid and solid Constitution" in *Advances In Chemistry Series Vol 43*, 43, American Chemical Society, Washington, 1964.
- [22] F. M. Fowkes, *Journal of Physical Chemistry*, **66**, (1962), 382.
- [23] F. M. Fowkes, *Industrial and Engineering Chemistry*, **56**, (1964), 40.
- [24] F. M. Fowkes, *Journal of Adhesion*, **4**, (1972), 153.
- [25] D. K. Owens, R. C. Wendt, *Journal of Applied Polymer Science*, **13**, (1969), 1741.
- [26] D. H. Kaelble, C. Uy, *Journal of Adhesion*, **2**, (1970), 50.
- [27] D. H. Kaelble, *Journal of Adhesion*, **2**, (1970), 66.
- [28] D. H. Kaelble, E. H. Cirlin, *Journal of Polymer Science*, **9**, (1971), 363.
- [29] S. Wu, *Journal of Polymer Science Part C*, **34**, (1971), 19.
- [30] S. Wu, *Journal of Adhesion*, **5**, (1973), 39.
- [31] S. Wu, *Polymer Blends*, Academic Press, New York, 1978.

- [32] S. Wu, *Journal of Physical Chemistry*, **74**, (1970), 632.
- [33] S. Wu, *Polymer Interface and Adhesion*, Dekker, New York, 1982.
- [34] S. Wu, *Adhesion and Adsorption of Polymers*, Plenum, New York, London, 1980.
- [35] L. Makkonen, *Langmuir*, **16**, (2000), 7669.
- [36] C. A. Ward, A. W. Neumann, *Journal of Colloid and Interface Science*, **49**, (1974), 286.
- [37] J. K. Spelt, D. R. Absolom, A. W. Neumann, *Langmuir*, **2**, (1986), 620.
- [38] J. K. Spelt, A. W. Neumann, *Langmuir*, **3**, (1987), 588.
- [39] D. Li, A. W. Neumann, *Advances in Colloid and Interface Science*, **39**, (1992), 299.
- [40] D. Y. Kwok, D. Li, A. W. Neumann, *Langmuir*, **10**, (1994), 1323.
- [41] A. W. Neumann, J. K. Spelt, *Applied Surface Thermodynamics*, Marcel Dekker, New York, 1997.
- [42] B. Janczuc, T. Bialopiotrowicz, *Journal of Colloid and Interface Science*, **127**, (2003), 189.
- [43] J. M. Köhler, *Ätzverfahren für die Mikrotechnik*, Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, 1998.
- [44] Y. Wu, K. Hayashi, N. Saito, H. Sugimura, O. Takai, *Surface and Interface Analysis*, **35**, (2003), 94.
- [45] N. Saito, Y. Wu, K. Hayashi, H. Sugimura, O. Takai, *Journal of Physical Chemistry B*, **107**, (2003), 664.
- [46] Y.-K. Gong, K. Nakashima, *Langmuir*, **16**, (2000), 8546.
- [47] A. Krysztafkiewicz, S. Binkowski, T. Jesionowski, *Applied Surface Science*, **199**, (2002), 31.

- [48] X. Leng, K. Starchev, J. Buffle, *Langmuir*, **18**, (2002), 7602.
- [49] D. J. Macquarrie, S. J. Tavener, G. W. Gray, P. A. Heath, J. S. Rafelt, S. I. Saulzez, J. J. E. Hardy, J. H. Clark, P. Sutra, D. Brunel, F. di Renzo, F. Fajula, *New Journal of Chemistry*, **23**, (1999), 725.
- [50] A. Y. Matsuura, T. Obayashi, H. Kondoh, T. Ohta, H. Oji, N. Kosugi, K. Sayama, H. Arakawa, *Chemical Physics Letters*, **360**, (2002), 133.
- [51] E. Mubarekyan, M. Santore, *Langmuir*, **14**, (1998), 1597.
- [52] S. J. Tavener, J. H. Clark, G. W. Gray, P. A. Heath, D. J. Macquarrie, *Chemical Communications*, (1997), 1147.
- [53] H. Yao, R. Kawabata, H. Ikeda, N. Kitamura, *Physical Chemistry, Chemical Physics*, **1**, (1999), 4629.
- [54] S. R. Twda, D. Mukesh, J. V. Yakhmi, C. Manohar, *Journal of Materials Chemistry*, **9**, (1999), 1847.
- [55] J. Vieceli, I. Benjamin, *Journal of Physical Chemistry B*, **106**, (2002), 7898.
- [56] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, VCH, Weinheim, Basel, Cambridge, New York, 1990.
- [57] I. Langmuir, *Journal of the American Chemical Society*, **40**, (1918), 1361.
- [58] M. J. Schwuger, *Lehrbuch der Grenzflächenchemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1996.
- [59] SigmaPlot 2001 for Windows Version 7.0, Copyright © 1986-2001 SPSS Inc.,
- [60] H. Dunken, *Physikalische Chemie der Glasoberfläche*, VEB Deutscher Verlag für Grunstoffindustrie, Leipzig, 1981.
- [61] W. Fritzsche, A. Csáki, J. Reichert, R. Möller, J. M. Köhler, *European Microscopy and Analysis*, (2001), 5.
- [62] Z. Guo, R. A. Guilfoyle, A. J. Thiel, R. Wang, L. M. Smith, *Nucleic Acids Research*, **22**, (1994), 5456.

