

# Mobile Biosensorik auf Basis funktionalisierter, nanostrukturierter, optischer Wellenleiter

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Ingenieurwissenschaften  
(Dr.-Ing.)  
der Technischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Sabrina Jahns**

Kiel  
November 2016



1. Gutachterin:

Prof. Dr. Martina Gerken

2. Gutachter:

Assoc. Prof. Dr. Jost Adam

Datum der mündlichen Prüfung

07. November 2016



Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation

**Mobile Biosensorik auf Basis funktionalisierter, nanostrukturierter,  
optischer Wellenleiter**

selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe und dass ich alle von anderen Autoren wörtlich übernommenen Stellen wie auch die sich an die Gedankengänge anderer Autoren eng anlehnenden Ausführung meiner Arbeit besonders gekennzeichnet und die entsprechenden Quellen angegeben habe. Weiterhin wurde die Arbeit bisher nicht im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt, jedoch wurden Teile in Form von Beiträgen in Fachzeitschriften und Tagungsbänden veröffentlicht sowie auf Konferenzen präsentiert. Diese Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Sabrina Jahns



# Kurzfassung

Frühe Erkennung und Behandlung von Erkrankungen besitzen einen großen Einfluss auf den Krankheitsverlauf eines Patienten. Deshalb sind kompakte, dezentrale und einfach zu bedienende Sensoren, die zudem mehrere Risikomarker quantitativ und qualitativ nachweisen können, von hohem Interesse für die patientennahe Diagnostik. In dieser Arbeit wird ein kompakter Biosensor zur mobilen, markerfreien Detektion von mehreren Proteinen präsentiert. Ein photonischer Kristall, der mit Rezeptoren lokal funktionalisiert ist, dient hier als optischer Signalumwandler. Dafür wurden sowohl zwei Herstellungsprozesse zur Vervielfältigung von photonischen Kristallen als auch zwei Prozesse zur lokalen und kovalenten Anbindung von Rezeptoren an die Kristalloberfläche entwickelt.

Zur Auslesung dieses photonischen Kristall-Sensors wurden verschiedene intensitätsbasierte Messsysteme in Form von zwei Smartphone-Adaptoren und einem Kamera-basierten Messgerät evaluiert. Diese Messsysteme wandeln die Proteinanbindung an die Sensoroberfläche in ein Intensitätssignal um, über dessen Amplitude die Proteinkonzentration bestimmt werden kann. Mit dem kompakten, Kamera-basierten Messgerät konnte die parallele und spezifische Anbindung der drei Proteine CD40 Ligand Antikörper (13.5 µg/ml), EGF Antikörper (13.5 µg/ml) und Streptavidin (30 µg/ml) anhand von sechs Rezeptorpositionen nachgewiesen werden. In einem weiteren Experiment ist die detektierbare Konzentration des Proteins CD40 Ligand Antikörper auf 1,35 µg/ml reduziert worden. Um die Detektionsgrenze dieser Technologie weiter zu verbessern, werden hier photonische Kristalle mit einer multi- und aperiodischen Gitterstruktur simulativ und experimentell untersucht.

Zusätzlich wurde ein Testchip zur Filterung von Vollblut und für die bildgebende, markerfreie Detektion von mehreren Risikomarkern entworfen. Dieser beinhaltet Kapillarkanäle zum Transport des Blutes, eine Filtermembran und eine Sensorkammer, in der der funktionalisierte photonische Kristall eingeklebt wird. Die Eigenschaften des Testchips wurden evaluiert und die Assoziation von 500 nmol/l Biotin in Puffer an zwei Bindungspositionen und in Vollblut an einer Bindungsposition kann im Intensitätssignal beobachtet werden. Abschließend wurden mono- und zweiperiodische Gitter in nanostrukturierten Wellenleitern zur Steigerung des Fluoreszenzsignals für die Marker-basierte Biosensorik experimentell und theoretisch betrachtet. Eine Lumineszenzverstärkung von Titandioxid um das 1,65-Fache wurde mit Hilfe monoperiodischer Gitter erzielt.





# Abstract

Early recognition and treatment have an important influence of the patient's course of disease. Therefore, compact, decentralized and easy-to-use sensors able to detect multiple risk markers quantitatively and qualitatively are of high interest for point-of-care applications. In this thesis a compact biosensor for mobile, label-free detection of multiple proteins is presented. A photonic crystal functionalized with specific receptors forms the optical transducer. Two fabrication processes to duplicate photonic crystals as well as two processes for coupling the receptors covalently and locally to the crystal surface are developed.

Different intensity based measuring systems are evaluated in the form of two smartphone adapters and a camera-based measuring instrument to read-out the photonic crystal sensor. These measuring systems transform the binding kinetics of the protein into a detectable intensity signal, whose amplitudes can be used to determine protein concentration. With the compact, camera-based measuring instrument the parallel and specific association of the three proteins CD40 ligand antibody (13.5  $\mu\text{g/ml}$ ), EGF antibody (13.5  $\mu\text{g/ml}$ ) and streptavidin (30  $\mu\text{g/ml}$ ) could be observed on six binding positions. In a further experiment the detectable protein concentration is reduced down to 1.35  $\mu\text{g/ml}$  for CD40 ligand antibody. To improve the limit of detection photonic crystals with multiperiodic and aperiodic grating structures are investigated in simulation and in experiment.

Additionally, a test chip for human blood filtration and imaging label-free detection of multiple biomarkers is designed. The chip contains capillary channels for blood transportation, a filter membrane and a cavity open on one side for sensor bonding. The performance of the test chip is evaluated and the association of 500 nmol/l biotin in buffer on two receptor positions and in human blood on one receptor position is observed in the intensity signal.

Concluding monoperiodic and twoperiodic gratings in nanostructured waveguides are investigated in experiment and in simulation to enhance the fluorescence signal of labelled biosensors. A 1.65 times larger luminescence of titanium oxide could be achieved by using monoperiodic grating structures.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Motivation.....	2
1.2. Gliederung.....	7
<b>2 Photonische Kristalle in der optischen Biosensorik .....</b>	<b>9</b>
2.1. Optische Sensoren.....	10
2.2. Grundlagen zu photonischen Kristallen und Wellenleitertheorie .....	11
2.2.1. Lineare einperiodische Gitterstrukturen.....	16
2.2.2. Lineare multi- und aperiodische Gitterstrukturen .....	18
2.3. Photonische Kristalle als Signalumwandler in der markerfreien Biosensorik.....	20
2.4. Photonische Kristalle zur resonanten Anregung von Fluorophoren .....	24
2.4.1. Grundlagen zu Fluoreszenz.....	24
2.4.2. Aktueller Stand der Forschung.....	25
<b>3 Herstellung von photonischen Kristallen und des Biosensors.....</b>	<b>29</b>
3.1. Herstellung von photonischen Kristallen .....	30
3.1.1. Herstellung von Strukturen mit PDMS .....	31
3.1.2. Herstellung von Strukturen mit h-PDMS.....	36
3.2. Prozesse zur kovalenten und lokalen Anbindung von Rezeptoren .....	38
3.2.1. Funktionalisierung mittels Spotten.....	38
3.2.2. Funktionalisierung mit einer Fotolackmaske .....	43
<b>4 Design und Charakterisierung von nanostrukturierten Wellenleitern .....</b>	<b>47</b>
4.1. Finite- Differenzen-Methode: Simulationsmodell.....	49
4.2. Resonanzverhalten in Abhängigkeit vom Beleuchtungs- und Detektionswinkel.....	51
4.2.1. Spektrale Charakterisierung der photonischen Kristalle in Transmission .....	51
4.2.2. Spektrale Charakterisierung der photonischen Kristalle in Reflexion .....	53
4.3. Nanostrukturen für die markerfreie Biosensorik.....	57
4.3.1. Monoperiodische Gitterstrukturen .....	57
4.3.2. Multi- und aperiodische Gitterstrukturen .....	61
4.4. Zusammenfassung.....	68

<b>5 Bildgebende Messsysteme für die markerfreie und multiparametrische Proteindetektion .....</b>	<b>71</b>
5.1. Bildgebende Messsysteme für die parallele Proteindetektion .....	72
5.1.1. Funktionsweise der bildgebenden Proteindetektion.....	72
5.1.2. Kompaktes, photometrisches Messgerät .....	74
5.1.2.1. Aufbau .....	74
5.1.2.2. Refraktometrische Messungen .....	76
5.1.3. Algorithmus zur Unterdrückung des Hintergrundsignals .....	78
5.1.4. Smartphone-Adaptoraufsätze .....	81
5.1.4.1. Optik-freies Design.....	81
5.1.4.2. Adapter-Design mit telezentrischer Optik .....	89
5.2. Multiparametrische Proteindetektion .....	95
5.2.1. Detektion mit Aptameren als Rezeptor .....	95
5.2.2. Detektion mit Antikörpern als Rezeptor .....	100
5.3. Zusammenfassung.....	104
<b>6 Testchip zur markerfreien Detektion in Blut.....</b>	<b>107</b>
6.1. Mikrofluidischer Chip zur Filtration von Blut .....	109
6.2. Brechungsindex-Messungen mit Testchip .....	112
6.3. Detektion von Biotin .....	115
6.4. Zusammenfassung.....	118
<b>7 Fluoreszenzverstärkung mittels nanostrukturierter Wellenleiter .....</b>	<b>121</b>
7.1. Monoperiodische Gitterstrukturen .....	123
7.2. Fluoreszenzverstärkung mittels monoperiodischer Gitterstrukturen .....	129
7.3. Multiperiodische Gitterstrukturen .....	133
7.4. Zusammenfassung.....	136
<b>8 Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>139</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>145</b>
<b>Eigene Publikationen .....</b>	<b>155</b>
<b>Konferenzbeiträge/-präsentationen.....</b>	<b>157</b>

<b>Betreute Abschlussarbeiten .....</b>	<b>159</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>161</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>169</b>
<b>Abkürzungs- und Symbolverzeichnis .....</b>	<b>171</b>
Abkürzungen.....	171
Symbole .....	173
<b>Anhang A Rezepte zur Sensor-Herstellung .....</b>	<b>175</b>
A.1 Herstellung von Nanostrukturen mit reinem PDMS.....	177
A2. Herstellung der Nanostruktur mit h-PDMS .....	179
A3. Lokale Funktionalisierung mittels Spotten .....	181
A4. Funktionalisierung mittels Fotolackmaske .....	183
A5. Rezepte für Puffer- und Proteinlösungen.....	185
<b>Anhang B Design der verschiedenen Gitterstrukturen .....</b>	<b>187</b>
B1. Gitterstrukturen für die resonante Anregung .....	189
B2. Gitterstrukturen für die markerfreie Biosensorik .....	193
<b>Anhang C Intensitätswerte der Proteindetektionen .....</b>	<b>197</b>



# Kapitel 1

## Einleitung

---

### Zusammenfassung

*Biosensoren können in kompakter Bauweise realisiert werden und ermöglichen dadurch dezentrale Analysen von sogenannten Risikomarkern. Deshalb sind sie prädestiniert für die patientennahe Diagnostik. Am Beispiel Diabetes-Erkrankung und ihrer Früherkennung wird die Notwendigkeit von Biosensoren erläutert und eine kurze Einführung in die Thematik der Biosensorik gegeben. Dabei werden der aktuelle Stand der Forschung in diesem Bereich sowie die verschiedenen Realisierungsmöglichkeiten dargestellt. Zudem wird für optische Biosensoren motiviert. Die Gliederung dieser Arbeit schließt daraufhin dieses Kapitel ab.*

## 1.1. Motivation

Aufgrund der guten Lebensmittelversorgung sowie auch einer stetig besser werdenden medizinischen Versorgung vor allem in den Industriestaaten steigt die Lebenserwartung der Menschen kontinuierlich an. In Deutschland beispielsweise stieg die Lebenserwartung für Frauen von 48,3 Jahren im Jahr 1901 auf 82,8 Jahre im Jahr 2010 [1]. Neben einer immer älter werdenden Bevölkerung hat vor allem das Überangebot an Lebensmitteln einen entscheidenden Einfluss auf die steigende Zahl von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie z.B. Herzinfarkt oder Diabetes. Im Jahr 2014 waren 38,9% aller Sterbefälle in Deutschland auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen zurückzuführen, wodurch diese Erkrankungen auf dem ersten Platz der Sterbeursachen liegen [2]. Eine frühe Erkennung und Behandlung dieser Krankheitsgruppe ist deshalb entscheidend für den späteren Krankheitsverlauf und somit für die vollständige Genesung des Betroffenen [3]. Hervorzuheben ist jedoch, dass besonders die Früherkennung von z.B. Diabetes heutzutage nur eingeschränkt möglich ist [4]. So fanden Rathmann et al. [5] 2003 in einer Studie heraus, dass von allen Befragten über die Hälfte der an Diabetes leidenden Probanden nicht von ihrer Erkrankung wussten.

Aktuell wird zur Früherkennung von Diabetes mit Hilfe des Deutschen Diabetes-Risiko-Scores, der hauptsächlich anthropometrische Daten und Lebensstilanamnese zur Risikobewertung einbezieht, das Erkrankungsrisiko ermittelt [6]. Durch die Bestimmung der vorliegenden Konzentration sogenannter Risikomarker wie Glukose, HbA1c, Triglyceride, HDL-Cholesterin, hochsensitives C-reaktives Protein und Gamma-Glutamyltransferase können die Ergebnisse aus dem Diabetes-Risiko-Score noch weiter konkretisiert werden [7]. Die Werte der Risikomarker werden zurzeit in zentralen Laboren mit aufwendigen Verfahren meistens einzeln bestimmt, wodurch eine schnelle Risikobewertung nicht möglich ist. Aus diesem Grund sind kostengünstige, dezentrale und für den Patienten einfach anzuwendende Messsysteme von hohem Interesse für die Biowissenschaft (engl. *Life Science*). Besonders vielversprechend sind Systeme, die mehrere dieser Risikomarker parallel und sehr spezifisch qualitativ und quantitativ nachweisen können. So identifizierten Forscher eine Palette von Diabetesmarkern, die zur Früherkennung von Diabetes prädestiniert sind und welche möglichst zusammen aus einem Probenvolumen detektiert werden müssen, um eine zuverlässige Diagnose stellen zu können [8], [9].

Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, existieren in der Forschung viele verschiedene Ansätze. Die bekannteste und am weitesten verbreitete Methode zur



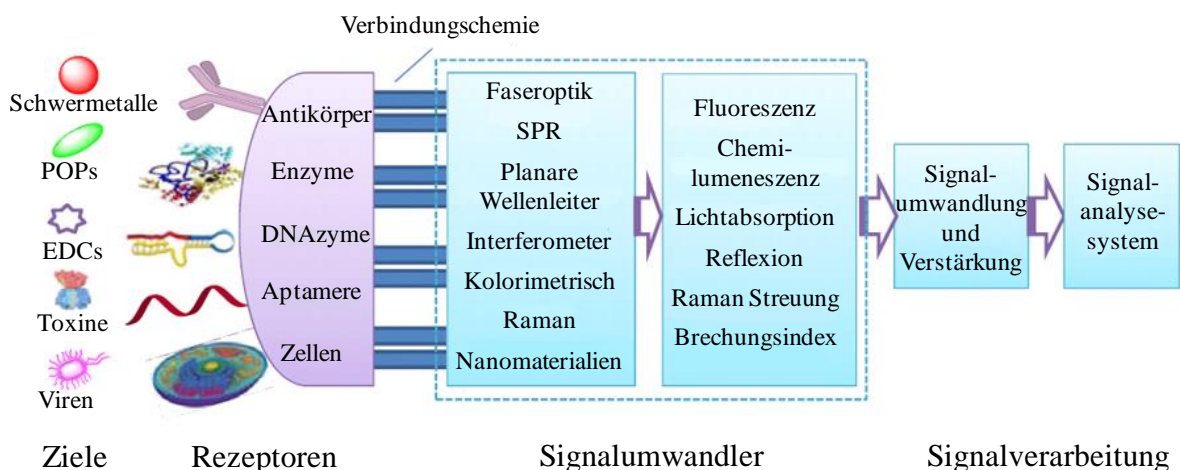
Bestimmung von Risikomarkern sind Immunassays (ELISA, engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*). ELISA-Tests bezeichnen antikörperbasierte Nachweisverfahren und basieren auf einer enzymatischen Farbreaktion. Die zu analysierende Flüssigkeit wird auf eine Mikrotiterplatte in voneinander isolierte Näpfe gegeben, in denen durch die Zugabe von entsprechenden Reagenzien ein Farbumschlag bei Vorliegen des zu detektierenden Risikomarkers erzeugt wird. Die Durchführung von ELISA-Tests erfordert ein größeres Probenvolumen und enthält aufwendige Wasch- und Präparationsschritte, bevor der Test überhaupt ausgelesen werden kann.

Biosensoren können Detektionsergebnisse deutlich schneller liefern und können so kompakt konzipiert werden, dass sie in Feldexperimenten eingesetzt werden können. Biosensoren bestehen im Wesentlichen aus drei Hauptkomponenten: der biologisch erkennenden Komponente (Rezeptor), dem Signalumwandler und der Datenverarbeitung [10]. Rezeptor und Signalumwandler sind direkt miteinander verbunden. Der Rezeptor erkennt den Risikomarker in der zu analysierenden Flüssigkeit und bindet diesen an sich und somit an den Signalumwandler. Beispiele für Rezeptoren sind Antikörper, Enzyme oder Aptamere. Die Anbindung des Zielmoleküls an den Rezeptor wird dann von dem Signalumwandler in ein detektierbares Signal transformiert. Diese Transformation geschieht entweder mechanisch, elektrochemisch oder optisch [11]. Bei den mechanischen Biosensoren handelt es sich im Wesentlichen um Massensensoren, die piezoelektrische Elemente oder Biegebalken zur Erkennung von Massenänderung an der Oberfläche nutzen [12], [13]. Bei elektrochemischen Sensoren verursacht die Proteinanbindung entweder eine messbare Änderung des Stromes, der Kapazität oder der Impedanz [14], [15].

Bei optischen Sensoren werden Veränderungen im Brechungsindex, der Lichtabsorption und –emission bedingt durch die Markeranbindung erfasst. Die optischen Sensoren können zunächst in zwei Gruppen unterteilt werden: den Marker-basierten und den markerfreien (engl. *label-free*) Sensoren. Bei Marker-basierten Sensoren werden Fluorophore oder Farbstoffe im Vorfeld der Detektion an den Risikomarker angebunden [16]–[19]. Bindet dieses wiederum an den Rezeptor, kann anschließend Fluoreszenz oder entsprechend ein Farbwechsel detektiert werden. Im Gegensatz zu den Marker-basierten Sensoren benötigen markerfreie Sensoren keine solche zusätzliche Präparation der entnommenen Probenflüssigkeit [20]. Das Signal markerfreier optischer Sensoren reagiert direkt auf die Markeranbindung bzw. auf die daraus resultierende Brechungsindexänderung [21]–[27].

Im Vergleich zu den anderen Sensorarten kann die Anbindung des Risikomarkers bei optischen Biosensoren in Echtzeit beobachtet werden, wodurch z.B. die Bindungskinetik

einzelner Moleküle untersucht werden kann. Die Bandbreite optischer Biosensoren bzw. optischer Signalumwandler reicht von Wellenleiter-Interferometern [28], [29] über Oberflächenplasmonenresonatoren [30], [31] (SPR, engl. *surface plasmon resonances*) hin zu Mikroresonator-Sensoren [32] und photonischen Kristall-Sensoren [33]–[36]. Bei all diesen Konzepten wird das Licht über eine Strukturierung der Oberflächen so manipuliert, dass sich ein evaneszentes elektromagnetisches Feld an der Sensoroberfläche ausbildet. Wegen dieses evaneszenten Anteils sind diese Signalumwandler sensitiv gegenüber Brechungsindexänderungen an der Sensoroberfläche [37]. So werden z.B. bei Wellenleiter-Interferometern [38] oder Mikroresonatoren [39] über UV-Lithographie (Ultraviolett) Mikrometer große Wellenleiter auf Siliziumsubstrate prozessiert. Durch das Prozessieren auf Waferebene können mehrere dieser Sensoren auf einem Chip integriert werden, was eine Detektion von verschiedenen Proteinen auf kleinem Raum erlaubt. Allerdings werden für diese Sensoren entweder Spektrometer oder optische Powermeter zur Signaldetektion benötigt, was eine kompakte Realisierung dieser Gesamtsensoren stark erschwert.



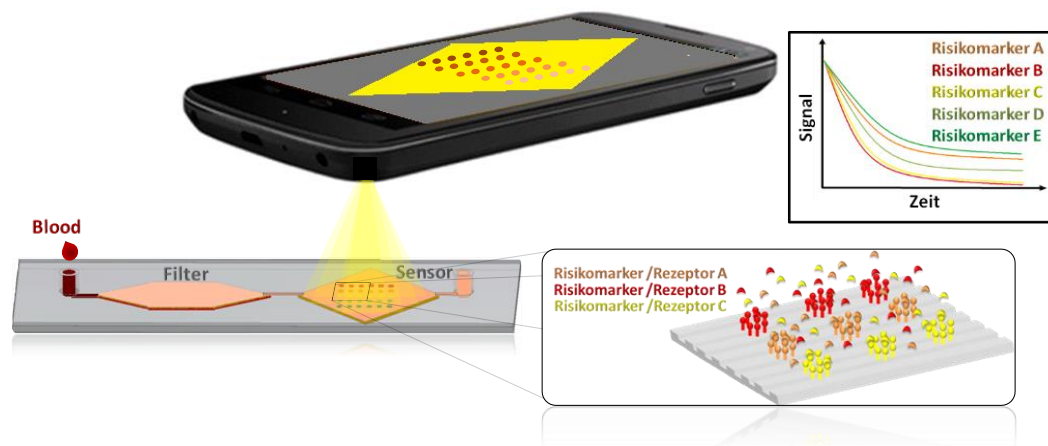
**Abbildung 1.1:** Schema von einem optischen Biosensor mit den einzelnen Möglichkeiten Rezeptor und Signalumwandler zu realisieren (nach [40]).

Das zweite Sensorkonzept, für das eine Strukturierung der Sensoroberfläche notwendig ist, sind die SPR-Sensoren. Durch Strukturierung einer Metalloberfläche im Mikrometer- aber auch im Nanometerbereich, wird eine Steigerung der Sensorempfindlichkeit erzielt [41]. Aufgrund des Betriebs der SPR-Sensoren im infraroten Spektralbereich werden kostenintensivere Anregungs- und Messmethoden benötigt. Eine parallele Detektion von mehreren Proteinen konnte mit Hilfe eines kompakten Messgeräts bereits demonstriert werden [42]. Für die Erkennung von Risikomarkern reicht die Empfindlichkeit dieses Biosensors mit 3,9 µg/ml noch nicht aus. Für zuverlässige Diagnosen sollte die

Empfindlichkeit beispielsweise für Diabetesmarker im Bereich von pg/ml liegen und somit um 9 Größenordnungen besser sein. Hier sind zudem die metallischen Schichten nachteilig, da sie das Licht absorbieren und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verschlechtern.

Diese Absorptionseffekte treten bei nanostrukturierten Wellenleitern, welche auch als photonische Kristalle bekannt sind, nicht auf. Sie bestehen wie die Wellenleiter-Interferometer und die Mikroresonatoren aus dielektrischen Materialien. Die Funktionalität der photonischen Kristalle als Signalumwandler wurde in früheren Arbeiten demonstriert, in dem das Spektrum des transmittierten oder reflektierten Lichts während der Proteinanbindung ausgewertet wurde [34], [36]. Zur Realisierung eines kompakten Biosensors mit photonischen Kristallen wurden bereits Ansätze sowohl zur Miniaturisierung eines Spektrometers [43] als auch die Verwendung einer Smartphone-Kamera als Detektor [44] untersucht. Eine parallele Detektion von mehreren Proteinen ist mit diesen Methoden jedoch nicht möglich.

In dieser Arbeit wird ein kompakter Biosensor zur spezifischen und parallelen Detektion von mehreren Proteinen vorgestellt. Ein photonischer Kristall dient hier als Signalumwandler. Über das Design der Nanostrukturen innerhalb eines photonischen Kristalls lassen sich die optischen Eigenschaften über den gesamten sichtbaren Spektralbereich des Lichts manipulieren, so dass der Kristall möglichst empfindlich auf Proteinanbindungen reagiert. Des Weiteren können die Flächen der photonischen Kristall-Sensoren in beliebigen Größen prozessiert werden, womit die Sensorfläche an das benötigte Probenvolumen angepasst werden kann. Dies bedeutet, dass eine Integration des Sensors in einen Testchip möglich ist. Durch die Integration des photonischen Kristalls in einen Testchip, der zudem mit einer einfachen und kostengünstigen Detektoreinheit ausgelesen wird, kann die Analyse von geringen Probenvolumina und somit eine sehr patientennahe Diagnostik und Therapieüberwachung realisiert werden. Gerade bei der Verwendung von Blut als zu analysierende Flüssigkeit sind steriles Arbeiten und die Vermeidung von Querkontaminationen sehr wichtig. Durch die Konzipierung eines solchen Testchips als Wegwerfprodukt wird die Gefahr von Querkontaminationen deutlich verringert. Photonische Kristalle lassen sich über Rolle-zu-Rolle-Verfahren oder mittels Spritzgusstechnik in Massen kostengünstig produzieren, weshalb sie für Wegwerfprodukte sehr gut geeignet sind [45], [46].



**Abbildung 1.2:** Konzept des hier präsentierten optischen Biosensors zur markerfreien und parallelen Detektion von mehreren Risikomarkern.

In Abbildung 1.2 ist das Konzept des in dieser Arbeit entwickelten Biosensors dargestellt. Eine kleine Menge Blut wird vom Patienten entnommen und auf den Testchip gegeben. Eine Filtermembran filtert alle roten Blutkörperchen heraus, so dass nur noch das klare Blutserum über Mikrofluidikkanäle zur Sensorkammer transportiert wird. In der Sensorkammer ist der photonische Kristall-Sensor eingelassen. Für eine spezifische und parallele Proteindetektion werden auf die Oberfläche des photonischen Kristalls tropfenweise verschiedene Rezeptoren kovalent gebunden.

Im Gegensatz zu den spektralen Messmethoden, die für die meisten photonischen Kristall-Sensoren verwendet werden, wird hier ein intensitätsbasiertes Messverfahren vorgestellt. Nazirizadeh et al. [22] konnten 2010 mit einer einfachen Photodiode und einer farbigen LED einen kompakten intensitätsbasierten Biosensor aufbauen. Die Idee der intensitätsbasierten Messmethodik wird in dieser Arbeit übernommen und so weiterentwickelt, dass eine parallele Detektion von mehreren Proteinen bildgebend durchgeführt werden kann.

Binden die Proteine aus dem Blut an die dazugehörigen Rezeptoren, verursacht dies an den Rezeptorpositionen eine Änderung des transmittierten Lichts, welche von einer einfachen CMOS-Kamera, wie sie in jedem Smartphone heutzutage eingebaut ist, detektiert werden kann. Die Möglichkeit, ein Smartphone als Messeinheit zu benutzen, macht diesen Ansatz noch interessanter für die patientennahe Diagnostik und Therapieverfolgung.

Es werden sowohl verschiedene Möglichkeiten eines Smartphone-Adapters als auch ein Kamera-basiertes Messgerät für die bildgebende Proteindetektion demonstriert. Es besteht in dieser Arbeit die Herausforderung, alle Einzelkomponenten aufeinander abzustimmen und zu einem funktionierenden Biosensor zusammenzubringen. Es werden die Ergebnisse der

Identifikation geeigneter Nanostrukturen im Signalumwandler über die Herstellung des Sensors samt der kovalenten Anbindung der Rezeptoren bis hin zum bildgebenden Messgerät und der Entwicklung eines Prototyps für einen Wegwerfchip sowie ein Auswertalgorithmus zur Hintergrundsignalunterdrückung gezeigt.

## 1.2. Gliederung

In Kapitel 2 werden zunächst die Grundlagen zu optischen Biosensoren, dann zu photonischen Kristallen und zu Fluoreszenz dargestellt. Zusätzlich wird der Stand der Forschung zu photonischen Kristallen in der markerfreien Biosensorik und zur resonanten Anregung von Fluorophoren vorgestellt und diskutiert.

Kapitel 3 beschreibt die Herstellung des photonischen Kristall-Biosensors. Es werden jeweils zwei Methoden zur Nanostrukturherstellung auf einem Glassubstrat und zur lokalen Immobilisierung von Rezeptoren auf die Oberfläche eines photonischen Kristalls präsentiert.

Anhand von Simulationen von unterschiedlichen Nanostrukturen und variierenden Strukturparametern in Kapitel 4 wird die optimale Struktur für die optische Biosensorik identifiziert. Mit entsprechenden Experimenten werden diese Simulationen zusätzlich verifiziert und das Verhalten der hergestellten photonischen Kristalle bezüglich Brechungsindexänderungen an der Oberfläche sowie die Winkelabhängigkeit genau charakterisiert.

Der hier entwickelte Biosensor und die Ergebnisse zur parallelen Detektion von mehreren Proteinen werden in Kapitel 5 demonstriert. Für eine bildgebende Detektion werden zwei verschiedene Ansätze untersucht. Der erste Ansatz bildet eine Transmissionsmessung, die mit einem Kamera-basierten Messgerät erfolgt. Der zweite Ansatz beinhaltet das Auslesen des Biosensors in Reflexion mit Hilfe eines Smartphones. Zwei Adapter-Designs werden dafür vorgestellt und genau charakterisiert. Im sechsten Kapitel wird ein Prototyp für einen Wegwerfchip zur markerfreien Proteindetektion in Blut präsentiert. Der Testchip wird hinsichtlich seiner Eigenschaften, Blut zu filtern, und Eignung zur bildgebenden Proteindetektion charakterisiert. Die erzielten Detektionsergebnisse von Biotin, gelöst in Puffer und in Blut, werden vorgestellt.

Die Erhöhung von Fluoreszenz durch mono- und zweiperiodische Gitter in nanostrukturierten Wellenleitern steht im Fokus des siebten Kapitels. Dafür werden zunächst die Resonanzeigenschaften in Abhängigkeit unterschiedlicher Designparameter untersucht. Des Weiteren werden Lumineszenzexperimente mit monoperiodischen Strukturen durchgeführt.

Abschließend erfolgt eine Zusammenfassung dieser Arbeit und ein Ausblick.



# Kapitel 2

## Photonische Kristalle in der optischen Biosensorik

---

### Zusammenfassung

*In der optischen Biosensorik können photonische Kristalle als Signalumwandler eingesetzt werden. Deshalb werden hier die theoretischen Grundlagen zu photonischen Kristallen und die Lichtausbreitung in solchen Kristallen erläutert. Des Weiteren werden der Stand der aktuellen Forschung und Sensorkonzepte, in denen photonische Kristalle zum Einsatz kommen, vorgestellt und die Vor- und Nachteile dieser Konzepte diskutiert. Weiterhin wird der Stand der Forschung zur Steigerung der Anregungseffizienz von Fluorophoren mittels photonischer Kristalle dargestellt.*

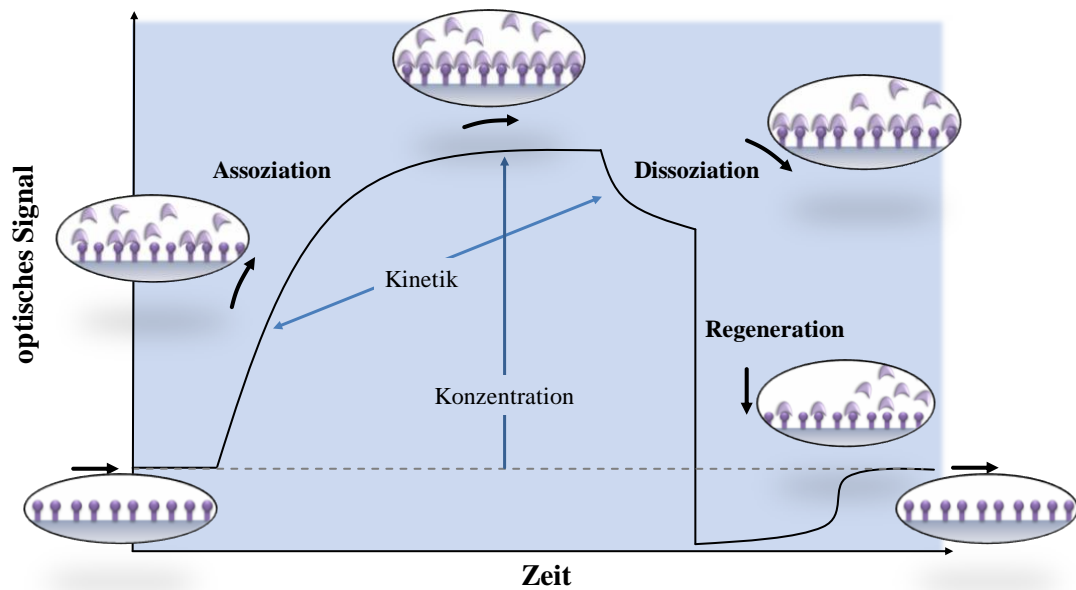
## 2.1. Optische Sensoren

Optische Sensoren gehören neben den elektrochemischen und mechanischen zu den drei Hauptkategorien in der Biosensorik. Im Vergleich zu den anderen Sensorarten liefern optische Sensoren nicht nur Informationen über das detektierte Zielprotein und die vorliegende Proteinkonzentration, sondern sie geben auch Aufschluss über das Bindungsverhalten an den Rezeptor. In Abbildung 2.1 ist ein typischer Signalverlauf für alle Phasen des Anbindungsprozesses gezeigt [47]. Zuerst wird die reine Flüssigkeit meist in Form von Puffer auf den Signalumwandler gegeben, um ein Basissignal zu erzeugen. Zu Demonstrationszwecken werden in der Forschung die Risikomarker zunächst nur in Puffer gelöst, damit das reine Bindungssignal verfolgt werden kann. Für spätere Anwendungen vor Ort beim Patienten würde dieser Teil wegfallen.

Gibt man nun die Flüssigkeit mit den Risikomarkern auf den Signalumwandler, kann die allmähliche Anbindung, auch Assoziation genannt, als Anstieg im optischen Signal verfolgt werden. Der Signalverlauf in Form einer exponentiellen Annäherung ist für die Phase der Assoziation typisch. Wenn alle Rezeptorstellen belegt sind, geht das Signal entsprechend in Sättigung. Wird die Sensoroberfläche dann wieder mit reinem Puffer gewaschen, kann es je nach Rezeptorart zu einem leichten Ablösen der Risikomarker (Dissoziation) und somit zu einer Verringerung des optischen Signals kommen. Bei der Verwendung von Aptameren als Rezeptor kann die Sensorfläche über den Einsatz von leicht sauren oder basischen Puffern vollständig regeneriert werden: die gebundenen Marker werden abgelöst und der Sensor kann in Folge dessen für erneute Messungen verwendet werden [48]. Wird hingegen Streptavidin als Rezeptor eingesetzt, um das Protein Biotin zu detektieren, ist die Regeneration des Sensors nicht ohne weiteres möglich. Der Bindungskomplex Streptavidin-Biotin besitzt soweit bekannt die stärkste, nicht-kovalente, biologische Bindungsenergie, weshalb hier auch nur eine Assoziationsphase beobachtet werden kann [49].

Die Signalverläufe sowohl Marker-basierter als auch markerfreier Biosensoren spiegeln die einzelnen Phasen der Proteinanbindung wieder, weshalb diese Sensoren letztendlich für die Untersuchung der Bindungskinetik zwischen Rezeptor und Zielprotein gut geeignet und für verschiedene Bereiche in der Biowissenschaft anwendbar sind.

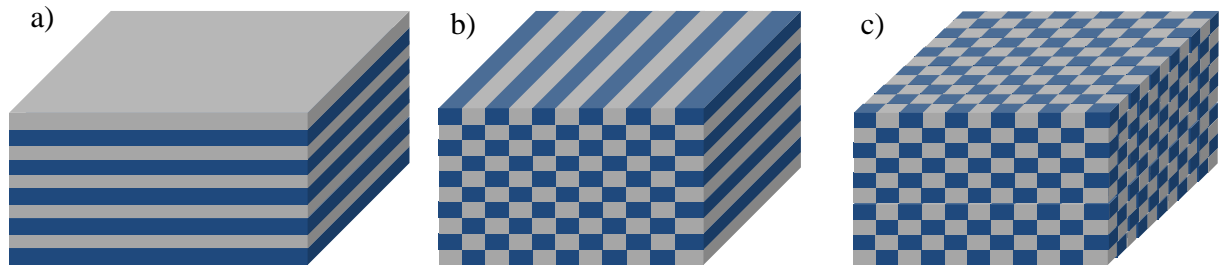




**Abbildung 2.1:** Typischer Signalverlauf eines optischen Sensors für den gesamten Anbindungsprozess eines Zielproteins an den Rezeptor mit anschließender Regeneration des Sensors (nach [47]).

## 2.2. Grundlagen zu photonischen Kristallen und Wellenleitertheorie

Photonische Kristalle bilden als Signalumwandler die Basis für den hier entwickelten optischen Biosensor. Photonische Kristalle bestehen aus dielektrischen Materialien mit unterschiedlichem Brechungsindex, die sich mit einer Periode in der Größenordnung der Lichtwellenlänge wiederholen. Sie können aufgrund dieser Eigenschaften die Ausbreitung des Lichts beeinflussen. Photonische Kristalle werden anhand der räumlichen Anordnung der dielektrischen Materialien in drei Hauptgruppen unterschieden: 1-dimensionale, 2-dimensionale und 3-dimensionale Kristalle. Die dielektrischen Materialien variieren bei 1-dimensionalen photonischen Kristallen in nur einer Raumrichtung, wodurch die Lichtausbreitung entsprechend nur in eine Raumrichtung beeinflusst werden kann (Abbildung 2.2a). Bei 2-dimensionaler Anordnung variieren die Materialien in zwei Raumrichtungen und bei 3-dimensionaler in drei Raumrichtungen. Dementsprechend kann die Lichtausbreitung dort in zwei bzw. drei Raumrichtungen beeinflusst werden.



**Abbildung 2.2:** Schematische Darstellung eines a) 1-dimensionalen, b) 2-dimensionalen und c) 3-dimensionalen photonischen Kristalls. Die Farben grau und blau repräsentieren Materialien mit unterschiedlichen Brechungsindices. Die periodische Wiederholung der zwei Materialien in ein oder mehrere Richtungen ist für die Eigenschaft von photonischen Kristallen entscheidend (nach [50]).

Da Licht als elektromagnetische Welle beschrieben werden kann, beschreiben die Maxwell'schen Gleichungen die Ausbreitung des Lichts in photonischen Kristallen. Sie sind definiert als [50]:

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0 \quad (\text{Gl. 2.1})$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} + \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} = 0 \quad (\text{Gl. 2.2})$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{D} = \rho \quad (\text{Gl. 2.3})$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{H} - \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} = \vec{j} \quad (\text{Gl. 2.4})$$

Dabei handelt es sich bei  $\rho$  um die elektrische Raumladungsdichte und  $\vec{j}$  um die elektrische Stromdichte. Die elektrische und magnetische Feldstärke  $\vec{E}$  bzw.  $\vec{H}$  sind mit den jeweiligen Flussdichten  $\vec{D}$  und  $\vec{B}$  über die Materialgleichungen verknüpft.

$$\vec{D} = \varepsilon_0 \varepsilon_r(\vec{r}) \vec{E} \quad (\text{Gl. 2.5})$$

$$\vec{B} = \mu_0 \mu_r(\vec{r}) \vec{H} \quad (\text{Gl. 2.6})$$

Dabei beschreibt  $\varepsilon_0 \approx 8,854 \cdot 10^{-12} \frac{\text{As}}{\text{Vm}}$  die elektrische und  $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} \frac{\text{N}}{\text{A}^2}$  die magnetische Feldkonstante. Die relative Permittivität  $\varepsilon_r(\vec{r})$  und die relative Permeabilität  $\mu_r(\vec{r})$  sind im Allgemeinen ortsabhängig (Ortsvektor  $\vec{r}$ ). Zur Vereinfachung kann von einem nichtmagnetischen, ladungsfreien und quellenfreien Medium ausgegangen werden. Dadurch

gilt für die relative Permeabilität  $\mu_r(\vec{r})=1$ , die Raumladungsdichte  $\rho = 0 \frac{As}{m^3}$  und die Stromdichte  $\vec{J} = 0 \frac{A}{m^2}$ . Des Weiteren werden harmonische Schwingungen als Lichteigenschaft angenommen. Unter der Annahme harmonischer Zeitvorgänge und durch die Kombination des quellenfreien Faradaygesetzes und des Ampèreschen Gesetzes bei einer festen Kreisfrequenz  $\omega$  erhält man die folgende Gleichung, die in der Literatur auch als Mastergleichung bekannt ist [50], [51]

$$\vec{\nabla} \times \left( \frac{1}{\varepsilon_r(\vec{r})} \vec{\nabla} \times \vec{H}(\vec{r}) \right) = \left( \frac{\omega}{c} \right)^2 \vec{H}(\vec{r}) \quad (\text{Gl. 2.7})$$

mit der Lichtgeschwindigkeit  $c = \frac{c_0}{\sqrt{\varepsilon_r \mu_r}} \equiv \frac{c_0}{n}$  (Vakuumlichtgeschwindigkeit  $c_0 = 2,998 \cdot 10^8 \frac{m}{s}$ , Brechungsindex  $n$ ). Mit dieser Eigenwertgleichung kann nun die Feldverteilung  $\vec{H}(\vec{r})$  als Eigenfunktion und die dazugehörigen Frequenzen aus den Eigenwerten für jede dieser photonischen Kristallstrukturen berechnet werden. Photonische Kristalle entsprechen einer periodischen dielektrischen Funktion  $\varepsilon(\vec{r}) = \varepsilon(\vec{r} + \vec{R}_l)$  für einen beliebigen Gittervektor  $\vec{R}_l$  ( $l = 1, 2, 3$  für eine Kristallperiodizität in alle drei Raumrichtungen). Laut dem Bloch-Floquet Theorem für periodische Eigenwerte können die Lösungen aus Gleichung 2.7 mit den Eigenwerten  $\omega_n(\vec{k})$  in der Form

$$\vec{H}(\vec{r}) = H_{0,\vec{k}}(\vec{r}) \cdot \exp(j\vec{k}\vec{r}) \quad (\text{Gl. 2.8})$$

$$\vec{E}(\vec{r}) = E_{0,\vec{k}}(\vec{r}) \cdot \exp(j\vec{k}\vec{r}) \quad (\text{Gl. 2.9})$$

beschrieben werden [51], wobei es sich bei  $H_{0,\vec{k}}(\vec{r})$  bzw.  $E_{0,\vec{k}}(\vec{r})$  um die periodischen Einhüllendenfunktionen und bei  $\vec{k}$  um den Bloch-Wellenvektor handelt. Somit ist das elektromagnetische Feld aufgrund der Periodizität des Mediums ebenfalls periodisch im Raum. Der Wellenvektor zeigt in die Energiefluss- und somit in die Ausbreitungsrichtung des Lichtes. Für den Betrag des Wellenvektors  $k_0$  gilt

$$k_0 = \frac{\omega}{c} = \frac{2\pi}{\lambda_0} \quad (\text{Gl. 2.10})$$

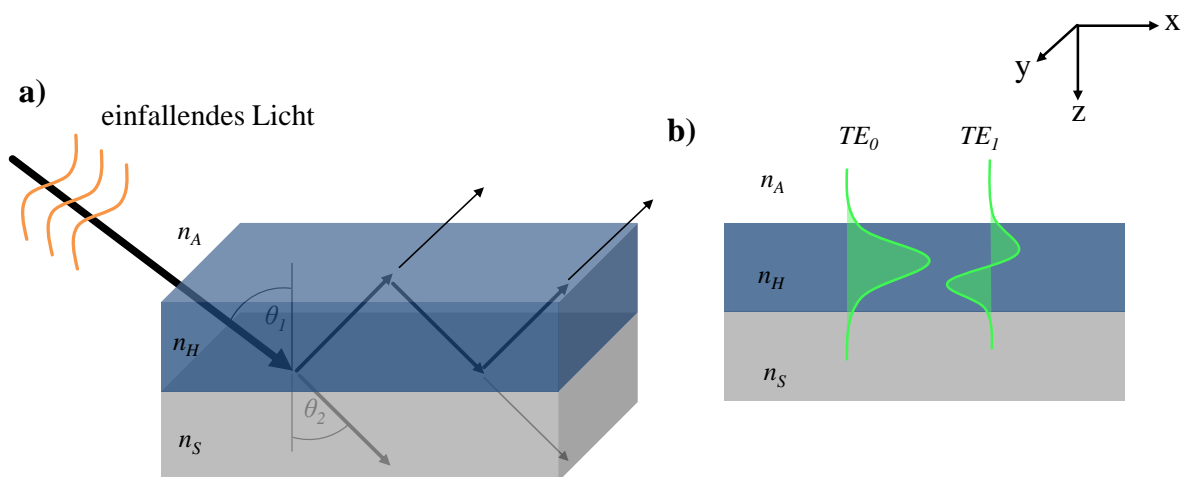
mit der Lichtwellenlänge  $\lambda_0$  im Vakuum. Im Fall einer ebenen Lichtwelle, die für die spätere simulative Betrachtung der Nanostrukturen als Anregung verwendet wird, sind die Zeiger  $\vec{E}$  und  $\vec{H}$  die Normalen von  $\vec{k}$ , so dass alle drei Vektoren orthogonal zueinander stehen.

Befindet sich ein hochbrechendes Medium (Wellenleiter) ( $n_H > n_S > n_A$ ) auf einem Substrat ( $n_S$ ), wie es in Abbildung 2.3a schematisch dargestellt ist, wird die ebene Welle

seitlich in den Wellenleiter eingekoppelt und trifft dann auf die Grenzfläche zwischen Wellenleiter und Substrat, wird im Allgemeinen ein Teil des Lichts reflektiert und ein Teil transmittiert [52]. Der Zusammenhang zwischen dem Winkel des einfallenden ( $\theta_1$ ) und des transmittierten ( $\theta_2$ ) Lichts ist über das Snellius'sche Brechungsgesetz beschrieben:

$$n_H \cdot \sin(\theta_1) = n_S \cdot \sin(\theta_2) \quad (\text{Gl. 2.11})$$

Wie groß die Amplitude des reflektierten bzw. transmittierten Lichts ist, wird sowohl über den Einfallswinkel als auch über die Änderung des Brechungsindex an der Grenzfläche sowie über die Polarisation des einfallenden Lichts berechnet [52]. Die Polarisation gibt hier die Schwingungsrichtung des Lichts an. Es wird hierbei zwischen transversalelektrischer (TE) und transversalmagnetischer (TM) Polarisation unterschieden. Bei TE-Polarisation steht der Zeiger des elektrischen Feldes  $\vec{E}$  senkrecht auf der Einfallsebene, die durch den Wellenvektor  $\vec{k}$  und der Flächennormalen festgelegt ist. Ist hingegen der Zeiger des magnetischen Feldes  $\vec{B}$  senkrecht zur Einfallsebene, so liegt TM-Polarisation vor [53].



**Abbildung 2.3:** a) Planarer Wellenleiter auf einem Substrat und das Prinzip, wie Licht seitlich eingekoppelt wird und teilweise im Wellenleiter geführt wird ( $n_A < n_S < n_H$ ); b) Schematische Darstellung der Modenprofile für die  $TE_0$ - und  $TE_1$ -Mode.

Der reflektierte Lichtstrahl trifft nun auf die Grenzfläche zwischen dem Wellenleiter und dem umgebenden Material und wird dort wieder partiell reflektiert und transmittiert. Somit wird das Licht in solchen Strukturen teilweise geführt.

In planaren Wellenleitern, wie in Abbildung 2.3 gezeigt, vereinfacht sich der Ausdruck für ausbreitungsfähige Moden aus Gleichung 2.9 für diese Strukturen zu [54]:

$$E(\vec{r}) = \vec{E}(z) \cdot \exp(-jk_x x) \quad (\text{Gl. 2.12})$$

$\vec{E}(z)$  wird als Modenprofil bezeichnet und tritt auf, wenn die Mode sich in x- Richtung ausbreitet. Die Ausbreitungsfähigkeit der Mode in solchen planaren Wellenleitern ist stark vom effektiven Brechungsindex  $n_{eff}$  abhängig. Dieser ist wiederum über die Ausbreitungskonstante der Mode  $k_x$  definiert als:

$$n_{eff} = \frac{k_x}{k_0} \quad (\text{Gl. 2.13})$$

Nach der Resonanzbedingung muss sowohl  $k_x \geq k_0 n_A$  als auch  $k_x \geq k_0 n_S$  erfüllt sein [53]. Wie Abbildung 2.3b am Beispiel der TE<sub>0</sub>- und TE<sub>1</sub>-Mode schematisch zeigt, besitzen geführte Moden einen exponentiell abklingenden, evaneszenten Anteil (evaneszente Welle) an den beiden Grenzflächen des Wellenleitermaterials. An der Grenzfläche des Wellenleiters zur umgebenden Luft ragt diese evaneszente Welle aus dem Wellenleiter heraus. Ändert sich nun der Brechungsindex bedingt durch Proteinanbindungen an der Oberfläche, ändert sich aufgrund der evaneszenten Welle der effektive Brechungsindex, weswegen die Mode gegenüber Brechungsindexänderungen an der Oberfläche empfindlich ist.

In der Regel werden nicht nur eine, sondern zwei oder mehrere Lichtmoden im Wellenleiter geführt. Diese überlagern sich dann nach dem Superpositionsprinzip. Es kann dadurch eine konstruktive oder destruktive Interferenz der Wellen auftreten. Bei vollkommener konstruktiver Interferenz wird bei gleicher Amplitude der einzelnen Wellen die Amplitude der resultierenden Welle verdoppelt, während bei vollkommener destruktiver Interferenz völlige Auslöschung der Gesamtwelle auftritt [52].

Dieser Effekt tritt auch bei photonischen Kristallen auf und wird als photonische Bandlücke bezeichnet. Für 1-dimensionale photonische Kristalle folgen die Bandlücken der 1D Bragg-Bedingung [55]:

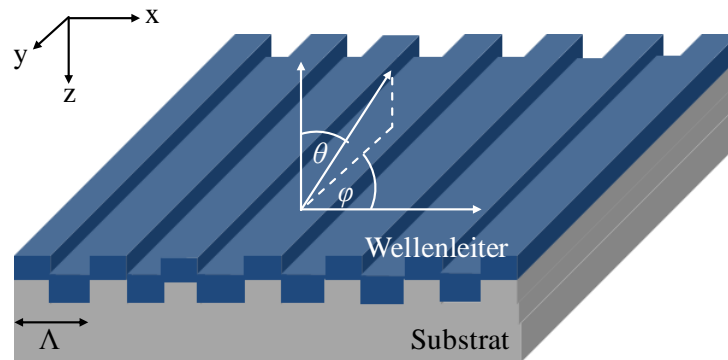
$$m \cdot \lambda_0 = 2 \cdot n_{eff} \cdot \Lambda \quad m = 1, 2, \dots \quad (\text{Gl. 2.14})$$

Dabei beschreiben  $\Lambda$  die Periodizität der Struktur und  $m$  die Beugungsordnung. Die Gleichung 2.14 beschreibt demnach die einzelnen Wellenlängen also die photonischen Bandlücken, in denen sich die Moden nicht ausbreiten.

Im Folgenden wird die Ausbreitung von Moden anhand von linearen einperiodischen Gitterstrukturen in photonischen Kristallen erläutert.

## 2.2.1. Lineare einperiodische Gitterstrukturen

Die in dieser Arbeit verwendeten photonischen Kristalle bestehen aus einem Glassubstrat, auf dem eine lineare Gitterstruktur aufgebracht wird, und einer dadurch strukturierten Wellenleiterschicht, wie in Abbildung 2.4 schematisch dargestellt ist.



**Abbildung 2.4:** Schematische Darstellung eines planaren photonischen Kristalls mit einer linearen, 1-dimensionalen Gitterstruktur und der Winkeldefinition.

Hierbei handelt es sich um einen planaren photonischen Kristall<sup>1</sup>, bei dem sich das Medium und somit der Brechungsindex ausschließlich in x-Richtung mit einer Periode  $\Lambda$  ( $\epsilon(\vec{r}) = \epsilon(\vec{r} + \Lambda)$ ) ändert. Dadurch ist ebenfalls die Ortsabhängigkeit aller Komponenten, die das elektrische und das magnetische Feld beschreiben, beschränkt [54].

In dem nanostrukturierten Wellenleiter werden quasi-geführte Moden (QGM) unterstützt. Die QGMs sind nicht vollständig innerhalb des Kristalls gebunden, sondern besitzen Feldanteile außerhalb der Wellenleiterschicht. Somit koppeln sie zum Fernfeld und sind deshalb als Resonanzen mit der zentralen Wellenlänge  $\lambda_{res}$  im optischen Spektrum sichtbar und können sowohl in Reflexion als auch in Transmission angeregt werden. Licht einer QGM wird durch die Gitterstruktur entlang der Achse senkrecht zu den Gittervertiefungen gestreut. Dieser Streuprozess kann über die Gleichung [56]

$$k_{mode}^2 = (mk_{Gx} - k_0 \sin(\theta) \cos(\varphi))^2 + (k_0 \sin(\theta) \sin(\varphi))^2 \quad (\text{Gl. 2.15})$$

mit dem Gittervektor  $k_{Gx} = 2\pi/\Lambda$ , dem Einfallswinkel des Lichts  $\theta$  und dem Winkel  $\varphi$  zwischen der Ausbreitungsrichtung der Mode und den Linien des Gitters beschrieben werden. Unter der Annahme, dass  $k_{mode} = n_{eff}/\lambda_{res}$  erfüllt ist, für QGMs  $k_0 = 2\pi/\lambda_{res}$  gilt und

<sup>1</sup> Im Folgenden wird diese Art von Kristall als photonischer Kristall bezeichnet.

unter der Beschränkung auf die ersten Ordnungen mit  $m = 1$ , kann die Gleichung 2.15 wie folgt vereinfacht werden.

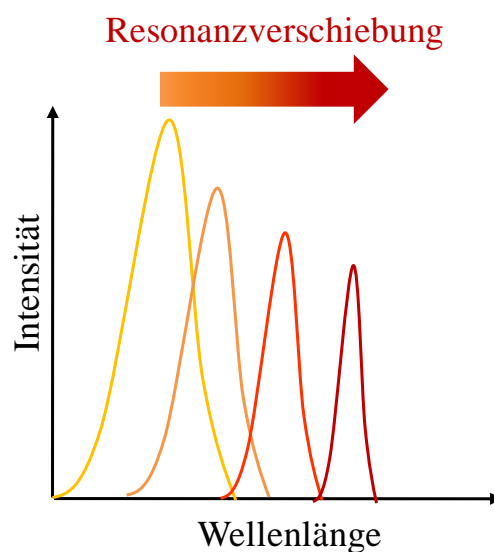
$$\lambda_{res} = \Lambda \cdot \sin(\theta) \cdot \cos(\varphi) \pm \Lambda \cdot \sqrt{n_{eff}^2 - \sin^2(\theta) \cdot \sin^2(\varphi)} \quad (\text{Gl. 2.16})$$

Mit dieser Gleichung wird die Position der Resonanz in Abhängigkeit der Winkel  $\theta$  und  $\varphi$ , der Gitterperiode und des Brechungsindex berechnet. Der effektive Brechungsindex kann für solche Strukturen über

$$n_{eff} = \sqrt{\frac{\int_{-\infty}^{\infty} \int_0^{\Lambda} \varepsilon(x, z) \cdot |E(x, z)|^2 dx dz}{\int_{-\infty}^{\infty} \int_0^{\Lambda} |E(x, z)|^2 dx dz}} \quad (\text{Gl. 2.17})$$

mit  $|E(x, z)|^2$  dem Betragsquadrat der räumlichen Verteilung des elektrischen Feldes und  $\varepsilon(x, z)$  der räumlichen Verteilung der Permittivität definiert werden [57]. Wenn also Proteine an die Oberfläche eines photonischen Kristalls binden, interagiert der evaneszente Anteil der QGMs mit den Proteinen und erzeugt eine Erhöhung der Permittivität des umgebenden Materials und somit des effektiven Brechungsindex, wodurch sich wiederum die Position der Resonanz nach Gl. 2.16 ändert. In Abbildung 2.5 ist eine Resonanz und die Änderung der Position aufgrund der Steigerung von  $n_{eff}$  schematisch dargestellt. Wie stark die Resonanz spektral auf die Brechungsindexänderung  $\Delta n$  reagiert, wird anhand der Empfindlichkeit  $S$  beschrieben.

$$S = \frac{\Delta \lambda_{res}}{\Delta n} \quad (\text{Gl. 2.18})$$



**Abbildung 2.5:** Schematische Darstellung von der Resonanzverschiebung bedingt durch die Erhöhung des effektiven Brechungsindex.

Neben der Resonanzverschiebung bewirkt die Anbindung der Proteine eine Reduzierung des Brechungsindexkontrastes zwischen dem Wellenleitermaterial und der Substanz an der Kristalloberfläche, was in einer geringeren Resonanzbreite und somit zu einer höheren Resonanzgüte  $Q$  führt [58], [59]. Die Güte der Resonanz wird über den Quotienten zwischen der Resonanzposition  $\lambda_{res}$  und der Halbwertsbreite der Resonanz (engl. *full width at half maximum*, *FWHM*) beschrieben.

$$Q = \frac{\lambda_{res}}{FWHM} \quad (\text{Gl. 2.19})$$

Für photonische Kristalle aus leicht absorbierenden Materialien führt die Erhöhung der Resonanzgüte zusätzlich zu einer Reduzierung der Resonanzintensität, weil die QGM länger mit dem absorbierenden Material interagiert [59], [60]. Beide Effekte resultieren in einer reduzierten Gesamtintensität der Resonanz, die mit einem intensitätsbasierten Messsystem verfolgt werden kann. Um geringe Konzentrationen von Proteinen und somit eine geringe Brechungsindexänderung nachweisen zu können, sind eine möglichst hohe Gütenänderung und eine gute Empfindlichkeit essentiell für solche intensitätsbasierte Messverfahren.

### 2.2.2. Lineare multi- und aperiodische Gitterstrukturen

Bei den bisher betrachteten Nanostrukturen handelte es sich um streng periodische Strukturen in einem photonischen Kristall. Wie in Kapitel 4.1 später näher dargestellt wird, können bei diesen Strukturen nur die Parameter wie Schichtdicke des Wellenleiters, Periodizität des Gitters, Gittertiefe und das Verhältnis von Stegbreite zu Gesamtperiode zur Empfindlichkeitssteigerung variiert werden. Es wurde zwar schon gezeigt, dass eine deutliche Empfindlichkeitssteigerung durch schräges Aufbringen des Wellenleitermaterials erreicht werden kann [61], jedoch sind die Variationsmöglichkeiten bei streng periodischen Strukturen damit nahezu ausgeschöpft. In der aktuellen Forschung widmet man sich deshalb stärker deterministisch aperiodisch strukturierten Wellenleitern. Zur Anwendung solcher aperiodischer Strukturen in der Biosensorik gibt es bereits mehrere Untersuchungen. Eine starke Lokalisierung der Mode und eine damit einhergehende lokale Erhöhung der Feldstärke konnte festgestellt werden [62]–[64]. Auch konnte experimentell gezeigt werden, dass diese photonischen Quasikristalle Resonanzen ausbilden können [65]. An diesen Ansatz wird in dieser Arbeit angeknüpft und deterministisch aperiodische Strukturen in photonischen Quasikristallen für die Biosensorik analysiert. Deterministisch aperiodische Strukturen besitzen keine Periodizität, folgen aber einem festen Schema. Es werden z.B. mathematische



Folgen dafür in binäre Sequenzen übertragen, so dass eine „1“ das Wellenleitermaterial und „0“ das Substrat repräsentiert. In dieser Arbeit werden exemplarisch die Fibonacci-, Rudin-Shapiro- und die Morsefolge in photonischen Quasikristallen untersucht.

Die Fibonacci-Folge lässt sich wie folgt als binäre Sequenz entwickeln:

$$F_{j+1} = [F_{j-1}, F_j] \quad \text{mit} \quad j \geq 1 \quad \text{und} \quad F_0 = [1] , F_1 = [0] \quad (\text{Gl. 2.20})$$

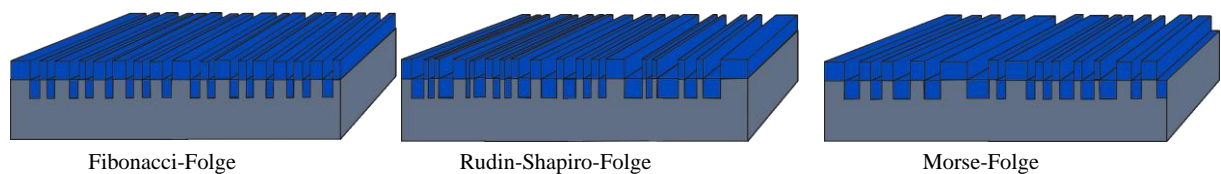
Die besondere Eigenschaft der Rudin-Shapiro-Folge ist die geringe Selbstähnlichkeit, womit sie einer kompletten Unordnung gleicht. Sie wird über die folgende Substitutionsregel aufgebaut:

$$[1,1] \rightarrow [1,1,0,0], \quad [1,0] \rightarrow [1,1,0,1], \quad [0,1] \rightarrow [0,0,1,0], \quad [0,0] \rightarrow [0,0,0,1] \quad (\text{Gl. 2.21})$$

Die dritte Folge, die Morse-Folge, beginnt mit der binären Sequenz [1,1] und wird iterativ substituiert.

$$[1] \rightarrow [1,0], \quad [0] \rightarrow [0,1] \quad (\text{Gl. 2.22})$$

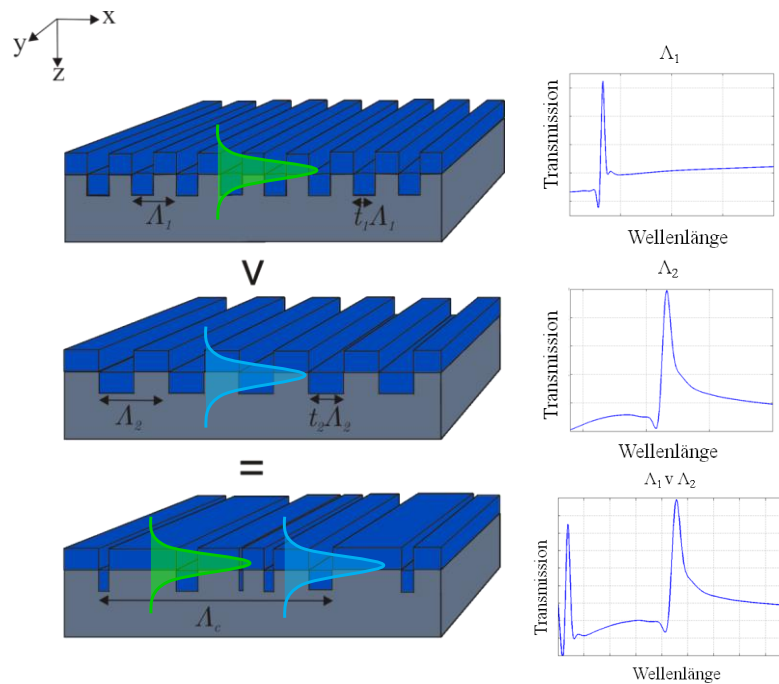
Mit den Ergebnissen aus den Gleichungen 2.20 – 2.22 können nun die Gitterstrukturen aufgebaut werden. In Abbildung 2.6 werden die resultierenden Quasikristalle schematisch gezeigt.



**Abbildung 2.6:** Schematische Darstellung der Fibonacci-, und Rudin-Shapiro- und der Morse-Folge realisiert als Gitterstruktur in photonischen Quasikristallen.

Zusätzlich zu den rein periodischen und aperiodischen Gitterstrukturen, werden multiperiodische Strukturen auf ihre Eignung als Signalumwandler simulativ und experimentell überprüft. Multiperiodische Gitterstrukturen wurden von Kluge et al. [66], [67] in organischen Leuchtdioden (OLED) zur Steigerung der Leuchteffizienz vorgestellt. Sie entstehen durch eine logische ODER-Verknüpfung von zwei oder mehreren einperiodischen Gitterstrukturen, wie in Abbildung 2.7 gezeigt. Die resultierende Struktur besitzt im Wesentlichen die Eigenschaften der einzelnen Perioden, nur dass nun die Periode durch die Überlagerung der Einzelperioden deutlich größer ausfällt und über das gemeinsame kleinste Vielfache der Ausgangsstrukturen vorgegeben ist [53]. Multiperiodische Gitterstrukturen

weisen deshalb mehrere Resonanzen im optischen Spektrum auf. Die zentralen Wellenlängen der dominanten Resonanzen werden hauptsächlich durch die Ausgangsgitterstrukturen vorgegeben. Allerdings können durch die Überlagerung der einzelnen Perioden aber auch Resonanzen bei anderen Wellenlängen auftreten .



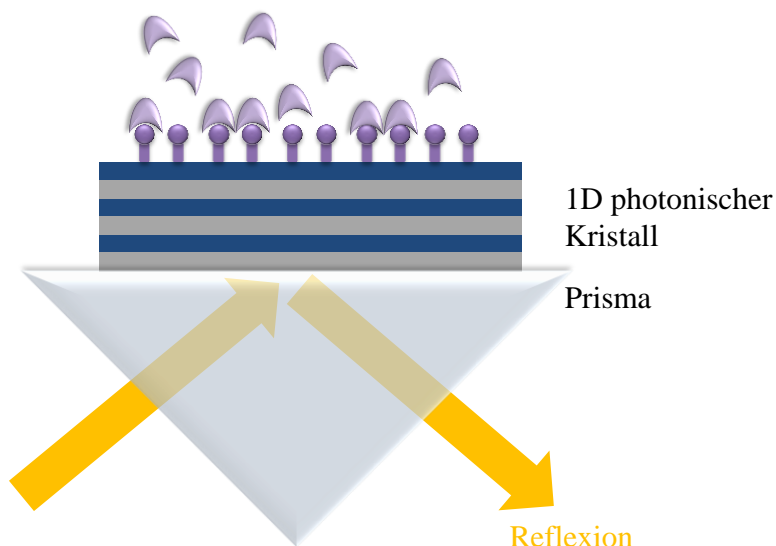
**Abbildung 2.7:** Funktionsprinzip zur Erzeugung von multiperiodischen Gitterstrukturen (links) und die aus der Simulation resultierenden Resonanzen zu den einzelnen Gitterstrukturen (rechts).

## 2.3. Photonische Kristalle als Signalumwandler in der markerfreien Biosensorik

Photonische Kristalle als Signalumwandler sind eine geeignete Plattform für vielseitige Anwendungen im Bereich der Sensorik. Überall, wo eine Brechungsindexänderung oder der Brechungsindex selbst bestimmt werden muss, können photonische Kristalle eingesetzt werden. Dabei reicht das Anwendungsgebiet von der Bestimmung der Brechungsindexdispersion von Flüssigkeiten [68] über Untersuchung von Zellen [69]–[71] bis hin zur Erkennung von Risikomarkern [72]–[74]. All diese Konzepte nutzen den evaneszenten Anteil der QGM, der aus der Wellenleiterschicht in das umgebende Medium ragt. Der evaneszente Anteil interagiert dann mit dem zu untersuchendem Medium und

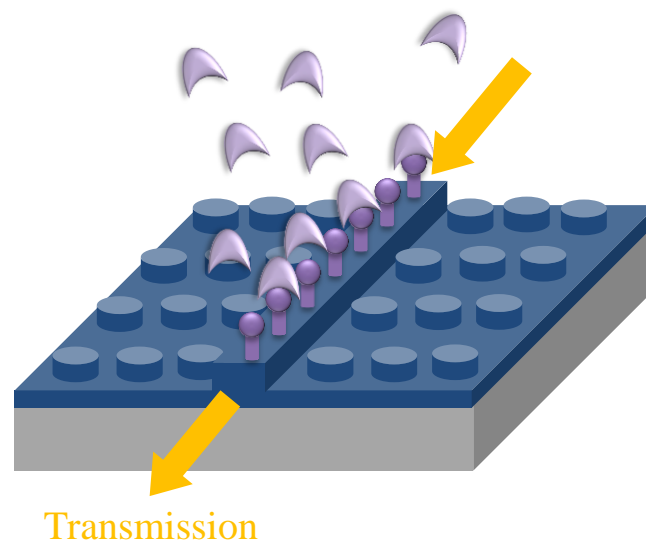
reagiert darauf mit einer Änderung im optischen Spektrum. Es gibt viele verschiedene Arten bzw. Bauweisen von photonischen Kristall-Sensoren [35].