- [63] U. Maskos, E. M. Southern, *Nucleic Acids Research*, **20**, (1992), 1679.
- [64] H. R. Christen, F. Vögtle, *Organische Chemie: von den Grundlagen zur Forschung Band 1*, Otto Salle Verlag, Frankfurt am Main, 1988.
- [65] R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, C. A. Mirkin, *Science*, **277**, (1997), 1078.
- [66] T. A. Taton, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *Science*, **289**, (2000), 1757.
- [67] J. Reichert, A. Csáki, J. M. Köhler, W. Fritzsche, *Analytical Chemistry*, **72**, (2000), 6025.
- [68] A. Csáki, R. Möller, J. Reichert, J. M. Köhler, W. Fritzsche, "Microstructured colloidal metal films: nanostructures based on specific (bio)chemical interactions" in *Micro- and Nanostructures of Biological Systems*, Shaker Verlag, Aachen, Germany, 2001.
- [69] J. M. Köhler, A. Csáki, J. Reichert, R. Möller, W. Straube, W. Fritzsche, *Sensors and Actuators B*, **76**, (2001), 166.
- [70] E. Delamarche, A. Bernard, H. Schmidt, B. Michel, H. Biebuyck, *Science*, **276**, (1997), 779.
- [71] J. Cordek, X. Wang, W. Tan, *Analytical Chemistry*, **71**, (1999), 1529.
- [72] S.-C. Huang, K. D. Caldwell, J.-N. Lin, H.-K. Wang, J. N. Herron, *Langmuir*, **12**, (1996), 4292.
- [73] W. P. Qian, D. F. Yao, B. Xu, F. Yu, Z. H. Lu, W. Knoll, *Chemistry of Materials*, **11**, (1999), 1399.
- [74] W. P. Qian, B. Xu, D. F. Yao, Y. H. Lin, L. Wu, C. X. Wang, F. Yu, Z. H. Lu, Y. Wei, *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, **8-9**, (1999), 475.
- [75] I. Schneegass, J. Reichert, J. M. Köhler, T. Kramer, J. Gabert, "Chip technology for fast serological determination of Salmonella serovars", *Salin pork 2001 - The*

---

*4th International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella and other Foodborne Pathogenes in Pork*, Leipzig, Germany, 2.9-5.9.2001.

- [76] V. W. Jones, J. R. Kenseth, M. D. Porter, C. L. Mosher, E. Henderson, *Analytical Chemistry*, **70**, (1998), 1233.
- [77] J. D. Swalen, D. L. Allara, J. D. Andrade, E. A. Chandross, S. Garoff, J. N. Israelachvili, T. J. McCarthy, R. Murray, R. F. Pease, J. F. Rabolt, K. J. Wynne, H. Yu, *Langmuir*, **3**, (1987), 932.
- [78] G. M. Whitesides, P. E. Laibinis, *Langmuir*, **6**, (1990), 87.
- [79] C. D. Bain, G. M. Whitesides, *Angewandte Chemie International Edition*, **28**, (1989), 506.
- [80] W. C. Bigelow, D. L. Pickett, W. A. Zisman, *Journal of Colloid and Interface Science*, **1**, (1946), 513.
- [81] M. Goldmann, J. V. Davidovits, P. Silberzan, *Thin Solid Films*, **327-329**, (1998), 166.
- [82] P. Silberzahn, L. Léger, D. Ausserré, J. J. Benattar, *Langmuir*, **7**, (1991), 1647.
- [83] D. L. Angst, G. W. Simmons, *Langmuir*, **7**, (1991), 2236.
- [84] C. P. Tripp, M. L. Hair, *Langmuir*, **8**, (1992), 1120.
- [85] J. Reichert, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [86] R. D. Peters, P. F. Nealey, J. N. Crain, F. J. Himpfel, *Langmuir*, **18**, (2002), 1250.
- [87] G. H. McGall, A. D. Barone, M. Diggelmann, S. P. A. Fodor, E. Gentalen, N. Ngo, *Journal of The American Chemical Society*, **119**, (1997), 5081.
- [88] M. Yang, R. Y. C. Kong, N. Kazmi, A. K. C. Leung, *Chemistry Letters*, (1998), 257.
- [89] L. Henke, P. A. E. Piunno, A. C. McClure, U. J. Krull, *Analytica Chimica Acta*, **344**, (1997), 201.

- [90] L. T. Zhuravlev, *Langmuir*, **3**, (1987), 316.
- [91] J. D. Le Grange, J. L. Markham, C. R. Kurjian, *Langmuir*, **9**, (1993), 1749.
- [92] M. E. McGovern, K. M. R. Kallury, M. Thompson, *Langmuir*, **10**, (1994), 3607.
- [93] N. Tillmann, A. Ulman, J. S. Schildkraut, T. L. Penner, *Journal of the American Chemical Society*, **111**, (1988), 6136.
- [94] S. R. Cohen, R. Naaman, J. Sagiv, *Journal of Physical Chemistry*, **90**, (1986), 3054.
- [95] S. R. Wasserman, G. M. Whitesides, I. M. Tidswell, B. M. Ocko, P. S. Pershan, J. D. Axe, *Journal of the American Chemical Society*, **111**, (1989), 5852.
- [96] D. J. Elliott, *Integrated Circuit Fabrication Technology*, Mc-Graw-Hill, New York, 1989.
- [97] L. F. Thompson, C. G. Willson, M. J. Bowden, *Introduction to Microlithography - 2nd ed.*, American Chemical Society, Washington, 1994.
- [98] H. J. Levinson, *Principles of lithography*, SPIE - The International Society for Optical Engineering, Bellingham, Washington, 2001.
- [99] D. Widmann, H. Mader, H. Friedrich, *Technologie hochintegrierter Schaltungen*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, 1988.
- [100] S. V. Slavov, A. R. Sanger, K. T. Chuang, *Journal of Physical Chemistry B*, **104**, (2000), 983.
- [101] A. B. D. Cassie, *Discussions of the Faraday Society*, **75**, (1952), 5041.
- [102] J. N. Israelachvili, M. L. Gee, *Langmuir*, **5**, (1989), 288.
- [103] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, 1985.
- [104] J. Drelich, J. D. Miller, A. Kumar, G. M. Whitesides, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **93**, (1994), 1.