Als erstes sind die Sensoren auf Basis von 1-dimensionalen photonischen Kristallen, die bereits in Kapitel 2.2 vorgestellt wurden, zu nennen. Sie bestehen aus einem Schichtaufbau von zwei Materialien mit unterschiedlichen Brechungsindizes [75], [76]. Wie in der Abbildung 2.8 schematisch dargestellt ist, wird ein 1D photonischer Kristall mit einem Prisma so angeordnet (Kretschmann-Anordnung), dass an der Oberfläche Totalreflexion entsteht und die angeregte evaneszente Welle mit den Risikomarkern an der Oberfläche interagieren kann [77]. Die Anbindung der Risikomarker kann dann im Spektrum des reflektierten Lichts als Resonanzverschiebung detektiert werden. Dieser Aufbau ist zwar kompakt realisierbar, jedoch wird immer ein Spektrometer zum Auslesen dieses Sensors benötigt. Aus diesem Grund können mit so einem Setup mehrere Proteine weder spezifisch noch parallel nachgewiesen werden, wodurch es zu kostenintensiv für patientennahe Anwendungen ist. Alternativ zu der beschriebenen Methode können mehrere dieser Sensoren als Array angeordnet werden, um dann eine multiparametrische Detektion zu ermöglichen. Jedoch müssten zum einen die Resonanzen der einzelnen Kristalle an unterschiedlichen spektralen Positionen liegen und gut voneinander unterscheidbar sein, um nur ein einziges Spektrometer als Detektor für eine spezifische Detektion zu benötigen. Zum anderen erhöht sich dadurch die Komplexität eines potentiellen Testchips.



**Abbildung 2.8:** Funktionsprinzip eines Biosensors auf Basis eines 1D photonischen Kristalls.

Die nächste Gruppe bilden die photonischen Kristall-Wellenleiter. Ein linearer Wellenleiter befindet sich als Defekt in einer 2-dimensionalen Gitterstruktur eines photonischen Kristalls (Abbildung 2.9). In diese Struktur kann nur eine gewisse Bandbreite von Licht einkoppeln und wird dann wie bei den üblichen planaren Wellenleitern in dem Wellenleiter geführt. Das Licht ist dann vertikal durch interne Totalreflexion und lateral durch die Bandlücken des 2D photonischen Kristalls begrenzt. Binden nun Proteine an den Wellenleiter, ändert sich bekanntermaßen der Brechungsindex an der Oberfläche. Dadurch erfährt die Bandlücke und somit die detektierte Wellenlänge eine Verschiebung in Richtung höherer Wellenlängen [78], [79]. Die Herstellung auf Waferebene und die damit verbundene Möglichkeit, mehrere dieser photonischen Kristall-Wellenleiter auf sehr kleinen Raum zu prozessieren, ist hier ein großer Vorteil gegenüber den 1D photonischen Kristall-Sensoren. Nachteilig ist hingegen die benötigte Optik zum Einkoppeln des Lichts für die Integration in einen Testchip.

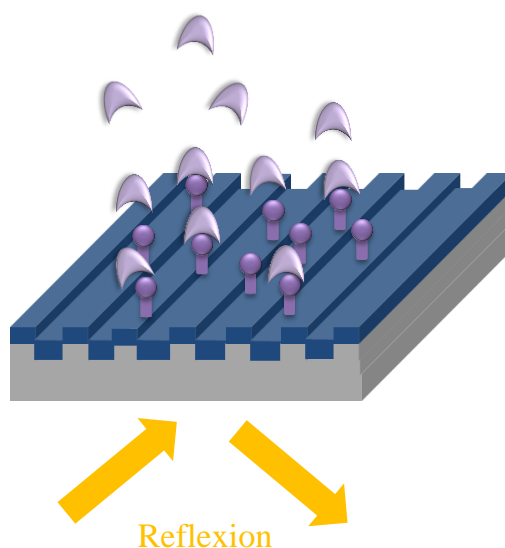


**Abbildung 2.9:** Schematischer Aufbau eines photonischen Kristall-Wellenleiters.

Biosensoren aus linearen planaren photonischen Kristallen können sowohl in Reflexion als auch in Transmission betrieben werden. Auf einem Substrat wird eine lineare Gitterstruktur aufgebracht und darauf das Wellenleitermaterial über Depositionsverfahren abgeschieden (Abbildung 2.10). Wie in Kapitel 2.2 detaillierter beschrieben wurde, resultiert die Brechungsänderung an der Oberfläche bedingt durch Proteinanbindungen in einer Resonanzverschiebung. Durch z.B. Cunningham et al. [80] und Magnusson et al. [73] wurde die Funktionsfähigkeit dieses Prinzips, Proteine mit einem planaren photonischen Kristall zu detektieren, erfolgreich demonstriert. Über spektrale Detektion konnten zudem bereits

26 ng/ml des Proteins Ferritin mit so einem Sensor gezeigt werden [33]. Somit ist dieser Sensor in der Lage für die Diagnostik relevante Markerkonzentrationen zu detektieren. Jedoch erfolgte hier der Nachweis mit Nanopartikeln, an deren Oberflächen Ferritin-Antikörper funktionalisiert wurden. Die Nanopartikel wurden über Antikörper an das Ferritin und der gesamte Komplex an die funktionalisierte Kristalloberfläche gebunden. Deswegen kann hier eigentlich nicht von einer markerfreien Detektion gesprochen werden. Generell bedienen sich die meisten dieser Biosensorkonzepte eines Spektrometers als Detektor. Die Umformung der Resonanzverschiebung in eine Intensitätsänderung, wie sie Nazirizadeh et al. [22] erstmals demonstriert haben, ermöglicht eine deutlich kompaktere und stärker integrierte Bauweise des Auslesesystems. Durch die Platzierung eines photonischen Kristalls zwischen zwei gekreuzten linearen Polarisationsfiltern, wird nahezu das gesamte Anregungslicht unterdrückt während nur das Licht, was mit dem photonischen Kristall interagiert, zu einer einfachen Fotodiode geleitet wird und hier aufgenommen werden kann. Mit diesem Aufbau konnte die Assoziation von 2,5 nmol/l des Proteins Biotin detektiert werden.

Ein weiterer Vorteil von planaren photonischen Kristallen besteht in ihrer Gitterstruktur, durch die solche photonischen Kristalle auch großflächig prozessiert werden können [81]. So kann die gesamte Oberfläche des photonischen Kristalls für die Proteindetektion verwendet werden, indem mehrere Rezeptoren lokal angebunden werden und eine parallele Detektion stattfinden kann.

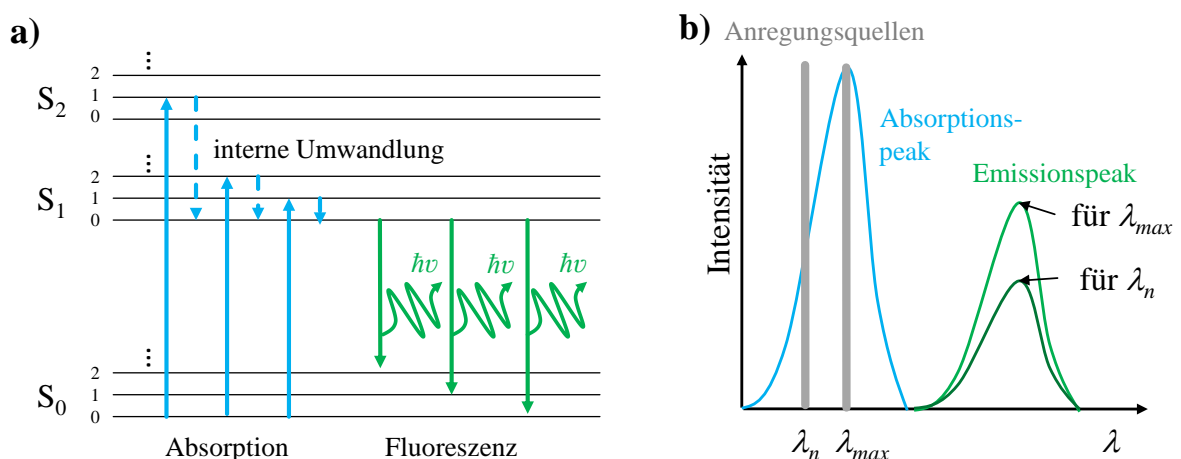


**Abbildung 2.10:** Schematischer Aufbau eines planaren photonischen Kristall-Biosensors.

## 2.4. Photonische Kristalle zur resonanten Anregung von Fluorophoren

### 2.4.1. Grundlagen zu Fluoreszenz

Die Detektion von Fluoreszenz ist in der Biosensorik weit verbreitet und eine der etabliertesten Techniken in der Biowissenschaft. Die Funktionsweise von Fluoreszenz kann anhand eines Jabłoński-Diagramms erklärt werden (Abbildung 2.11a). Wird ein Fluorophor durch die Absorption eines Photons optisch angeregt, wird das Fluorophormolekül, welches sich im Grundzustand im Energieband  $S_0$  befindet, energetisch auf ein höheres Energieniveau  $S_1$  gehoben. Das höhere Energieniveau ist äußerst instabil, weswegen das Molekül nach nur kurzer Zeit wieder in den Grundzustand zurückfällt und dabei die aufgenommene Energie wieder abgibt. Der Vorgang des Zerfalls (Relaxation) geschieht auf zwei Weisen, strahlungsfrei oder strahlend. Bei der strahlungsfreien Relaxation gibt das Molekül die Energie beispielsweise über quantisierte Gitterschwingungen (Phononen) ab, bis es das niedrigste Energieniveau des Energiebandes  $S_1$  erreicht hat. Dies wird auch als interne Umwandlung bezeichnet. Befindet sich nun das Molekül in einem sogenannten Singlettzustand, ist der Übergang in den Grundzustand spinerlaubt und das Molekül zerfällt unter Abgabe eines Photons [82]. Die Emission dieses Photons wird als Fluoreszenz bezeichnet.



**Abbildung 2.11:** a) Funktionsprinzip von Fluoreszenz anhand eines Jabłoński Diagramms. b) Absorptions- und Emissionsspektrum eines Fluorophors und die resultierenden Intensitäten bei Anregung mit unterschiedlichen Wellenlängen (nach [83]).

Wie in Abbildung 2.11a schon angedeutet ist, ist der Übergang nach der Anregung in unterschiedliche Energieniveaus eines oder mehrerer Energiebänder möglich. Dafür werden verschiedene Energien bzw. verschiedene Wellenlängen benötigt. Die benötigten Wellenlängen können im Absorptionsspektrum jedes einzelnen Fluorophors abgelesen werden (Abbildung 2.11b). Auf der anderen Seite spiegelt das Emissionsspektrum die Relaxation der angeregten Zustände aus dem Energieband  $S_1$  in die Energieniveaus des Energiebandes  $S_0$  wider. Da nicht alle angeregten Moleküle strahlend zerfallen, sondern ihre Energie durch Gitterschwingungen oder anderen Energieübertragungen (z.B. Förster- oder Dexter-Transfer [82]) abgeben, fällt die maximale Emissionsrate immer niedriger als die Absorptionsrate aus. Zudem ist das Emissionsspektrum aufgrund der Energieabgabe in Richtung höherer Wellenlängen verschoben. In Abbildung 2.11b ist nun schematisch gezeigt, was mit dem Emissionsspektrum passiert, wenn der Fluorophor nicht im Absorptionsmaximum angeregt wird. Der Fluorophor wird mit zwei schmalbandigen Lasern, bei denen ihre zentrale Wellenlänge einmal im ( $\lambda_{max}$ ) und einmal neben ( $\lambda_n$ ) dem Absorptionsmaximum liegt, angeregt [84]. Man erhält dasselbe Fluoreszenzspektrum, jedoch mit unterschiedlichen Amplituden. Die Intensität der Emission fällt bei Anregung im Maximum deutlich stärker aus als die Anregung außerhalb des Maximums. Deshalb ist eine genaue Abstimmung der anregenden Wellenlänge auf das Absorptionsspektrum entscheidend für eine effiziente Anregung.

### 2.4.2. Aktueller Stand der Forschung

Genau wie die markerfreie Biosensorik erlaubt der Einsatz von Fluoreszenzmarkern Proteinaktivitäten sowie Zellenverhalten quantitativ und qualitativ mit einer hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung zu untersuchen [85]. In der Forschung sind hierzu zahlreiche Fluoreszenzsensoren dokumentiert [81]–[83]. Entscheidend bei solchen Sensoren ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Ist im Vergleich zum Hintergrundrauschen das Fluoreszenzsignal zu gering, kann es nicht vom Rauschen unterschieden werden. Wenn sehr geringe Proteinkonzentrationen detektiert werden sollen, stoßen viele Sensoren wegen eines geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses an ihre Grenzen.

Wird ein Fluorophor über einen Antikörper an die Oberfläche eines Glassubstrates gebunden, so wie es bei vielen herkömmlichen Sensoren der Fall ist, passiert das Licht den Fluorophor nur ein Mal. Dadurch hat der Fluorophor nur sehr wenig Zeit die Energie des

Lichts aufzunehmen. Durch Wellenleiter und auch photonische Kristalle wird das Licht in Form der evaneszenten Welle an der Oberfläche geführt. Dies bewirkt eine längere Interaktionszeit zwischen Fluorophor und Anregungslicht und somit eine effizientere Anregung [37], [76]. In der aktuellen Forschung konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Anregungseffizienz von Fluorophoren durch den Einsatz von photonischen Kristallen gesteigert werden kann. So demonstrierten Mathias et al. 2008 [89] eine vierfache Erhöhung des Fluoreszenzsignals. Dafür brachten sie jeweils den Fluorophor Cyanin-5 auf einen photonischen Kristall und auf ein einfaches Glassubstrat auf und verglichen die Fluoreszenzsignale miteinander verglichen. Der Kristall, der bei Mathias et al. verwendet wurde, besteht ähnlich der Struktur, wie in Abbildung 2.4 gezeigt, aus einem Glassubstrat, auf dem eine einperiodische lineare Gitterstruktur prozessiert wurde, und Titandioxid als Wellenleitermaterial. Im selben Jahr erweiterten Zhang und Cunningham [90] diese Struktur, indem sie auf den Wellenleiter eine zusätzliche Schicht bestehend aus nebeneinander angeordneten Nanostäbchen aufgebracht haben. Durch die Nanostäbchen, die auch aus Titandioxid bestehen, wurde die Oberfläche und somit die Anzahl der Anbindungsstellen für die Moleküle deutlich vergrößert. Als zweiten Effekt verändert diese zusätzliche Nanostäbchen-Schicht die Lage der Mode in der Struktur, so dass mehr Anteile der Mode in die Nanostäbchen-Schicht geführt werden. Hierdurch erhöht sich die Lichtenergie, welche mit dem Fluorophor interagieren kann, ergo auch die Fluoreszenzintensität. Durch diese Methode konnte eine Signalsteigerung um das 193-fache im Vergleich zu Glas beobachtet werden.

Zwei Jahre später stimmten Wu et al. [91] (aus derselben Arbeitsgruppe) die TM-Mode des photonischen Kristalls von Zhang auf das Absorptionsspektrum und die TE-Mode auf das Emissionsspektrum des Fluorophors Cyanin-5 ab und erzielten nochmals eine Steigerung um das 588-fache.

2015 wurde diese Steigerung zuletzt durch Lin et al [92] übertroffen. Sie erreichten eine Steigerung im Bereich von  $10^4$ , indem sie den Fluorophor in den Kunststoff Polymethylmethacrylat (PMMA) gemischt und als zusätzliche Schicht mit einer Dicke von 250 nm auf den photonischen Kristall gegeben haben. Auch hier wurde die lineare Gitterstruktur mit Titandioxid als Wellenleiter verwendet. Eine Verlagerung der Mode in Richtung der PMMA-Schicht tritt dadurch auf, welche diese Erhöhung erklärt. Allerdings ist letzteres nicht für Anwendungen im Bereich der Biosensorik geeignet, da über die Fluorophore die Anbindungsprozesse von Proteinen an die Sensoroberfläche nachgewiesen werden sollen. Der Einsatz des PMMA als Trägermaterial ist deshalb eher kontraproduktiv. Es zeigt aber trotzdem, welche Steigerungen mit photonischen Kristallen möglich sind.



Allgemein bieten photonische Kristalle ein breites Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten für die zeitnahe Analyse von Risikomarkern, weshalb sie sowohl für die Marker-basierte als auch für die markerfreie Biosensorik interessant sind.



# Kapitel 3

## Herstellung von photonischen Kristallen und des Biosensors

---

### Zusammenfassung

*Dieses Kapitel beschreibt sowohl die Herstellung von photonischen Kristallen als auch die Transformation der photonischen Kristalle in einen Biosensor. Für die Herstellung der photonischen Kristalle werden zwei Abformungsprozesse vorgestellt, um die Nanostrukturen von einer Masterstruktur auf ein Glassubstrat zu übertragen. Dabei werden zwei verschiedene Stempelmaterialien (PDMS und h-PDMS) genutzt, die daraus resultierende Abformungsqualität vorgestellt und miteinander verglichen. Als nächstes werden zwei Methoden zur Oberflächenfunktionalisierung und somit zur Herstellung des Biosensors präsentiert, mit denen Rezeptoren lokal und kovalent an die Oberfläche eines photonischen Kristalls gebunden werden können. Hier erfolgt die Anbindung der Rezeptoren zum einen über das tropfenweise Aufbringen (Spotten) und zum anderen über eine Maskierung mit einer Fotolackmaske.*

Allgemein besteht die Herstellung des hier verwendeten Biosensors aus drei Schritten. Zuerst wird die Nanostruktur von einem Master in einen flexiblen Polymer-Stempel übertragen. Die Master mit den unterschiedlichen Nanostrukturen bestehen in dieser Arbeit aus Quarzglas oder aus mit Nickel-bedampftem Silizium und wurden entweder käuflich bei den Firmen *Amo GmbH* oder *EULITHA* erworben oder in Kooperation mit dem Karlsruhe Nano Micro Facility (KNMF) hergestellt. Im nächsten Schritt wird ein Polymer-Stempel benutzt, um mit Hilfe der UV-Nanoprägelithographie die Nanostruktur auf ein Glassubstrat zu prozessieren und dann den photonischen Kristall durch das Auftragen der Wellenleiterschicht zu finalisieren. Der letzte Schritt ist die Transformation des photonischen Kristalls in einen Biosensor.

Zur Übertragung der Nanostruktur von einem Master werden hier zwei Verfahren vorgestellt, welche sich im Wesentlichen im Material des Polymer-Stempels unterscheiden. Im zweiten Teil dieses Kapitels wird näher auf die Transformation des photonischen Kristalls in einen Biosensor eingegangen. Dazu werden zwei Methoden zur lokalen und kovalenten Anbindung von Rezeptoren auf der Kristalloberfläche untersucht.

### 3.1. Herstellung von photonischen Kristallen

Nanostrukturen können auf unterschiedliche Weise auf ein Substrat übertragen werden [93]. Die Herstellung von linearen Gitterstrukturen, so wie sie hier verwendet werden, kann entweder über Elektronenstrahlithographie, Laserinterferenzlithographie, Spritzgusstechnik oder Nanoprägelithographie erfolgen. Bei der Elektronenstrahlithographie wird ein Fotolack, der vorher auf das Substrat aufgeschleudert wurde, mittels eines Elektronenstrahls Punkt für Punkt belichtet. Dadurch ist eine maskenfreie Fotolithographie mit einer Auflösung der Stegbreiten von wenigen Nanometern möglich. Zudem kann jede Gitterform, sei sie periodisch, multiperiodisch und aperiodisch auf das Substrat geschrieben werden [94]. Diese Methode ist jedoch mit einer geringen Fertigungsstückzahl sehr kostenintensiv und wird meist nur für die Herstellung eines Masters verwendet. Zudem stoßen viele Geräte bei einer Strukturfläche von mehreren Millimetern an ihre Grenzen.

Im Gegensatz zur Elektronenstrahlithographie können große Strukturflächen mit der Laserinterferenzlithographie produziert werden. Dafür werden zwei aufgeweitete Laserstrahlen auf der Probe überlagert, wo durch die Interferenz der beiden Strahlen ein periodisch variierendes Intensitätsmuster entsteht. Entsprechend zu diesem Muster wird der Fotolack periodisch belichtet. Die resultierende Periode  $\Lambda = \lambda/2 \sin(\theta)$  dieser Interferenz kann über die Einfallswinkel  $\theta$  und die Wellenlänge  $\lambda$  der beiden Strahlen eingestellt werden.

Hierbei ist eine minimale Strukturgröße von ca. 180 nm möglich [95]. Nachteilig sei an dieser Stelle erwähnt, dass hier nur rein periodische Strukturen mit einer im Vergleich zur Elektronenstrahlolithographie geringen Strukturauflösung hergestellt werden können. Eine Massenproduktion von photonischen Kristallen ist mit diesen beiden Methoden mit hohen Kosten verbunden, weswegen sie nicht für Wegwerfestchips geeignet sind. Jedoch lassen sich mit diesen Verfahren sehr gut Masterstrukturen herstellen, die dann mit Hilfe der Spritzgusstechnik und der UV-Nanoprägelithographie kostengünstig und relativ einfach vervielfältigt werden können.

Der Master wird bei der Spritzgusstechnik zunächst in eine Gussform eingespannt. Anschließend wird thermoplastischer oder duroplastischer Kunststoff in die Gussform injiziert, wo der Kunststoff aushärtet und somit die Struktur des Masters übernimmt. Im Vergleich zur Nanoprägelithographie wird bei der Spritzgusstechnik keine UV-Bestrahlung zum Aushärten des Kunststoffs benötigt. Jedoch wird bei dieser Technik der Master sehr beansprucht.

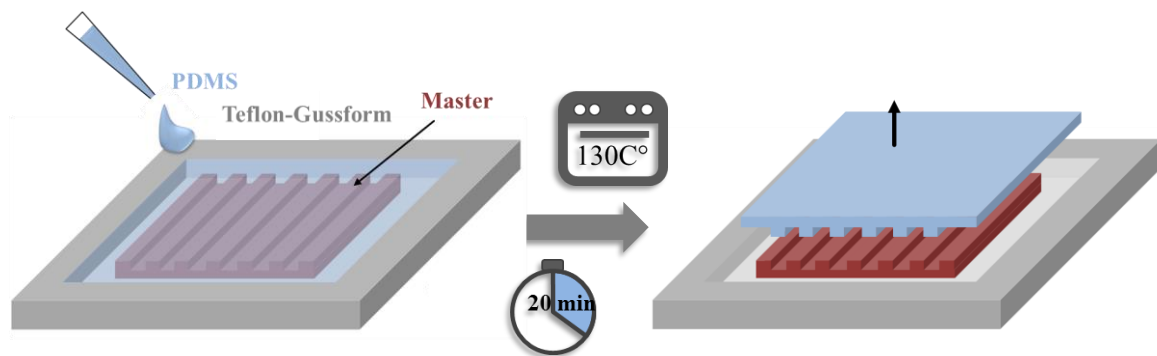
Bei der Nanoprägelithographie wird über einen Polymer-Stempel, der von einem Master abgeformt wird, die Struktur in einen Fotolack eingeprägt. Dieser wird dann komplett belichtet und die Struktur ist vom Master mit einem vergleichsweise einfachen Prozess auf das Substrat übertragen worden [96]. Dadurch dass dieser Stempel mehrfach abgeformt werden kann, leidet die Qualität der Masterstruktur deutlich weniger mit der Anzahl der Abformungen. Auch ist es möglich über dieses Verfahren, wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt, Strukturen über Rolle-zu-Rolle-Verfahren in großen Stückmengen zu produzieren.

#### 3.1.1. Herstellung von Strukturen mit PDMS

Damit die Nanostruktur von einem Master in den Polymer-Stempel abgeformt werden kann, wird zuerst die Gussform aus Teflon vorbereitet. Diese Gussform besteht aus zwei Teilen, der Grundplatte und dem 2 mm hohen Gussrahmen. Der Rahmen wird mit Hilfe vom hitzebeständigen Kepton-Klebeband (817-0054, *VWR International GmbH*) so auf der Grundplatte fixiert, dass das Polymer nicht unter den Rahmen gelangen und dadurch auslaufen kann. Für das Anmischen des Polymers Polydimethylsiloxan (PDMS) werden Sylgard 184 und der dazugehörige Curing Agent (beides von *Dow Corning*) in einem Verhältnis 8:1 in ein Mischgefäß (ST-20, *IKA*) gefüllt und darin für 15 Minuten auf Stufe 3 mit Hilfe des Rührgeräts (ULTRA-TURRAX® Tube Drive, *IKA*) gerührt. Dabei entstehen in dem zähflüssigen PDMS meist viele Blasen, die für die Abformung von Nanostrukturen

unbedingt entfernt werden müssen. Deshalb wird das Mischgefäß samt dem PDMS in eine Vakuumkammer gestellt. Durch wechselndes Evakuieren und Belüften der Vakuumkammer werden die Luftblasen aus dem PDMS gezogen und zum Platzen gebracht. Dieser Schritt kann bis zu 15 Minuten dauern.

Anschließend wird der Master mit der Nanostruktur nach oben zeigend in die Gussform gelegt und das entgaste PDMS vorsichtig über den Master gegossen, bis die Gussform randvoll ist (Abbildung 3.1). Dabei ist zum einen darauf zu achten, dass das PDMS in einem kontinuierlichen Fluss auf einer Stelle gegossen wird, da ansonsten bei diesem Schritt erneut störende Luftblasen entstehen können. Zum anderen muss die Gussform wirklich randvoll gefüllt werden, um einen zu dünnen Stempel zu vermeiden, der später bei der Nanoprägelithographie schnell reißen kann.



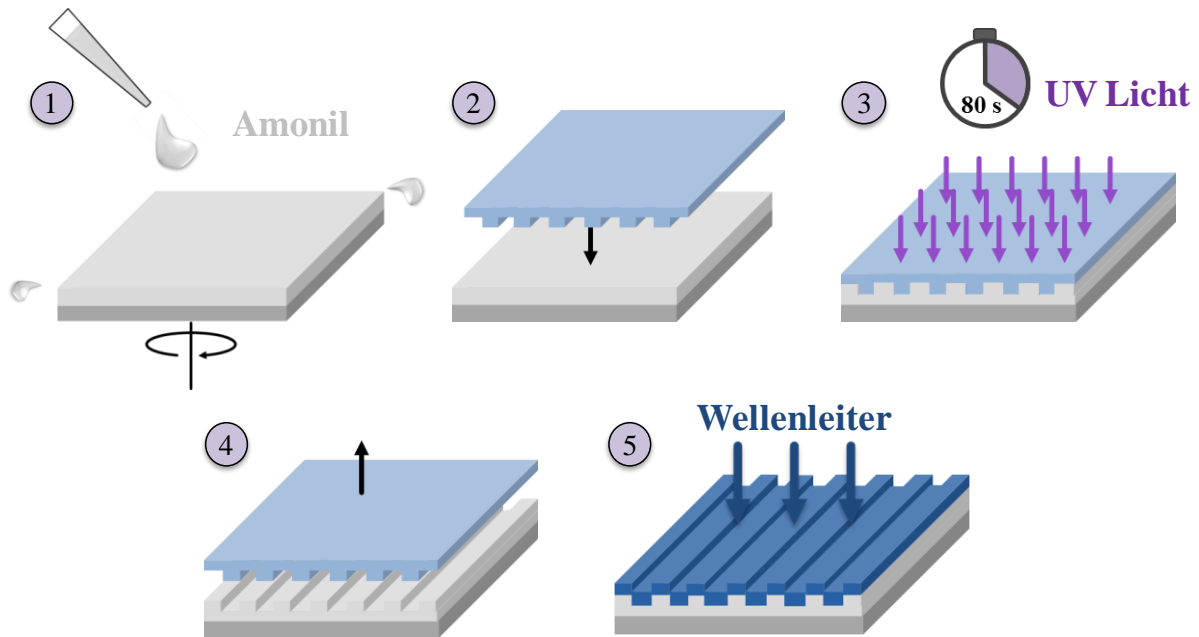
**Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung der Hauptschritte zur Herstellung des PDMS-Stempels. Zunächst wird der Master mit PDMS übergossen, dann das PDMS ausgehärtet und vom Master abgezogen.

Das PDMS wird samt dem Master in der Gussform für 20 Minuten bei 130°C im Ofen ausgehärtet. Dabei kann das PDMS um ca. 3% zusammenschrumpfen, wodurch auch die Periode der Masterstruktur später auf dem Glassubstrat um diesen Faktor reduziert wird<sup>2</sup>. Um dieses zu vermeiden, kann PDMS auch bei Raumtemperatur ausgehärtet werden. Dieser Vorgang dauert jedoch anstatt der 20 Minuten bis zu zwei Tage. Diese Schrumpfung der Gesamtgitterperiode verursacht gemäß Gleichung 2.17 eine äquivalente Resonanzverschiebung. Da bei der Proteinanbindung die relative Resonanzverschiebung verfolgt wird und bei der resonanten Anregung das Anregespektrum sehr breitbandig ist, kann dieser Effekt hier trotzdem vernachlässigt werden, weshalb das Aushärten im Ofen in der gesamten Arbeit beibehalten wird. Während das PDMS im Ofen aushärtet, werden 25 x 25 mm<sup>2</sup> große Glassubstrate (Floatglas, *Präzision Glas & Optik GmbH*) zuerst in Aceton und

<sup>2</sup> Alle späteren Angaben zur Länge der Strukturperiode beruhen auf den Größen der Masterstruktur.

dann in Isopropanol für jeweils 10 Minuten im Ultraschallbad gereinigt. Anschließend werden sie bei 160°C auf einer Heizplatte dehydriert.

Das ausgehärtete und abgekühlte PDMS wird samt Master vorsichtig aus der Gussform geschnitten. Danach wird das PDMS entlang der Gitterstruktur vom Master abgezogen und in Form geschnitten, so dass bei der folgenden Prägelithographie keine störenden Erhöhungen auf der Seite der Nanostruktur vorhanden sind.

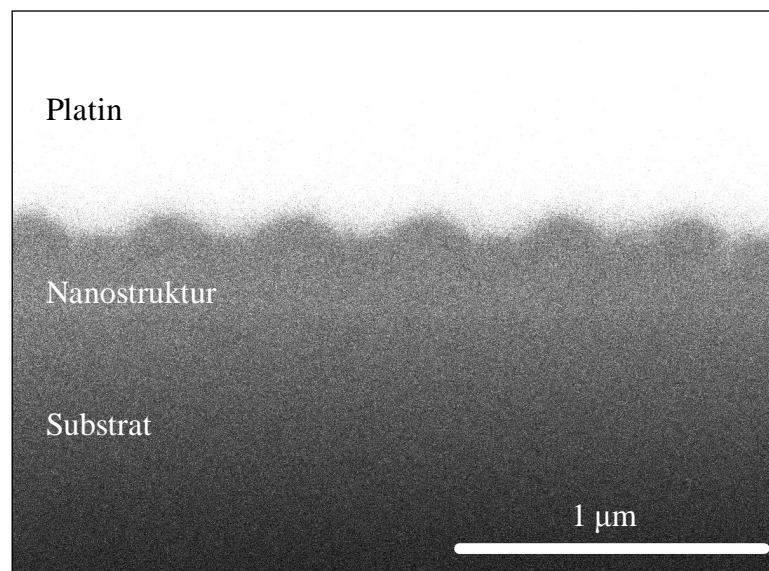


**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung der Nanostrukturübertragung auf Glas mit allen Hauptschritten, (1) Aufschleudern des Fotolacks, (2) Drücken des Stempels in den Fotolack, (3) Aushärten des Fotolacks durch UV-Licht-Bestrahlung, (4) Entfernen des Stempels vom ausgehärteten Fotolack und (5) Abscheiden des Wellenleitermaterials.

Nun werden die Glassubstrate weiter für die Prägelithographie vorbereitet. Die Glassubstrate werden von der Heizplatte genommen und für zwei Minuten auf einem Metallhalter abgekühlt. Über Rotationsbeschichtung (SpinCoating) werden zuerst 150 µl des Haftvermittlers Amoprime bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 3000 rpm für 30 Sekunden auf ein Glassubstrat aufgetragen (SpinCoater SE OptiSpin ST 22P). Anschließend wird das Substrat für zwei Minuten bei 115°C auf der Heizplatte ausgebacken. Nach zweiminütigem Abkühlen wird der eigentliche Fotolack Amonil (beides von der Firma *Amo GmbH*) mit denselben Einstellungen aufgeschleudert (Abbildung 3.2, Schritt 1). Laut dem Hersteller besitzt das Amonil auf dem Glassubstrat nun eine Dicke von 200 nm.

Als nächstes wird eine UV-Lampe eingeschaltet und für mindestens drei Minuten gewartet, bis die Lampe betriebsbereit ist. Währenddessen wird das mit Amonil belackte Glassubstrat auf einen Metallhalter gelegt und der PDMS-Stempel mit der Nanostruktur nach unten vorsichtig auf das Substrat gelegt (Abbildung 3.2, Schritt 2). Durch leichtes Streichen mit einer Pinzette entlang der Gitterstruktur werden zum einen die Gitterstruktur in den Lack gedrückt und zum anderen eventuell auftretende Luftblasen herausgedrückt. Die Probe samt PDMS-Stempel wird nun mit dem Metallhalter in die Belichtungsvorrichtung gestellt. Durch die Vorrichtung wird ein Abstand zwischen der Probe und der UV Lampe von 10 cm gewährleistet. Jetzt wird die Probe für 80 Sekunden mit UV-Licht (Lichtleistung: 93 mW/cm<sup>2</sup>) bestrahlt und das Amonil härtet aus. Der Stempel wird entlang der Gitterstruktur vom ausgehärteten Amonil gezogen. Die Struktur befindet sich nach diesem Vorgang auf dem Glassubstrat (Abbildung 3.2, Schritt 4). Final wird nun noch der Wellenleiter in Form von Titandioxid (TiO<sub>2</sub>) oder Niob(V)-Oxid (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) über physikalische Gasphasenabscheidung (reaktives Sputtern<sup>3</sup>) auf die Struktur abgeschieden (Abbildung 3.2, Schritt 5).

### Charakterisierung der hergestellten Nanostrukturen



**Abbildung 3.3:** REM-Aufnahme eines FIB-Schnittes durch die Nanostrukturen eines photonischen Kristalls mit  $\Lambda = 370 \text{ nm}$ ,  $t = 0,5$ ,  $d = 60 \text{ nm}$ .

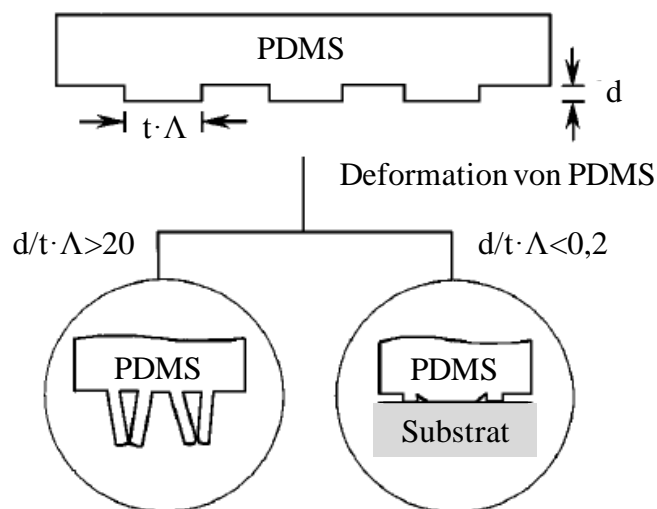
---

<sup>3</sup> Das Sputtern wurde entweder von Mirko Hansen aus der Arbeitsgruppe Nanoelektronik an der Technischen Fakultät der Universität Kiel oder durch Kollegen der Süddänischen Universität (SDU) in Sonderbørg durchgeführt.



Für genauere Untersuchungen wurde die abgeformte Struktur unter einem Rasterelektronenmikroskop (REM) betrachtet. Mit Hilfe eines fokussierten Ionenstrahls (engl. *focused ion beam*, FIB) wurde ein Schnitt durch die Struktur vorgenommen. Dabei wurde zuerst Platin als Schutzschicht aufgetragen, da sonst keine sauberen Schnitte gewährleistet werden können.

Wie aus Abbildung 3.3 zu erkennen ist, wird die Struktur mit dem PDMS-Stempel einigermaßen gut auf das Substrat übertragen. Allerdings ähnelt die abgeformte Struktur in diesem Fall eher einer wellenförmigen Struktur statt der rechteckigen Gitterstruktur des Masters. Aufgrund der weichen Konsistenz des PDMS besitzt der Stempel keine große Oberflächenspannung, wodurch die Stege zusammenfallen und die Gitterflanken einen sehr großen Firstwinkel besitzen [97]. Bei dieser Struktur handelt es sich um eine monoperiodische Gitterstruktur mit einer Periode von  $\Lambda = 370$  nm, einem Tastverhältnis von ca.  $t = 0,5$  und einer Gittertiefe von  $d = 60$  nm. Damit liegt das Aspektverhältnis von Stegtiefe ( $d$ ) zu Stegbreite ( $t \cdot \Lambda$ ) bei  $d / (t \cdot \Lambda) = 0,32$  und befindet sich somit noch im Bereich der defektfreien Abformung, die mit PDMS erreicht werden kann. Liegt das Aspektverhältnis unter 0,2 kann die Stegvertiefung des Stempels durchhängen, wie es in Abbildung 3.4 gezeigt ist. Ist hingegen das Aspektverhältnis größer als 20, kollabieren die Gitterstege und kleben zusammen [97], [98]. Im folgenden Kapitel wird deswegen ein weiteres Prägeverfahren vorgestellt, mit dem Strukturen mit kleinerer Stegbreite bei größerer Stegtiefe abgeformt werden können.



**Abbildung 3.4:** Schemazeichnung des Verhaltens von PDMS bei zu großem und zu kleinem Aspektverhältnis (nach [98]).

### 3.1.2. Herstellung von Strukturen mit h-PDMS

Die Herstellung von den Strukturen mit „hard“-PDMS (h-PDMS) unterscheidet sich im Vergleich zu dem „einfachen“ PDMS-Prozess nur in der Stempelherstellung. Die spätere Abformung der Gitterstruktur in den Fotolack Amonil und somit auf das Substrat erfolgt, wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben. Im Vergleich zu PDMS besitzt h-PDMS eine deutlich höhere Festigkeit [97], [99], [100], wodurch bereits Stegbreiten von 50 nm bei einer Stegtiefe von ca. 350 nm erreicht wurden [97]. Schmid und Michel [99] untersuchten 2000 erstmals verschiedenste Vinyl- und Hydrosilanpräpolymere, um Strukturen mit hohem Aspektverhältnis und somit mit einer höheren Güte abformen zu können. Dabei lieferte die Hybridstruktur bestehend aus dem Methylhydrosiloxan-Dimethylsiloxan-Kopolymer (HMS-301) und dem Vinylmethylsiloxan-Dimethylsiloxan-Kopolymer (VDT-731, beide von *Gelest, Inc.*) die besten Ergebnisse. Kang et al. [100] verbesserten die Mixtur für das von Schmid und Michel vorgestellte h-PDMS und konnten dadurch noch bessere Aspektverhältnisse mit höherer Abformungsqualität realisieren. Das Rezept dieser Mixtur bildet die Basis des im Folgenden vorgestellten Abformungsprozesses und wurde entsprechend an die hier etablierten Prozesse adaptiert.

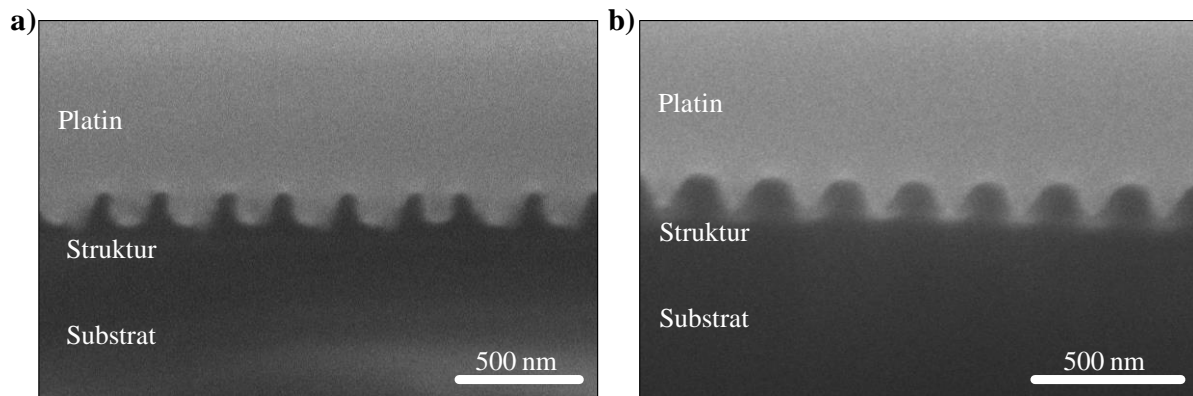
Zunächst werden 3,4 g vom VDT-731 mit 18  $\mu$ l Platin-Divinyltetramethyldisiloxan Komplex (68478-92-2, *ABCR*) und 1 Tropfen Tetramethyltetravinyl-Cyclotetrasiloxan (396281-10mL, *Sigma Aldrich*) in einem Glasfläschchen mit einem Spatel ordentlich verrührt. Anschließend wird 1 g vom HMS-301 hinzugegeben und alles erneut ordentlich mit dem Spatel vermischt. Um die dabei entstandenen Luftblasen aus dem Gemisch zu entfernen, wird das Fläschchen in die Vakuumkammer gestellt und solange evakuiert und belüftet (Minimum 2 Minuten) bis alle Luftblasen entfernt sind. Je nach Größe des Masters wird das h-PDMS entweder aufgeschleudert (Mastergröße: 25 x 25 mm<sup>2</sup>) oder mit Hilfe der Teflونغussform über den Master gegossen (Mastergröße: 4“ Wafer). Bei der Mastergröße von 25 x 25 mm<sup>2</sup> wird der Master in den SpinCoater gespannt und 1,5 ml von dem h-PDMS bei einer Umdrehung von 1000 rpm für 40 Sekunden auf den Master geschleudert. Bei einer Größe von 4“ werden 200  $\mu$ l des h-PDMS mit Hilfe der Gussform, genau wie in Kapitel 3.1.1. beschrieben, auf den Master gegossen und durch Neigung in verschiedene Richtungen möglichst gleichmäßig verteilt. Anschließend wird das h-PDMS für 30 Minuten bei 60°C im Ofen oder auf einer Heizplatte ausgehärtet. Wichtig ist dabei, dass die h-PDMS-Schicht sehr dünn prozessiert wird, da das h-PDMS beim Aushärten sehr hart und spröde wird. Wenn die Stempel zu hart werden, können Unebenheiten auf der Probe nicht ausgeglichen werden und

die Struktur wird dadurch nicht gleichmäßig über die gesamte Fläche abgeformt [101]. Damit der ganze Stempel für die Strukturübertragung flexibel bleibt, wird reines PDMS als Trägermaterial verwendet.

Dafür wird das PDMS aus Sylgard 184, wie im Kapitel zuvor beschrieben, angemischt, evakuiert und dann über den Master in der Teflونغussform gegossen. In dem Fall, dass das h-PDMS gespincoated wurde, muss entsprechend der Master vorher in die Gussform gelegt werden. Alles zusammen wird dann bei 60°C für 60 Minuten in den Ofen oder auf die Heizplatte gelegt. Der nun komplett ausgehärtete Stempel wird vorsichtig entlang der Gitterstruktur vom Master getrennt und in Form geschnitten.

#### **Charakterisierung der hergestellten Nanostrukturen**

Für Abbildung 3.5a wurde mit diesem Hybridstempel aus h-PDMS und Sylgard 184 der Master mit einer Periode von  $\Lambda = 250$  nm, einer Stegtiefe  $d = 225$  nm und einem Tastverhältnis von  $t = 0,38$  nm auf ein Glassubstrat übertragen und unter dem REM untersucht. Als Vergleich wurde dieselbe Struktur mit dem reinen PDMS-Stempel abgeformt und ebenfalls im REM betrachtet (Abbildung 3.5b). Die FIB-Schnitte zeigen, dass die Kanten einen deutlich steileren Firstwinkel aufweisen als bei den mit reinem PDMS abgeformten Strukturen. In beiden Fällen beträgt die Strukturtiefe nur  $d_{abform.} \approx 145$  nm, was durch die schmalen und tiefen Kanäle der Gitterstruktur erklärt werden kann. Um diesen Tiefenverlust zu vermeiden, könnten sowohl das h-PDMS als auch das reine PDMS durch eine gewisse Wartezeit vor dem Aushärten besser in die Strukturgräben fließen. Allerdings besitzen die hauptsächlich verwendeten Masterstrukturen eine Gittertiefe von  $d < 85$  nm, weswegen diese Prozesszeit als ausreichend erachtet wird. Zusammenfassend kann mit dem h-PDMS-Prozess eine deutlich bessere Abformung realisiert werden.



**Abbildung 3.5:** REM-Aufnahme eines FIB-Schnittes durch die Nanostrukturen eines photonischen Kristalls mit  $\Lambda = 250 \text{ nm}$ ,  $t=0,38$ ,  $d = 225 \text{ nm}$ . a) abgeformt mit *h*-PDMS, b) abgeformt mit reinem PDMS.

## 3.2. Prozesse zur kovalenten und lokalen Anbindung von Rezeptoren

Um den photonischen Kristall in einen Sensor umzuwandeln, müssen Rezeptoren an die Oberfläche gebunden werden. Diesen Schritt nennt man Funktionalisierung der Oberfläche. Die Funktionalisierung kann über verschiedene Methoden erfolgen. Am einfachsten und am weitesten verbreitet in der Biosensorik sind Goldoberflächen, da sich Rezeptoren einfach über z.B. ihre Thiolgruppen an das Gold binden [102], [103]. Für die optische Biosensorik und somit auch für das hier verwendete Detektionsverfahren ist diese Funktionalisierungsmethode von Nachteil, da Gold Licht im roten Wellenlängenbereich absorbiert und somit negative Auswirkungen auf das Signal-Rausch-Verhältnis hat. Auf dielektrischen Materialien in Form von Oxiden können die Rezeptoren über Silane und Verbindungsmoleküle kovalent an die Oberfläche gebunden werden [104]–[106].

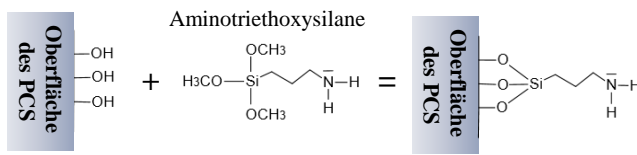
Für die spezifische und parallele Detektion von mehreren Proteinen mit photonischen Kristallen ist die stochastische Verteilung der wenigen zu detektierenden Proteine über die gesamte Sensoroberfläche von Nachteil, da sonst die Bindungssignale nicht jedem einzelnen Protein zugeordnet werden können. Im Folgenden werden zwei Methoden zur lokalen Funktionalisierung von Rezeptoren demonstriert.

### 3.2.1. Funktionalisierung mittels Spotten

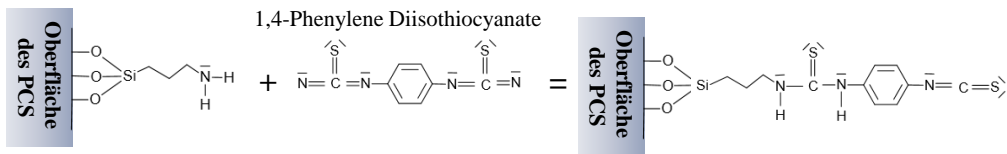
Die Oberfläche des photonischen Kristalls wird bei diesem Verfahren mittels tropfenweisen Aufbringens, auch Spotten genannt, funktionalisiert. Im ersten Schritt wird die

Oxid-Oberfläche des Wellenleitermaterials mit Hydroxygruppen angereichert. Dafür wird der photonische Kristall für fünf Minuten mit Sauerstoffplasma (8 sccm, RF-Leistung: 50 W, *Sentech SI 100*) behandelt. Anschließend folgen weitere Reinigungsschritte, die flächige Silanisierung der Oberfläche und die Crosslinker-Anbindung unter Stickstoffatmosphäre. Silane gehen bevorzugt mit Sauerstoffmolekülen eine feste Verbindung ein, was für die Anbindung an die hier verwendeten Oxidschichten von Vorteil ist. Jedoch reagieren sie auch gern mit Wasserstoffmolekülen, weswegen in einer Stickstoffatmosphäre mit trockenen Substraten und Lösungsmitteln gearbeitet werden muss. Aus diesem Grund werden die photonischen Kristalle nach der Plasmabehandlung für jeweils fünf Minuten in trockenem Ethanol (9065.3, *Carl Roth*) und Methanol (322415, *Sigma Aldrich*) gereinigt [105]. Während der Reinigung wird die Silanisierungslösung aus 260  $\mu\text{l}$  (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES) (281778, *Sigma Aldrich*) und 24,5 ml trockenem Methanol angesetzt und die photonischen Kristalle anschließend für 60 Minuten darin inkubiert. In Abbildung 3.6 Schritt 1 ist das resultierende Molekül an der Oberfläche schematisch dargestellt. Die nichtgebundenen APTES-Moleküle werden mit trockenem Methanol weggespült. Um die Verbindung des Silans mit der Oberfläche zu verstärken, wird das Substrat für 20 Minuten bei 110°C auf der Heizplatte gebacken.

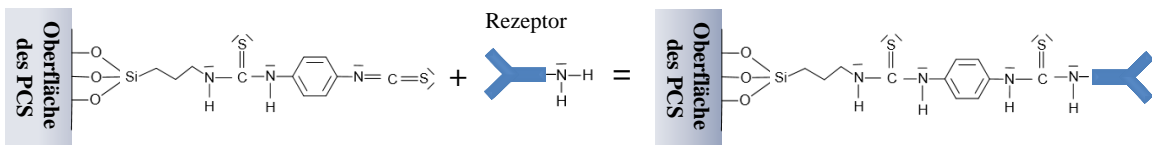
### 1. Silanisierung



### 2. Crosslinker-Anbindung

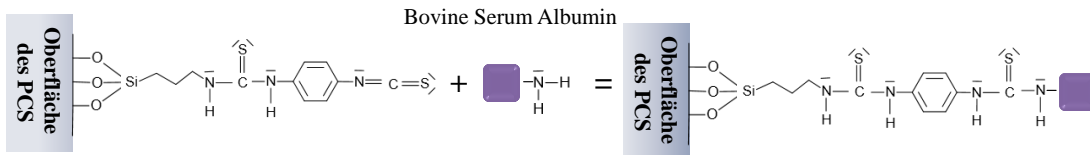


### 3. Ligand-Anbindung

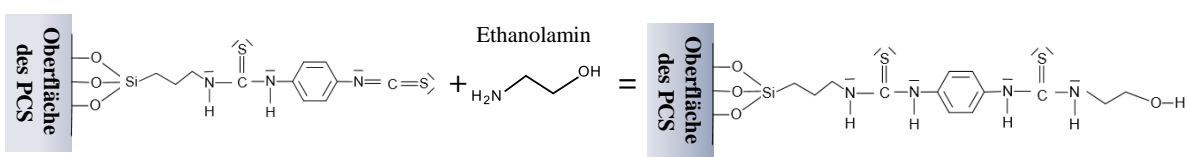


### 4. Passivierung

#### 4.1 Bovine Serum Albumin



#### 4.2 Ethanolamin



**Abbildung 3.6:** Schematische Darstellung der resultierenden Moleküle für jeden einzelnen Funktionalisierungsschritt

100 mg des Crosslinkers 1,4-Phenylene Diisothiocyanate (PDC, 258555-5G, *Sigma Aldrich*) werden in 500  $\mu\text{l}$  Pyridin (494410-1L, *Sigma Aldrich*) und 4,5 ml N,N-Dimethylformamide (DMF, 227056-2L, *Sigma Aldrich*) gelöst [104]. PDC besitzt an beiden Seiten des Phenylrings eine Isothiocyanate-Gruppe, wodurch das Molekül aminreaktiv ist und deshalb mit jedem Molekül, das eine Amino-Gruppe besitzt oder mit einer solchen Gruppe modifiziert wurde, reagiert [107]. Somit fungiert PDC als Verbindung zwischen dem Silan und dem Rezeptor. Nachdem das Substrat eine Minute abgekühlt wurde, wird es für 120 Minuten in die Crosslinker-Lösung gelegt. Erneut werden ungebundene Moleküle mit reichlich trockenem Methanol weggespült und das Substrat für 15 Minuten in der Handschuhbox zum Trocknen stehen gelassen (Abbildung 3.6, Schritt 2).

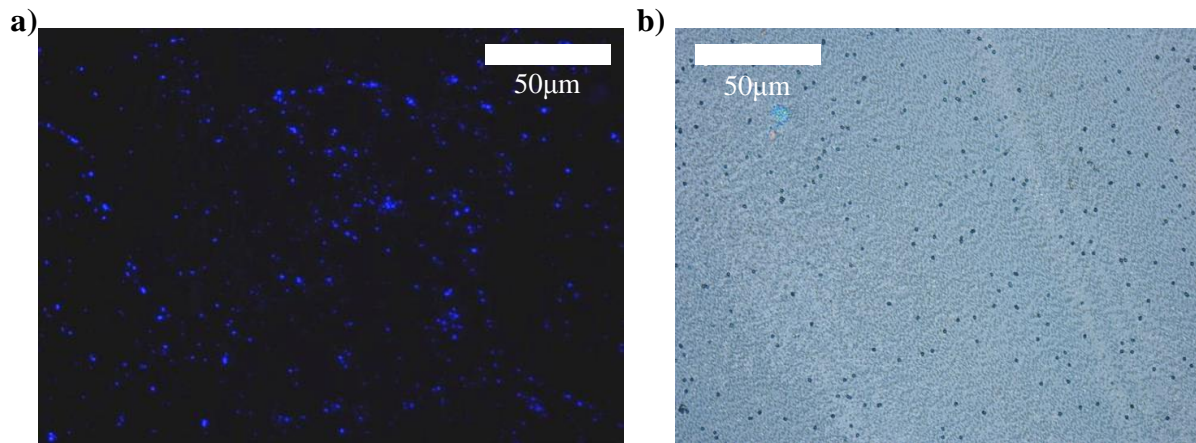
Für die kovalente Bindung der Rezeptoren wird das Substrat aus der Handschuhbox geholt und in eine Feuchtigkeitskammer platziert. Die Feuchtekkammer verhindert das Eintrocknen der Rezeptor-Lösungen und stellt dadurch eine homogene Anbindung sicher. Diese besteht aus zwei Petrischalen, eine als Boden und eine als Deckel. In die untere Petrischale wird Wasser gefüllt und ein Teflonwürfel in die Mitte platziert. Auf diesen wird später das Substrat gelegt. Im nächsten Schritt werden die verschiedenen Rezeptoren mit Hilfe einer Pipette in 500 nl großen Tropfen auf das Substrat aufgebracht. Dabei werden die Aptamere in tris-HCl-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 und die Antikörper in Natriumacetatpuffer mit einem pH-Wert von 4,5 gelöst [103]. Nach der Inkubation über Nacht wird das Substrat mit reichlich Phosphatpuffer (DPBS) (14190-169, *Lifetechnologies GmbH*) abgewaschen. Um unspezifische Bindungen an die noch freien Isothiocyanat-Gruppen bei der späteren Proteindetektion zu vermeiden, wird die restliche Oberfläche mit 1,00 mol/l Ethanolamine HCl und dann mit 1 ml/mg Bovine Serum Albumin (BSA) gelöst in DPBS für jeweils 30 Minuten passiviert [108]. Nach jedem Passivierungsschritt wird das Substrat mit DPBS gespült.

#### **Verifizierung der Funktionalisierungsschritte**

Jeder Funktionalisierungsschritt<sup>4</sup> wird einzeln im Folgenden verifiziert. Dafür wurden zunächst zur Verifizierung der flächigen Silanisierung blau fluoreszierende Mikrobeads (PDC-Beads, Fluoreszenzfarbstoff: DAPI, *Polyscience Inc.*), welche mit Säuregruppen funktionalisiert sind, über eine Aminokopplung an das Silan gebunden und unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Abbildung 3.7a). Für die Evaluierung der Crosslinker-Anbindung wurde die Oberfläche erst flächig silanisiert und anschließend flächig der Crosslinker angebunden. Mit Aminogruppen funktionalisierte Mikrobeads ohne Farbstoff (Polybeads® Amino, *Polyscience Inc.*) wurden anschließend an die Isothiocyanat-Gruppen des Crosslinkers gekoppelt und unter einem Auflichtmikroskop untersucht (Abbildung 3.7b). Wie aus Abbildung 3.7 entnommen werden kann, hat die flächige Silanisierung und flächige Crosslinker-Anbindung gut funktioniert. Die entsprechenden Mikrobeads wurden über die ganze Oberfläche verteilt angebunden.

---

<sup>4</sup> Sören B. Gutekunst hat hier bei der chemischen Vorbereitung der Mikrobeads unterstützt. Er stammt aus der Arbeitsgruppe Biokompatible Nanomaterialien des Instituts für Materialwissenschaft der CAU. Alle Messungen von Fluoreszenzsignalen wurden von ihm durchgeführt.



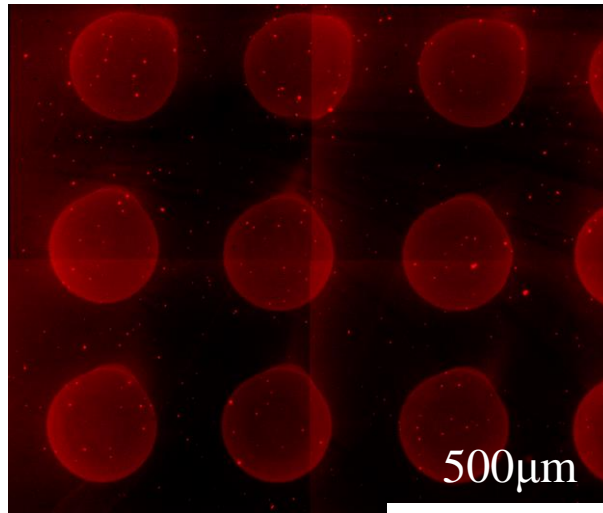
**Abbildung 3.7:** a) Fluoreszenzbild der Substratoberfläche nach der Kopplung zwischen silanisierter Oberfläche und den mit DAPI-modifizierten Mikrobeads; b) Mikroskopbild der Substratoberfläche nach der Kopplung zwischen den Mikrobeads und der zuerst silanisierten und dann Crosslinker-beschichteten Oberfläche.

Im nächsten Schritt wurden alle Funktionalisierungsschritte durchgeführt und der Fluoreszenzfarbstoff ATTO594 (ATTO-TEC GmbH), welcher mit einer Aminogruppe modifiziert ist, anstelle des Rezeptors auf die Oberfläche getropft<sup>5</sup>. Nach der Inkubationszeit von drei Stunden innerhalb einer Feuchtekammer wurden die nicht gebundenen Fluoreszenzmoleküle mit diionisiertem Wasser (DI-Wasser) gewaschen. Unter dem Konfokal-Fluoreszenzmikroskop sind die tropfenförmig immobilisierten Moleküle gut als große rot fluoreszierende Kreise sichtbar (Abbildung 3.8). Bei den kleinen fluoreszierenden Flecken handelt es sich um Verunreinigungen auf der Probe.

---

<sup>5</sup> Das Aufbringen der Tropfen wurde am Institut für Siliziumtechnologie in Itzehoe mit Hilfe eines Spotters durchgeführt.





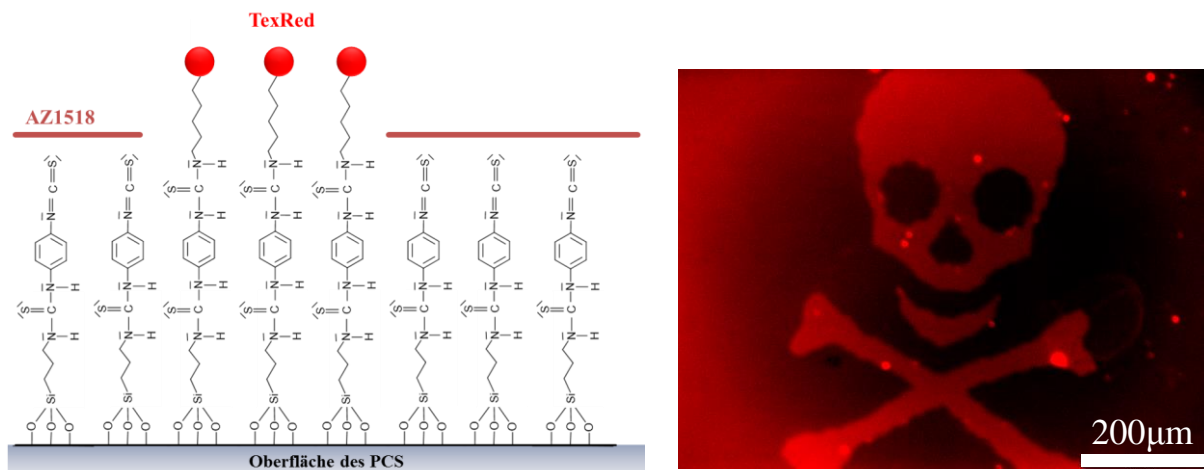
*Abbildung 3.8: Evaluierung der lokalen Funktionalisierung durch tropfenweises Aufbringen des Fluoreszenzfarbstoffes ATTO594, welcher mit einer Aminogruppe modifiziert ist. Dargestellt ist ein aus vier einzelnen Fluoreszenzbildern zusammengesetztes Foto.*

### 3.2.2. Funktionalisierung mit einer Fotolackmaske

Das Detektionslimit dieses Sensors könnte noch weiter verbessert werden, wenn nur die Bereiche mit der höchsten Feldstärke (Kapitel 4.3.2.) in den multi- und aperiodischen Gitterstrukturen funktionalisiert werden. Das Problem bei der tropfenweisen Funktionalisierung, wie sie in Kapitel 3.2.1. vorgestellt wurde, besteht darin, dass die Tropfen mit einem Durchmesser von 150  $\mu\text{m}$  im Vergleich zu der Größe der „Hot-Spots“ deutlich größer ausfallen. Proteine binden dann auch in den weniger empfindlichen Bereichen an und verringern den Effekt der „Hot-Spots“ deutlich.

Deswegen wird im Folgenden eine Funktionalisierung mit Hilfe einer Fotolackmaske vorgestellt [109]. Fotolacke haben den Vorteil, dass Strukturen über eine Belichtungsmaske im einstelligen Mikrometerbereich auf ein Substrat übertragen werden können. Zunächst wird die Substratoberfläche, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, silanisiert und der Crosslinker angebunden. Danach wird das Substrat aus der Handschuhbox genommen und im Gelblichtbereich des Reinsraums der positive Fotolack AZ1518 von *Microchemicals* auf das Substrat mit dem SpinCoater aufgeschleudert (1 ml, 2850 rpm, 30 s). Normalerweise wird nun der Fotolack für 60 Sekunden auf der Heizplatte leicht ausgehärtet, damit bei der späteren Belichtung das Substrat nicht an der Maske kleben bleibt. Da der Crosslinker jedoch temperaturempfindlich ist, wird hier davon abgesehen und die Probe einfach für 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet.

Nach der UV-Belichtung (Maskaligner MA6 der Firma SÜSS MicroTec GmbH) und Entwicklung (AZ 726 MIF für 50 s) wurde die Stammlösung (5 mg/ml in DMSO) des Fluoreszenzfarbstoffes Texas Red™-PEO3-Amine (Biotrend) auf eine Konzentration von 1 mg/ml mit Wasser verdünnt und die gesamte Oberfläche damit benetzt. Während der Inkubationszeit über Nacht bindet der Fluoreszenzfarbstoff über seine Aminogruppe nur an die Isothiocyanatgruppen des Crosslinkers, die bei der Lackentwicklung freigelegt wurden (Abbildung 3.9 links).



**Abbildung 3.9:** (links) Schema von dem Funktionsprinzip zur lokalen Funktionalisierung mit Lackmaske; (rechts) Evaluierung der Funktionalisierung mit Lackmaske. Es wurde eine Lackmaske mit unterschiedlichen Figuren gewählt und hier ist das Fluoreszenzbild von einer Figur zu sehen.

Am darauffolgenden Tag wird die Probe mit reichlich DI-Wasser abgewaschen. Anschließend wird der Lack durch leichtes Schwenken in Aceton für 30 Sekunden entfernt und die Probe mit Stickstoff getrocknet. Wie man auf dem Fluoreszenzbild erkennen kann, konnte der Farbstoff nur in dem Bereich ohne Fotolack anbinden und erzeugt entsprechend zur Belichtungsmaske diese fluoreszierende Figur (Abbildung 3.9). Allerdings ist das Signal der angebundenen Fluoreszenz so schwach, dass die Belichtungszeit so weit erhöht werden musste, dass der Hintergrund zum Teil autofluoresziert. Trotzdem konnte nachgewiesen werden, dass über dieses Verfahren Proteine lokal auf eine Oxidoberfläche immobilisiert werden können. Jedoch ist der Schritt des Lackentfernens für die Proteinanbindung kritisch, da es sich bei Aceton um ein organisches Lösungsmittel handelt und es dadurch zu Aktivitätsverlusten der Proteine kommt [110]. Unter anderem aus diesem Grund werden die

photonischen Kristalle für alle Proteindetektionen im Folgenden über das Spotten funktionalisiert.



# Kapitel 4

## Design und Charakterisierung von nanostrukturierten Wellenleitern

---

### Zusammenfassung

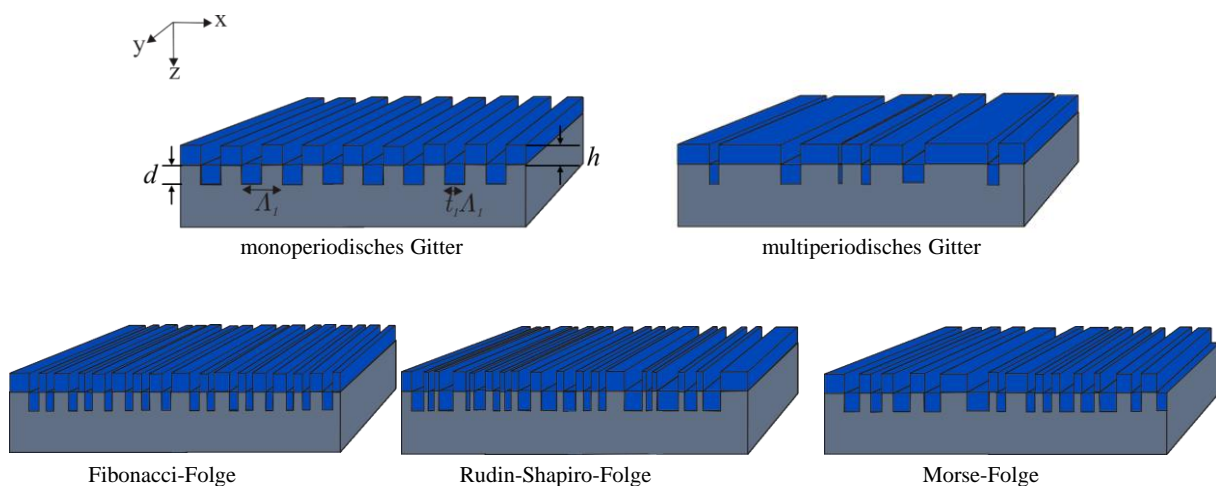
*In diesem Kapitel stehen die spektralen Eigenschaften mono-, multi- und aperiodisch strukturierter Wellenleiter für die markerfreie Biosensorik im Fokus. Um für die in dieser Arbeit entwickelten intensitätsbasierten Detektionssysteme die geeignete Gitterorientierung zu identifizieren, werden die Winkeleigenschaften der verwendeten monoperiodischen Strukturen sowohl in Transmission als auch in Reflexion spektral analysiert. Weiterhin werden mono-, multi- und aperiodische Strukturen und ihr Einfluss auf die Empfindlichkeit nanostrukturierter Wellenleiter theoretisch und spektral untersucht. Das für die theoretische Betrachtung verwendete Simulationsmodell, welches auf der Finite-Differenzen-Methode beruht, wird hier vorgestellt. Allgemein konnte durch die Verwendung von multi- und aperiodischen Strukturen zwar keine Steigerung der Gesamtempfindlichkeit im Vergleich zu monoperiodischen Strukturen erzielt werden. Jedoch kommt es in multi- und aperiodisch strukturierten Wellenleitern zu einer lokalen Felderhöhung der quasi-geführten Moden, die mit einer Steigerung der Oberflächenempfindlichkeit in diesen Bereichen einhergehen.<sup>6</sup>*

---

<sup>6</sup> Teile dieses Kapitels wurden bereits in [150] und [157] veröffentlicht.