- 
- [105] C. M. Halliwell, A. E. G. Cass, *Analytical Chemistry*, **73**, (2001), 2476.
- [106] M. J. O'Donnell-Maloney, D. P. Little, *Genetic Analysis*, **13**, (1996), 151.
- [107] A. B. Steel, T. M. Herne, M. J. Tarlov, *Analytical Chemistry*, **70**, (1998), 4670.
- [108] A. Simon, T. Cohen-Bouhacina, M. C. Porté, J.-P. Aimé, C. Baquey, *Journal of Colloid and Interface Science*, **251**, (2002), 278.
- [109] S. M. Kanan, W. T. Tze, C. P. Tripp, *Langmuir*, **18**, (2002), 6623.
- [110] A. V. Krasnoslobodtsev, S. N. Smirnov, *Langmuir*, **18**, (2002), 3181.
- [111] A. Dodson, E. Davies, J. Waring, *Histopathology*, **19**, (1991), 484.
- [112] J. P. Ranieri, R. Bellamkonda, J. Jacob, T. G. Vargo, J. A. Gardella, P. Aebischer, *Journal of Biomedical Materials Research*, **27**, (1993), 917.
- [113] C. R. Suri, M. Raje, G. C. Mishra, *Biosensors and Bioelectronics*, **9**, (1994), 325.
- [114] C. Consolandi, B. Castiglioni, R. Bordoni, E. Busti, C. Battaglia, L. R. Bernardi, G. De Bellis, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **21**, (2002), 561.
- [115] S. Pathak, P. M. Dentinger, *Langmuir*, **19**, (2003), 1948.
- [116] J. P. Gering, L. Quaroni, G. Chumanov, *Journal of Colloid and Interface Science*, **252**, (2002), 50.
- [117] C. A. Goss, D. H. Charych, M. Majda, *Analytical Chemistry*, **63**, (1991), 85.
- [118] *Nature Genetics Supplement*, **21**, (1999), 1.
- [119] M. S. Shchepinov, S. C. Case-Gree, E. M. Southern, *Nucleic Acids Research*, **25**, (1997), 1155.
- [120] E. M. Southern, K. Mir, M. Shchepinov, *Nature*, **21**, (1999), 5.
- [121] J. Reichert, A. Csáki, R. Möller, J. M. Köhler, W. Fritzsche, *Analytical Chemistry*, **72**, (2000), 6025.

- 
- [122] T. Ung, L. M. Liz-Marzan, P. Mulvaney, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **202**, (2002), 119.
- [123] J. M. Köhler, A. Csáki, J. Reichert, R. Möller, W. Straube, W. Fritzsche, *Sensors and Actuators B*, **76**, (2002), 166.
- [124] A. Csáki, W. Fritzsche, J. M. Köhler, J. Reichert, DE19943704, 2001.
- [125] P. Arenkov, A. Kukhtin, A. Gemmel, S. Voloshchuk, V. Chupeeva, A. Mirzabekov, *Analytical Biochemistry*, **278**, (2000), 123.
- [126] J. E. Butler, *Methods : A Companion to Methods in Enzymology*, **22**, (2000), 4.
- [127] T. Kodadek, *Chemistry & Biology*, **8**, (2001), 105.
- [128] M. J. Heller, *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, **15**, (1996), 100.
- [129] D. Figeys, D. Pinto, *Electrophoresis*, **22**, (2001), 208.
- [130] C. Bieri, O. P. Ernst, S. Heyse, K. P. Hofmann, H. Vogel, *Nature*, **17**, (1999), 1105.
- [131] I. Bieber, J. Reichert, U. Klenz, J. M. Köhler, T. Kramer, J. Gabert, *Biotest Bulletin*, **6**, (2002), 235.
- [132] J. Reichert, U. Klenz, I. Bieber, "Antibody arrays on microtechnically based affinity matrices for specific recognition of antigen-antibody-interactions", *Protein Microarray Technology*, Hamburg, Germany, 23.9-25.9.2002.
- [133] M. K. Dutt, *Indian Journal for Experimental Biology*, **18**, (1980), 57.
- [134] F. M. Winnik, B. Keoshkerian, J. R. Fuller, P. G. Hofstra, *Dyes and Pigments*, **14**, (1990), 101.
- [135] G. Wu, A. Koliadima, Y.-S. Her, E. Matijevic, *Journal of Colloid and Interface Science*, **195**, (1997), 222.
- [136] I. Yamazaki, N. Tamai, T. Yamamazi, *Journal of Physical Chemistry*, **94**, (1990), 88.
- [137] M. Kawasaki, T. Sato, T. Yoshimoto, *Langmuir*, **16**, (2000), 5409.

- 
- [138] T. D. Khokhlova, Yu. S. Nikitin, A. L. Detistova, *Adsorption Science & Technology*, **15**, (1997), 333.
- [139] R. W. Owens, D. A. Smith, *Langmuir*, **16**, (2000), 562.
- [140] S. H. Kost, H. D. Breuer, *Journal of Physical Chemistry*, **96**, (1992), 134.
- [141] S. E. Sheppard, R. H. Lambert, R. D. Walker, *Journal of Chemical Physics*, **7**, (1939), 265.
- [142] G. Scharz, W. Balthasar, *European Journal of Biochemistry*, **12**, (1970), 461.
- [143] R. J. Bunting, T. V. Phan, E. Komali, R. M. Bowben, *Biophysical Journal*, **56**, (1989), 979.
- [144] E. Ostuni, R. G. Chapman, M. N. Liang, G. Meluleni, G. Pier, D. E. Ingber, G. M. Whitesides, *Langmuir*, **17**, (2001), 6336.
- [145] R. G. Chapman, E. Ostuni, M. N. Liang, G. Meluleni, E. Kim, L. Yan, G. Pier, H. S. Warren, G. M. Whitesides, *Langmuir*, **17**, (2001), 1225.
- [146] S. A. Gani, D. C. Mukherjee, D. K. Chattoraj, *Langmuir*, **15**, (1999), 7130.
- [147] J. E. Lee, S. S. Saavedra, *Langmuir*, **12**, (1996), 4025.
- [148] S. K. Bhatia, J. L. Teixeira, M. Anderson, L. C. Shriver-Lake, J. M. Calvert, J. H. Georger, J. J. Hickman, C. S. Dulcey, P. E. Schoen, F. S. Ligler, *Analytical Biochemistry*, **208**, (1993), 197.
- [149] A. Baszkin, M. M. Boissonnade, A. Kamyshny, S. Magdassi, *Journal of Colloid and Interface Science*, **244**, (2001), 18.
- [150] C. Galli, M. C. Coen, R. Hauert, V. L. Katanaev, M. P. Wymann, P. Grönig, L. Schlaphbach, *Surface Science*, **474**, (2001), L180.
- [151] K. L. Prime, G. M. Whitesides, *Science*, **252**, (1991), 1164.
- [152] S. R. Tawde, D. Mukesh, J. V. Yakhmi, C. Manohar, *Journal of Materials Chemistry*, **9**, (1999), 1847.
- [153] M. J. Rosen, *Surfactants and Interfacial Phenomena*, Wiley, New York, 1989.

- [154] A. C. Zettlemoyer, *Journal of Colloid and Interface Science*, **28**, (1968), 343.
- [155] G. Ström, *Journal of Colloid and Interface Science*, **119**, (1987), 352.
- [156] F. M. Fowkes, S. Maruchi, *Coatings and Plastics*, **37**, (1977), 605.
- [157] A. Ohm, B. C. Lippold, *Pharmazeutische Industrie*, **48**, (1986), 510.
- [158] M. D. Lechner, *Landolt Börnstein, New Series, IV/16*, Springer Verlag, Heidelberg, 1998.
- [159] DPI Laboratory, DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt.
- [160] C. H. Giles, T. H. MacEwan, S. N. Nakhwa, D. Smith, *Journal of the Chemical Society*, (1960), 3973.

## Abkürzungen und Formelzeichen

### Abkürzungen

6-FAM	5'-Fluorescein-Phosphoramidit
Abb.	Abbildung
AES	Atom Emissionsspektroskopie
AFM	Rasterkraftmikroskopie
Anm.	Anmerkung
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CSA	Common Structural Antigen
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
gef.	gefunden
Gl.	Gleichung
GOPS	3-Glycidoxypropyltriethoxysilan
HMDS	1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
IR	Infrarotspektroskopie
lfd. Nr.	laufende Nummer
LPS	Lipopolysaccharide
NMP	N-Methylpyrrolidon
ODS	Octadecylsilan
OD	Optische Dichte
PA 9	Ethylenglycol-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	Phosphate Buffered Saline + Tween
PDMS	Polydimethylsiloxan
PE	Polyethylen
PFD	Perfluordecylsilan
PFO	Perfluorocetyl silan
PMMA	Polymethylmethacrylat
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVA	Polyvinylalkohol
rel.	relativ
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RIE	Reaktives Ionenätzen
rpm	rotation per minute
SAMs	Self Assembled Monolayers
SIMS	Sekundär Ionen Massenspektrometrie
SPR	Oberflächen Plasmon Resonanz
Tab.	Tabelle
UV/Vis	Elektronenspektroskopie

### XPS

z. B.