Um die evaneszente Welle an der Oberfläche und somit die Empfindlichkeit nanostrukturierter Wellenleiter zu erhöhen, existieren bereits verschiedene Ansätze. Abbas et al. [111] erzielten beispielsweise eine Erhöhung der Resonanzgüte ( $Q = 71165$ ) und der Empfindlichkeit ( $S = 343,1 \text{ nm/RIU}$ ) durch das kreuzweise Stapeln von einzelnen Gittern. Durch diese Struktur sind die Moden in den einzelnen Gittern miteinander gekoppelt und beeinflussen sich dadurch gegenseitig so, dass die evaneszente Welle an der Oberfläche deutlich erhöht wird. Diese Struktur ist allerdings aufgrund des komplexen Herstellungsprozesses nicht für die Anwendung in Wegwerfprodukten geeignet. Lin et al. [25] erweiterten die in dieser Arbeit verwendete monoperiodische Gitterstruktur durch eine Metallschicht zwischen Substrat und Gitter. Sie erzielten mit  $S = 376,78 \text{ nm/RIU}$  eine vergleichsweise ähnliche Empfindlichkeit wie Abbas et al., mit aber einem für Wegwerfprodukte deutlich geeigneterem Herstellungsprozess. Allerdings erzeugen sie mit dieser Struktur keine Resonanzpeaks sondern Dips im Reflexionsspektrum, deren Verschiebung bedingt durch Proteinanbindungen mit einem Spektrometer-freien Messverfahren nur sehr schwer ausgewertet werden kann.

Für monoperiodische Gitterstrukturen, wie sie in dieser Arbeit benutzt werden, konnte bisher eine Empfindlichkeit im Bereich von nur  $S = 36 \text{ nm/RIU}$  [112] erreicht werden. Um die Empfindlichkeit zu steigern, werden in diesem Kapitel unterschiedliche Designparameter wie Tastverhältnis ( $t$ ) und Schichtdicke des Wellenleiters ( $h$ ) von monoperiodischen Gitterstrukturen anhand des Simulationsmodells für TE- und TM-Polarisation untersucht (Abbildung 4.1a). Die Simulationsergebnisse werden entsprechend experimentell verifiziert.



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung aller untersuchten Strukturen mit einer Übersicht der Designparameter ( $t =$  Tastverhältnis,  $\Lambda =$  Gitterperiode,  $d =$  Gittertiefe,  $h =$  Dicke der Wellenleiterschicht).

Als neuer Ansatz werden multi- und aperiodische Gitter in nanostrukturierten Wellenleitern zur Empfindlichkeitssteigerung analysiert. In Abbildung 4.1 sind alle untersuchten Strukturen schematisch dargestellt. In Zusammenarbeit mit dem KNMF wurden diese Nanostrukturen mit Hilfe von Elektronenstrahlolithographie auf einen Master geschrieben. Eine Liste der Gitterstrukturen ist in Anhang B zu finden.

Neben der spektralen Empfindlichkeit der nanostrukturierten Wellenleiter ist die Resonanzposition und die Resonanzform bei einer intensitätsbasierten Detektionsmethode, wie sie in dieser Arbeit für die markerfreie und parallele Detektion von mehreren Risikomarkern eingesetzt wird, entscheidend. Diese wird in diesem Kapitel zusätzlich sowohl in Transmission als auch in Reflexion genauer analysiert.

### 4.1. Finite- Differenzen-Methode: Simulationsmodell

Um möglichst geringe Proteinkonzentrationen nachweisen zu können, müssen photonische Kristalle auf Brechungsindexänderungen an der Oberfläche mit einer größtmöglichen Verschiebung der Resonanzwellenlänge reagieren. Für die resonante Anregung bzw. die Effizienzerhöhung von Fluorophoren ist hingegen eine hohe Feldstärke der evaneszenten Welle auf der Oberfläche entscheidend. Anhand der Finite- Differenzen-Methode im Zeitbereich (engl.: *finite-difference time domain*, FDTD) werden deshalb verschiedene Strukturen und Strukturparameter in photonischen Kristallen hinsichtlich Empfindlichkeit und Feldstärke an der Oberfläche theoretisch untersucht, um eine optimale Strukturkonfiguration für die jeweilige Anwendung zu identifizieren. Die Simulationsergebnisse werden entsprechend mittels experimentellen Ergebnissen verifiziert. Die FDTD-Methode ist eine numerische Methode, um die diskreten zeitabhängigen Maxwell-Gleichungen zu lösen [113], [114]. Für die Simulation wurde die kommerziell erhältliche Software *FDTD Solutions* der Firma *Lumerical* verwendet [115].

In diesem Simulationsprogramm wurde das Simulationsmodell, wie in Abbildung 4.2 gezeigt, in einem 2D Simulationsbereich implementiert<sup>7</sup>. Es besteht aus einer Einheitszelle, die in x-Richtung periodisch wiederholt wird. In y-Richtung wird die Zelle oben und unten mit perfekt abgestimmten bzw. absorbierenden Schichten (PML, engl. *perfectly matched layer*) abgeschlossen, wodurch unerwünschte direkte Reflexionen unterdrückt werden. Als Anregungsquelle wird eine planare Welle mit einem breitbandigen Spektrum und einer

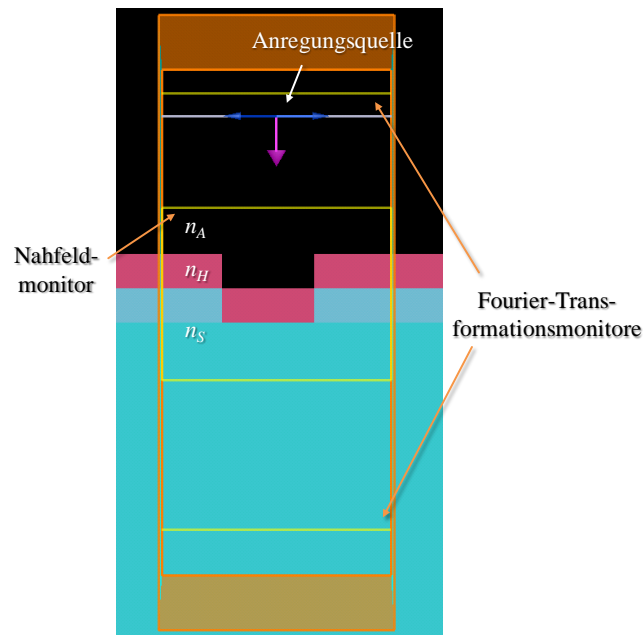
---

<sup>7</sup> Die erstmalige Konstruktion und Implementierung des in dieser Arbeit verwendeten Modells erfolgte durch Professor Dr. Jost Adam von der Universität Süddänemark (Mads Clausen Institut) und wurde entsprechend adaptiert.

zeitlichen Gaußschen Intensitätsverteilung gewählt. Über einen kurzen Puls werden die Moden in der Kristallstruktur angeregt. Um die Resonanzen der QGM extrahieren zu können, wird der Anregungsimpuls ähnlich zu dem Prozess von Fan und Joannopoulos [58] zeitlich herausgefiltert. Mit Hilfe von Fourier-Transformations-Monitoren werden die durch die Struktur transmittierten elektromagnetischen Komponenten des Feldes in das Fernfeld transformiert, wodurch die QGM als Resonanzen im Transmissionsspektrum sichtbar werden. 2D-Gitterkoppler bilden dann die Gitterstruktur des photonischen Kristalls im Substrat ( $n_S=1,52$ ). Entsprechend befindet sich das hochbrechende Wellenleitermaterial ( $n_H=2,44$ ) auf der Struktur. Als Umgebung wird entweder Luft ( $n_A=1,00$ ) oder Wasser ( $n_A=1,33$ ) gewählt. Die elektrische Feldstärke wird zusätzlich in Abhängigkeit der TE- ( $0^\circ$ ) oder TM- ( $90^\circ$ ) Polarisation des Anregungsimpulses mit Feldmonitoren aufgenommen.

In diesen Simulationen werden rein reelle und über den gesamten Spektralbereich gleichbleibende Brechungsindices für die einzelnen Komponenten gewählt. Es ist zwar möglich aus der Literatur bekannte Brechungsindexdispersionen für die einzelnen Materialien in *FDTD Solutions* einzupflegen, jedoch passen die Literaturwerte nicht immer mit den in dieser Arbeit hergestellten Schichten zusammen. Folglich wären Simulation und Experiment nur schwer vergleichbar. Darüber hinaus wird eine Größe von  $5 \times 5 \text{ nm}^2$  für das Mesh gewählt. Das bedeutet, dass innerhalb eines Rechtecks von  $5 \times 5 \text{ nm}^2$  die vorkommenden Brechungsindizes gemittelt werden. Bei der Wahl des Mesh muss immer zwischen Simulationsgenauigkeit, Simulationszeit und dem Datenvolumen abgewogen werden.





**Abbildung 4.2:** Aufbau der Simulationszelle in FDTD Solutions mit der Gitterstruktur im Substrat ( $n_s$ ), der Wellenleiterschicht ( $n_H$ ) und dem umgebenden Medium ( $n_A$ ). Der Monitor für die elektrische Feldstärke ist als gelbes Rechteck und die Fourier-Transformations-Monitore als gelbe Linien dargestellt. Der violette Pfeil spiegelt die Abstrahlrichtung der Anregungsquelle wieder.

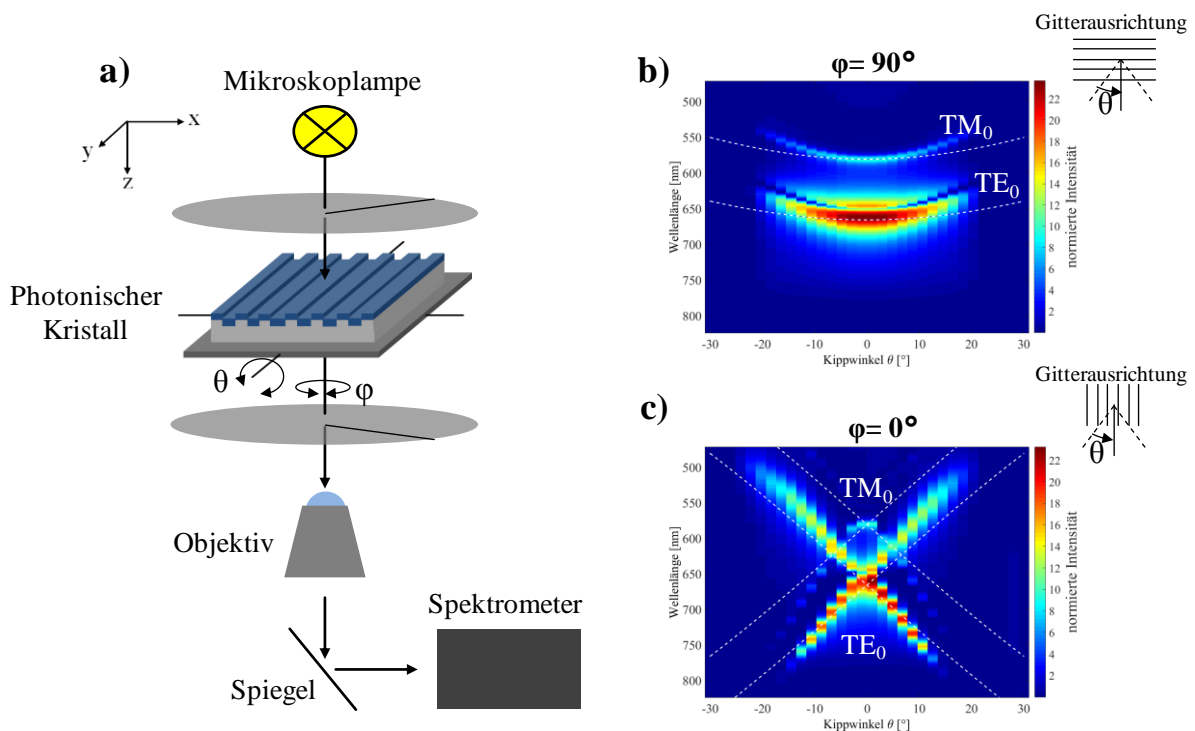
## 4.2. Resonanzverhalten in Abhängigkeit vom Beleuchtungs- und Detektionswinkel

In dieser Arbeit werden zwei Arten von intensitätsbasierten Messsystemen vorgestellt. Bei diesen Systemen spielen die Resonanzposition und Resonanzform, welche sowohl vom Beleuchtungs- als auch vom Detektionswinkel abhängig sind, eine große Rolle. Deswegen wird im Folgenden dieses Verhalten sowohl in Transmission als auch in Reflexion spektral genau charakterisiert. Dabei ist die Identifizierung der geeigneten Gitterausrichtung zur Beleuchtung und zum Detektor essentiell, denn Resonanzen von nanostrukturierten Wellenleitern besitzen eine hohe Winkelabhängigkeit, die sich negativ auf das zu detektierende Signal auswirken kann [116].

### 4.2.1. Spektrale Charakterisierung der photonischen Kristalle in Transmission

Für die Charakterisierung in Transmission werden die hergestellten photonischen Kristalle, wie in Abbildung 4.3a dargestellt, zwischen zwei lineare Polarisationsfilter, die

orthogonal zu einander angeordnet sind, auf einen Mikroskopisch platziert. Zur Anregung der Resonanzen wird das breitbandige Licht der Halogen-Mikroskoplampe benutzt. Die gekreuzten Polarisationsfilter bewirken in diesem Aufbau eine nahezu komplette Unterdrückung des Anregelichts [55]. Das Licht der Resonanz, welches in die Struktur ein- und wieder auskoppeln kann, erfährt hingegen eine Polarisationsdrehung und wird dadurch zum Objektiv und darüber weiter in ein Spektrometer geleitet. Es wird der Mikroskop-Spektrometer-Aufbau mit einer Kippvorrichtung, in die der photonische Kristall<sup>8</sup> eingespannt und in zwei Grad Schritten um den Winkel  $\theta$  gekippt werden kann, modifiziert



**Abbildung 4.3:** (a) Schema des Mikroskop-Spektrometer-Aufbaus zur winkelabhängigen Charakterisierung des photonischen Kristalls; (b) Spektrum des hergestellten photonischen Kristalls ( $\Lambda = 370 \text{ nm}$ ,  $d = 60 \text{ nm}$ ,  $t = 0,5$ ,  $h = 85 \text{ nm}$   $\text{TiO}_2$ ,  $n_{\text{TiO}_2} = 2,44$ ) in Abhängigkeit der Wellenlänge und des Winkels  $\theta$  mit einer Ausrichtung der Gitterstruktur parallel ( $\phi = 90^\circ$ ) und (c) senkrecht ( $\phi = 0^\circ$ ) zur x-Achse.

Anschließend wird die Gitterstruktur des photonischen Kristalls einmal parallel zur ( $\phi = 90^\circ$ ) und einmal senkrecht ( $\phi = 0^\circ$ ) zur x-Achse ausgerichtet und jeweils Spektren mit einem von  $-30^\circ$  bis  $+30^\circ$  variierendem Kippwinkel  $\theta$  aufgenommen. Für Abbildung 4.3 b) und c) wurde die Intensität der Resonanzen auf das Spektrum der Mikroskoplampe normiert und

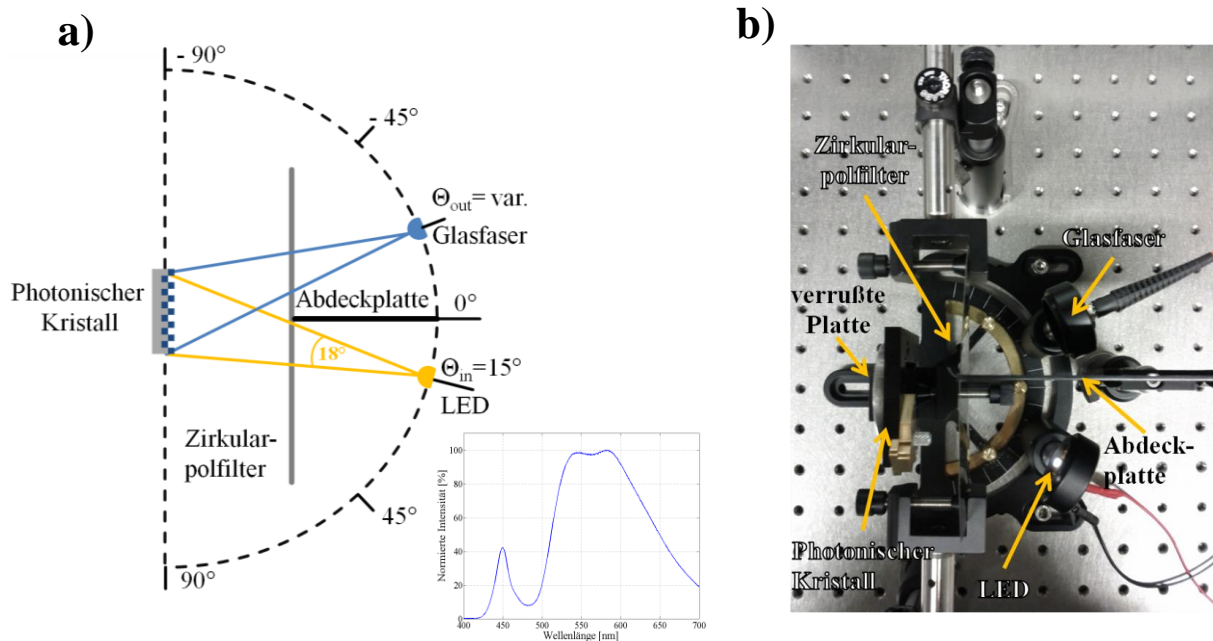
<sup>8</sup> Dieser Kristall besitzt eine Periode von 370 nm, Tastverhältnis von 0,5, Gittertiefe von 60 nm und eine 85 nm dicke  $\text{TiO}_2$ -Schicht.

die daraus resultierenden Spektren (in Falschfarben) gegenüber der Wellenlänge und dem Kippwinkel für jede Gitterorientierung aufgetragen. In beiden Abbildungen sind die  $TE_0$ - und die  $TM_0$ -Mode zu erkennen. Die Resonanz bei einer senkrechten Gitterausrichtung ( $\varphi = 0^\circ$ ) spaltet sich mit erhöhtem Kippwinkel ( $\theta$ ) auf. Es besteht eine starke Winkelabhängigkeit, die es für intensitätsbasierte Messmethoden zu vermeiden gilt. Richtet man nun die Gitterstruktur ( $\varphi = 90^\circ$ ) parallel zum Anregungslicht aus, dürfte nach Gleichung 2.17 sich die Resonanz nicht mehr aufspalten, sondern sich im Ganzen verschieben. Wie aus Abbildung 4.3b entnommen werden kann, bestätigen die experimentellen Untersuchungen diesen Sachverhalt. Die berechnete (gestrichelte weiße Linie) und die gemessenen Resonanzpositionen stimmen nahezu überein. Die Verkippung des Kristalls um  $\theta = 15^\circ$  bewirkt bei paralleler Ausrichtung eine Resonanzverschiebung von  $\lambda_{res} = -25$  nm, die im Vergleich zu der senkrechten Ausrichtung mit  $\lambda_{res} = -43$  nm verhältnismäßig gering ausfällt.

Aus diesen Ergebnissen kann nun abgeleitet werden, dass das Gitter des photonischen Kristalls parallel zur x-Achse ausgerichtet werden muss, um die Einflüsse von Winkeln auf die Resonanzposition bei einem intensitätsbasierten Messsystem zu minimieren.

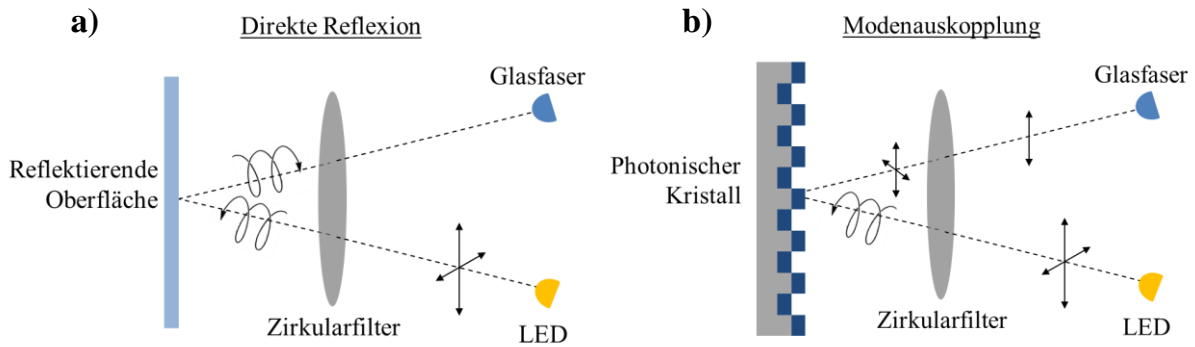
### 4.2.2. Spektrale Charakterisierung der photonischen Kristalle in Reflexion

Um ein möglichst kompaktes Messsystem zu realisieren und dafür beispielsweise die LED und die Kamera eines Smartphones als Messeinheit gleichzeitig benutzen zu können, ist eine Messung in Reflexion vorteilhafter als die bisher verwendete Transmissionsmethode. Hierfür wurde zunächst der in Abbildung 4.4 a) und b) dargestellte Messaufbau entworfen und die Winkelabhängigkeit des photonischen Kristalles in Reflexion untersucht.



**Abbildung 4.4:** (a) Schemazeichnung und (b) Foto des Reflexionsaufbaus für eine winkelabhängige Charakterisierung des photonischen Kristalls. Zur Anregung wird eine weiße LED und zur Detektion eine Glasfaser, die in das Spektrometer eingekoppelt ist, verwendet. Zudem ist das Spektrum der LED unter (a) dargestellt.

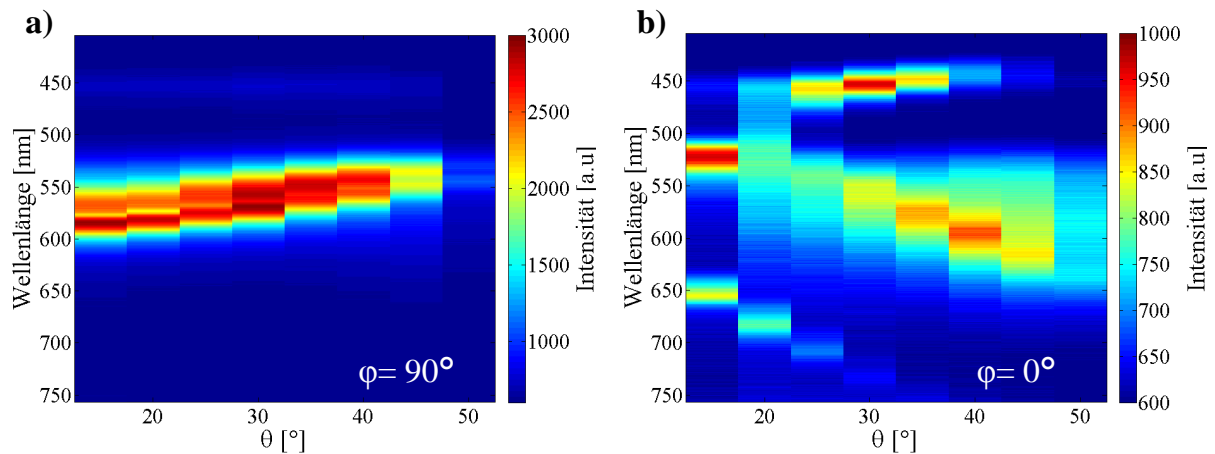
Als Lichtquelle wird eine weiße SMD-LED, wie sie auch in Smartphones verbaut ist (Spektrum siehe *Abbildung 4.4a*), sowie als Detektor eine in das Spektrometer eingekoppelte Glasfaser verwendet. Über eine Schiene lässt sich der Detektions- und Anregungswinkel von  $0^\circ$  bis  $90^\circ$  variieren. Jedoch können Glasfaser und LED wegen der Halterungen minimal auf  $10^\circ$  gleichzeitig eingestellt werden. Zur Vermeidung von direkter Einstrahlung der LED in die Glasfaser wird zwischen den beiden Bauteilen eine schwarze Abdeckplatte geschoben. Die Abdeckplatte bewirkt eine Reduzierung des auf den photonischen Kristall auftreffenden Abstrahlwinkels der LED von  $120^\circ$  auf  $18^\circ$ . Der Zirkularpolarisationsfilter sorgt hier, wie die linearen Polarisationsfilter bei der Transmissionsmessung, für die Unterdrückung von direkten Reflexionen an jeglichen Oberflächen. Dabei wird der Zirkularpolarisationsfilter vor den photonischen Kristall und in den Strahlengang der LED und des Detektors platziert.



**Abbildung 4.5:** Funktionsprinzip eines Zirkularpolarisationsfilters bei (a) direkter Reflexion und (b) bei Modenauskopplung.

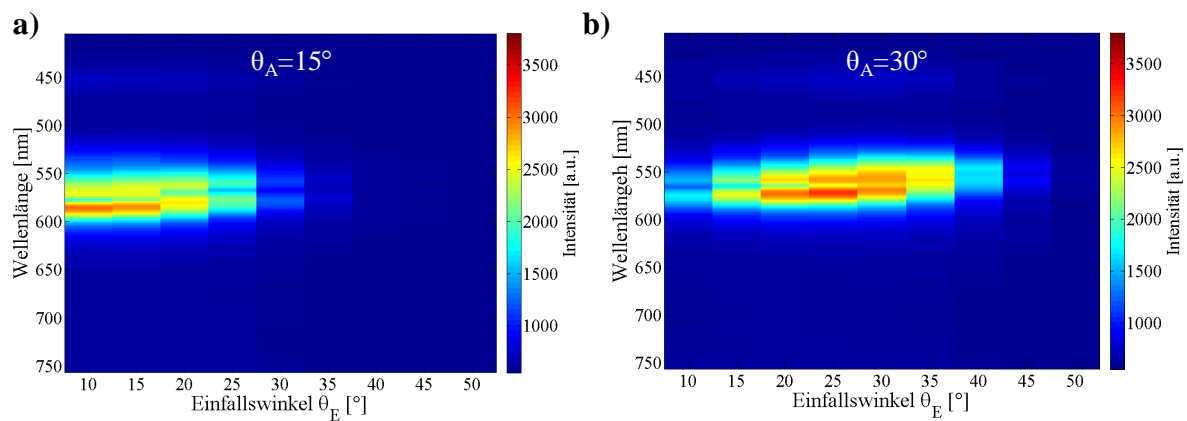
Der Zirkularfilter besteht aus einem linearen Polarisationsfilter und einer  $\lambda/4$ -Verzögerungsplatte, die miteinander zu einer Folie verklebt sind. Tritt das Licht durch den Zirkularpolarisationsfilter, wird es in rechtszirkuliertes Licht umgewandelt. Wird es dann von der Oberfläche des photonischen Kristalls oder der Halteroberfläche direkt reflektiert, erfährt das Licht eine Polarisationsdrehung und wird so beim Auftreffen auf den Zirkularpolarisationsfilter geblockt (Abbildung 4.5a). Das Licht, welches aus dem photonischen Kristall wieder auskoppelt, besitzt eine andere Polarisation und kann somit den Zirkularpolarisationsfilter passieren (Abbildung 4.5b)[114]. Hinter dem photonischen Kristall<sup>9</sup> wird zusätzlich zur Vermeidung ungewollter Reflexionen eine verrußte Metallplatte platziert. Genau wie bei der Transmissionsmessung werden nun für jede Gitterorientierung und variierende Anregungs- und Detektionswinkel Resonanzspektren aufgenommen.

<sup>9</sup> Dieser Kristall besitzt einer Periode von  $\Lambda = 370$  nm,  $t = 0,5$ ,  $d = 60$  nm und eine 45 nm dicke  $\text{TiO}_2$ -Schicht.



**Abbildung 4.6:** Spektrum des photonischen Kristalls in Abhängigkeit der Wellenlänge und des Einfalls- und Ausfallswinkels  $\theta = \theta_E = \theta_A$  mit einer Ausrichtung der Gitterstruktur (a) parallel ( $\varphi = 90^\circ$ ) und (b) senkrecht ( $\varphi = 0^\circ$ ) zur x-Achse.

In Abbildung 4.6 sind dann die resultierenden Resonanzspektren für Einfallswinkel  $\theta_E$  gleich Ausfallswinkel  $\theta_A$  und beide Gitterorientierungen gegenüber der Wellenlänge aufgetragen. Auch hier zeigt sich wieder, dass sich die Resonanz bei einer zur x-Achse senkrechten Gitterstruktur aufspaltet und bei einer parallelen nur leicht im Ganzen hin zu kürzeren Wellenlängen verschiebt.



**Abbildung 4.7:** Spektrum des photonischen Kristalls in Abhängigkeit der Wellenlänge für variierende Einfallswinkel bei festen Ausfallswinkel (a)  $\theta_E = 15^\circ$  und (b)  $\theta_E = 30^\circ$  mit einer zur x-Achse parallelen ( $\varphi = 90^\circ$ ) Ausrichtung der Gitterstruktur.

Es konnte zudem beobachtet werden, dass zum einen die Intensität der Resonanz bei  $\theta_A = \theta_E$  maximal wird und zum anderen Resonanzen im Winkel von  $\theta_A = \theta_E \pm 15^\circ$  auskoppeln können, jedoch mit immer schwächer werdender Intensität. Repräsentativ sind für die festen

Ausfallswinkel  $\theta_E = 15^\circ$  und  $\theta_E = 30^\circ$  die Resonanzspektren in Abhängigkeit des Einfallswinkels in Abbildung 4.7 gezeigt. Somit sollte zusammenfassend auch in Reflexion eine zur x-Achse parallele Ausrichtung der Gitterstruktur gewählt werden.

## 4.3. Nanostrukturen für die markerfreie Biosensorik

Entscheidend für die intensitätsbasierte Biosensorik ist eine hohe spektrale Empfindlichkeit. In diesem Kapitel werden deshalb mono-, multi- und aperiodisch strukturierte Wellenleiter untersucht. Das Ziel ist es, durch Variation von Designparametern wie z.B. dem Tastverhältnis und der Dicke der Wellenleiterschicht die Empfindlichkeit des Signalumwandlers für den in dieser Arbeit entwickelten intensitätsbasierten Biosensor zu steigern. Dafür werden die verschiedenen Gitterstrukturen inklusive ihrer Eigenschaften analysiert und bezüglich ihrer Eignung als Struktur für den Biosensor evaluiert.

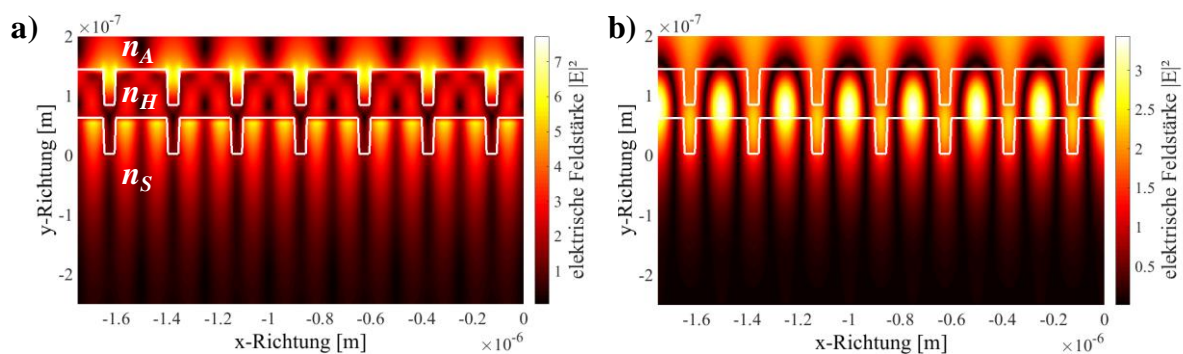
Zur Bestimmung der Gesamtempfindlichkeit wird die spektrale Verschiebung der Resonanz durch eine Brechungsindexänderung von  $\Delta n_A = 0,33$  erzeugt, in dem die Resonanzspektren jeweils für Luft ( $n = 1,00$ ) und Wasser ( $n = 1,33$ ) als umgebendes Medium aufgenommen werden.

Besonders die Empfindlichkeit photonischer Kristalle gegenüber Brechungsindexänderungen an der Oberfläche ist ein wichtiger Faktor, um empfindliche Messungen von Proteinkonzentrationen im pmol/l Bereich zu realisieren. Somit sollte das Design der photonischen Kristalle als Signalumwandler so optimiert werden, dass kleine Brechungsindexänderungen an der Oberfläche detektiert werden können. Diese Oberflächenempfindlichkeit benötigt eine andere optimale Designstruktur verglichen zur Gesamtempfindlichkeit. Für kleine Brechungsindexänderungen, wie sie bei der Proteinassoziation erzeugt werden, kann die elektrische Feldstärke an der Oberfläche näherungsweise als Maß für die Oberflächenempfindlichkeit verwendet werden [117], [118]. Deshalb wird neben der Gesamtempfindlichkeit auch die elektrische Feldstärke für verschiedene Gitterstrukturen theoretisch untersucht.

### 4.3.1. Monoperiodische Gitterstrukturen

Die Einflüsse der Wellenleiterschichtdicke als auch die Einflüsse des Tastverhältnisses auf die Empfindlichkeit monoperiodischer Gitter wird in diesem Kapitel analysiert. Die Ausgangsstruktur bildet ein monoperiodisches Gitter mit einer Periode von  $\Lambda = 370$  nm und einer Strukturtiefe von  $d = 60$  nm. Bei der Empfindlichkeit wird zwischen Oberflächen- und

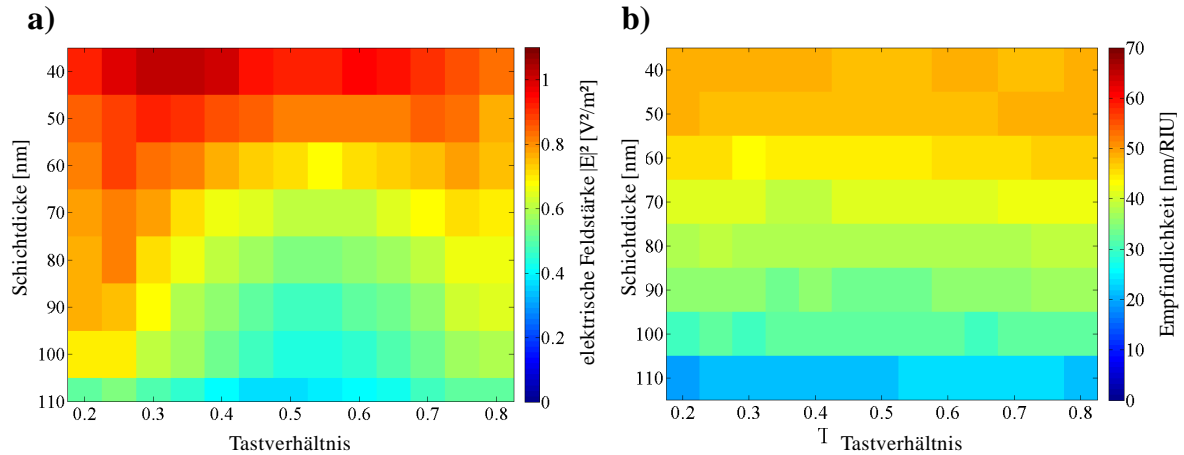
Gesamtempfindlichkeit unterschieden. Zur Berechnung der Gesamtempfindlichkeit wird die Peakwellenlänge für die unterschiedlichen Umgebungsmedien und somit die Resonanzverschiebung  $\Delta\lambda$  bestimmt. Anschließend wird  $\Delta\lambda$  durch die Brechungsindexänderung  $\Delta n$  dividiert. Die Oberflächenempfindlichkeit wird hingegen über die elektrische Feldstärke  $|E|^2$  an der Oberfläche approximiert. In Abbildung 4.8 ist zunächst die Verteilung der elektrischen Feldstärke  $|E|^2$  im Resonanzfall für TE- und TM-Polarisation gezeigt. Zur Berechnung der elektrischen Feldstärke wird der Mittelwert ( $\overline{|E|^2}$ ) über alle einzelnen Feldstärken ( $|E_i|^2$ ) entlang der Hochindexschicht (obere weiße Linie) und in einem Bereich bis zu  $\Delta y = 5$  nm oberhalb der Oberfläche gebildet.



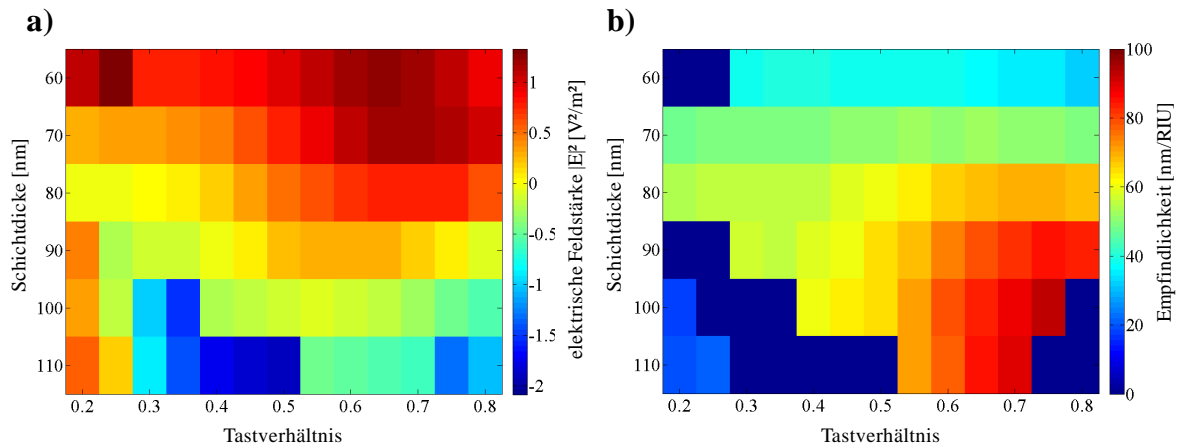
**Abbildung 4.8:** Verteilung der elektrischen Feldstärke  $|E|^2$  innerhalb eines monoperiodischen Gitters für (a) TM- und (b) TE-polarisierte Anregung. Die gestrichelte weiße Linie kennzeichnet die Gitterstruktur.

Die Feldstärke und die Gesamtempfindlichkeit werden nun für verschiedene Schichtdicken und Tastverhältnisse anhand der simulierten Ergebnisse bestimmt. In Abbildung 4.9 und Abbildung 4.10 sind die Ergebnisse für  $TE_0$ - und  $TM_0$ -Resonanzen dargestellt. Für TM-polarisiertes Licht waren für einige Tastverhältnisse keine Resonanzen in dem betrachteten Spektralbereich (350 nm – 700 nm) zu erkennen, weswegen die Empfindlichkeiten für diese Tastverhältnisse bei 0 nm/RIU liegen.





**Abbildung 4.9:** a) Elektrische Feldstärke  $|\bar{E}|^2$  und (b) Gesamtempfindlichkeit eines monoperiodischen Gitters ( $\Lambda = 370$  nm,  $d = 60$ ) aufgetragen gegenüber der Schichtdicke und dem Tastverhältnis für TE-Polarisation.



**Abbildung 4.10:** a) Elektrischen Feldstärke  $|\bar{E}|^2$  und (b) Gesamtempfindlichkeit eines monoperiodischen Gitters ( $\Lambda = 370$  nm,  $d = 60$ ) aufgetragen gegenüber der Schichtdicke und dem Tastverhältnis für TM-Polarisation.

Während das Tastverhältnis für die TE-Resonanz keinen entscheidenden Einfluss auf die Gesamtempfindlichkeit besitzt, kann die elektrische Feldstärke bzw. die Oberflächenempfindlichkeit durch die geeignete Wahl des Tastverhältnisses doch deutlich gesteigert werden. Wählt man beispielsweise für TE-polarisiertes Licht eine Schichtdicke von  $h = 100$  nm und ein Tastverhältnis von  $t = 0,2$ , ist die Änderung der elektrischen Feldstärke um 1,5-mal größer als mit  $t = 0,5$ .

Zusätzlich zeigen diese Abbildungen, dass die TM-Resonanz mit einer maximalen Gesamtempfindlichkeit von bis zu  $S_{max} = 92,37$  nm/RIU empfindlicher auf Brechungsindexänderungen reagiert. Die TE-Resonanz weist im Vergleich dazu lediglich eine Empfindlichkeit von  $S_{max} = 49,22$  nm/RIU auf.

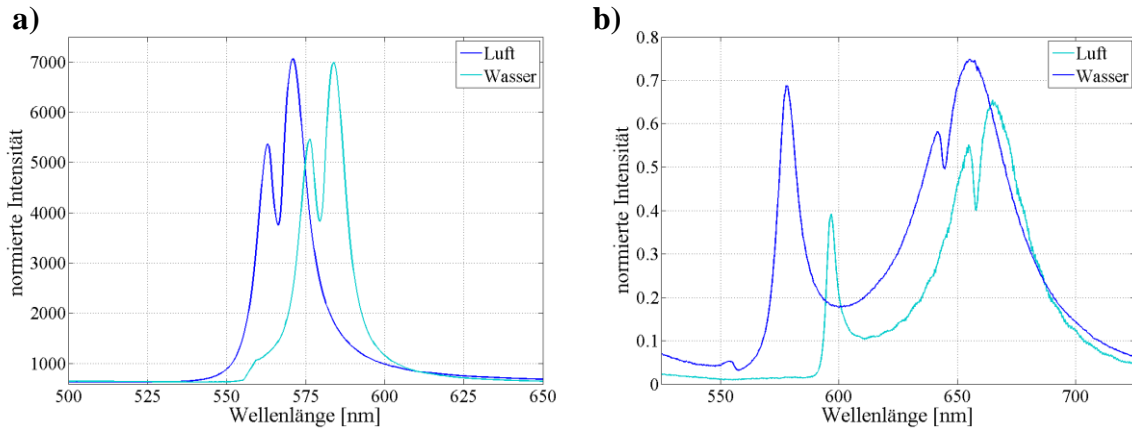
## Vergleich Simulation und Experiment

Zur Verifizierung der theoretischen Ergebnisse wurde auf monoperiodische Gitterstrukturen ( $\Lambda = 370$  nm,  $t = 0,5$ ,  $d = 60$  nm) jeweils eine  $\text{TiO}_2$ -Schichtdicke von  $h_1 = 45$  nm und  $h_2 = 85$  nm aufgetragen und die Resonanzspektren für Luft und Wasser auf der Oberfläche mit dem Transmissionsaufbau aus Abbildung 4.3a aufgenommen (Abbildung 4.11). Dafür wurde jeder photonische Kristall in eine Fluidzelle eingebaut. Ein O-Ring wird zwischen den photonischen Kristall und einem Glassubstrat platziert. Zwei Flügelkanülen werden durch den O-Ring als Zu- und Ablauf für den Austausch der zu detektierenden Flüssigkeit gestochen. Alles wird dann mit Substrathaltern, die miteinander verschraubt sind, fixiert.

Wie in Abbildung 4.11a zu sehen ist, bildet sich in dem photonischen Kristall mit der dünneren  $\text{TiO}_2$ -Schicht nur die  $\text{TE}_0$ -Resonanz aus. Dieser Kristall besitzt eine Gesamtempfindlichkeit von  $S_{exp.} = 39,7$  nm/RIU. Die gemessene und simulierte Empfindlichkeit, welche für diese Konfiguration des photonischen Kristalls  $S_{sim.} = 47,77$  nm/RIU beträgt, unterscheiden sich somit um  $\Delta S = 8,07$  nm/RIU.

In dem photonischen Kristall mit der dickeren  $\text{TiO}_2$ -Schicht bilden sich sowohl die  $\text{TE}_0$ - als auch die  $\text{TM}_0$ -Resonanz aus (Abbildung 4.11b). Hier betragen die Empfindlichkeiten für die  $\text{TE}_0$ -Resonanz  $S_{exp,TE0} = 31,21$  nm/RIU und die  $\text{TM}_0$ -Resonanz  $S_{exp,TM0} = 57,27$  nm/RIU. Die dazugehörigen simulierten Empfindlichkeiten ( $S_{sim,TE0} = 37,54$  nm/RIU,  $S_{sim,TM0} = 60,85$  nm/RIU) weichen auch hier etwas von den experimentellen Ergebnissen ab. Da aber in den Simulationen feste Brechungsindizes angenommen und damit die Brechungsindexdispersionen und die Absorptionseigenschaften der einzelnen Materialien vernachlässigt werden, können diese Abweichungen dadurch erklärt werden.

Aus den Simulationen können die optimalen Designparameter identifiziert und auf die Experimente übertragen werden. Zusammenfassend sollte somit für die  $\text{TM}$ -Resonanz eine Schichtdicke von  $h = 100$  nm und einem Tastverhältnis von  $t = 0,75$  gewählt werden, um sowohl die Oberflächen- als auch die Gesamtempfindlichkeit des photonischen Kristalls zu steigern und somit empfindliche Proteindetektionen zu ermöglichen.



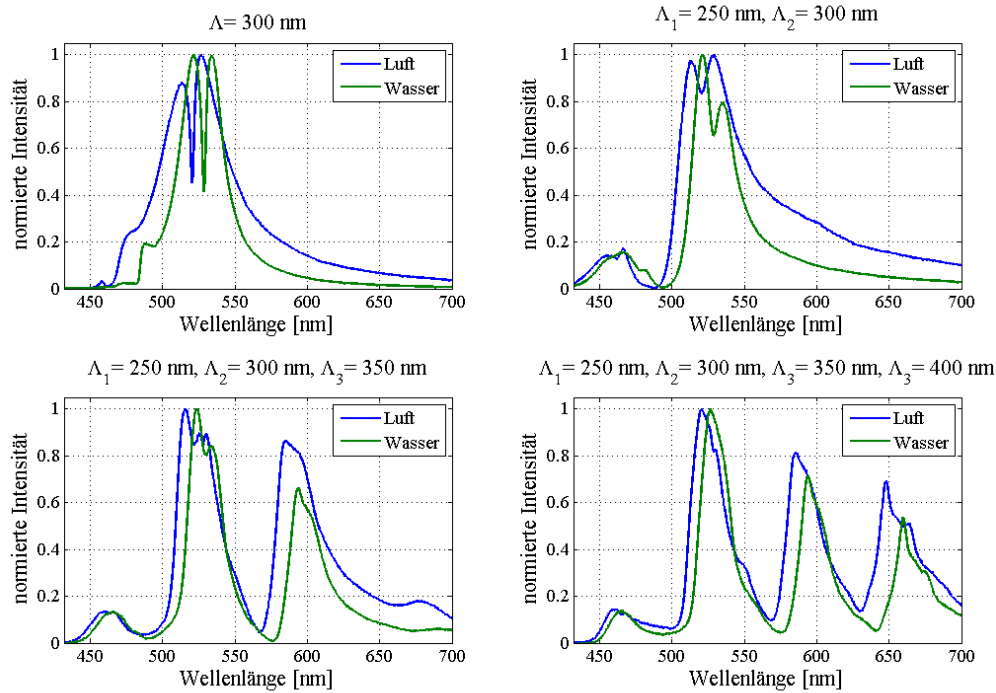
**Abbildung 4.11:** Resonanzspektren photonischer Kristalle mit  $\Lambda = 370$  nm,  $t = 0,5$  und einer TiO<sub>2</sub>-Schichtdicke von (a)  $h_1 = 45$  nm und (b)  $h_2 = 85$  nm. Zur Bestimmung der Gesamtempfindlichkeit befindet sich jeweils Luft und Wasser auf der Oberfläche.

#### 4.3.2. Multi- und aperiodische Gitterstrukturen

Es wurden bereits die spektralen Eigenschaften und die Gesamtempfindlichkeit von multi- und aperiodischen Gitterstrukturen in photonischen Quasikristallen hauptsächlich theoretisch untersucht [150]. Die theoretischen Ergebnisse wurden anhand einzelner Experimente verifiziert. Es konnte zwar keine Steigerung der Gesamtempfindlichkeit festgestellt werden, jedoch nimmt die Güte der Resonanzen mit der Unordnung, d.h. von rein monoperiodisch über multiperiodisch bis zu aperiodisch, in der Gitterstruktur deutlich zu.

Deshalb werden aufbauend auf diesen Ergebnissen in dieser Arbeit die Gesamtempfindlichkeit und die Güte von zwei-, drei-, vier- und aperiodisch strukturierten Wellenleitern experimentell bestimmt und mit den theoretischen Ergebnissen verglichen.

In Abbildung 4.12 sind exemplarisch die Resonanzen von zwei-, drei- und vierperiodisch strukturierten Wellenleitern gezeigt. Diese Strukturen befinden sich als  $2 \times 2$  mm<sup>2</sup> große Felder auf einem  $25 \times 25$  mm<sup>2</sup> großen Master und sind zusammen mit anderen Strukturen in einer Matrix von  $3 \times 3$  Feldern angeordnet. Als Referenz befindet sich zusätzlich ein monoperiodisches Gitter auf diesem Master. Mit Hilfe des h-PDMS-Prozesses wurden die Strukturen vom Master (Kapitel 3.1.2.) auf ein Glassubstrat übertragen. Eine 85 nm dicke Niob(V)-Oxid-Schicht ( $n_{\text{Nb}_2\text{O}_5} = 2,3$ ) wurde als Wellenleitermaterial auf die Struktur abgeschieden. Das Substrat mit den einzelnen Strukturen wurde in eine Fluidzelle platziert und die Spektren für Luft und Wasser als umgebendes Medium mit Hilfe des Mikroskopaufbaus (Abbildung 4.3a) aufgenommen.



**Abbildung 4.12:** Resonanzspektren von photonischen Quasikristallen mit ein-, zwei-, drei- und vierperiodischer Gitterstruktur und mit Luft und Wasser als umgebendes Medium.

Zum einen ist für jede zusätzliche überlagerte Periode eine zusätzliche Resonanz im Transmissionsspektrum sichtbar. Zum anderen verschieben sich alle Resonanzen durch die Erhöhung des Brechungsindex in Richtung höherer Wellenlängen. Wie stark die einzelnen Resonanzen schieben bzw. wie hoch die daraus resultierende Gesamtempfindlichkeit ist, ist neben der Halbwertsbreite (FWHM) und der Position ( $\lambda_{peak}$ ) der einzelnen Resonanzen in Tabelle 4.1 dokumentiert.

Weil aufgrund der Resonanzformen die exakte Resonanzwellenlänge nicht ermittelt werden kann, wird hier statt der Güte die Halbwertsbreite angegeben. Wie aus den simulierten Ergebnissen zu erwarten war, wird die Gesamtempfindlichkeit mit Anzahl der überlagerten Perioden nicht verbessert. Allerdings konnte auch nur teilweise eine Verbesserung der Halbwertsbreite und damit der Resonanzgüte mit der Anzahl der überlagerten Perioden beobachtet werden. Die multiperiodischen Strukturen enthalten zum Teil sehr feine Stege mit einer Stegbreite von ca. 10 nm, die mit dem hier verwendeten Abformungsprozess nur schwer eins zu eins auf ein Substrat übertragen werden können.

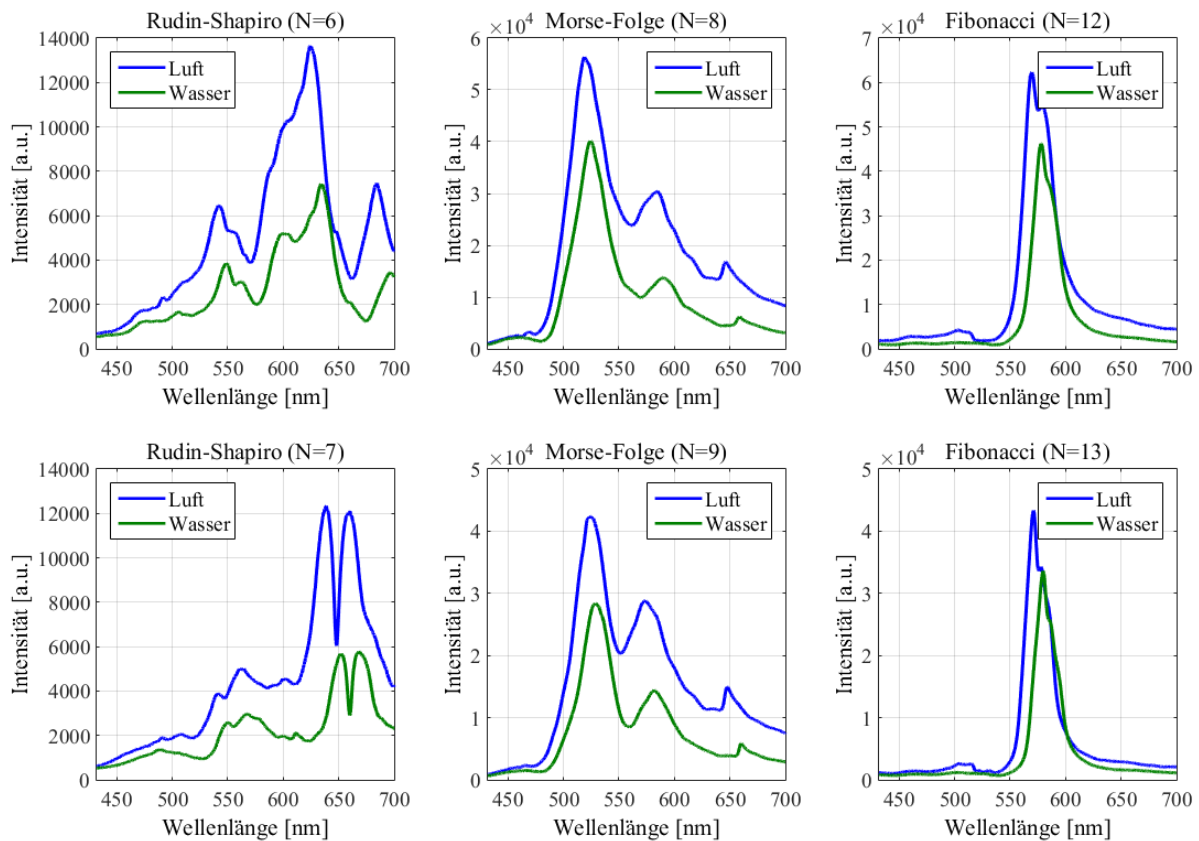
	Peakwellenlänge $\lambda_{peak}$ [nm]	Empfindlichkeit $S$ [nm/RIU]	Halbwerts- breite [nm]
$\Lambda = 300$ nm	526,3	23,03	47,4
$\Lambda_1 = 250$ nm, $\Lambda_2 = 300$ nm	455,5	30,30	28,2
	529,4	17,87	49,1
$\Lambda_1 = 250$ nm, $\Lambda_2 = 300$ nm, $\Lambda_3 = 350$ nm	460,1	17,57	26,1
	516,1	24,84	29,6
	584,1	26,96	33,4
$\Lambda_1 = 250$ nm, $\Lambda_2 = 300$ nm, $\Lambda_3 = 350$ nm, $\Lambda_4 = 400$ nm	460,4	16,66	28,5
	520,5	18,78	26,2
	586,2	22,12	28,5
	648,2	34,54	33,4

**Tabelle 4.1:** Experimentell ermittelte Gesamtempfindlichkeiten  $S$  und Halbwertsbreite der ein-, zwei-, drei- und vierperiodischen Strukturen und die ausgewertete Peakwellenlänge  $\lambda_{peak}$  bei Luft.

### Analyse von aperiodischen Gitterstrukturen in nanostrukturierten Wellenleitern

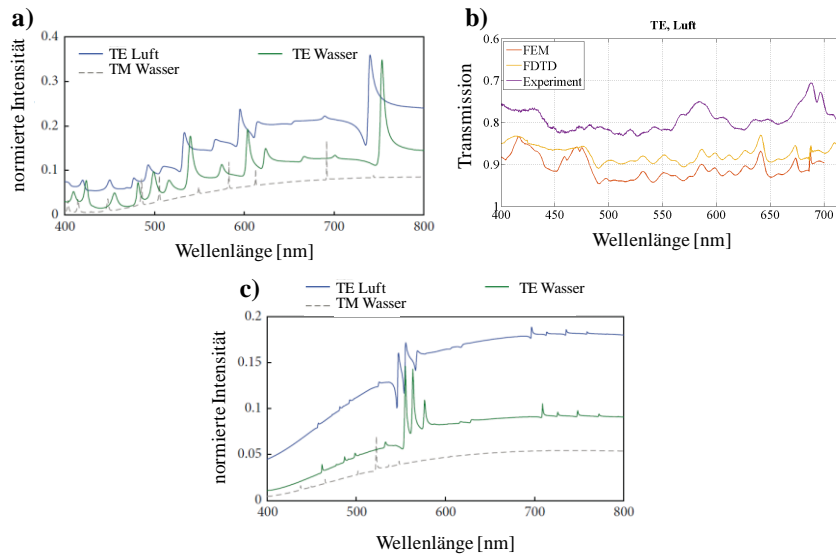
Nun werden die aperiodischen Strukturen experimentell untersucht. Für die aperiodischen Strukturen wurden, wie in Kapitel 2.2.2. beschrieben, exemplarisch binäre Sequenzen der drei mathematischen Folgen Rudin-Shapiro, Morse-Folge und Fibonacci in eindimensionale symmetrische Strukturen übertragen. Es wurden von jeder Folge jeweils zwei Strukturen auf den Master realisiert. Die Substitutionsregeln, die zur Erzeugung der Folgen als Gitterstrukturen verwendet werden, können simulationsbedingt nicht unendlich oft ausgeführt werden, da die Simulationszelle entsprechend unendlich groß ausfallen würde. Die zwei Strukturfelder pro Folge unterscheiden sich deshalb nur in der Anzahl der Iterationsschritte ( $N$ ).

Die aperiodischen Strukturen wurden aufgrund ihrer sehr feinen Gitterstrukturen auch mit dem h-PDMS (Kapitel 3.1.2.) auf ein Glassubstrat übertragen. Genau wie bei den multiperiodischen Kristallen wurde eine 85 nm Niob(V)-Oxid-Schicht ( $n_{\text{Nb}_2\text{O}_5} = 2,3$ ) als Wellenleitermaterial aufgetragen. Das Substrat mit den aperiodischen Quasikristallen wird zur Bestimmung der Gesamtempfindlichkeit in eine Fluidzelle eingebaut und erneut refraktometrische Messungen mit Luft und Wasser als umgebendes Medium durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.13 zu sehen.



**Abbildung 4.13:** Resonanzspektren der aperiodischen, photonischen Quasikristalle mit Luft und Wasser als umgebendes Medium.

Bis auf die Rudin-Shapiro-Folge hat die Anzahl der Iterationsschritte keinen Einfluss auf die Form der Resonanzspektren. Auch fällt auf, dass die hier gezeigten Spektren nicht mit den Spektren aus [150] übereinstimmen (Abbildung 4.14 a und c). Sie sind deutlich breiter und der Resonanzkamm, der durch die simulierte Fibonacci-Folge erzeugt wurde, verschwimmt zu einer einzelnen Resonanz (Abbildung 4.14c). Bei der simulierten Struktur handelt es sich allerdings um eine sehr stark vereinfachte Struktur, bei der sich lediglich Wellenleitermaterial und Substrat abwechseln und die Wellenleiterschicht auf den Stegen weggelassen wurde. Die Simulationen mit FDTD aus [161] passen deutlich besser zu diesen Ergebnissen, da die simulierte Struktur mehr Ähnlichkeit mit den realen Strukturen besitzt (Abbildung 4.14b).



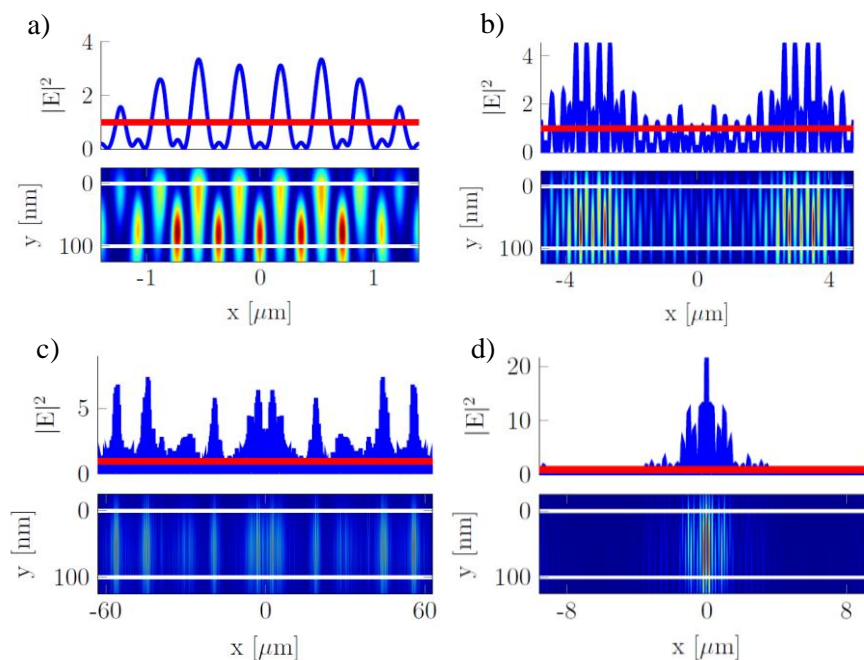
**Abbildung 4.14:** Simulierte Resonanzspektren für die Rudin-Shapiro-Folge (a) mit vereinfachter Simulationsstruktur und (b) mit realitätsnäherer Simulationsstruktur [150]. c) Simuliertes Resonanzspektrum für die Fibonacci-Folge [161].

Die Gesamtempfindlichkeit wurde für jeden Intensitätspeak bestimmt und in Tabelle 4.2 dokumentiert. Die hier ermittelten Gesamtempfindlichkeiten bestätigen die Aussage von Neustock et al., dass die Gesamtempfindlichkeit durch die aperiodischen Gitterstrukturen im Vergleich zu monoperiodischen Gittern nicht gesteigert wird. Sie verschlechtern in diesen Experimenten sogar die Gesamtempfindlichkeit.

	Peakwellenlänge $\lambda_{peak}$ [nm]	Empfindlichkeit $S$ [nm/RIU]
Rudin-Shapiro (N=6)	542,1	23,03
	625,8	28,18
	684,4	13,4
Rudin-Shapiro (N=7)	638,9	41,8
	660,3	28,18
Morse-Folge (N=8)	519,8	15,75
	585,9	19,69
	646,1	37,57
Morse-Folge (N=9)	524,7	13,33
	574,2	21,81
	647,9	35,45
Fibonacci (N=12)	569,7	28,66
Fibonacci (N=13)	571,1	26,96

**Tabelle 4.2:** Experimentell ermittelte Gesamtempfindlichkeiten  $S$  der verschiedenen aperiodischen Strukturen und die ausgewertete Peakwellenlänge  $\lambda_{peak}$  bei Luft.

Betrachtet man jedoch die elektrische Feldverteilung in multi und aperiodischen photonischen Quasikristallen ist eine lokale Felderhöhung der QGM zu beobachten. Für Abbildung 4.15 wurde zunächst die elektrische Feldverteilung (unterer Teil) für jede Resonanz, die sich in den sehr vereinfachten Strukturen aus [150] ausbildet, mit Hilfe eines Algorithmus, der auf der Methode der gekoppelten Wellen (engl. *rigorous coupled-wave analysis*, RCWA) beruht, betrachtet<sup>10</sup>. Es sind sehr gut die evaneszenten Wellen der Moden sichtbar, die aus der Struktur herausragen. Als nächstes wurde der Mittelwert des Betragsquadrates der elektrischen Feldstärke über die gesamte Strukturoberfläche berechnet (rote Linie). Dies entspricht der Systemantwort des photonischen Quasikristalls bei einer Brechungsindexänderung über die ganze Oberfläche. Anschließend wurde die elektrische Feldstärke orts aufgelöst in X-Richtung berechnet (blaue Linie).



**Abbildung 4.15:** Betragsquadrat der elektrischen Feldstärke an der Oberfläche und Betragsquadrat der elektrischen Feldverteilung innerhalb der Strukturen: (a) zwei-periodisches Gitter bei  $\lambda_{res} = 600 \text{ nm}$ , (b) Rudin-Shapiro-Folge bei  $\lambda_{res} = 600 \text{ nm}$ , (c) fünf-periodisches Gitter bei  $\lambda_{res} = 600 \text{ nm}$  und (d) Morse-Folge bei  $\lambda_{res} = 552 \text{ nm}$ . Weiße Linien kennzeichnen die obere und untere Seite der Hochindexschicht [157].

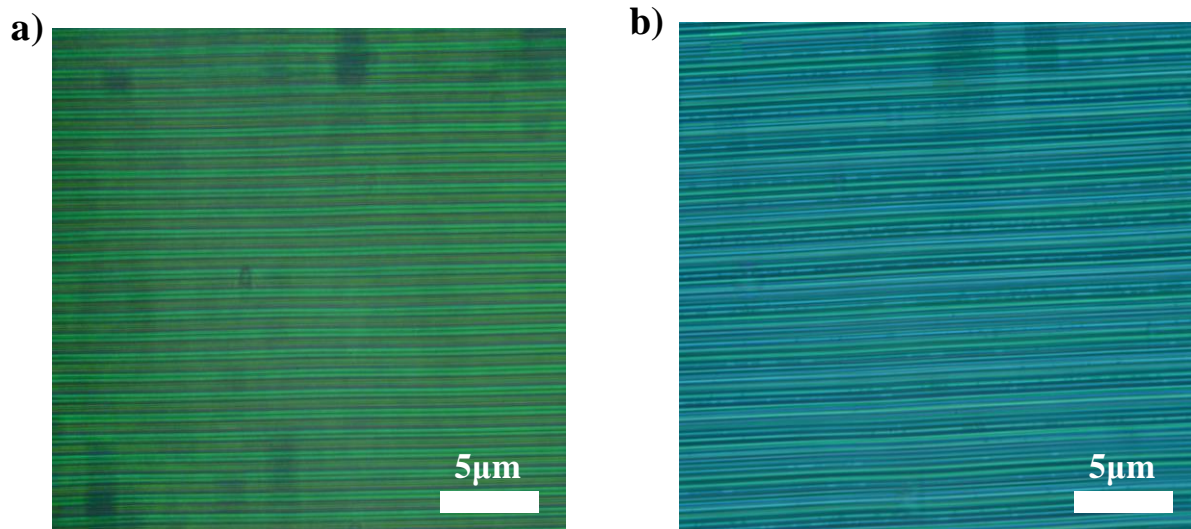
Gemäß den Ergebnissen ist die mittlere elektrische Feldstärke für alle Strukturen vergleichsweise ähnlich, was auch durch die Betrachtung der Gesamtampfindlichkeiten zu

<sup>10</sup> Diese Simulationen wurden von Lars-Thorben Neustock innerhalb der von mir betreuten Masterarbeit durchgeführt.

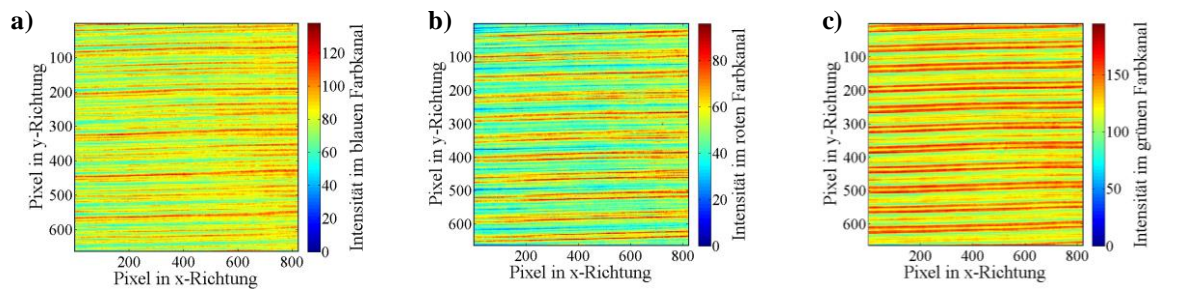


erwarten war. Jedoch sind die Moden in den verschiedenen Strukturen unterschiedlich stark lokalisiert. Die maximalen Feldstärken liegt sogar teilweise deutlich höher als der Mittelwert, was eine deutliche Empfindlichkeitssteigerung in diesen Bereichen verspricht. Die Morse-Folge besitzt beispielsweise eine starke lokalisierte Feldverteilung mit einer 20-fach höheren Feldstärke auf der Oberfläche als der Mittelwert (Abbildung 4.15d).

Dieser Effekt wurde in ersten experimentellen Untersuchungen bestätigt, wie man in Abbildung 4.16 sieht. Für die Fotos wurden photonische Quasikristalle (Morse-Folge (a) und vierperiodisches Gitter (b)) in den Mikroskopaufbau gelegt und mit 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Fotos zeigen, dass sich die vorher beobachteten Resonanzen bei beiden Kristallen lokal auszubilden scheinen. Durch die Zerlegung der Aufnahme vom photonischen Quasikristall mit Morse-Folge in die blauen, grünen und roten Farbwerte wird dieser Eindruck bestätigt (Abbildung 4.17). Um eine Aussage über die Oberflächenempfindlichkeit der realen Strukturen treffen zu können und ob diese Resonanzen sich wirklich nur lokal ausbreiten, müssen allerdings noch weitere Experimente durchgeführt werden.



**Abbildung 4.16:** Fotos von photonischen Quasikristallen (a) mit Morse-Folge und (b) vierperiodischem Gitter als Struktur. Die Fotos wurden mit dem Mikroskopaufbau zwischen gekreuzten Polarisationsfiltern bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen.



**Abbildung 4.17:** Foto des photonischen Quasikristalls mit Morse-Folge wurde in seine Grundfarbwerte zerlegt. Gezeigt sind die daraus resultierenden Falschfarbenbilder des (a) blauen, (b) roten und (c) grünen Farbkanals.

## 4.4. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde zuerst das Simulationsmodell, mit dem in dieser Arbeit verschiedene Designparameter von nanostrukturierten Wellenleitern untersucht wurden, vorgestellt. Für intensitätsbasierte Messsysteme, wie sie im Laufe dieser Arbeit entwickelt wurden, spielen die Resonanzposition und die Resonanzform der photonischen Kristalle eine große Rolle, weshalb zunächst der Einfluss von Beleuchtungs- und Detektionswinkel und der Gitterorientierung sowohl in Transmission als auch in Reflexion untersucht wurde. Um die Aufspaltung der Resonanz und somit unerwünschte Signale zu vermeiden, sollte daher bei beiden Messrichtungen eine zur x-Achse parallele Anordnung der Gitterstruktur zum Detektor und zur Lichtquelle gewählt werden. Neben der Resonanzform und Resonanzposition ist die spektrale Empfindlichkeit von photonischen Kristallen für die markerfreie Biosensorik entscheidend. Hierfür wurden die Dicke der Wellenleiterschicht und das Tastverhältnis von monoperiodischen Gitterstrukturen simulativ untersucht und mit ausgewählten Experimenten verifiziert. Die höchste Empfindlichkeit mit  $S_{max} = 92,37$  nm/RIU wurde für TM-Resonanzen identifiziert, wenn die Struktur eine 100 nm dicke Wellenleiterschicht und ein Tastverhältnis von  $t = 0,75$  besitzt.

Als weiteren Ansatz wurden die Gesamtempfindlichkeit und die Resonanzgüte von multi- und aperiodischen Gitter in nanostrukturierten Wellenleitern untersucht, um die Detektionsgrenze des hier entwickelten Messsystems weiter zu verbessern. Mit einer Erhöhung der Unordnung in der Gitterstruktur, d.h. von streng monoperiodisch über multiperiodisch zu aperiodisch, konnte teilweise eine Verbesserung der Resonanzgüte beobachtet werden. Eine Steigerung der Gesamtempfindlichkeit bei diesen Strukturen konnte generell nicht festgestellt werden. Sie wurde im Gegenteil bei aperiodischen Strukturen eher noch verschlechtert. Jedoch konzentriert sich die Ausbildung der Resonanzen in diesen

Strukturen sehr stark auf einen Bereich, was mit einer lokalen Felderhöhung und somit mit einer potentiellen, lokalen Empfindlichkeitssteigerung einhergeht. Durch die gezielte Funktionalisierung dieser „Hotspots“ mit Rezeptoren erscheint eine Verbesserung des Detektionslimits möglich.



# Kapitel 5

## Bildgebende Messsysteme für die markerfreie und multiparametrische Proteindetektion

---

### Zusammenfassung

*In diesem Kapitel wird zunächst ein Kamera-basiertes Messgerät zur parallelen Proteindetektion demonstriert, welches in Transmission betrieben wird. Zur Unterdrückung des systembedingten Hintergrundrauschens wird ein Algorithmus implementiert, mit dem allein die Intensitätsänderung bedingt durch die Proteinanbindung abgebildet wird. Als Weiterentwicklung werden zwei Smartphone-Adapter untersucht: ein Design mit und eines ohne Optik. Mit dem optik-freien Design wurde mit Hilfe von Brechungsindexmessungen ein Detektionslimit von  $LOD = 1,4 \cdot 10^{-3}$  RIU erreicht, während der Adapter mit Optik hingegen nur ein Detektionslimit von  $LOD = 2,1 \cdot 10^{-3}$  RIU besitzt. Deshalb wurden mit dem Kamera-basierten Messgerät Bindungsanalysen mit Antikörpern und Aptameren durchgeführt und miteinander verglichen. Es konnte mit diesem System die parallele und spezifische Detektion von 90 nM CD40 Ligand Antikörper, 90 nM EGF Antikörper und 500 nM Streptavidin an sechs Messpositionen erreicht werden. Experimentell konnte ein Detektionslimit von  $LOD_{exp} = 9$  nM CD40 Ligand Antikörper nachgewiesen werden.<sup>11</sup>*

---

<sup>11</sup> Teile dieses Kapitels wurden bereits in [148], [151], [152] und [158] veröffentlicht.

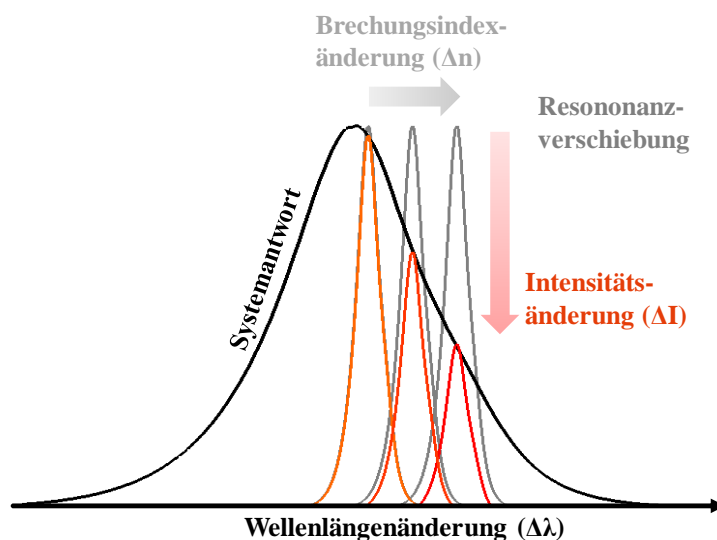
## 5.1. Bildgebende Messsysteme für die parallele Proteindetektion

### 5.1.1. Funktionsweise der bildgebenden Proteindetektion

Wie in Kapitel 2.2. beschrieben, reagieren photonische Kristalle auf Brechungsindexänderungen mit einer Verschiebung der Resonanzposition. Da Proteine einen Brechungsindex von ca. 1,6 besitzen, erhöht sich der Brechungsindex auf der Oberfläche, was eine Verschiebung zu höheren Wellenlängen verursacht [119]. Werden dann die Rezeptoren auch noch lokal an die Oberfläche des photonischen Kristalls gebunden, verursacht die Assoziation der Proteine an den entsprechenden Stellen eine Wellenlängenverschiebung der Resonanz. Spektrometer-basierte Messsysteme können zwar die Resonanzverschiebung an mehreren Bindungsstellen durch eine spektrale Abrasterung bestimmen, jedoch benötigen diese Systeme bewegliche und meist motorisierte Probenhalter, wodurch diese Systeme für den Patienten selbst eher schwieriger zu bedienen sind [27].

Nazirizadeh et al. [22] stellten 2008 eine Spektrometer-freie Messmethode zur Proteindetektion mittels photonischer Kristalle vor. Dabei wurde der Biosensor in Form eines flächig funktionalisierten photonischen Kristalls zwischen zwei gekreuzte lineare Polarisationsfilter platziert. Durch diesen Aufbau wird, wie schon aus Kapitel 4 bekannt, nahezu das gesamte Anregungslicht unterdrückt. Zur Anregung wird eine farbige Leuchtdiode (LED) mit einem schmalen Lichtspektrum und steil abfallenden spektralen Flanken verwendet. Wird nun die Resonanzwellenlänge auf die abfallende Flanke des LED-Spektrums abgestimmt, wie es in Abbildung 5.1 schematisch dargestellt ist, wird die Resonanzverschiebung in eine Intensitätsverringerung umgewandelt, die schließlich mit einer einfachen Fotodiode ausgelesen werden kann.

Um nun auch orts aufgelöst detektieren zu können, muss die Fotodiode durch eine einfache CMOS-Kamera, wie sie z.B. in Smartphones verbaut ist, ausgetauscht werden. Um den Effekt der Intensitätsreduzierung noch weiter zu verstärken, können die spektralen Empfindlichkeiten der einzelnen Farbpixel des Kamerasensors genutzt werden. Alle drei Farbpixel (rot, grün und blau) besitzen jeweils in einem bestimmten Wellenlängenbereich eine abfallende Flanke ihrer Empfindlichkeiten. Werden die LED, die Resonanzposition und die Empfindlichkeit eines Farbpixel aufeinander abgestimmt, führt dies zu einer Empfindlichkeitssteigerung des Gesamtsystems.



**Abbildung 5.1:** Schematische Darstellung des Detektionsverfahrens, um die Resonanzverschiebung als Intensitätsänderung sichtbar zu machen. Durch Nutzung der abfallenden, spektralen Flanke einer farbigen LED und der abfallenden Flanke der Kamera-Empfindlichkeit (Systemantwort) resultiert die Resonanzverschiebung bei Brechungsindexerhöhung in einer Intensitätsreduzierung.

Als Maß für die Empfindlichkeit eines Gesamtsystems wird hier das Detektionslimit (engl. *limit of detection*: *LOD*) verwendet. Das Detektionslimit ist definiert über den Signal-Rausch-Abstand und gibt die minimal messbare Größe an. Zur Berechnung des Detektionslimits wird nach [120] zunächst das arithmetische Mittel  $\bar{x}$  als Durchschnittswert aus der Summe der einzelnen Messwerte  $x_i, i \in \{1, \dots, N\}$  geteilt durch die Anzahl der Messpunkte  $N$  berechnet:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad (\text{Gl. 5.1})$$

Anschließend wird die Stärke des Rauschens, welches durch die Standardabweichung  $\sigma$  des Signals beschrieben wird, bestimmt. Die Standardabweichung gibt an, wie stark ein Messwert um den Mittelwert schwankt, und wird wie folgt berechnet:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{Gl. 5.2})$$

Die Empfindlichkeit  $S$  beschreibt das Verhältnis zwischen der Änderung des Signals, wie z.B. der Intensitätsänderung  $\Delta I$ , und der Größe, die das Signal beeinflusst, wie z.B. der Brechungsindexänderung  $\Delta n$ .

Damit das Signal eindeutig vom Rauschen unterschieden werden kann, muss es größer als die dreifache Standardabweichung sein [121]. Daraus ergibt sich die folgende Gleichung für das Detektionslimit:

$$LOD = \frac{3 \cdot \sigma}{S} \quad (\text{Gl. 5.3})$$

## 5.1.2. Kompaktes, photometrisches Messgerät

### 5.1.2.1. Aufbau

In diesem Kapitel wird ein kompaktes, photometrisches Messgerät<sup>12</sup> für die parallele Detektion mehrerer Proteine vorgestellt und detailliert charakterisiert. Genau wie bei dem Mikroskopaufbau zur Charakterisierung der photonischen Kristalle wird der photonische Kristall, der sich innerhalb einer Fluidzelle befindet, bei diesem Messgerät zwischen zwei gekreuzten, linearen Polarisationsfiltern platziert (Abbildung 5.2 b - d). Als Lichtquelle wird eine orangene SMD-LED (LY T686-Q2T1-26, *OSRAM Opto Semiconductors*) verwendet, dessen Licht mit Hilfe einer 1 mm großen Lochblende und einer achromatischen Linse (AC254-35-A, *Thorlabs GmbH*) parallelisiert wird, so dass das Licht möglichst senkrecht auf den photonischen Kristall trifft. Mit Hilfe des USB-Interfaces (NI USB-6009, *National Instruments*) wird die Intensität der LED über einen Computer gesteuert. Das USB-Interface liefert eine steuerbare Ausgangsspannung von 0 V - 5 V, weswegen ein Vorwiderstand von 560  $\Omega$  vor die LED gelötet wurde. Über eine Optik, bestehend aus zwei plankonvexen Linsen (LA1608 & LA1131, *Thorlabs GmbH*), wird dann die Oberfläche des photonischen Kristalls auf den CMOS-Sensor einer Kamera (DCC1645C, *Thorlabs GmbH*) fokussiert. Der CMOS-Chip besitzt eine Größe von 4,48 x 3,36 mm<sup>2</sup> mit 1600 x 1200 Pixeln bei einer 24-bit Farbtiefe. Diese Kamera ist somit zwar qualitativ schlechter ausgestattet als die Kameras, die in den heutigen Smartphones verbaut werden, jedoch besitzt sie einen deutlich größeren Sensorchip, wodurch geringeres Rauschen zu erwarten ist.

Das gesamte photometrische Messgerät besitzt eine Größe von 13 x 3,5 x 4,9 cm<sup>3</sup>. Ein Foto von dem kompakten Messgerät ist in Abbildung 5.2c mit der LED, dem metallischem Gehäuse, in dem die ganze Optik verbaut ist, den Zu- und Ablauf für die Analytlösung, dem USB-Interface und der Kamera gezeigt.

---

<sup>12</sup> Das photometrische Messsystem wurde innerhalb der Bachelorarbeit von Björn-Ole Meyer „Portables optisches Messsystem für einen Photonischen-Kristall-Biosensor“ bereits 2012 entwickelt und gebaut. Für die Proteindetektion wurde die Beleuchtung dieses Systems innerhalb dieser Arbeit angepasst.

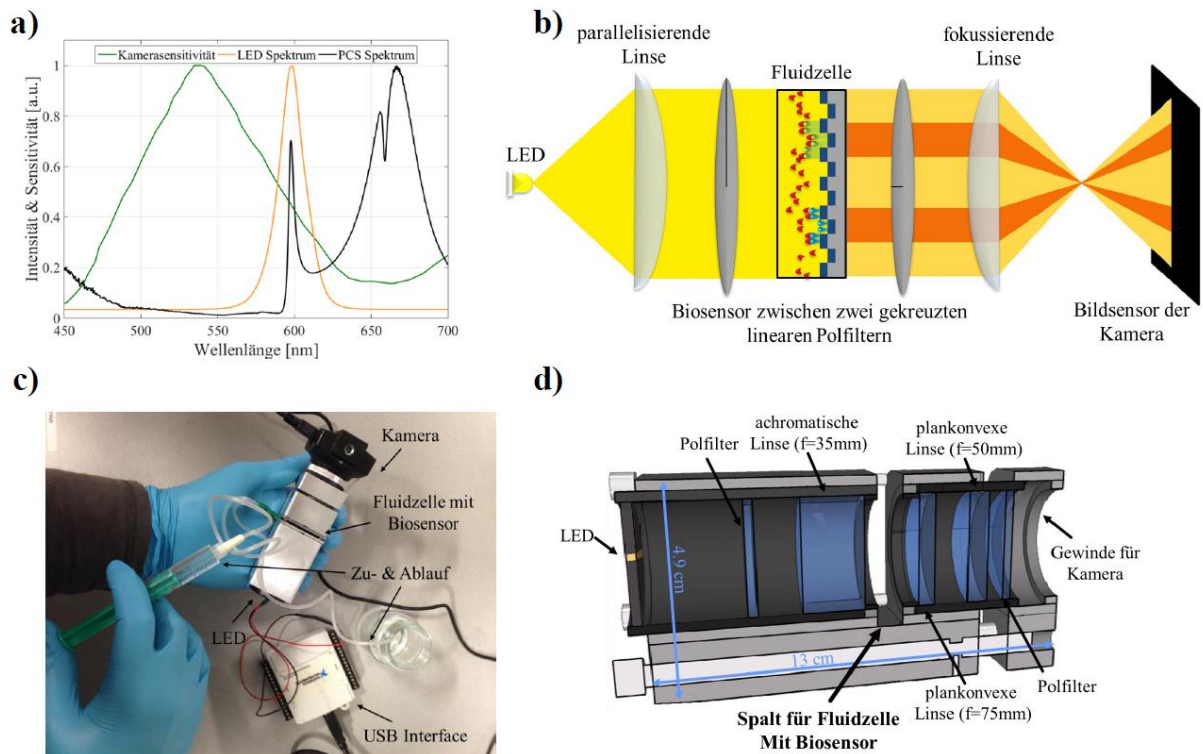


Die Kamera, die LED und das USB-Interface sind mit einem Computer verbunden und werden mit einem *LabVIEW* Programm gesteuert und ausgelesen. Das *LabVIEW* Programm erlaubt neben der Einstellung aller Parameter, wie z.B. LED-Versorgungsspannung und Belichtungszeit des Kamerasensors, auch die Datenspeicherung und Signalprozessierung in Echtzeit. Dabei wird während einer Messung alle 0,5 Sekunden ein Bild von der Oberfläche des photonischen Kristalls aufgenommen und anschließend nur ein Farbkanal der Kamera ausgelesen. Das resultierende Falschfarbenbild wird je nach Einstellung weiter innerhalb des Programms prozessiert. Es kann eine Matrix von  $b \times b$  Pixeln ( $b \in \mathbb{N}$ ) zu einem Pixel zusammengefasst werden, indem der Mittelwert z.B. aus  $10 \times 10$  Pixeln berechnet und dann ein Bild aus  $160 \times 120$  Pixeln ausgegeben wird. Das Signalrauschen und das gespeicherte Datenvolumen für eine Messung werden zwar mit zunehmendem  $b$  kleiner, jedoch leidet die Bildqualität und somit die Ortsauflösung, welche für die multiparametrische Proteindetektion von Bedeutung ist. Deswegen muss hier ein Kompromiss zwischen Rauschoptimierung und Bildqualität gefunden werden. Zusätzlich kann das Rauschen über eine zeitliche Mittelung bzw. über die Mittelung von  $p$  Bildern ( $p \in \mathbb{N}$ ) zu einem Bild auch noch weiter in dem Programm verbessert werden. Hier kristallisierten sich eine Mittelung über  $p=5$  Bilder und über  $b=8$  Pixel als optimal heraus, da die Speicherdauer nun nur 2 Sekunden pro prozessiertem Bild und aufgenommene Sensorfläche pro Pixel  $125 \times 130 \mu\text{m}^2$  beträgt. Bei der Wahl beispielsweise von  $p > 5$  und  $b < 8$  verringert sich die Rechengeschwindigkeit des Programms deutlich und das Datenvolumen wird für die Nachbearbeitung zu groß.

Neben der Kamerasensitivität ist in Abbildung 5.2a auch das Spektrum der LED und der Resonanz des hier verwendeten Kristalls abgebildet. Wie vorher in Kapitel 5.1.1. erklärt wurde, resultiert die Ausrichtung der Resonanzwellenlänge auf die abfallende Flanke des LED-Spektrums in einer Intensitätsänderung des transmittierten Lichts bei Brechungsindexänderung. Hier wird die  $\text{TM}_0$ -Resonanz auf die orangene LED ausgerichtet, weil diese eine höhere Empfindlichkeit ( $S_{\text{TM}} = 54,24 \text{ nm/RIU}$ ) als die  $\text{TE}_0$ -Resonanz ( $S_{\text{TE}} = 24,84 \text{ nm/RIU}$ ) besitzt<sup>13</sup>. Um den Effekt der Intensitätsreduktion bei Resonanzverschiebung weiter zu verstärken, wird zudem noch die abfallende Flanke der Kamerasensitivität im grünen Farbkanal verwendet.

---

<sup>13</sup> Diese Empfindlichkeiten wurden mit Luft und Wasser auf der Oberfläche des photonischen Kristalls spektral bestimmt, indem die Peakwellenlängen der jeweiligen Resonanzen ausgewertet wurden.

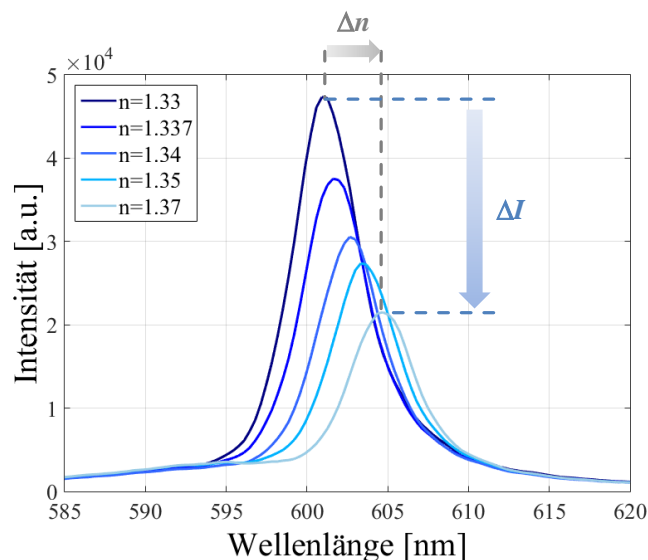


**Abbildung 5.2:** a) Kamerasensitivität (aus [122]), LED-Spektrum und Resonanzspektrum des photonischen Kristalls, aufgenommen mit gekreuzten Polarisationsfiltern. b) Schemazeichnung des photometrischen Messsystems. Die orangefarbenen Bereiche deuten die lokale Intensitätsreduzierung bedingt durch die Proteinanbindung an. c) Foto des photometrischen Messgeräts mit der LED, der Kamera, der gesamten Optik innerhalb des metallischen Gehäuses, dem Zu- und Ablauf für Analytwechsel, der Fluidzelle mit Biosensor und dem USB-Interface. d) CAD-Zeichnung des photometrischen Messgeräts.

### 5.1.2.2. Refraktometrische Messungen

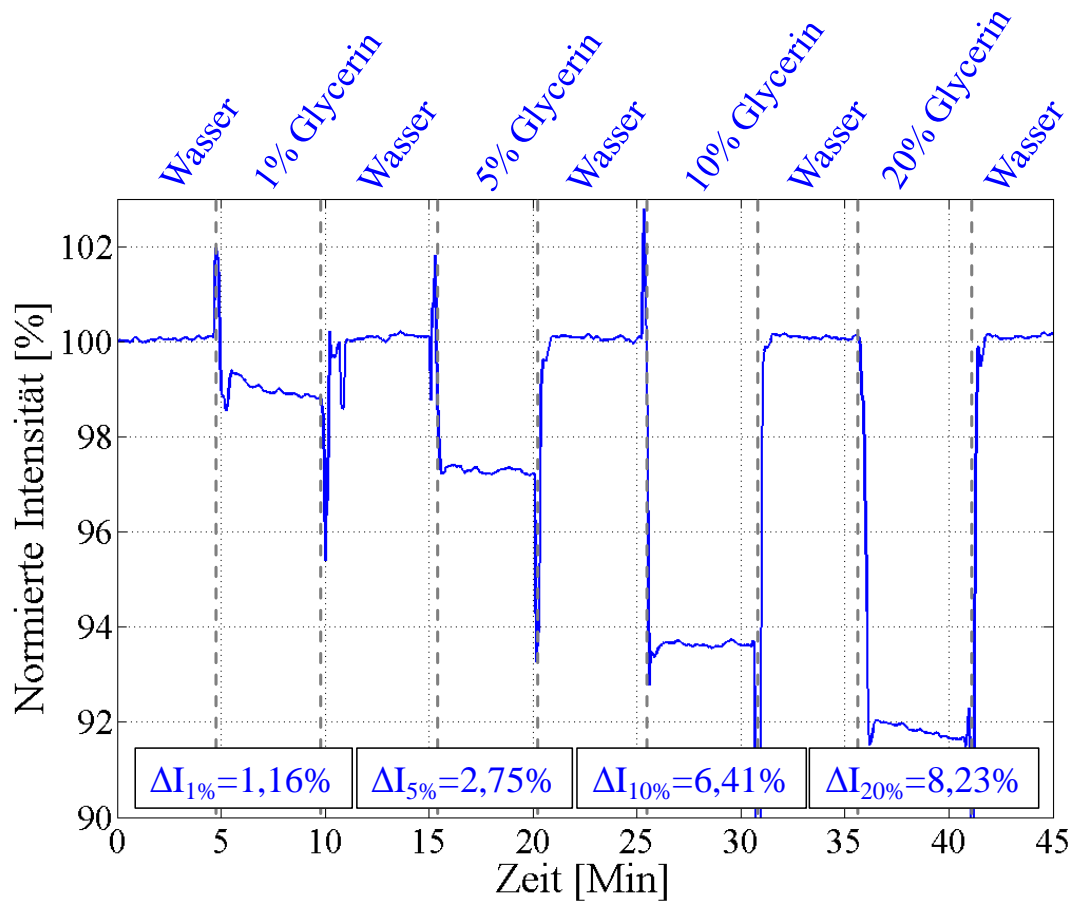
Um zu überprüfen, ob die Resonanzverschiebung wirklich in einer Intensitätsänderung resultiert, wurde eine Glasfaser, welche mit dem Spektrometer verbunden ist, anstelle der Kamera mit dem Messgerät verbunden. Mit Hilfe von Glycerin und DI-Wasser wurde der Brechungsindex von fünf Lösungen ( $n = [1,33; 1,337; 1,34; 1,35, 1,37]$ ) unterschiedlich eingestellt. Zunächst wurde der photonische Kristall in die Fluidzelle platziert und die Fluidzelle mit reinem DI-Wasser ( $n = 1,33$ ) befüllt. Über die Glasfaser wurde für jede einzelne Lösung die Systemantwort spektral aufgenommen. Nach jedem Analytwechsel wurde reichlich mit reinem DI-Wasser gespült, um mögliche Glycerinreste, welche unter Umständen in der Fluidzelle verbleiben könnten, zu entfernen. Die verschiedenen Systemantworten auf die Brechungsindexerhöhung sind in Abbildung 5.3 dargestellt. Die Erhöhung des Brechungsindexes von  $n = 1,33$  auf  $n = 1,37$  verursacht eine Resonanzverschiebung von  $\Delta\lambda = 3,8 \text{ nm}$  ( $\cong +0,63\%$ ) und eine Intensitätsreduzierung von

$\Delta I = -25.860$  Counts ( $\hat{=} -54,61\%$ ). Daraus folgt, dass durch die Umwandlung der Wellenlängenverschiebung in eine Intensitätsänderung die Systemantwort mit deutlich höheren Signalamplituden auf Brechungsindexänderungen reagiert.



**Abbildung 5.3:** Resonanzverschiebung und beleuchtungsabhängige Intensitätsänderung hervorgerufen durch Brechungsindexänderung an der Oberfläche. Gemessen wurden diese Spektren mit dem photometrischen Messaufbau und einer Glasfaser anstelle der Kamera.

Die gleiche Messung wird nun mit der Kamera als Detektor wiederholt. Dafür wird erneut reines DI-Wasser für fünf Minuten in die Fluidzelle gefüllt. Anschließend wird das DI-Wasser durch eine 1-prozentige Glycerin-Wasser-Lösung (Spritzenfüllung: 5 ml) ausgetauscht und die Intensität fällt um  $\Delta I = -1,16\%$ . Nachfolgendes Spülen mit Wasser (Spritzenfüllung: 10 ml) lässt die Intensität wieder auf ihr Ausgangssignal ansteigen. Im 5-Minuten-Rhythmus wird die Konzentration des Glycerins in Wasser sukzessive in 5%-Schritten bis 20% erhöht und nach jedem Analytwechsel reichlich mit DI-Wasser gespült. In Abbildung 5.4 sind deutlich die stetig höher werdenden Amplituden der Intensität passend zur Brechungsindexänderung zu erkennen. Zur Berechnung der Intensität wurde hier ein Array aus  $20 \times 10$  Pixeln für jedes aufgenommene Bild ausgewählt und das arithmetische Mittel über alle Pixel innerhalb dieses Arrays gebildet. Bei dieser Messung ergab sich ein Detektionslimit von  $LOD = 3,36 \cdot 10^{-4}$  RIU für das Intensitätssignal, welches durch eine 5-ige Glycerin-Wassermischung hervorgerufen wurde.



**Abbildung 5.4:** Intensitätsverlauf für eine Messreihe mit sukzessiv größer werdendem Glycerinanteil und somit größer werdenden Brechungsindex des Analyten.

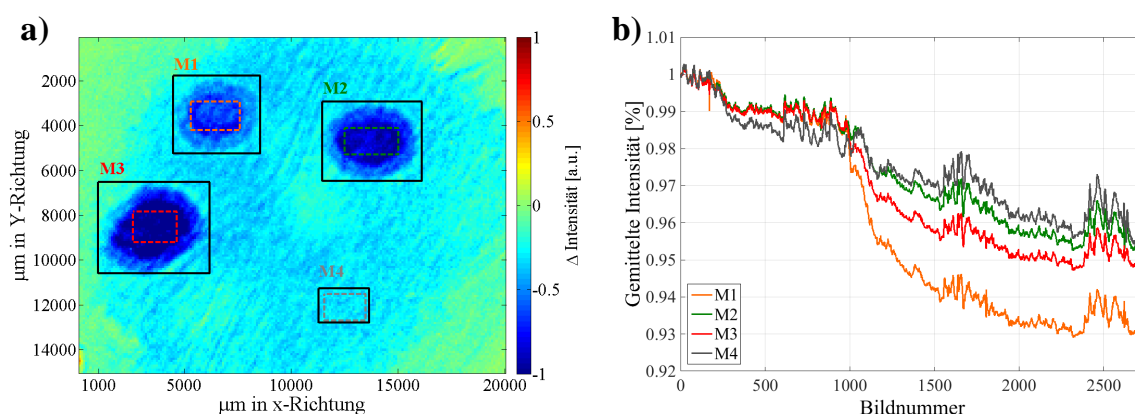
### 5.1.3. Algorithmus zur Unterdrückung des Hintergrundsignals

Das Detektionslimit in anderen Messmethoden, die auf der Detektion von Wellenlängen oder Winkeln basieren und somit Spektrometer benötigen, ist meistens eine Funktion der Resonanzbreite und der Resonanzempfindlichkeit. Das Detektionslimit in intensitätsbasierten Systemen ist hingegen eine Funktion des Systemrauschens und Drifts<sup>14</sup>. Dabei haben jegliche Formen von Intensitätsschwankungen, die durch z.B. Verunreinigungen in der zu untersuchenden Flüssigkeit oder ungewollte Reflexionen im optischen Gesamtsystem verursacht werden, großen Einfluss auf das Detektionslimit. Aus diesem Grund sind intensitätsbasierte Messsysteme nicht so robust im Vergleich zu ihren Spektrometer-basierten Pendanten. Jedoch können mit der hier vorgestellten bildgebenden Messmethode nicht

<sup>14</sup> Drift beschreibt hier die allmähliche Intensitätsverringering über die Zeit, die z.B. durch die schwächer werdende LED-Leistung verursacht wird.

funktionalisierte Bereiche auf der Sensoroberfläche als Referenz zur Kompensation von Intensitätsschwankungen und Driftvorgängen im Gesamtsystem genutzt werden.

Für Abbildung 5.5 (links) wurde das letzte während einer Proteindetektion aufgenommene Bild von dem ersten Bild pixelweise abgezogen. Entsprechend zu der tropfenweisen Immobilisierung der Rezeptoren verursacht die Anbindung des passenden Proteins eine lokale Intensitätsänderung, welche als dunkel blaue Flecke im Falschfarben-Differenzbild zu sehen sind. Wählt man nun die Messfelder (M1-M3) und das Referenzfeld (M4), wie sie in Abbildung 5.5 links mit gestrichelten Rechtecken markiert sind, berechnet das arithmetische Mittel der Intensitätswerte innerhalb dieser Messfelder und trägt es über die Bildnummer auf, zeigen sich keine deutlichen Assoziationskurven, wie es eigentlich aus dem Falschfarbenbild zu erwarten wäre. Hier zeigt sich deutlich der vorher angesprochene Intensitätsdrift des Systems, welcher hauptsächlich durch Intensitätsschwankungen der LED hervorgerufen wird. Dieser Drift kann durch Aufheizung des Sensors und der elektrischen Komponenten des Systems erklärt werden.

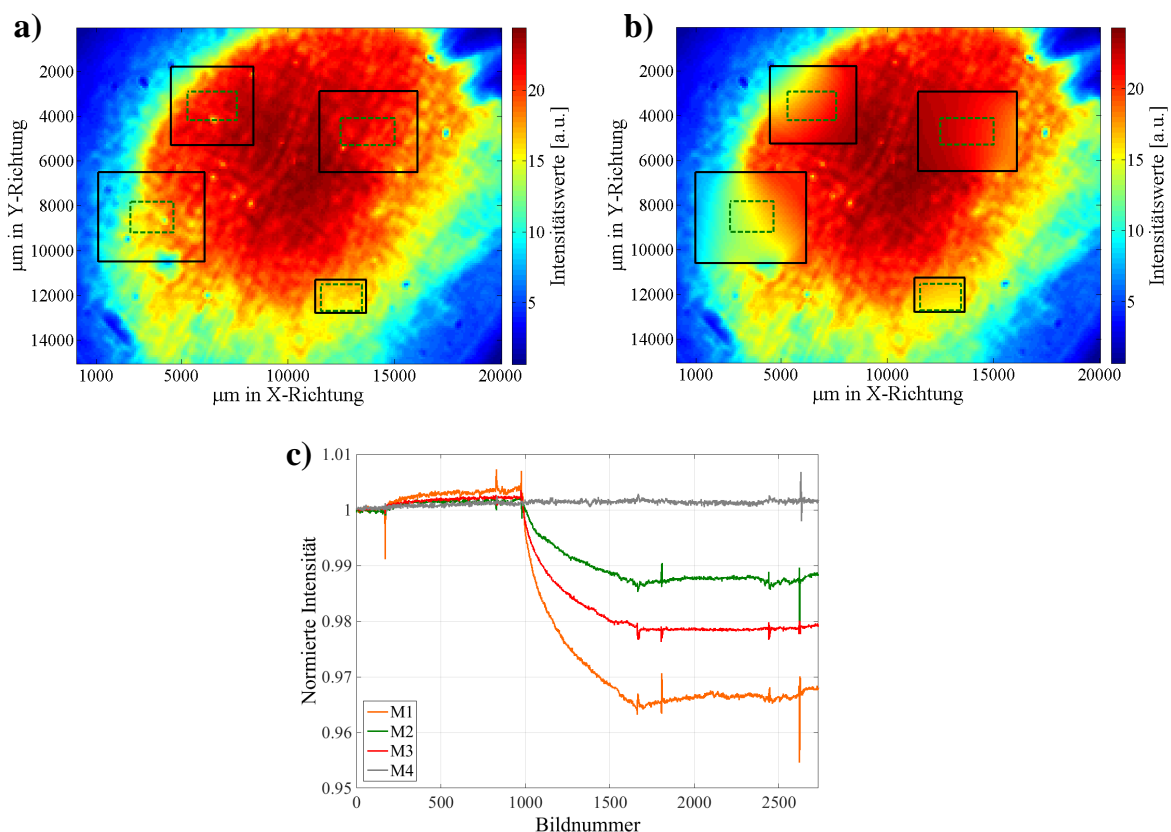


**Abbildung 5.5:** a) Falschfarben-Differenzbild erhalten durch Pixel-weißer Subtraktion des ersten Intensitätsbildes vom letzten aufgenommenen Intensitätsbild von der Sensoroberfläche. Drei Messfelder (M1-M3) und ein Referenzfeld (M4) sind durch gestrichelte Rechtecke markiert. b) Das arithmetische Mittel der Intensität innerhalb der entsprechenden Messfelder aufgetragen über die Bildnummer, die mit der Messzeit korreliert.

Um dieses Driftverhalten aus dem Messsignal zu eliminieren, wurde ein Bildverarbeitungsalgorithmus in *MATLAB* implementiert. Die nicht-funktionalisierten Bereiche um die Messbereiche herum werden nur von dem Systemdrift und nicht von Proteinanbindungen beeinflusst. Deshalb eignen sich diese Bereiche sehr gut für die Driftkompensation. Zuerst werden die Bereiche um die Messfelder (schwarze Rechtecke) in jedem Bild ausgeschnitten und die hierdurch fehlenden Pixel mit Hilfe der Voronoi-

Interpolation („natural neighbour interpolation“) interpoliert [123]. Vergleicht man das Originalintensitätsbild (Abbildung 5.6a) mit dem Bild mit den interpolierten Bereichen (Abbildung 5.6b), funktioniert die Interpolation sehr gut und die fehlenden Pixel werden gut angenähert.

Wird nun das Originalbild durch das bearbeitete Bild dividiert und erneut die mittlere Intensität innerhalb der Messfelder berechnet, sind nun die Assoziationskurven in Abbildung 5.6c deutlich zu erkennen, während das Signal des Referenzfeldes (M4) sich über die Zeit kaum verändert und auf gleichem Niveau verweilt. Das Referenzsignal besitzt jetzt nur noch einen kleinen Rauschanteil und zeigt auch keine bindungstypischen Signalcharakteristika.



**Abbildung 5.6:** a) Originales Falschfarbenbild der Sensoroberfläche mit der entsprechenden Verteilung des transmittierten Lichts und den Markierungen für die Messfelder. b) Das gleiche Intensitätsbild mit dem interpolierten Hintergrund. c) Nach der Driftkompensation wird die mittlere Intensität über alle Elemente innerhalb der Messfelder berechnet und über die Bildnummer aufgetragen.

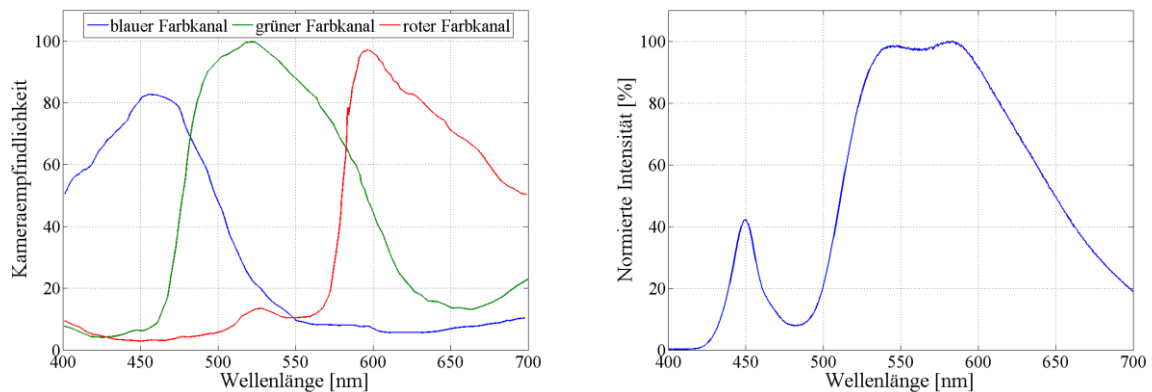
### 5.1.4. Smartphone-Adaptieraufsätze

Als weiteren Ansatz zur parallelen Detektion von mehreren Proteinen wird hier nun ein Smartphone als bildgebende Messeinheit untersucht, um ein für den Patienten noch einfacher zu bedienendes System zu realisieren. Smartphones werden heutzutage nicht mehr nur zu Kommunikationszwecken gebraucht. Vielmehr können die kleinen und leistungsstarken Rechner unter anderem auch zur Überwachung der eigenen Gesundheit genutzt werden. Das Angebot von kleinen Programmen, auch Apps genannt, ist im Bereich der Gesundheit sehr vielfältig und reicht von der Messung des eigenen Herzpulses bis hin zum Ernährungsberater und Fitnesscoach. Durch Zusatzmodule, die mit dem Smartphone verbunden werden, kann beispielsweise der Blutzuckerspiegel überwacht und gespeichert werden, so dass der Nutzer immer und überall seinen Blutzuckerspiegel nachverfolgen kann (GlucuDock von der Firma *MEDISANA*). Auch in der Biosensorforschung werden Smartphones zur Signalverarbeitung eingesetzt [124]–[127]. Die hochauflösenden Kameras und die leistungsstarken LEDs, die zum Teil in Smartphones verbaut sind, sind besonders für bildgebende Messprinzipien von großem Interesse. So kann die LED als Lichtquelle zur Anregung des optischen Sensors und die Kamera zur Detektion der Sensorantwort auf z.B. Proteinanbindungen genutzt werden [128]. Zur Proteindetektion mit einem photonischen Kristall als Signalumwandler nutzten Gallegos et al. [44] den CCD-Sensor der Smartphonekamera, um ein Spektrometer zu bauen, welches als Aufsatz an das Smartphone adaptiert wurde. Damit konnten sie die Resonanzverschiebung bedingt durch die Anbindung von 1,00 nM des Proteins Immunglobulin G mit diesem Smartphone-Adapter verfolgen. Weil mit diesem Aufbau die Detektion von nur einem Protein und nicht von mehreren Proteinen in einer einzigen Messung möglich ist, werden in diesem Kapitel als Weiterentwicklung des Kamera-basierten Messgeräts SmartphoneAdapter vorgestellt. Dafür werden zwei Designs, eines mit und eines ohne Optik, für einen Smartphone-Adapter entwickelt und anhand von Brechungsindexmessungen die Detektionsgrenzen dieser zuvor beschriebenen Adapter bestimmt.

#### 5.1.4.1. Optik-freies Design

Um einen kompakten Smartphone-Adapter zu realisieren, ist ein Design ohne zusätzliche und aufwendige Optik wünschenswert. Wie in Kapitel 4.2.2. experimentell gezeigt wurde, werden Resonanzen durch die Bestrahlung einer einfachen LED ohne Optik angeregt und koppeln in Reflexion wieder aus. Für alle Untersuchungen wurde das Smartphone Nexus 4

von LG verwendet. In Abbildung 5.7 ist das LED-Spektrum und die Empfindlichkeitskurve des Kamerasensors gezeigt [129].

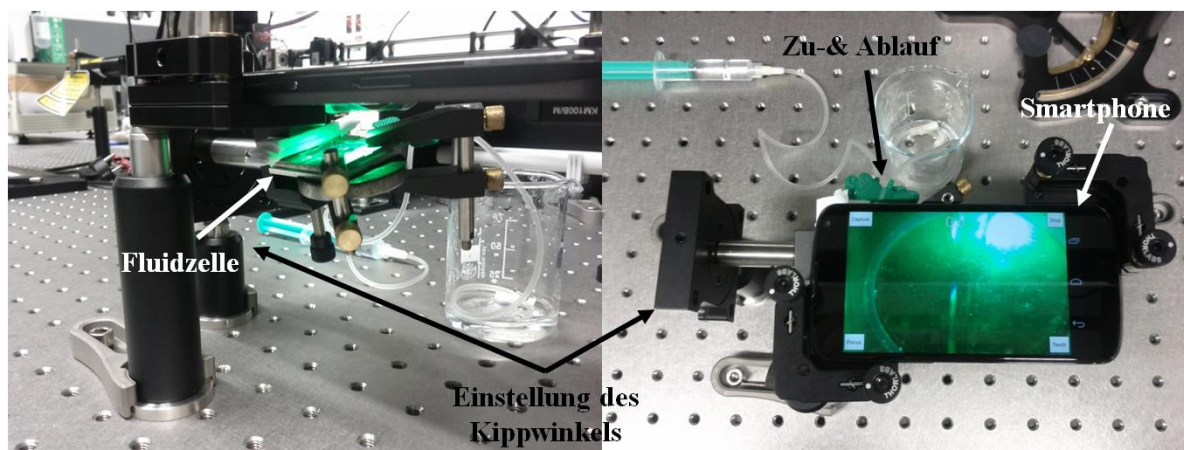


**Abbildung 5.7:** (links) Empfindlichkeitskurve des Kamerasensors für alle drei Farbkanäle; (rechts) Lichtspektrum der Smartphone-LED.

Entsprechend der Reflexionsmessungen aus Kapitel 4.2.2. wurde ein Zirkularpolarisationsfilter vor der Smartphone-LED und Kamera platziert. Damit die Resonanzverschiebung bei Brechungsindexerhöhung in einer Intensitätsreduzierung resultiert, wurde ein auf das Resonanzspektrum abgestimmter Farbfilter zusätzlich vor der LED platziert. Weil die Smartphone-Kamera Objekte in einem minimalen Abstand von 70 mm scharf abbilden kann, wird zusätzlich eine asphärische Kunststofflinse mit einer Brennweite von 18,15 mm, einer numerischen Apertur von 0,12 und einem Durchmesser von 6,28 mm (CAX183-A, Thorlabs) zur Reduzierung des Abstandes verwendet und der Fokus der Kameralinse auf unendlich gestellt. Anschließend wird der photonische Kristall in die Fluidzelle eingespannt.

Schon während der Live-Aufnahme konnte ein überstrahlter Fleck auf der rechten Bildhälfte beobachtet werden (Abbildung 5.8 (rechts)). Der Fleck entsteht durch direkte Reflexionen bedingt durch die sehr starke Lichtintensität der Smartphone-LED. Innerhalb der Bachelorarbeit von Marlena Draheim wurden schon mehrere Möglichkeiten, wie z.B. der Einsatz von Neutralsichtfilter, validiert, um diesen Fleck zu reduzieren. Die Untersuchungen führten jedoch nicht zu der gewünschten homogenen Ausleuchtung des photonischen Kristalls. Aufgrund der Tatsache, dass Resonanzen in einem Winkel von  $\theta_A = \theta_E \pm 15^\circ$  auskoppeln und die LED genug Intensität bereitstellt, wird der photonische Kristall um  $14^\circ$  gekippt, so dass der Fleck aus dem Bildbereich, der für die Auswertung gewählt werden soll, wandert.

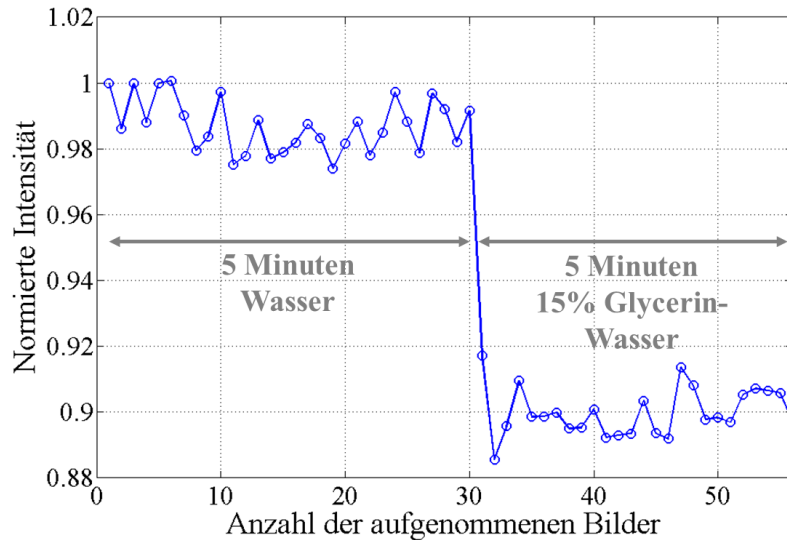




**Abbildung 5.8:** Experimenteller Aufbau zur Validierung des Adapterdesigns. In der Seitenansicht ist die Position der Fluidzelle, in der sich der photonische Kristall befindet, unter dem Smartphone gezeigt und wie dieser kontrolliert gekippt wird (links). Von oben sind das Smartphone mit der App-Ansicht und der Bildaufnahme, den Zu- und Ablauf der zu analysierenden Flüssigkeit und der Messvorrichtung zur Bestimmung des Kippwinkels abgebildet (rechts).

Über einen Zeitraum von zehn Minuten wurde eine Brechungsindexmessung durchgeführt. Alle zehn Sekunden wurde ein Bild vom photonischen Kristall aufgenommen und der mittlere Intensitätswert für den grünen Farbkanal über einen bestimmten Bereich für jede Aufnahme berechnet. Die Empfindlichkeitskurve des grünen Farbkanals besitzt in dem spektralen Bereich der Resonanz eine abfallende Flanke, wodurch die Intensitätsreduzierung aufgrund der Resonanzverschiebung noch weiter verstärkt wird.

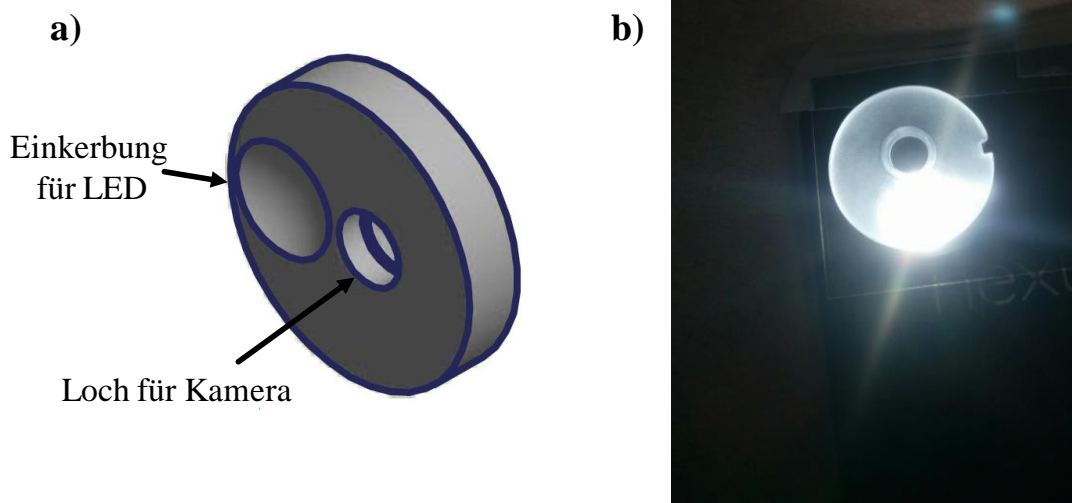
Zur Generierung eines Basissignals wurde die Fluidzelle zunächst mit Wasser ( $n_w = 1,33$ ) gefüllt und nach fünf Minuten durch eine Mischung aus 15% Glycerin und 85% Wasser ( $n_{15\%Gly} = 1,35$ ) ersetzt. Die Erhöhung des Brechungsindex um 0,02 RIU verursacht eine zehnprozentige Intensitätsreduzierung im grünen Farbkanal (Abbildung 5.9). Jedoch schwankt diese Intensität im Bereich des Basissignals um  $\pm 2\%$ . Wie später in Kapitel 5.2. beschrieben ist, verursacht die Proteinanbindung einen Signalausschlag in der Größenordnung des hier beobachteten Rauschens, weshalb das Rauschen minimiert werden muss.



**Abbildung 5.9:** Intensitätsverlauf über die Zeit während einer Wasser-Glycerin-Messung ( $\Delta n = 0,02$ ) gemessen mit dem Smartphoneaufbau.

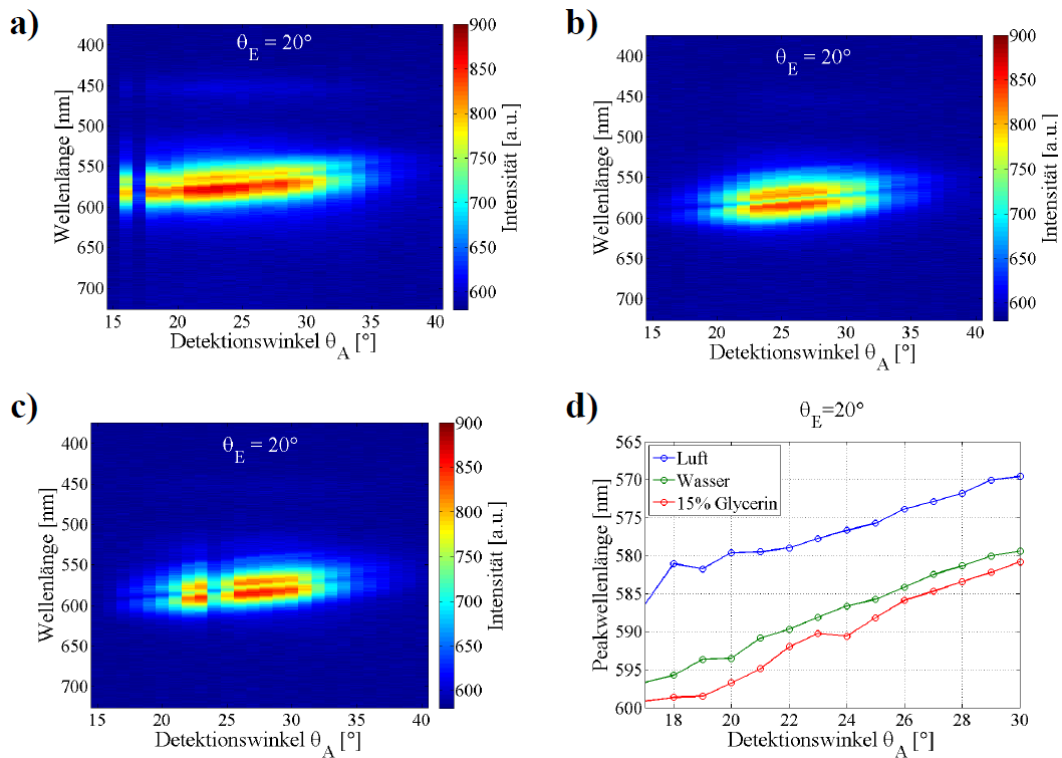
### Optimierung der Kristallausleuchtung durch Diffusor

Ein Ansatz zur Rauschreduzierung ist eine homogenere Ausleuchtung über die Fläche des photonischen Kristalls. Über einen Diffusor ist die Verteilung optik-frei möglich. Dafür werden alle Flächen eines runden Plexiglasses (5 mm dick und 1“ im Durchmesser) mit Schleifpapier angeraut. Eine halbrunde Einkerbung wurde für die LED zusätzlich in das Plexiglas gefräst, um das Licht besser in das Plexiglas einzukoppeln, und ein Loch für die Kamera bzw. die asphärische Linse gebohrt (Abbildung 5.10). An den Rändern, auf die Rückseite und an den Rändern des Bohrlochs wurde eine spiegelnde Schicht in Form von Alufolie geklebt, damit das Licht gezielt nach vorne zum photonischen Kristall geleitet wird. Mit diesem Diffusor wird eine flächige Lichtquelle erzeugt, die um die Kamera herum auf den photonischen Kristall strahlt und zudem für eine homogene Ausleuchtung sorgt.



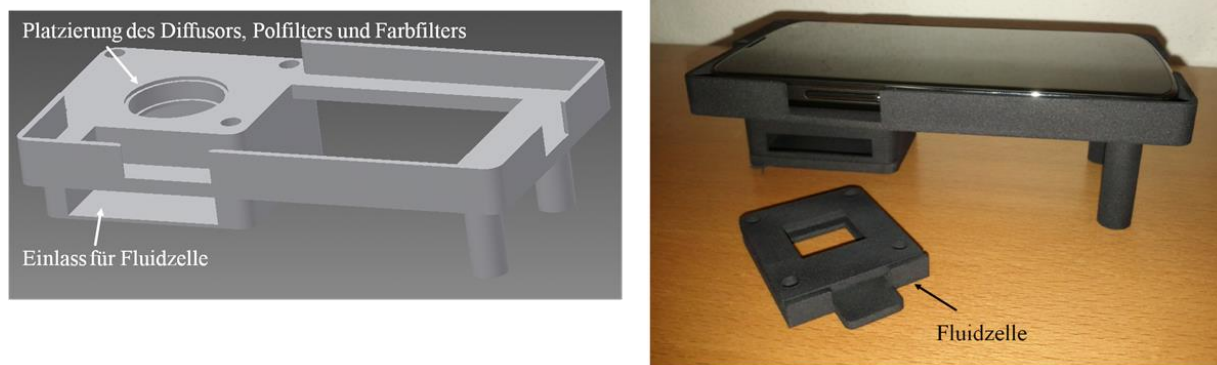
**Abbildung 5.10:** a) CAD-Bild des Diffusors aus Plexiglas. b) Realisierter Diffusor auf dem Smartphone platziert. Eine bessere Verteilung des LED-Lichtes über die Diffusorfläche konnte erreicht werden.

Zur Evaluierung der Resonanzeigenschaften bei Anregung mit diffusem Licht wird der Reflexionsaufbau um den Diffusor erweitert, indem die LED in der dafür gefrästen Kerbe positioniert wird. Dann werden erneut Resonanzspektren für zur x-Achse parallele Ausrichtung der Gitterstruktur und unterschiedlichen Analyten wie Luft, Wasser und 15-prozentige Glycerin-Wasser-Lösung in der Fluidzelle aufgenommen. Durch das diffuse Licht wird nicht nur die Resonanz verbreitert, sondern auch der Winkelbereich, in dem die Resonanzen auskoppeln, vergrößert. Die Abbildung 5.11 a bis c zeigen die aufgenommenen Resonanzspektren für einen festen Einfallswinkel  $\theta_E = 20^\circ$ , variierendem Detektionswinkel  $\theta_A$  und den unterschiedlichen Analyten. Für jede Resonanz wurde die Peakwellenlänge jedes einzelnen Analyten bestimmt und gegenüber dem Detektionswinkel aufgetragen (Abbildung 5.11 c). Wie erwartet wurde, verursacht die Erhöhung des Brechungsindex eine entsprechend parallele Resonanzverschiebung über den Detektionswinkel. Somit hat die diffuse Lichtquelle keine relevanten Auswirkungen auf das Resonanzverhalten.



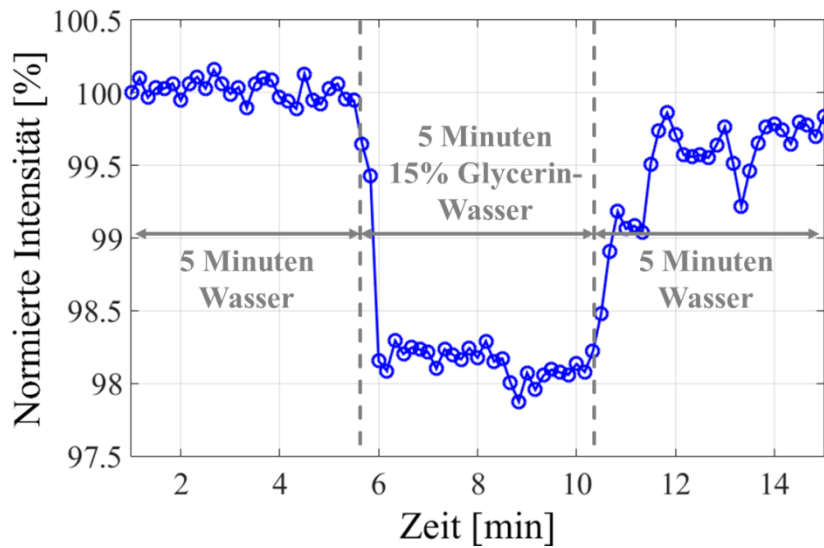
**Abbildung 5.11:** Spektrum des photonischen Kristalls in Abhängigkeit der Wellenlänge und des Detektionswinkels bei festem Einfallswinkel von  $20^\circ$  für (a) Luft, (b) Wasser und (c) 15%-Glycerin-Wasser-Lösung an der Oberfläche des photonischen Kristalls; d) Peakwellenlänge der Resonanzen aufgetragen über den Detektionswinkel für alle drei Analyten.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurde der in Abbildung 5.12 gezeigte Smartphone-Adapter entworfen. In die 1“ große Öffnung wird zuerst der Polarisationsfilter gelegt und danach folgt der Diffusor mit der asphärischen Linse. Durch die Schale wird eine Ausrichtung der Smartphone-LED und Kamera passend zum Diffusor sichergestellt. Des Weiteren wurde eine Fluidzelle entworfen, die in die Einsparung im unteren Teil des Korpus geschoben wird.



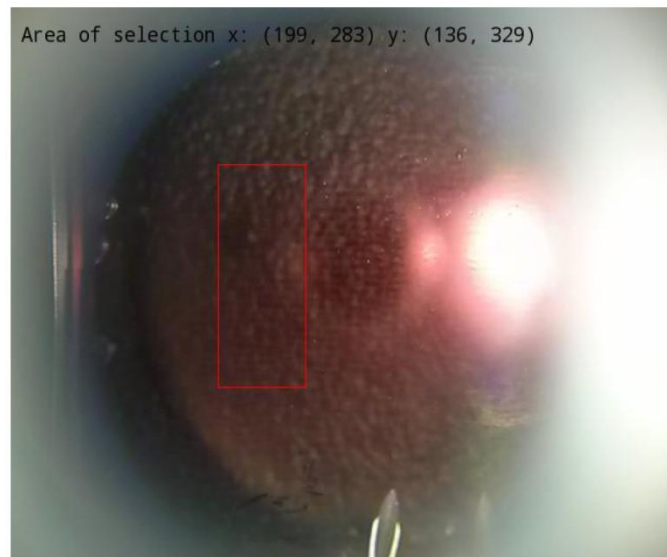
**Abbildung 5.12:** (links) CAD-Zeichnung des Smartphone-Adapters; (rechts) Bild des per 3D-Druck realisierten Smartphone-Adapters (Hintergrund) und der Fluidzelle (Vordergrund).

Zur Validierung des Adapters wurden erneut refraktometrische Messungen durchgeführt, indem zunächst Wasser und dann eine 15-prozentige Glycerin-Wasser-Lösung in die Fluidzelle gefüllt wurde. Für jede Aufnahme wurden die Intensitätswerte für den grünen Farbkanal berechnet. Eine deutliche Intensitätsänderung ist auch bei dieser Messung wieder mit  $\Delta I = 1,72\%$  bei einer Brechungsindexerhöhung von  $\Delta n = 0,02$  zu erkennen (Abbildung 5.13). Abschließendes Spülen mit Wasser lässt nach zehn Minuten das Signal erneut ansteigen. Allerdings erreicht die Intensität bedingt durch einen Intensitätsdrift der LED nicht das Ausgangsniveau. Obwohl nur die abfallende Flanke der Empfindlichkeitskurve des Kamerasensors genutzt wurde, um die Resonanzverschiebung in eine Intensitätsänderung umzuwandeln, konnte mit diesem Aufbau ein Detektionslimit von  $LOD = 1,4 \cdot 10^{-3}$  RIU erreicht werden.



**Abbildung 5.13:** Intensitätsverlauf über die Zeit während einer Wasser-Glycerin-Messung gemessen mit dem optik-freien Smartphone-Adapte. Eine Brechungsindexänderung von  $\Delta n=0,02$  resultiert in eine Intensitätsänderung von  $\Delta I = 1,72\%$ .

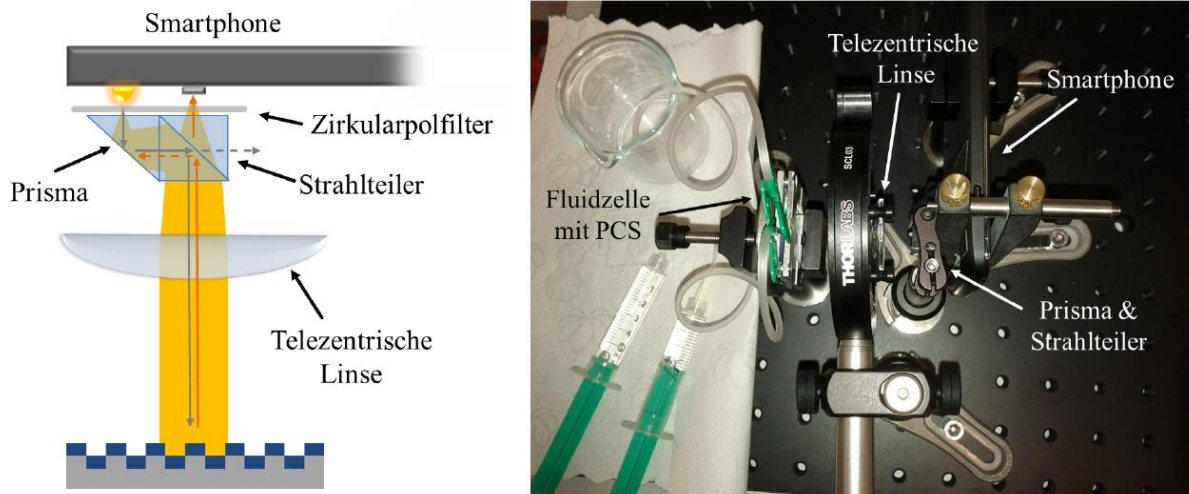
Der Nachteil dieses Systems besteht jedoch in der inhomogenen Ausleuchtung des Sensors. Wie in der Abbildung 5.14 zu sehen ist, verursacht das Loch für die Kamera einen schwarzen Fleck in der Bildmitte. Dieser ist für eine spätere Proteindetektion nicht auswertbar, da aufgrund der geringen Intensität der Rauschanteil zu groß ist. Auch gelangt trotz Abdeckung der Bohrränder durch Alufolie Licht vom Diffusor direkt in die Kamera. Das Problem mit der punktuellen Überstrahlung durch die LED konnte zudem nicht komplett gelöst werden, wodurch noch mehr Bereiche in diesem Ansatz unbrauchbar gemacht werden. Daher wird im nächsten Kapitel ein anderer Ansatz für einen Smartphone-Adapter vorgestellt.



*Abbildung 5.14: Aufgenommenes Bild bei der Brechungsindexmessung mit dem optik-freien Smartphone-Adapter. Der ausgewählte Bereich für die Messung ist als rotes Rechteck markiert.*

### 5.1.4.2. Adapter-Design mit telezentrischer Optik

In diesem Kapitel wird ein Adapter-Design vorgestellt, welches eine telezentrische Optik zur scharfen Abbildung der Sensoroberfläche nutzt. Telezentrie ist bereits in der Messtechnik weitverbreitet, da durch telezentrische Objektive Bildaufnahmen nicht perspektivisch verzerrt werden. Aus diesem Grund ist eine Qualitätsprüfung von Fertigungsteilen wie z.B. Schrauben und deren Gewinde problemlos möglich. Die Aperturblende liegt hier im Brennpunkt der Linse bzw. des Objektivs auf der Bildbereichsseite, wodurch nicht nur das abzubildende Objekt scharf abgebildet wird, sondern auch die Lichtstrahlen der Lichtquelle parallelisiert auf das Objekt treffen [130]. Dies ermöglicht nicht nur eine homogenere Ausleuchtung, sondern lässt auch nur wenige Winkelanteile des Anregungslichtes zu.



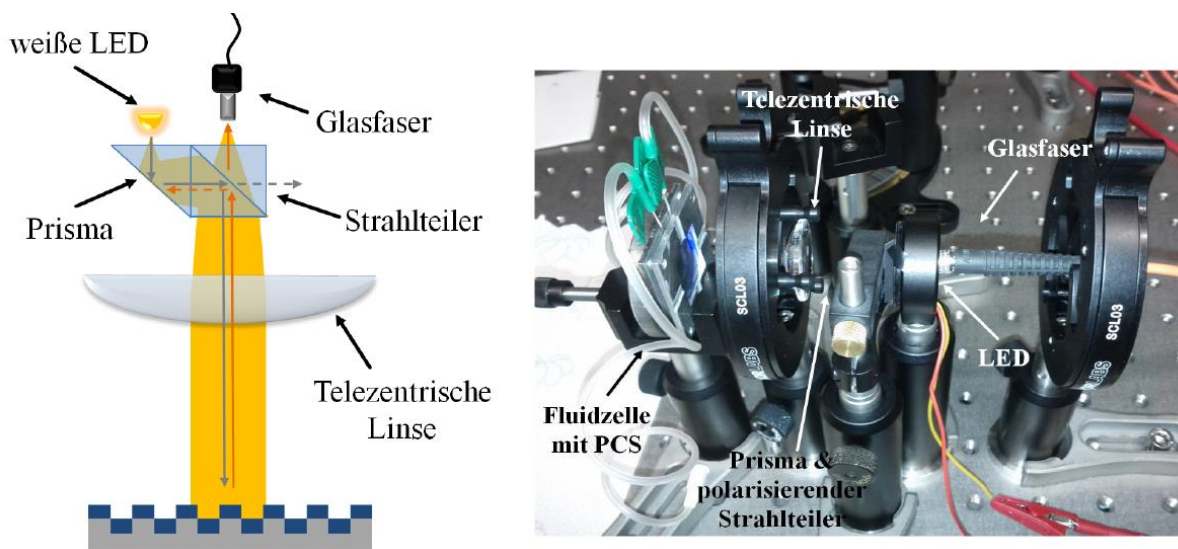
**Abbildung 5.15:** (links) Schematische Darstellung des Optik-Designs, wodurch das LED-Licht in den Strahlengang der Kamera geleitet wird und über die telezentrische Linse der photonische Kristall auf den Kamerasensor abgebildet wird; (rechts) Foto des realisierten Optik-Designs mit dem Smartphone auf der rechten Seite, der telezentrischen Linse in der Bildmitte und dem photonischen Kristall in der Fluidzelle auf der linken Bildseite.

Über ein rechtwinkliges Prisma (Kantenlängen jeweils 10 mm) wird das Licht der Smartphone-LED im rechten Winkel abgelenkt und trifft dann auf einen 50:50 Strahlteiler ( $10 \times 10 \times 10 \text{ mm}^3$ ), der genau vor der Smartphone-Kamera platziert wird (Abbildung 5.16). Durch den Strahlteiler wird 50% des Lichtes erneut um  $90^\circ$  in Richtung des photonischen Kristalls abgelenkt. Die anderen 50% werden einfach durch den Strahlteiler hindurch transmittiert und ohne Rückstrahlung am Gehäuse absorbiert. Danach passiert das Licht eine telezentrische Linse mit einem Durchmesser von 25 mm und einer Brennweite von 30 mm (66-009, *EdmundOptics*). Diese dient dazu, die Oberfläche des photonischen Kristalls scharf auf den Kamerasensor abzubilden und die ausgekoppelten Resonanzen detektieren zu können. Wie in Kapitel 4.2 und 5.1.4.1 festgestellt wurde, hat die Art der Anregung, also ob diffus oder parallelisiert, keinen großen Einfluss, solange die Gitterstruktur des photonischen Kristalls zur x-Achse parallel ausgerichtet ist.

### Spektrale Validierung der telezentrischen Optik

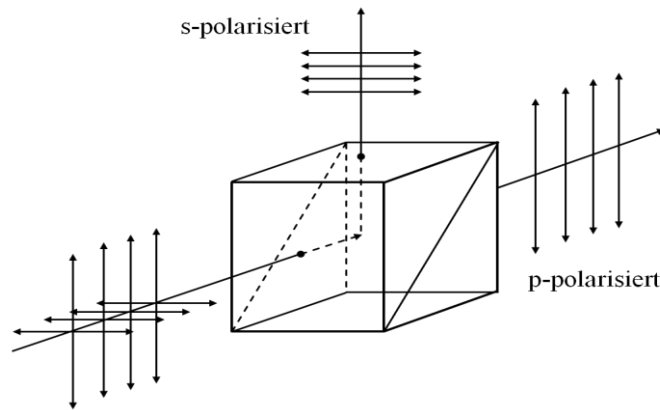
Im ersten Schritt wurde dieser Aufbau mit einer weißen LED und einer Glasfaser, welche in das Spektrometer eingekoppelt ist, anstelle des Smartphones realisiert, um zu validieren, ob Resonanzen mit diesem Aufbau angeregt und detektiert werden können (Abbildung 5.16).





**Abbildung 5.16:** (links) Schematische Darstellung des Optik-Designs, wodurch das LED-Licht in den Strahlengang der Glasfaser geleitet wird und über die telezentrische Linse das aus dem Kristall ausgekoppelte Licht in die Glasfaser fokussiert wird. (rechts) Foto von dem realisierten Optik-Design mit der Glasfaser und der LED auf der rechten Seite, der Linse in der Bildmitte und dem photonischen Kristall in der Fluidzelle auf der linken Bildseite.

Zur Optimierung des Systems wurden Prismen und Strahlenteiler mit und ohne Anti-Reflexionsbeschichtung (AR-Beschichtung), ein Aufbau mit einem Zirkularpolarisationsfilter und mit einem polarisierenden Strahlteiler untersucht. Dabei soll der polarisierende Strahlteiler alternativ zum Zirkularpolarisationsfilter das Anregungslicht unterdrücken und nur die ausgekoppelte Resonanz zum Kamerasensor durchlassen. Tritt, wie in Abbildung 5.17 dargestellt, das unpolarisierte LED-Licht durch den Strahlteiler, wird das transmittierte Licht p-polarisiert, während das um  $90^\circ$  abgelenkte Licht s-polarisiert wird. Bei der direkten Reflexion erfährt das Licht eine Poldrehung um  $90^\circ$  und wird dadurch vom Strahlteiler geblockt.

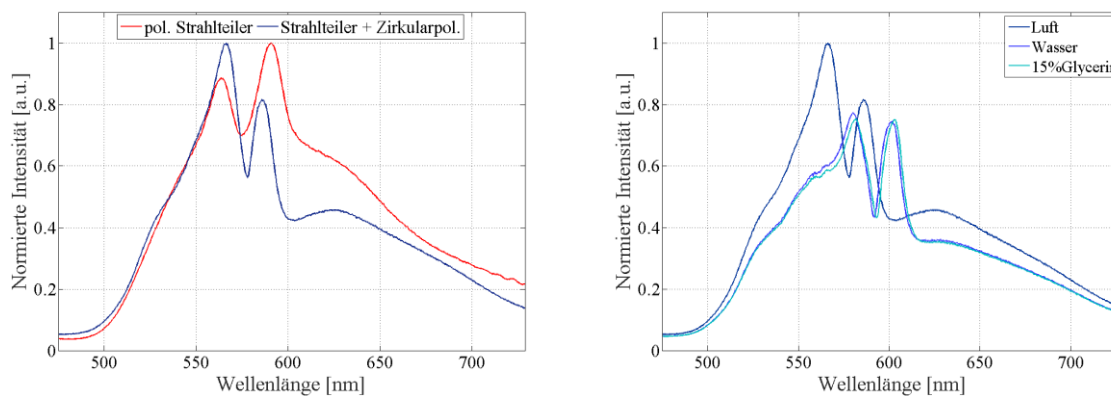


**Abbildung 5.17:** Funktionsprinzip eines polarisierenden Strahlteilers. Das transmittierte Licht wird p-polarisiert und das abgelenkte Licht s-polarisiert.

Die Verwendung von Bauteilen ohne Anti-Reflexionsbeschichtung ergab zu viele ungewollte Reflexionen, so dass die Resonanzen nicht klar vom Hintergrundsignal unterschieden werden konnten. Bei den Messungen mit AR-beschichteten Bauteilen ist das Hintergrundsignal zwar noch ziemlich stark, aber die Resonanz lässt sich sowohl bei der Verwendung des polarisierenden Strahlteilers (PBS101, Thorlabs GmbH) als auch bei der Verwendung vom einfachen Strahlteiler (BS010, Thorlabs GmbH) mit dahinter positioniertem Zirkularpolarisationsfilter (CP42N, ITOS®) erkennen (Abbildung 5.18 links). Aufgrund der Transmissionseigenschaften des Zirkularpolarisationsfilters<sup>15</sup> werden zwar höhere Wellenlängen abgeschwächt, allerdings bewirkt dies zum einen eine weniger breite Resonanz und zum anderen eine zusätzliche Intensitätsreduzierung bei Resonanzverschiebung. Alle folgenden Experimente wurden daher mit AR-beschichteten Bauteilen, einem einfachen Strahlteiler und Zirkularpolarisationsfilterfolie durchgeführt.

---

<sup>15</sup> Hier sei auf die Datenblätter auf den Homepages der Firmen ITOS ([www.itos.de](http://www.itos.de)) und Thorlabs ([www.thorlabs.de](http://www.thorlabs.de)) verwiesen.



**Abbildung 5.18:** (links) Resonanzspektren gemessen mit dem Reflexionsaufbau. Es werden polarisierender Strahlteiler und anti-reflexionsbeschichteter Strahlteiler mit Zirkularpolarisationsfilter verglichen. (rechts) Reflexionsspektren für verschiedene Analyten mit unterschiedlichen Brechungsindices in der Fluidzelle aufgenommen mit Strahlteiler und Zirkularpolarisationsfilter.

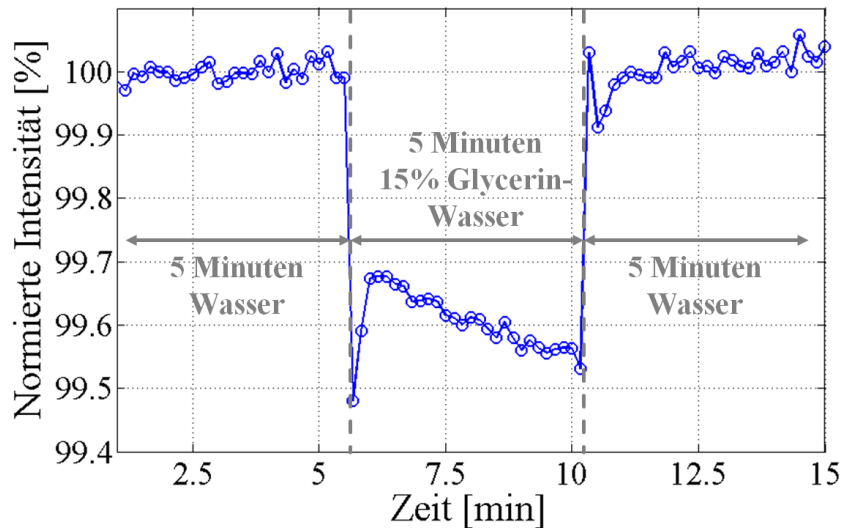
Zur weiteren Evaluierung dieses Reflexionsaufbaus wurden abermals Brechungsindexmessungen vorgenommen. Entsprechend zur Brechungsindexerhöhung ist eine deutliche Resonanzverschiebung sichtbar, so dass sich eine Empfindlichkeit von  $S = \Delta\lambda / \Delta n = 50 \text{ nm/RIU}$  in wässriger Lösung ergibt. Als Ergebnis können Resonanzen und ihre Verschiebung bei Brechungsindexerhöhung mit diesem Aufbau detektiert werden.

### Brechungsindexmessungen mit telezentrischer Optik und Smartphone

Mit diesen Erkenntnissen wird das Smartphone gemäß Abbildung 5.15 statt der Glasfaser und der externen LED in den Aufbau integriert. Wird wieder die mittlere Intensität der grünen Pixel innerhalb des roten Rechtecks für jedes aufgenommene Bild, wie es in Abbildung 5.20 gezeigt ist, berechnet, ist wieder eine Intensitätsreduzierung bedingt durch Brechungsindexerhöhung zu erkennen. Die Intensität nimmt hier jedoch nur um  $\Delta I = 0,43\%$  bei einer Brechungsindexerhöhung um  $\Delta n = 0,02$  ab (Abbildung 5.19). Das Ausgangsniveau wird bei diesem Aufbau zwar nach abermaligem Spülen mit DI-Wasser erreicht, jedoch ist nur ein Detektionslimit von  $LOD = 2,1 \cdot 10^{-3}$  RIU möglich. Aufgrund der homogeneren Ausleuchtung (Abbildung 5.20) konnte im Vergleich zum optik-freien Design zwar das Rauschen verbessert werden, jedoch ist der hier erzielte Signalausschlag deutlich geringer.

Allgemein ist bei beiden Designs keine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erzielt worden. Auch konnte durch den Einsatz von verschiedenen Farbfiltern oder Bandpässen weder das Detektionslimit weiter verbessert, noch die Reproduzierbarkeit erhöht werden.

Wegen der geringen Reproduzierbarkeit der mit den Smartphone-Adaptoren erzielten Ergebnisse und weil das Detektionslimit noch weit entfernt von der benötigten Sensitivität ist, welche für die Proteindetektion im Bereich von  $10^{-9}$  liegen muss, wird im Folgenden das Kamera-basierte Messgerät für die folgenden Proteindetektionen verwendet.



**Abbildung 5.19:** Intensitätsverlauf über die Zeit während einer Wasser-Glycerin-Messung gemessen mit dem Optikaufbau und Smartphone. Eine Brechungsindexänderung von  $\Delta n = 0,02$  resultiert in eine Intensitätsänderung von  $\Delta I = 0,43\%$ .



**Abbildung 5.20:** Aufgenommenes Bild bei der Brechungsindexmessung mit dem telezentrischen Optikaufbau und Smartphone. Der ausgewählte Bereich für die Messung ist als rotes Rechteck markiert.

## 5.2. Multiparametrische Proteindetektion

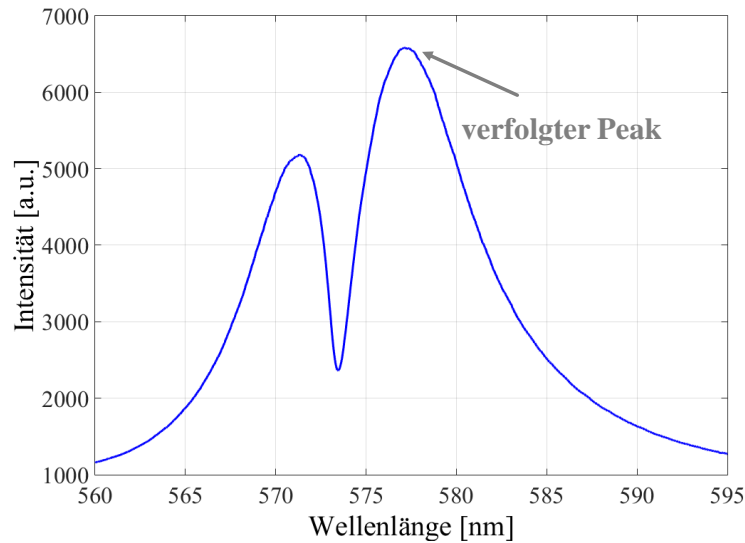
### 5.2.1. Detektion mit Aptameren als Rezeptor

In diesem Kapitel wurden Aptamere als Rezeptoren zur Proteindetektion eingesetzt. Aptamere sind synthetisch hergestellte Fängermoleküle. Sie bestehen aus einsträngigen Oligonukleotiden, die dreidimensional gefaltet werden und über diese dreidimensionale Struktur das entsprechende Zielprotein erkennen und an sich binden können [131], [132]. Im Vergleich zu den herkömmlichen Rezeptoren wie Antikörper sind Aptamere unempfindlicher gegenüber Temperatureinflüssen und können aufgrund der synthetischen Herstellung mit sehr geringer Ausschussrate produziert werden. Sie sind zudem genauso hoch bindungsspezifisch gegenüber dem Zielprotein [133].

Für diese Experimente wird das Protein Thrombin (HCT-0020, *CellSystems*) nachgewiesen. In der Literatur existieren bekannte und analysierte Aptamere für dieses Protein [134]. Als erstes wurde die Oberfläche des photonischen Kristalls<sup>16</sup> mit einem Tropfen Thrombin-bindendem Aptamer (5 µmol/l in tris-HCl-Puffer<sup>17</sup> mit einem pH-Wert von 7,4 gelöst), wie in Kapitel 3.2.1. beschrieben, funktionalisiert. Dieses ist mit einer Aminogruppe zur kovalenten Bindung an die Sensoroberfläche und einem Spacer bestehend aus einer Alkylkette modifiziert (Oligosequenz: 5'-C6-Aminolink-XAG TCC GTG GTA GGG CAG GTT GGG GTG ACT-3' mit X = Spacer-HEG/PEO, *metabion international AG*). Zunächst wurde der funktionalisierte photonische Kristall mit Hilfe des Spektrometernaufbaus aus Kapitel 4.2 getestet, indem die Resonanzverschiebung, hervorgerufen durch Thrombin-Assoziation, untersucht wird. Dafür wurde der photonische Kristall in die Fluidzelle platziert und alles zusammen auf den Mikroskopisch gelegt. Für Abbildung 5.22 wurde alle 20 Sekunden ein Transmissionsspektrum (Belichtungszeit: 1 s) aufgenommen und über einen Lorentz-Fit die Peakwellenlänge der TE<sub>0</sub>-Resonanz bestimmt und über die Zeit verfolgt.

<sup>16</sup> Hier wurde ein Kristall mit einer Periode von 370 nm und einer Titandioxidschicht von 45 nm verwendet.

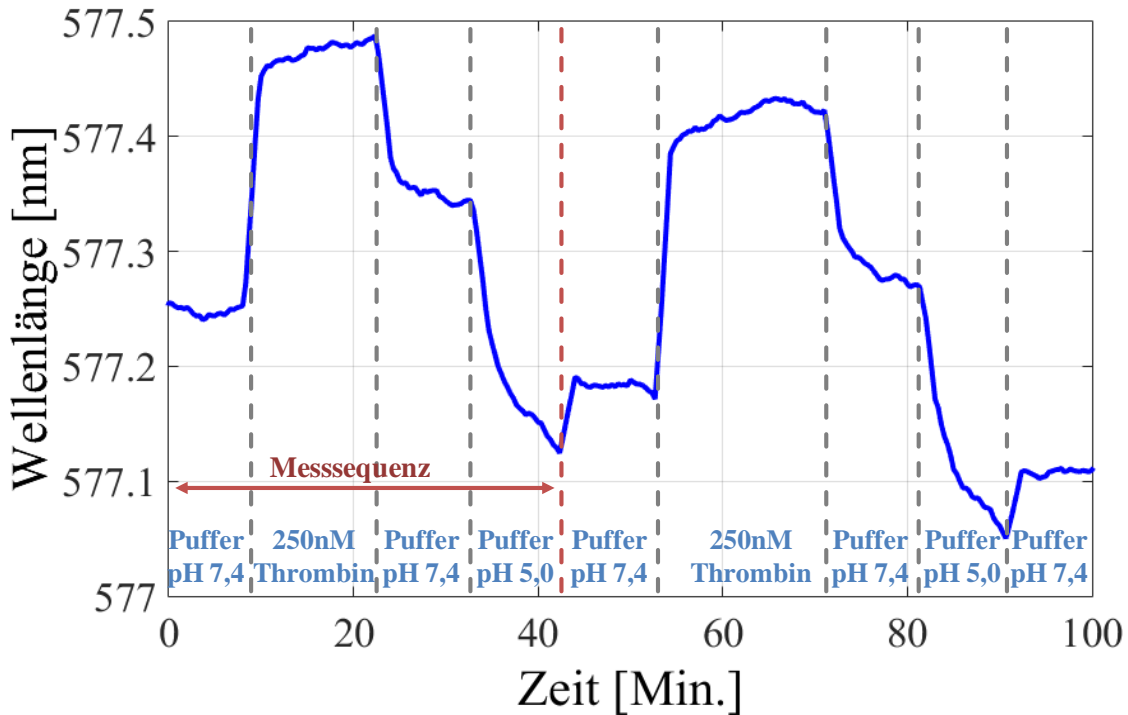
<sup>17</sup> Herstellung der zwei tris-HCl-Puffer (pH = 7,4 und pH = 5,0) wird im Anhang A beschrieben.



**Abbildung 5.21:** Resonanzspektrum des für die Thrombindetektion verwendeten Kristalls. Der verfolgte Resonanzpeak ist durch den Pfeil markiert.

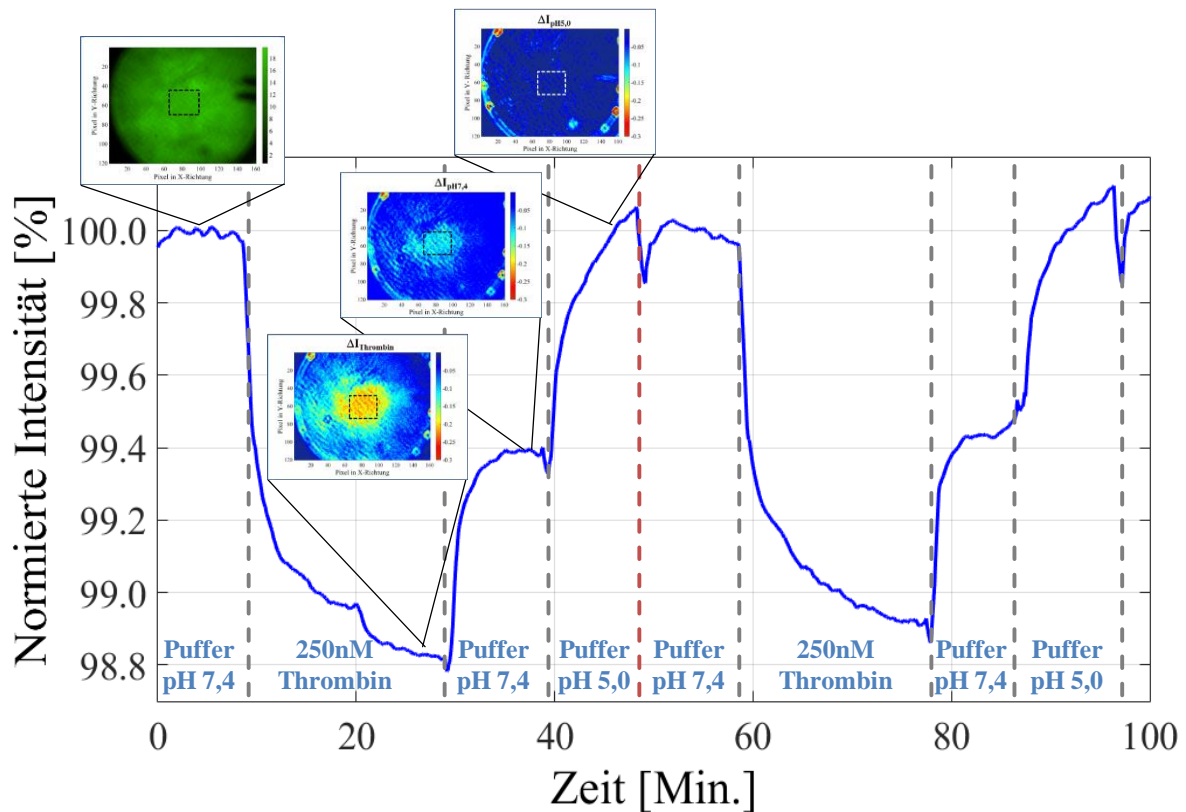
Am Anfang wird die Fluidzelle mit tris-HCl-Puffer (pH = 7,4) gefüllt, um ein Basissignal zu erzeugen. Nach zehn Minuten werden 5 ml von der Thrombin-Puffer-Lösung in die Fluidzelle gespritzt. Dafür wurden 250 nM Thrombin in tris-HCl-Puffer gelöst. Die Anbindung des Thrombins an das Aptamer und somit an die Sensoroberfläche (Assoziation) verursacht eine Resonanzverschiebung von  $\Delta\lambda_{res} = 0,2$  nm. Nachdem das Signal in Sättigung gegangen ist und alle Aptamere mit einem Protein besetzt sind, werden die nicht gebundenen Proteine mit reinem tris-HCl-Puffer (pH = 7,4) gewaschen. Dabei verschiebt sich die Resonanz hin zu kürzeren Wellenlängen, was darauf hindeutet, dass sich auch bereits gebundenes Thrombin teilweise wieder von dem Aptamer ablösen scheint (Dissoziation). Wie oben bereits erwähnt, binden Aptamere das Zielprotein über deren 3D-Struktur an sich. Diese Bindung scheint in diesem Fall nicht sehr stabil zu sein.

Nach weiteren 10 Minuten wird der neutrale Puffer durch ein leicht sauren tris-HCl-Puffer (pH = 5,0) ersetzt. Aptamere sind empfindlich gegenüber dem pH-Wert der umgebenden Flüssigkeit und ändern bei saurem Puffer ihre 3D-Faltung, wodurch das gebundene Protein wieder abgelöst und die Sensoroberfläche regeneriert wird. Dieses Ablösen verursacht eine entsprechende Verringerung der Resonanzwellenlänge. Anschließendes Spülen mit neutralem Puffer schließt die Regeneration des Sensors ab und die Messsequenz von Assoziation, Dissoziation und Regeneration kann mit nahezu den gleichen Messergebnissen von neuem durchgeführt werden.



**Abbildung 5.22:** Verschiebung der Resonanzwellenlänge hervorgerufen durch die Assoziation, Dissoziation und Regeneration während der Thrombindetektion in zwei hintereinander durchgeführten Messzyklen.

Aufbauend auf diesen Messergebnissen wurde die Messesequenz am nächsten Tag mit dem Kamera-basierten Messgerät und demselben Sensor wiederholt. Der Sensor wurde dafür über Nacht innerhalb der Fluidzelle, welche mit neutralem tris-HCl-Puffer ( $\text{pH} = 7,4$ ) gefüllt war, im Kühlschrank gelagert. Wegen der langen Messdauer wurde hier und für die folgende Messung ein Pixelbinning über  $10 \times 10$  Pixel und ein Bildbinning über zehn Bilder im *LabVIEW*-Programm eingestellt. Zur Auswertung der Intensität wurde das in Abbildung 5.23 gezeigte Messfeld für jedes einzelne Intensitätsbild zur Berechnung der Intensität gewählt. Neben dem Intensitätsverlauf über die Zeit sind zum einen Differenzbilder für jede Messphase und ein Intensitätsbild der Sensoroberfläche am Anfang der Messung gezeigt. Passend zur Wellenlängenverschiebung sind die Assoziations-, Dissoziations- und Regenerationsphasen auch in diesem Experiment klar zu beobachten. Obwohl die Resonanz nach der Thrombin-Assoziation nur um  $\Delta\lambda_{res} = 0,2$  nm verschoben wurde, resultiert dies in eine Reduzierung der Intensität um  $\Delta I = -1,17\%$  und somit zu einer höheren Signalamplitude.

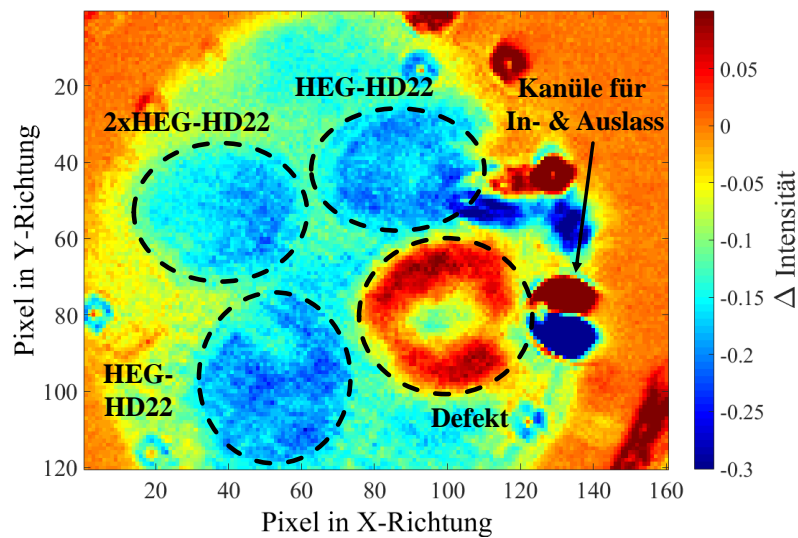


**Abbildung 5.23:** Assoziations-, Dissoziations- und Regenerationsphasen sind bei der Detektion von 250 nM mit dem Kamera-basierten Messsystem in dem Intensitätsverlauf über die Zeit sichtbar.

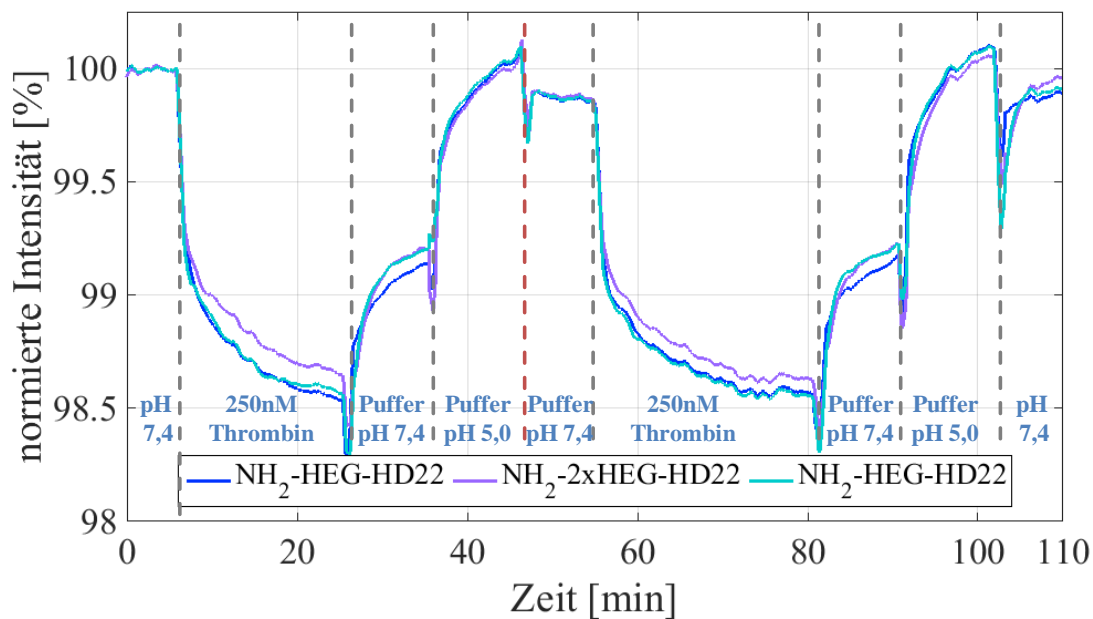
Nun werden verschiedene Thrombin-bindende Aptamere tropfenweise auf den photonischen Kristall immobilisiert. Anhand von verschiedenen Spacer-Längen soll das Signal-zu-Rauschverhältnis optimiert werden. Dafür wurden jeweils zwei Tropfen von Aptameren (10  $\mu\text{M}$ ) mit einem ( $\text{NH}_2\text{-HEG-HD22}$ ) und mit zwei ( $\text{NH}_2\text{-2xHEG-HD22}$ ) Spacern auf den Sensor aufgetragen. Wie die Aptamere angeordnet sind und wie das Differenzbild, für das das Intensitätsbild am Ende der Assoziationsphase vom Ersten abgezogen wurde, aussieht, kann aus Abbildung 5.24 entnommen werden. Leider hat sich ein Defekt in Form von Verunreinigung genau an der Position des zweiten Tropfens vom Aptamer  $\text{NH}_2\text{-2xHEG-HD22}$  gebildet, wodurch die Intensitätswerte nur für ein Messfeld mit den längeren Aptameren ausgewertet wird (Abbildung 5.25). Auch hier sind wieder die typischen Intensitätsverläufe während der drei Messphasen zu sehen. Zudem liegen die zwei Messkurven für das kürzere Aptamer fast annähernd übereinander, während die Intensitätsverringerung bei  $\text{NH}_2\text{-2xHEG-HD22}$  nach der Thrombinanbindung um  $\Delta I_{\text{diff}} = 1,17\%$  kleiner ausfällt. Obwohl  $\text{NH}_2\text{-2xHEG-HD22}$  im Vergleich zu  $\text{NH}_2\text{-HEG-HD22}$  laut Datenblatt der Firma *metabion international AG* nur 0,102 nm länger ist, scheint dies schon



einen messbaren, negativen Einfluss auf die Signalstärke zu haben. Dieses Verhalten deckt sich mit den Untersuchungen von Ganesh et al. [117]. Sie demonstrierten sowohl simulativ als auch experimentell, dass die elektrische Feldstärke an der photonischen Kristalloberfläche und somit die Oberflächenempfindlichkeit mit größer werdendem Abstand abnimmt. Da aber wegen der pH-Empfindlichkeit der Aptamere die Funktionalisierung nicht mehr funktioniert hat, konnten keine weiteren Experimente durchgeführt werden, um die Reproduzierbarkeit und somit die Allgemeingültigkeit dieser Ergebnisse sicher zu stellen. Diese Messung gibt jedoch Aufschluss darüber, dass eine parallele Detektion an mehreren Positionen möglich ist.



**Abbildung 5.24:** Differenzbild zwischen dem ersten Intensitätsbild und dem Bild am Ende der Assoziationsphase. Die Positionierung der Aptamere ist mit den gestrichelten Kreisen markiert.



**Abbildung 5.25:** Assoziations-, Dissoziations- und Regenerationsphasen sind bei der Detektion von 250 nM Thrombin für unterschiedlich lange Aptamere in deren Intensitätsverläufen über die Zeit sichtbar.

### 5.2.2. Detektion mit Antikörpern als Rezeptor

Für die parallele und spezifische Detektion von mehreren Proteinen wurde der photonische Kristall<sup>18</sup> in diesem Kapitel an sechs Positionen mit drei unterschiedlichen Rezeptoren funktionalisiert. Als Rezeptoren wurden die Proteine rekombinantes CD40 Ligand (AF-310-02-B, *PeproTech GmbH*), rekombinantes EGF (CS-C1020, *CellSystems*) und biotinyliertes Bovin Serum Albumin (BSA-Biotin) (A8549-10MG, *Sigma Aldrich*) gewählt. Diese Proteine und deren Gegenpart sind käuflich zu erwerben und wurden hier nur eingesetzt, um die Funktion des Sensors zur multiparametrischen Proteindetektion zu demonstrieren. Zwei Tropfen vom CD40 Liganden, drei Tropfen von EGF und 1 Tropfen vom BSA-Biotin werden, wie in Kapitel 3.2.1.2 beschrieben, jeweils mit einer Konzentration von 1,00  $\mu$ M auf die Oberfläche des photonischen Kristalls immobilisiert.

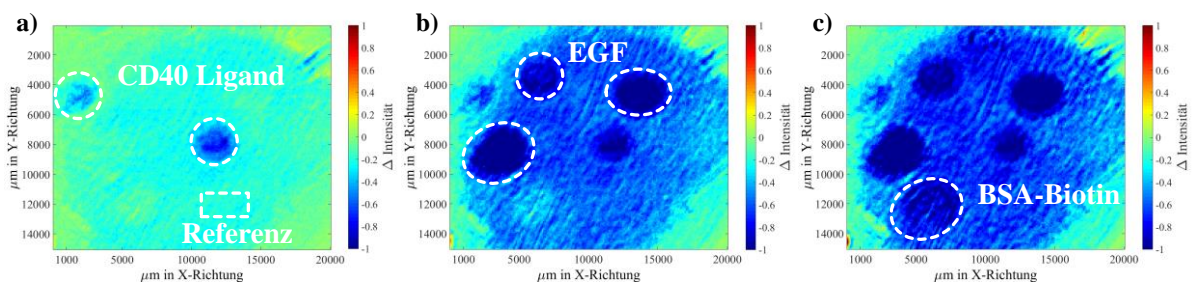
Am Anfang des Experiments ist die Fluidzelle mit reinem Phosphatpuffer (DPBS) gefüllt. Nach ca. 7 Minuten werden zunächst 90 nM des zu messenden Proteins CD40 Ligand Antikörper (Anti-CD40L), welches auch in DPBS gelöst wurde, mit einer 5 ml Spritzfüllung in die Fluidzelle gespritzt. Wie man in dem Differenzbild in Abbildung 5.26a beobachten kann, verursacht die Anbindung des CD40 Ligand Antikörpers eine lokale

<sup>18</sup> Hier wurde ein Kristall mit einer Periode von 370 nm und einer Titandioxidschicht von 80 nm verwendet.

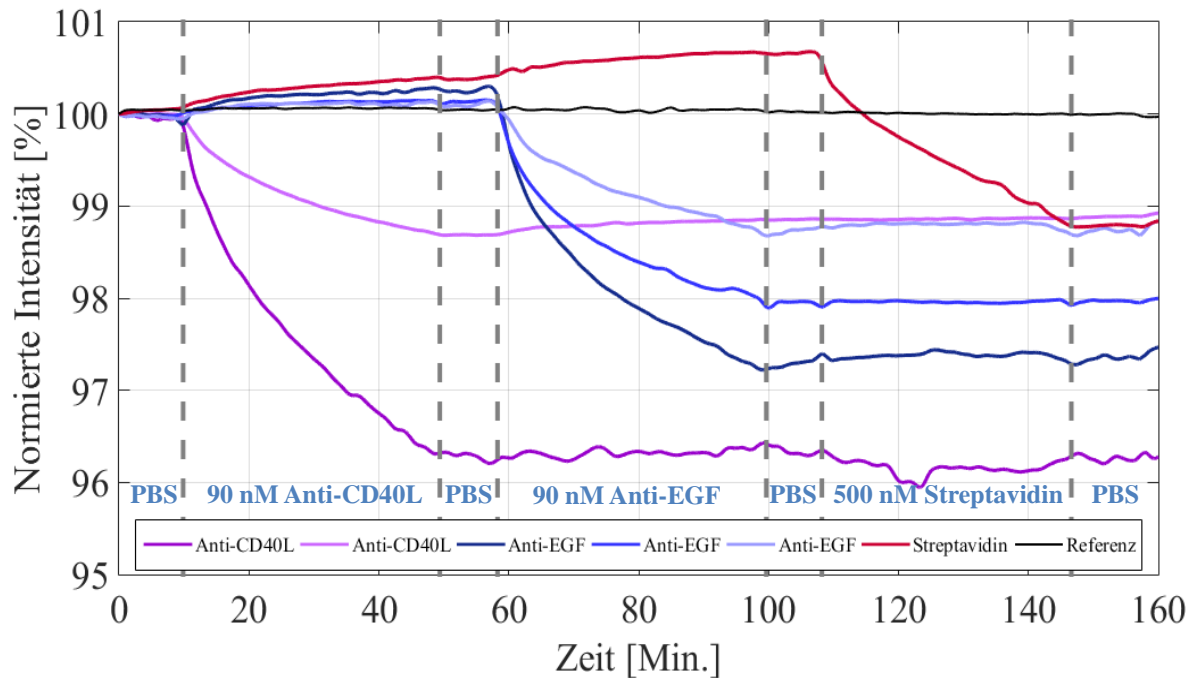
Intensitätsverringering nur an der Stelle, an der der Gegenpart CD40 Ligand funktionalisiert wurde. Während der 40-minütigen Inkubationszeit verursacht die Assoziation des CD40 Ligand Antikörpers eine Intensitätsänderung von maximal  $\Delta I_{max} = 4,3\%$  (Abbildung 5.27). Anschließend wird wieder mit reinem DPBS gespült. Die Intensität innerhalb dieser Messfelder verringert sich nicht weiter und bleibt stabil auf einem Niveau bis zum Ende der Detektion. Als Zweites wird eine Lösung aus 90 nM des Proteins EGF Antikörper (Anti-EGF) und DPBS hinzugegeben. Erneut werden kreisrunde Intensitätsverringeringungen an den Stellen, an denen entsprechend EGF immobilisiert worden ist, im Differenzbild erkennbar (Abbildung 5.26b). Hier beträgt die maximale Intensitätsamplitude  $\Delta I_{max} = 2,7\%$ . Mit DPBS werden anschließend die nicht gebundenen Proteine erneut gewegewaschen. Als Letzteres löst die Assoziation von 500 nM Streptavidin in DPBS eine Intensitätsreduzierung von  $\Delta I_{max} = 1,9\%$  an der letzten Rezeptorposition aus (Abbildung 5.26). Ein finales Spülen mit Puffer schließt diese Messung ab.

Die Intensitätskurven in Abbildung 5.27 demonstrieren eine deutliche und spezifische Detektion von mehreren Proteinen mit einem einzigen Sensor. Allerdings unterscheiden sich die Signalamplituden der Messfelder sowohl für das gleiche Protein als auch für die gleiche Proteinkonzentration deutlich voneinander, da der EGF und CD40 Ligand Antikörper mit 150 kDa dieselbe molekulare Größe besitzen. Auch wäre zu erwarten, dass die Anbindung von Streptavidin aufgrund der deutlich höheren Konzentration in einer höheren Amplitude resultiert. Jedoch besitzt Streptavidin mit 60 kDa eine geringere molekulare Größe, wodurch diese Diskrepanz erklärt werden könnte.

Es wurde mit dieser Methode ein Detektionslimit von  $LOD = 166 \text{ pM}$  (24 ng/ml) für die maximale Intensitätsänderung berechnet.



**Abbildung 5.26:** a) Differenzbild nach der Assoziation von CD40 Ligand Antikörper. b) Differenzbild nach der Assoziation von EGF Antikörper. d) Differenzbild nach der Assoziation von BSA-Biotin.

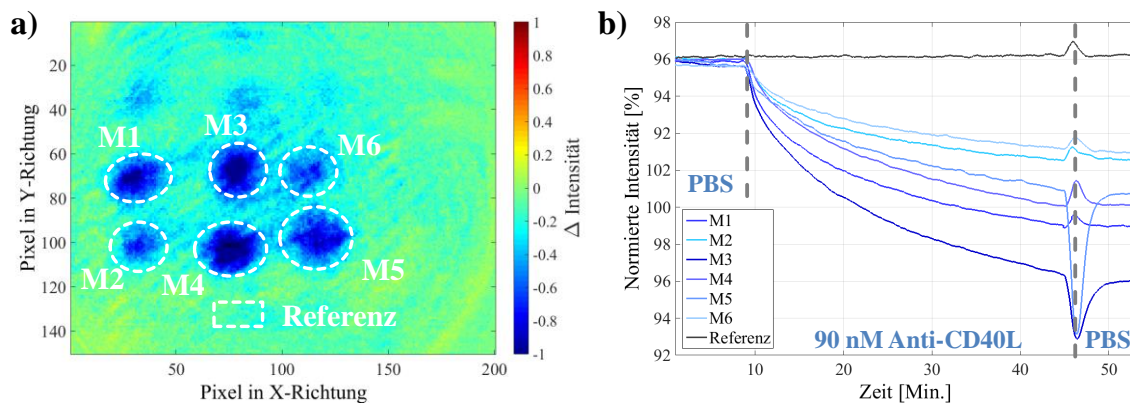


**Abbildung 5.27:** Die Anbindung von zuerst 90 nM CD40 Ligand Antikörper (Anti-CD40L), dann von 90 nM EGF Antikörper (Anti-EGF) und abschließend von 500 nM Streptavidin sind in der normierten Intensität des transmittierten Lichts zu erkennen.

Als Nächstes soll die Ursache für die verschiedenen Signalamplituden bei der Detektion des gleichen Proteins untersucht werden. Dafür wurden 3 x 3 500 nl große Tropfen CD40 Ligand mit einer Pipette auf den photonischen Kristall platziert und erneut die Detektion von 90 nM CD40 Ligand Antikörper in DPBS durchgeführt. Bereits in dem Differenzbild sind zum einen nur sechs von neun Anbindungsstellen und zum anderen deutliche Intensitätsunterschiede und ungleich große Spots zwischen den Messfeldern zu erkennen (Abbildung 5.28). Auch die Bestimmung der Intensitätswerte zeigt eine Varianz von  $\Delta I_{min} = 2,53\%$  für Messfeld M6 bis zu  $\Delta I_{max} = 6,01\%$  (M3). Dies könnte durch das manuelle Spotten und somit in der ungleichen Verteilung der Rezeptoren auf der Oberfläche begründet sein. Experimente mit einem automatisierten Spotter in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Institut für Siliziumtechnik in Itzehoe waren im Zuge der zu langen Transportwege leider fehlgeschlagen.

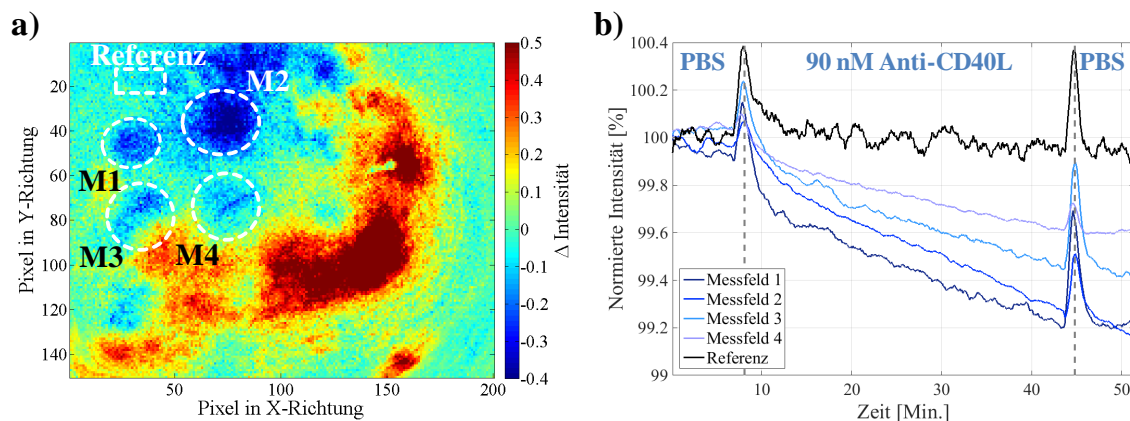
Eine weitere Störquelle könnte das Messgerät, genauer die Optik an sich, sein. Wird die LED nicht exakt auf den Strahlengang der Optik justiert, kommt es zu einer inhomogenen Ausleuchtung, die sich wiederum auf die Qualität des zu detektierenden Signals auswirkt. Die LED ist, wie in Kapitel 5.1.2. bereits beschrieben, mit einer Lochblende verbunden, welche

systembedingt etwas Bewegungsspielraum in der Fixierung besitzt und deshalb eine genaue Justage nur sehr schwer ermöglicht.



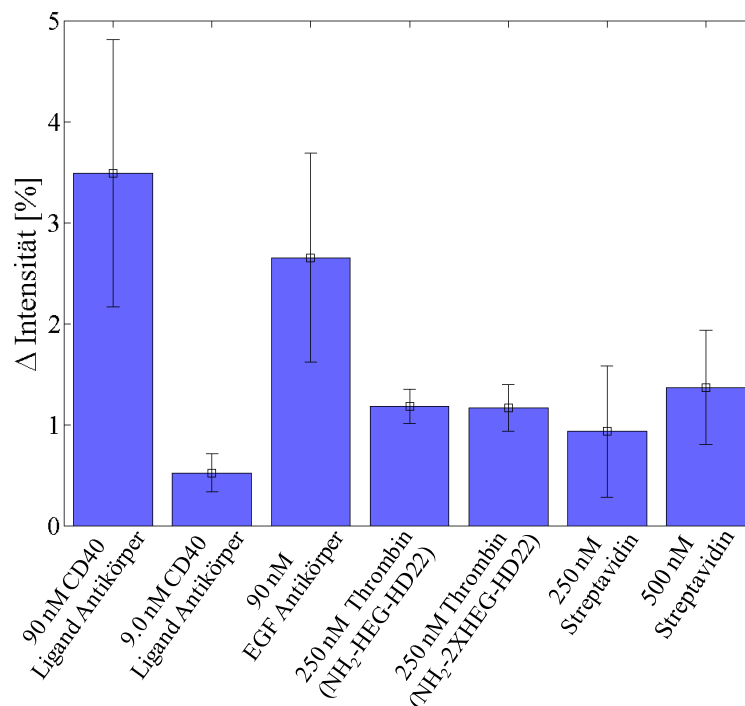
**Abbildung 5.28:** a) Differenzbild mit den einzelnen weiß markierten Messfeldern (M1-M6) und dem Referenzfeld. b) Intensitätswerte der Messfelder über die Zeit aufgetragen.

Im nächsten Experiment wird zur Bestimmung der realen Detektionsgrenze die Konzentration vom CD40 Ligand Antikörper um den Faktor 10 auf 9 nM reduziert. Auch hier wurde der photonische Kristall wieder an 3 x 3 Positionen mit 1,00  $\mu$ M CD40 Ligand funktionalisiert. Bei dieser Messung konnten maximal vier Messfelder identifiziert werden, da die anderen Rezeptorpositionen im Hintergrundsignal verschwinden (Abbildung 5.29a). Allerdings liefern die Daten von Messfeld 1 trotz des sehr starken Hintergrundsignals eine deutliche Assoziationskurve mit einer maximalen Intensitätsverringerung für Messfeld 1 von  $\Delta I = 0,8\%$  (Abbildung 5.29b).



**Abbildung 5.29:** Differenzbild mit den einzelnen weiß markierten Messfeldern (M1-M4) und dem Referenzfeld. b) Intensitätswerte aller Messfelder und dem Referenzfeld über die Zeit aufgetragen.

Abbildung 5.30 fasst alle gemessenen Intensitätsänderungen für jedes Protein und die unterschiedlichen Konzentrationen, die mit diesem optischen Messverfahren detektiert wurden, zusammen<sup>19</sup>. Eine starke Standardabweichung bei der Messung von z.B. 90 nM CD40 Ligand Antikörper spiegelt die großen Schwankungen der Signalamplituden bei der Detektion der gleichen Proteinkonzentration wieder. Die Intensitätsamplituden für die Thrombindetektion weisen allerdings eine geringere Standardabweichung und somit eine höhere Reproduzierbarkeit verglichen mit den anderen Messungen auf. Dies könnte mit der höheren chemischen Stabilität der Thrombin-bindenden Aptamere erklärt werden.



**Abbildung 5.30:** Mittelwerte und Standardabweichung aller gemessenen Intensitätsamplituden für jede einzelne Proteindetektion.

### 5.3. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden zwei Kamera-basierte Messsysteme zur parallelen Detektion von mehreren Proteinen vorgestellt. Zunächst wird ein kompaktes Messgerät mit einer Gesamtgröße von 13 x 3,5 x 4,9 cm<sup>3</sup> genauer charakterisiert. Um die in diesem Gerät vorkommenden Driftvorgänge zu kompensieren und allein die Bindungssignale der Proteine an die Sensoroberfläche detektieren zu können, wurde erfolgreich ein Bildverarbeitungsalgorithmus implementiert.

<sup>19</sup> Die einzelnen Intensitätswerte für die verschiedenen Proteindetektionen können Anhang C entnommen werden.

Das zweite Messsystem nutzt sowohl die LED als Anregungsquelle als auch die Kamera eines Smartphones als Detektor. Auf Basis dieser Ergebnisse wurden zwei unterschiedliche Adapter konzipiert und untersucht. Durch eine Diffusorplatte wird das Licht der Smartphone-LED gleichmäßiger über die Oberfläche des photonischen Kristalls verteilt. Mit Brechungsindexmessungen konnte ein Detektionslimit von  $LOD = 1,4 \cdot 10^{-3}$  RIU erreicht werden. Für das zweite Adapterdesign wurde eine telezentrische Optik entworfen, die das Licht der LED mit einem rechtwinkligem Prisma, was vor der LED platziert wird und einem Strahlteiler vor dem Kamerasensor, in den Strahlengang der Kamera leitet. Über eine telezentrische Linse wird die Oberfläche des photonischen Kristalls scharf abgebildet. Mit diesem Adapter wurde allerdings ein schlechteres Detektionslimit von  $LOD = 2,1 \cdot 10^{-3}$  RIU erzielt. Das Detektionslimit der beiden Adapterdesigns konnte durch den Einsatz von Farbfiltern und Bandpassfiltern nicht verbessert werden, weshalb Proteindetektionen nur mit dem Kamera-basierten Messgerät durchgeführt wurden.

Mit diesem Messgerät konnte letztendlich die parallele und spezifische Detektion von drei verschiedenen Proteinen an sechs Bindungsstellen demonstriert werden. Dabei wurde ein Detektionslimit von 166 pM berechnet. Experimentell konnte eine Proteinkonzentration von 9,0 nM (1,35 µg/ml) des Proteins CD40 Ligand Antikörper in Puffer nachgewiesen werden, was im Vergleich zu anderen bildgebenden optischen Biosensoren wie z.B. Cetin et al. [42], die 3,9 µg/ml nachweisen konnten, um fast einen Faktor drei empfindlicher ist.





# Kapitel 6

## Testchip zur markerfreien Detektion in Blut

---

### Zusammenfassung

*Hier wird ein Ansatz für einen Testchip präsentiert, mit dem Vollblut so gefiltert werden kann, dass eine Proteindetektion in Blut möglich ist. In diesem Prototyp wird der funktionalisierte photonische Kristall integriert und das gefilterte Blut über Mikrofluidikkanäle zum Sensor geleitet. Mit Hilfe von fluoreszierenden Partikeln in unterschiedlichen Größen werden die Filtereigenschaften dieses Testchips charakterisiert. Die Flusseigenschaften innerhalb der Sensorkammer und die Systemantwort wurden mit Brechungsindexmessungen verifiziert. Erste Bindungsexperimente mit dem Biotin-Streptavidin-Komplex in Puffer konnten erfolgreich mit dem Testchip und dem Kamera-basierten Messgerät durchgeführt werden. Detektionen von Biotin, welches in Vollblut angereichert wurde, verursachten eine deutliche Änderung im Messsignal.<sup>20</sup>*

---

<sup>20</sup>Teile dieses Kapitels wurden bereits in [149] und [155] veröffentlicht.

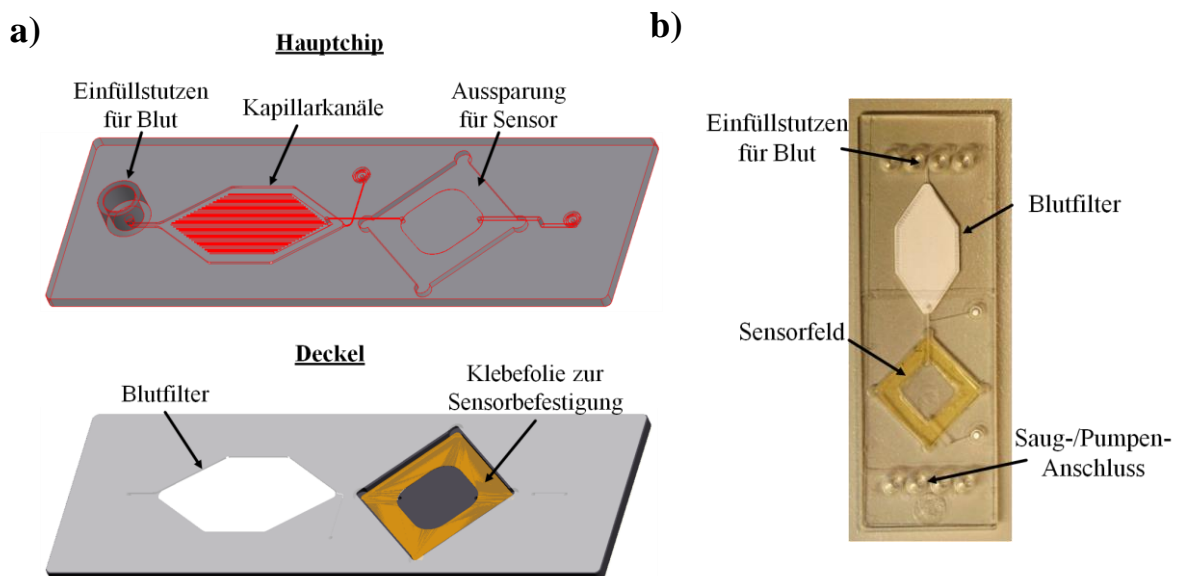
Neben der spezifischen und parallelen Detektionen von mehreren Proteinen sind einfach anzuwendende Sensoren für die patientennahe Diagnostik von großer Bedeutung. Da die für die Diagnostik interessanten Proteine in den Körperflüssigkeiten wie Urin, Speichel und Blut zu finden sind, sind Testchips, die sowohl die zu messende Flüssigkeit aufbereiten als auch gleichzeitig Proteine in der Flüssigkeit detektieren können, von Vorteil. Diese Anforderungen können erfüllt werden, indem Mikrofluidik-Technologie mit einem Biosensor verbunden wird [135]–[138]. Durch Mikrofluidiksysteme sind biochemische Analysen bereits mit nur kleinen Flüssigkeitsvolumina möglich [139]. Verglichen mit konventionell verwendeten Diagnoseverfahren in den zentralen Laboratorien, sind kleine Flüssigkeitsvolumina vor allem bei der Filterung von Blut und somit die Analyse von Proteinen in Blut nicht zu vernachlässigen [140].

Rote Blutkörperchen überdecken mit einer Größe von ca.  $7,5\ \mu\text{m}$  für die meisten Messverfahren die Anbindungskinetik von Proteinen, die mit einigen Nanometern deutlich kleiner sind. Aus diesem Grund werden verschiedene Konzepte zur Trennung der roten Blutkörperchen vom Blutplasma in der Literatur diskutiert. Die Bandbreite reicht von speziellen Filtermaterialien [141] über speziell designte Mikrofluidikkanäle [140], [142] bis zur Separation über eine Membran [143]. Kombiniert man nun Biosensoren aus photonischen Kristallen mit solchen Mikrofluidik-Kanälen, ist es möglich, kompakte und markerfreie Testchip-Systeme zu realisieren [35], [73], [136].

Im Kapitel 5.2 konnte bereits demonstriert werden, dass es möglich ist, mehrere Proteine hoch spezifisch mit einem funktionalisierten photonischen Kristall und dem bildgebenden Messsystem nachzuweisen. Um diese Technologie für die patientennahe Diagnostik noch interessanter zu gestalten, soll der hier entwickelte Biosensor in einen Mikrofluidik-Chip integriert werden. Deshalb wurde in dieser Arbeit ein Prototyp eines Testchips entwickelt, mit dem zunächst Blut gefiltert und dann zu einem Sensorfeld, in dem der Biosensor platziert ist, geleitet wird. Die Filtereigenschaften dieses Testchips werden mit Hilfe von Experimenten mit Blut und fluoreszenzmarkierten, unterschiedlich großen Mikrokügelchen beurteilt. Zudem werden die Flusseigenschaften in der Kavität über dem Sensorfeld anhand von Brechungsindexmessungen und dem Kamera-basierten Messgerät untersucht. Anschließend werden orts aufgelöste Bindungsexperimente anhand der Reaktion zwischen Biotin und Streptavidin mit dem gesamten Testchip durchgeführt.

## 6.1. Mikrofluidischer Chip zur Filtration von Blut

Es wurde ein  $75 \times 25 \times 2 \text{ mm}^3$  großer Testchip aus Plastik designet. Dieser wurde in Zusammenarbeit mit der Firma *Microfluidic ChipShop GmbH* entwickelt. Wie man in Abbildung 6.1a erkennen kann, besteht der Mikrofluidik-Chip aus zwei Teilen, dem Hauptchip und dem Deckel. In den Hauptchip ist ein Einfüllstutzen für das Blut, Kapillarkanäle für den Bluttransport und eine  $15 \times 15 \text{ mm}^2$  große Aussparung für den Sensor eingelassen. Der Deckel beinhaltet den Blutfilter sowie die Klebefolie zur Befestigung des Sensors und schließt den Hauptchip von der Umgebung ab. Die Grundidee besteht darin, einen Tropfen Blut in den Stutzen einzufüllen und dann durch den Filter zu pressen, so dass nur das klare Blutserum zum Sensorfeld geleitet wird. Dabei dienen die Kapillarkanäle zum Transport und Verteilung des Blutes, so dass die gesamte Fläche des Filters genutzt werden kann. Der gefertigte Testchip ist in Abbildung 6.1b zu sehen.



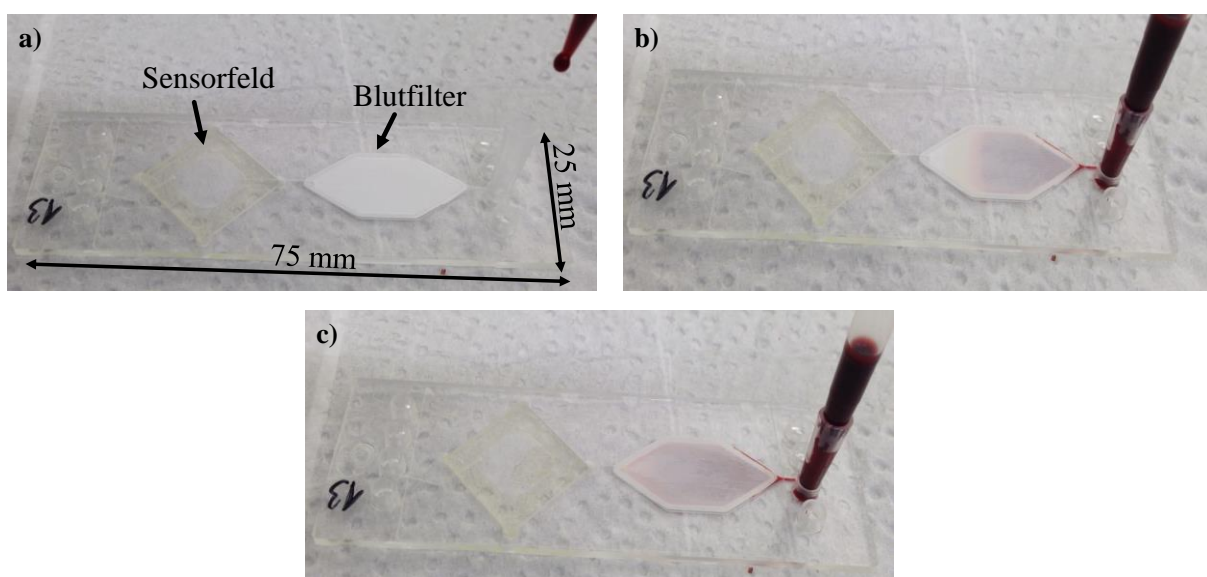
**Abbildung 6.1:** (a) CAD-Zeichnung des Mikrofluidik-Chips mit dem Hauptchip (oben), der den Einfüllstutzen für das Blut, die Kapillarkanäle für den Bluttransport sowie der Aussparung für den Sensor beinhaltet, und mit dem Deckel (unten), in dem der Blutfilter und die Klebefolie zur Sensorbefestigung integriert sind. (b) Bild des realisierten, mikrofluidischen Testchips.

Da das Sensorfeld abzüglich des Platzes für die Klebefolie eine Größe von  $1 \times 1 \text{ mm}^2$  besitzt und somit ca.  $70 - 100 \text{ }\mu\text{l}$  Blutserum benötigt werden, um den Raum oberhalb des Sensors komplett zu füllen, wird für diesen Chip statt eines Tropfens Blut eine Blutmenge von  $200 \text{ }\mu\text{l}$  benötigt. Dies ist immer noch sehr gering im Vergleich zu herkömmlichen

Blutuntersuchungen, bei denen dem Patienten meist mehrere Milliliter entnommen werden. Auch hat sich herausgestellt, dass rohes Blut sofort in den Kapillarkanälen aufgrund der Oberflächenvergrößerung gerinnt und dadurch den Filter verstopft. Deshalb mussten alle folgenden Experimente mit Gerinnungshemmer (Heparin) versetztem Blut ausgeführt werden.

Mit diesem Chip-Design ist das Einfüllen und Filtern des Blutes auf drei unterschiedliche Vorgehensweisen möglich. Bei der ersten Variante wird das Blut in den Einfüllstutzen gefüllt und anschließend am Sauganschluss über z.B. eine Spritze oder Pumpe durch den Filter gesaugt. Als zweites kann die Blutinjektion über das Ansaugen der Blutprobe aus einem Reservoir mittels Schlauchverbindung zum Chip erfolgen. Bei diesen beiden Methoden ist laut Hersteller darauf zu achten, dass ein Unterdruck von 50 bis maximal 80 mbar erzeugt wird. Die Einhaltung dieses Unterdrucks hat sich als schwierig bei der Verwendung einer Spritze zum Ansaugen des Blutes erwiesen, da es trotz vorsichtigem Umgang schnell zum Durchbruch der Filtermembran kam. Die dritte Variante, bei der die Injektion der Blutprobe mit einer Pipette durchgeführt wird, stellte sich als am stabilsten heraus, weshalb hier auf den Einsatz einer Pumpe verzichtet wurde.

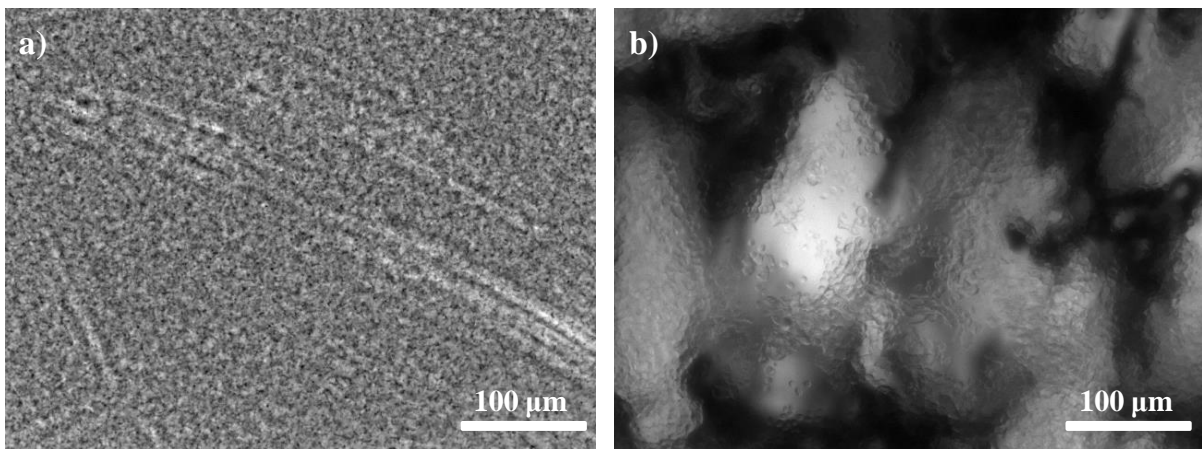
Mit Hilfe der Pipette werden nun 200  $\mu\text{l}$  des mit Heparin versetzten Blutes aufgezogen und die Pipettenspitze in den Einfüllstutzen gedrückt. Über die Pipette wird dann vorsichtig ein Überdruck erzeugt, durch den das Blut aus der Pipettenspitze in die Kapillarkanäle durch den Filter gepresst wird. Wie in Abbildung 6.2 zu sehen ist, bleiben die roten Blutkörperchen an der Unterseite der Filtermembran hängen und nur das klare Blutplasma gelangt über einen Mikrofluidikkanal zu dem Sensorfeld.



**Abbildung 6.2:** a) Injektion des Blutes in den Testchip über (b) die Filterung bis (c) zum Transport des klaren Blutplasmas zum Sensorfeld.

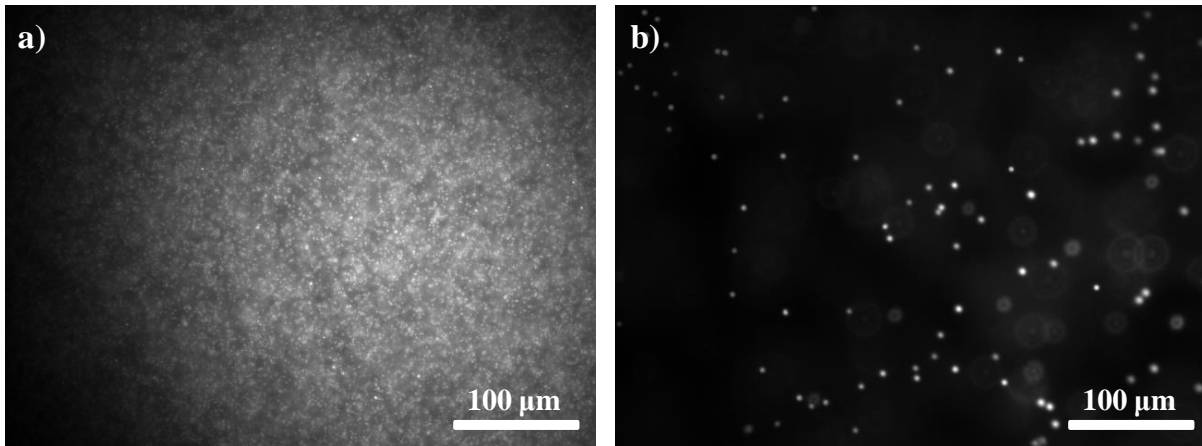
### Charakterisierung der Testchip-Filtreigenschaften

Für genauere Untersuchungen des Mikrofluidik-Chips wurde zunächst ein einfaches Glassubstrat in die Aussparung für den Sensor geklebt und mit Hilfe eines Mikroskops Blutfilter-Experimente genauer analysiert. Anhand der Mikroskopaufnahmen wird zum einen erneut deutlich, dass die roten Blutkörperchen vom Filter zurückgehalten werden (Abbildung 6.3b). Zum anderen beinhaltet das zuerst augenscheinlich klare Blutplasma doch sehr viele weitere Bestandteile, welche die Qualität des Signals bei späteren Proteindetektionen negativ beeinflussen (Abbildung 6.4a).



**Abbildung 6.3:** a) Mikroskopaufnahme des gefilterten Bluts (Blutplasma) innerhalb des Sensorfelds. b) Mikroskopaufnahme unterhalb des Filters mit den zurück gehaltenen roten Blutkörperchen im Vordergrund und der Filterstruktur im Hintergrund.

Um zu verifizieren, wie groß die Bestandteile sind und wie stark ihr Einfluss ist, wurden Filterexperimente mit unterschiedlich großen Partikeln (200 nm, 1, 2, 3 und 5 µm) absolviert, die in den Farben DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) oder FITC (Fluoreszein Isothiocyanat) fluoreszieren. Dafür wurden 500 µl der Partikelstammlösung (1 Gew.-%) in 5 µl doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) gelöst und genau wie das Blut mit einer Pipette in den Mikrofluidik-Chip injiziert. Die 200 nm und 1 µm großen Partikel passieren die Filtermembran und gelangen zu dem Sensorfeld (Abbildung 6.4a). Partikel größer als 3 µm bleiben im Filter haften (Abbildung 6.4b). Zusätzlich sind die Partikel mit Säure- oder Aminogruppen modifiziert, um chemischen Reaktionen der Blutbestandteile mit dem Filter ausschließen zu können. Hier konnte kein Einfluss beobachtet werden.



*Abbildung 6.4:* a) Fluoreszenzfoto von den 1 µm großen Partikeln innerhalb des Sensorfeldes. b) Fluoreszenzfoto von den 3 µm großen Partikeln innerhalb der Filtermembran.

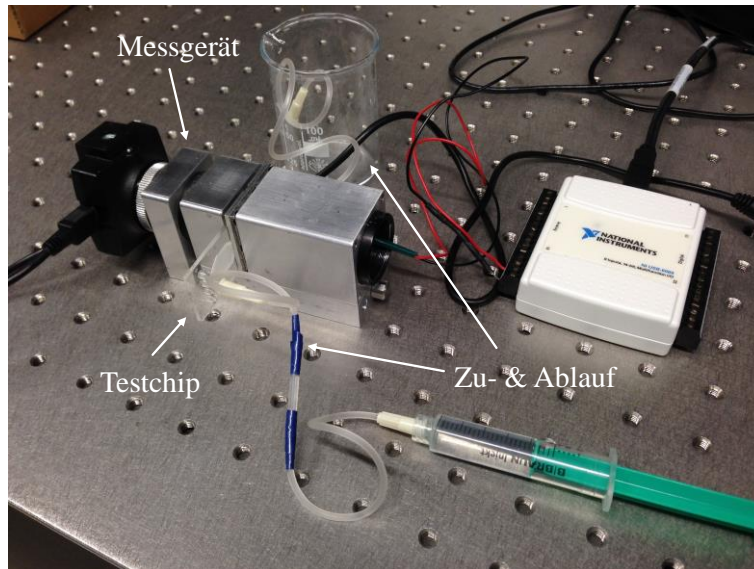
## 6.2. Brechungsindex-Messungen mit Testchip

Damit eine multiparametrische Proteindetektion mit dem in Kapitel 5 vorgestellten Biosensor und Messgerät durchgeführt werden kann, muss auch bei diesem Testchip die Intensität möglichst homogen über die gesamte Fläche des Sensors sein. Für diese Untersuchung wurde ein nicht funktionalisierter photonischer Kristall in die Aussparung für den Sensor geklebt. Anhand von DI-Wasser ( $n_{H_2O} = 1,33$ ) und Isopropanol ( $n_{Iso} = 1,379$ ) wurde zunächst das Detektionslimit für Brechungsindexänderungen bestimmt. Hierfür wurde der Testchip samt integriertem photonischen Kristall mit DI-Wasser gefüllt und anstelle der Fluidzelle in das Messgerät geschoben. Das Wasser wurde nach sieben Minuten durch das Isopropanol ausgetauscht. Um während der Messung Flüssigkeiten besser austauschen zu können, wurden vorher an dem Einfüll- und dem Saugstutzen des Testchips Schläuche angebracht (Abbildung 6.5).

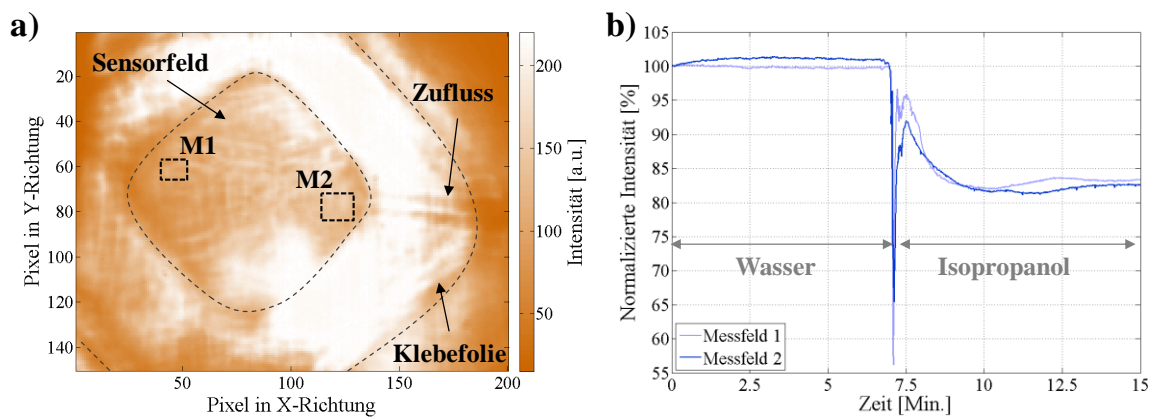
Für jedes aufgenommene Bild wurde wieder der Mittelwert der Intensität über alle Pixel innerhalb der Messfelder M1 und M2, wie sie in Abbildung 6.6a gezeigt sind, berechnet, auf den Anfangsintensitätswert normiert und für Abbildung 6.6b gegenüber der Zeit aufgetragen. Für jedes Messfeld resultiert der Wechsel von DI-Wasser zu Isopropanol in eine Intensitätsänderung  $\Delta I = -17,12\%$ . Daraus lässt sich ein Detektionslimit von  $LOD = 7,3 \cdot 10^{-4}$  RIU berechnen.

Wie man schon aus dem aufgenommenen Bild entnehmen kann, verursachen der Testchip selbst und die Klebefolie zur Sensorfixierung eine Polarisationsdrehung des transmittierten Lichts. Bei der Klebefolie kann so viel Licht zum Kamerasensor gelangen, dass es an den Stellen zur Überstrahlung und somit zur Sättigung des Kamerasensors kommt. Obwohl die

Polarisation geändert wird, kann trotzdem eine Intensitätsverringering innerhalb des Sensorfeldes festgestellt werden, während die Intensität außerhalb des Sensorfeldes nur systembedingt verändert wird.



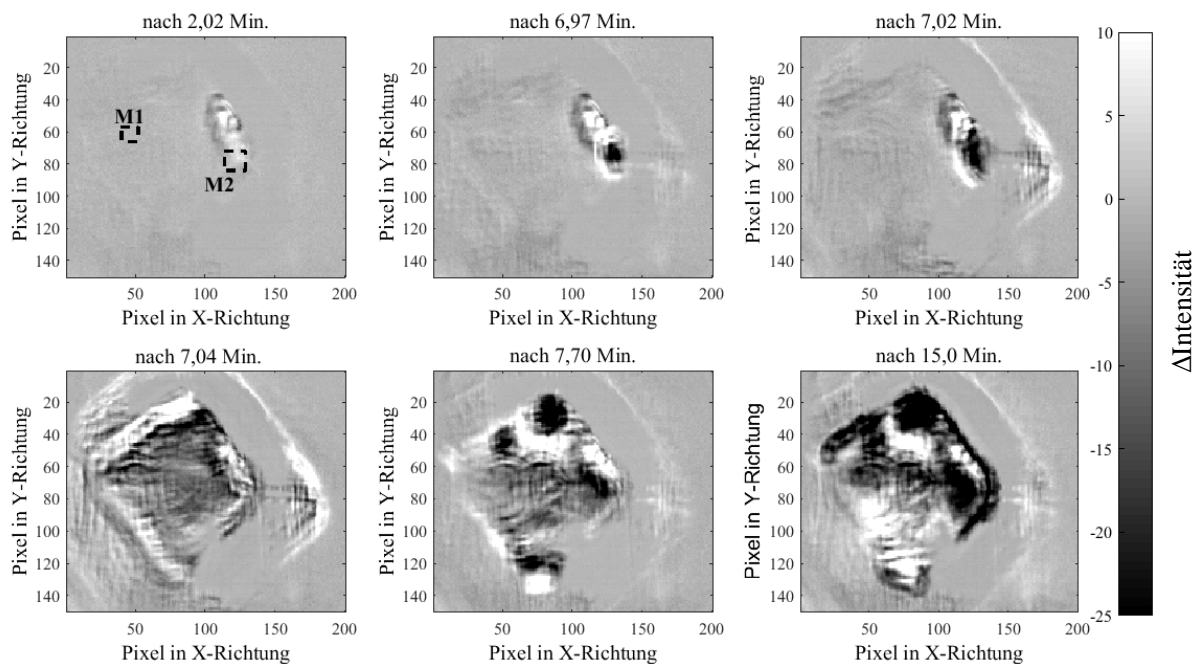
**Abbildung 6.5:** Foto des Messaufbaus für eine Brechungsindexmessung mit dem Testchip und dem Kamera-basierten Messgerät.



**Abbildung 6.6:** a) Bild des Sensorfelds. Die Messfelder M1 und M2 sind mit gestrichelten Linien markiert. b) Mittlere Intensitätswerte innerhalb der Messfelder für jedes Bild berechnet und gegenüber der Zeit aufgetragen.

Im Vergleich zu Brechungsindexmessungen mit der Fluidzelle ändert sich hier die Intensität nicht sprunghaft, sondern scheint eine gewisse Einschwingzeit von ca. 3 Minuten beim Einspritzen von Isopropanol zu benötigen. Als nächstes wurden zur genaueren Untersuchung dieses Verhaltens alle aufgenommenen Bilder von dem ersten Bild abgezogen und in einem Video abgespielt. Beispielhaft sind für gewisse Zeitpunkte diese Differenzbilder in Abbildung 6.7 dargestellt. In diesem Video und auch in dem Differenzbild nach 2,02

Minuten sind Intensitätsänderungen, noch bevor die Injektion von Isopropanol stattfindet, im Bereich des Messfelds M2 zu sehen. Diese könnten durch mechanische Deformationen zu Stande gekommen sein. Das Isopropanol wird dann ab Minute 6,97 durch den Zulaufkanal in das Sensorfeld geleitet. Abbildung 6.7 demonstriert, dass bereits ab Minute 7,04 (14 Sekunden nach Isopropanol-Injektion) eine Brechungsindexänderung über den gesamten Sensor erfolgt ist. Für weitere 40 Sekunden verursachen Strömungen in der Sensorkammer weitere Intensitätsschwankungen im Differenzbild bis nach ca. 1 Minute ein stabiler Zustand in der rechten oberen Ecke des Sensorfeldes erreicht ist. Die Differenzbilder nach Minute 7,70 und 15,0 sind in dieser Region sehr ähnlich. Im unteren linken Teil hingegen sind weitere Intensitätsschwankungen zu erkennen, die augenscheinlich durch Luftblasen entstehen. Zieht man jedes Differenzbild von dem davor liegenden Differenzbild ab, sind deutlich aufsteigende Luftblasen in der unteren Ecke der Kammer zu sehen. Allem Anschein nach wird die Klebefolie zur Sensorfixierung und somit zur Testchipabdichtung durch das Isopropanol angegriffen, was zu den beobachteten Undichtigkeiten führt. Deshalb muss für zukünftige Experimente auf Glycerin oder andere Flüssigkeiten mit bekanntem Brechungsindex zurückgegriffen werden.

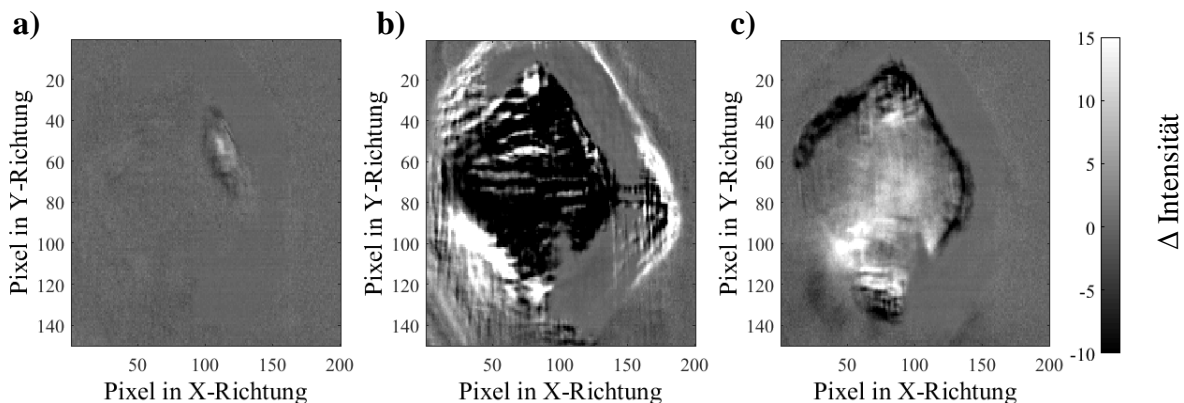


**Abbildung 6.7:** Beispiel von Differenzbildern für bestimmte Zeitpunkte bei der Brechungsindexmessung mit Wasser und Isopropanol.



Die Differenzbilder in Abbildung 6.8 zeigen erneut einen schnellen Intensitätswechsel bei der Injektion von Isopropanol. Allerdings sind nur sehr geringe Änderung bzw. Schwankungen vor und nach der Injektion in der Sensorkammer zu verzeichnen. Die Intensitätsverringerungen in der oberen Ecke der Sensorkammer stammen von Luftansammlungen, die von den bereits erwähnten Luftblasen stammen (Abbildung 6.8c).

Unter der Berücksichtigung, dass es sich um eine reine Isopropanollösung handelt und dadurch eigentlich eine entsprechend homogene Brechungsindexänderung bzw. Intensitätsänderung über den gesamten Sensor zu erwarten wäre, ist in diesem Experiment entgegen den Erwartungen eine sehr inhomogene Intensitätsänderung bei der Betrachtung des Differenzbildes in Abbildung 6.7 bei Minute 15 zu beobachten. Aufgrund des dünnen Chip-Deckels und dem 2 mm dünnen Gesamtchip ist diese Inhomogenität auf mechanische Deformationen zurückzuführen. Diese eben beschriebenen Eigenschaften sind für einen bildgebenden Biosensor von großem Nachteil und könnten durch einen stabileren Mikrofluidik-Chip unterbunden werden. Nichtsdestotrotz wurden im nächsten Kapitel Bindungsexperimente in Puffer und in Blut durchgeführt.



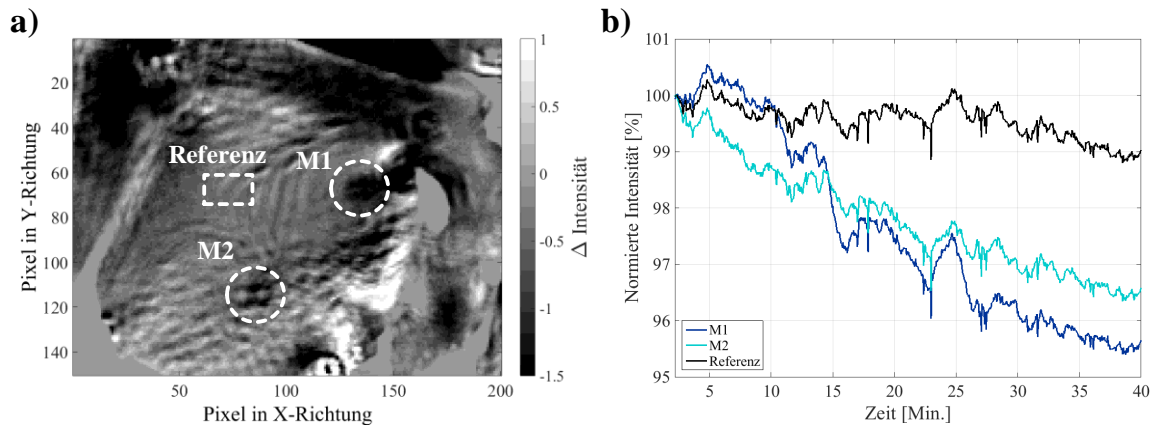
**Abbildung 6.8:** Differenzbilder zwischen verschiedenen Zeitpunkten. a) Bild bei Minute 4,8 minus das Bild bei Minute 2,23. Es befindet sich nur Wasser in der Sensorkammer. b) Bild bei Minute 7,20 minus das Bild bei Minute 6,74. Injektion des Isopropanols. c) Bild bei Minute 13,32 minus das Bild bei Minute 10,55. Es befindet sich nur Isopropanol in der Sensorkammer.

## 6.3. Detektion von Biotin

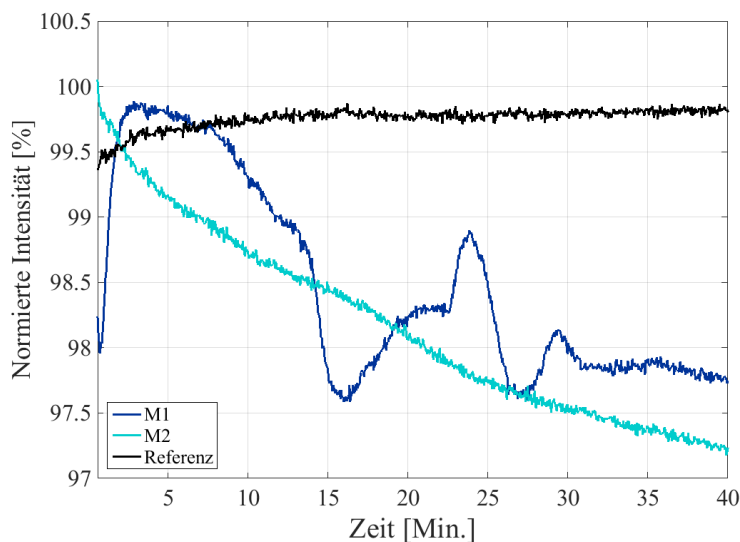
Hier werden nun Bindungsexperimente mit dem Bindungskomplex Streptavidin-Biotin zur Evaluierung des Testchips für die markerfreie Biosensorik verwendet. Da Biotin, auch bekannt als Vitamin B<sub>7</sub> oder Vitamin H, bereits natürlich im menschlichen Blut vorkommt, wird zunächst tropfenweise biotinyliertes Bovine Serum Albumin (BSA-Biotin) auf die

Oberfläche des photonischen Kristall immobilisiert und dann daran Streptavidin gebunden, beides jeweils in einer Konzentration von 1,00  $\mu\text{M}$ . Der funktionalisierte photonische Kristall wird dann in die Aussparung geklebt und die Protein-Puffer-Lösung (500 nM BSA-Biotin in DPBS) mit einer Pipette in den Testchip gefüllt. Sofort nachdem die Lösung die Sensorkammer erreicht, werden der Testchip in das Messgerät geschoben und für 40 Minuten Bilder von der Sensorkammer aufgenommen.

Neben den bereits bekannten Intensitätsschwankungen sind aber auch Intensitätsreduzierungen an den zwei Positionen, an denen das Streptavidin gebunden wurde, zu sehen (Abbildung 6.9a). Wird zuerst der Mittelwert aller Intensitäten der Pixel innerhalb der Messfelder M1 und M2 und dem Referenzwert berechnet und diese Werte dann auf den ersten Wert normiert, sinken die Intensitätssignale für M1 und M2 ab, während das Referenzsignal nahezu auf dem gleichen Ausgangsniveau bleibt (Abbildung 6.9b). Allerdings ähneln die Signalverläufe keinen typischen Assoziationskurven. Für Abbildung 6.10 wurde deshalb der Driftkompensationsalgorithmus aus Kapitel 5.1.3 auf die Mess- und Referenzfelder angewendet. Der Intensitätsverlauf von Messfeld M2 weist nun die typischen Anbindungscharakteristika auf und die Anbindung der 500 nM Biotin verursachen eine Intensitätsreduzierung von  $\Delta I = -2,67\%$ . Das Messfeld M2 hingegen besitzt nun mehr Schwankungen als vorher. Dies könnte mit der Lage des Messfelds direkt vor dem Zulaufkanal begründet sein. Wie im vorherigen Kapitel festgestellt wurde, kann es speziell in diesem Bereich zu mechanischen Deformationen und somit zu unerwünschten Intensitätsschwankungen kommen. Dieser Eindruck wird bei der Betrachtung des Videos für diese Messung bestätigt. Zudem zeigt der Signalverlauf des Referenzfeldes diese Schwankungen nicht, was wiederum auf ein lokales Phänomen hindeutet.



**Abbildung 6.9:** a) Differenzbild des Sensorfeldes zwischen dem ersten und dem letzten aufgenommenen Bild mit den Messfeldern M1 und M2 und dem Referenzfeld markiert mit gestrichelten Linien. b) Gemittelte Intensität über die Pixel innerhalb der einzelnen Mess- und Referenzfelder aufgetragen über die Zeit.



**Abbildung 6.10:** Hintergrundbereinigte Intensitätsverläufe nach der Anwendung des Algorithmus aus Kapitel 5.1.3.

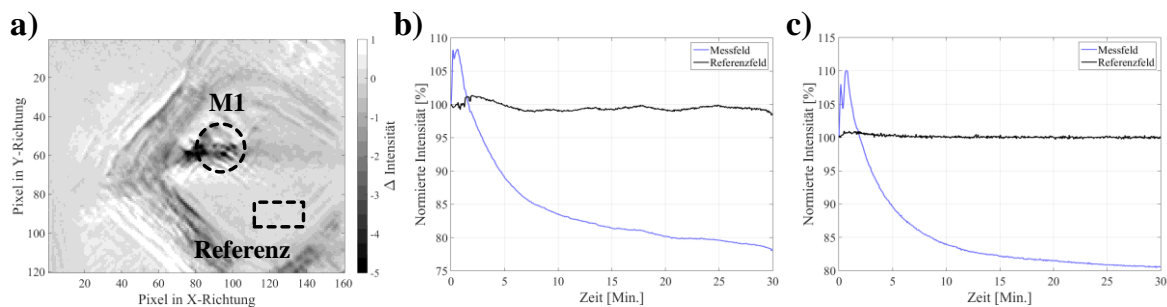
Abschließend wurde dieses Experiment mit menschlichem Blut<sup>21</sup> wiederholt. Dafür wurde der photonische Kristall mit Streptavidin dieses Mal an nur einer Position funktionalisiert und in den Testchip geklebt. Das Blut wird mit 500 nM reinem Biotin (nicht BSA-Biotin) versetzt. Dann wird unter einer sterilen Bank das Blut in den Testchip gegeben und durch den Filter gepresst. Sofort nachdem die Sensorkammer mit dem Blutplasma gefüllt ist, wird der Testchip in das Messgerät geschoben. Hier betrug die Messdauer 30 Minuten.

<sup>21</sup> Diese Experimente wurden in dem Biolabor des Helmholtz-Zentrums des Uniklinikums München in Zusammenarbeit mit den dort ansässigen Kollegen durchgeführt.

In Abbildung 6.11 ist sowohl das Differenzbild (a) als auch die gemittelte Intensität aus den Rohdaten (b) sowie die mit dem Algorithmus hintergrundbereinigte Intensität (c) zu sehen. Bei diesem Experiment sind diesmal keine großen systembedingten Intensitätsschwankungen zu beobachten. Selbst in den Rohdaten sind anbindungstypische Verläufe zu sehen. Die Intensität des Messfelds steigt zwar zu Beginn der Messung an, was aber durch das Nachfließen des Blutserums zu erklären ist. Diesmal befindet sich der Zulaufkanal auf der linken Bildseite und deshalb in der unmittelbaren Nähe zum Messfeld. Sogar das Referenzfeld zeigt nur leichte Intensitätsschwankungen, welche durch den Algorithmus komplett bereinigt werden können. Insgesamt sinkt die Intensität bei den Rohdaten auf  $I_{roh} = 78,35\%$  und bei den bereinigten Daten auf  $I_{algo.} = 80,68\%$  ab.

Diese Werte liegen deutlich über den Werten, die bei der Detektion in Puffer gemessen wurden. Dies könnte mit dem im Blut bereits vorliegenden Biotin erklärt werden, so dass deutlich mehr als 500 nM Biotin in der Blutprobe enthalten sein könnten.

Aufgrund der dargelegten Eigenschaften des Testchips konnte die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse nicht verifiziert werden.



**Abbildung 6.11:** a) Differenzbild zwischen dem ersten und letzten Bild bei der Biotindetektion in Blut mit dem Testchip. b) Gemittelte Rohintensität über die Pixel innerhalb des Mess- und Referenzfeldes aufgetragen über die Zeit. c) Hintergrundbereinigte Intensitätsverläufe nach der Anwendung des Algorithmus aus Kapitel 5.1.3.

## 6.4. Zusammenfassung

Es wurde ein Testchip für die markerfreie Detektion von Proteinen in Blut design und in Kooperation mit der Firma *Microfluidic ChipShop GmbH* entwickelt. Mit diesem Chip konnte mit Heparin versetztes Blut so gefiltert werden, dass die roten Blutkörperchen in der Filtermembran verbleiben und nur das Blutplasma zum Sensorfeld geleitet wird. Fluoreszenzmessungen haben ergeben, dass Polymerpartikel größer als 3  $\mu\text{m}$  vom Filter zurückgehalten werden. Mit Hilfe des Kamera-basierten Messgeräts und einem photonischen

Kristall, der in den Testchip geklebt ist, wurde das Strömungsverhalten innerhalb der Sensorkammer untersucht. Durch die Erhöhung des Brechungsindex über die gesamte Sensoroberfläche konnten systembedingte Intensitätsschwankungen festgestellt werden, die zum einen durch mechanische Deformationen des Testchips und zum anderen durch die nicht ausreichende Klebekraft der Klebefolie zur Sensorfixierung und Chipabdichtung hervorgerufen werden. Trotz dieser inhomogenen Intensitätsverteilung über den Sensorbereich wurde bei diesen Messungen ein Detektionslimit von  $LOD = 7,3 \cdot 10^{-4}$  RIU erreicht. Zusätzlich wurde mit diesem Testchip die lokale Anbindung von 500 nM Biotin in Pufferlösung an zwei Bindungspositionen, allerdings mit hohem Signalrauschen, nachgewiesen. Ein Bindungsexperiment mit 500 nM Biotin in Blut lieferte, den Erwartungen zum Trotz, deutliche Signalverläufe mit wenig Hintergrundrauschen. Obwohl die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse nicht untersucht werden konnte, ist es möglich, mit dieser Technologieplattform einen Wegwerftestchip zur markerfreien und parallelen Detektion von mehreren Proteinen im Blut zu realisieren.



# Kapitel 7

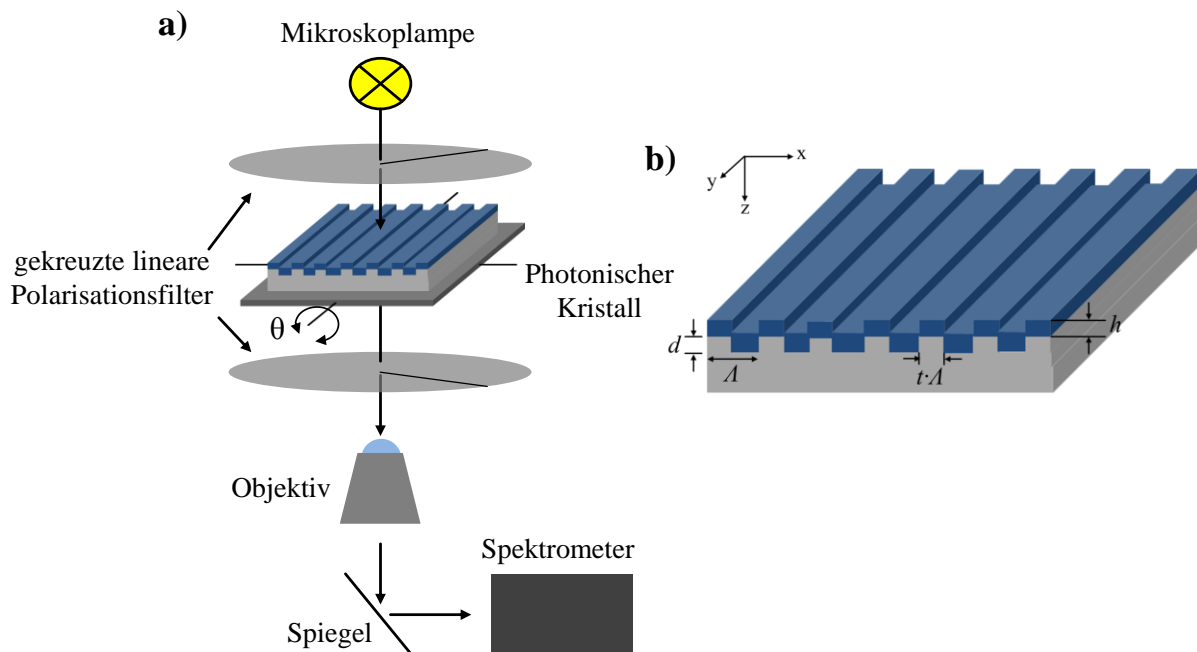
## Fluoreszenzverstärkung mittels nanostrukturierter Wellenleiter

---

### Zusammenfassung

*In diesem Kapitel werden zunächst monoperiodische Gitterstrukturen in nanostrukturierten Wellenleitern zur Steigerung der Anregeeffizienz von Fluorophoren theoretisch und experimentell betrachtet. Der Einfluss von Wellenleiterschichtdicke und Tastverhältnis auf die Lichtenergie an der Oberfläche wird untersucht und mit der eines Glassubstrats verglichen. Durch die Abstimmung der  $TE_0$ -Resonanz eines monoperiodischen, photonischen Kristalls auf das Absorptionsspektrum wurde die Lumineszenz von Titandioxid um das 1,65-fache im Vergleich zu einer unstrukturierten Oberfläche gesteigert. Um sowohl die Anregungs- als auch die Emmissionseffizienz zu steigern, werden zudem zweiperiodische Gitterstrukturen theoretisch untersucht. Auch bei diesen Strukturen werden die Wellenleiterschichtdicke und die Tastverhältnisse der überlagerten Perioden variiert, um möglichst viel Lichtenergie an der Oberfläche zu erzeugen.*

Wie in Kapitel 2.4.2. beschrieben, kann die Intensität der Fluoreszenzemission durch photonische Kristalle deutlich verstärkt werden. In diesem Kapitel werden mono- und zweiperiodische Gitterstrukturen in nanostrukturierten Wellenleitern so designt, dass möglichst viel Licht als evaneszente Welle an der Oberfläche geführt wird. Je mehr Lichtenergie sich an der Oberfläche befindet, desto besser kann der Fluorophor diese Energie aufnehmen und strahlend wieder abgeben. Neben einer möglichst hohen Energie an der Oberfläche ist auch die spektrale Abstimmung zwischen Resonanzposition des photonischen Kristalls und Absorptionsmaximum des Fluorophors für eine effiziente Anregung des Farbstoffs entscheidend. Für die spektrale Charakterisierung werden die hergestellten photonischen Kristalle, wie in Abbildung 7.1 schematisch dargestellt, in den Mikroskopaufbau platziert, welcher auch in Kapitel 4 verwendet wurde.



**Abbildung 7.1:** a) Schematische Darstellung des Spektrometersaufbaus zur Charakterisierung der nanostrukturierten Wellenleiter. Durch die Positionierung des Kristalls zwischen zwei gekreuzte Polarisationsfilter wird nahezu das gesamte Anregungslicht der Mikroskoplampe geblockt und nur das Licht der Resonanzen wird über das Mikroskopobjektiv zum Spektrometer geleitet. b) Schematische Darstellung eines monoperiodischen Gitters mit einer Übersicht aller untersuchten Designparameter ( $t$ = Tastverhältnis,  $\Lambda$ = Gitterperiode,  $d$ = Gittertiefe,  $h$ = Dicke der Wellenleiterschicht).



## 7.1. Monoperiodische Gitterstrukturen

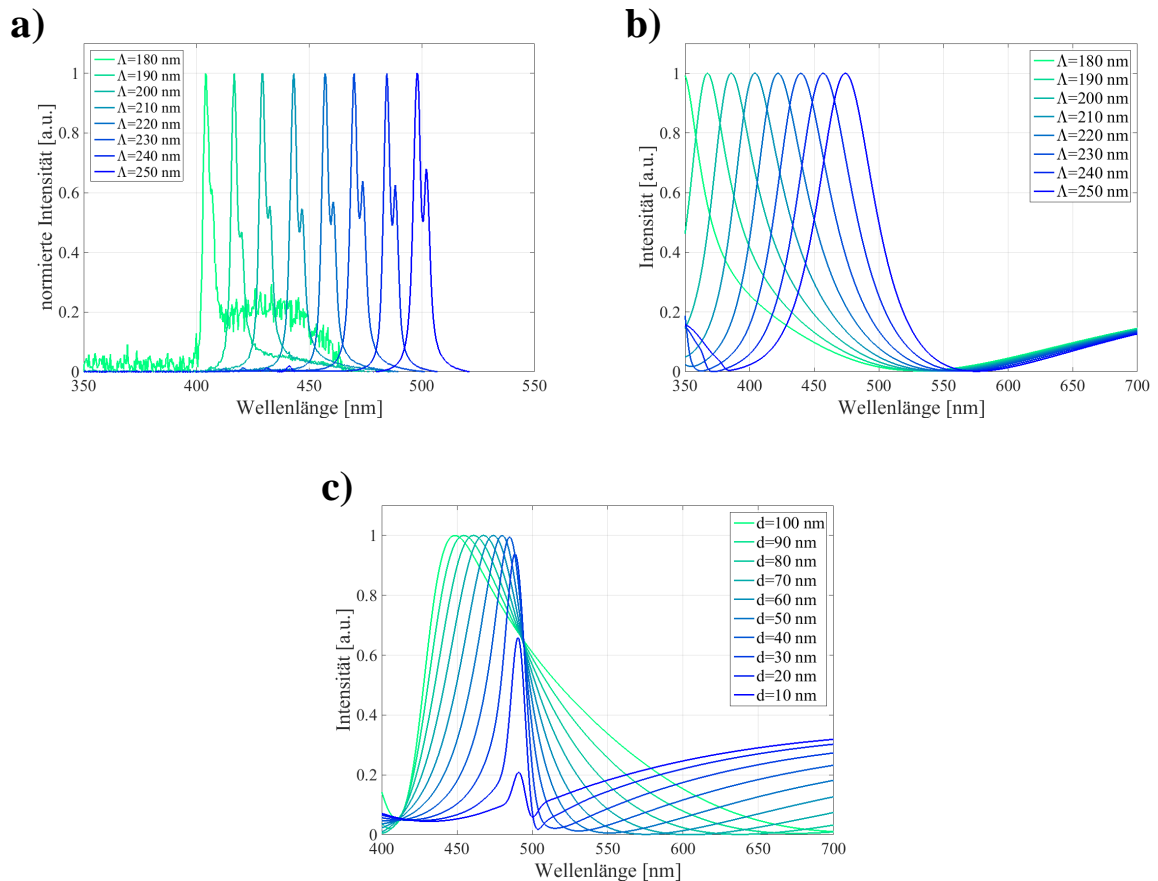
Es werden in diesem Kapitel verschiedene Designparameter monoperiodischer Gitterstrukturen simulativ<sup>22</sup> und experimentell zur Steigerung der Anregungseffizienz von Fluoreszenzfarbstoffen untersucht.

Viele Farbstoffe werden im blauen Spektralbereich angeregt. Zur Identifizierung, welcher Wellenlängenbereich allein über die Veränderung der Gitterperiode erzielt werden kann, wird zunächst die Gitterperiode von 180 nm bis 250 nm bei einem Tastverhältnis von  $t = 0,7$ , einer Schichtdicke des Titandioxids ( $\text{TiO}_2$ ,  $n_{\text{TiO}_2} = 2,44$ ) von  $h = 85$  nm und einer Gittertiefe von  $d = 60$  nm variiert. Abbildung 7.2 zeigt die simulierten und experimentell ermittelten Transmissionsspektren für die unterschiedlichen Gitterperioden. Die experimentellen Spektren wurden zusätzlich durch das Spektrum der Mikroskoplampe und auf ihre Intensitätsmaxima normiert. Die Mikroskoplampe besitzt im blauen Spektralbereich vergleichsweise wenig Intensität. Zusätzlich nimmt die Lampenintensität linear mit der Wellenlänge zu, weshalb alle aufgenommenen Spektren durch das Lampenspektrum normiert werden. Der Einfluss der Lampe auf die Resonanzform wird dadurch bis zu einem gewissen Grad herausgerechnet. Wie man an dem Spektrum für das Gitter mit einer Periode von  $\Lambda = 180$  nm sieht, ist das Signal sehr verrauscht.

Vergleicht man die Resonanzpositionen der simulierten und gemessenen Spektren, unterscheiden sich die Positionen um 24 nm. Auch besitzen die experimentellen Resonanzen eine deutlich bessere Güte. Dies spricht dafür, dass die Strukturtiefe des abgeformten Gitters im Vergleich zur Masterstruktur ( $d = 60$  nm) flacher ist. Betrachtet man die simulierten Resonanzspektren für verschiedene Gittertiefen in Abbildung 7.2c verändert sich nicht nur die Resonanzposition sondern auch die Resonanzgüte, was auf eine geringere Gittertiefe schließen lässt. Nichtsdestotrotz wird die Resonanzposition in beiden Fällen um  $\Delta\lambda = 97$  nm verschoben, wodurch das Verhalten der simulierten photonischen Kristalle bedingt durch Änderungen der Nanostruktur auf die hergestellten Proben übertragen werden kann.

---

<sup>22</sup> Mit dem aus Kapitel 4.1. bekannten Simulationsmodell durchgeführt.

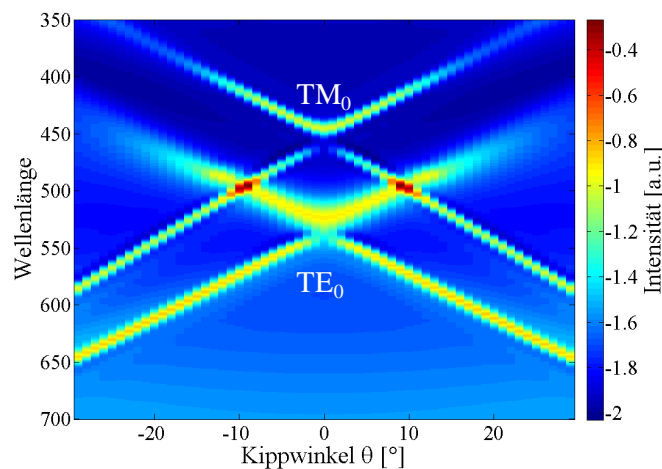


**Abbildung 7.2:** (a) experimentelle und (b) simulierte Spektren der TE-Resonanz für verschiedene Gitterperioden  $\Lambda = [180 \text{ nm}, \dots, 250 \text{ nm}]$  ( $t = 0,3$ ,  $d = 60 \text{ nm}$ ,  $h = 85 \text{ nm}$ ,  $n = 2,44$ ). c) TE-Resonanzspektren eines photonischen Kristall mit einer Gitterperiode von  $\Lambda = 250 \text{ nm}$  für unterschiedliche Gittertiefen  $d = [10 \text{ nm}, \dots, 100 \text{ nm}]$  ( $h = 85 \text{ nm}$ ,  $n = 2,44$ ).

Als weitere Diskrepanz zwischen Simulation und Experiment sind die unterschiedlichen Resonanzformen zu nennen. Während die Simulation eine Resonanz zeigt, die eher einer Lorentz-Kurve ähnelt, sind bei der gemessenen Resonanz Doppelpicks im Transmissionsspektrum zu sehen<sup>23</sup>. Nach Barnes et al. [144] handelt es sich bei den Doppelpeaks, um Moden an den Rändern der photonischen Bandlücke (Bandkanten-Moden, engl. *band-edge modes*). Die photonische Bandlücke befindet sich somit in der Mitte der beiden Peaks. Aus Kapitel 2.2. haben wir gelernt, dass sich in photonischen Bandlücken keine Wellenlängen ausbreiten können. Weil in den Simulationen mit einer ebenen Welle in perfekt  $\theta = 0^\circ$  eingestrahlt wird und die Strukturen ideal um  $90^\circ$  abfallende Flanken besitzen, zeigen die Simulationsergebnisse dieses Verhalten nicht.

<sup>23</sup> Dies konnte bereits in früheren Kapiteln beobachtet werden.

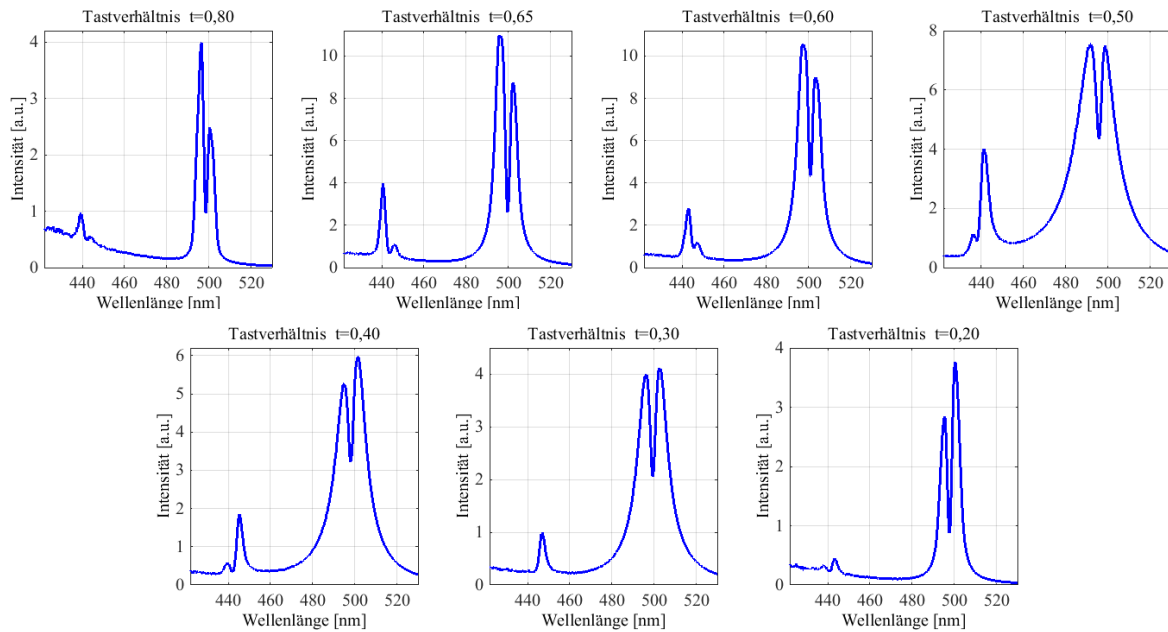
Die zwei Bandkanten-Moden sind nach Barnes et al. erst im Spektrum zu sehen, wenn entweder ein Tastverhältnis von  $t = 0,5$  vorliegt und die Gittertiefe einen bestimmten Wert überschreitet oder die Struktur ein Tastverhältnis von  $t \neq 0,5$  besitzt und Winkelanteile durch z.B. schräge Einstrahlung oder schräge Strukturflanken auftreten. Liegen wie bei der Simulation ein Tastverhältnis von  $t \neq 0,5$  und ideale Verhältnisse vor, prägt sich nur eine Bandkanten-Mode aus. Durch den Charakterisierungsaufbau, speziell durch die Lochblende vor der Mikroskoplampe, besitzt das Anregungslicht gewisse Winkelanteile, die dann diese Resonanzform verursachen. Zur Verifizierung dieser Aussage wurde in den Simulationen der Abstrahlwinkel der Anregungsquelle in  $1^\circ$ -Schritten von  $-30^\circ$  bis  $+30^\circ$  geändert. In Abbildung 7.3 sind die daraus resultierenden  $TE_0$ - und  $TM_0$ -Resonanzen gegenüber der Wellenlänge auf der Y-Achse und des Anregewinkels ( $\theta$ ) auf der X-Achse abgebildet. Die Falschfarben geben die Intensität der Resonanzen wieder. Die Resonanzbänder der Bandkanten-Moden und die photonische Bandlücke sind für TE- und TM-Polarisation deutlich zu erkennen. Auch ist eine Aufspaltung der Resonanz und somit die Entstehung dieser Doppelpeaks schon für einen Winkel von  $\pm 1^\circ$  zu beobachten. Des Weiteren bildet sich für die hier simulierte Struktur bei  $0^\circ$  Einfallswinkel nur die obere Bandkanten-Mode aus.



**Abbildung 7.3:**  $TE_0$ - und  $TM_0$ -Resonanzen eines monoperiodischen Gitters ( $\Lambda = 250 \text{ nm}$ ,  $d = 60 \text{ nm}$ ,  $t = 0,8$ ,  $90 \text{ nm TiO}_2$ ) gegenüber der Wellenlänge und des Anrege- bzw. Kippwinkels  $\theta$  aufgetragen. Die Resonanzintensitäten werden durch die Falschfarben wiedergegeben.

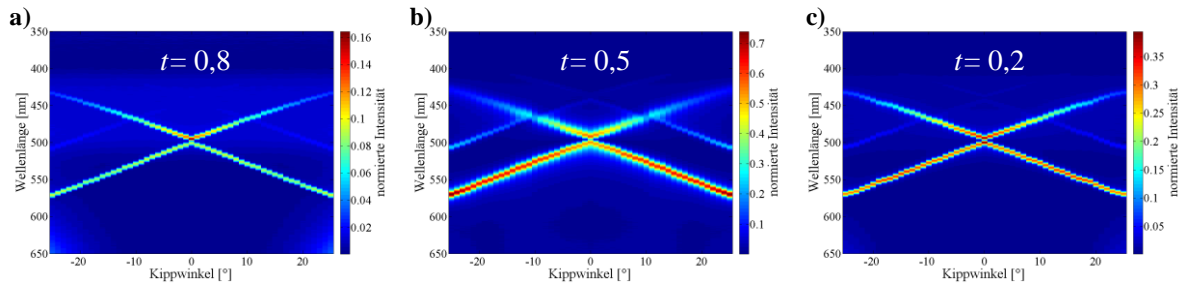
Welche der beiden Bandkantenmoden sich ausprägen und wie viel Intensität sie besitzt, kann über das Tastverhältnis eingestellt werden. Die Transmissionsspektren der einzelnen photonischen Kristalle in Abbildung 7.4 zeigen deutlich, dass bei hohem Tastverhältnis ( $t > 0,5$ ) die linke Bandkanten-Mode der  $TE_0$ - Mode eine höhere Intensität besitzt. Bei einem

Tastverhältnis von  $t = 0,5$  ist das Intensitätsverhältnis der Moden hingegen ausgeglichen, während bei einem Tastverhältnis von  $t < 0,5$  die Intensität der rechten Bandkanten-Mode stärker ist. Für die  $TM_0$ -Mode kann dieses Verhalten in diesem Experiment nicht beobachtet werden. Allerdings ist die Intensität der  $TM_0$ -Mode bei einem Tastverhältnis von  $t = 0,5$  maximal.



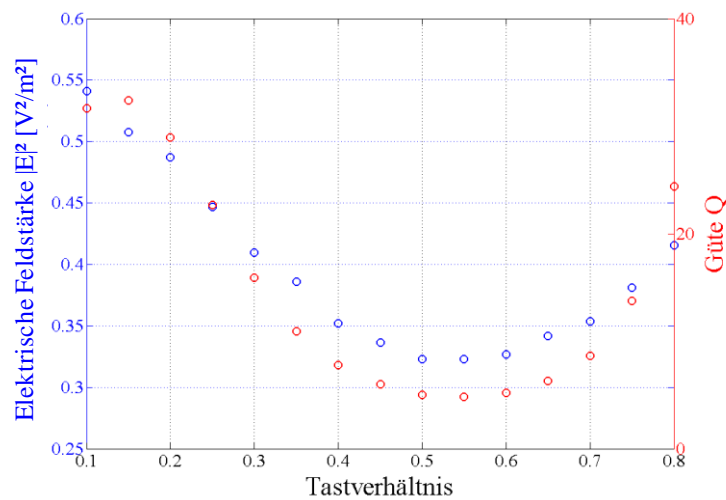
**Abbildung 7.4:** Resonanzspektren hergestellter, monoperiodischer Gitter mit gleicher Gitterperiode  $\Lambda = 250$  nm und variierendem Tastgrad  $0,2 \leq t \leq 0,8$ .

Betrachtet man die Spektren bei unterschiedlichen Kippwinkeln, sind im Experiment die beiden Bandkanten-Moden und die Bandlücke deutlich zu erkennen. Sie zeigen zudem, dass die Resonanzen der Bandkanten-Moden je nach Tastverhältnis unterschiedliche Intensitäten besitzen.



**Abbildung 7.5:** Experimentell ermittelte Spektren photonischer Kristalle ( $\Lambda = 250 \text{ nm}$ ,  $h = 85 \text{ nm}$   $\text{TiO}_2$  ( $n_{\text{TiO}_2} = 2,44$ ),  $d = 60 \text{ nm}$ ) in Abhängigkeit der Wellenlänge und des Kippwinkels  $\theta$  mit einem Tastverhältnis von (a)  $t = 0,8$ , (b)  $t = 0,5$  und (c)  $t = 0,2$ .

Außerdem erzeugt die Struktur mit  $t = 0,5$  die breiteste Resonanz, während für  $0,2 < t < 0,8$  deutlich schmalere Resonanzen und somit bessere Güten entstehen. Für die resonante Anregung ist die Lichtenergie an der Oberfläche entscheidend, welche laut Ganesh et al. [117] durch die Resonanzgüte wiedergespiegelt wird. Zur Validierung dieser Aussage wird die elektrische Feldstärke an der Oberfläche, wie in Kapitel 4.3.1. beschrieben, und die Güte der  $\text{TE}_0$ -Mode anhand der Simulationsergebnisse jeder Struktur berechnet und gegenüber dem Tastverhältnis aufgetragen (Abbildung 7.6).



**Abbildung 7.6:** Elektrische Feldstärke  $|\bar{\mathbf{E}}|^2$  und die Güte  $Q$  der simulierten  $\text{TE}_0$ -Resonanz aufgetragen über das Tastverhältnis für ein Gitter mit  $\Lambda = 200 \text{ nm}$ ,  $d = 60 \text{ nm}$ ,  $h = 85 \text{ nm}$ .

Wie Abbildung 7.6 demonstriert, stimmen die Verläufe der Güte und der elektrischen Feldstärke für TE-Polarisation gut überein. Deshalb wird für folgende Betrachtungen die

elektrische Feldstärke an der Oberfläche berechnet und als Vergleichsgröße zwischen den verschiedenen Nanostrukturen angegeben.

Außerdem zeigt diese Abbildung, dass die Struktur mit einem Tastverhältnis von  $t = 0,1$  die größte elektrische Feldstärke an der Oberfläche besitzt. Folglich sollte dieses Tastverhältnis für eine resonante Anregung gewählt werden. Allerdings lassen sich Strukturen mit solchen geringen Stegbreiten nur schwer abformen, weswegen für die folgenden Simulationen ein Tastverhältnis von  $t = 0,3$  gewählt wurde.

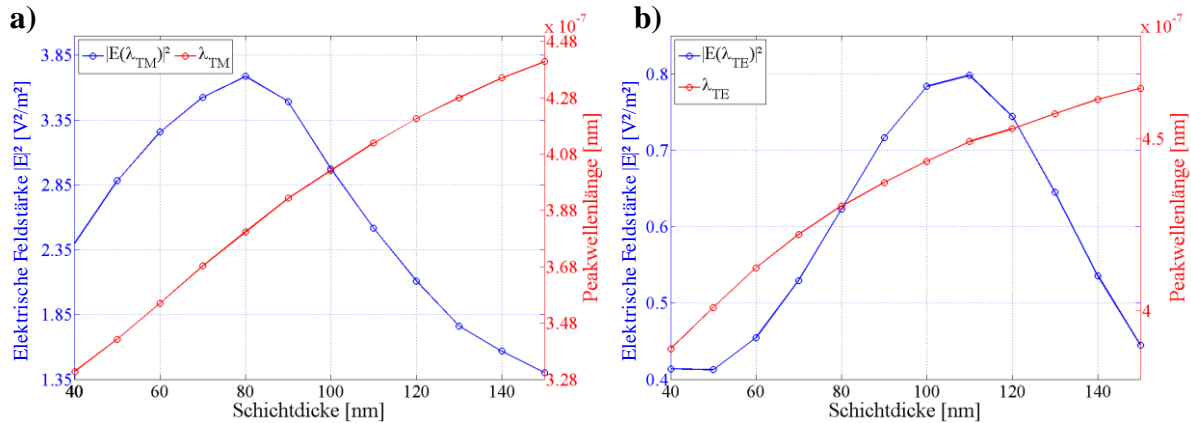
### **Variation der Wellenleiterschichtdicke**

Die Untersuchung der Gittertiefe zur Steigerung der Anregungseffizienz wurde ausführlich von Chaudhery et al. [118] dokumentiert. Hier wurde eine Gittertiefe von  $d = 15$  nm als optimal identifiziert. Um die Simulationsergebnisse mit den experimentellen Ergebnissen vergleichen zu können, wurde allerdings in dieser Arbeit für jedes Gitter eine Tiefe von  $d = 60$  nm vorausgesetzt.

Die Einflüsse der Wellenleiterschicht auf die elektrische Feldstärke werden zunächst analysiert, indem die Schichtdicke von  $h = 40$  nm stetig in 10 nm Schritten auf  $h = 150$  nm erhöht wird<sup>24</sup>. In Abbildung 7.7 sind sowohl die resultierende elektrische Feldstärke als auch die Peakwellenlänge der Resonanz gegenüber den Schichtdicken für TE- und TM-Polarisation aufgetragen. Während für TM-Polarisation eine Schichtdicke von  $h = 80$  nm gewählt werden sollte, um die elektrische Feldstärke zu maximieren, beträgt die optimale Schichtdicke für die TE-Resonanz  $h = 110$  nm. Auch ist hier eine um das Dreifache höhere Feldstärke für die TM-Resonanz zu beobachten.

---

<sup>24</sup> Hier wurde ein Gitter mit einer Periode  $\Lambda = 200$  nm, einer Gittertiefe von  $d = 80$  nm und einem Tastverhältnis von  $t = 0,7$  nm simuliert.



**Abbildung 7.7:** Elektrische Feldstärke  $|\overline{E}|^2$  und Peakwellenlängen aufgetragen gegenüber der Schichtdicke für (a) TM- und (b) TE- Resonanz. Die Gitterparameter betragen hier  $\Lambda = 200$  nm,  $t = 0,3$ ,  $d = 60$  nm.

Um die Steigerung der Anregungseffizienz abzuschätzen, wurde ein planares Glassubstrat ohne Gitter und ohne Wellenleiterschicht simuliert und die elektrische Feldstärke ( $|\overline{E}_{\text{Glass}}|^2 = 0,794$ ) hierfür berechnet. Der Verstärkungsfaktor ergibt sich somit aus dem Quotienten zwischen den elektrischen Feldstärken des photonischen Kristalls und des Glassubstrates. Für die TM-Resonanz mit einer Schichtdicke von  $h = 80$  nm und einem Tastverhältnis von  $t = 0,3$  ergibt sich daraus eine Verstärkung von 4,6. Das bedeutet, dass die Lichtenergie an der Oberfläche durch die photonischen Kristalle im Vergleich zu einem Glassubstrat 4,6-fach stärker ist und dadurch mehr Energie zur Anregung eines Fluorophors zur Verfügung stünde.

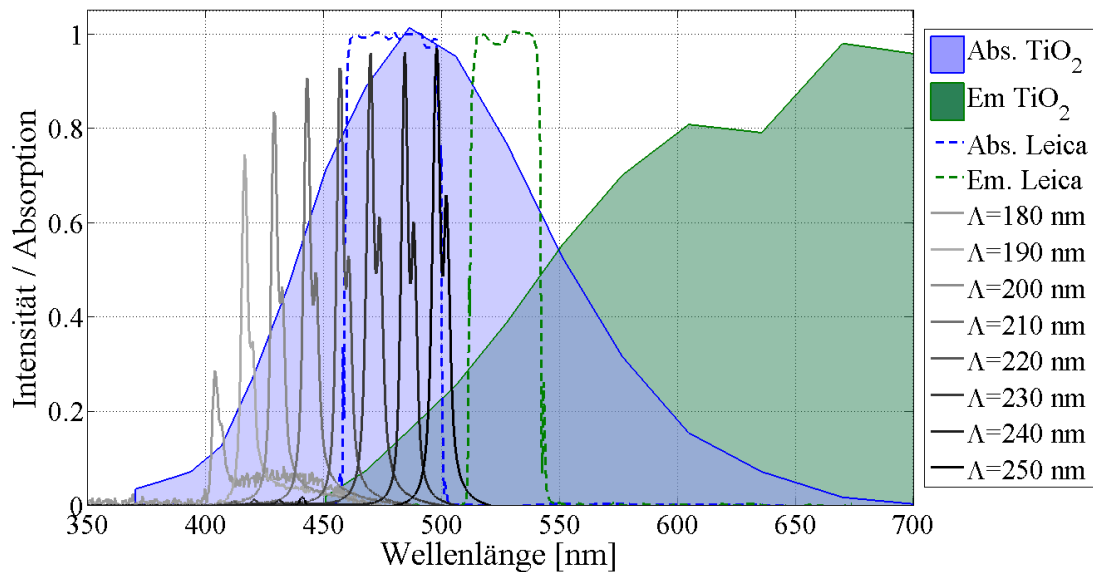
## 7.2. Fluoreszenzverstärkung mittels monoperiodischer Gitterstrukturen

Wie aus der Literatur bekannt, besitzt Titandioxid, was hauptsächlich als Wellenleiternmaterial in dieser Arbeit verwendet wird, selbst lumineszierende Eigenschaften [145], [146]. Für die Spektren in Abbildung 7.8 wurden das Absorptions- aus [146] und Emissionsspektrum aus [145] für  $\text{TiO}_2$  eingelesen und zusammen mit den Transmissionsspektren des Fluoreszenzfilterwürfels (L5 ET, *Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH*) [147] und den einzelnen Resonanzspektren der hergestellten photonischen Kristalle abgebildet (Abbildung 7.8).

Auf einem Substrat befinden sich acht monoperiodische Gitterstrukturen mit unterschiedlichen Perioden ( $\Lambda = [180, \dots, 250]$ ) mit gleicher Gittertiefe ( $d = 65$  nm), gleichem Tastverhältnis ( $t = 0,7$ ) und einer Schichtdicke von  $h = 85$  nm ( $n_{\text{TiO}_2} = 2,44$ ). Die Fläche je

Struktur beträgt  $2 \times 2 \text{ mm}^2$  und die Strukturen sind in einer Matrix von  $3 \times 3$  Strukturen auf dem  $25 \times 25 \text{ mm}^2$  großen Substrat angeordnet.

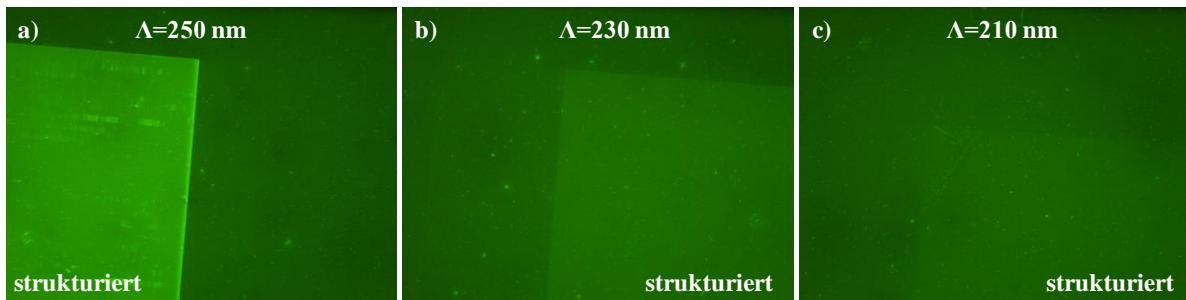
Bei der Betrachtung aller Spektren ist zu sehen, dass die Resonanzen mit den drei größten Gitterperioden zum einen im Bereich des Anregungslichtes (Abs. Leica) und zum anderen im Absorptionsmaximum der  $\text{TiO}_2$ -Schicht liegen. Aus diesem Grund ist für diese Gitter eine Erhöhung der  $\text{TiO}_2$ -Lumineszenz zu erwarten.



**Abbildung 7.8:** Das Absorptions- (Abs.  $\text{TiO}_2$ ) [146] und Emissionsspektrum (Em.  $\text{TiO}_2$ ) [145] von  $\text{TiO}_2$  zusammen mit den Transmissionsspektren des Fluoreszenzfilters (Em. Leica, Abs. Leica) und den Resonanzspektren der photonischen Kristalle, die sich auf einem Substrat befinden.

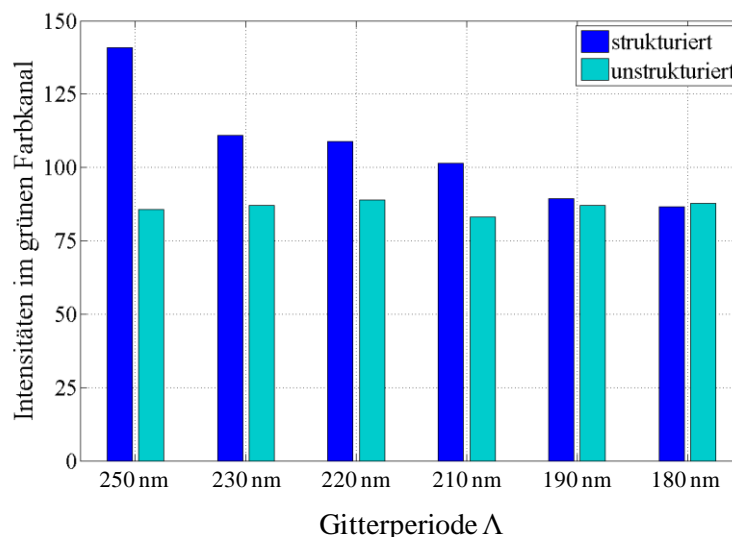
Mit der Kamera (MC170 HD, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) des Fluoreszenzmikroskops (DMi8, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH), in das der Filterwürfel eingebaut ist, wird nun die Lumineszenz für jede einzelne Struktur betrachtet. Als Beispiel sind Lumineszenzbilder vom Übergang zwischen strukturiertem und nicht strukturiertem Bereich von drei verschiedenen Gitterperioden gezeigt (Abbildung 7.9). Eine deutlich stärkere Lumineszenz der  $\text{TiO}_2$ -Schicht ist bereits in diesen Bildern für das Feld mit einer Gitterperiode von  $\lambda = 250 \text{ nm}$  zu erkennen.





**Abbildung 7.9:** Lumineszenzbilder vom Übergang zwischen strukturierten und unstrukturierten Bereich. Die Strukturen besitzen eine Gitterperiode von (a)  $\Lambda = 250 \text{ nm}$ , (b)  $\Lambda = 230 \text{ nm}$  und (c)  $\Lambda = 210 \text{ nm}$ . Es ist eine deutliche Lumineszenzsteigerung des  $\text{TiO}_2$  durch die Gitterstruktur zu verzeichnen.

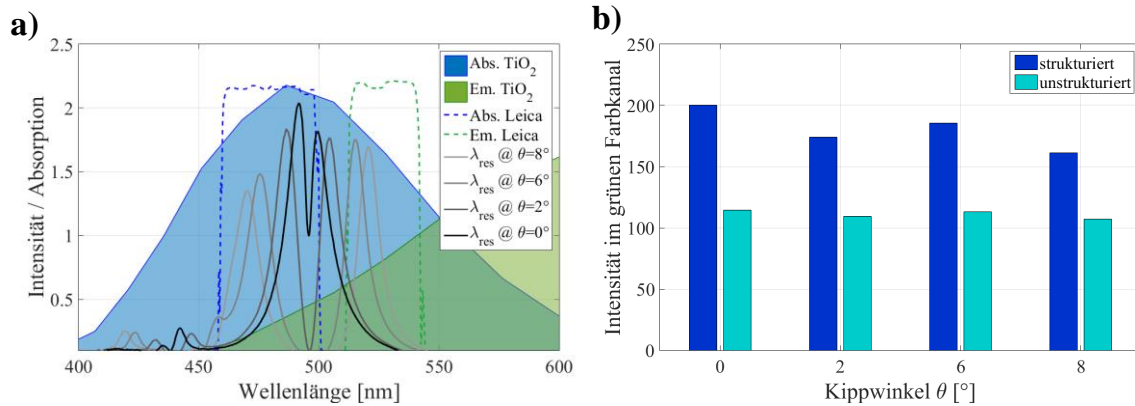
Zur genaueren Charakterisierung wurden für jedes aufgenommene Lumineszenzbild die Intensitäten des grünen Farbkanals extrahiert und der Mittelwert über alle Intensitäten jeweils in den Bereichen mit und ohne Struktur berechnet. Abbildung 7.10 zeigt die resultierenden Intensitätswerte für die verschiedenen Gitterperioden. Die Berechnung der Intensitätswerte auf dem strukturierten und unstrukturierten Bereich bestätigen, dass für  $\Lambda = 250 \text{ nm}$  die größte Verstärkung mit 1,65 erzeugt wird, während mit geringer werdender Gitterperiode die Verstärkung durch den photonischen Kristall entsprechend schwächer wird. Dies demonstriert, dass eine Steigerung der Anregeeffizienz erreicht wurde.



**Abbildung 7.10:** Mittlere Intensitäten aus den Lumineszenzbildern für strukturierte und unstrukturierte Bereiche. Die Intensitätswerte wurden aus dem grünen Farbkanal der Bilder für jede Gitterperiode berechnet.

Aus Kapitel 7.1. haben wir gelernt, dass sich zum einen die Resonanzen der Bandkantenmoden mit Erhöhung des Belichtungswinkels bzw. Kippwinkels auseinander bewegen und zum anderen die Intensität der Resonanzen über das Tastverhältnis eingestellt werden kann. Diese Effekte könnten nun genutzt werden, um sowohl die Anregungs- als auch die Emissionseffizienz eines Fluorophors zu erhöhen, indem ein Kippwinkel eingestellt wird, bei dem die Resonanz der einen Bandkantenmode auf das Absorptionsspektrum und die Resonanz der anderen Bandkantenmode auf das Emissionsspektrum des Fluorophores abgestimmt wird. In Abbildung 7.11a ist zu sehen, dass durch einen Kippwinkel von  $\theta = 8^\circ$  die Resonanzen in den Transmissionspektren des Fluoreszenzfilters liegen. Für  $\theta = 2^\circ$  liegt die Resonanz der einen Bandkantenmode hingegen genau zwischen den beiden Transmissionspektren. Für dieses Experiment wird eine Struktur mit einer Gitterperiode von  $\Lambda = 250$  nm und mit einem Tastverhältnis von  $t = 0,5$  gewählt, damit die beiden Bandkantenmoden nahezu die gleiche Intensität besitzen. Erneut werden Lumineszenzbilder der TiO<sub>2</sub>-Oberfläche für verschiedene Kippwinkel aufgenommen und die Intensitätswerte auf den strukturierten und unstrukturierten Bereichen für jedes Lumineszenzbild berechnet.

Obwohl die Resonanzen bei einem Kippwinkel von  $\theta = 8^\circ$  auf die Transmissionspektren des Fluoreszenzfilters abgestimmt sind, ist hier eine geringere Verstärkung der Lumineszenz als bei einem Kippwinkel von  $\theta = 2^\circ$  zu beobachten (Abbildung 7.11b). Allerdings wird bei genauerer Betrachtung der einzelnen Spektren deutlich, dass sich die Resonanz der linken Bandkantenmode für  $\theta = 8^\circ$  ( $\lambda_{res}(\theta = 8^\circ) = 470$  nm) deutlich neben dem Absorptionsmaximum von TiO<sub>2</sub> befindet und somit das TiO<sub>2</sub> nicht ideal anregt. Die Resonanz für  $\theta = 2^\circ$  ( $\lambda_{res}(\theta = 2^\circ) = 486$  nm) liegt hingegen im Absorptionsmaximum und ermöglicht damit eine deutlich effizientere Anregung, was in einer höheren Lumineszenz resultiert. Die Resonanzen für einen Kippwinkel von  $\theta = 6^\circ$  sind hingegen zum einen auf die Transmissionspektren und zum anderen besser auf das TiO<sub>2</sub> abgestimmt, weswegen bei diesem Kippwinkel eine höhere Lumineszenz zu sehen ist. Jedoch ist diese immer noch schwächer als die resonante Anregung unter  $\theta = 0^\circ$ . Generell kann eine Verstärkung der Lumineszenz durch strukturierte Wellenleiter erzeugt werden, jedoch konnte hier keine weitere Verstärkung durch die Wahl eines geeigneten Kippwinkels erzielt werden.



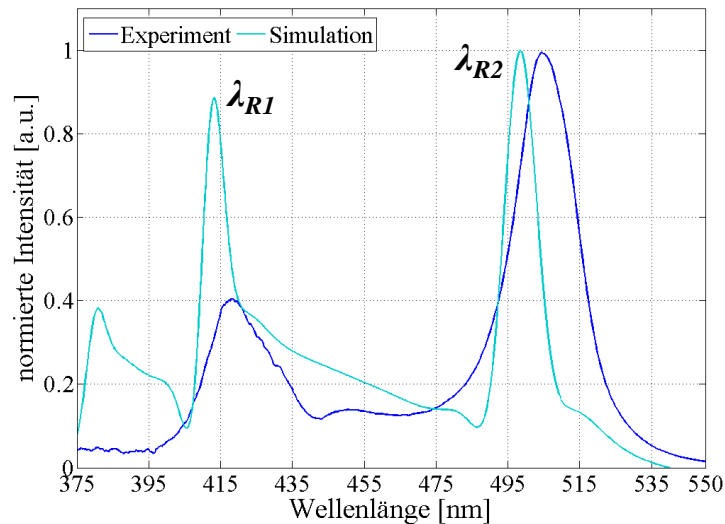
**Abbildung 7.11:** a) Das Absorptions- (Abs.  $\text{TiO}_2$ ) [146] und Emissionsspektrum (Em.  $\text{TiO}_2$ ) [145] von  $\text{TiO}_2$  zusammen mit den Transmissionsspektren des Fluoreszenzfilters (Em. Leica, Abs. Leica) und den Resonanzspektren des photonischen Kristalls ( $\Lambda = 250 \text{ nm}$ ,  $t = 0,5$ ,  $d = 60 \text{ nm}$ ,  $h = 85 \text{ nm}$ ) für unterschiedliche Kippwinkel  $\theta$ . b) Mittlere Intensitäten aus den resultierenden Lumineszenzbildern bei unterschiedlichen Kippwinkeln für strukturierte und unstrukturierte Bereiche.

### 7.3. Multiperiodische Gitterstrukturen

Wie im Kapitel 7.2. dargestellt wurde, ist die Fluoreszenzverstärkung eines Fluorophors mit monoperiodischen Gittern durch resonante Anregung unter  $\theta = 0^\circ$  möglich. Durch Verkippung des Substrats wurde versucht die Resonanzen der Bandkantenmoden auf die Absorptions- und Emissionsspektren von  $\text{TiO}_2$  abzustimmen, um eine weitere Fluoreszenzverstärkung durch sowohl eine resonante Anregung als auch resonante Emission zu ermöglichen. Dafür müssten die Resonanzen gleichzeitig im Absorptions- als auch im Emissionsmaximum liegen. Dies war mit Hilfe des Kippwinkels nicht möglich, so dass keine weitere Verstärkung erzielt werden konnte. Multiperiodische Gitter hingegen sind, wie in Kapitel 2.2.2. vorgestellt, in der Lage mehrere Resonanzen gemäß ihrer Ausgangsgitter auszubilden. Durch Überlagerung von zwei geeigneten monoperiodischen Gittern können zwei Resonanzen erzeugt werden, deren spektrale Position auf das Maximum der Absorption und der Emission eines Fluorophors abgestimmt sind. Abbildung 7.12 zeigt die experimentell ermittelten und simulierten Resonanzen eines zweiperiodischen Gitters mit  $\Lambda_1 = 200 \text{ nm}$ ,  $\Lambda_2 = 250 \text{ nm}$ ,  $t_1 = t_2 = 0,3$  und einer Schichtdicke von  $h = 70 \text{ nm}$ . Simulation (nur TE) und Experiment stimmen bis auf die Intensitäten sehr gut überein. Da in der Simulation mit rein reellen Brechungsindices gerechnet wird, wird die Absorption in den Materialien nicht berücksichtigt, was diesen Unterschied erklärt. Auch ist die ganz linke Resonanz systembedingt nicht im Experiment zu sehen. Wie Kapitel 7.1. bereits erwähnt, besitzt die

Mikroskoplampe in diesem Spektralbereich sehr wenig Intensität. Dies und die Transmissionseigenschaften der Messaufbaukomponenten für so geringe Wellenlängen führen zu einer Unterdrückung dieser Resonanz.

Im Folgenden werden die Resonanzen mit einer niedrigeren Resonanzwellenlänge mit  $\lambda_{R1}$  und Resonanzen mit höheren Resonanzwellenlängen mit  $\lambda_{R2}$  bezeichnet. In den Simulationen treten sowohl zwei TE- als auch zwei TM-Resonanzen auf, die im Experiment nicht immer sichtbar sind.



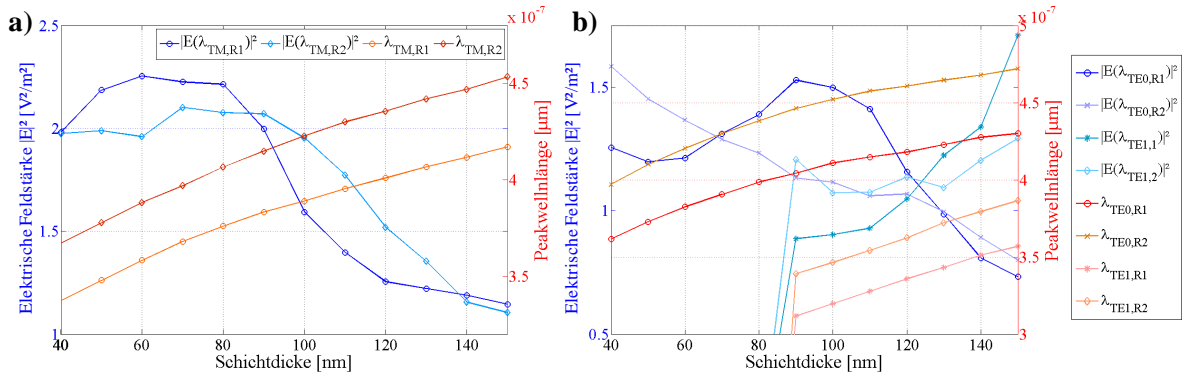
**Abbildung 7.12.:** Simulierte (nur TE) und experimentell ermittelte Resonanzspektren eines zweiperiodischen Gitters mit  $\Lambda_1 = 200 \text{ nm}$ ,  $\Lambda_2 = 250 \text{ nm}$ ,  $t_1 = t_2 = 0,3$ , Schichtdicke von  $h = 70 \text{ nm}$  und Tiefe von  $d = 60 \text{ nm}$ .

### Variation der Wellenleiterschichtdicke

Für ein zweiperiodisches Gitter wird nun die optimale Schichtdicke ermittelt. In Abbildung 7.13 sind die Peakwellenlängen der einzelnen Resonanzen und die dazugehörigen elektrischen Feldstärken für TM- (a) und TE-Polarisation (b) gegenüber den Schichtdicken aufgetragen. Ab einer Schichtdicke von  $h = 90 \text{ nm}$  entstehen TE-Moden höherer Ordnung. Diese besitzen aber im Vergleich zu den  $TE_0$ -Moden eine deutlich geringere Intensität. Während für die  $TE_0$ -Resonanz  $\lambda_{TE0,R2}$  die elektrische Feldstärke linear mit der Schichtdicke abnimmt, bildet sich für  $\lambda_{TE0,R1}$  bei  $h = 90 \text{ nm}$  ein Maximum aus. Es ergibt sich bei dieser Schichtdicke ein Verstärkungsfaktor von 1,92.

Bei TM-polarisiertem Licht bilden sich in diesem Schichtdickenbereich keine höheren Ordnungen aus. Ein Maximum der Feldstärke kann aber für beide Resonanzen gefunden werden. Für Resonanz  $\lambda_{TM,R1}$  ist  $h = 70 \text{ nm}$  und für Resonanz  $\lambda_{TM,R2}$   $h = 80 \text{ nm}$  optimal.

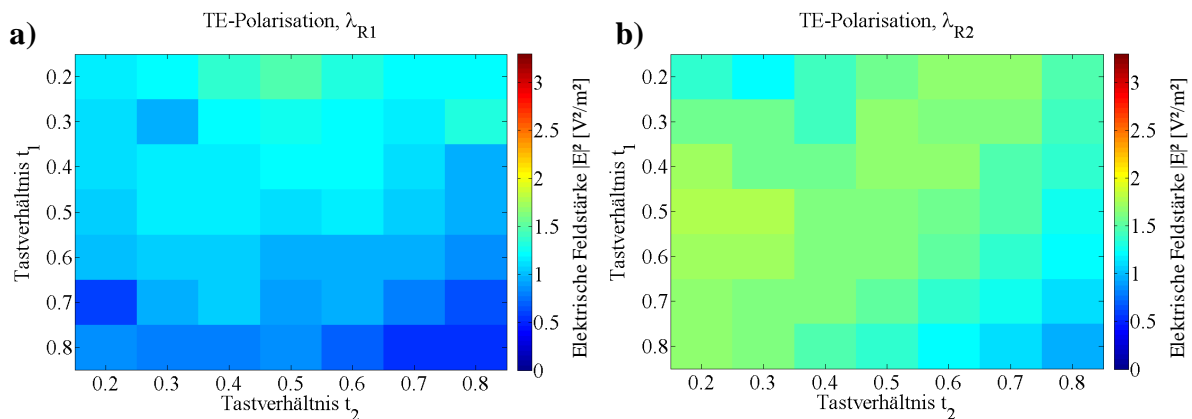
Prozessbedingt sollte jedoch eine Schichtdicke von  $h = 80$  nm gewählt werden, da die dadurch resultierende Feldstärke für  $\lambda_{TM,R1}$  nur geringfügig schwächer ist. Die Verstärkung beträgt demzufolge das 2,78-fache für  $\lambda_{TM,R1}$  und das 2,61-fache für  $\lambda_{TM,R2}$ .



**Abbildung 7.13:** Elektrische Feldstärke  $|\bar{E}|^2$  und Peakwellenlängen aufgetragen gegenüber der Schichtdicke für (a) TM- und (b) TE- Resonanzen des zweiperiodischen Gitters.

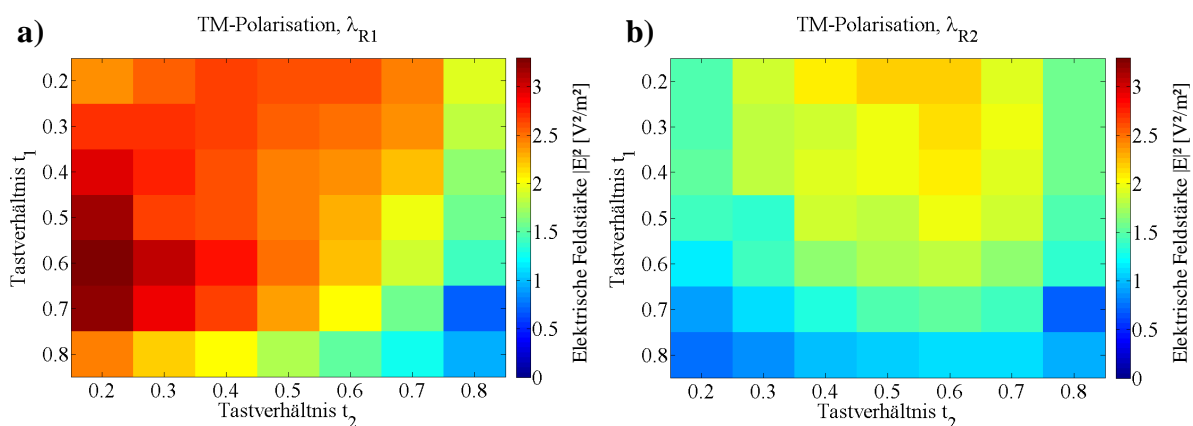
### Variation der Tastverhältnisse

Das Tastverhältnis wird nun für jedes Ausgangsgitter von  $t_1 = t_2 = 0,2$  bis  $t_1 = t_2 = 0,8$  variiert und die elektrische Feldstärke an der Oberfläche berechnet (Abbildung 7.14). Wählt man für die erste Periode ein Tastverhältnis von  $t_1 = 0,2$  und für die zweite eines von  $t_2 = 0,5$ , wird eine elektrische Feldstärke mit diesem Gitter im TE-Fall erzeugt, welche 2,2-mal stärker im Vergleich zu Glas ist.



**Abbildung 7.14:** Elektrische Feldstärke für TE-Resonanz (a) mit geringerer Resonanzwellenlänge ( $\lambda_{R1}$ ) und (b) mit höherer Resonanzwellenlänge ( $\lambda_{R2}$ ). Es werden die Tastverhältnisse jedes Ausgangsgitters eines zweiperiodischen Gitters gegeneinander aufgetragen.

Für die TM-Resonanzen sollte hingegen die erste Periode ein Tastverhältnis von  $t_1 = 0,5$  und die zweite eines von  $t_2 = 0,2$  besitzen, um eine 4,2-fach größere Feldstärke gegenüber einem Glassubstrat zu erreichen (Abbildung 7.15). Die Verstärkungen, die mit zweiperiodischen Gittern erzielt wurden, liegen in derselben Größenordnung wie die monoperiodischen Gitter. Jedoch unterstützen multiperiodische Gitterstrukturen die Ausbreitung mehrerer Resonanzen, welche auf das Absorptions- und das Emissionsspektrum jedes beliebigen Fluorophors durch die geeignete Wahl der Ausgangsgitterperioden abgestimmt werden können. Dadurch ist sowohl eine Steigerung der Anregungseffizienz als auch der Emissionsintensität mit einer einzigen Struktur denkbar.



**Abbildung 7.15:** Elektrische Feldstärke für TM-Resonanz (a) mit geringerer Resonanzwellenlänge ( $\lambda_{R1}$ ) und (b) mit höherer Resonanzwellenlänge ( $\lambda_{R2}$ ). Es werden die Tastverhältnisse jedes Ausgangsgitters eines zweiperiodischen Gitters gegeneinander aufgetragen.

## 7.4. Zusammenfassung

Es wurden in diesem Kapitel zunächst monoperiodische Nanostrukturen und deren Resonanzeigenschaften in Abhängigkeit der Gitterperiode, der Gittertiefe und des Tastverhältnisses experimentell und theoretisch analysiert, um die Anregungseffizienz von Fluorophoren durch eine geeignete Wahl der Strukturparameter zu steigern. Anhand von Analysen der elektrischen Feldstärke wurde festgestellt, dass für diese Strukturen besonders durch die TM-Resonanz die Lichtenergie im Vergleich zu einem normalen Glassubstrat an der Oberfläche verstärkt wird. Eine Dicke der Wellenleiterschicht von  $h = 80$  nm und ein Tastverhältnis von  $t = 0,3$  sollte gewählt werden, um eine Verstärkung der Lichtenergie um das 4,6-fache zu erzielen. Experimentell wurde eine Lumineszenzverstärkung von Titandioxid um das 1,65-Fache durch die Verwendung eines monoperiodischen Gitters nachgewiesen, in dem die Resonanz auf das Absorptionsmaximum von TiO<sub>2</sub> abgestimmt und somit resonant

angeregt wurde. Um die Lumineszenz noch weiter verstärken zu können, wurde durch unterschiedliche Verkippung der monopériodischen Gitterstruktur versucht die Resonanzen der Bandkantenmoden sowohl auf das Absorptions- als auch auf das Emissionsspektrum von  $\text{TiO}_2$  abzustimmen. Durch die spektrale Untersuchung der Resonanzpositionen und der Resonanzintensitäten der beiden Bandkantenmoden unter verschiedenen Kippwinkeln konnte zum einen ein geeigneter Kippwinkel für eine resonante Anregung und Emission identifiziert werden. Zum anderen konnte festgestellt werden, dass bei einem Tastverhältnis von  $t = 0,5$  die Resonanzintensitäten mit Erhöhung des Kippwinkels für beide Bandkantenmoden nahezu gleich sind. Lumineszenzexperimente mit einer Gitterstruktur, die dieses Tastverhältnis und eine Gitterperiode von  $\Lambda = 250$  nm besitzt, ergaben allerdings für eine Verkippung um  $\theta = 6^\circ$  eine um 6,8% schwächere Verstärkung im Vergleich zur nicht verkippten Struktur. Weil durch die Verkippung die Resonanzpositionen nicht ideal auf die Lumineszenz von  $\text{TiO}_2$  abgestimmt werden kann, wurden in einer Studie zweiperiodische Gitterstrukturen und deren Strukturparameter untersucht. Analysen der elektrischen Feldstärke ergaben, dass bei zweiperiodischen Gittern auch TM-Resonanzen am meisten Licht an der Oberfläche führen. Für TM-Resonanzen wird der Verstärkungsfaktor maximal, wenn für die erste Periode ein Tastverhältnis von  $t_1 = 0,5$  und für die zweite  $t_2 = 0,3$  und eine Dicke der Wellenleiterschicht von  $h = 80$  nm gewählt wird.





# Kapitel 8

## Zusammenfassung und Ausblick

---

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein optischer Biosensor für die mobile, markerfreie und parallele Detektion von mehreren Proteinen vorgestellt, der aus einem mit verschiedenen Rezeptoren funktionalisierten photonischen Kristall als Signalumwandler besteht und mit einem Kamera-basierten Messgerät ausgelesen wird. Die Integration des photonischen Kristall-Sensors in einen Testchip ermöglichte die Detektion von Biotin in Vollblut.

Hierfür wurde zunächst der photonische Kristall über UV-Nanoprägelithographie hergestellt. Zur Vervielfältigung einer Nanostruktur von einem Master wurden zwei Prozesse vorgestellt. Diese unterschieden sich im Material des Polymerstempels. Zunächst wurde reines PDMS über den Master gegossen und ausgehärtet. Mit diesem Stempel wurde die Nanostruktur auf ein mit Fotolack beschichtetes Glassubstrat geprägt, indem der Lack samt dem Stempel mit UV-Licht ausgehärtet wurde. Das Abscheiden eines hochbrechenden Materials wie Titandioxid oder Niob(V)-Oxid auf die nun nanostrukturierte Oberfläche des Substrats finalisierte die Herstellung des photonischen Kristalls. Mit Hilfe von REM-Aufnahmen wurde die Qualität der Abformung charakterisiert. Zur Abformung von Strukturen mit einem höheren Aspektverhältnis konnte ein Kollabieren der Stege aufgrund der Eigenschaften von reinem PDMS beobachtet werden, weshalb alternativ h-PDMS als Stempelmateriale untersucht wurde. Hiermit wurde die Abformungsqualität verbessert und Gitterstrukturen mit steileren Flanken hergestellt.

Als Nächstes wurden Rezeptoren über Oberflächenchemie kovalent an die Oberfläche des photonischen Kristalls gebunden. Dafür wurde die Oberfläche des photonischen Kristalls zuerst über Silanisierung und Crosslinker-Anbindung flächig funktionalisiert. Um mehrere Proteine mit nur einem Sensor nachweisen zu können, wurden hier zwei Prozesse zur lokalen Immobilisierung von Rezeptoren vorgestellt. Die erste Methode erfolgte über das tropfenweise Aufbringen der Rezeptoren (Spotten). Bei der anderen Methode wurde hingegen über eine strukturierte Fotolackmaske die zu funktionalisierenden Stellen vorgegeben. Abschließend wurden die freien Funktionsgruppen des Crosslinkers mit BSA und Ethanolamin passiviert. Um die Funktionalität dieser Methoden nachweisen zu können, wurden Fluoreszenzfarbstoffe anstelle der Rezeptoren an die Oberfläche des photonischen Kristalls gebunden und die Proben unter einem Fluoreszenzmikroskop charakterisiert. Die funktionalisierten Bereiche waren dabei klar sichtbar.

Des Weiteren wurden verschiedene Nanostrukturen zur resonanten Anregung von Fluorophoren und zur Steigerung der Ober- und Gesamtempfindlichkeit untersucht. Für die resonante Anregung von Fluorophoren muss die Lichtenergie an der Oberfläche und somit die Intensität der evaneszenten Welle gesteigert werden. Die Einflüsse der Tastverhältnisse und

---

der Dicke der Wellenleiterschicht auf die Lichtenergie wurden theoretisch für mono- und zweiperiodische Gitter betrachtet und mit der Lichtenergie von einer planaren Glasoberfläche verglichen. Für eine monoperiodische Struktur in einem photonischen Kristall kann eine Verstärkung um das 4,6-fache erzielt werden, wenn die TM-Resonanz mit einem Tastverhältnis von  $t = 0,3$  und eine 80 nm dicken Wellenleiterschicht gewählt wird. Durch die Überlagerung von zwei monoperiodischen Gittern konnte eine zweiperiodische Struktur erzeugt werden, welche entsprechend zu den Ausgangsgittern die Ausbildung mehrerer Resonanzen unterstützt. Diese ermöglichen die Abstimmung der Resonanzen sowohl auf das Absorptions- als auch auf das Emissionsspektrum eines Fluorophoren, womit neben einer resonanten Anregung eine resonante Emission möglich wäre. Dieser zweiperiodische Kristall erzeugte eine ähnliche Verstärkung für TM-Polarisation. Hier liegt das Optimum bei einer Schichtdicke von ebenfalls  $h = 80$  nm und Tastverhältnissen von  $t_1 = 0,5$  und  $t_2 = 0,2$ . Im Experiment konnte gezeigt werden, dass bereits mit der TE-Resonanz eines monoperiodischen Kristalls die Lumineszenz von Titandioxid um das 1,62-fache durch resonante Anregung gesteigert werden konnte.

Für die markerfreie Biosensorik wurden mono-, multi- und aperiodische Gitterstrukturen hinsichtlich einer möglichen Empfindlichkeitssteigerung untersucht. Dafür wurden die Gesamtempfindlichkeit mit refraktometrischen Messungen und die Güte der Resonanzen bestimmt. Durch die Wahl der TM-Resonanz in einem monoperiodischen Kristall wurde simulativ eine Gesamtempfindlichkeit von 92,37 nm/RIU und im Experiment von 57,27 nm/RIU festgestellt. Für multi- und aperiodische Strukturen konnte keine signifikante Steigerung der Empfindlichkeit festgestellt werden. Jedoch nahm die Güte mit der Unordnung in der Gitterstruktur, von rein mono- über multi- bis zu aperiodisch, teilweise zu. Auch konnte in Simulationen und im Experiment eine Lokalisierung der quasi-geführten Moden beobachtet, die laut den Simulationen mit einer deutlichen Felderhöhung an der Oberfläche einhergehen.

Nachdem identifiziert werden konnte, dass sich die TM-Resonanz eines monoperiodischen Kristalls aufgrund der Empfindlichkeit am Besten zur markerfreien Biosensorik eignet, wurden verschiedene bildgebende Messverfahren zur parallelen Detektion mehrerer Proteine entwickelt.

Zunächst wird ein kompaktes Kamera-basiertes Messgerät vorgestellt, mit dem der photonische Kristall in Transmission ausgelesen wird. Dieses Messgerät wurde anhand von refraktometrischen Messungen detailliert charakterisiert. Dabei wurde festgestellt, dass dieses System ein deutliches Driftverhalten über die Zeit zeigt, welches sich negativ auf das

Messsignal auswirkt. Durch einen in *MATLAB* implementierten Algorithmus konnte das Driftverhalten kompensiert werden, so dass im Signal allein die Anbindungsvorgänge der Proteine zu sehen sind. Durch die Anwendung des Algorithmuses konnte mit diesem Kamera-basiertem Messgerät die spezifische Anbindung von drei verschiedenen Proteinen (CD40 Ligand Antikörper, EGF Antikörper und Streptavidin) an sechs Bindungspositionen nachgewiesen werden. Mit einem experimentell nachgewiesenen Detektionslimit von  $LOD = 9,0 \text{ nM}$  ( $1,35 \text{ }\mu\text{g/ml}$ ) des Proteins CD40 Ligand Antikörper in Puffer gehört dieses System im Vergleich zu anderen dokumentierten intensitätsbasierten Messmethodiken zu den empfindlichsten.

Als Weiterentwicklung dieses Kamera-basierten Messgeräts wurden zwei Ansätze zur Realisierung eines Smartphone-Adapters präsentiert, der die LED des Smartphones als Anregelichtquelle und die Smartphone-Kamera als Detektor verwendet. Dabei wird der photonische Kristall in Reflexion betrieben. Mit einer Diffusorplatte vor der Smartphone-LED wurde eine homogenere Ausleuchtung des photonischen Kristalls im Vergleich zu einer direkten Beleuchtung ohne Diffusor und dadurch ein Optik-freies Design erreicht. Durch eine telezentrische Abbildung und die Umlenkung des LED-Lichtes über ein rechtwinkliges Prisma und einen 50:50 Strahlteiler in den Strahlengang der Kamera, wurde die homogene Verteilung des Lichts noch weiter gesteigert. Durch refraktometrische Messungen wurden beide Designs spektral und photometrisch charakterisiert. Mit dem Optik-freien Design konnte ein Detektionslimit von  $LOD = 1,4 \cdot 10^{-3}$  RIU erreicht, während der Adapter mit telezentrischer Optik hingegen nur ein Detektionslimit von  $LOD = 2,1 \cdot 10^{-3}$  RIU besitzt. Die Empfindlichkeit dieser Messsysteme ist jedoch zu gering für die Anwendung in der patientennahen Diagnostik.

Um diesen photonischen Kristall-Biosensor noch kompakter und somit interessanter für die patientennahe Diagnostik zu gestalten, wurde zusätzlich ein Testchip zur Proteindetektion in Vollblut vorgestellt. Dieser konzipierte Testchip benötigt lediglich ein Probenvolumen von nur  $200 \text{ }\mu\text{l}$  Vollblut, welches auf dem Chip so gefiltert wird, dass ausschließlich Blutserum zur Sensorkammer geleitet wird. In die Sensorkammer wird dann der funktionalisierte photonische Kristall platziert. Die Filtereigenschaften der Filtermembran wurden anhand von verschieden großen, fluoreszierenden Mikrobeads analysiert. Es stellte sich heraus, dass Partikel kleiner als  $3 \text{ }\mu\text{m}$  den Filter passieren können und das Hintergrundsignal bei der Proteindetektion signifikant beeinflussen. Die Fließeigenschaften innerhalb der Sensorkammer wurden zudem mittels Brechungsindexmessungen charakterisiert. Auch diese Fließeigenschaften besitzen einen negativen Einfluss auf das Hintergrundsignal.

---

Nichtsdestotrotz konnten 500 nmol/l Biotin an zwei Bindungsstellen in Puffer und an einer Bindungsstelle in Vollblut erfolgreich mit diesem Testchip detektiert werden.

Um aus dem in dieser Arbeit vorgestellten Biosensor ein marktfähiges Produkt zu realisieren, benötigt es noch weitere Entwicklungsarbeit. Die Varianz der Signalamplituden bei der Detektion von demselben Protein bei gleicher Proteinkonzentration ist zu groß, um verlässliche Aussagen treffen zu können. Systemseitig könnte beispielsweise die Ausleuchtung des photonischen Kristalls durch eine telezentrische oder eine Kondensor-Optik verbessert werden, so dass der Intensitätsunterschied zwischen Bildmitte und Bildrand minimiert wird. Auf Sensorebene sind klar die per Hand aufgetropften Rezeptoren als Verbesserungsmaßnahme zu nennen. Über maschinelle Spotter sollten eine gleichmäßigere Auftragung der Rezeptoren und gleichgroße Spots die Varianz der Signalamplituden deutlich verringern.

Um für die Diagnostik relevante Proteinkonzentrationen detektieren zu können, ist es notwendig, die Empfindlichkeit der photonischen Kristalle zu steigern. Hier könnte durch die gezielte Platzierung der Rezeptoren an den „Hotspots“, die in multi- und aperiodischen Strukturen entstehen, eine deutliche Steigerung der Empfindlichkeit erreicht werden. Zudem wurde simulativ bereits gezeigt, welche strukturellen Maßnahmen noch zur Empfindlichkeitssteigerung ergriffen werden können.

Allgemein besitzt diese bildgebende Technologie großes Potential für die patientennahe Diagnostik, wenn diese Verbesserungen umgesetzt werden können. Dadurch, dass beispielsweise eine Sensorfläche von 1 cm<sup>2</sup> mit diesem Messgerät ausgelesen werden kann, ist es möglich 20 x 20 = 400 Rezeptorpositionen mit einem Durchmesser von 350 µm auf den Sensor zu platzieren. Als Resultat wären 40% der Gesamtfläche belegt und genug freie Stellen können zur Driftkompensation genutzt werden. Diese hohe Zahl zeigt, dass eine breite Palette von Risikomarkern parallel ausgelesen werden kann. Somit ist diese Plattformtechnologie vielversprechend für zukünftige Anwendungen in der patientennahen Diagnostik.



# Literaturverzeichnis

- [1] Statistisches Bundesamt, “Bevölkerung und Erwerbstätigkeit: Natürliche Bevölkerungsbewegung,” 2016.
- [2] Statistisches Bundesamt, “Gesundheit: Todesursachen in Deutschland,” 2009.
- [3] J. McCord, R. M. Nowak, P. a McCullough, C. Foreback, S. Borzak, G. Tokarski, M. C. Tomlanovich, G. Jacobsen, and W. D. Weaver, “Ninety-minute exclusion of acute myocardial infarction by use of quantitative point-of-care testing of myoglobin and troponin I,” *Circulation*, vol. 104, no. 13, pp. 1483–1488, 2001.
- [4] A. Icks and M. Roden, “Diabetes mellitus in Deutschland,” *Public Heal. Forum*, vol. 18, no. 1, 2010.
- [5] W. Rathmann, B. Haastert, A. Icks, H. Löwel, C. Meisinger, R. Holle, and G. Giani, “High prevalence of undiagnosed diabetes mellitus in Southern Germany: target populations for efficient screening. The KORA survey 2000.,” *Diabetologia*, vol. 46, no. 2, pp. 182–189, 2003.
- [6] M. B. Schulze, K. Hoffmann, H. Boeing, J. Linseisen, S. Rohrmann, M. Möhlig, A. F. H. Pfeiffer, J. Spranger, C. Thamer, H. U. Häring, A. Fritsche, and H. G. Joost, “An accurate risk score based on anthropometric, dietary, and lifestyle factors to predict the development of type 2 diabetes,” *Diabetes Care*, vol. 30, no. 3, pp. 510–515, 2007.
- [7] N. Stefan, A. Fritsche, C. Weikert, H. Boeing, H. Joost, and M. B. Schulze, “Plasma Fetuin-A Levels and the Risk of Type 2 Diabetes,” *Diabetes*, vol. 57, pp. 2762–2767, 2008.
- [8] J. A. Kolberg, T. Jørgensen, R. W. Gerwien, S. Hamren, M. P. McKenna, E. Moler, M. W. Rowe, M. S. Urdea, X. M. Xu, T. Hansen, O. Pedersen, and K. Borch-Johnsen, “Development of a type 2 diabetes risk model from a panel of serum biomarkers from the inter99 cohort,” *Diabetes Care*, vol. 32, no. 7, pp. 1207–1212, 2009.
- [9] V. Salomaa, A. Havulinna, O. Saarela, T. Zeller, P. Jousilahti, A. Jula, T. Muenzel, A. Aromaa, A. Evans, K. Kuulasmaa, and S. Blankenberg, “Thirty-one novel biomarkers as predictors for clinically incident diabetes,” *PLoS One*, vol. 5, no. 4, pp. 1–8, 2010.
- [10] F. W. Scheller, U. Wollenberger, A. Warsinke, and F. Lisdat, “Research and development in biosensors,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 12, no. 1, pp. 35–40, 2001.
- [11] Dmitri Ivnitcki, Ihab Abdel-Hamid, Plamen Atanasov, and Ebtisam Wilkins, “Biosensors for detection of pathogenic bacteria,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 14, pp. 599–624, 1999.
- [12] C. Steinem, “Piezoelectric Mass-Sensing Devices as Biosensors-An Alternative to Optical Biosensors?,” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 39, no. 22, pp. 4004–4032, 2000.
- [13] J. Fritz, “Cantilever biosensors,” *Analyst*, vol. 133, pp. 855–863, 2008.
- [14] J. A. Lee, S. Hwang, J. Kwak, S. Il Park, S. S. Lee, and K. C. Lee, “An electrochemical impedance biosensor with aptamer-modified pyrolyzed carbon electrode for label-free protein detection,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 129, no. 1, pp. 372–379, 2008.

- [15] D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, and G. S. Wilson, "Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 16, no. 1–2, pp. 121–131, 2001.
- [16] A. Waggoner, "Fluorescent labels for proteomics and genomics," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 10, no. 1, pp. 62–66, 2006.
- [17] B. Cunningham, P. Li, B. Lin, and J. Pepper, "Colorimetric resonant reflection as a direct biochemical assay technique," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 81, no. 2–3, pp. 316–328, 2002.
- [18] W. Budach, D. Neuschäfer, C. Wanke, and S. D. Chibout, "Generation of Transducers for Fluorescence-Based Microarrays with Enhanced Sensitivity and Their Application for Gene Expression Profiling," *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 11, pp. 2571–2577, 2003.
- [19] L. M. Smith, J. Z. Sanders, R. J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C. R. Connell, C. Heiner, S. B. Kent, and L. E. Hood, "Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis," *Nature*, vol. 321, no. 6071, pp. 674–679, 1986.
- [20] X. Fan, I. M. White, S. I. Shopova, H. Zhu, J. D. Suter, and Y. Sun, "Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 620, no. 1–2, pp. 8–26, 2008.
- [21] D. Threm, S. Jahns, Y. Nazirizadeh, M. Ziegler, M. Hansen, H. Kohlstedt, J. Adam, and M. Gerken, "On the effect of broadband, multi-angular excitation and detection in guided-mode resonance biosensors," *Proc. SPIE*, vol. 9127, p. 91270X–91270X–7, 2014.
- [22] Y. Nazirizadeh, U. Bog, S. Sekula, T. Mappes, U. Lemmer, and M. Gerken, "Low-cost label-free biosensors using photonic crystals embedded between crossed polarizers," *Opt. Express*, vol. 18, no. 18, pp. 19120–19128, 2010.
- [23] Z. Yu and S. Fan, "Extraordinarily high spectral sensitivity in refractive index sensors using multiple optical modes," *Opt. Express*, vol. 19, no. 11, pp. 10029–10040, 2011.
- [24] P. Kozma, F. Kehl, E. Ehrentreich-Förster, C. Stamm, and F. F. Bier, "Integrated planar optical waveguide interferometer biosensors: A comparative review," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 58, pp. 287–307, 2014.
- [25] S.-F. Lin, C.-M. Wang, T.-J. Ding, Y.-L. Tsai, T.-H. Yang, W.-Y. Chen, and J.-Y. Chang, "Sensitive metal layer assisted guided mode resonance biosensor with a spectrum inversed response and strong asymmetric resonance field distribution," *Opt. Express*, vol. 20, no. 13, p. 14584, 2012.
- [26] D. Neuschäfer, W. Budach, C. Wanke, and S.-D. Chibout, "Evanescent resonator chips: a universal platform with superior sensitivity for fluorescence-based microarrays," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 18, no. 4, pp. 489–497, 2003.
- [27] P. Y. Li, B. Lin, J. Gerstenmaier, and B. T. Cunningham, "A new method for label-free imaging of biomolecular interactions," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 99, no. 1, pp. 6–13, 2004.
- [28] M. a Cooper, "Optical biosensors in drug discovery," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 1, no. 7, pp. 515–528, 2002.
- [29] R. Bruck, E. Melnik, P. Muellner, R. Hainberger, and M. Lämmerhofer, "Integrated polymer-based Mach-Zehnder interferometer label-free streptavidin biosensor compatible with injection molding," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 9, pp. 3832–



- 3837, 2011.
- [30] C. L. Wong and M. Olivo, "Surface Plasmon Resonance Imaging Sensors: A Review," *Plasmonics*, vol. 9, pp. 809–824, 2014.
- [31] W. Peng, Y. Liu, P. Fang, X. Liu, Z. Gong, H. Wang, and F. Cheng, "Compact surface plasmon resonance imaging sensing system based on general optoelectronic components," *Opt. Express*, vol. 22, no. 5, p. 6174, 2014.
- [32] H. K. Hunt, A. M. Armani, and S. Member, "Bioconjugation Strategies for Label-Free Optical Microcavity Sensors," *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, vol. 20, no. 2, 2014.
- [33] R. D. Peterson, B. T. Cunningham, and J. E. Andrade, "A photonic crystal biosensor assay for ferritin utilizing iron-oxide nanoparticles," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 56, pp. 320–327, 2014.
- [34] S.-F. Lin, T.-J. Ding, J.-T. Liu, C.-C. Lee, T.-H. Yang, W.-Y. Chen, and J.-Y. Chang, "A guided mode resonance aptasensor for thrombin detection.," *Sensors (Basel)*, vol. 11, no. 9, pp. 8953–65, 2011.
- [35] D. Threm, Y. Nazirizadeh, and M. Gerken, "Photonic crystal biosensors towards on-chip integration," *J. Biophotonics*, vol. 5, no. 8–9, pp. 601–616, 2012.
- [36] B. Zhang, A. W. Morales, R. Peterson, L. Tang, and J. Y. Ye, "Label-free detection of cardiac troponin I with a photonic crystal biosensor," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 58, pp. 107–113, 2014.
- [37] V. M. N. Passaro, F. Dell'Olivo, B. Casamassima, and F. De Leonardis, "Guided-Wave Optical Biosensors," *Sensors*, vol. 7, pp. 508–536, 2007.
- [38] B. Sepúlveda, J. S. Del Río, M. Moreno, F. J. Blanco, K. Mayora, C. Domínguez, and L. M. Lechuga, "Optical biosensor microsystems based on the integration of highly sensitive Mach–Zehnder interferometer devices," *J. Opt. A Pure Appl. Opt.*, vol. 8, pp. S561–S566, 2006.
- [39] K. Malmir, H. Habibiyan, and H. Ghafoorifard, "An ultrasensitive optical label-free polymeric biosensor based on concentric triple microring resonators with a central microdisk resonator," *Opt. Commun.*, vol. 365, pp. 150–156, 2016.
- [40] F. Long, A. Zhu, and H. Shi, "Recent advances in optical biosensors for environmental monitoring and early warning.," *Sensors (Basel)*, vol. 13, no. 10, pp. 13928–13948, 2013.
- [41] S. Roh, T. Chung, and B. Lee, "Overview of the characteristics of micro- and nano-structured surface plasmon resonance sensors," *Sensors*, vol. 11, no. 2, pp. 1565–1588, 2011.
- [42] A. E. Cetin, A. F. Coskun, B. C. Galarreta, M. Huang, D. Herman, A. Ozcan, and H. Altug, "Handheld high-throughput plasmonic biosensor using computational on-chip imaging," *Light Sci. Appl.*, vol. 3, no. 1, p. e122, 2014.
- [43] W.-J. Kim, B. K. Kim, A. Kim, C. Huh, C. S. Ah, K.-H. Kim, J. Hong, S. H. Park, S. Song, J. Song, and G. Y. Sung, "Response to cardiac markers in human serum analyzed by guided-mode resonance biosensor.," *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 23, pp. 9686–9693, 2010.
- [44] D. Gallegos, K. D. Long, H. Yu, P. P. Clark, Y. Lin, S. George, P. Nath, and B. T.

- Cunningham, "Label-free biodetection using a smartphone.," *Lab Chip*, vol. 13, no. 11, pp. 2124–32, 2013.
- [45] W. Chen, K. D. Long, M. Lu, V. Chaudhery, H. Yu, J. S. Choi, J. Polans, Y. Zhuo, B. a C. Harley, and B. T. Cunningham, "Photonic crystal enhanced microscopy for imaging of live cell adhesion.," *Analyst*, vol. 138, no. 20, pp. 5886–94, 2013.
- [46] Y. Nazirizadeh, F. von Oertzen, K. Plewa, N. Barié, P.-J. Jakobs, M. Guttmann, H. Leiste, and M. Gerken, "Sensitivity optimization of injection-molded photonic crystal slabs for biosensing applications," *Opt. Mater. Express*, vol. 3, no. 5, p. 556, 2013.
- [47] M. A. Cooper, "Optical biosensors in drug discovery.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 1, no. 7, pp. 515–528, 2002.
- [48] J. H. Park, J. Y. Byun, H. Mun, W. B. Shim, Y. B. Shin, T. Li, and M. G. Kim, "A regeneratable, label-free, localized surface plasmon resonance (LSPR) aptasensor for the detection of ochratoxin A," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 59, pp. 321–327, 2014.
- [49] A. Holmberg, A. Blomstergren, O. Nord, M. Lukacs, J. Lundeberg, and M. Uhlén, "The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures," *Electrophoresis*, vol. 26, no. 3, pp. 501–510, 2005.
- [50] J. J. D. Joannopoulos, S. Johnson, J. N. J. Winn, and R. R. D. Meade, *Photonic crystals: molding the flow of light*, Second Edi. Princeton University Press, 2008.
- [51] S. G. Johnson and J. D. Joannopoulos, "Introduction to Photonic Crystals: Bloch 's Theorem , Band Diagrams , and Gaps ( But No Defects ) Maxwell ' s Equations in Periodic Media," in *Photonic Crystal Tutorial*, 2003, pp. 1–16.
- [52] F. Pedrotti, L. Pedrotti, W. Bausch, and H. Schmidt, *Optik für Ingenieure*, 4. Auflage. Springer-Verlag Berlin, 1999.
- [53] Christian Kluge, "Nanostructures for emission control in organic light-emitting layers," Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 2014.
- [54] M. C. T. Bahaa and E. A. Saleh, *Grundlagen der Photonik*, 1. Auflage. WILEY-VCH Verlag, 2008.
- [55] S. Jahns, F. Von Oertzen, T. Karrock, Y. Nazirizadeh, and M. Gerken, "Photonic Crystal Slabs for Biosensing," in *PIERS Proceedings*, 2014, pp. 1217–1220.
- [56] G. A. Turnbull, P. Andrew, W. L. Barnes, and I. D. W. Samuel, "Photonic mode dispersion of a two-dimensional distributed feedback polymer laser," *Phys. Rev. B*, vol. 67, pp. 165107-1-165107–8, 2003.
- [57] I. D. Block, N. Ganesh, M. Lu, and B. T. Cunningham, "A Sensitivity Model for Predicting Photonic Crystal Biosensor Performance," *IEEE Sens. J.*, vol. 8, no. 3, pp. 274–280, 2008.
- [58] S. Fan and J. Joannopoulos, "Analysis of guided resonances in photonic crystal slabs," *Phys. Rev. B*, vol. 65, no. 23, pp. 1–8, 2002.
- [59] Y. Nazirizadeh, J. Reverey, U. Geyer, U. Lemmer, C. Selhuber-Unkel, and M. Gerken, "Material-based three-dimensional imaging with nanostructured surfaces," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 102, no. 1, pp. 1–4, 2013.
- [60] Y. Zhuo, H. Hu, W. Chen, M. Lu, L. Tian, H. Yu, K. D. Long, E. Chow, W. P. King, S. Singamaneni, and B. T. Cunningham, "Single nanoparticle detection using photonic crystal enhanced microscopy.," *Analyst*, vol. 139, pp. 1007–1015, 2014.

- [61] Y. Nazirizadeh, F. von Oertzen, T. Karrock, J. Greve, and M. Gerken, "Enhanced sensitivity of photonic crystal slab transducers by oblique-angle layer deposition.," *Opt. Express*, vol. 21, no. 16, pp. 18661–70, 2013.
- [62] S. V. Boriskina and L. D. Negro, "Sensitive label-free biosensing using critical modes in aperiodic photonic structures," *Opt. Express*, vol. 16, no. 17, pp. 1565–1573, 2008.
- [63] S. V. Boriskina, A. Gopinath, and L. Dal Negro, "Optical gap formation and localization properties of optical modes in deterministic aperiodic photonic structures.," *Opt. Express*, vol. 16, no. 23, pp. 18813–18826, 2008.
- [64] A. Ricciardi, I. Gallina, S. Campopiano, G. Castaldi, M. Pisco, V. Galdi, and A. Cusano, "Guided resonances in photonic quasicrystals.," *Opt. Express*, vol. 17, no. 8, pp. 6335–6346, 2009.
- [65] A. Ricciardi, M. Pisco, A. Cutolo, A. Cusano, L. O'Faolain, T. F. Krauss, G. Castaldi, and V. Galdi, "Evidence of guided resonances in photonic quasicrystal slabs," *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.*, vol. 84, no. 8, pp. 1–4, 2011.
- [66] C. Kluge, L. T. Neustock, J. Adam, and M. Gerken, "Wavelength dependency of outcoupling peak intensities for emission layers with multi-periodic photonic crystals," in *International Conference on Transparent Optical Networks*, 2014, pp. 4–7.
- [67] C. Kluge, J. Adam, N. Barié, P.-J. Jakobs, M. Guttman, and M. Gerken, "Multi-periodic nanostructures for photon control," *Opt. Express*, vol. 22, no. August, p. A1363, 2014.
- [68] P. G. Hermansson, C. Vannahme, C. L. C. Smith, K. T. Sørensen, and A. Kristensen, "Refractive index dispersion sensing using an array of photonic crystal resonant reflectors," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 107, no. 6, p. 61101, 2015.
- [69] Y. Nazirizadeh, T. Becker, J. Reverey, C. Selhuber-Unkel, D. H. Rapoport, U. Lemmer, and M. Gerken, "Photonic crystal slabs for surface contrast enhancement in microscopy of transparent objects," *Opt. Express*, vol. 20, no. 13, pp. 14451–14459, 2012.
- [70] Y. Nazirizadeh, V. Behrends, A. Prós, N. Orgovan, R. Horvath, A. M. Ferrie, Y. Fang, C. Selhuber-Unkel, and M. Gerken, "Intensity interrogation near cutoff resonance for label-free cellular profiling," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 24685, 2016.
- [71] S. M. Shamah and B. T. Cunningham, "Label-free cell-based assays using photonic crystal optical biosensors," *Analyst*, vol. 136, no. 136, pp. 1090–1102, 1090.
- [72] B. Cunningham, B. Lin, J. Qiu, P. Li, J. Pepper, and B. Hugh, "A plastic colorimetric resonant optical biosensor for multiparallel detection of label-free biochemical interactions," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 85, no. 3, pp. 219–226, 2002.
- [73] R. Magnusson, D. Wawro, S. Zimmerman, and Y. Ding, "Resonant photonic biosensors with polarization-based multiparametric discrimination in each channel," *Sensors*, vol. 11, no. 2, pp. 1476–1488, 2011.
- [74] J. H. Han, H. J. Kim, L. Sudheendra, S. J. Gee, B. D. Hammock, and I. M. Kennedy, "Photonic crystal lab-On-a-Chip for detecting staphylococcal enterotoxin B at low attomolar concentration," *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 6, pp. 3104–3109, 2013.
- [75] K. V. Srekanth, S. Zeng, K. T. Yong, and T. Yu, "Sensitivity enhanced biosensor using graphene-based one-dimensional photonic crystal," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 182, pp. 424–428, 2013.

- [76] F. Frascella, S. Ricciardi, P. Rivolo, V. Moi, F. Giorgis, E. Descrovi, F. Michelotti, P. Munzert, N. Danz, L. Napione, M. Alvaro, and F. Bussolino, "A fluorescent one-dimensional photonic crystal for label-free biosensing based on bloch surface waves," *Sensors (Switzerland)*, vol. 13, no. 2, pp. 2011–2022, 2013.
- [77] M. Zourob and A. Lakhtakia, *Optical Guided-wave Chemical and Biosensors 2*. Springer Berlin Heidelberg, 2010.
- [78] J. Topol'ančik, P. Bhattacharya, J. Sabarinathan, and P. C. Yu, "Fluid detection with photonic crystal-based multichannel waveguides," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 82, no. 8, pp. 1143–1145, 2003.
- [79] N. Skivesen, A. Têtu, M. Kristensen, J. Kjems, L. H. Frandsen, and P. I. Borel, "Photonic-crystal waveguide biosensor," *Opt. Express*, vol. 15, no. 6, pp. 3169–3176, 2007.
- [80] B. T. Cunningham, P. Li, S. Schulz, B. Lin, C. Baird, J. Gerstenmaier, C. Genick, F. Wang, E. Fine, and L. Laing, "Label-free assays on the BIND system.," *J. Biomol. Screen. Off. J. Soc. Biomol. Screen.*, vol. 9, no. 6, pp. 481–490, 2004.
- [81] I. D. Block, L. L. Chan, and B. T. Cunningham, "Large-area submicron replica molding of porous low-k dielectric films and application to photonic crystal biosensor fabrication," *Microelectron. Eng.*, vol. 84, no. 4, pp. 603–608, 2007.
- [82] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer Berlin Heidelberg, 2006.
- [83] M. Dandin, P. Abshire, and E. Smela, "Optical filtering technologies for integrated fluorescence sensors.," *Lab Chip*, vol. 7, no. 8, pp. 955–77, 2007.
- [84] M. Dandin, P. Abshire, and E. Smela, "Optical filtering technologies for integrated fluorescence sensors.," *Lab Chip*, vol. 7, no. 8, pp. 955–77, 2007.
- [85] S. B. VanEngelenburg and A. E. Palmer, "Fluorescent biosensors of protein function," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 12, no. 1, pp. 60–65, 2008.
- [86] E. P. Kartalov, J. F. Zhong, A. Scherer, S. R. Quake, C. R. Taylor, and W. F. Anderson, "High-throughput multi-antigen microfluidic fluorescence immunoassays," *Biotechniques*, vol. 40, no. 1, pp. 85–90, 2006.
- [87] Z. Li, Y. Wang, J. Wang, Z. Tang, J. G. Pounds, and Y. Lin, "Rapid and Sensitive Detection of Protein Biomarker Using a Portable Fluorescence Biosensor Based on Quantum Dots and a Lateral Flow Test Strip," *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 16, pp. 7008–7014, 2010.
- [88] W. F. Patton, "Detection technologies in proteome analysis," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 771, no. 1–2, pp. 3–31, 2002.
- [89] P. C. Mathias, N. Ganesh, and B. T. Cunningham, "Application of Photonic Crystal Enhanced Fluorescence to a Cytokine Immunoassay," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 23, pp. 9013–9020, 2008.
- [90] W. Zhang, N. Ganesh, P. C. Mathias, and B. T. Cunningham, "Enhanced fluorescence on a photonic crystal surface incorporating nanorod structures," *Small*, vol. 4, no. 12, pp. 2199–2203, 2008.
- [91] H.-Y. Wu, W. Zhang, P. C. Mathias, and B. T. Cunningham, "Magnification of photonic crystal fluorescence enhancement via TM resonance excitation and TE

- resonance extraction on a dielectric nanorod surface.,” *Nanotechnology*, vol. 21, no. 12, p. 125203, 2010.
- [92] J. H. Lin, H. Y. Liou, C.-D. Wang, C.-Y. Tseng, C.-T. Lee, C.-C. Ting, H.-C. Kan, and C. C. Hsu, “Giant Enhancement of Upconversion Fluorescence of NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>, Tm<sup>3+</sup> Nanocrystals with Resonant Waveguide Grating Substrate,” *ACS Photonics*, vol. 2, no. 4, pp. 530–536, 2015.
- [93] Y. Xia, J. a. Rogers, K. E. Paul, and G. M. Whitesides, “Unconventional Methods for Fabricating and Patterning Nanostructures.,” *Chem. Rev.*, vol. 99, no. 7, pp. 1823–1848, 1999.
- [94] S. Kronholz, “Integration von Nanostrukturen durch alternative Methoden: Mizellen-Disposition, Template-Wachstum und Nanogaps,” Forschungszentrum Jülich GmbH, 2007.
- [95] S. B. Klinkhammer, “Durchstimmbare organische Halbleiterlaser,” Karlsruher Institut für Technologie, 2012.
- [96] L. J. Guo, “Nanoimprint lithography: Methods and material requirements,” *Adv. Mater.*, vol. 19, no. 4, pp. 495–513, 2007.
- [97] T. W. Odom, J. C. Love, D. B. Wolfe, K. E. Paul, and G. M. Whitesides, “Composite Stamps,” *Langmuir*, vol. 18, no. 9, pp. 5314–5320, 2002.
- [98] Y. Xia and G. M. Whitesides, “Soft Lithography,” *Annu. Rev. Mater. Sci.*, vol. 28, no. 12, pp. 153–184, 1998.
- [99] H. Schmid and B. Michel, “Siloxane Polymers for High-Resolution, High Accuracy Soft Lithography,” *Macromolecules*, vol. 33, pp. 3042–3049, 2000.
- [100] H. Kang, J. Lee, J. Park, and H. H. Lee, “An improved method of preparing composite poly(dimethylsiloxane) moulds,” *Nanotechnology*, vol. 17, no. 1, pp. 197–200, 2005.
- [101] M. Hansen, M. Ziegler, H. Kohlstedt, A. Pradana, M. Raedler, and M. Gerken, “UV capillary force lithography for multiscale structures,” *J. Vac. Sci. Technol. B*, vol. 30, no. 3, p. , 2012.
- [102] P. Jonkheym, D. Weinrich, H. Schröder, C. M. Niemeyer, and H. Waldmann, “Chemical Strategies for Generating Protein Biochips.pdf,” *Angew. Chemie*, vol. 47, pp. 9618–9647, 2008.
- [103] G. Healthcare, *Biacore: Sensor Surface Handbook*. GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2008.
- [104] R. Möller, “DNA-Chips mit elektrischer Detektion,” Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2006.
- [105] H. H. Weetall, “Preparation of immobilized proteins covalently coupled through silane coupling agents to inorganic supports,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 41, no. 3, pp. 157–188, 1993.
- [106] R. Benters, C. M. Niemeyer, and D. Wöhrle, “Dendrimer-activated solid supports for nucleic acid and protein microarrays.,” *Chembiochem*, vol. 2, no. 9, pp. 686–94, 2001.
- [107] Z. Guo, R. a Guilfoyle, a J. Thiel, R. Wang, and L. M. Smith, “Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 22, no. 24, pp. 5456–5465, 1994.

- [108] L. Römhildt, C. Pahlke, F. Zörgiebel, H. G. Braun, J. Opitz, L. Baraban, and G. Cuniberti, "Patterned biochemical functionalization improves aptamer-based detection of unlabeled thrombin in a sandwich assay," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 5, no. 22, pp. 12029–12035, 2013.
- [109] C. F. Carlborg, T. Haraldsson, K. Oberg, M. Malkoch, and W. van der Wijngaart, "Beyond PDMS: off-stoichiometry thiol-ene (OSTE) based soft lithography for rapid prototyping of microfluidic devices.," *Lab Chip*, vol. 11, no. 18, pp. 3136–3147, 2011.
- [110] F. Lottspeich and J. W. Engels, "Proteinreinigung 2," in *Bioanalytik*, 2012.
- [111] S. Abbas, J. Moghaddas, M. Shahabadi, S. Member, and M. Mohammad-taheri, "Surface Sensitivity Using Coupled Cross-Stacked Gratings," vol. 14, no. 4, pp. 1216–1222, 2014.
- [112] Y. Nazirizadeh, F. von Oertzen, T. Karrock, J. Greve, and M. Gerken, "Enhanced sensitivity of photonic crystal slab transducers by oblique-angle layer deposition.," *Opt. Express*, vol. 21, no. 16, pp. 18661–18670, 2013.
- [113] K. S. Yee, "Numerical solution of initial boundary value problems involving Maxwell's equations in isotropic media," *IEEE Trans. Antennas Propag.*, vol. 14, no. 3, pp. 302–307, 1966.
- [114] Y. Nazirizadeh, "Photonic crystal slabs for low-cost biosensors," Karlsruhe Institut für Technologie, 2010.
- [115] "www.lumerical.com." [Online]. Available: [www.lumerical.com](http://www.lumerical.com). [Accessed: 27-Jun-2016].
- [116] G. A. Turnbull, P. Andrew, M. J. Jory, W. L. Barnes, and I. D. W. Samuel, "Relationship between photonic band structure and emission characteristics of a polymer distributed feedback laser," *Phys. Rev. B*, vol. 64, no. 12, p. 125122, 2001.
- [117] N. Ganesh, P. C. Mathias, W. Zhang, and B. T. Cunningham, "Distance dependence of fluorescence enhancement from photonic crystal surfaces," *J. Appl. Phys.*, vol. 103, no. 8, 2008.
- [118] V. Chaudhery, M. Lu, A. Pokhriyal, S. C. Schulz, and B. T. Cunningham, "Angle-scanning photonic crystal enhanced fluorescence microscopy," *IEEE Sens. J.*, vol. 12, no. 5, pp. 1272–1279, 2012.
- [119] T. L. McMeekin, M. Wilensky, and M. L. Groves, "Refractive indices of proteins in relation to amino acid composition and specific volume," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 7, no. 2, pp. 151–156, 1962.
- [120] G. Bamberg, F. Bauer, and M. Krapp, *Statistik*, 16th ed. München: Oldenbourg Wissenschaftsverlag, 2011.
- [121] M. Müller and Werner Poguntke, *Basiswissen Statistik*. W3I GmbH, 2010.
- [122] "[http://www.thorlabs.de/newgrouppage9.cfm?objectgroup\\_id=4024](http://www.thorlabs.de/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=4024)." [Online]. Available: [http://www.thorlabs.de/newgrouppage9.cfm?objectgroup\\_id=4024](http://www.thorlabs.de/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=4024). [Accessed: 25-Jun-2016].
- [123] J. B. F. Cazals, and S. Antipolis, "Smooth Surface Reconstruction via Natural Neighbour Interpolation of Distance Functions," in *Proceedings of the sixteenth annual symposium on Computational geometry*, 2000, pp. 223–232.
- [124] A. F. Coskun, R. Nagi, K. Sadeghi, S. Phillips, and A. Ozcan, "Albumin testing in

- urine using a smart-phone.,” *Lab Chip*, vol. 13, no. 21, pp. 4231–8, 2013.
- [125] R. N. Maamari, J. D. Keenan, D. A. Fletcher, and T. P. Margolis, “A mobile phone-based retinal camera for portable wide field imaging.,” *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 98, no. 4, pp. 438–41, 2014.
- [126] H. J. Chun, Y. M. Park, Y. D. Han, Y. H. Jang, and H. C. Yoon, “Paper-based glucose biosensing system utilizing a smartphone as a signal reader,” *Biochip J.*, vol. 8, no. 3, pp. 218–226, 2014.
- [127] K.-L. Lee, M.-L. You, C.-H. Tsai, E.-H. Lin, S.-Y. Hsieh, M.-H. Ho, J.-C. Hsu, and P.-K. Wei, “Nanoplasmonic biochips for rapid label-free detection of imidacloprid pesticides with a smartphone.,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 75, no. August, pp. 88–95, 2016.
- [128] D. Zhang and Q. Liu, “Biosensors and bioelectronics on smartphone for portable biochemical detection,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 75, pp. 273–284, 2016.
- [129] “[http://www.sony.net/Products/SC-HP/cx\\_news\\_archives/img/pdf/vol\\_65/imx081\\_091\\_111pq.pdf](http://www.sony.net/Products/SC-HP/cx_news_archives/img/pdf/vol_65/imx081_091_111pq.pdf).” [Online]. Available: [http://www.sony.net/Products/SC-HP/cx\\_news\\_archives/img/pdf/vol\\_65/imx081\\_091\\_111pq.pdf](http://www.sony.net/Products/SC-HP/cx_news_archives/img/pdf/vol_65/imx081_091_111pq.pdf). [Accessed: 27-Jul-2016].
- [130] R. Schuhmann and T. Thöniß, “Telezentrische Systeme für die optische Meß- Und Prüftechnik,” *Tech. Mess.*, vol. 65, no. 4, pp. 131–136, 1998.
- [131] J. G. Walter and F. Stahl, “Aptamere in der Biosensorik,” *Chemie-Ingenieur-Technik*, vol. 80, no. 6, pp. 771–781, 2008.
- [132] C. Reinemann, “Aptamere als neue molekulare Erkennungselemente in Biosensoren,” pp. 8–15, 2007.
- [133] S. Song, L. Wang, J. Li, C. Fan, and J. Zhao, “Aptamer-based biosensors,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 27, no. 2, pp. 108–117, 2008.
- [134] D. M. Tasset, M. F. Kubik, and W. Steiner, “Oligonucleotide Inhibitors of Human Thrombin that Bin Distinct Epitodes,” *J. Mol. Biol.*, vol. 272, pp. 688–698, 1997.
- [135] C. Liu, D. Cui, and H. Li, “A hard-soft microfluidic-based biosensor flow cell for SPR imaging application,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 1, pp. 255–261, 2010.
- [136] C. J. Choi, I. D. Block, B. Bole, D. Dralle, and B. T. Cunningham, “Label-Free Photonic Crystal Biosensor Integrated Microfluidic Chip for Determination of Kinetic Reaction Rate Constants,” *Sensors Journal, IEEE*, vol. 9, no. 12, pp. 1697–1704, 2009.
- [137] A. Brolo, “Plasmonics for future biosensors,” *Nat. Photonics*, vol. 6, no. November, pp. 709–713, 2012.
- [138] R. C. Stevens, S. D. Soelberg, S. Near, and C. E. Furlong, “Detection of cortisol in saliva with a flow-filtered, portable surface plasmon resonance biosensor system,” *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 17, pp. 6747–6751, 2008.
- [139] D. Janasek, J. Franzke, and A. Manz, “Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems.,” *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 374–380, 2006.
- [140] T. A. Crowley and V. Pizziconi, “Isolation of plasma from whole blood using planar microfilters for lab-on-a-chip applications.,” *Lab Chip*, vol. 5, no. 9, pp. 922–9, 2005.

- [141] L. M. Bonanno and L. A. DeLouise, "Whole blood optical biosensor," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 23, no. 3, pp. 444–448, 2007.
- [142] J. N. Kuo and Y. H. Zhan, "Microfluidic chip for rapid and automatic extraction of plasma from whole human blood," *Microsyst. Technol.*, vol. 21, no. 1, pp. 255–261, 2013.
- [143] C. Liu, M. Mauk, R. Gross, F. D. Bushman, P. H. Edelstein, R. G. Collman, and H. H. Bau, "Membrane-based, sedimentation-assisted plasma separator for point-of-care applications," *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 21, pp. 10463–10470, 2013.
- [144] W. Barnes, T. Preist, S. Kitson, and J. Sambles, "Physical origin of photonic energy gaps in the propagation of surface plasmons on gratings," *Phys. Rev. B*, vol. 54, no. 9, pp. 6227–6244, 1996.
- [145] Y. Nakato, H. Ogawa, K. Morita, and H. Tsubomura, "Luminescence spectra from n-type titanium dioxide and n-type strontium titanate (SrTiO<sub>3</sub>) semiconductor electrodes and those doped with transition-metal oxides as related with intermediates of the photooxidation reaction of water," *J. Phys. Chem.*, vol. 90, no. 23, pp. 6210–6216, 1986.
- [146] V. N. Kuznetsov and N. Serpone, "Visible light absorption by various titanium dioxide specimens," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, no. 50, pp. 25203–25209, 2006.
- [147] "www.leica-microsystems.com/de/fluoscout/." [Online]. Available: [www.leica-microsystems.com/de/fluoscout/](http://www.leica-microsystems.com/de/fluoscout/). [Accessed: 25-Jun-2016].



# Eigene Publikationen

- [148] **S. Jahns**, M. Bräu, B.-O. Meyer, T. Karrock, S. B. Gutekunst, L. Blohm, C. Selhuber-Unkel, R. Buhmann, Y. Nazirizadeh, and M. Gerken, “Handheld imaging photonic crystal biosensor for multiplexed, label-free protein detection,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 6, no. 10, p. 3724, 2015.
- [149] **S. Jahns**, S. B. Gutekunst, C. Selhuber-Unkel, Y. Nazirizadeh, and M. Gerken, “Human blood microfluidic test chip for imaging, label-free biosensor,” *Microsyst. Technol.*, vol. 22, no.7, pp. 1513 - 1518, 2016.
- [150] L. T. Neustock, **S. Jahns**, J. Adam, and M. Gerken. “Optical waveguides with compound multiperiodic grating nanostructures for refractive index sensing,” *Journal of Sensors*, 501, 6174527, 2016.



# Konferenzbeiträge/-präsentationen

- [151] **S. Jahns**, Y. Nazirizadeh, B. Meyer, S. B. Gutekunst, C. Selhuber-Unkel, M. Gerken, “Photometric Aptasensor using Biofunctionalized Photonic Crystal Slabs,” *Proc. IEEE Sensors 2013*, Baltimore (USA), 03. – 06. November 2013, Posterpräsentation.
- [152] **S. Jahns**, B. Meyer, K. Thilsing-Hansen, S. B. Gutekunst, C. Selhuber-Unkel, Y. Nazirizadeh, M. Gerken, “Multiparametric and Label-free Thrombin Detection with Photonic Crystal Aptasensor,” *EUROPT(R)ODE XII Conference*, Athen (Griechenland), 13. – 16. April 2014, Vortrag.
- [153] D. Threm, **S. Jahns**, Y. Nazirizadeh, M. Ziegler, M. Hansen, H. Kohlstedt, J. Adam, M. Gerken, “On the effect of broad-band, multi-angular excitation and detection in guided-mode resonance biosensors ,” *Proc. SPIE Photonics Europe*, Brüssel (Belgien), 14. – 17. April 2014, Vortrag.
- [154] **S. Jahns**, F. v. Oertzen, T. Karrock, Y. Nazirizadeh and M. Gerken, “Photonic Crystal Slabs for Biosensing,” *Proc. PIERS*, Guangzhou (China), 25. – 28. August 2014, Vortrag.
- [155] **S. Jahns**, P. Glorius, M. Hansen, Y. Nazirizadeh, and M. Gerken, “Imaging label-free biosensor with microfluidic system,” *Proc. SPIE Microtechnologies*, Barcelona (Spanien), 04. - 06. Mai 2015, Vortrag.
- [156] **S. Jahns**, C. Kallweit, J. Adam, M. Gerken, “Compound grating structures in photonic crystals for resonant excitation of azobenzene,” *SPIE Photonics West*, San Francisco (USA), 13. – 18. Februar 2016, Vortrag.
- [157] **S. Jahns**, L. Neustock, E. Moussavi, M. Gerken, “Plattformtechnologie für die mobile, markerfreie Proteindetektion,” *Proc. 18. GMA/ITG- Fachtagung Sensoren und Messsysteme 2016*, Nürnberg (Deutschland), 10. – 11. Mai 2016, Posterpräsentation.
- [158] **S. Jahns**, M. Gerken, “Imaging label-free biosensor for multiplexed protein detection,” *Proc. ICTON*, Trento (Italien), 10. – 14. Juli 2016, Vortrag.
- [159] M. Paulsen, L. T. Neustock, **S. Jahns**, J. Adam, M. Gerken, “Simulation Methods for Multiperiodic and Aperiodic Nanostructured Dielectric Waveguides,” *OWTNM 2016*, Warschau (Polen), 18. – 21. Mai 2016, Vortrag.
- [160] M. Paulsen, **S. Jahns**, L. T. Neustock, J. Adam, M. Gerken, “Properties of Deterministic Aperiodic Photonic Nanostructures for Biosensors,” *PECS-XII*, York (Großbritannien), 17. - 21. Juli 2016, Vortrag.
- [161] L. T. Neustock, M. Paulsen, **S. Jahns**, J. Adam, M. Gerken, “Simulation of Photonic Waveguides with Deterministic Aperiodic Nanostructures for Biosensing,” *Proc. ICEAA 2016*, Cairns (Australien), 19. – 23. September 2016, Vortrag.



# Betreute Abschlussarbeiten

Teile der in Kapitel 4 und 5 vorgestellten Ergebnisse wurden im Rahmen der von mir betreuten Abschlussarbeiten erzielt:

## **Bachelorarbeiten:**

- [1] Marlena Draheim,  
Messaufsatz für eine Smartphonekamera zur optischen Proteindetektion
- [2] Matthias Mischung,  
Herstellung und Charakterisierung eines homogenen und großflächigen photonischen Kristalls für die bildgebende Biosensorik
- [3] Dennis Knobbe,  
Entwicklung automatisierter Pumpenantriebe für ein integriertes Biochip-Kartuschensystem für die Point-of-Care Diagnostik
- [4] Ruprecht Reinke,  
Entwicklung einer Optik für die Smartphone-basierte Biosensorik
- [5] Andre Schönherr,  
Resonante Anregung von Molekülen auf photonischen Kristallen im blauen Spektralbereich
- [6] Ursula Hallmann,  
Design von Nanostrukturen zur Bestimmung der Brechungsindexdispersion von Flüssigkeiten

## **Masterarbeiten:**

- [7] Lars Thorben Neustock,  
Nanostrukturdesign zur Steigerung der Empfindlichkeit optischer Biosensoren
- [8] Jan Balke,  
Integriertes System für Fluoreszenzmessung mit organischer Optoelektronik
- [9] Marc Schikowski,  
Integriertes optoelektronisches System zur empfindlichen Messung von Fluoreszenzmarkern



# Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1.1: Schema von einem optischen Biosensor mit den einzelnen Möglichkeiten Rezeptor und Signalumwandler zu realisieren (nach [40]).</i>	<i>4</i>
<i>Abbildung 1.2: Konzept des hier präsentierten optischen Biosensors zur markerfreien und parallelen Detektion von mehreren Risikomarkern.</i>	<i>6</i>
<i>Abbildung 2.1: Typischer Signalverlauf eines optischen Sensors für den gesamten Anbindungsprozess eines Zielproteins an den Rezeptor mit anschließender Regeneration des Sensors (nach [47]).</i>	<i>11</i>
<i>Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines a) 1-dimensionalen, b) 2-dimensionalen und c) 3-dimensionalen photonischen Kristalls. Die Farben grau und blau repräsentieren Materialien mit unterschiedlichen Brechungsindices. Die periodische Wiederholung der zwei Materialien in ein oder mehrere Richtungen ist für die Eigenschaft von photonischen Kristallen entscheidend (nach [50]).</i>	<i>12</i>
<i>Abbildung 2.3: a) Planarer Wellenleiter auf einem Substrat und das Prinzip, wie Licht seitlich eingekoppelt wird und teilweise im Wellenleiter geführt wird (<math>n_A &lt; n_S &lt; n_H</math>); b) Schematische Darstellung der Modenprofile für die <math>TE_0</math>- und <math>TE_1</math>-Mode.</i>	<i>14</i>
<i>Abbildung 2.4: Schematische Darstellung eines planaren photonischen Kristalls mit einer linearen, 1-dimensionalen Gitterstruktur und der Winkeldefinition.</i>	<i>16</i>
<i>Abbildung 2.5: Schematische Darstellung von der Resonanzverschiebung bedingt durch die Erhöhung des effektiven Brechungsindex.</i>	<i>17</i>
<i>Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Fibonacci-, und Rudin-Shapiro- und der Morse-Folge realisiert als Gitterstruktur in photonischen Quasikristallen.</i>	<i>19</i>
<i>Abbildung 2.7: Funktionsprinzip zur Erzeugung von multiperiodischen Gitterstrukturen (links) und die aus der Simulation resultierenden Resonanzen zu den einzelnen Gitterstrukturen (rechts).</i>	<i>20</i>
<i>Abbildung 2.8: Funktionsprinzip eines Biosensors auf Basis eines 1D photonischen Kristalls.</i>	<i>21</i>
<i>Abbildung 2.9: Schematischer Aufbau eines photonischen Kristall-Wellenleiters.</i>	<i>22</i>
<i>Abbildung 2.10: Schematischer Aufbau eines planaren photonischen Kristall-Biosensors.</i>	<i>23</i>
<i>Abbildung 2.11: a) Funktionsprinzip von Fluoreszenz anhand eines Jabłoński Diagramms. b) Absorptions- und Emissionsspektrum eines Fluorophors und die resultierenden Intensitäten bei Anregung mit unterschiedlichen Wellenlängen (nach [83]).</i>	<i>24</i>
<i>Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Hauptschritte zur Herstellung des PDMS-Stempels. Zunächst wird der Master mit PDMS übergossen, dann das PDMS ausgehärtet und vom Master abgezogen.</i>	<i>32</i>

Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Nanostrukturübertragung auf Glas mit allen Hauptschritten, (1) Aufschleudern des Fotolacks, (2) Drücken des Stempels in den Fotolack, (3) Aushärten des Fotolacks durch UV-Licht-Bestrahlung, (4) Entfernen des Stempels vom ausgehärteten Fotolack und (5) Abscheiden des Wellenleitermaterials.....	33
Abbildung 3.3: REM-Aufnahme eines FIB-Schnittes durch die Nanostrukturen eines photonischen Kristalls mit $\Lambda= 370 \text{ nm}$ , $t=0,5$ , $d=60 \text{ nm}$ . .....	34
Abbildung 3.4: Schemazeichnung des Verhaltens von PDMS bei zu großem und zu kleinem Aspektverhältnis (nach [98])......	35
Abbildung 3.5: REM-Aufnahme eines FIB-Schnittes durch die Nanostrukturen eines photonischen Kristalls mit $\Lambda = 250 \text{ nm}$ , $t=0,38$ , $d =225\text{nm}$ . a) abgeformt mit h-PDMS, b) abgeformt mit reinem PDMS.....	38
Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der resultierenden Moleküle für jeden einzelnen Funktionalisierungsschritt .....	40
Abbildung 3.7: a) Fluoreszenzbild der Substratoberfläche nach der Kopplung zwischen silanisierter Oberfläche und den mit DAPI-modifizierten Mikrobeads; b) Mikroskopbild der Substratoberfläche nach der Kopplung zwischen den Mikrobeads und der zuerst silanisierter und dann Crosslinker-beschichteten Oberfläche. ....	42
Abbildung 3.8: Evaluierung der lokalen Funktionalisierung durch tropfenweises Aufbringen des Fluoreszenzfarbstoffes ATTO594, welcher mit einer Aminogruppe modifiziert ist. Dargestellt ist ein aus vier einzelnen Fluoreszenzbildern zusammengesetztes Foto. ....	43
Abbildung 3.9: (links) Schema von dem Funktionsprinzip zur lokalen Funktionalisierung mit Lackmaske; (rechts) Evaluierung der Funktionalisierung mit Lackmaske. Es wurde eine Lackmaske mit unterschiedlichen Figuren gewählt und hier ist das Fluoreszenzbild von einer Figur zu sehen. ....	44
Abbildung 4.1: Schematische Darstellung aller untersuchten Strukturen mit einer Übersicht der Designparameter ( $t=$ Tastverhältnis, $\Lambda=$ Gitterperiode, $d=$ Gittertiefe, $h=$ Dicke der Wellenleiterschicht).....	48
Abbildung 4.2: Aufbau der Simulationszelle in FDTD Solutions mit der Gitterstruktur im Substrat ( $n_s$ ), der Wellenleiterschicht ( $n_H$ ) und dem umgebenden Medium ( $n_A$ ). Der Monitor für die elektrische Feldstärke ist als gelbes Rechteck und die Fourier-Transformations-Monitore als gelbe Linien dargestellt. Der violette Pfeil spiegelt die Abstrahlrichtung der Anregungsquelle wieder.....	51
Abbildung 4.3: (a) Schema des Mikroskop-Spektrometer-Aufbaus zur winkelabhängigen Charakterisierung des photonischen Kristalls; b) Spektrum des hergestellten photonischen Kristalls ( $\Lambda = 370 \text{ nm}$ , $d = 60 \text{ nm}$ , $t = 0,5$ , $h = 85 \text{ nm}$ $\text{TiO}_2$ , $n_{\text{TiO}_2} = 2,44$ ) in Abhängigkeit der Wellenlänge und des Winkels $\theta$ mit einer Ausrichtung der Gitterstruktur parallel ( $\varphi = 90^\circ$ ) und (c) senkrecht ( $\varphi = 0^\circ$ ) zur x-Achse.....	52
Abbildung 4.4: (a) Schemazeichnung und (b) Foto des Reflexionsaufbaus für eine winkelabhängige Charakterisierung des photonischen Kristalls. Zur Anregung wird eine weiße	



<i>LED und zur Detektion eine Glasfaser, die in das Spektrometer eingekoppelt ist, verwendet. Zudem ist das Spektrum der LED unter (a) dargestellt. ....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 4.5: Funktionsprinzip eines Zirkularpolarisationsfilters bei (a) direkter Reflexion und (b) bei Modenauskopplung. ....</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 4.6: Spektrum des photonischen Kristalls in Abhängigkeit der Wellenlänge und des Einfallswinkels <math>\theta = \theta_E = \theta_A</math> mit einer Ausrichtung der Gitterstruktur (a) parallel (<math>\varphi = 90^\circ</math>) und (b) senkrecht (<math>\varphi = 0^\circ</math>) zur x-Achse. ....</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 4.7: Spektrum des photonischen Kristalls in Abhängigkeit der Wellenlänge für variierende Einfallswinkel bei festem Ausfallswinkel (a) <math>\theta_E = 15^\circ</math> und (b) <math>\theta_E = 30^\circ</math> mit einer zur x-Achse parallelen (<math>\varphi = 90^\circ</math>) Ausrichtung der Gitterstruktur. ....</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 4.8: Verteilung der elektrischen Feldstärke <math> E ^2</math> innerhalb eines monoperiodischen Gitters für (a) TM- und (b) TE-polarisierte Anregung. Die gestrichelte weiße Linie kennzeichnet die Gitterstruktur. ....</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 4.9: a) Elektrische Feldstärke <math> E ^2</math> und (b) Gesamtempfindlichkeit eines monoperiodischen Gitters (<math>\Lambda = 370</math> nm, <math>d = 60</math>) aufgetragen gegenüber der Schichtdicke und dem Tastverhältnis für TE-Polarisation. ....</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 4.10: a) Elektrischen Feldstärke <math> E ^2</math> und (b) Gesamtempfindlichkeit eines monoperiodischen Gitters (<math>\Lambda = 370</math> nm, <math>d = 60</math>) aufgetragen gegenüber der Schichtdicke und dem Tastverhältnis für TM-Polarisation. ....</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 4.11: Resonanzspektren photonischer Kristalle mit <math>\Lambda = 370</math> nm, <math>t = 0,5</math> und einer <math>\text{TiO}_2</math>-Schichtdicke von (a) <math>h_1 = 45</math> nm und (b) <math>h_2 = 85</math> nm. Zur Bestimmung der Gesamtempfindlichkeit befindet sich jeweils Luft und Wasser auf der Oberfläche. ....</i>	<i>61</i>
<i>Abbildung 4.12: Resonanzspektren von photonischen Quasikristallen mit ein-, zwei-, drei- und vierperiodischer Gitterstruktur und mit Luft und Wasser als umgebendes Medium. ....</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 4.13: Resonanzspektren der aperiodischen, photonischen Quasikristalle mit Luft und Wasser als umgebendes Medium. ....</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 4.14: Simulierte Resonanzspektren für die Rudin-Shapiro-Folge (a) mit vereinfachter Simulationsstruktur und (b) mit realitätsnäherer Simulationsstruktur [150]. c) Simuliertes Resonanzspektrum für die Fibonacci-Folge [161]. ....</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 4.15: Betragsquadrat der elektrischen Feldstärke an der Oberfläche und Betragsquadrat der elektrischen Feldverteilung innerhalb der Strukturen: (a) zwei-periodisches Gitter bei <math>\lambda_{\text{res}} = 600</math> nm, (b) Rudin-Shapiro-Folge bei <math>\lambda_{\text{res}} = 600</math> nm, (c) fünf-periodisches Gitter bei <math>\lambda_{\text{res}} = 600</math> nm und (d) Morse-Folge bei <math>\lambda_{\text{res}} = 552</math> nm. Weiße Linien kennzeichnen die obere und untere Seite der Hochindexschicht [157]. ....</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 4.16: Fotos von photonischen Quasikristallen (a) mit Morse-Folge und (b) vierperiodischem Gitter als Struktur. Die Fotos wurden mit dem Mikroskopaufbau zwischen gekreuzten Polarisationsfiltern bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen. ....</i>	<i>67</i>

Abbildung 4.17: Foto des photonischen Quasikristalls mit Morse-Folge wurde in seine Grundfarbwerte zerlegt. Gezeigt sind die daraus resultierenden Falschfarbenbilder des (a) blauen, (b) roten und (c) grünen Farbkanals.....68

Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des Detektionsverfahrens, um die Resonanzverschiebung als Intensitätsänderung sichtbar zu machen. Durch Nutzung der abfallenden, spektralen Flanke einer farbigen LED und der abfallenden Flanke der Kamera-Empfindlichkeit (Systemantwort) resultiert die Resonanzverschiebung bei Brechungsindexerhöhung in einer Intensitätsreduzierung. ....73

Abbildung 5.2: a) Kamerasensitivität (aus [122]), LED-Spektrum und Resonanzspektrum des photonischen Kristalls, aufgenommen mit gekreuzten Polarisationsfiltern. b) Schemazeichnung des photometrischen Messsystems. Die orangefarbenen Bereiche deuten die lokale Intensitätsreduzierung bedingt durch die Proteinanbindung an. c) Foto des photometrischen Messgeräts mit der LED, der Kamera, der gesamten Optik innerhalb des metallischen Gehäuses, dem Zu- und Ablauf für Analytwechsel, der Fluidzelle mit Biosensor und dem USB-Interface. d) CAD-Zeichnung des photometrischen Messgeräts. ....76

Abbildung 5.3: Resonanzverschiebung und beleuchtungsabhängige Intensitätsänderung hervorgerufen durch Brechungsindexänderung an der Oberfläche. Gemessen wurden diese Spektren mit dem photometrischen Messaufbau und einer Glasfaser anstelle der Kamera.....77

Abbildung 5.4: Intensitätsverlauf für eine Messreihe mit sukzessiv größer werdendem Glycerinanteil und somit größer werdenden Brechungsindex des Analyten. ....78

Abbildung 5.5: a) Falschfarben-Differenzbild erhalten durch Pixel-weißer Subtraktion des ersten Intensitätsbildes vom letzten aufgenommenen Intensitätsbild von der Sensoroberfläche. Drei Messfelder (M1-M3) und ein Referenzfeld (M4) sind durch gestrichelte Rechtecke markiert. b) Das arithmetische Mittel der Intensität innerhalb der entsprechenden Messfelder aufgetragen über die Bildnummer, die mit der Messzeit korreliert. ....79

Abbildung 5.6: a) Originales Falschfarbenbild der Sensoroberfläche mit der entsprechenden Verteilung des transmittierten Lichts und den Markierungen für die Messfelder. b) Das gleiche Intensitätsbild mit dem interpolierten Hintergrund. c) Nach der Driftkompensation wird die mittlere Intensität über alle Elemente innerhalb der Messfelder berechnet und über die Bildnummer aufgetragen. ....80

Abbildung 5.7: (links) Empfindlichkeitskurve des Kamerasensors für alle drei Farbkanäle; (rechts) Lichtspektrum der Smartphone-LED. ....82

Abbildung 5.8: Experimenteller Aufbau zur Validierung des Adapterdesigns. In der Seitenansicht ist die Position der Fluidzelle, in der sich der photonische Kristall befindet, unter dem Smartphone gezeigt und wie dieser kontrolliert gekippt wird (links). Von oben sind das Smartphone mit der App-Ansicht und der Bildaufnahme, den Zu- und Ablauf der zu analysierenden Flüssigkeit und der Messvorrichtung zur Bestimmung des Kippwinkels abgebildet (rechts).....83

Abbildung 5.9: Intensitätsverlauf über die Zeit während einer Wasser-Glycerin-Messung ( $\Delta n = 0,02$ ) gemessen mit dem Smartphoneaufbau. ....84

Abbildung 5.10: a) CAD-Bild des Diffusors aus Plexiglas. b) Realisierter Diffusor auf dem Smartphone platziert. Eine bessere Verteilung des LED-Lichtes über die Diffusorfläche konnte erreicht werden.....	85
Abbildung 5.11: Spektrum des photonischen Kristalls in Abhängigkeit der Wellenlänge und des Detektionswinkels bei festem Einfallswinkel von $20^\circ$ für (a) Luft, (b) Wasser und (c) 15%-Glycerin-Wasser-Lösung an der Oberfläche des photonischen Kristalls; d) Peakwellenlänge der Resonanzen aufgetragen über den Detektionswinkel für alle drei Analyten. ....	86
Abbildung 5.12: (links) CAD-Zeichnung des Smartphone-Adapters; (rechts) Bild des per 3D-Druck realisierten Smartphone-Adapters (Hintergrund) und der Fluidzelle (Vordergrund). ....	87
Abbildung 5.13: Intensitätsverlauf über die Zeit während einer Wasser-Glycerin-Messung gemessen mit dem optik-freien Smartphone-Adapte. Eine Brechungsindexänderung von $\Delta n=0,02$ resultiert in eine Intensitätsänderung von $\Delta I = 1,72\%$ . ....	88
Abbildung 5.14: Aufgenommenes Bild bei der Brechungsindexmessung mit dem optik-freien Smartphone-Adapter. Der ausgewählte Bereich für die Messung ist als rotes Rechteck markiert. ....	89
Abbildung 5.15: (links) Schematische Darstellung des Optik-Designs, wodurch das LED-Licht in den Strahlengang der Kamera geleitet wird und über die telezentrische Linse der photonische Kristall auf den Kamerasensor abgebildet wird; (rechts) Foto des realisierten Optik-Designs mit dem Smartphone auf der rechten Seite, der telezentrischen Linse in der Bildmitte und dem photonischen Kristall in der Fluidzelle auf der linken Bildseite. ....	90
Abbildung 5.16: (links) Schematische Darstellung des Optik-Designs, wodurch das LED-Licht in den Strahlengang der Glasfaser geleitet wird und über die telezentrische Linse das aus dem Kristall ausgekoppelte Licht in die Glasfaser fokussiert wird. (rechts) Foto von dem realisierten Optik-Design mit der Glasfaser und der LED auf der rechten Seite, der Linse in der Bildmitte und dem photonischen Kristall in der Fluidzelle auf der linken Bildseite. ....	91
Abbildung 5.17: Funktionsprinzip eines polarisierenden Strahlteilers. Das transmittierte Licht wird p-polarisiert und das abgelenkte Licht s-polarisiert. ....	92
Abbildung 5.18: (links) Resonanzspektren gemessen mit dem Reflexionsaufbau. Es werden polarisierender Strahlteiler und anti-reflexionsbeschichteter Strahlteiler mit Zirkularpolarisationsfilter verglichen. (rechts) Reflexionsspektren für verschiedene Analyten mit unterschiedlichen Brechungsindices in der Fluidzelle aufgenommen mit Strahlteiler und Zirkularpolarisationsfilter.....	93
Abbildung 5.19: Intensitätsverlauf über die Zeit während einer Wasser-Glycerin-Messung gemessen mit dem Optikaufbau und Smartphone. Eine Brechungsindexänderung von $\Delta n = 0,02$ resultiert in eine Intensitätsänderung von $\Delta I = 0,43\%$ . ....	94
Abbildung 5.20: Aufgenommenes Bild bei der Brechungsindexmessung mit dem telezentrischen Optikaufbau und Smartphone. Der ausgewählte Bereich für die Messung ist als rotes Rechteck markiert. ....	94

Abbildung 5.21: Resonanzspektrum des für die Thrombindetektion verwendeten Kristalls. Der verfolgte Resonanzpeak ist durch den Pfeil markiert.....	96
Abbildung 5.22: Verschiebung der Resonanzwellenlänge hervorgerufen durch die Assoziation, Dissoziation und Regeneration während der Thrombindetektion in zwei hintereinander durchgeführten Messzyklen. ....	97
Abbildung 5.23: Assoziations-, Dissoziations- und Regenerationsphasen sind bei der Detektion von 250 nM mit dem Kamera-basierten Messsystem in dem Intensitätsverlauf über die Zeit sichtbar.....	98
Abbildung 5.24: Differenzbild zwischen dem ersten Intensitätsbild und dem Bild am Ende der Assoziationsphase. Die Positionierung der Aptamere ist mit den gestrichelten Kreisen markiert. ....	99
Abbildung 5.25: Assoziations-, Dissoziations- und Regenerationsphasen sind bei der Detektion von 250 nM Thrombin für unterschiedlich lange Aptamere in deren Intensitätsverläufen über die Zeit sichtbar.....	100
Abbildung 5.26: a) Differenzbild nach der Assoziation von CD40 Ligand Antikörper. b) Differenzbild nach der Assoziation von EGF Antikörper. d) Differenzbild nach der Assoziation von BSA-Biotin.....	101
Abbildung 5.27: Die Anbindung von zuerst 90 nM CD40 Ligand Antikörper (Anti-CD40L), dann von 90 nM EGF Antikörper (Anti-EGF) und abschließend von 500 nM Streptavidin sind in der normierten Intensität des transmittierten Lichts zu erkennen. ....	102
Abbildung 5.28: a) Differenzbild mit den einzelnen weiß markierten Messfeldern (M1-M6) und dem Referenzfeld. b) Intensitätswerte der Messfelder über die Zeit aufgetragen.....	103
Abbildung 5.29: Differenzbild mit den einzelnen weiß markierten Messfeldern (M1-M4) und dem Referenzfeld. b) Intensitätswerte aller Messfelder und dem Referenzfeld über die Zeit aufgetragen.....	103
Abbildung 5.30: Mittelwerte und Standardabweichung aller gemessenen Intensitätsamplituden für jede einzelne Proteindetektion. ....	104
Abbildung 6.1: (a) CAD-Zeichnung des Mikrofluidik-Chips mit dem Hauptchip (oben), der den Einfüllstutzen für das Blut, die Kapillarkanäle für den Bluttransport sowie der Aussparung für den Sensor beinhaltet, und mit dem Deckel (unten), in dem der Blutfilter und die Klebefolie zur Sensorbefestigung integriert sind. (b) Bild des realisierten, mikrofluidischen Testchips.....	109
Abbildung 6.2: a) Injektion des Blutes in den Testchip über (b) die Filterung bis (c) zum Transport des klaren Blutplasmas zum Sensorfeld. ....	110
Abbildung 6.3: a) Mikroskopaufnahme des gefilterten Bluts (Blutplasma) innerhalb des Sensorfelds. b) Mikroskopaufnahme unterhalb des Filters mit den zurück gehaltenen roten Blutkörperchen im Vordergrund und der Filterstruktur im Hintergrund.....	111
Abbildung 6.4: a) Fluoreszenzfoto von den 1 µm großen Partikeln innerhalb des Sensorfeldes. b) Fluoreszenzfoto von den 3 µm großen Partikeln innerhalb der Filtermembran. ....	112

Abbildung 6.5: Foto des Messaufbaus für eine Brechungsindexmessung mit dem Testchip und dem Kamera-basierten Messgerät. ....	113
Abbildung 6.6: a) Bild des Sensorfelds. Die Messfelder M1 und M2 sind mit gestrichelten Linien markiert. b) Mittlere Intensitätswerte innerhalb der Messfelder für jedes Bild berechnet und gegenüber der Zeit aufgetragen. ....	113
Abbildung 6.7: Beispiel von Differenzbildern für bestimmte Zeitpunkte bei der Brechungsindexmessung mit Wasser und Isopropanol. ....	114
Abbildung 6.8: Differenzbilder zwischen verschiedenen Zeitpunkten. a) Bild bei Minute 4,8 minus das Bild bei Minute 2,23. Es befindet sich nur Wasser in der Sensorkammer. b) Bild bei Minute 7,20 minus das Bild bei Minute 6,74. Injektion des Isopropanols. c) Bild bei Minute 13,32 minus das Bild bei Minute 10,55. Es befindet sich nur Isopropanol in der Sensorkammer. ....	115
Abbildung 6.9: a) Differenzbild des Sensorfeldes zwischen dem ersten und dem letzten aufgenommenen Bild mit den Messfeldern M1 und M1 und dem Referenzfeld markiert mit gestrichelten Linien. b) Gemittelte Intensität über die Pixel innerhalb der einzelnen Mess- und Referenzfelder aufgetragen über die Zeit. ....	117
Abbildung 6.10: Hintergrundbereinigte Intensitätsverläufe nach der Anwendung des Algorithmus aus Kapitel 5.1.3. ....	117
Abbildung 6.11: a) Differenzbild zwischen dem ersten und letzten Bild bei der Biotindetektion in Blut mit dem Testchip. b) Gemittelte Rohintensität über die Pixel innerhalb des Mess- und Referenzfeldes aufgetragen über die Zeit. c) Hintergrundbereinigte Intensitätsverläufe nach der Anwendung des Algorithmus aus Kapitel 5.1.3. ....	118
Abbildung 7.1: a) Schematische Darstellung des Spektrometeraufbaus zur Charakterisierung der nanostrukturierten Wellenleiter. Durch die Positionierung des Kristalls zwischen zwei gekreuzte Polarisationsfilter wird nahezu das gesamte Anregungslicht der Mikroskoplampe geblockt und nur das Licht der Resonanzen wird über das Mikroskopobjektiv zum Spektrometer geleitet. b) Schematische Darstellung eines monoperiodischen Gitters mit einer Übersicht aller untersuchten Designparameter ( $t$ = Tastverhältnis, $\Lambda$ = Gitterperiode, $d$ = Gittertiefe, $h$ = Dicke der Wellenleiterschicht). ....	122
Abbildung 7.2: (a) experimentelle und (b) simulierte Spektren der TE-Resonanz für verschiedene Gitterperioden $\Lambda = [180 \text{ nm}, \dots, 250 \text{ nm}]$ ( $t = 0,3$ , $d = 60 \text{ nm}$ , $h = 85 \text{ nm}$ , $n = 2,44$ ). c) TE-Resonanzspektren eines photonischen Kristall mit einer Gitterperiode von $\Lambda = 250 \text{ nm}$ für unterschiedliche Gittertiefen $d = [10 \text{ nm}, \dots, 100 \text{ nm}]$ ( $h = 85 \text{ nm}$ , $n = 2,44$ ). ....	124
Abbildung 7.3: TE <sub>0</sub> - und TM <sub>0</sub> -Resonanzen eines monoperiodischen Gitters ( $\Lambda = 250 \text{ nm}$ , $d = 60 \text{ nm}$ , $t = 0,8$ , $90 \text{ nm TiO}_2$ ) gegenüber der Wellenlänge und des Anrege- bzw. Kippwinkels $\theta$ aufgetragen. Die Resonanzintensitäten werden durch die Falschfarben wiedergegeben. ....	125
Abbildung 7.4: Resonanzspektren hergestellter, monoperiodischer Gitter mit gleicher Gitterperiode $\Lambda = 250 \text{ nm}$ und variierendem Tastgrad $0,2 \leq t \leq 0,8$ . ....	126

Abbildung 7.5: Experimentell ermittelte Spektren photonischer Kristalle ( $\Lambda = 250 \text{ nm}$ , $h = 85 \text{ nm}$ $\text{TiO}_2$ ( $n_{\text{TiO}_2} = 2,44$ ), $d = 60 \text{ nm}$ ) in Abhängigkeit der Wellenlänge und des Kippwinkels $\theta$ mit einem Tastverhältnis von (a) $t = 0,8$ , (b) $t = 0,5$ und (c) $t = 0,2$ .	127
Abbildung 7.6: Elektrische Feldstärke $ \mathbf{E} ^2$ und die Güte $Q$ der simulierten $\text{TE}_0$ -Resonanz aufgetragen über das Tastverhältnis für ein Gitter mit $\Lambda = 200 \text{ nm}$ , $d = 60 \text{ nm}$ , $h = 85 \text{ nm}$ .	127
Abbildung 7.7: Elektrische Feldstärke $ \mathbf{E} ^2$ und Peakwellenlängen aufgetragen gegenüber der Schichtdicke für (a) $\text{TM}$ - und (b) $\text{TE}$ - Resonanz. Die Gitterparameter betragen hier $\Lambda = 200 \text{ nm}$ , $t = 0,3$ , $d = 60 \text{ nm}$ .	129
Abbildung 7.8: Das Absorptions- (Abs. $\text{TiO}_2$ ) [146] und Emissionsspektrum (Em. $\text{TiO}_2$ ) [145] von $\text{TiO}_2$ zusammen mit den Transmissionsspektren des Fluoreszenzfilters (Em. Leica, Abs. Leica) und den Resonanzspektren der photonischen Kristalle, die sich auf einem Substrat befinden.	130
Abbildung 7.9: Lumineszenzbilder vom Übergang zwischen strukturierten und unstrukturierten Bereich. Die Strukturen besitzen eine Gitterperiode von (a) $\Lambda = 250 \text{ nm}$ , (b) $\Lambda = 230 \text{ nm}$ und (c) $\Lambda = 210 \text{ nm}$ . Es ist eine deutliche Lumineszenzsteigerung des $\text{TiO}_2$ durch die Gitterstruktur zu verzeichnen.	131
Abbildung 7.10: Mittlere Intensitäten aus den Lumineszenzbildern für strukturierte und unstrukturierte Bereiche. Die Intensitätswerte wurden aus dem grünen Farbkanal der Bilder für jede Gitterperiode berechnet.	131
Abbildung 7.11: a) Das Absorptions- (Abs. $\text{TiO}_2$ ) [146] und Emissionsspektrum (Em. $\text{TiO}_2$ ) [145] von $\text{TiO}_2$ zusammen mit den Transmissionsspektren des Fluoreszenzfilters (Em. Leica, Abs. Leica) und den Resonanzspektren des photonischen Kristalls ( $\Lambda = 250 \text{ nm}$ , $t = 0,5$ , $d = 60 \text{ nm}$ , $h = 85 \text{ nm}$ ) für unterschiedliche Kippwinkel $\theta$ . b) Mittlere Intensitäten aus den resultierenden Lumineszenzbildern bei unterschiedlichen Kippwinkeln für strukturierte und unstrukturierte Bereiche.	133
Abbildung 7.12.: Simulierte (nur $\text{TE}$ ) und experimentell ermittelte Resonanzspektren eines zweiperiodischen Gitters mit $\Lambda_1 = 200 \text{ nm}$ , $\Lambda_2 = 250 \text{ nm}$ , $t_1 = t_2 = 0,3$ , Schichtdicke von $h = 70 \text{ nm}$ und Tiefe von $d = 60 \text{ nm}$ .	134
Abbildung 7.13: Elektrische Feldstärke $ \mathbf{E} ^2$ und Peakwellenlängen aufgetragen gegenüber der Schichtdicke für (a) $\text{TM}$ - und (b) $\text{TE}$ - Resonanzen des zweiperiodischen Gitters.	135
Abbildung 7.14: Elektrische Feldstärke für $\text{TE}$ -Resonanz (a) mit geringerer Resonanzwellenlänge ( $\lambda_{R1}$ ) und (b) mit höherer Resonanzwellenlänge ( $\lambda_{R2}$ ). Es werden die Tastverhältnisse jedes Ausgangsgitters eines zweiperiodischen Gitters gegeneinander aufgetragen.	135
Abbildung 7.15: Elektrische Feldstärke für $\text{TM}$ -Resonanz (a) mit geringerer Resonanzwellenlänge ( $\lambda_{R1}$ ) und (b) mit höherer Resonanzwellenlänge ( $\lambda_{R2}$ ). Es werden die Tastverhältnisse jedes Ausgangsgitters eines zweiperiodischen Gitters gegeneinander aufgetragen.	136

# Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 4.1: Experimentell ermittelte Gesamtempfindlichkeiten <math>S</math> und Halbwertsbreite der ein-, zwei-, drei- und vierperiodischen Strukturen und die ausgewertete Peakwellenlänge <math>\lambda_{peak}</math> bei Luft.....</i>	<i>63</i>
<i>Tabelle 4.2: Experimentell ermittelte Gesamtempfindlichkeiten <math>S</math> der verschiedenen aperiodischen Strukturen und die ausgewertete Peakwellenlänge <math>\lambda_{peak}</math>.....</i>	<i>65</i>





# Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

## Abkürzungen

Anti-CD40L	CD40 Ligand Antikörper
Anti-EGF	EGF Antikörper
APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilan
AR	Antireflexion
BSA	Bovine Serum Albumin
BSA-Biotin	biotinyliertes Bovine Serum Albumin
CAD	Computer-unterstütztes Design (engl. <i>computer aided design</i> )
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CMOS	Complementary metal-oxide-semiconductor
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
DI	deionisiert
DMF	N,N- Dimethylformamid
DPBS	Phosphatpuffer
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FDTD	finite-difference time domain
FIB	fokussierter Ionenstrahl (engl. <i>focused ion beam</i> )
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FWHM	Halbwertsbreite der Resonanz (engl. <i>full width at half maximum</i> )
HCl	Hydrochlorid
HMS-301	Methylhydrosiloxan-Dimethylsiloxan-Kopolymer
h-PDMS	hard Polydimethylsiloxan
LED	Leuchtdiode
LOD	Detektionslimit (engl. <i>limit of detection</i> )
Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Ni(V)-Oxid
NH <sub>2</sub> -2xHEG- HD22	Aptamer, mit zwei Spacer zwischen Aminogruppe und Aptamer
NH <sub>2</sub> -HEG- HD22	Aptamer, mit einem Spacer zwischen Aminogruppe und Aptamer
OLED	organische Leuchtdiode
PDC	1,4-Phenylene Diisothiocyanat

PDMS	Polydimethylsiloxan
PML	perfekt angepasste Schichten (engl. <i>perfectly matched layers</i> )
PMMA	Polymethylmethacrylat
QGM	quasi-geführte Modes
RCWA	Methode der gekoppelten Wellen (engl. <i>rigorous coupled-wave analysis</i> )
REM	Rasterelektronenmikroskop
RIU	Einheit des Brechungsindex (engl. <i>refractive index unit</i> )
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (engl. <i>surface plasmon resonance</i> )
TE	transversal elektrisch
TiO <sub>2</sub>	Titandioxid
TM	transversal magnetisch
tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
USB	Universal Serial Bus
UV	Ultraviolett
VDT-731	Vinylmethylsiloxan-Dimethylsiloxan-Kopolymer

# Symbole

$\vec{B}$	magnetische Flussdichte
$\vec{D}$	elektrische Flussdichte
$\vec{E}$	elektrische Feldstärke
$ \vec{E} ^2$	Mittelwert der elektrischen Feldstärke
$\vec{H}$	magnetische Feldstärke
$\vec{j}$	elektrische Stromdichte
$\rho$	elektrische Raumladungsdichte
$\epsilon_0$	elektrische Feldkonstante im Vakuum
$\epsilon_r$	relative Permittivität
$\mu_0$	magnetische Feldkonstante im Vakuum
$\mu_r$	relative Permeabilität
$c_0$	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum
$c$	Lichtgeschwindigkeit im Medium
$n$	Brechungsindex
$n_{eff}$	effektiver Brechungsindex
$n_S$	Brechungsindex des Substrats
$n_H$	Brechungsindex des Wellenleiters
$n_A$	Brechungsindex des umgebenden Mediums
$\vec{R}$	beliebiger Gittervektor
$\vec{r}$	Ortsvektor
$\vec{k}$	Wellenvektor
$k_0$	Betrag des Wellenvektors
$k_{Gx}$	Gittervektor
$\omega$	Kreisfrequenz
$\lambda_0$	Lichtwellenlänge im Vakuum
$\lambda_{res}$	zentrale Resonanzwellenlänge
$\theta$	Einfallswinkel des Lichts
$\varphi$	Winkel zwischen Ausbreitungsrichtung und Gitterlinien
$m$	Beugungsordnung
$h$	Dicke der Wellenleiterschicht
$\Lambda$	Periodizität
$a_i$	Anteil der Mode im Medium $i$
$S$	spektrale Empfindlichkeit des photonischen Kristalls

$Q$	Resonanzgüte
$t$	Tastverhältnis
$d$	Gittertiefe
$x_i$	Messwerte
$\bar{x}$	arithmetische Mittel
$N$	Anzahl der Messpunkte
$\sigma$	Standardabweichung
$I$	Intensität
$b$	Anzahl der Pixel
$p$	Anzahl der Bilder

# Anhang A

## Rezepte zur Sensor-Herstellung



## A.1 Herstellung von Nanostrukturen mit reinem PDMS

Nr.	Prozessschritt:	Prozessparameter:
1	PDMS anmischen	Sylgard 184, Curing Agent, 8:1 20 min mischen, Stufe 1-2 (IKA Tube Drive) PDMS auf Master gießen
2	Evakuieren	15-20 min im Vakuum evakuieren bis keine Blasen mehr im PDMS sind
3	Aushärten	20 min bei 130°C im Ofen oder 20-30 min bei 130°C auf der Heizplatte erhitzen
4	Ausschneiden	Gehärtetes PDMS vorsichtig vom Master trennen und zurechtschneiden
5	Substrate reinigen	Ultraschallbad 15 min Aceton, 15 min Isopropanol Stufe 3
6	Dehydrieren	Substrate mind. 10 min bei 160°C auf die Heizplatte, 2 min abkühlen
7	Spincoating Amoprime	150µl pro Substrat, Progr.: Amonil: 30sec, 3000rpm
8	Ausbacken Amoprime	2 min Heizplatte 115°C, 2 min abkühlen
9	Spincoating Amonil	150µl pro Substrat, Progr.: Amonil: 30 sec, 3000rpm
10	PDMS-Stempel auf belacktes Substrat	Stempel leicht andrücken, Blasen entlang der Gitterstruktur herausdrücken
11	Belichten	UV-Lampe 3min vorheizen, 1min belichten, Abstand 10cm
12	PDMS-Stempel abziehen	Vorsichtig entlang der Gitterstruktur abziehen
13	Sputtern des Wellenleiters	Schichtdicke:





## A2. Herstellung der Nanostruktur mit h-PDMS

Nr.	Prozessschritt:	Prozessparameter:
1.	h-PDMS anmischen	<u>Mischung:</u> 3,4g vinyl PDMS (VDT-731) 18µl Pt catalyst 1 Tropfen Tertamethyltetravinyl-cyclotetrasiloxane - per Hand mit Spatel gut vermischen
2.	h-PDMS fertig stellen	1g Hydrosilan Prepolymer (HMS-301) in die h-PDMS Lösung rühren
3.	Evakuieren	Mischung 2 Min. in Evakuierungskammer aus gasen
4.	h-PDMS auf Master verteilen	- Teflonform vorbereiten - Teflonform auf Master kleben - 200µl h-PDMS auf Master tropfen und gleichmäßig verteilen lassen
5.	h-PDMS aushärten	30 min bei 60°C
6.	PDMS anmischen	Sylgard 184, Curing Agent, 8:1 15 min mischen, Stufe 1-2 (IKA Tube Drive)
7.	Evakuieren	15-20 min im Vakuum evakuieren bis keine Blasen mehr im PDMS sind
8.	PDMS in Form gießen	-PDMS darüber gießen, so dass die Form komplett gefüllt ist
9.	Aushärten	60 min bei 60°C im Ofen
10.	Ausschneiden	-Master samt PDMS aus der Form schneiden -Gehärtetes PDMS vorsichtig vom Master trennen und zurechtschneiden
11.	PDMS auf Master verteilen	- Teflonform vorbereiten - Teflonform auf Master kleben - PDMS auf Master geben und gleichmäßig verteilen lassen

12.	Aushärten	20 min bei 130°C im Ofen erhitzen
13.	Ausschneiden	Gehärtetes PDMS vorsichtig vom Master trennen und zurechtschneiden
14.	Substrate reinigen	Ultraschallbad 5 min Aceton, 5 min Isopropanol Stufe 3
15.	Dehydrieren	Substrate mind. 10 min bei 160°C auf die Heizplatte, 2 min abkühlen
16.	Spincoating Amoprime	150µl pro Substrat, Progr.: Amonil: 30sec, 3000rpm
17.	Ausbacken Amoprime	2 min Heizplatte 115°C, 2 min abkühlen
18.	Spincoating Amonil	150µl pro Substrat, Progr.: Amonil: 30 sec, 3000rpm
19.	PDMS-Stempel auf belacktes Substrat	Stempel leicht andrücken, Blasen herausdrücken
20.	Belichten	UV-Lampe 3min vorheizen, 1min 20 sek belichten, Abstand 10cm
21.	PDMS-Stempel abziehen	Vorsichtig entlang der Gitterstruktur abziehen
22.	Aufspütern TiO <sub>2</sub>	Schichtdicke

### A3. Lokale Funktionalisierung mittels Spotten

Nr.	Prozessschritt:	Prozessparameter:	Bemerkungen:
1	Plasmaveraschen-Oberfläche aktivieren	5 Minuten 50W 8O2	
2	photonische Kristalle reinigen	5 min Ethanol, 5 min Methanol	in Glovebox
3	Silanisierung – Lösung herstellen	für 25 ml Lösung: Methanol: 24.75 ml APTES: 0.260 ml	in Glovebox
4	Silanisierung – Inkubation der Substrate in Lösung	60 min bei 20 °C inkubieren - mehrere Substrate in Becherglas mit Teflon-Halterung	in Glovebox
5	Reinigen	3x mit Methanol waschen (mit 5ml- Spritze spülen)	in Glovebox
6	Trocknen	20 min bei 110°C auf Hotplate 1 min abkühlen	in Glovebox
7	Crosslinker- Herstellung	PDC: 0,2g Pyridin: 1ml DMF: 9ml	
8	Crosslinker - Inkubation der Substrate in Lösung	2 h bei 20°C - in Petrischale	in Glovebox
9	Reinigen	3x mit Methanol waschen (mit 5ml- Spritze spülen)	in Glovebox
10	Trocknen	Für 15 min in Glovebox stellen und trocknen lassen	in Glovebox
11	Ansetzen der Immobilisierungslösung	<u>Im Reinraum:</u> BSA-Biotin: 1µl in 6,57µl Natriumacetatpuffer pH5,5 (= 1µM) EGF: 1µl in 99 µl Natriumacetatpuffer pH5,5	

		(= 1 $\mu$ M) CD40-Ligand: 1 $\mu$ l in 47 $\mu$ M Natriumacetatpuffer pH5,5 (= 1 $\mu$ M)	
<b>12</b>	Immobilisierung – Inkubation der Substrate	- 8 Tropfen a 0,5 $\mu$ l Lösung auf PCS aufbringen - Über Nacht in Feuchtkammer inkubieren lassen (Petrischale, Boden mit Wasser füllen, Substrat auf Teflonwürfel, Deckel auf Schale)	sterile gestopfte Spitzen
<b>13</b>	Proteinanbindung – Inkubation der Substrate	Über Nacht in Feuchtkammer (Petrischale, Boden mit Wasser füllen, Substrat auf Teflonwürfel, Deckel auf Schale),	
<b>14</b>	Reinigen	reichlich mit DPBS spülen	
<b>15</b>	Deaktivieren	Oberfläche mit Ethanolamin 1 M pH 8,5 benetzen und 30 min inkubieren lassen	Unter dem Abzug
<b>16</b>	Reinigen	reichlich mit DPBS spülen	
<b>17</b>	Deaktivieren	- 4mg BSA in 4ml DPBS lösen - Oberfläche des Kristalls benetzen - 30 Min inkubieren	Unter dem Abzug
<b>18</b>	Reinigen	reichlich mit DPBS spülen	

## A4. Funktionalisierung mittels Fotolackmaske

Nr.	Prozessschritt:	Prozessparameter:	Bemerkungen:
1.	Glassubstrate reinigen	5 min Ethanol, 5 min Methanol	in Glovebox
2.	Silanisierung – Lösung herstellen	für 25 ml Lösung: Methanol: 24.75 ml APTES: 0.260 ml	in Glovebox
3.	Silanisierung – Inkubation der Substrate in Lösung	60 min bei 20 °C inkubieren - mehrere Substrate in Becherglas mit Teflon-Halterung	in Glovebox 4 min länger
4.	Reinigen	3x mit Methanol waschen (mit 5ml- Spritze spülen)	in Glovebox
5.	Trocknen	20 min bei 110°C auf Hotplate 1 min abkühlen	in Glovebox
6.	Crosslinker- Herstellung	PDC: 0,2g Pyridin: 1 ml DMF: 9ml	
7.	Crosslinker - Inkubation der Substrate in Lösung	2 h bei 20°C - in Petrischale	in Glovebox
8.	Reinigen	3x mit Methanol waschen (mit 5ml- Spritze spülen)	in Glovebox
9.	Fotolack spincoaten	1000 µl AZ 1518 mit Pipette Spincoat-Programm: J.Greve AZ1518 (0-800 rpm, 2850 rpm 30s)	
10.	Fotolack trocknen	15 min bei Raumtemperatur	
11.	Belichten	UV-Intensität an 5 Stellen bestimmen Zeit= 50mJ/cm <sup>2</sup> / Ø UV- Intensität Prozess: Lithography Contact: Hard Al. Gap=100nm Wec: off	
12.	Entwickeln	30s im Entwickler AZ 726 MIF schwenken Im Fine-Rinser Entwicklung mit DI-Wasser stoppen	
13.	Hardbake	50s bei 120°C auf Hotplate 1 Minute abkühlen	

<b>14.</b>	Farbstoff lösen	60µl ATTO 594 in 360µl H <sub>2</sub> O	
<b>15.</b>	Anbindung von Farbstoff	Über Nacht in Feuchtkammer (Petrischale, Boden mit Wasser füllen, Substrat auf Teflonwürfel, Deckel auf Schale)	
<b>16.</b>	Reinigung	3x mit DI-Wasser waschen	
<b>17.</b>	Lack entfernen	in Aceton und in Isopropanol schwenken	
<b>18.</b>	Deaktivieren	Oberfläche mit Ethanolamin 1 M pH 8,5 benetzen und 30 min inkubieren lassen	Unter dem Abzug
<b>19.</b>	Reinigen	reichlich mit DPBS spülen	
<b>20.</b>	Deaktivieren	- 4mg BSA in 4ml DPBS lösen - Oberfläche des Kristalls benetzen - 30 Min inkubieren	Unter dem Abzug
<b>21.</b>	Reinigen	reichlich mit DPBS spülen	

## A5. Rezepte für Puffer- und Proteinlösungen

### Anmischung der Proteinlösung:

**BSA:** 1mg in 1ml DPBS → 15,03µM

**BSA-Biotin:** 1mg in 1ml DPBS → 15,03µM

**CD40-Ligand:** 50µg in 60µl ddH<sub>2</sub>O + 1µl BSA (steril) → 49 µM

**EGF:** 50µg in 60µl ddH<sub>2</sub>O + 1µl BSA (steril) → 49 µM

**Anti-EGF:** 100µg in 100µl ddH<sub>2</sub>O (steril) → 6,67 µM

**Anti-CD40 Ligand:** 100µg in 100µl ddH<sub>2</sub>O (steril) → 6,67 µM

### Tris- HCl- Puffer

#### **Stammlösung Tris:**

- (24,2 g Tris auf 1l DI- Wasser = 0,2 mol/l)
- 3,675 g Tris in 150ml DI- Wasser lösen

#### **Stammlösung HCl:**

- (212 µl 30% HCl + 10ml DI- Wasser= 0,2 mol/l)
- 3,816ml 30% Salzsäure- Lösung in 180ml DI- Wasser

#### **Zusammenstellung des Puffers:**

- 150ml von Tris- Lösung + x ml von HCl- Lösung  
→ pH- Wert von 7,4 einstellen
- Mit DI- Wasser auf 600ml auffüllen

### Carbonatpuffer

#### **Stammlösung Natriumcarbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>):**

- 2,12g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 50ml DI- Wasser lösen (=0,4M)

#### **Stammlösung Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>)**

- 20,16g in 600ml DI- Wasser lösen (=0,4M)

#### **Zusammenstellung des Puffers:**

- 10ml der Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>- Lösung + x ml der NaHCO<sub>3</sub>- Lösung  
→ pH- Wert von 8,3 einstellen





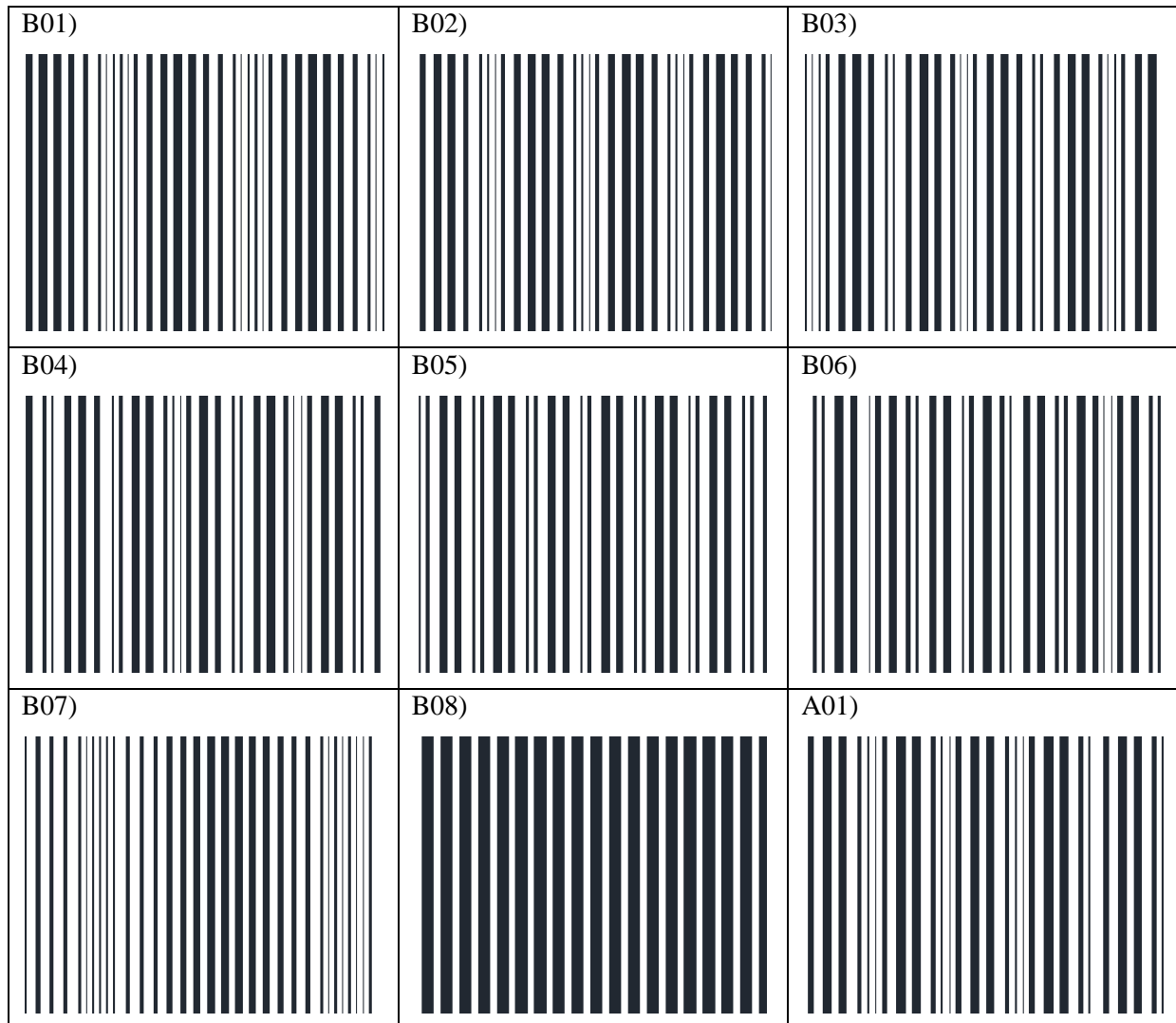
# Anhang B

## Design der verschiedenen Gitterstrukturen

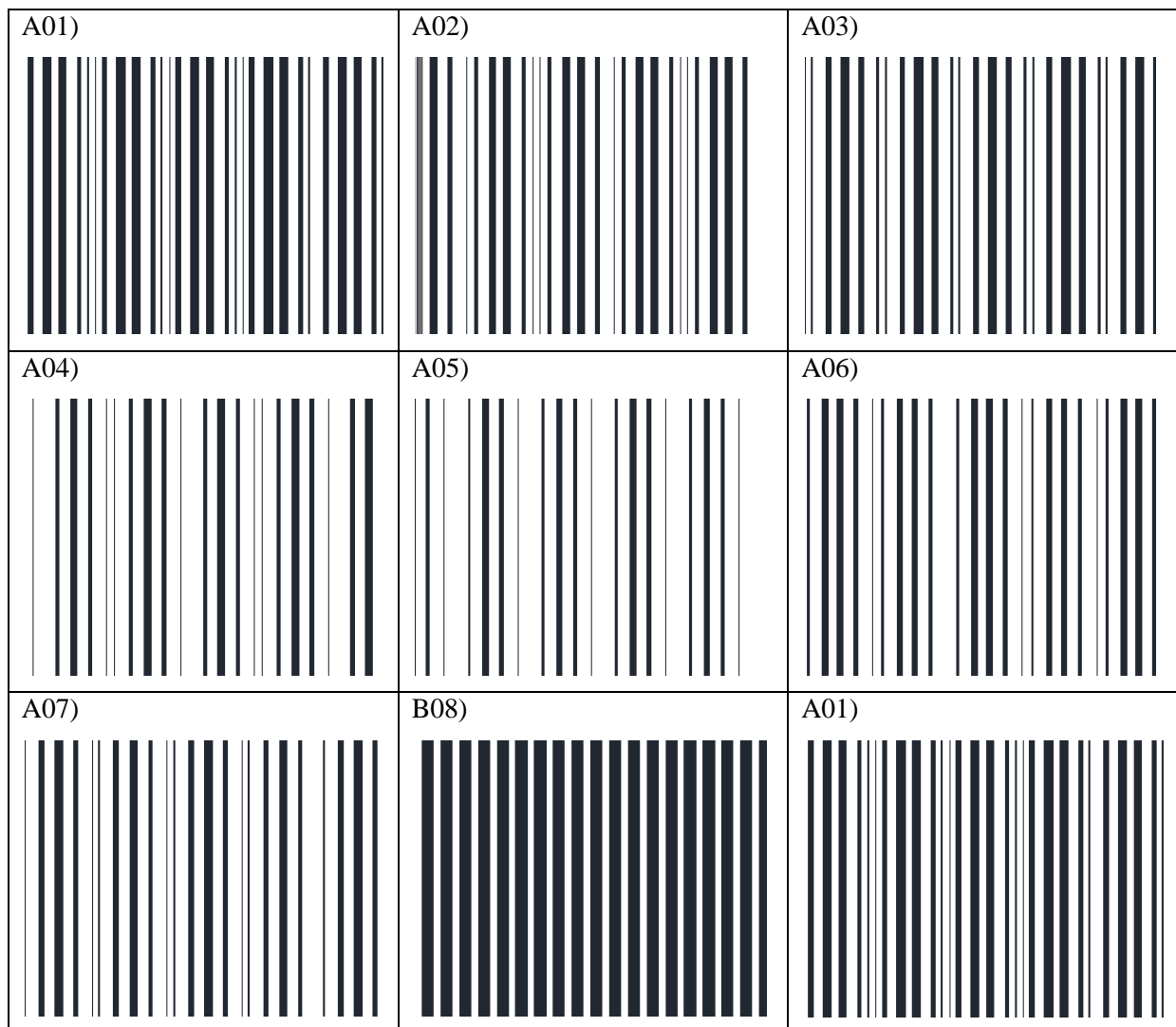


## B1. Gitterstrukturen für die resonante Anregung

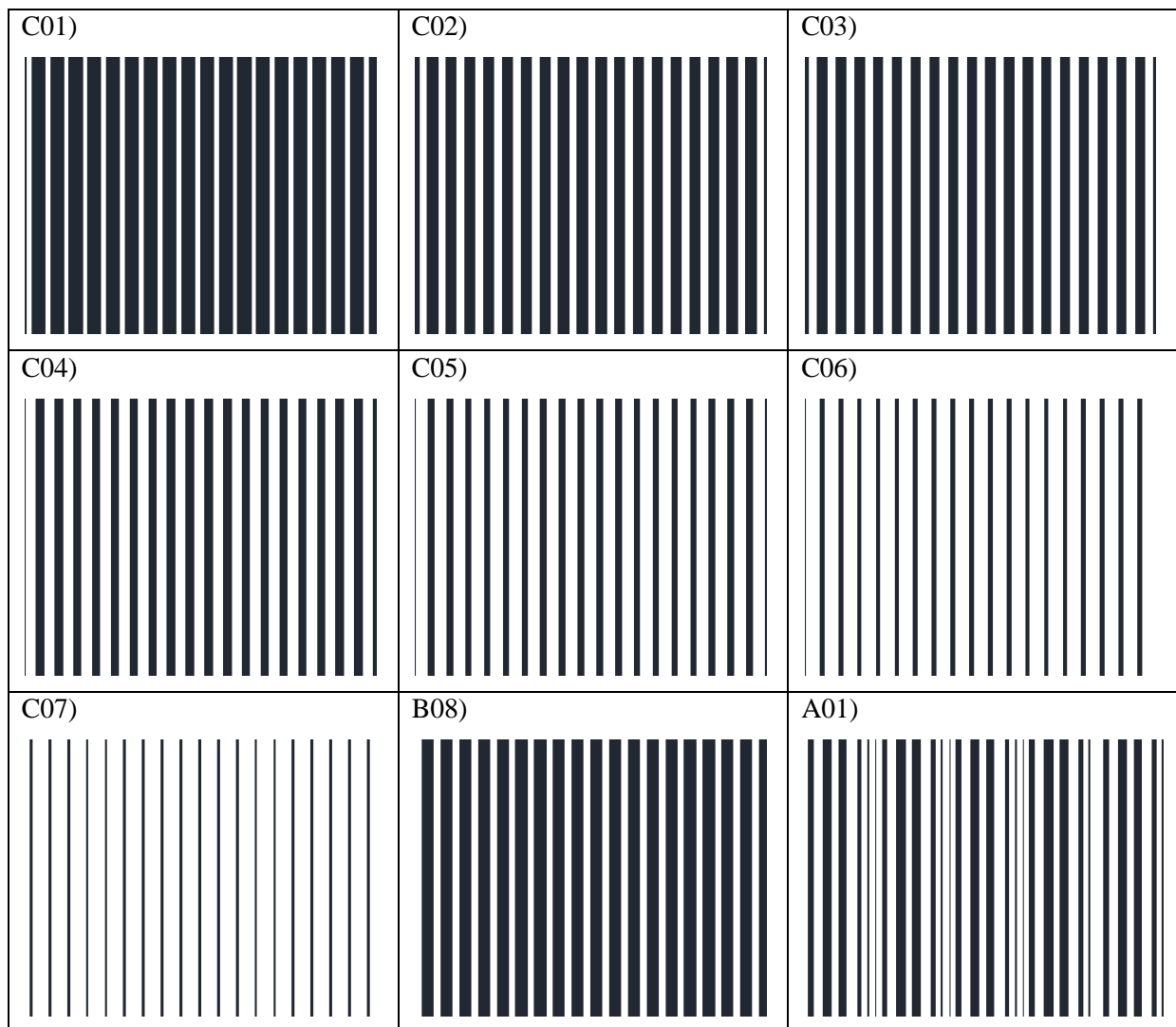
	Bezeichnung	$\Lambda_1$	$t_1$	$\Lambda_2$	$t_2$
<b>Master 1/ Feld B</b>	B09	180	0,3	190	0,3
	B01	180	0,3	200	0,3
	B02	180	0,3	210	0,3
	B03	180	0,3	220	0,3
	B04	180	0,3	230	0,3
	B05	180	0,3	240	0,3
	B06	180	0,3	250	0,3
	B08	250	0,3		
	A01	200	0,3	250	0,3



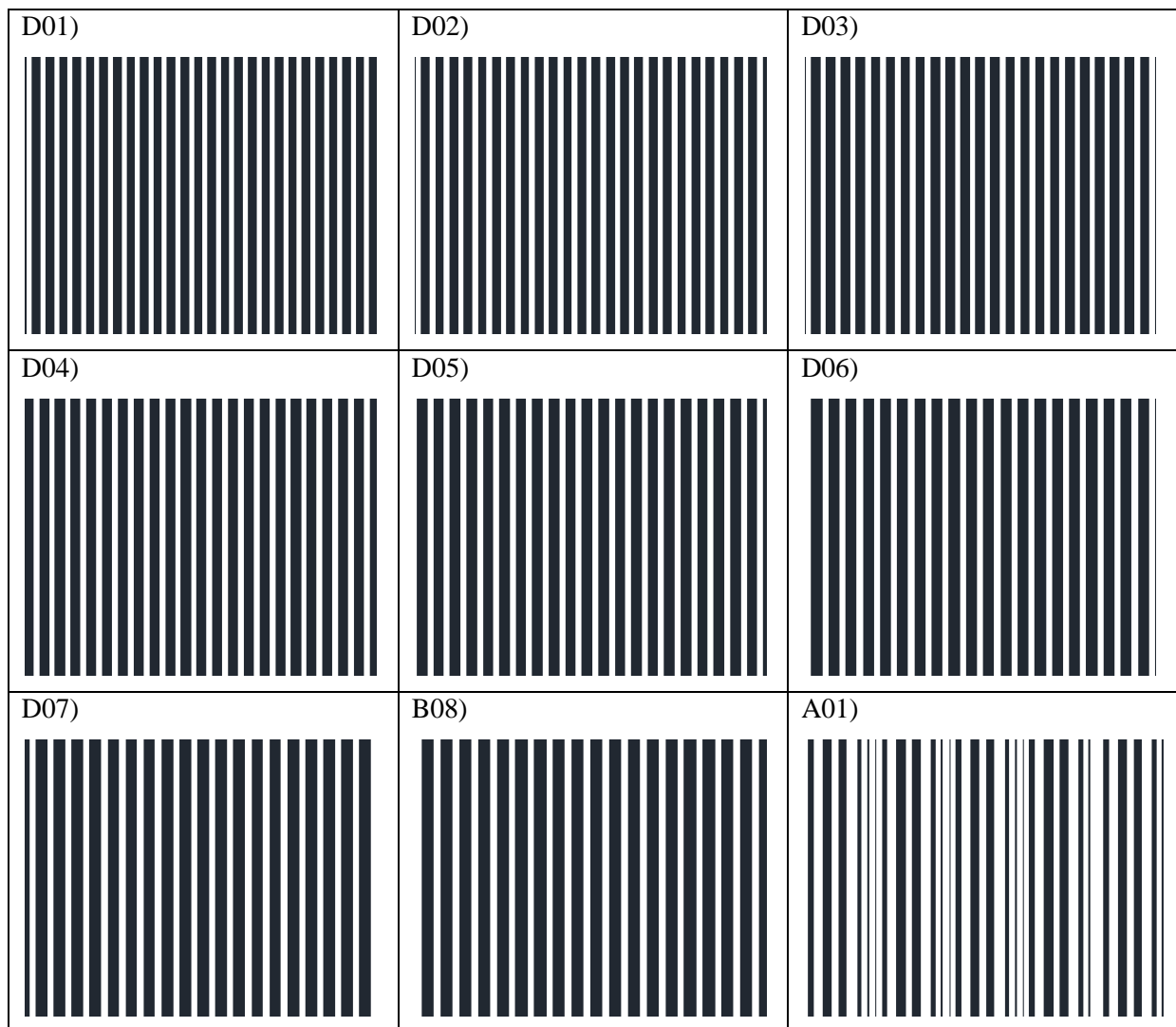
	Bezeichnung	$\Lambda_1$	$t_1$	$\Lambda_2$	$t_2$
<b>Master 2/ Feld A</b>	A01	200	0,3	250	0,3
	A03	200	0,3	250	0,4
	A02	200	0,4	250	0,3
	A04	200	0,4	250	0,5
	A05	200	0,5	250	0,5
	A06	200	0,5	250	0,3
	A07	200	0,3	250	0,5
	B08	250	0,3		
	A01	200	0,3	250	0,3



	Bezeichnung	$\Lambda_1$	$t_1$	$\Lambda_2$	$t_2$
<b>Master 3/ Feld C</b>	C01	250	0,2		
	C02	250	0,35		
	C03	250	0,4		
	C04	250	0,5		
	C05	250	0,6		
	C06	250	0,7		
	C07	250	0,8		
	B08	250	0,3		
	A01	200	0,3	250	0,3












	Bezeichnung	$\Lambda_1$	$t_1$	$\Lambda_2$	$t_2$
<b>Master 3/ Feld D</b>	D01	180	0,3		
	D02	190	0,3		
	D03	200	0,3		
	D04	210	0,3		
	D05	220	0,3		
	D06	230	0,3		
	D07	240	0,3		
	B08	250	0,3		
	A01	200	0,3	250	0,3



## B2. Gitterstrukturen für die markerfreie Biosensorik

	Bezeichnung	$\Lambda_1$	$t_1$	$\Lambda_2$	$t_2$	$\Lambda_3$	$t_3$	$\Lambda_4$	$t_4$
<b>Master 1/ Feld G</b>	G09	250	0,3						
	G01			300	0,4				
	G02	250	0,3	300	0,4				
	G03	250	0,3	300	0,4	450	0,3		
	G04	250	0,3	300	0,4	450	0,3	500	0,3
	G05	250	0,3	300	0,4	350	0,3		
	G06	250	0,3	300	0,4	350	0,3	400	0,3
	G07	200	0,3	300	0,4	400	0,3		
	G08	200	0,3	300	0,4	400	0,3	500	0,3










G01	
G02	
G03	
G04	
G05	
G06	
G07	
G08	
G09	

	Bezeichnung	$\Lambda_1$	$t_1$	$\Lambda_2$	$t_2$	$\Lambda_3$	$t_3$
<b>Master 2/ Feld H</b>	H01	250	0,3	300	0,2	450	0,3
	H02	250	0,3	300	0,3	450	0,3
	H03	250	0,3	300	0,4	450	0,3
	H04	250	0,3	300	0,5	450	0,3
	H05	250	0,3	300	0,6	450	0,3
	H06	250	0,3	300	0,7	450	0,3
	H07	250	0,3	300	0,8	450	0,3
	H08	250	0,3	300	0,2		
	H09	300	0,2				





H01	
H02	
H03	
H04	
H05	
H06	
H07	
H08	
H09	



	Bezeichnung	Folge	$N$
<b>Master 3/ Feld E</b>	E01	Rudin- Shapiro	6
	E02		7
	E03		8
	E04	Morse	8
	E05		9
	E06		10
	E07	Fibonacci	12
	E08		13
	E09		14

E01	
E02	
E03	
E04	
E05	
E06	
E07	
E08	
E09	

	Bezeichnung	$\Lambda_1$	$t_1$	$\Lambda_2$	$t_2$	$\Lambda_3$	$t_3$	$\Lambda_4$	$t_4$
<b>Master 4/ Feld F</b>	F04	250	0,3	275	0,3	300	0,3	325	0,3
	F05	350	0,2	350	0,4	350	0,6		
	F06	250	0,3	350	0,7				
	F07	250	0,3	350	0,5				
	F08	250	0,5	350	0,5				
	F09	250	0,3						

F04	
F05	
F06	
F07	
F08	
F09	

# Anhang C

## Intensitätswerte der Proteindetektionen

Hier sind alle Intensitätswerte dargestellt, die bei der Detektion der verschiedenen Proteine mit dem Kamera-basierten Messgerät beobachtet wurden. Aus diesen Werten wurde die Statistik aus Abbildung 5.30 berechnet.

	<b>250nM Streptavidin</b>	<b>500nM Streptavidin</b>	<b>90nM Anti-CD40-Ligand</b>	<b>Anti EGF</b>	<b>250nM Thrombin (HEG-HD22)</b>	<b>250nM Thrombin (2HEG-HD22)</b>	<b>9nM Anti-CD40-Ligand</b>
<b>Intensität [%]</b>	0,95	1,41	2,55	4,15	1,18	1,33	0,38
	0,67	0,78	4,27	2,72	1,44	1	0,55
	0,63	1,91	1,3	2,9	1,41		0,78
	0,25		3,66	2,14	1,06		0,8
	0,63		2,34	1,35	1,06		
	0,31		2,71		1,04		
	2,54		3,63		1,26		
	0,51		3,93		1		
	1,6		4,49				
	0,8		6,01				
	1,49						
	0,8						