Röntgen Photoelektronen Spektroskopie  
zum Beispiel

### Formelzeichen

$\Delta G_A^\circ$	molare Freie Standardadsorptionsenthalpie [kJ mol <sup>-1</sup> ]
$a_F$	Frumkin'sche Wechselwirkungskonstante
$c$	Konzentration [mol l <sup>-1</sup> ]
$F$	relative Fluoreszenzintensität
$F_\infty$	relative Fluoreszenzintensität bei maximaler Bedeckung
$K$	Adsorptionskonstante
$R$	Gaskonstante [J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]
$T$	Temperatur [K]
$W_A$	Adhäsionsarbeit pro Fläche [J m <sup>-2</sup> ]
$\Theta$	Besetzungsdichte
$\gamma^c$	kritische Oberflächenspannung [mN m <sup>-1</sup> ]
$\gamma_{lv}$	Grenzflächenspannung flüssig/gas [mN m <sup>-1</sup> ]
$\gamma_{ls}$	Grenzflächenspannung flüssig/fest [mN m <sup>-1</sup> ]
$\gamma_{sv}$	Grenzflächenspannung fest/gas [mN m <sup>-1</sup> ]
$\theta$	Kontaktwinkelwinkel [°]

## Danksagung

Für die interessante Themenstellung, das große Interesse am Fortgang dieser Arbeit, sowie die intensive Unterstützung und Zusammenarbeit danke ich vor allem meinen Betreuern Prof. Dr. Ulrich-Walter Grummt und Prof. Dr. J. Michael Köhler. Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Michael Köhler für die zahlreichen Diskussionen, nützlichen Ratschläge und vielen Anregungen, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ivonne und Björn Bieber danke ich vielfach für die Hilfsbereitschaft und informativen Gespräche, sowie für die Möglichkeit, mich jederzeit mit Fragen und Problemen an sie wenden zu können.

Bei allen Mitarbeitern vom Bereich Mikrosysteme bedanke ich mich für das angenehme und freundliche Arbeitsklima, vor allem bei Jens Albert, Michael Berg, Andrea Csáki, Jana Felbel, Grit Festag, Wolfgang Fritzsche, Thomas Henkel, Patrick Hoffmann, Franka Jahn, Mark Kielpinski, Uwe Klenz, Gunter Maubach, Günter Mayer, Robert Möller, Jürgen Pipper und Matthias Urban. Ihnen schulde ich Dank für die gute Zusammenarbeit und die vielen fachlichen und freundschaftlichen Ratschläge, ebenso wie den ehemaligen Mitarbeitern Andreas Opitz, Herbert Stürmer und Rainer Willnauer.

Insbesondere danke ich:

- Christiane Schulze für die unendliche Geduld bei den Adsorptionsuntersuchungen und Fluoreszenzmessungen
- Katrin Kandra und Wolfgang Morgenroth für das Sauerstoff Plasmaätzen
- Margitta Sossna und Denise Horn für die Hilfe bei den Arbeiten im Reinraum
- Franka Jahn für die REM-Aufnahmen
- Dr. E. Birch-Hirschfeld für die DNA-Synthesen
- Hans Fischer und Jens Albert für das Vereinzeln der Chips
- dem Team von der Werkstatt, besonders Ralf Stöpel für die speziell angefertigten Arbeitsmittel.

Vor allem bedanke ich mich bei meinen Eltern für die fortwährende Unterstützung.

Nicht zuletzt bei Anett – Danke, dass es dich gibt!

# **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Jena, 10. Juli 2003

# Lebenslauf

Name: Reichert  
Vorname: Jörg  
Geburtsdatum: 17. Juni 1970  
Geburtsort: Kölleda  
Familienstand: ledig  
1976 – 1986 Polytechnische Oberschule Sömmerda  
1986 – 1988 Erweiterte Oberschule Sömmerda mit Abschluss Abitur  
1988 – 1990 Grundwehrdienst  
1990 – 1991 Studium Lehramt Chemie/Biologie an der Pädagogischen Hochschule Erfurt/Mühlhausen  
1991 – 1992 Studium Lehramt Chemie/Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
1992 – 1998 Chemiestudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena mit Abschluss als Diplom-Chemiker  
seit 1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Physikalische Hochtechnologie Jena, Abt. Biotechnische Mikrosysteme  
davon seit 1999 Doktorarbeit am Institut für Physikalische Hochtechnologie Jena unter Betreuung von Prof. Dr. U.-W. Grummt (Institut für Physikalische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena)